



Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Estudo do mecanismo de ação das moléculas agonistas e antagonistas para o tratamento do mal de Alzheimer e da depressão.

Érica Cristina Moreno Nascimento
Orientador: Prof. Dr. João Batista Lopes Martins

Brasília-DF
Dezembro de 2014

Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Estudo do mecanismo de ação das moléculas agonistas e antagonistas para o tratamento do mal de Alzheimer e da depressão.

Érica Cristina Moreno Nascimento
Orientador: Prof. Dr. João Batista Lopes Martins

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Química da
Universidade de Brasília, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Química, área de
concentração Físico-Química.

Brasília-DF
Dezembro de 2014



COMUNICADO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese de Doutorado do (a) aluno (a) **Érica Cristina Moreno Nascimento**, matrícula nº **09/0088611**, intitulada *“Estudo do mecanismo de ação das moléculas agonistas e antagonistas para o tratamento do mal de Alzheimer e da depressão”*, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 19 de dezembro de 2014.

Prof. Dr. João Batista Lopes Martins
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof. Dr. Ademir João Camargo
Membro Titular (UEG/Anápolis)

Prof. Dr. José Roberto dos Santos Politi
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof. Dr. Demétrio Antônio da Silva Filho
Membro Titular (IF / UnB)

Prof. Dr. Elton Anderson Santos de Castro
Membro Titular (UEG/Formosa)

Prof^a Dr^a Elaine Rose Maia
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 19 de dezembro de 2014.

*“Neste caminho, só custa dar o primeiro passo. Empréstimo
sem esperar nada em troca parece duro à natureza;
preferiríamos dar, porque o que damos já não nos pertence. ☸”*

(Santa Teresinha do Menino Jesus)

*À minha Família, que em seu seio
sempre me acolhe, na esperança do
retorno do meu sorriso.*

Agradecimentos

Agradeço ...

em primeiro lugar a Deus, pela oportunidade de estar viva e poder fazer dos meus dias, nem sempre doces, algo belo e prazeroso.

ao meu orientador de tese, Prof. João Batista Lopes Martins, pela confiança depositada em minha pessoa, pelos ensinamentos e exemplos, e por fazer todo o possível administrativamente para que eu pudesse realizar parte dos meus estudos no exterior;

aos meus colabores na Universitat Jaume I, Prof. Dr. Juan Andrés e Prof. Dr. Mónica Oliva, pela generosidade e esforços realizados durante meus estudos naquela universidade;

aos professores da Universidade de Brasília: Edgardo Garcia, Maria José Sales, Ricardo Gargano e José Roberto Politi;

aos professores da Universitat Jaume I: Sixte Safont, Javier Pernia, Vicente Moliner e Katarzyna Swiderek;

aos funcionários da secretaria do Instituto de Química especialmente Inocência e D. Chiquinha; também à Merche Campos do Departamento de Química Física y Analítica da UJI por toda ajuda e cuidados com minha pessoa;

aos membros da banca examinadora, que prontamente atenderam ao convite de avaliar este trabalho;

aos amigos do LQC que sempre estiveram por perto, pelas trocas de idéias e discussões sempre construtivas: Victor, Elton, Fernanda, Sérgio, Diego, Ítalo e também aos amigos do IQ, sempre queridos: Dino, Daniela, Júlia, Carol, Ludmila, Guilherme, Ernani e Sérgio;

aos amigos e colegas que a vida me presenteou ao chegar à Castellón, em especial: Carlos, Ana B., Neus, Ana M., Ana Cunha, Mateus, Amanda, Natacha, Natal, Natalia, Isabel, Kemel, Conchin, Tomás, Carmina, André, Lourdes, Maite, Laura, Christa, Vero, Leandra, Cléia e todos os amigos do EMTCCM.

aos amigos de toda a vida: Gilmar, Thais, Andrea, Sandra, Mariana, Lucas, Víctor, Leo, Clarissa, Nadir, Sandrinha, Lilian;

às amigas inesquecíveis: Irmã Magda, Irmã Maria das Dores e Eliane;

às minhas afilhadas queridas: Ana Clara e Cecília, por esperarem a dinda, sempre com um sorriso sem preço e com muito amor;

a Ibrahim, por sempre encontrar um caminho e me fazer sorrir;

à minha família, especialmente ao meu padrinho Emanuel, às minhas primas Elisama, Ana Paula, Denise e à minha tia Gilda, que durante minha ausência sempre estiveram presente;

às minhas irmãs Débora e Renata por me apoiar e me amar tanto. Em especial agradeço a minha Lililda, por toda ajuda, apoio, pela presença sempre amiga e pelo compartilhar das alegrias e dificuldades da vida,

à minha mãe, D. Suzana, por estar comigo todos os dias, por aprender a usar o computador para não me deixar sozinha enquanto eu estive longe de casa, por me amar e deixar que eu a ame cada dia mais;

a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho, e eu, por lapso de memória esqueci de mencionar;

ao CNPQ, UNESCO e à Generalitat Valenciana pelo apoio financeiro.

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é um tipo de demência degenerativa e progressiva de grande preocupação social. Estima-se hoje que, 45 milhões de pessoas no mundo apresentem algum tipo de demência, dentre essas, 25 milhões apresentam sintomas característicos da doença de Alzheimer. O estilo de vida imposto pela situação social e econômica e alterações no estado emocional causadas por traumas e doenças vêm contribuindo para o aumento dos casos de pessoas onde são observadas modificações no seu estado comportamental (estados depressivos: ED). Dados da Organização Mundial de Saúde indicam que mais de 20% da população mundial sofre fisiologicamente com alterações no seu estado emocional originando estados depressivos de alguma natureza. Por não terem suas causas determinadas e nem serem conhecidos os mecanismos que desencadeiem estas alterações nos estados neurológicos dos pacientes, estratégias de tratamento são empregadas para tentar sanar o problema, ou trazer melhora no estado de vida dos pacientes. As estratégias mais utilizadas para tratar pacientes com DA e ED estão relacionadas ao uso de drogas que atuam nas sinapses de maneira a inibir a função de enzimas responsáveis pela ativação e desativação dos neurotransmissores envolvidos diretamente nos processos que ocasionam as demências e o ED. A estratégia mais usada para tratar pacientes com DA é a terapia colinérgica, que consiste no uso de fármacos com ação inibitória frente à acetilcolinesterase (AChE) para impedir o decréscimo da concentração da acetilcolina nas fendas sinápticas. As drogas tacrina, donepezil, galantamina e a rivastigmina são drogas aprovadas para o tratamento da DA, classificadas como inibidoras da acetilcolinesterase (AChE). Outras drogas como o metrifonato, diclorvos, huperzina A, fenserina e o dímero da tacrina estão em fases de teste clínico. O tratamento clássico da depressão é feito com o uso de medicamentos que promovam o aumento da serotonina nas regiões sinápticas, seja inibindo a ação das enzimas monoamina oxidase A e monoamina oxidase B que degradam o neurotransmissor, seja pela inibição seletiva de recaptura deste neurotransmissor pelos receptores específicos a essa função. As drogas moclobemida, isocarboxazida, iproniazida, tranilcipromina, fenelzina foram amplamente utilizadas no tratamento de ED, porém seus efeitos colaterais severos as classificam como drogas restritas ao uso, caso outras drogas não sejam eficientes. As drogas inibidoras das isoformas da monoamina oxidase de segunda geração, Clorgilina, Nialamida selegilina e rasigilina foram desenvolvidas para amenizar o tratamento do ED. Na tentativa de produzir drogas multi-alvos foi proposta a droga híbrida ladostigil, como potente inibidor da acetilcolinesterase e da monoamina oxidase B. Neste trabalho, foram realizados diversos estudos teóricos quânticos no intuito de elucidar o perfil farmacofórico de conhecidas drogas empregadas no tratamento da DA e do ED. Para isso foram realizados cálculos no vácuo e em meio solvatado no nível semi-empírico e *ab initio* para determinação de parâmetros estruturais, eletrônicos e espaciais dos inibidores das enzimas. Outra série de estudos, simulando o ambiente intracelular *in silico*, foram também realizados para compreender o mecanismo de inibição da AChE, quando a enzima interage com alguns de seus inibidores. O método de multivariáveis de análise das componentes principais (PCA) foi aplicado a 20 parâmetros, das drogas citadas, para determinação do perfil farmacofórico dos inibidores das proteínas aqui estudadas. Os parâmetros foram obtidos através dos cálculos no vácuo e no modelo de solvatação CPCM em nível B3LYP/6-31+G(d,p). O estudo da PCA foi realizado para reduzir o espaço amostral de propriedades, a fim de obter as propriedades que são relevantes e comuns entre essas drogas, que têm estrutura molecular diferenciada e, no entanto, apresentam os mesmos alvos. Com o intuito de determinar qualitativa e quantitativamente as interações entre a acetilcolinesterase e alguns de seus inibidores foram realizadas uma série de simulações utilizando o método híbrido QM/MM MD e vários cálculos teóricos usando o método FEP nos níveis AM1/MM empregando a biblioteca fDynamo. Propriedades eletrônicas, como a energia do orbital HOMO-1, dipolo e propriedades estruturais como, o tamanho da droga e a distância entre os dois hidrogênios mais ácidos da molécula são algumas das componentes principais participantes do perfil farmacofórico que correlacionam as drogas estudadas. As energias livres de interação dos sistemas proteína-ligante foram calculadas e observou-se uma grande contribuição da componente de van der Waals para as interações entre a acetilcolinesterase e seus inibidores.

Palavras –chaves: Doença de Alzheimer, estado depressivo, inibidores da acetilcolinesterase, inibidores da monoamina oxidase, semi-empírico, DFT, PCA, QM/MM MD, FEP.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a degenerative and progressive type of dementia of great social concern. The latest worldwide estimate shows that 45 million people have some form of dementia, among these 25 million have symptoms of Alzheimer's disease. The lifestyle imposed by social and economic conditions and changes in emotional state caused by trauma and disease have contributed to the increase in cases of people where changes in behavioral state (depressive states: DS) are observed. The World Health Organization estimates that more than 20% of the world population suffers physiologically with changes in its emotional state resulting in depressive states. The AD and DS specific causes and the mechanisms that trigger these changes in the neurological status of patients are not known, thus treatment strategies are employed to try to minimize the effect, or bring improvement in the state of patient life. The most common strategies used to treat patients with AD and DS are related to use drugs that act at the synapses so as to inhibit the function of enzymes responsible for the activation and deactivation of the neurotransmitters directly involved in the processes that cause dementia and the depression. The most used strategy to treat patients with AD is the cholinergic therapy, which consists in use drugs with inhibitory effects against acetylcholinesterase (AChE), in order to prevent the decrease of the concentration of acetylcholine (the neurotransmitter) in the synaptic region. Tacrine, donepezil, galanthamine and rivastigmine are drugs approved for treatment of AD and are classified as inhibitors of acetylcholinesterase. Other drugs such as metrifonate, dichlorvos, huperzine, phenserine and the tacrine dimmer are in stages of clinical testing. The classical treatment of depression is done with the use of drugs that promote the increase of serotonin in the synaptic cleft, either inhibiting the action of the enzymes monoamine oxidase A and monoamine oxidase B, that degrades the neurotransmitter, or by selective inhibition of the reuptake of this neurotransmitter by specific receptors to such function. The drug moclobemide, isocarboxazid, iproniazid, tranlycypromine, phenelzine, have been widely used in the treatment of DS. Nevertheless, its severe side effect classifies as restricted to use, only if other drugs are not effective. The second generation drugs that inhibit monoamine oxidase isoforms Clorgyline, Nialamide selegiline and rasagiline were developed to help the treatment of depression. In an attempt to produce a multi-target drug, ladostigil a hybrid drug was proposed as a potent inhibitor of acetylcholinesterase and monoamine oxidase B. In this work several quantum theoretical approach were undertaken in order to elucidate the pharmacophore profile of known drugs used in the treatment of AD and DS. For this purpose calculations in vacuum and solvated medium at the semi-empirical and *ab initio* level were performed for determination of structural, electronic and spatial parameters of enzyme inhibitors. Another series of studies simulating the intracellular environment *in silico* was used in order to understand the mechanism of acetylcholinesterase inhibition, when enzyme interacts with some of its inhibitors. The multivariate method of the principal components analysis (PCA) was applied to selected 20 parameters of drugs cited before to determining the pharmacophoric profile of those protein inhibitors. The multivariate method of the principal components analysis was applied to selected 20 parameters of drugs cited before in order to determine the pharmacophoric profile of these protein inhibitors. The parameters were obtained from the calculations in vacuum and CPCM solvation model at the DFT B3LYP/6-31+G(d,p) level. PCA study was applied to reduce the sample space of properties to obtain the most relevant properties common to these drugs, which have the same target but have different molecular structure. A huge number of simulations were performed using the hybrid method QM/MM MD in order to qualitatively and quantitatively determine the interactions between acetylcholinesterase and some of its inhibitors. Additionally several theoretical calculations applying FEP method using the fDynamo library in AM1/MM level to compute the free binding energy of the systems acetylcholinesterase-inhibitor were performed. Electronic properties such as the orbital energy of HOMO-1 and the dipole momentum; structural properties such as the size of the drug and the distance between the two most acidic hydrogens of the molecule are some main components of the pharmacophoric profile correlating the drugs studied here. Free energies of interaction of the protein-ligand systems were calculated and revealed a major contribution of the van der Waals component to the interactions between acetylcholinesterase and its inhibitors.

Keywords: Alzheimer's disease, depression, acetylcholinesterase inhibitors, monoamine oxidase inhibitors, semi-empirical, DFT, PCA, QM/MM MD, FEP.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1	18
1. Introdução	19
1.1 Considerações Gerais	19
1.2 Sistema Nervoso Central	22
1.3 Doença de Alzheimer	28
1.4 Transtorno do estado de ânimo (Depressão)	34
1.5 Acetilcolinesterase	36
1.5.1 Sítio ativo da AChE: GORGE	37
1.5.2 Mecanismo de hidrólise da ACh	39
1.6 Monoamina oxidase	41
1.7 Inibidores da AChE	45
1.7.1 Análogos de AChEIs	50
1.8 Inibidores da Monoamina oxidase (MAOI)	53
1.9 Associação de AChEIs e MAOIs no tratamento do ED e DA	58
CAPÍTULO 2	60
2. Objetivo	61
2.1 Objetivos específicos	61
CAPÍTULO 3	62
3. Metodologia	63
3.1 Considerações Gerais	63
3.1.1 Considerações sobre a Modelagem Molecular	64
3.2 Modelos Computacionais	69
3.2.1 Estudo de estrutura eletrônica e PCA	69
3.2.2 Estudo QM/MM MD	72
3.2.2.1 Set up do Sistema	72
3.2.2.2 Simulações com método FEP	75
3.3 Fundamentação Teórica	77
3.3.1 Método Hartree Fock (HF)	77
3.3.2 Teoria do Funcional de Densidade (DFT)	83
3.3.3 Métodos semi-empíricos	88
3.3.4 Métodos teóricos para solvatação	88
3.3.5 Método ChelpG	90
3.3.6 Análise de Componente Principal (PCA)	90
3.3.7 Método híbrido QM/MM	94
3.3.8 Dinâmica Molecular (MD)	101
3.3.8.1 Algoritmos aplicados à MD	103
3.3.8.2 Mecânica estatística aplicada à MD	105
3.3.8.3 Energia livre de interação em MD	108
3.3.8.3.1 Método de Perturbação de Energia Livre (FEP)	110
CAPÍTULO 4	116
4. Resultados e Discussão	117
4.1 Estudo de estrutura eletrônica dos sistemas AChEIs, NTs e MAOIs	117
4.1.1 ACh	118
4.1.2 NTs	120

4.1.3 AChEIs	123
4.1.3.1 Acridinas	123
4.1.3.2 Alcalóides	124
4.1.3.3 Carbamatos	125
4.1.3.4 Organofosforados	125
4.1.3.5 Piperidinas	126
4.1.3.6 MEP das AChEIs	128
4.1.4 MAOIs	129
4.2 Análise dos Componentes Principais	134
4.2.1 NTS	134
4.2.2 ACh + AChEIs	137
4.2.3 MAOIS + NTs	140
4.2.4. AChEIs + MAOIS + NTs	142
4.2.5 ACh + AChEIs + MAOIs	144
4.3 Cálculos da energia livre de interação (ΔG_{bind}) com o método FEP	147
4.4 Estudo das energias livres de interação por resíduo entre a AChE e seus inibidores	153
4.4.1 DMT	153
4.4.2 DNP	155
4.4.3 GNT	156
4.4.4 HUP	158
4.4.5 THA	159
4.4.6 ACh	162
CAPÍTULO 5	163
5. Conclusões	164
CAPÍTULO 6	166
6. Referências	167
ANEXOS	180
ANEXO 1	181
ANEXO 2	191

Lista de abreviaturas e acrônimos

•OH	Radical hidroxila
5-HT	Serotonina
5HT ₁ - 5HT ₇	Receptores de serotonina de tipos 1 a 7
ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima acetilcolinesterase
AChEI	Inibidor da acetilcolinesterase
Ala537	Alanina, resíduo 537 da acetilcolinesterase
AM1	Modelo Austin 1 (Austin Model 1)
Asp	Aspartato
Asp1	Aspartato, resíduo 1 da acetilcolinesterase
Asp2	Aspartato, resíduo 2 da acetilcolinesterase
Asp3	Aspartato, resíduo 3 da acetilcolinesterase
Asp72	Aspartato, resíduo 72 da acetilcolinesterase
ATP	Trifosfato de adenosina
B3LYP	Funcional híbrido dependente da densidade eletrônica
B88	Funcionais de troca de gradiente corrigidos de Becke
BACE2	Betasecretase
Bc95	Funcionais de correlação de gradiente corrigidos de Becke
CC	Método Coupled Cluster
CCK	Gastrinas: gastrina, colecistocinina
ChelpG	Charges from Electrostatic Potential Grid Based
CI	Método variacional de interações de configuração
Cis307	Cisteína, resíduo 301 da monoamina oxidase B
Cis406	Cisteína, resíduo 406 da monoamina oxidase A
CLO	Clorgilina
CO	Monóxido de carbono
COMFA	Análise Comparativa dos Campos Moleculares.
CPCM	Conductor-like Polarizable Continuum Model
Cut-off	Cut-off
DA	Doença de Alzheimer
DCV	Diclorvos
DFT	Método da Teoria do Funcional de Densidade
DMT	Dímetro da tacrina
dN-O	Distância entre os heteroátomos N e O de uma molécula
dN-O=C	Distância entre Oxigênio carbonílico e o átomo N de uma molécula
DNP	Donepezil
DOP	Dopamina
ED	Estado depressivo
Enk	Encefalinas
EPI	Epinefrina
ERS	Estimulantes da recaptura de serotonina
EUA	Estados Unidos da América do Norte
FAD	Flavina adeninda dinucleotídeo
FDA	U.S. Food and drug admistration
FEP	Perturbação da energia livre
G1	Forma monomérica da acetilcolinesterase
G2	Forma dimérica da acetilcolinesterase
G4	Forma tetramérica da acetilcolinesterase
GABA	Ácido γ -amino-butirico
GAP	Diferença entre os orbitais de fronteira: LUMO-HOMO
GGA	Funcional de aproximação do gradiente generalizado
Glu	Glutamato
Glu199	Ácido glutâmico, resíduo 199 da acetilcolinesterase
Glu327	Ácido glutâmico, resíduo 327 da acetilcolinesterase
Glu445	Glutamato, resíduo 445 da acetilcolinesterase

Gly	Glicina
Gly118	Glicina, resíduo 118 da acetilcolinesterase
GNT	Galantamina
GORGE	Sítio ativo da acetilcolinesterase
HDC	Hipótese do déficit colinérgico
Hdon	Doador de hidrogênio
HF	Hartree-Fock
H-H	Distância entre os dois átomos de hidrogênios mais ácidos
His440	Histidina, resíduo 440 da acetilcolinesterase
HOMO	Orbital molecular ocupado de energia mais alta
HOMO-1	Segundo orbital molecular ocupado de mais alta energia
Hrecp	Receptor de hidrogênio
HUP	Huperzina A
IC ₅₀	medida da eficácia de uma droga
ID	Idade dependente
Ile199	Isoleucina, resíduo 199 da da monoamina oxidase
Ile316	Isoleucina, resíduo 316 da monoamina oxidase
INDO	Desconsideração Intermediária da Sobreposição Diferencial
IPR	Iproniazida
IRSA	Inibidores de recaptura de serotonina e antagonistas ALFA-2
IRSS	Inibidores seletivos de recaptura de serotonina
ISO	Isocarboxazida
ISRD	Inibidores seletivos de recaptura de dopamina
ISRN	Inibidores seletivos de recaptura de noradrenalina
ISRSN	Inibidores seletivos de recaptura de serotonina e dopamina
L	Ligante
LAD	Ladostigil
LCAO	Combinação linear de orbitais atômicos
LDA	Funcional de aproximação de densidade local
Leu164	Leucina, resíduo 164 da monoamina oxidase
Leu167	Leucina, resíduo 167 da monoamina oxidase
Leu171	Leucina, resíduo 171 da monoamina oxidase
LogP	Coefficiente de partição
LSDA	Funcional de aproximação de densidade de spin local
LUMO	Orbital molecular desocupado de energia mais baixa
LUMO+1	Segundo orbital molecular desocupado de mais baixa energia
LYP	Funcionais de troca de gradiente corrigidos de Lee-Yan-Parr
Lys149	Lisina, resíduo 149 da monoamina oxidase B
M1	Receptor muscarínico do tipo 1
M2	Receptor muscarínico do tipo 2
M3	Receptor muscarínico do tipo 3
MAO	Enzima monoamina oxidase
MAO-A	Isoforma A da enzima monoamina oxidase
MAO-B	Isoforma B da enzima monoamina oxidase
MAOI	Inibidores da monoamina oxidase
MC	Mecânica clássica
MD	Dinâmica molecular
MDNO	Método Modificado da Desconsideração das Sobreposições Diatómicas
Me ₃ N ⁺	Nitrogênio quaternário
MEP	Mapa de Potencial Eletrostático
Met222	Metionina, resíduo 222 da monoamina oxidase B
MM	Massa Molecular
MOC	Moclobemina
MPn	Método perturbacional de Møller-Plesset
MQ	Mecânica quântica
MTR	Metrifonato
NAG	N-acetil D-glucosamina
NDDO	Desprezo da Sobreposição Diatómica Diferencial

NIA	Nialamida
nM	Nano Molar: 10^{-9} mol/litro
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOR	Noradrenalina
NT	Neurotransmissor
NVE	ensemble microcanônico
NVT	ensemble canônico
Oms	orbitais moleculares
ONIOM	Our own N-layered Integrated molecular Orbital and Molecular mechanics
OPLS-AA	Campo de força <i>Optimized Potentials for Liquid Simulations – All Atoms</i>
PAS	Periferic aromatic site : Sítio aromático periférico
PBC	Condições de contorno periódicas
Pc86	Funcionais de troca de gradiente corrigidos de Perdew
PCA	Análise de componente principal
PCs	Componentes principais
PDB	Protein Data Bank
PEG	Etilenoglicol
PHE	Fenserina
Phe103	Fenilalanina, resíduo 103 da monoamina oxidase
Phe168	Fenilalanina, resíduo 168 da monoamina oxidase
Phe330	Fenilalanina, resíduo 330 da acetilcolinesterase
Phe331	Fenilalanina, resíduo 331 da acetilcolinesterase
PHN	Feniletilamina
PHY	Fisostigmina
PHZ	Fenelzina
PM3	Método de Parametrização 3
PM6	Método de Parametrização 6
PPA	Proteína precursora amilóide
Pro104	Prolina, resíduo 104 da monoamina oxidase
PSA	Área da superfície polar
PWx86	Funcionais de troca de gradiente corrigidos de Becke e Wang
PWx91	Funcionais de troca de gradiente corrigidos de Becke e Wang
QM/MM	Mecânica quântica/ mecânica molecular
QSAR	Relações Quantitativas Estrutura-Actividade
QSAR 3D	Relações Quantitativas Estrutura-Actividade 3D
R	Receptor biológico (enzima, proteína)
RAS	Rasagilina
RHF	Hartre-Fock-Roothaan
RIV	Rivastigmina
R-L	Sistema receptor-ligante
RMSD	Desvio médio quadrático
SAR	Gás sarin
SCF	Campo autoconsistente
SEH	Tríade catalítica da acetilcolinesterase
SEL	Selegilina
Ser200	Serina, resíduo 200 da acetilcolinesterase
SK	Substância K
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substancia P
THA	Tacrina
TI	Integração termodinâmica
TIP3	Campo de força para solvente, água
TOL	Toloxatona
TRA	Tranilcipromina
Trp119	Triptofano, resíduo 119 da monoamina oxidase
Trp279	Triptofano, resíduo 279 da acetilcolinesterase
Trp84	Triptofano, resíduo 84 da acetilcolinesterase

Tyr121	Tirosina, resíduo 121 da acetilcolinesterase
Tyr130	Tirosina, resíduo 130 da acetilcolinesterase
Tyr326	Tirosina, resíduo 326 da monoamina oxidase
Tyr70	Tirosina, resíduo 70 da acetilcolinesterase
vdW	Termo de van der Waals
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
ΔG_{bind}	Energia livre de interação
$\Delta G_{\text{e-E}}$	Contribuições dos termos eletrostáticos em meio enzimático
ΔG_{elet}	Diferença entre os valores das contribuições das interações eletrostáticas dos ligantes em água e na enzima
$\Delta G_{\text{e-w}}$	Contribuições das interações eletrostáticas em água
ΔG_{vdW}	Diferença entre os valores das contribuições das interações de van der Waals dos ligantes em água e na enzima
$\Delta G_{\text{vdW-E}}$	Contribuições dos termos de van der Waals em meio enzimático
$\Delta G_{\text{vdW-w}}$	Contribuições das interações van der Waals em água
β -A	Proteína beta-amilóide A/4
μM	Micro molar: 10^{-6} mol/litro

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Classificação anatômica básica do SNC.	22
Tabela 2.	Principais Neuromediadores e Neuromoduladores.	25
Tabela 3.	AChEIs, MAOIs e NTs estudados.	70
Tabela 4.	Propriedades estudadas.	71
Tabela 5.	Informação das estruturas PDB dos sistemas estudados.	73
Tabela 6.	Informações das estruturas de partida para os cálculos de MD.	75
Tabela 7.	Propriedades dos NTs calculadas com método DFT B3LYP/6-31+G(d,p).	135
Tabela 8.	Variâncias acumuladas considerando 7 NTs e 20 propriedades.	135
Tabela 9.	Propriedades das AChEIs calculadas com método DFT B3LYP/6-31+G(d,p).	137
Tabela 10.	Variâncias acumuladas considerando a ACh, 10 AChEIs e 20 propriedades.	138
Tabela 11.	Propriedades das MAOIs calculadas no nível DFT B3LYP/6-31+G(d,p).	140
Tabela 12.	Variâncias acumuladas considerando 10 MAOIs, 7NTs e 20 propriedades.	141
Tabela 13.	Variâncias acumuladas considerando 10 AChEIs, 10 MAOIs, 7 NTs e 20 propriedades.	142
Tabela 14.	Variâncias acumuladas considerando 10 MAOIs, 10 AChEIs, ACh e 20 propriedades.	144
Tabela 15.	Termos das energias de interação eletrostáticas (e) e de van der Waals (vdW) dos sistemas proteína-ligante (E) e água-ligante (w) em função dos tempos de simulações MD. Valores expressos em kcal mol ⁻¹ .	147
Tabela 16.	Valores de K _i , ΔG _{bind} e IC ₅₀ dos inibidores da AChE.	149
Tabela 17.	Valores dos termos eletrostáticos e de van der Waals da energia para os sistemas proteína-ligante e água-ligante. Valores em kcal mol ⁻¹ .	150

Lista de Figuras

Figura 1.	Pirâmides Etárias do Brasil e dos Estados Unidos - censo 2010 (adaptada).	19
Figura 2.	Representação gráfica de partes do SNC (adaptada).	23
Figura 3.	Morfotipos neuronais (adaptada).	24
Figura 4.	Etapas da transmissão sináptica (adaptada).	26
Figura 5.	Comparação entre um cérebro normal e outro com DA (adaptada).	28
Figura 6.	Esquema da transmissão sináptica em neurônios colinérgicos (adaptada).	31
Figura 7.	Representação da molécula de acetilcolina.	33
Figura 8.	Representação da biossíntese da molécula de serotonina.	35
Figura 9.	Estrutura monomérica 3D da TcAChE complexada com ACh (docada manualmente), PDB:2ACE; 2,5 Å.	37
Figura 10.	Sítio ativo da AChE (pdb:2ACE; 2,5 Å) (adaptada).	38
Figura 11.	Mecanismo proposto para hidrólise da ACh pela AChE (adaptada).	40
Figura 12.	Estrutura 3D da MAO-A complexada com Harmina (PDB:2Z5X; 2,20 Å).	42
Figura 13.	Estrutura 3D da MAO-B complexada com tranilcipromina (PDB:2XFU; 2,20Å).	43
Figura 14.	Estrutura 2D de algumas AChEIs.	46
Figura 15.	Estrutura 2D do dímero da tacrina.	50
Figura 16.	Estrutura de derivados da THA.	51
Figura 17.	Estrutura de derivados do DNP (a e b), RIVA (c) e GALA (d)	52
Figura 18.	Estrutura de MAOIs de 1ª geração.	54
Figura 19.	Estrutura de MAOIs de 2ª geração.	55
Figura 20.	Estrutura de MAOIs de 3ª geração (IRMAs).	55
Figura 21.	Representação esquemática de interação entre MAOI e MAO-B (adaptada).	56
Figura 22.	Estrutura de derivados cumarina (a) e indolalquilaminas (b) potenciais inibidores da MAO.	57
Figura 23.	Estrutura 2D do ladostigil.	58
Figura 24.	Estrutura 2D de derivados pirazólicos.	59
Figura 25.	Esquema da montagem do sistema molecular empregados nos cálculos da FEP.	76
Figura 26.	Matriz de dados $m \times n$ elementos.	91
Figura 27.	Representação das regiões de um sistema do modelo QM/MM.	94
Figura 28.	Representação das interações entre a célula unitária (quadrado branco) e suas imagens replicadas. Condições Periódicas de contorno em 3D.	98
Figura 29.	Representação de alguns tipos de funções em função da distância. Raios de corte: $r_c=r_{off}=10 \text{ \AA}$ and $r_{on}=5 \text{ \AA}$.	100
Figura 30.	Ciclo termodinâmico com adaptações.	113
Figura 31.	Ciclo termodinâmico do método FEP, com adaptações.	115
Figura 32.	Representação esquemática dos principais pontos de reconhecimento molecular do sistema ACh-AChE.	118
Figura 33.	Estrutura otimizada, dipolo, HOMO, LUMO e MEP da ACh calculadas em nível B3LYP/6-31+G(d,p) e B3LYP/6-31+G(d,p)/CPCM.	119
Figura 34.	Estrutura otimizada e momento dipolar dos NTs - B3LYP/6-31+G(d,p) e B3LYP/6-31+G(d,p)/CPCM.	120
Figura 35.	Energia dos orbitais HOMO, HOMO-1, LUMO e LUMO+1 dos NTs - B3LYP/6-31+G(d,p) e B3LYP/6-31+G(d,p)/CPCM.	121
Figura 36.	MEP dos NTs - B3LYP/6-31+G(d,p).	122
Figura 37.	Orbitais HOMO e LUMO da THA. Nível de calculo: B3LYP/6-31+G(d,p)	123
Figura 38.	Orbitais HOMO e LUMO do GNT. Nível de calculo: B3LYP/6-31+G(d,p).	124
Figura 39.	Orbitais HOMO e LUMO da RIV. Nível de calculo: B3LYP/6-31+G(d,p).	125
Figura 40.	Orbitais HOMO e LUMO do DCV. Nível de calculo: B3LYP/6-31+G(d,p).	126
Figura 41.	Orbitais HOMO e LUMO do DNP. Nível de calculo: B3LYP/6-31+G(d,p).	126
Figura 42.	Comportamento da energia dos orbitais HOMO, HOMO-1, LUMO e LUMO+1 no vácuo e em meio solvatado. AChEIs - B3LYP/6-31+G(d,p) e - B3LYP/6-31+G(d,p)/CPCM.	127

Figura 43.	Comportamento do dipolo no vácuo e em meio solvatado. AChEIs - B3LYP/6-31+G(d,p) e - B3LYP/6-31+G(d,p)/CPCM.	127
Figura 44.	MEP das AChEIs - B3LYP/6-31+G(d,p).	128
Figura 45.	Energia dos orbitais HOMO de algumas MAOIs - B3LYP/6-31+G(d,p).	129
Figura 46.	Energia dos orbitais LUMO de algumas MAOIs - B3LYP/6-31+G(d,p).	130
Figura 47.	Comportamento da energia dos orbitais HOMO, HOMO-1, LUMO e LUMO+1 no vácuo e em meio solvatado. MAOIs - B3LYP/6-31+G(d,p) e - B3LYP/6-31+G(d,p)/CPCM.	131
Figura 48.	MEP das MAOIs - B3LYP/6-31+G(d,p).	132
Figura 49.	Valores do momento de dipolo das MAOIs - B3LYP/6-31+G(d,p) e B3LYP/6-31+G(d,p)/CPCM.	133
Figura 50.	Gráfico dos escores PC1 versus PC2 no nível B3LYP/6-31+G(d,p) para NTs e 8 propriedades.	136
Figura 51.	Gráfico dos escores PC1 versus PC2 no nível B3LYP/6-31+G(d,p) para NTs e 8 propriedades.	138
Figura 52.	Gráfico dos escores PC1 versus PC2 no nível B3LYP/6-31+G(d,p) para MAOIs, NTs e 7 propriedades.	141
Figura 53.	Gráfico dos escores PC1 versus PC2 no nível B3LYP/6-31+G(d,p) para AChEIs, MAOIs, NTs e 6 propriedades.	143
Figura 54.	Gráfico dos escores PC1 versus PC2 no nível B3LYP/6-31+G(d,p) para AChEIs, MAOIs, ACh e 7 propriedades.	145
Figura 55.	Gráfico dos escores PC1 versus PC2 no nível B3LYP/6-31+G(d,p) para AChEIs, MAOIs, ACh e 20 propriedades.	146
Figura 56.	Dependência dos valores dos termos a contribuição eletrostática para a energia no sistema proteína-ligante em função do tempo de simulação MD realizadas com o método FEP.	148
Figura 57.	Dependência da energia de van der Waals para o sistema proteína-ligante em função do tempo de simulação MD realizadas com o método FEP.	148
Figura 58.	Dependência dos termos das energias eletrostática e de van der Waals para o sistema água-ligante em função do tempo de simulação MD realizadas com o método FEP.	149
Figura 59.	Correlação entre as energias de ΔG_{bind} calculadas teoricamente e os valores experimentais (a)-(c): $K_{i_{\text{THA}}}=10,0$ nM, (b)-(d): $K_{i_{\text{THA}}}=3,8$ nM, e preditas.	151
Figura 60.	Comparação da ordem de inibição obtida por diferentes métodos: (a) K_i ; (b) K_i ; (c) K_i .	152
Figura 61.	Contribuição por resíduo à energia de interação para o sistema AChE-DMT.	154
Figura 62.	Avaliação qualitativa das interações por resíduo AChE-DMT.	154
Figura 63.	Contribuição por resíduo à energia de interação para o sistema AChE-DNP.	155
Figura 64.	Avaliação qualitativa das interações por resíduo AChE-DNP.	156
Figura 65.	Contribuição por resíduo à energia de interação para o sistema AChE-GNT.	157
Figura 66.	Avaliação qualitativa das interações por resíduo AChE-GNT.	157
Figura 67.	Contribuição por resíduo à energia de interação para o sistema AChE-HUP.	158
Figura 68.	Avaliação qualitativa das interações por resíduo AChE-HUP.	159
Figura 69.	Contribuição por resíduo à energia de interação para o sistema AChE-THA.	160
Figura 70.	Avaliação qualitativa das interações por resíduo AChE-THA.	160
Figura 71.	Contribuição por resíduo à energia de interação para o sistema AChE-ACh.	161
Figura 72.	Avaliação qualitativa das interações por resíduo AChE-ACh.	162

Capítulo 1

1. Introdução

1.1 Considerações Gerais

A aplicação de recursos humanos e econômicos no desenvolvimento de melhores condições de vida tem modificado, ao longo dos séculos, o perfil etário dos países desenvolvidos e em via de desenvolvimento. A mudança na pirâmide etária destes países mostra que há um acentuado aumento na expectativa de vida da população, como pode ser verificado na Figura 1.

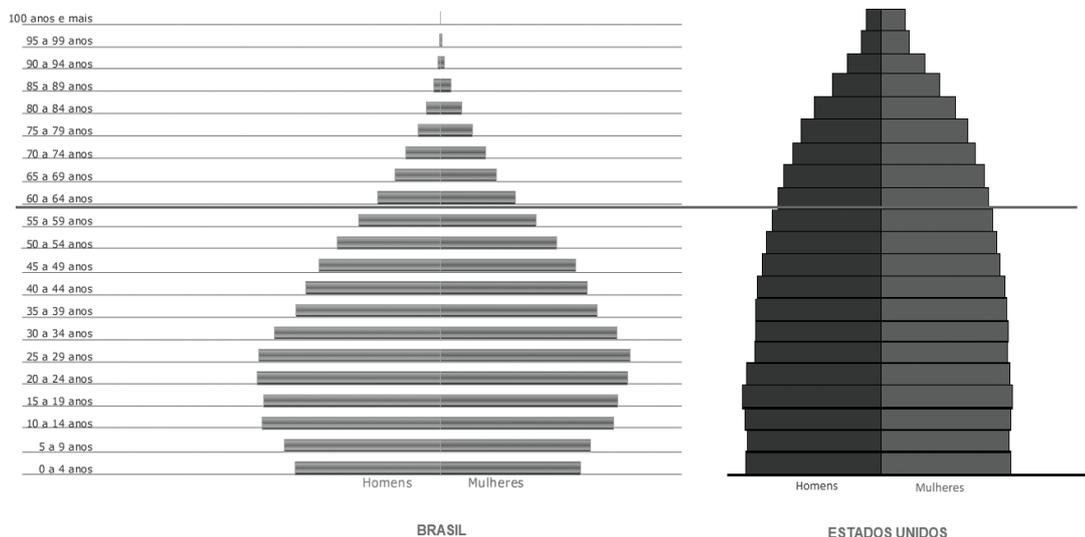


Figura 1. Pirâmides Etárias do Brasil e dos EUA - censo 2010 (adaptada).^{1,2}

Este quadro revela que o objetivo de prolongar a vida humana tem dado resultados positivos, sendo que, em alguns países a porcentagem da população com pessoas acima dos 60 anos é de mais de 30%. Porém, vinculado ao aumento da população mundial nessa faixa etária, alguns problemas tendem a ocorrer com maior frequência, principalmente as doenças conhecidas como “idade-dependente” (ID). A ocorrência das enfermidades ID é consequência principalmente do mau planejamento psicossocial e da ineficiência das políticas de saúde pública voltadas para esta faixa da população. Dentre as doenças ID, aquelas que mais se destacam são as demências, o diabetes e as doenças cardiovasculares.

Entre os vários tipos de demência existentes, os mais comuns e incidentes na população acima dos 60 anos de idade são a doença de Alzheimer (DA), demências vasculares, doença com corpos de Lewy e a doença de Pick.³

Estima-se que 45 milhões de pessoas no mundo apresentem algum tipo de demência, dentre essas, 18 milhões apresentam sintomas característicos da doença de Alzheimer (DA).³ Entende-se por demência um estado ou condição anormal progressiva e degenerativa do funcionamento cerebral que compromete a função cognitiva, a memória, o comportamento, o estado emocional e a operacionalidade de tarefas cotidianas de um indivíduo.⁴

O estilo de vida imposto pela situação social e econômica mundial e as alterações do estado emocional causadas por traumas e doenças como, por exemplo, câncer e demências vêm contribuindo para o aumento dos casos de pessoas onde são observadas modificações no seu estado comportamental (estados depressivos). Dados da Organização Mundial de Saúde indicam que mais de 20% da população mundial sofre fisiologicamente com alterações no seu estado emocional originando estados depressivos de alguma natureza.³

Entende-se como estado depressivo (ED) uma alteração no comportamento psicossocial de um indivíduo, ocasionado por fator emocional ou fisiológico. Nem sempre as causas do estado depressivo são passíveis de serem determinadas. São indicados vários fatores de risco para o acometimento de demências e do estado depressivo, ainda que não sejam conhecidos todos os mecanismos que desencadeiem as alterações neurofisiológicas, orgânicas e comportamentais observadas durante o desenvolvimento destas neuropatologias.

A maioria das demências é ID, mas além do fator etário a hereditariedade, as doenças cardiovasculares, o uso abusivo de drogas lícitas e ilícitas, o diabetes, as doenças da tireóide e o traumatismo craniano são tidos também como fatores de risco.⁴

A DA é uma demência que, por não ter determinada sua causa, não tem cura, é apenas tratável em nível paliativo para diminuição dos efeitos deletérios que causa no estado cognitivo e depressivo dos pacientes.⁵

Uma característica fisiológica comum em pacientes que apresentam sintomas de ED e DA é a supressão na quantidade de neurotransmissores (NT) responsáveis pela transmissão de impulsos nervosos nas regiões sinápticas. No ED, a redução da

quantidade de serotonina (5-HT) no meio neuronal parece estar associada ao seu aparecimento. Na DA é a diminuição da acetilcolina (ACh) nas fendas sinápticas que parece reduzir a capacidade cognitiva do paciente. Assim, a redução na quantidade de neurotransmissores nas fendas sinápticas causa efeitos deletérios nos estados motores, humor, emoções, cognição, memória e no aprendizado, uma vez que são os agentes reguladores destas funções.⁶⁻⁸

Por não terem suas causas determinadas e nem serem conhecidos os mecanismos que desencadeiem estas alterações nos estados neurológicos dos pacientes, estratégias de tratamento são empregadas para tentar sanar o problema, ou trazer melhora no estado de vida dos pacientes. Na maioria dos casos, estas estratégias estão relacionadas ao uso de drogas que atuem no sistema nervoso central (SNC), mais especificamente nas sinapses, de maneira a inibir a função de enzimas responsáveis pela ativação e desativação dos NT envolvidos diretamente nos processos que ocasionam as demências e o ED.

A pesquisa e o desenvolvimento de drogas que atuem de maneira mais eficiente no tratamento da DA e do ED bem como o estudo dos mecanismos das doenças são alvo de diversas áreas do conhecimento. O cérebro é principal o foco dos estudos bioquímico e biomoleculares do século XXI.

Enzimas são as máquinas mais eficientes capazes de realizar os processos catalíticos das reações bioquímicas de um organismo vivo, apresentam alta especificidade, tanto em condições extremas, quanto em condições fisiológicas.⁹ Determinar experimentalmente propriedades de sistemas macromoleculares químicos, não é tarefa trivial. A compreensão dos mecanismos enzimáticos é o ponto de partida fundamental na resolução de muitos problemas das mais diversas áreas e atividades humanas, como, por exemplo, processos industriais, aplicações tecnológicas e alvos médico-biológicos como o desenvolvimento de drogas eficientes para o tratamento e cura de enfermidades.

A química quântica teórica computacional vem desempenhando papel fundamental nos estudos de sistemas enzimáticos e seus mecanismos por meio de simulações, modelagem molecular e métodos computacionais. Este campo de pesquisa vem se consolidando como atividade transdisciplinar por meio de novas abordagens para a compreensão dos comportamentos integrados de sistemas compostos por muitas variáveis que interagem em uma ampla gama de domínios

de aplicação. Em particular, as aplicações da química quântica em sistemas reais tornaram-se possível e, como tal, está sendo usada como prática comum em campos como, por exemplo, química bioinorgânica e bioquímica, sendo possível hoje realizar estudos teórico-experimentais simultaneamente. O uso combinado das aproximações da mecânica quântica com a mecânica molecular (QM/MM) é hoje um dos métodos mais poderosos para estudar sistemas macromoleculares e seus problemas.^{9,10}

As aproximações QM/MM estão entre os melhores métodos que relacionam precisão e concordância, com estudos experimentais, na solução de problemas envolvendo sistemas enzimáticos.^{11,12} Estudos recentes onde o método aproximado QM/MM foi aplicado demonstraram a capacidade preditiva tanto qualitativa quanto quantitativa para avaliar o efeito de mutações na catálise enzimática.¹³

1.2 Sistema Nervoso Central

O sistema nervoso central (SNC) é o órgão de mais alta complexidade anatômica do corpo humano, é opaco e cheio de reentrâncias que ocultam umas às outras sendo extensamente conectado com estruturas da periferia do corpo. É definido como um conjunto de componentes do sistema nervoso contidos em caixas ósseas (crânio e coluna vertebral). É dividido em encéfalo e medula espinhal. O SNC (Figura 2) é um órgão tão complexo que para realizar suas funções, absorve sozinho 20% do oxigênio circulante na corrente sanguínea, apesar de representar somente 2% da massa corporal em um indivíduo adulto.⁶

Na Tabela 1 podem ser visualizadas, de forma esquemática, as divisões e subdivisões do SNC.

Tabela 1. Classificação anatômica básica do SNC.⁶

SNC								
Encéfalo							Medula espinhal	
Cérebro		Cerebelo		Tronco encefálico				
Telencéfalo		Diencefalo	Córtex	Núcleos profundos	Mesencéfalo	Ponte		Bulbo
Córtex cerebral	Núcleos da base							

O SNC possui regiões que podem ser diferenciadas visualmente por cores, a substância branca, que é composta basicamente por células de gordura que revestem as fibras nervosas (mielina) e a substância escura (negra ou cinzenta) que é a região onde estão localizados os corpos celulares. Quando a substância cinzenta se dispõe em camadas paralelas de células, ela passa a ser denominada córtex (casca) e quando está disposta em aglomerados celulares multiformes (elipsóides, esferóides, toróides e formas irregulares) é denominada núcleo.⁶

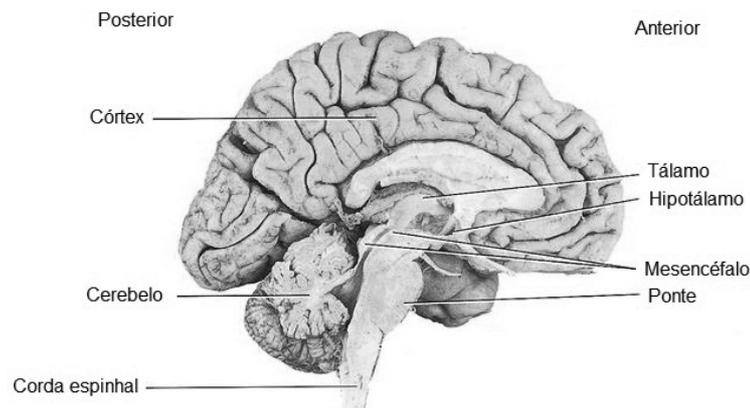


Figura 2. Representação gráfica de partes do SNC (adaptada).⁶

O cérebro é dividido em telencéfalo e diencéfalo. O telencéfalo é a parte mais volumosa do encéfalo e é dividido em núcleos da base e córtex cerebral. Devida a complexidade de funções que realiza, o córtex cerebral é a parte mais importante do telencéfalo. É no córtex cerebral que as informações sensoriais (percepções) são interpretadas, além de ser nesta região do SNC que ocorre o planejamento, a programação dos comandos de motricidade para serem enviados à medula espinhal.⁶ É no córtex que se localiza a memória das emoções, ações físicas e psicológicas.

Como pode ser visto na Tabela 1, o cerebelo está dividido em córtex e núcleos profundos. É semelhante ao cérebro apresentando duas subdivisões. Estas duas têm papel importante na coordenação motora (equilíbrio corporal, regulação do tônus muscular e controle da harmonia e precisão dos movimentos). Junto a estas funções, acredita-se que o cerebelo atue em funções mais complexas como a coordenação da memória de procedimentos, as funções sensoriais, emocionais e cognitivas.

O SNC recebe nutrientes, oxigênio e outros tipos de moléculas através da corrente sanguínea, que é levada por artérias, arteríolas e vasos tortuosamente

distribuídos. A rede capilar do SNC é regulada por uma barreira que seleciona quais substâncias entram, transitam e saem (barreira hematoencefálica) do sistema.¹⁴

O sistema nervoso é um sistema de desempenho global. Funciona sob alta cooperação e sincronia entre seus diferentes elementos celulares (neurônios e gliócitos). Estes dois tipos de células são capazes de gerar sinais, conduzi-los localmente e a longas distâncias, transmiti-los simultaneamente a milhares de células e modificá-los de diversas maneiras, para promover as mais diversas e complexas funções que o SNC executa por meio da integração de informações geradas pela atividade celular.

As principais células do SNC são os neurônios e os gliócitos. Para cada região do SNC existem tipos específicos de neurônios e gliócitos. Os neurônios apresentam basicamente a mesma estrutura celular (corpo celular, dendritos e axônio). Os gliócitos são elementos de suporte dos neurônios, provendo nutrição, proteção, isolamento elétrico e suporte metabólico para estas células. Além disso, participam nas diferenciações do período embrionário e pós-natal sendo atualmente considerados células-tronco e também auxiliam na continuidade do fluxo de informações que passam entre os neurônios.⁶

Sendo o córtex cerebral a parte mais sofisticada do cérebro, é mister observar como estão demarcados os neurônios e sua abrangência. Existem dois tipos de neurônios no córtex cerebral, os piramidais e os estrelados. Os neurônios piramidais são essencialmente excitatórios, sendo neurônios com axônios compridos e, portanto, denominados também neurônios de projeção. Já os estrelados são neurônios inibitórios, possuem axônio curto, são responsáveis pela comunicação local com os outros neurônios da mesma região e por isso são também chamados, neurônios de circuito local.

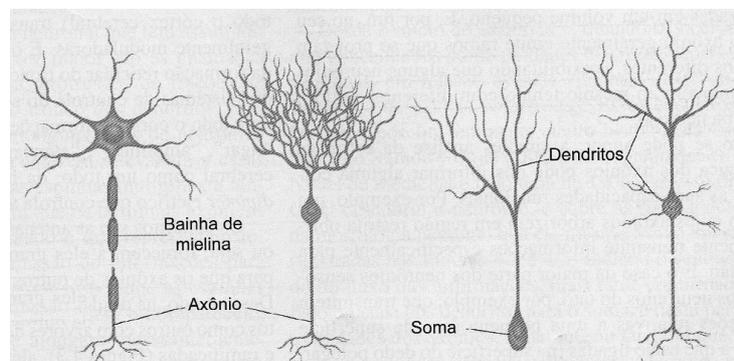


Figura 3. Morfotipos neuronais (adaptada).⁶

Os neurônios assim como todas as células possuem uma membrana plasmática composta por uma bicamada lipídica. A diferença na composição iônica entre o exterior e o interior de um neurônio origina uma diferença de potencial elétrico entre os dois meios fornecendo a base para a geração dos sinais elétricos de comunicação interneuronal. Transitando pela bicamada lipídica estão inúmeras proteínas que formam canais iônicos, receptores moleculares, transportadores moleculares, moléculas de adesão celular e enzimas, sendo essas últimas responsáveis pela degradação ou desativação de sinais químicos de comunicação entre os neurônios ou entre neurônios e gliócitos, os denominados neurotransmissores.⁶ O fluxo de sinais neurais é de natureza molecular e bioelétrica e move-se em várias direções de forma instantânea para englobar todas as regiões que compõem o SNC.

Os núcleos celulares dos neurônios diferem entre si de acordo com a função que exercerão no SNC. Existem diferentes morfotipos neuronais para diferentes tipos de expressão enzimática que os neurônios responderão (Figura 3). Desta forma, por exemplo, se um determinado neurônio utiliza como neuromediador a acetilcolina, este expressará enzimas necessárias para a produção deste NT, logo este tipo de célula é denominada neurônio colinérgico. Cada neuromediador tem um tipo de neurônio associado às funções que executam. A Tabela 2 traz os principais tipos de neuromediadores e neuromoduladores encontrados no SNC.⁶

Tabela 2. Principais Neuromediadores e Neuromoduladores.⁶

Neurotransmissores			Neuromoduladores	
<i>Aminoácidos</i>	<i>Aminas</i>	<i>Purinas</i>	<i>Peptídeos</i>	<i>Gases</i>
Ácido γ -amino-butírico (GABA)	Acetilcolina (ACh)	Adenosina	Gastrinas: gastrina, colecistocinina (CCK)	Óxido nítrico (NO)
Glutamato (Glu)	Adrenalina ou epinefrina (EPI)	Trifosfato de adenosina (ATP)	Horm. da neuroipófise: vasopressina, ocitocina	Monóxido de carbono (CO)
Glicina (Gly)	Dopamina (DOP)		Insulinas	
Aspartato (Asp)	Histamina		Opióides: encefalinas (Enk), β -endorfinas	
	Noradrenalina ou norepinefrina (NOR)		Secretinas: secretina, glucagon, peptídeo intestinal vasoativo (VIP)	
	Serotonina (5-HT)		Somatostatinas	
			Taquicinas: substância P (SP), substância K (SK)	

A forma de comunicação entre os neurônios é realizada pelos neuromediadores, que podem carregar informações de natureza química e elétrica a fim de fazer acontecer o processo de comunicação entre as células do SNC. Porém, além dos neuromediadores existe outro tipo de molécula envolvida no processo de comunicação neuronal, os neuromoduladores. A estrutura de contato formada pelo prolongamento de um neurônio pré-sináptico e um neurônio pós-sináptico é denominada sinapse. Esta estrutura é especializada na transmissão química da informação do neurônio pré-sináptico para a célula pós-sináptica. Os neuromediadores são sintetizados no soma dos neurônios ou no próprio terminal sináptico. Para tornar o processo sináptico mais eficiente, a maioria dos neuromediadores é armazenada em vesículas dentro dos próprios neurônios.⁶

A sinapse é o foco do processamento da informação neural, e também o local de ação de muitas substâncias que figuram no SNC. A transmissão sináptica acontece quando um potencial de ação chega ao terminal pré-sináptico, despolarizando-o.

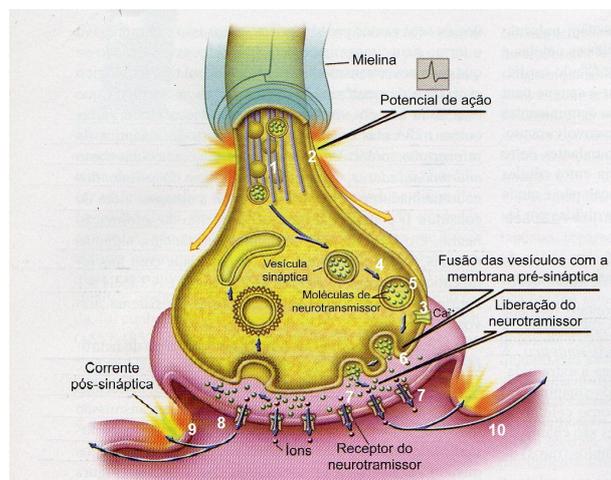


Figura 4. Etapas da transmissão sináptica (adaptada).⁶

A Figura 4 traz as etapas da transmissão sináptica que pode ser descrita da seguinte forma:

- 1: Síntese e armazenamento de neuromediador nas vesículas sinápticas;
- 2: chegada do potencial de ação;
- 3: influxo de íons Ca^{2+} ;
- 4 – 6: exocitose do neuromediador;
- 7: reconhecimento e ligação do neuromediador com seu receptor na membrana pós-sináptica;

8 – 9: origem do potencial pós-sináptico;

10: formação de novas vesículas a partir da membrana terminal.

A quantidade mínima de neuromediador que pode ser liberado em uma transmissão sináptica é a quantidade armazenada dentro de uma vesícula. Portanto, só podem ser liberados *quantas* de neuromediadores. A quantidade a ser liberada é determinada pela duração da despolarização da membrana resultante da chegada de um ou mais potenciais de ação em sequência. Assim, há uma relação direta entre a frequência de potenciais de ação no terminal e a quantidade de neuromediador liberado, e esta é a chave para manter a quantidade de informação contida na frequência de potenciais de ação ao chegar ao terminal.⁶

Uma vez liberado na fenda sináptica, é estabelecido um gradiente de concentração química entre a vizinhança da membrana pré-sináptica e a vizinhança da membrana pós-sináptica, através deste gradiente o neuromediador se difunde em direção a membrana pós-sináptica. Assim, a quantidade de receptores ativados e a duração da ativação são, via de regra, proporcionais à quantidade de neuromediador presente na fenda sináptica. O potencial pós-sináptico não é auto-regenerativo (como é o caso do potencial de ação), mas sim eletrônico, desta forma dependendo do tipo de receptor ao qual o neuromediador é reconhecido pode ser gerado um potencial excitatório ou inibitório.^{6,7,15}

Quando o delicado equilíbrio químico da região sináptica é alterado, começam a ocorrer falhas no processo de transmissão de sinais sinápticos. Muitas vezes, estas falhas ocasionam problemas de ordem neurológicas e psicológicas passageiras ou permanentes.

Muitas neuropatologias estão associadas ao decréscimo de neurotransmissores nas sinapses, dentre estas a DA e o ED são exemplos, onde a redução drástica dos neurotransmissores ACh e 5-HT nas sinapses de neurônios colinérgicos e serotoninérgicos provocam o déficit cognitivo e a alteração no estado de ânimo ocasionando a demência e a depressão.

Portanto, o estudo dos mecanismos que desencadeiam este desequilíbrio bem como o desenvolvimento de drogas eficientes que favoreçam o gradiente de concentração de neurotransmissores nas sinapses são fundamentais para amenizar e até, por que não, curar neuropatologias a médio e longo prazo.

1.3 Doença de Alzheimer

A DA foi descrita pela primeira vez na literatura em 1907 pelo psiquiatra alemão Alois Alzheimer, que após autopsiar centenas de cérebros observou que em grande parte de suas amostras havia diminuição da massa encefálica, além de manchas escuras e aglomerados fibrilares.¹⁶⁻¹⁸

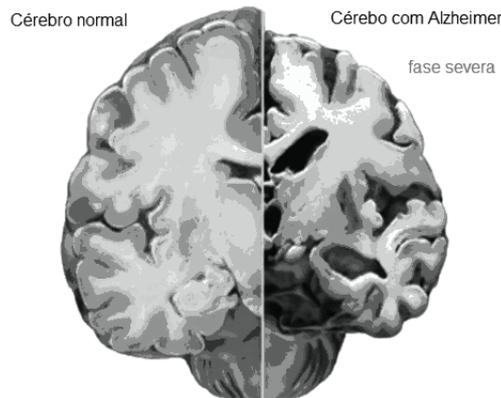


Figura 5. Comparação entre um cérebro normal e outro com DA (adaptada).¹⁹

É uma enfermidade conhecida erroneamente por “esclerose”, muitos a definem como “mal do século” ou “epidemia silenciosa”, é uma doença ainda pouco divulgada apesar do impacto social gerado, pois, causa grandes modificações nas vidas dos pacientes e de suas famílias.²⁰ É uma doença de grande preocupação social, pois é onerosa para a sociedade, para a economia e principalmente para o veio familiar.^{16,17}

A doença não tem cura e sua incidência aumenta com o aumento da idade da população. É uma doença degenerativa e progressiva.^{16,21-24}

Existem vários fatores considerados de risco para o acometimento da DA. Dentre eles os mais acentuados são:²⁵

- Idade: é o fato de risco mais importante para DA. Pessoas acima de 60 anos tem pelo menos 30% de chance de desenvolver DA. Com a chegada à terceira idade, há um aumento na síntese de superóxido dismutase pelas mutações de mais de mil genes envolvidos na biogênese mitocondrial, isso acarreta um aumento na quantidade de radicais livres no córtex cerebral. Dados estatísticos demonstram que há faixa de risco para o desenvolvimento da DA está entre os 60 e 90 anos.

- Gênero: mulheres têm mais risco de desenvolver demências, em particular DA, provavelmente pela deficiência de estrogênio no último terço de suas vidas. Além do fato que a mutação e4 no gene APOE ser mais frequente nas mulheres.

-Etnia e nacionalidade: a população afro-americana acima dos 65 anos de idade tem maior frequência da incidência de DA.

- Geografia: a maior quantidade de pessoas com DA é verificada na parte norte do globo terrestre.

- Genética e familiar: para 50 - 60% dos casos que desenvolveram DA após os 65 anos, existe um familiar de 1º grau que também desenvolveu a doença anteriormente. À medida que a pessoa envelhece o risco aumenta na ordem de 5% aos 70 anos, 10% aos 80 anos e 33% aos 90 anos de idade quando há casos de DA em parentes de 1º.

-Síndrome de Down: 95% dos portadores da Síndrome de Down apresentam entre 35 e 40 anos lesões características da DA. A principal suspeita seria a presença da pepsina BACE2, uma beta secretase que é co-responsável pela formação da β -amilóide a partir da sua proteína precursora PPA (proteína precursora amilóide) que é codificada no gene 21, como todos os portadores desta síndrome expressam 2 genes 21, a quantidade de placas senis nestas pessoas tem um acentuado aumento. Suspeita-se que pessoas com históricos de Síndrome de Down na família pode ser um fator de risco para DA.

-Quociente intelectual e capacidade lingüística: A capacidade mental na infância parece modificar a propensão à demências na idade senil. Dados estatísticos apontam que quanto maior for o nível intelectual na vida, menor será a probabilidade de se padecer de DA. Existem suspeitas de que seja na infância que a DA comece a se desenvolver no cérebro. Silenciosamente e durante anos, formando placas senis, alterando a densidade sináptica e danificando a plasticidade neural ao longo dos anos, até que os sintomas externos comecem a sinalizar a DA.

-Outros fatores: A DA pode estar condicionada também por fatores ambientais, quantidade de laços sociais, alimentação desregulada, vida no meio rural, personalidade pré-morbida, estresse, depressão, traumatismo craniano.

Os principais sintomas desta doença são perda gradual de memória e do senso crítico, desorientação temporal, climática e espacial, mudanças bruscas de personalidade sem motivo aparente, dificuldade de aprendizado e memorização, queda acentuada na realização de atividades cotidianas e o déficit cognitivo.^{17,26} A

evolução da DA é de 5% a 15% da cognição por ano de doença, com um período médio de oito anos desde seu início até seu último estágio. É geralmente dividida em três fases: a fase inicial, fase moderada e fase severa.^{19,20}

As primeiras manifestações da Doença de Alzheimer passam muitas vezes despercebidas, marcadas inicialmente por lapsos de memória que vão se agravando paulatinamente. Há relatos de pacientes com 40 anos de idade diagnosticados com a doença, porém sua incidência acontece acentuadamente após dos 60 anos de idade.^{18,27}

Não é possível diagnosticar a doença apenas com exames clínicos ou psicológicos-cognitivos. Não existem, ainda, exames que indiquem isoladamente a DA. São necessários vários testes e uma detalhada anamnese para se diagnosticar DA. Várias tentativas são feitas para que um exame clínico possa diagnosticar a DA, como por exemplo, a mensuração da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no líquido cefalorraquidiano (líquor) que parece decrescer quando a DA está presente e progredindo.²⁸ Por ora, somente um exame post-mortem pode confirmar com 100% de certeza a DA.

Não se sabe ao certo o que causa a DA. Suspeita-se de fatores genéticos, de fatores ambientais e dos hábitos intelectuais praticados ao longo da vida. Os pacientes acometidos pela DA com histórico da doença na família são chamados paciente com DA do tipo hereditário ou pacientes com DA familiar, estão entre 15% a 20% dos casos conhecidos.²⁹ Já pacientes com ausência de casos de DA na sua ancestralidade são chamados pacientes com DA do tipo esporádico e não apresentam padrões genéticos que os relacione.^{16,20,30}

Estudos recentes indicam que no caso de DA do tipo familiar, algumas mutações em alguns genes localizados nos cromossomos 12, 14, 19 e 21 estejam envolvidas diretamente no mecanismo que desencadeia a doença.^{16,20}

A principal implicação etiológica da DA é a dramática perda das funções colinérgicas cerebrais por meio da significativa diminuição do neurotransmissor (NT) acetilcolina e sua enzima de síntese a colina-acetiltransferase, no hipocampo e no neocórtex.⁶ Esta é a anormalidade psico-bioquímica mais importante ao se diagnosticar a doença,³¹ pois isto indica a morte dos neurônios no núcleo basal de Meynert e áreas adjacentes.

Como as causas da DA ainda são desconhecidas, várias hipóteses são lançadas para determinar os mecanismos de ação da doença. Algumas características histológicas e bioquímicas são aceitas como relacionadas intrinsecamente com a doença:

- ◆ presença de placas neuríticas, constituídas principalmente pela proteína β -amilóide A/4 (β -A), que se acumulam no meio extracelular neuronal do córtex cerebral; as placas neuríticas são derivadas do precursor da proteína amilóide (PPA) com gene localizado no cromossomo 21, este depósito é considerado neurotóxico.^{16,20,22,24,28,32}
- ◆ formação de emaranhados fibrilares, compostos por filamentos da proteína tau hiperfosforilada dentro dos neurônios (intracelular) e de suas projeções ramificadas (dendritos e axônios) principalmente nos neurônios piramidais do córtex cerebral, do lobo temporal, do hipocampo e da amígdala.^{16,20,22,24}
- ◆ acentuada queda na quantidade de neurotransmissores nas regiões sinápticas, dentre eles ACh, 5-HT, DOP, NOR e Glu. A ACh tem sua concentração brusca diminuída devido a baixa concentração da enzima acetilase, necessária na sua produção dentro do neurônio.^{16,20,22,24,34,35}
- ◆ presença da variante e4 no gene APOE está presente em 60% dos casos de DA registrados.²⁵

Em pacientes com DA, a concentração de ACh nas situações de transmissão de impulso neuronais são acentuadamente reduzidas, devido a sua baixa produção dentro dos neurônios, ocasionando o déficit colinérgico. E o grave comprometimento da função cognitiva.^{36,37}

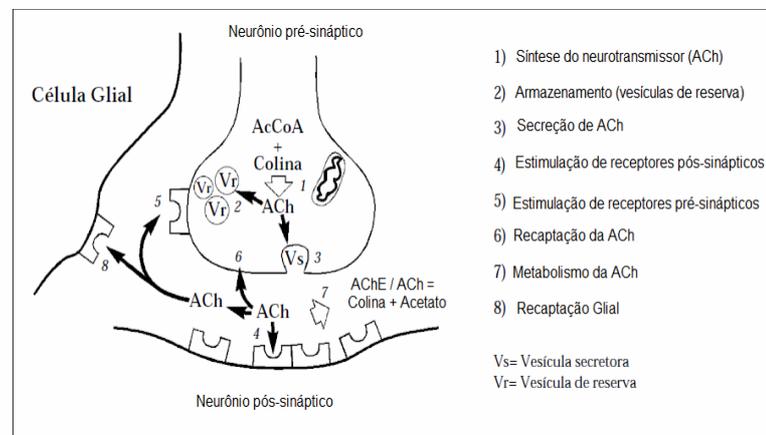


Figura 6. Esquema da transmissão sináptica em neurônios colinérgicos (adaptada).²⁵

Com a finalidade de tratar a doença, a partir destas informações, foi sugerida a hipótese do déficit colinérgico (HDC).^{34,38,39} Além desta, são propostas outras hipóteses para o tratamento da DA, uma vez que as causas e o mecanismo completo que desencadeiam a DA é assunto controverso e não esclarecido. As demais hipóteses conhecidas são: a hipótese amilóide, a hipótese do glutamato e a do estresse oxidativo.^{39,40}

Na hipótese amilóide acredita-se que o acúmulo de placas senis, constituídas principalmente pela proteína β -amilóide A/4 (β -A), possa ser evitado utilizando medicamentos que inibam a produção excessiva da β -A.^{18,20,32,41,42}

Atualmente o desenvolvimento de fármacos que inibam ou revertam a formação de placas senis é uma promissora área de atuação para o tratamento da DA. Porém, a hipótese amilóide ainda não está bem estabelecida, há muita discussão e desacordo na comunidade científica sobre a real função das placas senis em pacientes com DA. Testes realizados com ratos e camundongos revelaram que nem sempre é verdade que animais que apresentem placas senis em seus cérebros desenvolvam DA.^{18,43,44}

Já na hipótese do glutamato, supõe-se que alta concentração desse neurotransmissor promova a entrada anormal (excessiva) de íons Ca^{2+} no interior do neurônio, levando-o à morte. Medicamentos como a memantina são utilizados no tratamento de pacientes com DA para impedir que o neurotransmissor atue sobre os receptores de glutamato evitando o fluxo descontrolado de íons cálcio.²⁰

A hipótese colinérgica gerou uma corrida na busca de drogas capazes de trazer benefícios e melhora significativa das funções cognitivas de pessoas com DA. Para atacar o problema do déficit colinérgico, várias estratégias foram lançadas por diversos grupos de pesquisa no desenvolvimento de drogas capazes de atenuar os efeitos deletérios da DA. Citando Sugimoto:¹⁶

“Foram desenvolvidos 6 classes de drogas que buscam diminuir o déficit colinérgico em pacientes com DA:

1. Drogas inibidoras (AChEIs) e bloqueadoras da acetilcolinesterase (AChE)”.
2. Precursores da colina, como a fosfatidilcolina, para aumentar a biodisponibilidade da ACh.
3. Liberadores de ACh, para auxiliarem na liberação de ACh nos receptores pós-sinápticos e terminais.
4. Agonistas dos receptores M1 e M3, que mimetizem a ACh nos receptores pós-sinápticos e terminais.
5. Agonistas dos receptores M2 e M3, auto-receptores que regulem a liberação de ACh via feedback negativo.
6. Agonistas nicotínicos ou substâncias com mesmo efeito para melhorar a liberação de ACh.”

A primeira classe de drogas citadas como inibidoras da ação da enzima acetilcolinesterase, são as chamadas AChEIs e constituem hoje a principal estratégia para o tratamento de pacientes com DA, a terapia colinérgica. O tratamento consiste na melhora da transmissão de impulso nervoso na sinapse. O impedimento da hidrólise da ACh pela AChE, por inibição da enzima, é realizada na presença de fármacos que interagem com a enzima, bloqueando-a, permitindo assim a manutenção do gradiente de concentração do neurotransmissor durante os processos de condução de sinal para outros neurônios (transmissão sináptica). O uso de medicamentos corretos, que auxiliem no aumento da concentração de ACh na sinapse, têm efetivamente retardado a evolução da doença.^{16,20}

A ACh (Figura 7) é o neurotransmissor mais abundante no cérebro e o principal responsável pela propagação do impulso nervoso nas fendas sinápticas dos neurônios colinérgicos. Tem como precursores a colina e a acetil-coenzima A (acetil-CoA), que, sob a ação da enzima acetilase, reagem produzindo a acetilcolina dentro das células nervosas as quais armazenam o neurotransmissor nas vesículas sinápticas.^{7,15,36,42}

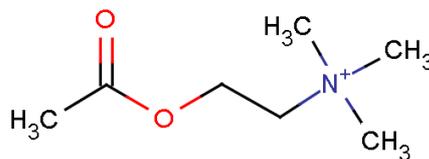


Figura 7. Representação da molécula de acetilcolina.

Existem atualmente no mercado 4 AChEIs aprovadas para o tratamento da DA, são elas: tacrina (THA), rivastigmina (RIV), donepezil (DNP) e galantamina (GNT).^{18,24,31,45} Existem várias outras drogas em estudos clínicos, algumas na fase 3, como a huperzina A (HUP), e vários derivados das três primeiras drogas citadas. Vários estudos e pesquisas são realizadas no intuito de desenvolver novas drogas que possam atuar nas sinapses colinérgicas a fim de garantir a manutenção dos níveis de ACh e, assim, garantir melhor eficiência na execução das atividades cognitivas dos pacientes com DA.

1.4 Transtorno do estado de ânimo (Depressão)

ED é entendido como uma alteração no comportamento psicossocial de um indivíduo, ocasionado por fator emocional ou fisiológico. O ED é muitas vezes denominado transtorno depressivo maior ou simplesmente depressão.⁶

A depressão é uma doença que afeta o sistema nervoso central, interferindo na emoção, percepção, pensamento e comportamento do indivíduo, causando grande sofrimento emocional e prejuízos para vida pessoal, social e profissional.

Segundo a Organização Mundial de Saúde aproximadamente 35% da população mundial apresentam sintomas do ED. Destes, apenas 3% apresentam transtornos afetivos graves, dos quais 30% são potenciais suicidas. Em relação aos homens, as mulheres são duas vezes mais propensas a ED. A média de idade está entre 20 e 65 anos.^{6,46} Porém, não raramente casos de ED são observados em crianças e adolescentes.

A causa da depressão é desconhecida. Sabe-se que aspectos sociais podem acelerar ou desencadear o estado depressivo. Além disto, a predisposição genética, o estresse e o estilo de vida também são fatores que contribuem para o estabelecimento da depressão em um indivíduo.

Uma das teorias atuais que explica a causa bioquímica da depressão relaciona à doença a uma falha no processo de transmissão sináptica de neurônios monoaminérgicos. Nessa teoria, um decréscimo na concentração de neurotransmissores monoaminérgicos norepinefrina, dopamina e serotonina causaria o aparecimento dos sintomas do estado de depressão.^{47,48}

A 5-HT (5-hidroxitriptamina), Figura 8, é um neurotransmissor derivado do aminoácido triptofano por meio de sua hidroxilação pela enzima triptofano hidrolase e de sua descarboxilação pela enzima decarboxilase. Está amplamente distribuído pelo corpo e é o responsável principalmente pela contração da musculatura lisa de arteríolas e bronquíolos. Também está associada a várias funções dos sistemas cardiovascular, gastrointestinal, endócrino e aos estados de percepção sensorial e comportamental (apetite, sono, sexo, agressividade, euforia, cognição e memória).⁴⁷ Há evidências de que a deficiência dos níveis de 5-HT na sinapse leva o indivíduo ao ED.

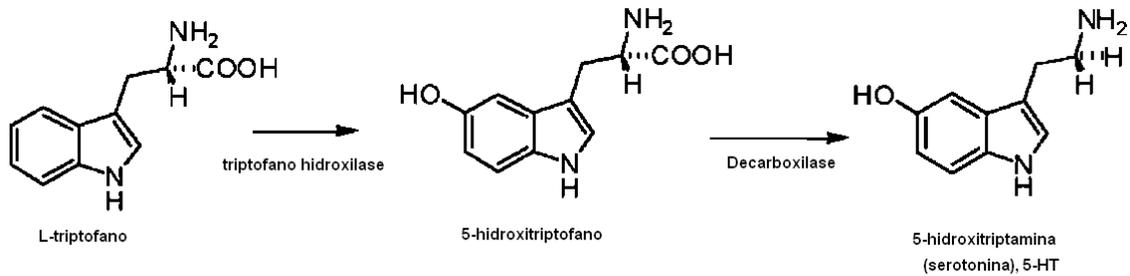


Figura 8. Representação da biossíntese da molécula de serotonina.

As funções resultantes da ação da serotonina são realizadas pela ação deste neurotransmissor sobre receptores específicos. São conhecidos 7 tipos de receptores para 5-HT, dentre estes alguns possuem subtipos, resultando num total de 14 receptores. Estes receptores são denominados pelos códigos 5HT1: 5HT1A, 5HT1B, 5HT1D, 5HT1E e 5HT1F; 5HT2: 5HT2A, 5HT2B e 5HT2C; 5HT3; 5HT4; 5HT5: 5HT5A e 5HT5B; 5HT6; 5HT7.^{47,49}

Muitos dos receptores da 5-HT estão acoplados às G proteínas. O receptor 5-HT_{1A} atua no processo cognitivo de memória e aprendizado. O receptor 5HT_{2A} tem funções específicas na agregação das plaquetas e na contração dos músculos lisos. O receptor 5HT₃ é um canal iônico presente principalmente no trato gastrointestinal e está relacionado às sensações de náusea. O 5HT₄ é situado no trato gastrointestinal, onde apresenta funções na secreção e nos movimentos peristálticos. Os 5HT₆ e 5HT₇ estão presentes no sistema límbico e apresentam alta afinidade por drogas antidepressivas.^{47,49}

Apesar de ser uma doença do SNC, a depressão tem tratamento e pode ser curada, ou controlada. Algumas drogas são utilizadas nos tratamentos antidepressivos, cada uma destas drogas atua de acordo com o mecanismo alvo. Os mecanismos alvos mais conhecidos no tratamento da depressão são:^{6,50}

- benzodiazepínicos;
- antidepressivos tricíclicos;
- inibidores não seletivos de recaptção de monoaminas, onde drogas como, por exemplo: a venlafaxina e a clomipramina atuam na recaptção da serotonina;
- Agentes antagonistas de receptores pré-sinápticos de monoaminas:

mianserina, nefazodona;

- Inibidores da monoamina oxidase (MAOI): selegilina (SEL), rasiglina (RAS), moclobemida (MOC);

- Agonistas benzodiazepínicos: alprazolam);

- Inibidores seletivos de recaptura de 5-HT (ISRS);

- Inibidores seletivos de recaptura de 5-HT e NOR (ISRSN);

- Inibidores de recaptura de 5-HT e antagonistas ALFA-2 (IRSA);

- Estimulantes da recaptura de 5-HT (ERS);

- Inibidores seletivos de recaptura de NOR (ISRN);

- Inibidores seletivos de recaptura de DOP (ISRD);

- Antagonistas de alfa-2 adrenorreceptores.

O tratamento clássico da depressão é feito com o uso de medicamentos que promovam o aumento da serotonina nas regiões sinápticas, seja inibindo a ação das enzimas monoamina oxidase A (MAO-A) e monoamina oxidase B (MAO-B) que degradam a 5-HT, seja pela inibição seletiva de recaptura de 5-HT pelos receptores específicos a essa função. Assim, o desenvolvimento de novas drogas mais eficientes, com efeitos colaterais reduzidos e com um menor período de latência é um desafio a ser vencido no desenvolvimento de pesquisas a serem realizadas nas próximas décadas.

1.5 Acetilcolinesterase

A AChE é o alvo molecular mais importante para os estudos de intervenção terapêutica e desenvolvimento de fármacos para o tratamento de diversos tipos de desordens como miastenia, glaucoma e DA. Sua função biológica é altamente específica.⁵¹⁻⁵³

A AChE (Figura 9) é uma enzima alostérica da classe das hidrolases, com 537 resíduos de aminoácidos na sua sequência. Está ancorada na membrana pós-sináptica; hidrolisa a ACh, em acetato e colina²² no seu sítio catalítico (tríade catalítica da AChE da *Torpedo californica*) composta pelos resíduos Ser200-Glu327-His440 (SEH) situado no fundo do seu sítio ativo.^{23,51,52,54,55} A estrutura 3D

(Figura 9) da AChE está depositada no Protein Data Bank (PDB) com código de entrada 2ACE.⁵⁶ Pode ser classificada estruturalmente em duas formas: globular e assimétrica. A forma globular da AChE é subdividida em monomérica (G1), dimérica (G2) e tetramérica (G4). A forma G4 é a mais abundante no cérebro, principalmente no córtex e no hipocampo e a forma menos abundante é a G1. A forma G4 decresce acentuadamente em pacientes com DA. Já a forma G1 permanece inalterada.⁵⁷

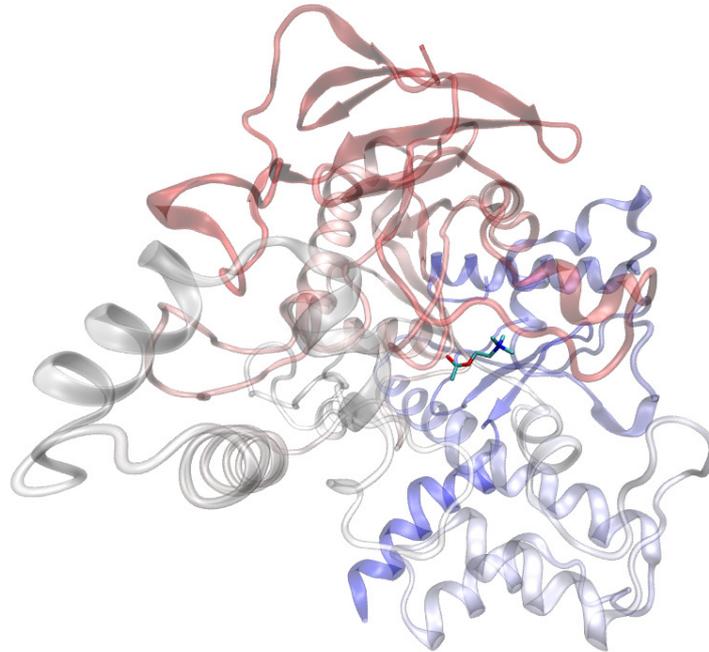


Figura 9. Estrutura monomérica 3D da TcAChE complexada com ACh (docada manualmente), PDB:2ACE.⁵⁶

1.5.1 Sítio ativo da AChE: GORGE

O sítio ativo da AChE denominado GORGE (Figura 10) é composto por quatro sub-sítios e tem aproximadamente 20 Å de profundidade.⁵¹ O primeiro sub-sítio é o sítio periférico que está localizado na entrada do GORGE, o outro é o sítio ligante de amônio quaternário que situa-se na região central do GORGE. Estes dois sub-sítios são constituídos por vários resíduos aromáticos e por isso a totalidade da área que abrangem é denominada sítio aromático da AChE. O GORGE possui poucos resíduos ácidos o que, em conjunto com o fato de ter muitos resíduos aromáticos, que lhe confere uma região de alta hidrofobicidade, produzindo uma alta carga efetiva local.^{51,58}

Os outros dois sub-sítios da AChE, sítios catalítico e aniônico, situam-se no fundo do bolso de acilação, onde ocorre a desativação da ACh.

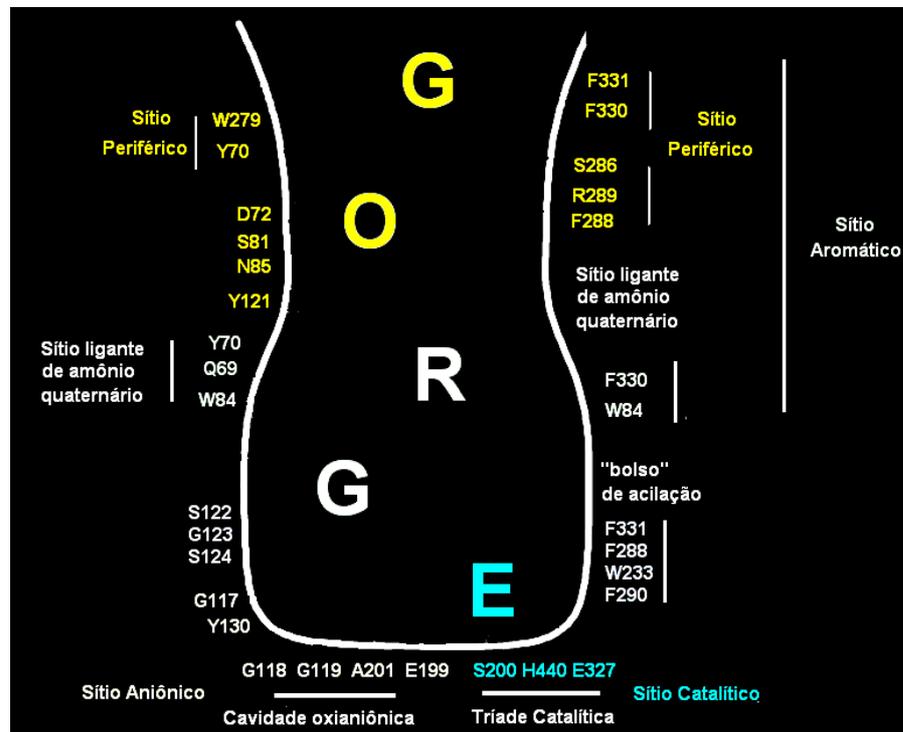


Figura 10. Sítio ativo da AChE (adaptada).^{56,59}

A AChE é uma enzima com um momento de dipolo alto orientado ao longo do seu sítio ativo (800 – 1800 Debye)⁶⁰. Seu sítio ativo é caracterizado pela presença de várias cargas negativas ao redor da sua tríade catalítica, o que explicaria o direcionamento carga positiva da ACh (nitrogênio quaternário) para tríade catalítica SEH, localizada no fundo do GORGE.^{59,61-63}

Além da função colinérgica, a AChE tem uma função não-colinérgica. O sítio periférico do GORGE induz uma mudança conformacional na estrutura da proteína PPA, isto acarreta a quebra desta proteína e o surgimento de fibras amilóides que vão gerar agregação dos peptídeos beta-amilóides durante a fase inicial da DA.⁶⁴ Assim, o uso de drogas capazes de inibir a ação da AChE não somente na região da SEH mas também na região periférica do GORGE são de grande importância no tratamento da doença, não somente para promover a manutenção das funções colinérgicas como também para evitar o aparecimento de placas senis que causam apoptose neural.^{28,42}

1.5.2 Mecanismo de hidrólise da ACh

O mecanismo proposto para a ação da AChE sobre a ACh (Figura 11) é dividido em duas etapas: a hidrólise da ACh e a acilação do grupo acetila. A ACh, depois de ser reconhecida pelos resíduos Asp72 e Tyr70, situados no sítio periférico da AChE, move-se para o fundo do GORGE, ligando-se covalentemente à tríade catalítica, mais especificamente à hidroxila do resíduo Ser200 que atua como nucleófilo usando um par de elétrons livres do oxigênio de sua hidroxila para atacar o carbono da carbonila da ACh formando, em seguida, um intermediário reativo tetraédrico com a His440, que atua como catalisador básico para aumentar a nucleofilicidade da serina (passos 1 e 2 da Figura 11).

Após a formação do intermediário reativo, a histidina, agora ácida, protona o grupo 'O-R' que se torna um melhor grupo de saída que os outros, liberando dessa forma a colina da ACh (passos 3 e 4 da Figura 11). O grupo acila da ACh encontra-se ligado covalentemente com a Ser200. Uma molécula de H₂O lítica interage com a tríade catalítica da AChE, atuando como nucleófilo (passo 5 da Figura 11). O par de elétrons livres do oxigênio da água ataca a carbonila, do grupo acila, formando um novo intermediário reativo que é atacado pela His440 (passo 6 da Figura 11). Em seguida, a histidina, novamente ácida, sofre ataque de um par de elétrons livres, do intermediário tetraédrico, que protonado sofre rearranjo, liberando o acetato formado (ácido acético) (passos 7, 8, 9 e 10 da Figura 11). Desta forma, a Ser200 é restaurada e o processo se repete, enquanto houver impulsos nervosos a serem transmitidos.^{51,52,65}

Quanto a flexibilidade, apesar de ser uma enzima com um número expressivo de resíduos (mais de 500) a AChE é pouco flexível. Porém, algumas importantes modificações estruturais puderam ser observadas principalmente nos resíduos do bolso do sítio ativo quando complexada com os inibidores dímero da tacrina (DMT), RIV e HUP. Os resíduos com mudanças conformacionais significativas são Gly118, Tyr130, His440, Trp279 e os resíduos do sítio aromático periférico.⁵¹

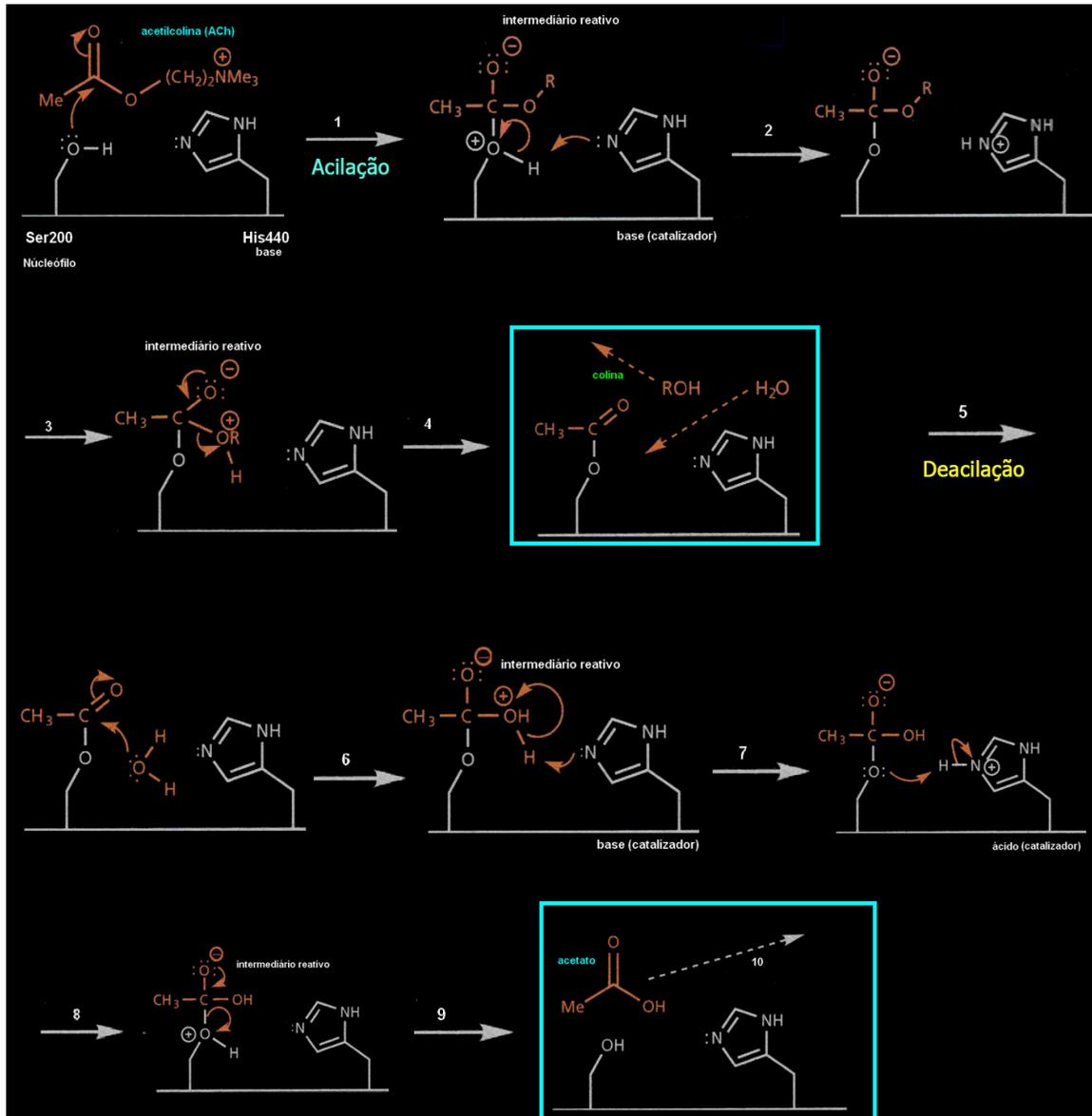


Figura 11. Mecanismo proposto para hidrólise da ACh pela AChE (adaptada).⁶⁵

A presença de moléculas de água no sítio ativo da AChE é primordial para a entrada da ACh, pois a entrada da cavidade não é grande o suficiente para que sozinha o NT passe por ela.⁶⁶ Estudos de dinâmica molecular apontaram que a população de moléculas de água no GORGE varia entre 16 a 22 moléculas. A presença de água no GORGE facilita a entrada da ACh e de outras moléculas agonistas ou antagonistas da AChE por meio do rearranjo das cadeias laterais. É a quantidade de água no GORGE que controla a entrada de ligantes e é a presença de moléculas de água no sítio catalítico que rege a força de ligação entre o resíduo Ser200 e os ligantes que adentram a cavidade.⁶⁶

Alguns inibidores da AChE agem competindo com a ACh, outros inibem a acilação do grupo OH da Ser200, formando um éster de carbamila, mais estável que o acetato e menos apto a sair do sítio ativo.^{21,65}

Novos estudos têm apontado que a AChE tem papel importante na formação de placas de β -amilóides. Quanto maior for a atividade da AChE maior será a quantidade de placas formadas.^{25,67}

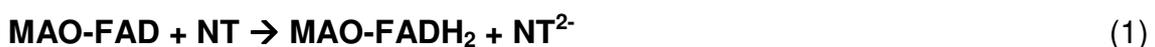
1.6 Monoamina oxidase

A monoamina oxidase (MAO) é uma flavoenzima da classe das oxidoreduases.^{68,69} É encontrada principalmente ancorada na parede externa das mitocôndrias nas sinapses de neurônios catecolaminérgicos e serotoninérgicos, no fígado, pulmões, placenta e rins.^{8,46,70,71}

A MAO é responsável pelo metabolismo (inativação) de monoaminas (neurotransmissores) como a dopamina, norepinefrina e a serotonina, e de neuromoduladores e aminas exógenas que apresentam toxicidade para vários órgãos do corpo.⁷²⁻⁷⁴ O processo de inativação resulta na regulação da quantidade de neurotransmissores monoaminérgicos nas sinapses. Além de regular, a MAO é agente de proteção atuando como barreira metabólica no controle da entrada de aminas tóxicas em muitos órgãos do corpo.^{8,75}

A inativação das aminas biogênicas como a serotonina ocorre por meio da desaminação oxidativa com a função de regular os níveis do NT na sinapse. Essa desaminação é feita pela redução e posterior re-oxidação da flavina adenina dinucleotídeo (FAD), presente na estrutura da MAO, liberando no meio reacional aldeído, amônia e peróxido de hidrogênio.

As reações esquemática da ação da MAO são descritas a seguir:^{8,50,76-78}



O processo de inativação de neurotransmissores pela MAO gera produtos que agem de maneira dúbia, pois, quando há aumento na expressão da MAO é produzido H_2O_2 em grande quantidade e este peróxido pode ser convertido, pela ação de íons metálicos presentes na substância negra do cérebro, em radicais hidroxilas ($\cdot OH$) que são potentes oxidantes. A produção destes radicais pode originar um efeito devastador no córtex cerebral: o estresse oxidativo, uma das causas da apoptose neuronal.^{6,8,74}

A MAO é encontrada no organismo humano sob duas isoformas, MAO-A e MAO-B.^{73,79-81} Estas duas isoformas se diferenciam pela sua seletividade (substratos e inibidores), distribuição e localização nos órgãos do corpo. Porém, apresentam 70% da sequência de aminoácidos idênticas, conferindo a ambas uma alta conservação de identidade de sua cadeia peptídica.^{8,70}

A isoforma MAO-A (Figura 12) apresenta 527 aminoácidos na sua estrutura e uma molécula de FAD, é a isoforma monomérica da MAO. Tem como principais substratos a 5-HT e a NOR, e uma de suas funções é catalisar a oxidação destes neurotransmissores. É encontrada no cérebro (neurônios catecolaminérgicos), placenta, fígado, intestino e pulmões.^{70,72,81,82}

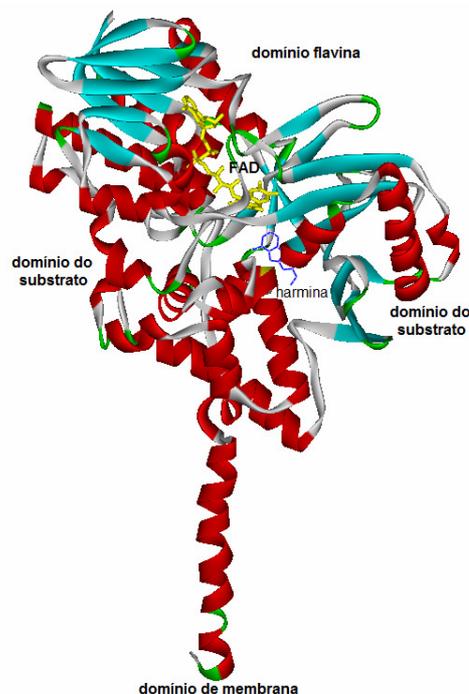


Figura 12. Estrutura 3D da MAO-A complexada com Harmina (PDB:2Z5X).⁶⁹

MAO-B (Figura 13) possui 520 aminoácidos na sua estrutura e uma molécula de FAD, é a forma dimérica da MAO. Tem como principais substratos feniletilamina (PHN) e benzilamina, e uma de suas funções é catalisar a oxidação destes neuromoduladores. É encontrada no cérebro (células gliais e neurônios serotoninérgicos), plaquetas, fígado, intestino e pulmões.^{8,70,72,81,82}

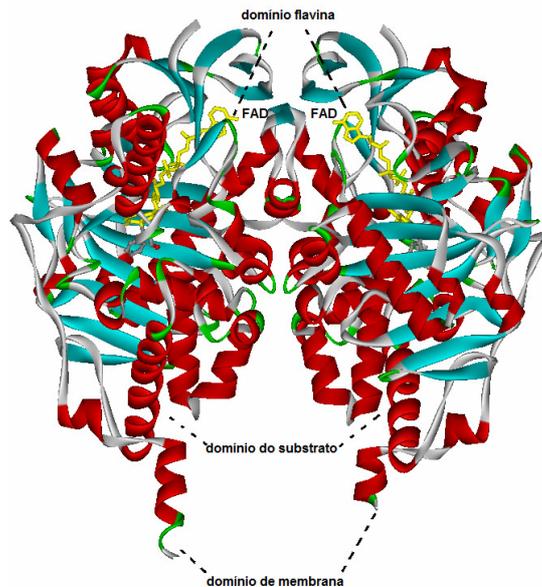


Figura 13. Estrutura 3D da MAO-B complexada com tranilcipromina (PDB:2XFU).⁶⁸

Tanto a MAO-A quanto a MAO-B possuem, de forma generalizada, três domínios na sua estrutura:⁶⁸

- domínio do substrato, sítio de reconhecimento de substratos;
- domínio flavina, sítio onde ocorre a deaminação de NT e a interação com inibidores clássicos da enzima;
- domínio de membrana, alfa-hélices transmembranas que se ligam à membrana plasmática das mitocôndrias.

O reconhecimento molecular dos substratos e dos inibidores da MAO ocorre no sítio ativo que está localizado próximo a junção da enzima com a superfície da membrana da mitocôndria.⁸ A cavidade de entrada do sítio ativo da MAO-B é hidrofóbica e composta por resíduos apolares (Phe103, Pro104, Trp119, Leu164, Leu167, Phe168, Leu171, Ile199, Ile316, Tyr326).⁶⁸ No domínio flavina, a FAD interage por meio de ligação covalente com o resíduo Cis406 na MAO-A e Cis307 na MAO-B

Além dos domínios descritos acima, a MAO possui um sítio regulador independente dos outros sítios, conhecido como sítio de ligação imidazólico tipo I2, que está localizado na junção com a membrana mitocondrial e possui alta afinidade para moléculas com grupos imidazólicos e guanidínicos. O sítio I2 é denominado na MAO-B pela sequência de resíduos Lys149 até o resíduo Met222, localizados na cavidade de entrada do sítio catalítico.^{8,83}

Muitos estudos mostram que a inibição seletiva das isoformas da MAO favorece a neuroproteção, seja aumentando o nível de DOP seja por reduzir a produção de radicais livres no meio sináptico.^{74,81}

Inibidores seletivos da MAO-A são eficazes no tratamento de ED por favorecerem a manutenção do nível de serotonina no cérebro.⁷⁵ Muitos inibidores da isoforma MAO-B demonstram serem capazes de auxiliar no tratamento de demências e doenças degenerativas do SNC como doença de Parkinson e DA, principalmente pela sua função neuroprotetora.^{82,84-86}

1.7 Inibidores da AChE

A DA é uma forma de demência que compromete as funções cognitivas neurais. Assim, uma das estratégias mais utilizada para o tratamento da doença consiste no bloqueio da desativação do neurotransmissor ACh na sinapse de neurônios colinérgicos. A HDC é hoje um dos principais alvos no desenvolvimento de drogas capazes de beneficiarem e melhorarem a manutenção do gradiente da concentração da ACh em pacientes com DA.^{22,87,88} A hidrólise da ACh é impedida por meio de drogas inibidoras e bloqueadoras da ação da AChE sobre o NT.

Dois tipos de conceitos são utilizados para o desenho racional de AChEIs: o primeiro são drogas que tenham o reconhecimento molecular no sítio catalítico da AChE, fazendo preferencialmente ligações covalentes com a hidroxila do resíduo Ser200; podendo ser esta ligação reversível ou irreversível. O segundo são drogas reconhecidas pelos sítios catalítico e periférico aniônico da enzima, localizados na entrada do sítio ativo da enzima, que agem bloqueando a entrada do substrato natural, o neurotransmissor ACh no GORGE da AChE.^{64,87,89}

Algumas AChEIs, além da função de inibição da AChE possuem também ação neuroprotetora atuando de forma mais eficiente no tratamento da DA. Estas drogas atuam de forma negativa no processo de hiperfosforilação da proteína β -amilóide, inibindo a quebra desta proteína e conseqüentemente a formação de placas amilóides.^{23,42,64,90-92}

Algumas drogas atuam como inibidoras da AChE, dentre elas, a THA^{16,23,93,94} primeiro fármaco aprovado pelo FDA para o tratamento da DA, seguida pelo DNP^{16,23,24,94}, pela RIV^{16,23,24,94} e pela GNT.^{23,24} Essas drogas são indicadas para o tratamento nas fases leve e moderada, quando o paciente ainda tem atividade cognitiva independente.

Outras drogas foram estudadas e testadas clinicamente para serem usadas no tratamento da DA, como a fisostigmina (PHY).^{24,67,94} Algumas outras estão em fase de teste e são candidatas promissoras a aprovação, entre elas a HUP^{53,65}, metrifonato (MTR)^{24,27} e a fenserina (PHE)^{24,94}.

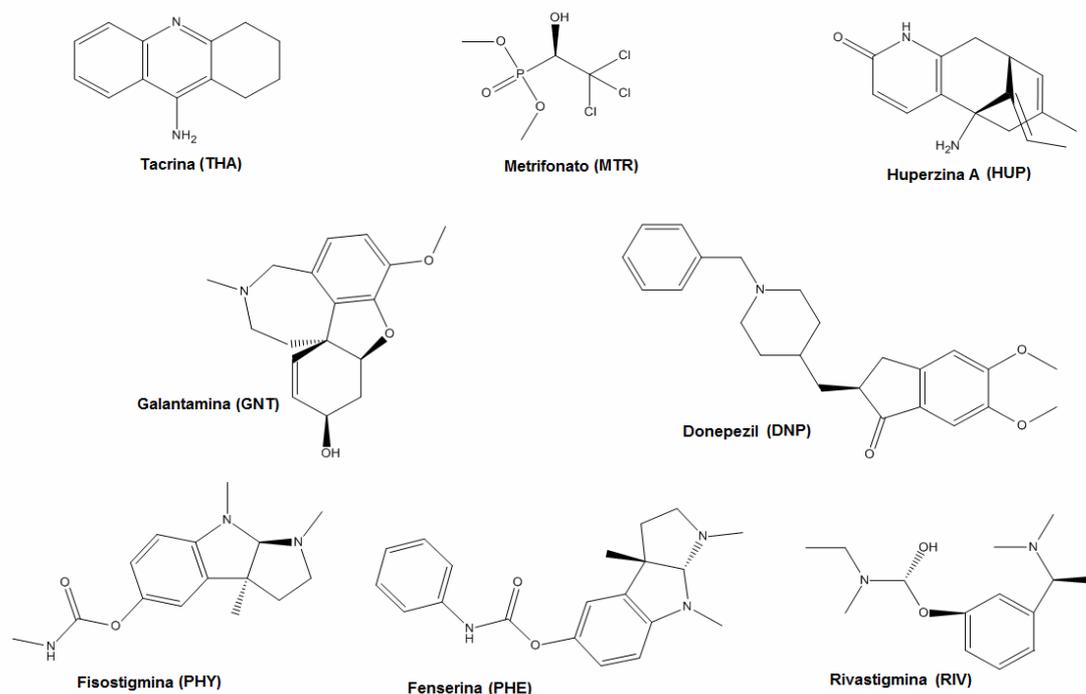


Figura 14. Estrutura 2D de algumas AChEIs.

Quimicamente as AChEIs citadas anteriormente têm em comum a ação inibitória da AChE, porém possuem estrutura e natureza química distintas.

A primeira droga aprovada pelo FDA para o tratamento de pacientes com DA a THA (Figura 14),^{54,95} é um derivado da acridina, (1,2,3,4-tetraidro 9-acridinamina) sintetizada em 1945, usada como agente antimicrobiano e bloqueador da monoaminoxidase.^{93,96} Essa droga é um inibidor reversível, não-competitivo e não seletivo para AChE. Tem alta hepatotoxicidade, farmacocinética lenta e alta incidência de efeitos colaterais.⁵⁴ Aumenta moderadamente a função cognitiva em pacientes com boa tolerância a ela. Embora seja pouco indicada é tida como droga de referência na busca de outras AChEIs.⁹³ Análogos da tacrina ainda são estudados na busca de uma AChEI mais potente. Análogos da THA podem ser formados por:

- substituição ou anelação no anel benzênico;
- substituição no grupo amino primário;
- contração ou expansão do anel do ciclohexano;
- substituição com heteroátomos nos anéis benzênico e ciclohexano;
- anelação de anéis no anel ciclohexano;
- substituição no anel ciclohexano.

Estudos de “docking” molecular entre a THA e a AChE evidenciaram que a THA é reconhecida no sítio ativo da AChE pelo sítio aniônico por meio de interações hidrofóbicas; no sítio periférico da enzima por interações fracas do tipo van der Waals e transferência de carga via elétrons π , e no sítio catalítico da AChE⁹³ por ligação hidrogênio com o resíduo His440 da tríade catalítica, interação eletrostática do tipo “ π - π stacking” com os resíduos Trp84 e Phe330, mais especificamente, forma um complexo de transferência de carga com o resíduo Trp84.⁵⁵

Em 1996, o DNP foi a segunda AChEI aprovada para o tratamento de DA, comercializada como Aricept[®] (Figura 14). Essa droga foi desenvolvida utilizando estudos de reconhecimento molecular e QSAR, mesmo antes da determinação da estrutura tridimensional da AChE.⁹⁷

A DNP ((R,S)1-benzil-4-[(5,6-dimetoxi-1-oxoindanon)-2-yl)-metil] piperidina) é uma droga da família das N-benzilpiperidinas. É uma AChEI altamente seletiva, ligando-se reversivelmente e de forma não-competitiva à AChE.^{16,97,98} O uso desse medicamento resulta em melhoras significativas comparando-a à THA, no tratamento da DA leve e moderada.^{91,99} Foi desenvolvido para superar as desvantagens dos efeitos colaterais produzidos pela THA. É bem tolerada pelo organismo, apesar de causar efeitos colaterais característicos das AChEIs como náusea, diarreia, constipação, dor de cabeça, tonturas, distúrbios do sono e complicações estomacais.¹⁷

Estudos de reconhecimento molecular realizados a partir da estrutura cristalina do complexo AChE-DNP mostraram que esta AChEI interage com resíduos dos sítios aniônicos e periférico da enzima e não diretamente com a tríade catalítica. Similarmente à THA, o anel benzênico da DNP faz interação eletrostática do tipo “ π - π stacking” com o resíduo Trp84. O DNP interage com várias moléculas de água estruturais, localizadas dentro do sítio ativo da AChE, formando importantes ligações de hidrogênio que potencializam o poder inibitório desta AChEI.⁹⁸ Os oxigênios dos dois grupos metoxilos fazem interação π - π clássica com o resíduo Trp279 da AChE.⁹⁸ Todas as formas enantioméricas deste inibidor mostram o mesmo perfil de seletividade, pois se interconvertem rapidamente em solução aquosa via intermediário cetoenólico, existindo, portanto como uma mistura racêmica.⁹⁵

A terceira AChEI utilizada no tratamento de DA foi a PHY (Figura 14). É um alcalóide natural, pertencente ao grupo dos carbamatos, extraído dos feijões de uma

leguminosa nativa do oeste africano conhecida como feijão-de-Calabar (*Physostigma venenosum*).⁵⁴ Sua estrutura foi determinada em 1925.⁶⁵ Foi a primeira AChEI estudada clinicamente para ser aplicada no tratamento da DA.³⁴

A PHY é seletiva, pseudo-irreversível, para AChE por se complexar a Ser200 e formar uma ligação pseudo-covalente com o átomo de oxigênio da hidroxila do resíduo. Apresentou baixo índice terapêutico durante os estudos clínicos, além de baixo tempo de meia-vida e biodisponibilidade variável. Apesar de ter proporcionado melhora da cognição dos pacientes, essa droga foi rejeitada pelo FDA devido a sua baixa eficiência a longo prazo nas fases clínicas II e III.^{16,54} A exemplo da THA, apesar de não ser mais usada no tratamento para DA, a PHY é objeto de referência no desenvolvimento de novos análogos para o tratamento da DA.

Em meados de 1998 foi aprovada na Europa a RIV, (Figura 14) droga derivada da fisostigmina por modificações moleculares. É uma AChEI seletiva e pseudo-irreversível como a PHY, porém tem menor seletividade do que sua predecessora.^{23,34,57,95} Diferente da PHY, a RIV apresenta perfil farmacológico superior, com boa seletividade e bioatividade considerável in vivo, boa tolerância por parte dos pacientes, além de propriedades neuroprotetoras e melhora na cognição dos pacientes durante as fases de testes clínicos.¹⁰⁰ Foi aprovada pelo FDA no ano 2000.^{23,34,57,95} A RIV é um potente protetor neural, seu uso auxilia a preservar a viabilidade e a estrutura neuronal.¹⁰¹

A RIV é considerada uma AChEI pseudo-irreversível por se complexar à AChE durante o reconhecimento molecular, carbamilação a enzima no oxigênio da hidroxila do resíduo Ser200, formando uma ligação covalente com distância de ligação da ordem de 1,39 Å que é lentamente desfeita (descarbamilação). Além da carbamilação, a RIV interage com os resíduos Trp84 e Phe330.¹⁰² A RIVA inibe seis vezes mais a forma G1 do que a forma G4 da AChE.⁵⁷ Por isso é a ainda hoje o principal fármaco indicado para o tratamento da DA nas fases leve e moderada. O tratamento via terapia combinada com o uso de AChEIs como a RIV e a memantina, antagonista do receptor de glutamato (N-metil-D-aspartato) NMDA, promove uma melhora acentuada nas funções cognitivas de pacientes com DA moderada e severa.³¹

A quarta AChEI aprovada pelo FDA para o tratamento da DA foi a GNT (Figura 14). É um alcalóide encontrado em várias plantas da família das *amaryllidaceae*, particularmente na flor conhecida como “snow drop”, planta nativa da região do cáucaso europeu.^{23,35,41,97,103,104}

Além de ser um inibidor seletivo, competitivo e reversível da AChE, a GNT é modulador alostérico dos receptores nicotínicos cerebrais, musculares e gangliais.¹⁰³ Tendo atividade diferenciada sob o sistema nervoso central, facilidade para penetrar a barreira hematoencefálica, boa biodisponibilidade, boa tolerância do organismo, foi aprovada em 2001 para o tratamento da DA, principalmente por promover melhoras significativas na cognição e outros sintomas não-cognitivos nos pacientes, além de inibir a formação de emaranhados da β -amilóide.^{32,41} A GNT interage com os resíduos do sítio ativo da AChE, principalmente a Gly118, Glu199, Ser200 e Phe330 por ligações de hidrogênio e com o Trp84 por interações do tipo π - π .⁹⁷

Um dos principais análogos da PHY estudados e possível candidato a novo medicamento para tratamento da DA é a PHE (Figura 14). A PHE é uma AChEI altamente seletiva e pseudo-irreversível.²² Está na fase II dos testes clínicos e é uma promessa por ter janela terapêutica relativamente larga em comparação às outras AChEIs. Em estudos pré-clínicos, a PHE apresentou baixa toxicidade, alta biodisponibilidade e acentuada potência na melhora das funções cognitivas, quando comparada com a THA e a PHY.²³

Moléculas derivadas de ervas provenientes, principalmente, do oriente são também alvo de estudo e consideradas promissoras candidatas a AChEIs com aplicação no tratamento da DA. A mais estudada destas é a HUP (Figura 14), alcalóide natural obtido da *Huperzia serrata*, planta muito utilizada pela medicina chinesa. É um potente inibidor reversível da AChE⁵⁶. É uma potencial candidata para o tratamento de DA, considerando sua ação prolongada sobre o SNC, baixa toxicidade, além de ação protetora sobre os neurônios contra o excesso de glutamato que pode causar a morte das células nervosas.^{87,95} Está sendo utilizada nos EUA como suplemento alimentar (extrato seco). Sem rota de síntese definida, para ser produzida em larga escala, a busca por análogos tem sido intensificada. Alguns de seus análogos mostraram ser 8 a 400 vezes mais potentes que a HUP.^{42,87}

Em estudo de “docking”⁵⁶ é mostrado que a HUP tem seu reconhecimento molecular com a AChE por meio de interações do tipo $\pi-\pi$ com os resíduos Trp84 e Phe330, além da ligação de hidrogênio com os resíduos Gly118, Tyr130 e His440.⁵⁶

A partir da década de 1920 alguns compostos organofosforados foram estudados como poderosos inibidores irreversíveis da AChE. O primeiro deles foi o gás Sarin (SAR), utilizado como arma química em guerras.⁶⁵ A única droga da classe dos organofosforados estudada como potencial AChEI para o tratamento de pacientes de DA é o metrifonato (MTR) (Figura 14), uma “pró-droga” não ativa, utilizada inicialmente como anti-helmíntico que, quando metabolizada, produz o metabólito ativo 2,2-diclorovinil dimetilfosfato (DCV) que atua de forma seletiva e pseudo-irreversível sobre a AChE.

1.7.1 Análogos de AChEIs

O desenvolvimento de novas moléculas vêm sendo realizado a partir de drogas com eficácia reconhecida na busca por drogas mais eficientes tanto para a melhora da função cognitiva dos pacientes quanto na redução de efeitos colaterais ocasionados com as AChEIs aprovadas.

Análogos da THA são amplamente investigados e testados para inibição da AChE. Uma das AChEIs derivadas da THA mais estudadas é o DMT (Figura 15), formado a partir de duas unidades da THA ligadas por um esqueleto carbônico de unidades de $(\text{CH}_2)_n$, que, para $n=7$ tem maior seletividade para a AChE ($K_i=77\text{fM}$).¹⁰⁵

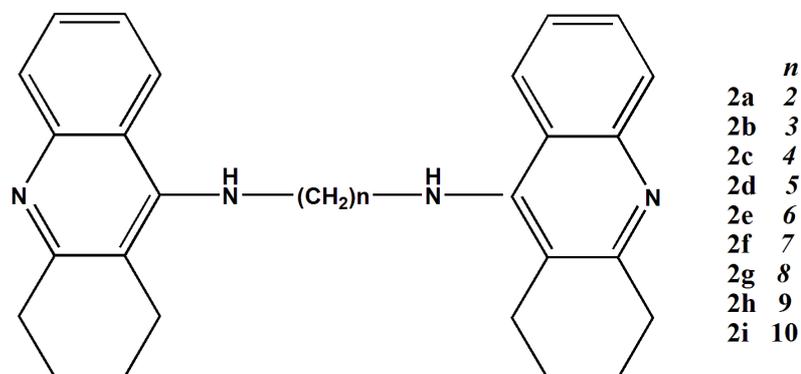


Figura 15. Estrutura 2D do dímero da tacrina.¹⁰⁵

Outros derivados da THA (Figura 16) são gerados por condensação da AChEI com outras drogas, como a huprina (Figura 16a)¹⁸, o triptofano (Figura 16b)⁶⁴, o 1,2-diarilimidazol (Figura 16c)¹⁰⁶ e a 2-aminopiridina-3,5-dicarbonitrila (Figura 16d)⁹⁰.

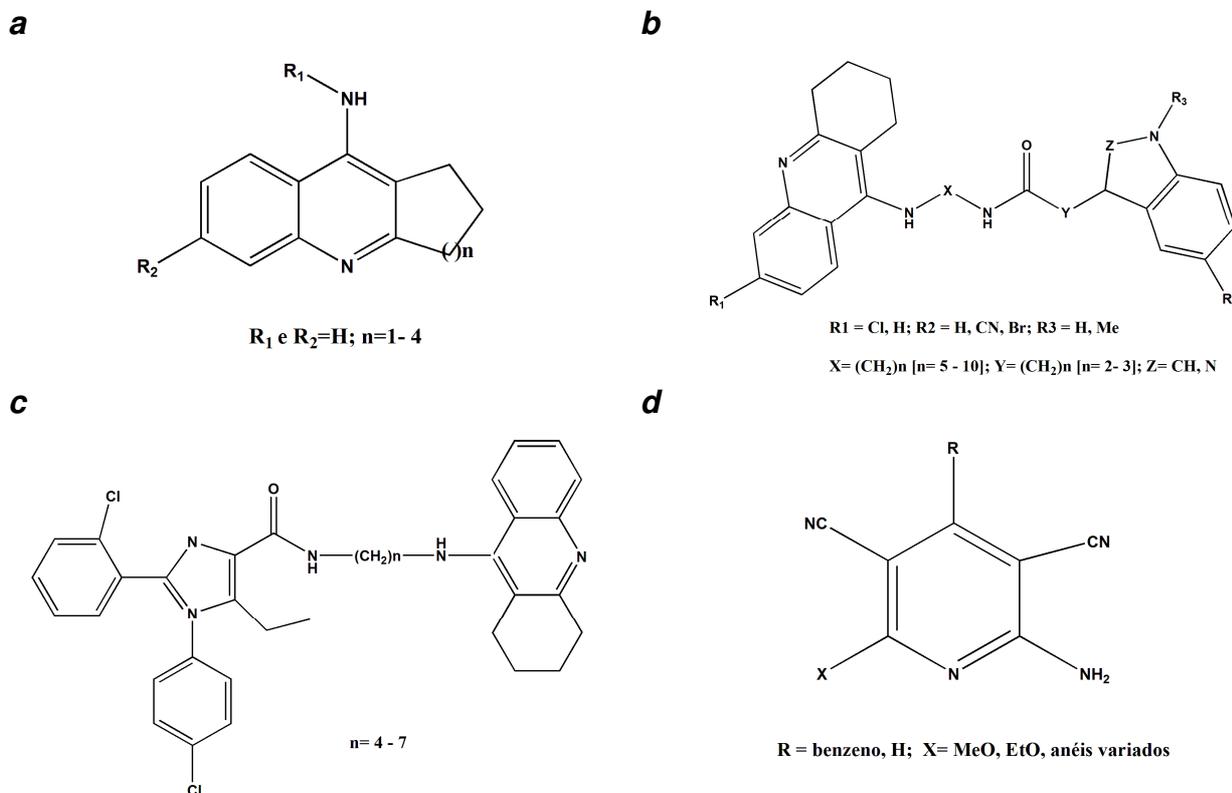


Figura 16. Estrutura de derivados da THA.

Vários estudos teóricos e experimentais são realizados para prever melhores AChEIs candidatas ao tratamento da DA. Além da THA, outras AChEIs utilizadas para tratar DA são ponto de partida para a síntese ou proposta de novas drogas com potencial ação de inibição sobre a AChE.

O DNP, AChEI obtido por meio de estudos teóricos, é outra molécula alvo de estudos para predição de AChEIs com maior potencial de inibição do que ela seja experimentalmente (Figura 17a)¹⁰⁷ (Figura 17b)⁴² seja com uso de técnicas como QSAR 3D. A RIV (Figura 17c)³⁷ e a GNT (Figura 17d)³⁵ também são moléculas alvos de investigações na tentativa de gerar drogas com maior potencial terapêutico por meio de estudos de QSAR 3D e COMFA. Algumas das drogas geradas por estes estudos chegam a ter potencial de inibição 10 mil vezes maior que a THA, porém testes clínicos que comprovem a eficácia e a boa tolerância destas drogas por humanos são necessários para avaliar a viabilidade e a segurança destas novas drogas.

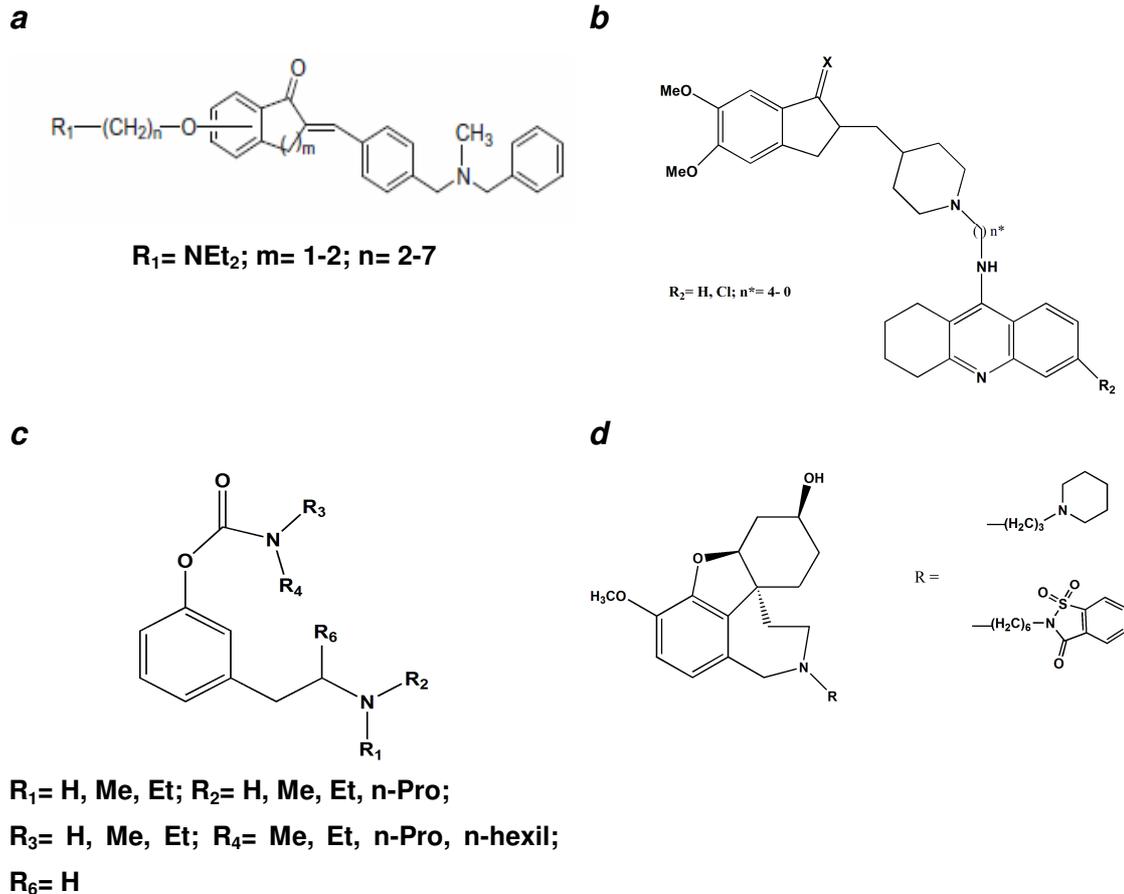


Figura 17. Estrutura de derivados do DNP (a e b), RIVA (c) e GALA (d).

Além das AChEIs sintéticas ou obtidas por estudos teóricos, algumas ervas conhecidas culturalmente, que contenham substâncias que apresentem ação na melhora das funções cognitivas, também são estudadas. Estas ervas são amplamente conhecidas pela população oriental, e são usadas há séculos no tratamento de algumas demências e males próprios do SNC. Ervas como *Huperzia serrata*, *Panax ginseng*, *Ginkgo biloba*, *Salvia officinalis*, *Camellia sinensis*, *Pueraria lobata*, *Rhodiolla Rosae Linn*, *Hymenosohace Benth*, *Drymymosohace Benth*, e muitas outras são hoje alvo de estudos na busca de compostos naturais que atuem como neuroprotetores e inibidores da AChE ou de outra enzima que tenha papel secundário no desenvolvimento de demências.^{39,108,109}

1.8 Inibidores da Monoamina oxidase (MAOI)

A transmissão de impulsos e sinais nervosos na sinapse é uma das atividades cruciais para o bom funcionamento do SNC. Quando os processos sinápticos falham ou desaparecem o cérebro envia sinais internos e externos que indicam importantes alterações no seu funcionamento. Uma das falhas que podem ocorrer durante a sinapse é a redução na concentração de neurotransmissores nas fendas sinápticas, além do decréscimo na produção de vesículas que armazenem os NTs nos neurônios pré-sinápticos. Este desequilíbrio pode acarretar o aparecimento de doenças como demências e mudanças no estado de humor gerando alterações que podem levar ao ED.

Suspeita-se que uma das causas do ED seja a falha no processo de neurotransmissão nos neurônios que utilizam neurotransmissores monoaminérgicos durante a sinapse. O decréscimo na quantidade de NOR, flucoxantina, DOP e 5-HT na transmissão monoaminérgica parece estar relacionada com o desenvolvimento do ED.¹¹⁰ Estes neurotransmissores têm papel fundamental nos efeitos de satisfação, prazer, sono, controle da dor e cognição, componentes importantes para a boa saúde de um indivíduo.

Uma das formas de tratamento para o ED é o uso de drogas que atuem diretamente na sinapse para impedir o decréscimo da quantidade de NTs monoaminérgicos na fenda sináptica.

A enzima MAO é uma flavoenzima que possui duas isoformas, MAO-A e MAO-B responsáveis pelo controle do nível de monoaminas na sinapse por meio da oxidação (deaminação) dos neurotransmissores como a DOP, NOR e 5-HT. A MAO-A possui alta afinidade pela serotonina e pela noradrenalina, já a MAO-B tem grande afinidade pelas benzilaminas e o PHN.^{71,74,81,82}

O uso da reserpina mostrou que esta substância impede a entrada de alguns neurotransmissores como NOR, DOP e 5-HT nas vesículas sinápticas. Desta forma, as monoaminas não podem ser oxidadas pela MAO⁶⁵. Este fato e alguns outros originaram a teoria monoaminérgica clássica da depressão.⁶ Esta teoria relaciona o ED com o déficit dos processos sinápticos mediados pela NOR e 5-HT. Assim, esta teoria deu aporte para a utilização de fármacos com ação inibitória da monoamina oxidase (MAOI) para o tratamento do ED.^{6,74,78,80,110}

Os MAOIs começaram a ser utilizados como antidepressivos em meados da década de 1950. A primeira geração de MAOIs eram drogas que inibiam de forma não seletiva e irreversível as duas isoformas da MAO.^{6,78}

Drogas como tranilcipromina (TRA), isocarboxazida (ISO), iproniazida (IPR) e fenelzina (PHZ) foram amplamente utilizadas no tratamento do ED (Figura 18).⁶ Atualmente, seu uso é restrito apenas para os casos onde outras drogas não são eficientes, pois, os efeitos colaterais causados são severos, sendo o mais crítico a “síndrome do queijo e vinho”. Esses alimentos, assim como as carnes e a cerveja, possuem grande quantidade de tiramina, que é NOR norepinefrina nos terminais pré-sinápticos. Desta forma, o uso destas drogas deve ser feito com uma rígida dieta alimentar, para evitar crises hipertensivas de alto risco.^{6,65}

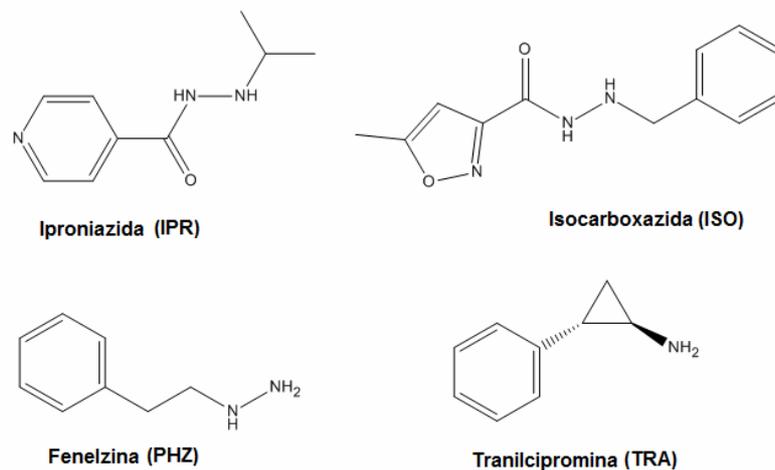


Figura 18. Estrutura de MAOIs de 1ª geração.

Para amenizar os efeitos indesejados das MAOIs de primeira geração, uma segunda geração de drogas foi desenvolvida para o tratamento do ED. Estas novas MAOIs inibem de forma irreversível, porém seletivas, as isoformas da MAO. As MAOIs de segunda geração (Figura 19) mais conhecidas são Clorgilina (CLO) e Nialamida (NIA) - inibidores da MAO-A e Selegilina (SEL) e Rasagilina (RAS) - inibidores da MAO-B.^{71,73,77,82}

A selegilina é um inibidor da MAO-B que permite o aumento da taxa de monoaminas na sinapse. Esta MAOI tem atividade anti-apoptótica, atuando como receptor NMDA, aumentando a síntese de NO e os níveis de monoaminas, induzindo assim a atividade de enzimas anti-oxidantes como a superóxido dismutase e a catalase.⁸² É uma droga utilizada no tratamento auxiliar da doença de Parkinson.

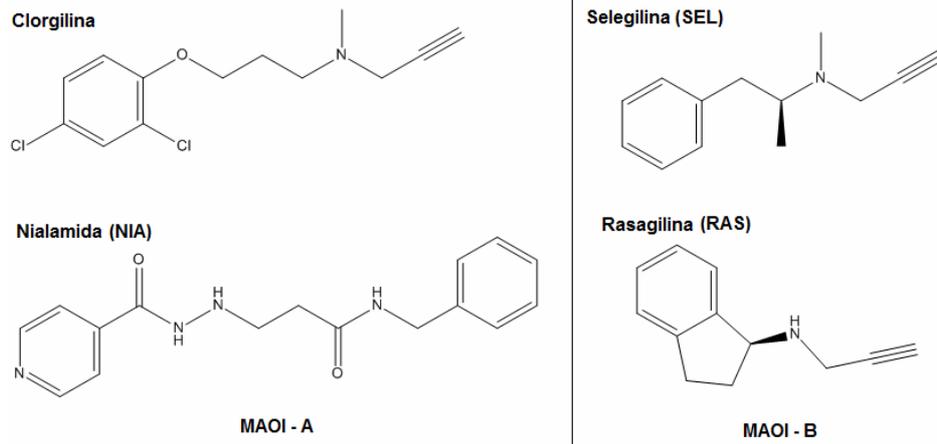


Figura 19. Estrutura de MAOIS de 2ª geração.

Na busca pela redução dos efeitos colaterais das MAOIs de 1ª e 2ª geração, novos inibidores reversíveis e seletivos da MAO-A (IRMAs) foram introduzidos no mercado. Fármacos como moclobemida (MOC), brofaromina, toloxatona (TOL) e befloxatona (Figura 20) são prescritos como antidepressivos que inibem apenas a isoforma A da MAO. Isto permite que a isoforma MAO-B fique livre para realizar a deaminação de monoaminas como a tiramina e outras amins tóxicas.⁶

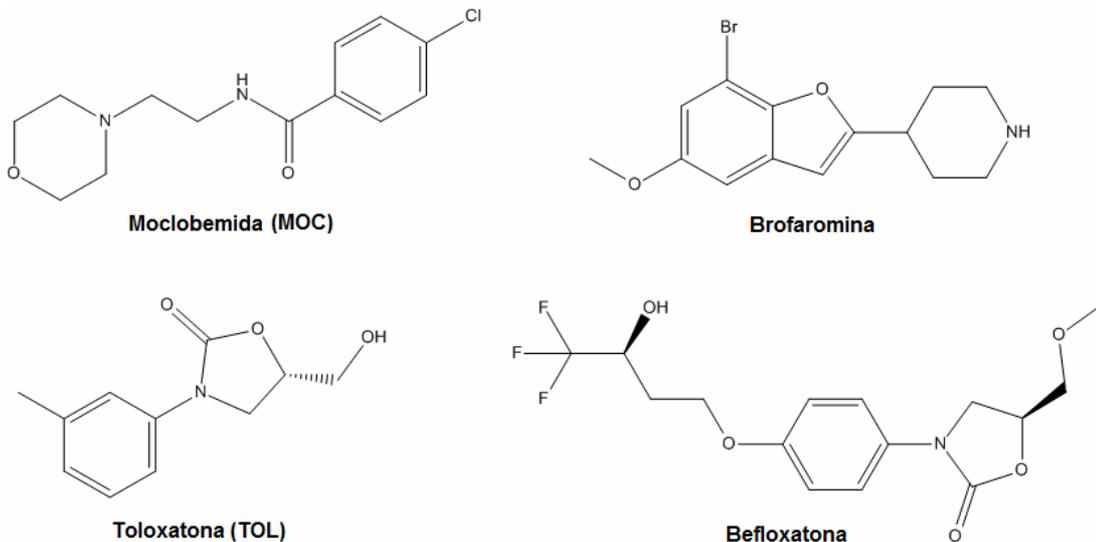


Figura 20. Estrutura de MAOIS de 3ª geração (IRMAs).

Um dos problemas enfrentados por pacientes que utilizam antidepressivos da classe dos MAOIs é a tardia latência inicial do efeito terapêutico. Uma explicação para a demora no início dos efeitos terapêuticos seria as alterações causadas nos receptores pré-sinápticos, inibitórios de sinapses recorrentes. Este problema parece ser atenuado a partir da terceira semana de uso de MAOIs de primeira e segunda

geração, e após duas semanas de uso de MAOIs de terceira geração.⁶ Alguns outros estudos apontam que o uso prolongado de antidepressivos a neuroplasticidade do SNC é alterada, principalmente na região dos receptores monoaminérgicos.

Dois mecanismos são propostos na catálise das MAOIs pela MAO. O primeiro envolveria transferência de cargas e o outro um mecanismo de reação nucleofílica. Estes dois mecanismos estão relacionados com a alta delocalização eletrônica das MAOIs que geram alta polarizabilidade e hidrofobicidade destas moléculas.⁸¹

Os tipos de interações de reconhecimento molecular envolvida na inibição da MAO-A são as interações entre anéis aromáticos do resíduo Phe208 e dos substratos (NTs), onde são observadas interações do tipo $\pi-\pi$.⁷³

No caso da MAO-B são observadas interações do tipo van der Waals, de natureza hidrofóbica, entre o resíduo Ile199 e o substrato. A alta lipofilicidade é a principal característica para que um inibidor tenha ação efetiva sobre a MAO-B.¹¹¹ Além desta propriedade, o tamanho da cadeia lateral dos compostos arildiazólicos não deve conter mais de dois carbonos. As drogas inibidoras da MAO-B devem ser moléculas com regiões ricas em elétrons para interagirem com regiões eletrofílicas do sítio ativo da enzima (Figura 21).

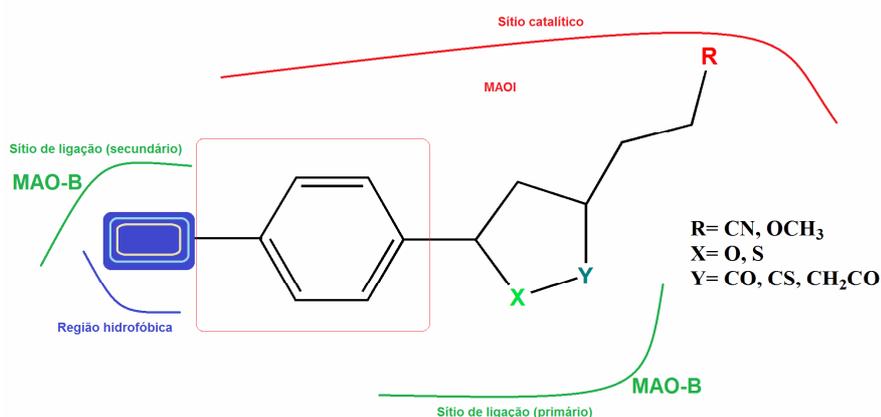


Figura 21. Representação esquemática da interação entre MAOIs e MAO-B (adaptada).¹¹¹

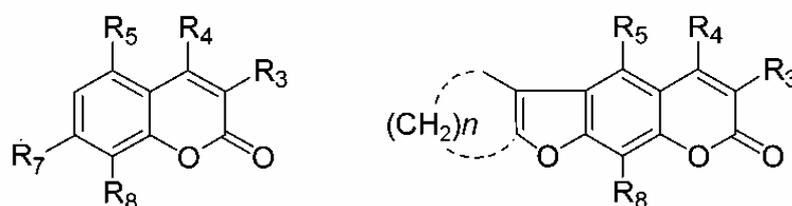
Para obtenção de inibidores seletivos e reversíveis da MAO-A é fundamental que a molécula não tenha o grupo amino em sua constituição para que não ocorra a formação de ligação covalente entre a MAO e o inibidor.

O interesse no desenvolvimento de novos inibidores seletivos e reversíveis da MAO-B tem aumentado nos últimos anos, decorrente do aumento dos níveis de MAO-B em humanos da terceira idade. Este aumento pode contribuir para o favorecimento de doenças neurodegenerativas como as doenças de Parkinson e Alzheimer por meio da formação de radicais livres via MAO-B.^{72,74,82}

Pesquisas são continuamente realizadas para desenvolver novas drogas que associem alto poder de inibição com seletividade e reversibilidade para a inibição das duas isoformas da MAO de maneira a minimizar os efeitos colaterais das MAOIs de 1ª e 2ª gerações.

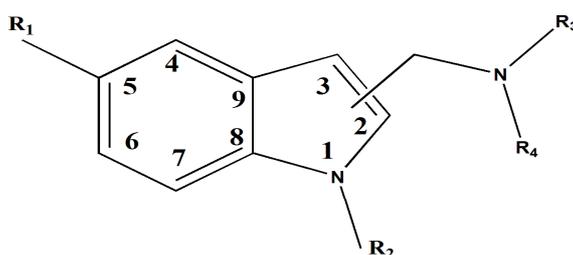
Vários compostos com potencial poder de inibição sobre as duas isoformas da MAO foram obtidos por técnicas de “drug design” com o auxílio de estudos de QSAR 3D. Compostos derivados da cumarina (Figura 22a)⁸¹ mostraram atividade de inibição até 1600 vezes maior que a CLO e a SEL. Derivados de Indolalquilaminas (Figura 22b)⁷³ também mostraram alto poder de inibição para MAO-A e MAO-B.

a



R3= H, NH₂; R4= H, Me; R5= OMe, H; R7= OH, MeCOCH₂O-; R8= H, OMe; n= 1-2

b



R₁= H, OH, OCH₃, C₆H₆-CH₂O-;

R₃= H, CH₃, C₅H₆-CH₂-;

R₂= H, CH₃, C₅H₆-CH₂-;

R₄= H; CHC-CH₂, CH₃-CC-CH-

Figura 22. Estrutura de derivados (a) cumarina e (b) indolalquilaminas potenciais inibidores da MAO.

1.9 Associação de AChEIs e MAOIs no tratamento do ED e DA

A DA e o ED são doenças de grande impacto social. Esforços contínuos estão centrados em pesquisas para o desenvolvimento de medicamentos que possam tratar estas enfermidades. Tanto a DA quanto o ED são patologias bioquimicamente multifatoriais.^{86,112}

Algumas drogas como a SEL e a RAS utilizadas no tratamento da ED têm trazido benefícios para pacientes que as utilizam e têm DA.^{85,92,112} Estas drogas têm permitido a melhora na proteção neuronal, por meio do impedimento da neurodegeneração via estresse oxidativo, causada principalmente devido a ação das isoformas da MAO nas fendas sinápticas.⁹²

Vários estudos têm sido direcionados pelo fato de MAOIs poderem auxiliar no tratamento da DA, além atuarem também no tratamento do ED. Associação de AChEIs e MAOIs têm sido estudadas na busca de drogas que inibam com maior eficiência, tanto a AChE quanto as isoformas da MAO. Desta forma está surgindo uma nova classe de inibidores multi-funcionais, AChEI-MAOI.⁸⁶ A droga ladostigil (LAD) é um exemplo bem sucedido das AChEI-MAOIs, constituída pelos farmacóforos da RIV (AChEI) e da RAS (MAOI) (Figura 23), e atualmente está na fase II de testes clínicos para o tratamento de demências como DA, doença de Parkinson e depressão.^{86,92} Esta droga mostrou alto poder de inibição frente às duas enzimas AChE e MAO-B.

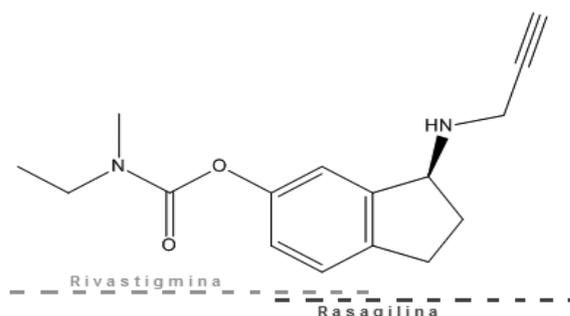


Figura 23. Estrutura 2D do ladostigil.

Outros compostos derivados pirazólicos (Figura 24a) foram estudados como drogas multi-funcionais no tratamento de patologias neurodegenerativas.^{86,112} Associando a RAS (MAOI), a ISO (MAOI), a LAD (AChEI-MAOI), um anel pirazol e um grupo tiocarbamoil (NC=S) isostero do grupo carbamato, alguns derivados 3,5-

diaril-1-carbotioamida-pirazolínicos (Figura 24b) foram gerados e testados como potenciais AChEI-MAOIs.

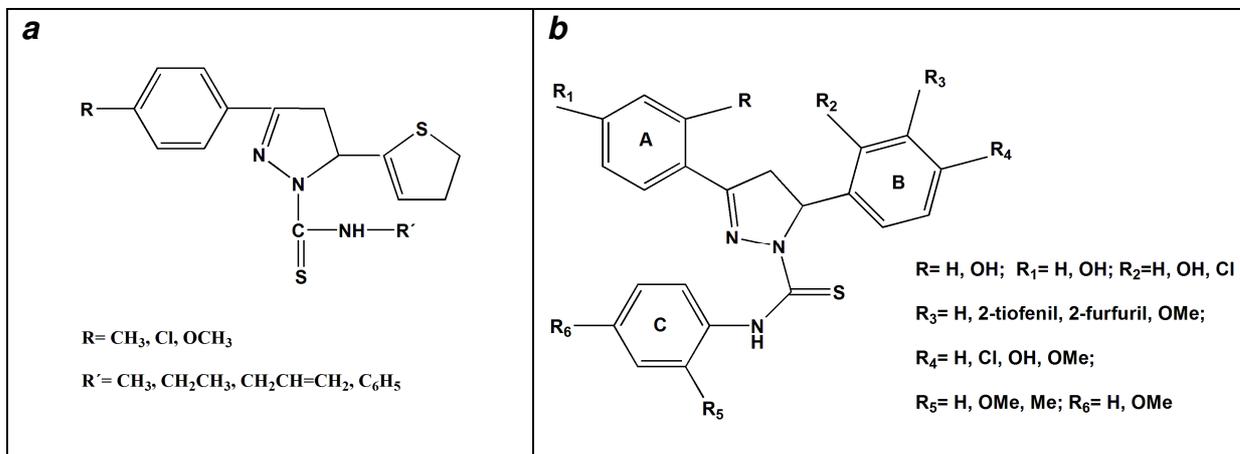


Figura 24. Estrutura 2D de derivados pirazólicos.

Os compostos representados na Figura 24a mostraram alto poder de inibição da AChE e da MAO-B para os substituintes R= Cl e OMe e R' = Me e Et. O IC₅₀ destes compostos ficou na ordem de nM para AChE e μM para MAO-A e MAO-B. Os pontos de interação dos compostos com as duas enzimas podem ser colocados da seguinte forma: o cloro e o grupo metoxil são substituintes ricos em elétrons e participam de forma ativa na inibição da AChE e da MAO. O grupo tiocarbamoil sendo um isómero do grupo carbamato é apto a interagir com o sítio catalítico da AChE, formando um éster de tiocarbamila com o resíduo Ser200 e o grupo fenila interage com os sítios ativos da AChE e MAO-B por meio de interações do tipo p-p com os resíduos aromáticos presente no sítio de inibição de ambas enzimas.^{85,86,112}

Apesar dos compostos estudados apresentarem natureza inibitória dual, é desejável que o IC₅₀ de inibição destes esteja abaixo de concentrações μM, garantindo assim uma dosagem ótima para o tratamento de doenças como a ED e a DA.⁸⁶

Capítulo 2

2. Objetivo

O objetivo geral deste trabalho é o estudo do mecanismo de ação de moléculas agonistas e antagonistas utilizados no tratamento do mal de Alzheimer e da depressão.

2.1 Objetivos específicos

- ◆ Determinar por meio de cálculos de estrutura eletrônica, descritores eletrônicos, geométricos, estruturais e topológicos de NTs, AChEs e MAOIs no vácuo e em meio solvatado utilizando método DFT;
- ◆ Modelar o perfil farmacofórico dos NTs, dos agonistas e dos antagonistas atuantes nas enzimas AChE e na MAO-A;
- ◆ Evidenciar o perfil farmacofórico das MAOIs como potenciais AChEs, por meio de análise multivariada, buscando componentes principais (PCA) que correlacionem estas duas classes de fármacos;
- ◆ Estudar teoricamente o processo de interação entre a AChE, seu substrato natural ACh e as AChEs: DMT, DNP, GNT, HUP e THA;
- ◆ Calcular a energia livre de interação, ΔG_{bind} , por meio do método FEP, entre a AChE e alguns inibidores que interagem bloqueando o sítio ativo da enzima através interações do tipo eletrostáticas e de van der Waals;
- ◆ Calcular a energia de interação por resíduo, com a finalidade de obter a contribuição de cada um dos resíduos no processo de reconhecimento, interação e bloqueio da enzima.

Capítulo 3

3. Metodologia

3.1 Considerações Gerais

Em 2013 foram agraciados conjuntamente Martin Karplus, Michael Levitt e Ariel Warshel com o Prêmio Nobel de Química "pelo desenvolvimento de modelos em multiescala para sistemas químicos complexos".¹¹³ Estes três pesquisadores foram homenageados por associar duas abordagens para simular moléculas e reações químicas em computadores. Combinando as teorias da mecânica clássica (MC) e quântica (MQ) para simular in sílico (experimentos que são realizados inteiramente em um computador) moléculas e reações químicas de sistemas complexos e macromoleculares.¹¹⁴

Quinze anos antes, outros dois químicos teóricos haviam sido galardoados com o mesmo prêmio, Walter Kohn "pelo desenvolvimento da Teoria do Funcional de Densidade" e John A. Pople "pelo desenvolvimento de métodos computacionais em química quântica".¹¹⁵

Sem sombra de dúvidas estes prêmios são reconhecimentos importantes para toda a química teórica, porém não significam em absoluto que o tratamento de sistemas moleculares complexos é trivial ou que esteja completamente resolvido.

Proteínas, enzimas e moléculas pequenas tem sido objeto de vários estudos teóricos ao longo dos últimos anos. Por outro lado milhares de alvos químicos e biológicos ainda não foram estudados. Estes estudos são de suma importância na solução de problemas enfrentados pela sociedade como a cura e tratamento de doenças e os problemas envolvendo processos industriais onde a catálise é etapa fundamental.^{114,116}

No passado, muitos cientistas acreditavam e afirmavam que os métodos computacionais de simulação de ambientes químicos iriam resolver de forma rápida os problemas da química. Atualmente é sabido que as simulações computacionais são excelente ferramenta para descrever problemas químicos em nanoescala, mas roga pela colaboração entre pesquisadores de áreas multidisciplinares que é necessária, principalmente, para acelerar o desenvolvimento de novos produtos, como a descoberta de novos medicamentos e de soluções para manejar os recursos energéticos.¹¹⁴

Mais que resolver um problema, a compreensão de como ocorrem os processos químicos significa auxiliar a promoção de uma melhor qualidade de vida da população.

3.1.1 Considerações sobre a Modelagem Molecular

A modelagem molecular é uma das vertentes dos métodos teóricos que tem tido grande desenvolvimento nas últimas décadas. O planejamento racional de fármacos é uma das áreas de aplicação da modelagem molecular de alta relevância no tratamento e cura de doenças. Predizer computacionalmente moléculas com atividades farmacológicas bem definidas traz a expectativa de reduzir o tempo em pesquisas e os gastos com sínteses e testes *in vitro* e *in vivo*.

A modelagem molecular de fármacos e alvos biológicos, como por exemplo, as proteínas, é caracterizada pela aplicação das aproximações das mecânicas clássicas e quântica e dos métodos estocásticos como Monte Carlo, no estudos dos átomos e moléculas destes alvos. Uma possibilidade e objetivo destes métodos é a predição do comportamento espacial e químico da interação entre um receptor biológico (R) e seu substrato ou inibidor (ligante: L).

Com a modelagem de sistemas R-L, é possível obter informações relevantes acerca das interações que ocorrem entre os dois sistemas. Estas interações inter e intramoleculares estabelecem a funcionalidade de uma determinada molécula frente ao alvo macromolecular. Apenas o estudo das interações não fornece parâmetros suficientes para o desenvolvimento de ligantes mais eficientes para um determinado problema químico e/ou bioquímico. Assim, para predição e desenho racional de novos fármacos, é fundamental a aplicação de técnicas robustas que proporcionem a obtenção de relações matemáticas e estatísticas que levam em consideração as propriedades estruturais, eletrônicas e químicas obtidas com a sua atividade biológica.¹¹⁷

O docking molecular é uma das técnicas mais utilizadas na modelagem molecular para o desenho e o reconhecimento molecular. Entretanto, esta técnica não é suficiente para predizer, com a devida precisão, o comportamento energético e as interações em um sistema macromolecular. Assim, métodos híbridos que fazem

uso das considerações da mecânica clássica (docking molecular) e também levam em consideração as aproximações da mecânica quântica são atualmente utilizados para resolver parte do problema envolvendo o reconhecimento molecular. Métodos como a Mecânica Quântica/Mecânica Molecular (do inglês Quantum Mechanics/Molecular Mechanics: QM/MM),¹¹⁸ ONIOM (Our own N-layered Integrated molecular Orbital and molecular Mechanics)¹¹⁹ e os estudos de relação estrutura atividade quantitativa (do inglês Quantitative Structure-Activity Relationship: QSAR)¹²⁰ são os principais métodos utilizados atualmente para modelagem de sistemas receptor-ligante (R-L).

A atividade biológica de determinada molécula em um alvo proteômico é resultante da contribuição de diferentes propriedades desta molécula. Estas propriedades são fatores intrínsecos a cada molécula que por sua vez podem ser descritas por meio de parâmetros físico-químicos, eletrônicos, geométricos, topológicos, tridimensionais e quadridimensionais. Um conjunto de propriedades, considerado isoladamente, não revelam explicitamente, de maneira simplificada, a atividade biológica de uma molécula. Para definir como as propriedades de um determinado ligante estão correlacionadas com sua atividade biológica, são utilizadas técnicas que permitam descrever as relações de reconhecimento molecular e as propriedades envolvidas no processo.

Estas propriedades podem ser calculadas por meio das técnicas e métodos das mecânicas clássica e quântica. Na abordagem da MM, os átomos constituintes das moléculas são tratados de maneira clássica, onde os elétrons e sua correlação não são levados em consideração. Este tipo de abordagem permite que sejam estudadas as propriedades geométricas, estruturais e topológicas de um sistema molecular. Para a obtenção das propriedades eletrônicas são empregados métodos de estrutura eletrônica por meio de cálculos quânticos. As principais propriedades que são utilizadas para descrever uma molécula são classificadas de acordo com a forma como estas são definidas espacialmente. Os chamados descritores moleculares, que podem ser classificados em 2D, 3D e 4D.

Os descritores 2D são aqueles que independem da orientação espacial da molécula. São classificados em:^{120,121}

- descritores constitucionais: massa molecular, número total de átomos, número total de ligações saturadas e insaturadas, número de anéis aromáticos;

- descritores geométricos: área de superfície molecular, volume molecular, distância de ligação, ângulo de ligação e diedro, grau de liberdade, tamanho da região hidrofóbica, tamanho da região hidrofílica, área da superfície de van der Waals, área de superfície polar (PSA);

- descritores eletrônicos: polarizabilidade, refatividade molar, número de receptores (H_{rec}) e doadores de hidrogênio (H_{don});

- descritores de lipofilicidade e solubilidade: logaritmo do coeficiente de partição ($\log P$), logaritmo de solubilidade em água ($\log S$), toxicidade;

- descritores topológicos: índice de conectividade molecular de Wiener, Balaban e Schultz, índices topológicos de elétrons de valência (índices de Kier e Hall), índices topológicos de carga (índice de Gálvez), índice de flexibilidade.

Descritores 3D são aqueles que descrevem a orientação tridimensional da molécula utilizando sua conformação espacial (confôrmeros, estereoisômeros e enantiômeros). São exemplos de descritores 3D: cargas atômicas totais e parciais, momentos de dipolo e multipolos, energia dos orbitais de fronteira, afinidade eletrônica, eletronegatividade, energia eletrônica e calor de formação.^{120,121}

Os descritores 4D são os parâmetros de liberdade conformacional definidos dentro de uma grade molecular.¹²⁰ A liberdade conformacional é a medida da mudança das posições geométricas, gerada pela interação entre todas as partes que formam a molécula, alinhada em um determinado eixo, e o um determinado farmacóforo submetidos em uma sonda teste.¹²⁰

Deste modo pode-se afirmar que a compreensão de como a enzima interage com o seu substrato natural e como eles interagem com outras moléculas (fármacos, drogas, ativadores enzimáticos, ligantes) é essencial para compreender o funcionamento do processo catalítico. O estudo da proteômica é uma das chaves para o tratamento e cura da maioria das doenças que afetam a população. A modelagem molecular e os métodos da química teórica são usados para elucidar o que ocorre em nanoescala dentro do ambiente intracelular.^{10,114,122,123}

Simular o ambiente celular não é uma tarefa trivial. Diferentes abordagens são necessárias para estudar como em particular, uma determinada enzima interage com uma molécula. Para isso, a estrutura tridimensional da enzima e das moléculas a serem estudadas deve ser conhecida. Atualmente, as melhores abordagens para simular realidade no ambiente intracelular baseiam-se na combinação de diferentes

métodos de química teórica e modelagem molecular computacional. Para este fim, lança-se mão dos métodos MM e MQ que compõem métodos híbridos QM/MM.

No método híbrido QM/MM, as propriedades do sistema formado entre uma enzima que irá interagir com seu substrato e/ou uma droga dentro do ambiente intracelular (constituído pelas moléculas de água no interior de um espaço pré-determinado) são calculadas em diferentes níveis de cálculos. Os elementos desse sistema, onde a reação catalítica ocorre (substrato e/ou molécula e os resíduos do sítio ativo) são estudadas em função dos métodos de MQ dependentes do tempo. Esta aproximação fornece informações eletrônicas e estruturais fundamentais para determinar e modelar o mecanismo de ação de uma enzima em uma dada molécula. Os demais resíduos da enzima são estudados em função dos métodos aproximados da MM, onde, por exemplo, campos de força baseados em dados experimentais foram desenvolvidos para calcular as propriedades estruturais e topológicas que não dependem da correlação eletrônica e nuclear em nível quântico.

Ainda sobre a simulação e os estudos de catálise enzimática é necessário considerar alguns parâmetros, tais como temperatura e velocidade das moléculas que compõem estes sistemas, pois no ambiente celular ou num procedimento experimental as moléculas não estão estáticas ou congeladas. Assim, os métodos de dinâmica molecular (MD) são aplicados a fim de simular ao longo do tempo, como os sistemas enzimáticos se comportam sob determinada temperatura e como a energia dos seus diversos microestados termodinâmicos varia com o tempo. Proporcionando, desta forma, a obtenção de informações relevantes para a compreensão dos mecanismos de ação, como as conformações estruturais e a energia associada com cada uma destas conformações. Portanto, a combinação de métodos QM/MM e MD é uma ferramenta poderosa para a modelagem dos processos catalíticos enzimáticos.^{114,122,124,125}

Outro ponto importante a ser considerado é o estudo das energias livres de interação entre as enzimas e os seus ligantes. Este é um tema polêmico e bem estudado, uma vez que existem diferentes formas de abordagens para determinar a energia de interação em sistemas de grande porte. Em geral, a termodinâmica estatística é usada para estudar com maior precisão as energias livres de interação entre as enzimas e seus ligantes.^{122,126}

Calcular diretamente a energia livre de interação para este tipo de sistema é uma tarefa muito complexa. Uma maneira simplificada para realizar este cálculo é

levar em conta a diferença de energia livre entre dois estados termodinâmicos deste sistema. Entre os métodos utilizados para calcular as diferenças entre as energias livres estão o Potencial de Força Média (do inglês Potential of Mean Force: PMF),^{127,128} o método de Perturbação da Energia Livre (do inglês Free Energy Perturbation: FEP),¹²² o método de Crescimento Lento (do inglês Slow Grow: SG)¹²⁹ e o método de Integração Termodinâmica (do inglês Thermodynamical integration: TI).

3.2 Modelos Computacionais

Neste trabalho, foram realizados diversos estudos teóricos quânticos no intuito de elucidar o perfil farmacofórico de conhecidas drogas empregadas no tratamento da DA e do ED. Na busca de compreender, como estas diferentes moléculas estão isoladamente correlacionadas nos processos de reconhecimento molecular e inibição da AChE, outra série de estudos, simulando o ambiente intracelular *in silico*, foram também realizados para compreender o mecanismo de inibição da AChE, quando a enzima interage com alguns de seus inibidores.

Na primeira parte deste trabalho foram investigadas de forma exaustiva as propriedades determinantes de 28 moléculas para que atuem diretamente no SNC. Dentre estas, 11 AChEIs aplicadas no tratamento da DA, 10 MAOIs utilizadas no tratamento do ED e os 7 principais NTs envolvidos no aparecimento destas enfermidades.

A segunda parte do trabalho foi dedicada ao estudo do mecanismo de inibição da AChE frente a algumas AChEIs clássicas. Na tentativa de esclarecer o processo de inibição da enzima por inibidores que bloqueiam o GORGE, principalmente por meio de interações de van der Waals e diferentes tipos de interações do tipo stacking, foram realizadas uma série de simulações utilizando o método híbrido QM/MM MD nos níveis AM1/MM. Neste trabalho, vários cálculos teóricos usando o método FEP, empregando a biblioteca fDynamo, foram também realizados para determinar qualitativa e quantitativamente as interações entre a AChE e os inibidores: DMT, DNP, GNT, HUP, THA, que interagem com enzima, bloqueando seu sítio ativo. Também foi estudada a interação da AChE com seu substrato natural, utilizando estrutura do complexo de Michaelis.

3.2.1 Estudo de estrutura eletrônica e PCA

Cálculos no vácuo e em meio solvatado no nível *ab initio* foram realizados para determinação de parâmetros estruturais e eletrônicos dos sistemas estudados neste trabalho.

As estruturas de partida das AChEIs, dos neurotransmissores e das MAOIs (Tabela 3) utilizadas na otimização da geometria destes sistemas encontram-se depositadas nos bancos de dados Cambridge Structural Database (CSD), DrugBank¹⁶⁶ e PubChem¹⁶⁷

Tabela 3. AChEIs, MAOIs e NTs estudados.

AChEI		MAOI	NT
<i>Acridinas</i>	DMT THA	ISO	5-HT
<i>Alcalóides</i>	GNT HUP	IPR	ACh
<i>Carbamatos</i>	PHE PHY	LAD	DOP
	RIV	MOC	EPI
<i>Organofosforados</i>	DCV	NIA	MEL
	MTR	PHZ	NOR
	SAR	RAS	PHN
		SEL	
		TOL	
		TRA	
<i>Piperidina</i>	DNP		

As geometrias de todas as moléculas estudadas foram otimizadas em coordenadas redundantes com otimização completa de todos os parâmetros geométricos (distâncias, ângulos e diedros). Cálculos de frequência vibracional também foram utilizados para acompanhar o mínimo das geometrias obtidas, bem como correlacionar com dados experimentais. Os cálculos de estrutura eletrônica foram realizados utilizando-se o método *ab initio* DFT, com o funcional híbrido B3LYP, este funcional combina o termo de troca HF com o termo de troca-correlação DFT. A função de base elegida foi 6-31+G(d,p).

Cálculos de solvatação foram realizados por meio do método contínuo de solvente implícito, CPCM. Foi estudada a influência do solvente sobre as propriedades eletrônicas e estruturais das AChEIs, MAOIs e NTs com o solvente água, considerando sua constante dielétrica $\epsilon=78,4$ (25 °C). Os cálculos da otimização da geometria foram realizados com o método *ab initio* DFT B3LYP/6-31+G(d,p)/PCM.

Para analisar a atividade das AChEIs, MAOIs e dos NTs avaliados neste estudo, considerou-se descritores eletrônicos, geométricos, de lipofilicidade, estruturais e topológicos mostrados na tabela 4. Todas as propriedades foram determinadas, para cada molécula, utilizando diferentes métodos quânticos.

O método ChelpG (Charges from Electrostatic Potentials using a Grid based method) foi utilizado para os cálculos das cargas. Além dos descritores foi feita a análise do Mapa da Superfície de Potencial Eletrostático Molecular (MSEP, do inglês “Molecular Electrostatic Potential”) para cada espécie estudada.

Tabela 4. Propriedades estudadas.

Tipo de descritor	Propriedade (s)
Eletrônico	Dipolo, energia dos orbitais de fronteira (HOMO, HOMO-1, LUMO e LUMO+1), carga do heteroátomo e do hidrogênio mais ácido, GAP (LUMO-HOMO).
Geométrico	Volume, distância entre os hidrogênios mais ácidos, tamanho da droga, distância N-O e N-C=O.
Lipofilicidade	LogP.
Estrutural	Número de receptores e doadores de hidrogênio (H_{recp} e H_{don}), quantidade de anéis aromáticos, grau de liberdade da molécula, massa molecular.
Topológico	Área da superfície polar (PSA).

Para traçar o perfil farmacofórico das moléculas descritas, foi aplicado o método de análise multivariada PCA. A partir dos descritores 2D, calculados, Tabela 4, foram avaliadas as propriedades com maior peso para a atividade dos compostos conhecidos como inibidores das isoformas da MAO com potencial atividade sobre a AChE, por meio da correlação entre as AChEIs já conhecidas.

Assim, neste trabalho, todas as propriedades estruturais e eletrônicas das moléculas estudadas, obtidas a partir dos cálculos de otimização de geometria foram consideradas explorando exaustivamente as propriedades elencadas na Tabela 4. Estas propriedades podem ser visualizadas como coordenadas de pontos num espaço de dimensão igual a 28 (11 AChEIs + 10 MAOIS + 7 NTs), onde cada eixo está associado a uma propriedade (variável).

Os cálculos PCA foram realizados na matriz de covariância e os dados utilizados foram autoescalados por meio do desvio padrão, uma vez que as propriedades consideradas não têm a mesma escala de unidade. Foram gerados três componentes principais (PCs) para o conjunto de dados analisado.

Os estudos teóricos para determinar os parâmetros estruturais e eletrônicos foram levados a cabo por meio dos programas Gaussian 09,¹⁶⁸ AlogPS2¹⁶⁹ e OSIRIS.¹⁷⁰ Os estudos PCA foram realizados com o programa MATLAB[®].¹⁷¹

3.2.2 Estudo QM/MM MD

O primeiro passo do nosso protocolo foi definir o sistema para realizar as simulações MD. Os sistemas aqui estudados possuem um elevado número de moléculas, por isso, foram utilizados os potenciais híbridos QM/MM, onde apenas uma pequena parte do sistema, o ligante, é descrito pelos métodos da mecânica quântica. A proteína e o solvente foram representados por meio de campos de forças clássicos. A região QM foi descrita por meio do método semiempírico AM1 e a parte MM por meio do campo de força OPLS-AA/TIP3. Todos os métodos estão implementados na biblioteca de módulos fDynamo, com adaptações e modificações realizadas pelo grupo de Química Teórica y Computacional da Universitat Jaume I de Castellón de La Plana, Espanha.

3.2.2.1 “Set up” do Sistema

As geometrias de partida para os cálculos QM/MM MD foram obtidas a partir da estrutura de Raio-X do complexo AChE, da espécie *Torpedo californica*, com o ligante acetilcolina (código PDB: 2C5G). Esta estrutura foi escolhida para os cálculos por ter excelente resolução cristalográfica na definição da estrutura (1,95 Å) e também por apresentar menor número de átomos e resíduos perdidos em seu arquivo PDB, apenas os três resíduos iniciais (Asp1, Asp2, His3) e o final (Ala537).

Para proceder aos cálculos e simulações foram eliminadas as moléculas de acetilticolina, PEG e NAG, para obtenção da estrutura da AChE e das águas estruturais. Esta estrutura foi a utilizada como referência para a construção das estruturas dos complexos R-L estudadas.

Com a finalidade de construir as estruturas dos complexos R-L dos cinco inibidores da AChE e do seu substrato natural, as coordenadas foram obtidas por meio da superposição da estrutura da AChE (modificada 2C5G) com as estruturas de raio-X do complexo da proteína com cada ligante correspondente, a saber: DMT, DNP, GNT, HUP, THA e ACh. A superposição foi realizada com o programa DaliLite.¹⁷² A tabela 5 traz as informações dos ligantes, seus códigos PDB, resolução do cristal e o valor do desvio médio (RMSD) depois da superposição.

Tabela 5. Informação das estruturas PDB dos sistemas estudados.

Ligante	Código PDB	Resolução (Å)	RMSD
ACh	2ACE	2,50	0,21
DMT	2CKM	2,15	0,31
DNP	1EVE	2,50	0,22
GNT	1DX6	2,30	0,28
HUP	1GPK	2,10	0,34
THA	1ACJ	2,80	0,18

Sabendo-se que os valores dos pKa padrão podem sofrer modificações resultantes dos efeitos localizados pelo meio protéico⁶², foi determinado o estado de protonação de todos os resíduos ionizáveis, a pH=7.0, para todos os sistemas AChE-Inibidor. Para isso foi utilizado o método “cluster”⁶² implementado por Field e colaboradores.¹⁷³ Este método leva em consideração o fato de que todo resíduo ionizável da proteína é perturbado por um efeito eletrostático do meio protéico.⁶² O resultados obtidos indicam que os estados de protonação da maioria dos resíduos são mantidos inalterados, a exceção de todas as histidinas, que foram protonadas nos seus átomos ND1 ou ND2, dependendo do resultado dos cálculos de pKa. A histidina catalítica, His440, tem valor de pKa dependente do ligante com o qual a AChE está complexada, por conseguinte tem estado de protonação diferente para cada caso. Outros resíduos que tiveram seu estado de protonação alterados foram o Asp389, Glu445 e Glu199. Os estados de protonação destes resíduos são apresentados na Tabela 6.

Uma vez determinado os estados de protonação à pH=7.0 foram adicionados os hidrogênios à estrutura. Em seguida foi realizada a minimização da energia dos átomos de hidrogênio.

A carga total dos sistemas estudados não é neutra, por isso são adicionados contraíons (cátions de sódio) em posições eletrostáticas otimizadas ao redor da proteína (respeitando uma distância mínima de 10,5 Å de qualquer átomo do sistema, e de 5 Å de qualquer outro contraíon, usando para isso uma grade regular de 0,5 Å). O número de contraíons adicionados a cada sistema é reportado na tabela 6.

Após a neutralização das cargas dos sistemas por meio da adição dos contraíons, inseriu-se o sistema no centro de massa de uma cavidade gerada numa caixa de moléculas de água cúbica (100x100x100 Å³) previamente relaxada com uma dinâmica de equilíbrio de 300ps.

Finalizada a etapa anterior, foram definidas as partes QM e MM, para dar início aos cálculos QM/MM MD. A região QM é composta pelos ligantes. A parte MM contém toda a proteína, as moléculas de água (estruturais e do solvente da caixa de água) e os contraíons. Foram aplicadas condições de contorno periódicas ao sistema. Os raios de corte (cutoffs) aplicados para as interações não-ligadas, utilizando uma função de comutação são $r_{on}= 14 \text{ \AA}$ e $r_{off}= 16 \text{ \AA}$. Em seguida a energia do sistema foi minimizada considerando todos os átomos livres.

Depois de minimizada a energia do sistema, foram realizadas simulações MD de Langevin-Verlet (NVT) com uma temperatura do termostado de 300 K e frequência de colisão de 100 ps para cada átomo. O passo (tempo) da dinâmica foi de 1 fs e se imprimiram as estruturas para posterior análise a cada 100 passos. O tempo de simulação para cada sistema R-L foi de 1 ns com todos os átomos livres. Este tempo de simulação foi aplicado para que o sistema estivesse equilibrado ao final da simulação. O número de átomos de cada sistema é citado na tabela 6.

Tabela 6. Informações complementares das estruturas de partida para os cálculos de MD.

	ACh	DMT	DNP	GNT	HUP	THA
His440	HSD	HSP	HSP	HSP	HSP	HSP
<i>pKa</i>	0,0	7,5	7,8	11,8	7,5	7,6
Glu199	Glu	Glu	Glu	HGlu	HGlu	HGlu
<i>pKa</i>	0,0	1,8	1,8	7,7	8,6	6,7
Asp	HAsp	HAsp	HAsp	HAsp	HAsp	HAsp
<i>pKa</i>	6,9	6,9	6,9	7,0	6,8	6,8
Glu445	HGlu	HGlu	HGlu	HGlu	HGlu	HGlu
<i>pKa</i>	6,0	6,3	6,3	6,6	6,2	6,1
N° de contraíons	6	5	5	4	4	4
N° de átomos	99190	99257	99213	99198	99180	99161

Além das simulações MD para os sistemas R-L, foram realizadas simulações para os sistemas inibidor-solvente, levando-se em consideração os mesmos parâmetros utilizados para a otimização dos sistemas AChE-inibidor. Por se tratar de um sistema com apenas dois tipos de moléculas, inibidor e água, o tempo de simulação aplicado para este caso foi de 300 ps com todos os átomos livres.

3.2.2.2 Simulações com método FEP

Para realizar os cálculos de energia livre de interação, ΔG_{bind} , utilizando o método FEP, em um tempo razoável, fixaram-se as coordenadas de parte dos átomos do sistema. Partindo-se das geometrias obtidas após a dinâmica de equilíbrio de 1 ns, foram congelados todos as moléculas que estivesse localizada a uma distância maior que 25 Å do átomo OG do resíduo Ser200 (serina catalítica da AChE), Figura 25. Gerando assim uma esfera de raio igual a 25 Å, onde todos os átomos contidos dentro desta esfera estejam livres. Foram tomadas as devidas precauções para que todo GORGE estivesse contido dentro da esfera.

Para o estudo do sistema inibidor-solvente foram considerados os mesmos parâmetros de ajustes descritos anteriormente, no entanto o átomo escolhido para centrar a esfera móvel foi o heteroátomo mais central de cada ligante.

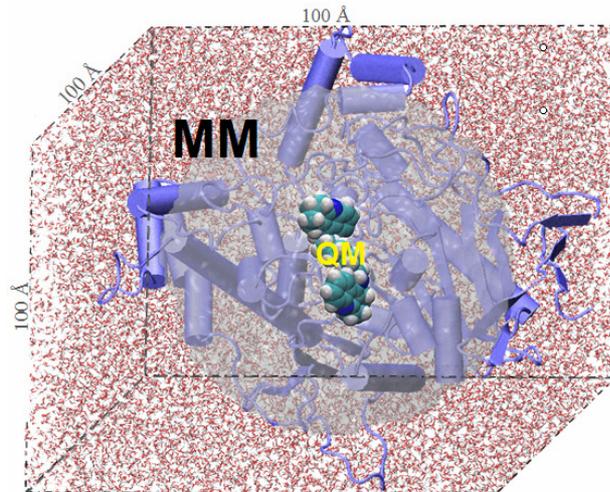


Figura 25. Esquema da montagem do sistema molecular empregados nos cálculos da FEP.

Foi utilizado um total de 50 janelas para avaliar o termo de interação eletrostática, desde $\lambda=0$ (ausência de interação eletrostática) até $\lambda=1$ (interação eletrostática total), em passos de $(\delta\lambda)$ 0,02. A mesma quantidade de janelas foi utilizada para o cálculo do termo de interação de van der Waals, desde $\gamma=0$ (ausência de interação) até $\gamma=1$ (interação de van der Waals completa), também em passos de $(\delta\lambda)$ 0,02. Em cada janela, foram realizadas um total de 10, 20, 50 e 100 ps de dinâmica de relaxação seguidas, sequencialmente, por simulações (testes dependentes) de QM/MM MD com tempo de 10, 20, 50 e 100 ps. Os cálculos foram executados usando ensemble NVT com temperatura de referência de 300 K.

3.3 Fundamentação Teórica

Com o advento da teoria quântica desenvolvida a partir do início do século XX, a maneira como a matéria é considerada mudou drasticamente. Os átomos, constituintes básicos das moléculas foram definidos de maneira mais detalhada por meio dos seus núcleos e elétrons e suas relações. Com o desenvolvimento de ferramentas computacionais (hardwares e softwares) é possível, hoje, tratar sistemas moleculares complexos utilizando os métodos da teoria quântica. A mecânica quântica considera que a energia de uma molécula pode ser descrita como sendo um somatório das energias cinéticas e das interações eletrostáticas entre as entidades que compõem seus átomos: núcleos e elétrons (energia cinética e potencial).

3.3.1 Método Hartree Fock (HF)

O postulado fundamental da mecânica quântica descreve uma função de onda para cada sistema químico, onde um operador matemático pode ser aplicado a esta função, resultando em propriedades observáveis desse sistema. A Equação 4 é o foco de estudo dos métodos quânticos para a descrição de sistemas químicos e é conhecida como equação de Schrödinger, independente do tempo e sem correções relativísticas:

$$H\Psi = E\Psi \quad (4)$$

onde, H é um operador matemático que retorna a energia do sistema como um autovalor chamado de operador hamiltoniano. A função de onda Ψ descreve o estado do sistema a partir das coordenadas das posições dos núcleos e dos elétrons dos átomos na molécula. E é o autovalor e representa a energia total do sistema.^{130,131}

O quadrado do módulo da função de onda, $|\Psi|^2$, fornece a densidade de probabilidade de um elétron ser encontrado dentro do espaço (dx, dy, dz) e quando seu valor é multiplicado pela carga do elétron tem-se a densidade eletrônica, uma observável.^{130,131}

O operador hamiltoniano, descrito na Equação 5, carrega informações a respeito das energias potenciais e cinéticas de um sistema atômico composto por N elétrons e M núcleos. Em unidades atômicas ($m_e = \hbar = e = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} = 1$), esse operador assume a forma:

$$H = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \frac{1}{2} \sum_{A=1}^M \frac{1}{M_A} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (5)$$

no qual i e j representam os N elétrons do sistema; A e B representam os M núcleos; Z é o número atômico; ∇^2 é o operador Laplaciano em função das coordenadas (x, y, z); r_{iA} , r_{ij} e R_{AB} são respectivamente a distância entre o elétron i e o núcleo A, distância entre os elétrons i e j , e a distância entre os núcleos A e B.^{130,132}

Os primeiros dois termos do operador hamiltoniano descrevem a energia cinética dos elétrons e dos núcleos ($\hat{h}(i)$), respectivamente. Os outros três termos refletem as interações Coulômbicas entre as partículas carregadas eletricamente (potencial). O terceiro termo corresponde a atração núcle-elétron, o quarto descreve a repulsão entre os pares de elétrons; o quinto termo é termo da energia potencial internuclear (\hat{V}_{AB})^{130,133}

A equação de Schrödinger, Eq. 4, só pode ser resolvida analiticamente para um pequeno conjunto de sistemas contendo no máximo um elétron e um núcleo. Para resolver parcialmente o problema de sistemas multi-eletrônicos são utilizadas aproximações onde alguns termos do operador hamiltoniano são considerados constantes ou nulos.

A aproximação de Born-Oppenheimer,¹³⁰ é uma aproximação matemática comum aos métodos de estrutura eletrônica. Nesta aproximação, se considera que os núcleos dos átomos são mais pesados e lentos que os elétrons, assim as contribuições energéticas relativas ao movimento dos núcleos podem ser desprezadas e o termo de repulsão entre os núcleos pode ser considerado constante.^{130,134}

Desta forma, as contribuições cinéticas exclusivamente nucleares representadas no operador hamiltoniano da Equação 5 (segundo termo) são eliminadas.

O operador H é simplificado e passa ser chamado de operador hamiltoniano eletrônico (H_{el}), que dá sequência ao surgimento da equação de Schrödinger eletrônica independente do tempo, representada pela Equação 7,

$$H = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i} \frac{1}{r_{ij}} \quad (6)$$

$$E_{el_total} = E_{el} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (7)$$

A energia eletrônica total do sistema, E_{el_total} , é dada pela soma da energia E_{el} mais a energia nuclear do termo de repulsão dos núcleos (Equação 7). A aproximação de Born-Oppenheimer não permite a solução exata de um sistema em estudo por considerar apenas as descrições eletrônicas.^{130,132}

Outra aproximação, dentro da aproximação de Born-Oppenheimer, foi desenvolvida na tentativa de solucionar a equação de Schrödinger para sistemas multieletrônicos é a aproximação de Hartree-Fock (HF). Neste método, as funções multieletrônicas, respeitando o princípio da antissimetria de Pauli, são obtidas a partir de funções de um elétron (funções spin-orbital). A função multieletrônica é resultante de um determinante, denominado determinante de Slater, no qual cada elemento do determinante é uma função spin-orbital (ϕ) representado na Equação 8.¹³⁵

$$\Psi(1, 2, \dots, N; R) = \frac{1}{\sqrt{N!}} |\phi_1(1; R) \phi_2(2; R) \dots \phi_N(N; R)| \quad (8)$$

na qual N é número total de elétrons do sistema em estudo e $\phi_i(j; R)$ o orbital de spin do elétron i dependente parametricamente das coordenadas dos núcleos.

Tomando,

$$E_{el_total} = \sum_{i=1}^N h_{ij} + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N (J_{ij} - K_{ij}) \quad (9)$$

$$\sum J_l(1) + K_l(1) = v^{HF}(1) \quad (10)$$

$$J_q(1)\varphi_p(1) = \left\langle \varphi_q(2) \left| \frac{1}{r_{12}} \right| \varphi_q(2) \right\rangle \varphi_p(1) \quad (11)$$

$$K_q(1)\varphi_p(1) = \left\langle \varphi_q(2) \left| \frac{1}{r_{12}} \right| \varphi_p(2) \right\rangle \varphi_q(1) \quad (12)$$

o termo $v^{HF}(1)$ é o potencial médio que atua sobre o i -ésimo elétron na presença dos demais elétrons, representa uma aproximação para o comportamento do elétron 1 sob a ação do campo gerado pelos outros elétrons. A equação 11 é o termo coulômbico médio sentido pelo elétron 1 e representa a média do potencial total proveniente dos demais spins-orbitais atuando sobre o elétron 1 no orbital φ_1 . A equação 12 é o termo de troca.

A equação de Hartree-Fock (HF) é uma equação de autovalor que pode ser definida como:

$$F(1)\varphi_i(1; R) = \varepsilon_i \varphi_i(1; R) \quad (13)$$

Em que, F é o operador monoelétrônico de Fock dado por:

$$\hat{F}(i) = \hat{h}(i) + \sum_{J=1}^{N_2} \left[2\hat{J}_i(i) - \hat{K}_j(i) \right] \quad (14)$$

O desafio em solucionar a equação HF está na resolução analítica das integrais multi-eletrônicas constantes dos sistemas com mais de um elétron. O método do campo auto-consistente (self consistent Field, SCF) é utilizado para resolver as equações de Fock, enquanto que a aproximação LCAO (linear combination of atomic orbitals) é a forma analítica usada para resolver a função de onda do sistema.^{130,132}

Para resolver a Equação 13 pelo método SCF é feita a escolha prévia de um conjunto de orbital de spin-orbital $\varphi_i^{(0)}$. Esta solução gera um novo conjunto de spin-orbitais $\varphi_i^{(1)}$ que são então novamente aplicados à Eq. 13 gerando novo conjunto de spin-orbitais $\varphi_i^{(2)}$, que são aplicados novamente à mesma equação, de forma iterativa, até que seja encontrado um valor que convirja a densidade eletrônica e/ou a energia do sistema.¹³⁵

A aproximação LCAO é usada para resolver a Eq. 13 de maneira mais rápida. Proposto por C. J. Roothaan, este método é conhecido como Hartre-Fock-Roothaan. Neste método os orbitais moleculares são representados por uma combinação linear dos orbitais atômicos. Dessa forma, cada spin-orbital é expandido como sendo um conjunto de funções conhecidas. Essas funções são chamadas funções de base $g_v(r)$:

$$\phi_p(r) = \sum_{v=1}^{\text{funções de base}} C_{vp} g_v(r) \quad (15)$$

em que, C_{vp} são os coeficientes das N funções de base a serem determinados.

Assim, em princípio, a resolução da equação HF permite serem encontrados resultados próximos da solução exata da equação de Schrödinger, desde que seja utilizado um número muito grande de funções de base. As funções mais utilizadas para estudos de sistemas moleculares são as funções do tipo gaussianas, que são definidas pela Equação 16 como:

$$g(x, y, z) = N x^l y^m z^n e^{-\alpha r^2} \quad (16)$$

l, m e n são números inteiros que combinados representam as funções do tipo s, p, d e f; $r = (x^2 + y^2 + z^2)^{1/2}$ e N é uma constante de normalização.

Ao aplicar as aproximações de Hartree-Fock e LCAO simultaneamente na equação de Schrödinger, é obtida a equação de Roothaan-Hall na forma matricial:^{130,132}

$$FC = SC \in \quad (17)$$

em que, \in é uma matriz diagonal que contém as energias dos orbitais, S é a matriz de superposição, C é a matriz dos coeficientes e F é a matriz de Fock.

A Equação 18 mostra a matriz de Fock em termos de unidades atômicas, o primeiro termo corresponde à energia potencial e cinética dos elétrons individualmente, enquanto o segundo termo gera as interações inter-eletrônicas:

$$F_{\mu\nu} = \left(\phi_\mu \left| -\frac{1}{2} \nabla^2 - \sum_A \frac{Z_A}{r_A} \right| \phi_\nu \right) + \sum_\lambda \sum_\sigma^{f.base} P_{\lambda\sigma} \left[(\phi_\mu \phi_\nu | \phi_\lambda \phi_\sigma) - \frac{1}{2} (\phi_\mu \phi_\lambda | \phi_\nu \phi_\sigma) \right] \quad (18)$$

O termo $P_{\lambda\sigma}$ é a matriz de densidade e pode ser definido como o quadrado dos coeficientes dos orbitais moleculares (OMs) somado em todo o espaço que eles ocupam:

$$P_{\lambda\sigma} = 2 \sum_i^{OMs} C_{\lambda i} C_{\sigma i}^* \quad (19)$$

O método SCF é utilizado na solução da equação de Roothaan-Hall para a determinação da energia do conjunto de bases finito.

Estes métodos negligenciam uma pequena parte da energia de repulsão eletrônica, gerada pelo movimento dos elétrons do sistema, a essa energia dá-se o nome de energia de correlação eletrônica. Portanto, a energia exata do sistema é dada pela soma das energias obtidas pelos métodos que resolvem a equação de HF e a energia de correlação eletrônica,

$$E_{exata} = E_{correlação} + E_{HF} \quad (20)$$

As limitações dos métodos HF estão no fato destes não resultarem em uma função de onda não correlacionada, e utilizarem aproximações de Born-Oppenheimer, além do uso de um conjunto de funções de bases incompleto e a desconsideração dos efeitos relativísticos.^{130,132} Apesar deste trabalho não utilizar o método Hartree-Fock diretamente, este é o passo inicial para os métodos semiempíricos empregados, bem como para o funcional híbrido B3LYP.

Existem outros métodos que introduzem a correlação eletrônica. Entre estes estão os métodos pós-Hartree-Fock (pós-HF), que têm como ponto de partida da função HF com algumas correções para incluir a correlação eletrônica. O método perturbacional de Møller-Plesset (MP_x , onde x é o número da ordem da correlação empregada), o Coupled Cluster (CC) e o método variacional de interações de configuração (CI) são exemplos dos métodos pós-HF. Alguns métodos não convencionais onde a correlação eletrônica é considerada de forma alternativa são baseados na Teoria do Funcional de Densidade (do inglês Density Functional Theory: DFT). Estes métodos apresentam baixo custo computacional quando comparados com os métodos pós-HF convencionais.^{130,132,133}

3.3.2 Teoria do Funcional de Densidade (DFT)

O DFT é um dos métodos mais utilizados na atualidade para o estudo de estrutura eletrônica de sistemas condensados moleculares. Diferente do método Hartree-Fock, a DFT inclui no seu escopo um termo para a energia de correlação eletrônica, que é a principal vantagem deste método em relação ao método HF. Kohn e Sham deram uma nova roupagem à DFT e os resultados de cálculos obtidos com a DFT em muitos casos são mais próximos dos dados experimentais do que os resultados de cálculos HF, com custo computacional inferior ao cálculo com HF. Além de fornecer um valor de energia mais representativo, a DFT ainda proporciona maior velocidade na realização dos cálculos frente a outros métodos que calculam a energia de correlação eletrônica de sistemas multieletrônicos.^{130,132}

A DFT relaciona os estados de energia mínima de um conjunto de elétrons sob a influência de um campo elétrico externo (Coulômbico) em função da densidade eletrônica do sistema. A energia calculada pela DFT inclui além dos termos avaliados pela energia HF uma redefinição da energia de troca HF por um funcional de troca, e adiciona um funcional de correlação para a energia de correlação. A função de onda do estado fundamental de um sistema e as propriedades consequentes deste estado são, então, funções da densidade eletrônica, uma observável.

A DFT tem como pilar o teorema de Hohenberg-Kohn, onde considerando que a energia eletrônica do estado fundamental de um sistema não degenerado está completa e univocamente determinada pela sua densidade de probabilidade eletrônica $\rho(r)$. Assim, a energia eletrônica do estado fundamental é um funcional definido por:

$$E = E[\rho(r)] \quad (21)$$

Diferente das demais teorias *ab initio*, onde a função de onda depende de 3N coordenadas, na teoria DFT basta ter $\rho(r)$, que é função de três variáveis, conhecido para que a energia de um sistema possa ser conhecida.

Analogamente aos outros métodos de química quântica, na DFT o funcional da energia pode ser descrito utilizando três funcionais:

$$E[\rho] = T[\rho] + V_{ne}[\rho] + V_{ee}[\rho] \quad (22)$$

em que $T[\rho]$ é o termo cinético, $V_{ne}[\rho]$ é o termo de correlação entre núcleos e elétrons, e $V_{ee}[\rho]$ é o termo de repulsão intereletrônica.

O termo $V_{ne}[\rho]$ pode ser reescrito em função da energia potencial de atração nuclear do elétron i localizado em uma coordenada r :^{130,132}

$$V_{ne}[\rho] = \sum_{i=1}^n v(r_i) \quad (23)$$

onde,

$$v(r_i) = - \sum_A \frac{Z_A}{r_{iA}} \quad (24)$$

Assim,

$$V_{ne}[\rho] = \left\langle \Psi_0 \left| \sum_{i=1}^n v(r_i) \right| \Psi_0 \right\rangle = \int \rho(r) v(r) dr \quad (25)$$

Deste modo, podemos reescrever a Equação 22 em termos da Equação 25:

$$E[\rho] = \int \rho(r) v(r) dr + F[\rho] \quad \text{onde, } F[\rho] = T[\rho] + V_{ee}[\rho] \quad (26)$$

O funcional $F[\rho]$ não é conhecido e independe do potencial externo aplicado, por isso a equação 26 não tem solução prática para calcular a energia de um sistema. No termo $V_{ee}[\rho]$ estão implícitas duas contribuições devidas à interação Coulombica clássica $V_H[\rho]$ e a troca e correlação $V_{xc}[\rho]$. O ponto chave da teoria DFT está em que ainda que o potencial de troca e correlação seja único, até agora não foi definido de forma explícita. Os distintos métodos DFT se diferenciam exatamente pela escolha do tipo de funcional que será utilizado na solução da equação 26.^{130,132}

Hohenberg e Kohn desenvolveram um teorema variacional que em conjunto com a aproximação proposta por Kohn e Sham tornou a DFT aplicável a problemas de interesse químico.

A teoria variacional de Hohenberg e Kohn propõe aplicar uma função de densidade de prova $\rho_{pr}(r)$ que satisfaça a condição:

$$\int \rho_{pr}(r) dr = n \quad \text{e que} \quad \rho_{pr}(r) \geq 0 \quad (27)$$

assim, para todo r é válido afirmar:

$$E_0 = E_v[\rho] \quad (28)$$

em que, ρ é a densidade eletrônica real do estado fundamental do sistema que minimiza o funcional de energia da Equação 28 em função de ρ_{pr} .

Desta forma, podemos obter a energia de um sistema, reescrevendo a Equação 26 utilizando o teorema variacional de Hohenberg-Kohn:^{130,132}

$$T[\rho_{pr}] + V_{ee}[\rho_{pr}] + \int \rho_{pr} v(r) dr \geq E_v[\rho] \rightarrow E_v[\rho_{pr}] \geq E_0[\rho] = E_0 \quad (29)$$

A Equação 29 demonstra que nenhuma densidade eletrônica de prova pode gerar uma energia do estado fundamental maior que a densidade eletrônica do estado fundamental verdadeira. Assim, este teorema permite calcular todas as propriedades de um sistema molecular no estado fundamental a partir de ρ sem a necessidade de se conhecer a função de onda deste sistema.^{130,132}

Para resolver este problema Kohn e Sham desenvolveram uma aproximação para obter ρ e calcular a energia a partir da densidade. Usando um sistema de referência imaginário \underline{s} contendo os mesmos \underline{n} elétrons do sistema real a ser estudado. Nesta aproximação, considera-se que os elétrons não interagem entre si, e que cada elétron percebe a energia potencial $v_s(r_i)$, igualmente. Desta maneira a densidade de probabilidade eletrônica do sistema de referência ρ_s torna-se exatamente igual a densidade do sistema real ρ .^{130,132}

O hamiltoniano, \hat{H}_s do sistema de referência pode ser descrito como:

$$\hat{H}_s = -\frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_{i=1}^n \nabla^2 + \sum_{i=1}^n v_s(r_i) \equiv \sum_{i=1}^n \hat{h}_i^{KS} \quad (30)$$

deste modo o hamiltoniano de Kohn-Sham para um elétron é definido por:

$$\hat{h}_i^{KS} = -\frac{\hbar^2}{2m_e} \nabla_i^2 + v_s(x_i) \quad (31)$$

Tendo em conta o princípio de antissimetria de Pauli e o spin, a função de onda do estado fundamental de um determinado sistema de referência assume a forma do determinante spin-orbital de Slater para cada elétron, que é o produto de um orbital espacial θ_i^{KS} e uma função spin, desta maneira os orbitais obtidos pela aproximação de Kohn-Sham são funções próprias do operador eletrônico:

$$\hat{h}_i^{KS} \theta_i^{KS} = \varepsilon_i^{KS} \theta_i^{KS} \quad (32)$$

em que, ε_i^{KS} é a energia do orbital espacial de Kohn-Sham.

Obedecendo ao formalismo da aproximação de Kohn-Sham, pode-se escrever a energia do estado fundamental de Hohenberg-Kohn:

$$E[\rho] = T_s[\rho] + \int d\vec{r} v_{ext}(\vec{r})\rho(\vec{r}) + V_H[\rho] + \Delta T[\rho] + \Delta V_{ee}[\rho] \quad (33)$$

Os funcionais $\Delta T[\rho]$ e $\Delta V_{ee}[\rho]$ são desconhecidos, e a soma destes dois termos é conhecida como funcional de energia de troca-correlação $E_{xc}[\rho]$.

Desta maneira a expressão exata da energia eletrônica molecular de Kohn-Sham é dada por:^{130,132}

$$E = \sum_i^N \varepsilon_i - V_H[\rho] + E_{xc}[\rho] - \int \frac{\delta E_{xc}[\rho]}{\delta p(\vec{r})} d\vec{r} \quad (34)$$

A escolha de um bom funcional da energia de troca-correlação permite realizar cálculos de DFT com maior precisão. Vários funcionais de troca-correlação foram desenvolvidos e são propostos na busca de maior precisão e confiabilidade dos valores calculados para as propriedades e as energias de sistemas moleculares. Dentre estes, destacam-se os propostos por Kohn-Sham: de aproximação de densidade local (LDA); a aproximação de densidade de spin local (LSDA) usados para cálculos de moléculas com camada aberta e geometrias moleculares próximas da dissociação.^{130,132} Outro funcional proposto é o da aproximação do gradiente-generalizado (GGA). Neste tipo de aproximação, foram desenvolvidos por Becke, Perdew e Wang funcionais de troca de gradiente corrigidos (PWx86) e (PWx91) e Becke (B88). Além destes, são propostos funcionais de correlação de gradiente

corrigidos, os mais comumente utilizados são o de Becke (Bc95), Lee-Yan-Parr (LYP) e Perdew (Pc86).^{136,137}

Os funcionais mais empregados para cálculos de estrutura eletrônica são os funcionais híbridos, onde um funcional (GGA) de troca pode ser associado a qualquer funcional (GGA) de correlação. Os mais comuns são os funcionais híbridos BLYP (associação do funcional B88 e LYP) e o funcional híbrido mais popular B3LYP.^{136,137} O funcional híbrido B3LYP foi proposto por Stephens et al. em 1994. Neste funcional, é usado o termo não-local de correlação dada pela expressão de Lee, Parr e Yang¹³⁸ dependente da densidade eletrônica $\rho(r)$ e o funcional VWN para correlação local modificada também dependente de $\rho(r)$. O B3LYP é definido da seguinte maneira:

$$E_{XC}^{B3LYP} = (1 - a_0 - a_i) E_i^{LSDA} + a_0 E_i^{exato} + a_i E_i^{B88} + (1 - a_c) E_c^{VWN} + a_c E_c^{LYP} \quad (35)$$

os valores para os termos foram obtidos por parametrização utilizando as energias de atomização molecular experimental e são $a_0 = 0.20$, $a_i = 0.72$ e $a_c = 0.81$.

3.3.3 Métodos semi-empíricos

Outro conjunto de métodos de estudo da estrutura eletrônica muito utilizado nos cálculos de moléculas bioativas e macromoléculas é o método semi-empírico. Este método surgiu com o intuito de reduzir o tempo computacional gasto no tratamento de sistemas moleculares compostos por um grande número de átomos, onde o tratamento destes por métodos *ab initio* é na maioria das vezes, ainda, inviável. Este método reduz drasticamente o número de integrais bieletrônicas utilizadas na construção da matriz de Fock para os cálculos HF e considera somente, em princípio, explicitamente os elétrons de valência.

A proposta feita por Pople em 1965¹³⁹ deu origem a três aproximações, o CNDO “Complete Neglect of Differential Overlap”, INDO “Intermediate Neglect of Differential Overlap” e NDDO “Neglect of Diatomic Differential Overlap”. Destes, o último é o mais aplicado, por meio das parametrizações, MINDO, MNDO, AM1, PM3, e PM6.

Estes métodos são definidos a partir da sua abordagem teórica, pela aproximação integral adotada no seu processo de iteração, pelas expressões utilizadas nos cálculos das parcelas integrais e pelo diferencial de cada método semi-empírico: a parametrização implementada. Todos os métodos semi-empíricos buscam solucionar o problema em estudo com aproximações às equações de Haree-Fock-Roothaan, utilizando parâmetros obtidos por ajustes numéricos ou advindos de resultados experimentais.¹³⁰

Esses métodos usam conjunto de bases mínimo para os elétrons de valência, geralmente as funções do tipo Slater, e também fazem uso da teoria de orbitais moleculares na obtenção da função de onda molecular.¹³⁰

3.3.4 Métodos teóricos para solvatação

O solvente tem papel importante na catálise e no processo de reconhecimento molecular, sendo muitas vezes participante ativo da função biológica resultante no ambiente intracelular. Moléculas de água são encontradas nas estruturas de Raios-X, obtidas na cristalização dos complexos receptor-ligante,

mostrando a importância da água na interação da enzima com seu ligante. Assim, é sábio levar em consideração as moléculas de água durante os estudos das interações de reconhecimento molecular e como as propriedades dos ligantes podem ser modificadas pela presença do solvente.^{140,141}

Modelos contínuos de solvente podem ser ferramentas úteis na modelagem de soluções líquidas que consideram o solvente como um meio contínuo de constante dielétrica uniforme ϵ . Alguns dos modelos de solvatação contínuo mais conhecidos são o CPCM (Conductor-like Polarizable Continuum Model) e o modelo COSMO.

O modelo CPCM descreve o soluto de forma quântica, no qual se determina por diferenciação numérica o potencial da superfície, enquanto que de forma auto-consistente, se integra o solvente junto com o potencial da superfície, Equação 36. A cavidade do solvente é definida considerando que as moléculas de soluto estão completamente dentro de um espaço, formado por esferas centradas nos átomos do soluto, ou num conjunto de átomos do soluto.

$$\hat{H}_{dissolução} = \hat{H}_{vácuo} + V_{soluto-solvente} \quad (36)$$

A superfície é corrigida pela adição de outras esferas não centradas em átomos para simular a exclusão da superfície do solvente. Após esse procedimento a superfície é particionada em pequenos espaços denominados mosaico.¹⁴² O modelo CPCM é utilizado para melhorar a energia livre de solvatação e a geometria das moléculas envolvidas em mecanismos de reações e interações químicas.

O método COSMO é um modelo de solvatação implícita que representa a influência do solvente nas propriedades moleculares, considerando o solvente como um contínuo. Considera que o soluto é completamente envolvido pelo solvente, onde este último tem cargas livres. Essas cargas são distribuídas na superfície da cavidade, as quais são determinadas pela imposição de que os potenciais se cancelam nessa superfície.¹⁴³

3.3.5 Método ChelpG

Um parâmetro importante na modelagem de sistemas de interesse biológico é a obtenção das cargas dos átomos deste sistema. Para o estudo das cargas das moléculas citadas neste trabalho foi empregado o método ChelpG que apresenta menor dependência da função de base na determinação das cargas atômicas parciais. O ChelpG é um método que deriva as cargas por meio do potencial eletrostático do sistema. Proposto por Breneman e Wiberg em 1990, onde definindo as cargas a partir de uma grade (grid) na qual a molécula ou o sistema em estudo é colocado, considera apenas pontos que estejam distantes até 2,8 Å (raio de van der Waals) dos átomos, assim as contribuições de carga de cada átomo do sistema são determinadas pontualmente. Este método reproduz de maneira satisfatória o momento dipolar obtido pelos cálculos SCF.¹⁴⁴

3.3.6 Análise de Componente Principal

No estudo de sistemas químicos existem muitas variáveis, de natureza diversificada, desde propriedades externas a este sistema até as propriedades intrínsecas a ele. Entretanto, nem todas as variáveis obtidas nos durante o estudo e nos cálculos de sistemas moleculares são relevantes para representar este sistema. Geralmente a escolha de variáveis importantes que possam representar um sistema químico é baseada na experiência ou na intuição química, critérios subjetivos que podem negligenciar variáveis importantes.¹⁴⁵

Dessa forma, técnicas estatísticas são aplicadas aos estudos de sistemas químicos para selecionar de maneira criteriosa as propriedades que o represente. Técnicas de análise multivariada, como por exemplo a Análise de Componentes Principais (do inglês Principal Components Analysis, PCA), são empregadas em estudos de quimiometria para analisar conjuntos de dados contendo varias variáveis. A PCA objetiva a redução do número de variáveis e a escolha linearmente independente das melhores propriedades para representar um determinado sistema (componentes principais).¹⁴⁶

A PCA é uma técnica exploratória de dados multivariados, introduzida em 1901 por Karl Pearson, fundamentada posteriormente no artigo de Harold Hotelling de 1933.

Considere um experimento químico constituído por m moléculas que resultam em n propriedades. Ao aplicar um estudo de PCA para tratamento dos dados D do sistema químico considera-se que as n variáveis (propriedades) do sistema sejam executadas sobre os m objetos (moléculas) de maneira a produzir uma matriz D (Figura 26) formada por $m \times n$ elementos. A j -ésima variável desta matriz é representada por um vetor coluna e o seu i -ésimo objeto é representado por um vetor linha, também chamado de vetor resposta e pode ser descrito por um ponto no espaço n -dimensional.

$$D = \begin{bmatrix} d_{11} & d_{12} & \dots & d_{ij} & \dots & d_{1n} \\ d_{21} & d_{22} & \dots & d_{ij} & \dots & d_{2n} \\ \cdot & & & & & \\ \cdot & & & & & \\ \cdot & & & & & \\ d_{m1} & d_{m2} & \dots & & \dots & d_{mn} \end{bmatrix}$$

Figura 26. Matriz de dados $m \times n$ elementos.

O principal objetivo da PCA é explicar a estrutura da variância e covariância de um vetor qualquer, composto de p -variáveis aleatórias por meio da combinação linear das n -variáveis originais, chamada de componentes principais (PCs).¹⁴⁷

De maneira sistemática, um estudo de PCA realizado para duas variáveis X_1 e X_2 , pode ser definido da seguinte forma:

Supondo-se que existem N observações feitas a partir dos eventos E_1 e E_2 , subtraem-se dos valores desses eventos as suas respectivas médias, obtendo-se:

$$e_1 = E_1 - \bar{E}_1 \quad \text{e} \quad e_2 = E_2 - \bar{E}_2 \quad (37)$$

Desta forma, as médias de e_1 e e_2 serão iguais a zero, porém isto não altera as variâncias, S_1^2 e S_2^2 (S =desvio padrão), dos eventos nem a sua correlação r .

No estudo da PCA a idéia é criar novas variáveis, PC_1 , PC_2 , PC_3 , PC_{n-1} , chamadas de componentes principais, que são funções lineares de e_1 e e_2 escritas da seguinte forma

$$PC_1 = a_{11}e_1 + a_{12}e_2 \quad (38)$$

$$PC_2 = a_{21}e_1 + a_{22}e_2 \quad (39)$$

de maneira que, a qualquer conjunto de valores dos coeficientes a_{11} , a_{12} , a_{21} e a_{22} , podem ser introduzidos N valores e_1 e e_2 , e serão obtidos N novos valores PC_1 e PC_2 .¹⁴⁷

Considerando,

$$\overline{PC_1} = \overline{PC_2} = 0 \quad (40)$$

$$Var PC_1 = a_{11}^2 S_1^2 + a_{12}^2 S_2^2 + 2a_{11}a_{12}rS_1 S_2 \quad (41),$$

e

$$Var PC_2 = a_{21}^2 S_1^2 + a_{22}^2 S_2^2 + 2a_{21}a_{22}rS_1 S_2 \quad (42)$$

$$S_i^2 = Var X_i \quad (43)$$

Para que a proposição acima seja válida os coeficientes a_{11} , a_{12} , a_{21} e a_{22} devem satisfazer três condições:

- i) O valor da variância (Var) da PC_1 deve ser o maior possível.
- ii) Os N valores das PC_1 e PC_2 não se correlacionam.
- iii) $a_{11}^2 + a_{12}^2 = a_{21}^2 + a_{22}^2 = 1$

Aplicando o exposto acima para o caso de P variáveis (e_1, e_2, \dots, e_P), cada PC é uma combinação linear das variáveis e . Ademais, todos os coeficientes desta combinação linear deverão satisfazer as três condições abaixo:¹⁴⁸

- i) $Var PC_1 \geq Var PC_2 \geq \dots \geq Var PC_P$.
- ii) Os valores de quaisquer duas PCs não se correlacionam;
- iii) Para qualquer componente principal a soma dos quadrados dos coeficientes é sempre igual a 1.

As PCs podem ser encaradas como eixos de máxima distribuição dos objetos. Podemos visualizar a disposição dos objetos nos novos conjuntos de eixos gerados.

A figura formada pela projeção dos objetos nas componentes principais é denominada de gráfico de escores. Suas coordenadas são obtidas a partir do produto da matriz de dados pela matriz de autovetores. Se os dois ou três primeiros autovetores explicarem uma quantidade significativa da variância acumulada total ($\geq 75\%$), um gráfico de escores em que eles são as coordenadas pode mostrar projeções acuradas, em poucas dimensões, do espaço original de maior dimensão de variáveis.^{149,150}

O estudo de PCA permite obter a partir de um número muito grande de propriedades um conjunto menor que represente as contribuições principais, ou seja, permite reduzir o espaço original das variáveis, mantendo todas as informações relevantes do sistema estudado. O PCA é uma ferramenta útil quando o objetivo final é prever a partir de várias amostras e propriedades, como estas amostras se assemelham em relação as suas variáveis.

3.3.7 Método híbrido QM/MM

A mecânica clássica pode ser usada para simular sistemas moleculares com grande número de átomos de maneira coerente, mas não é possível a partir de suas equações simular processos enzimáticos onde ocorrem reações químicas. Na direção oposta, as reações químicas podem ser satisfatoriamente simuladas por meio da mecânica quântica, mas o número de átomos a ser tratado é drasticamente reduzido, uma vez que a quantidade de equações necessárias para resolver estes processos é grande o suficiente para inviabilizá-lo do ponto de vista computacional.

Na tentativa de solucionar ambos os problemas, a associação das facilidades advindas da mecânica quântica no trato das partes mais relevantes de um sistema R-L (calor de formação, quebra e formação de ligações, transferências de carga, polarização, etc) e o grande poder da mecânica clássica no tratamento do resto do sistema; proporciona a precisão da abordagem quântica com as gerenciáveis soluções das equações de Newton.^{10,125}

A aplicação desta metodologia requer o estabelecimento da definição (divisões) do sistema em duas (ou três) regiões distintas, porém inseparáveis. Como mostrado na Figura 27, a região QM é a região que compreendem o menor número de átomos (geralmente ligando e resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise enzimática), esta é a parte estudada por métodos da mecânica quântica. A região MM é a parte onde se encontra o restante da enzima e as moléculas de águas de cristalográficas, é tratado por meio de campos de força de mecânica molecular clássicas. A terceira parte do sistema é a região de contorno, que consiste num conjunto de restrições (condições limite) aplicadas ao sistema, devido ao fato de que é impossível simular um sistema infinito.^{125,151}

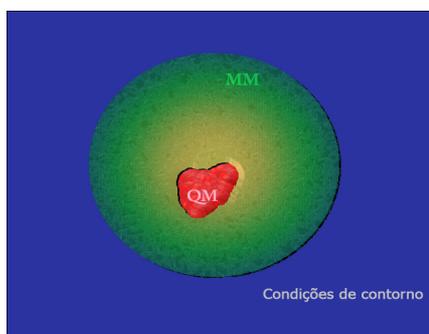


Figura 27. Representação das regiões de um sistema do modelo QM/MM.

O cálculo das energias e forças em um sistema R-L pode ser obtido pela resolução da equação de Schrödinger independente do tempo (Equação 44), sob uma abordagem adequada a este tipo de sistema.

$$\hat{H}_{eff} \Psi(r_i, R_A, R_M) = E(R_A, R_M) \Psi(r_i, R_A, R_M) \quad (44)$$

onde, r_i e R_A são respectivamente as coordenadas dos elétrons e núcleos da região, R_M é a coordenada dos átomos da parte MM.

Desta maneira, podemos descrever o hamiltoniano representando todas as partes do sistema a ser calculado, \hat{H}_{eff} , Equação 45. Este hamiltoniano é composto pela soma de quatro termos: O primeiro termo que representa a região de QM, o segundo a MM, um terceiro é utilizado para descrever as interações entre as regiões QM/MM e o quarto termo representa as condições de contorno do sistema.¹²³

$$\hat{H}_{eff} = \hat{H}_{QM} + \hat{H}_{MM} + \hat{H}_{QM/MM} + \hat{H}_{contorno} \quad (45)$$

A energia total do sistema é calculada para cada posição dos núcleos da parte QM e para todas as coordenadas dos átomos da região MM, utilizando o método SCF:

$$E = \frac{\langle \Psi | \hat{H}_{eff} | \Psi \rangle}{\langle \Psi | \Psi \rangle} \quad (46)$$

A energia potencial de do hamiltoniano \hat{H}_{eff} pode ser calculada por meio da soma de cada termo descrito na equação 45. A energia é, então, calculada por:

$$E_{total} = \frac{\langle \Psi | H_{QM} + H_{QM/MM} + H_{contorno(QM)} | \Psi \rangle}{\langle \Psi | \Psi \rangle} + \sum_{AM} \left\{ \frac{A_{AM}}{R_{AM}^{12}} - \frac{B_{AM}}{R_{AM}^6} \right\} \quad (47)$$

$$+ E_{MM} + E_{contorno(MM)}$$

O primeiro termo da equação 47 inclui os hamiltoniano da parte QM e QM/MM. O segundo termo é o potencial de Lennard-Jones que leva em conta os termos de curto alcance, de troca-repulsão e as contribuições de dispersão de longo alcance que não podem ser explicadas usando somente uma interação puramente

Coulômbica. Os outros termos são respectivamente, a energia da parte MM e da região de fronteira do sistema.

O hamiltoniano QM representa a parte eletrônica do sistema no vácuo. Pode ser calculado pelos métodos mecânico quânticos como os métodos semiempíricos AM1, PM3, AM1/MNDO e/ou métodos *ab initio* HF, MP₂ ou métodos DFT.¹²³

O hamiltoniano QM/MM descreve as interações entre os átomos tratados via QM e via MM. Nos casos em que não há ligações covalentes entre os átomos das regiões QM e MM este hamiltoniano deve ser composto pela soma do termo eletrostático e o potencial de Lennard-Jones.

O hamiltoniano MM é descrito pelas posições dos átomos que constituem esta região e contém as contribuições de energia dos termos ligados (conectados) e não-ligados (não conectados). O termo ligado da energia MM é composto pelos valores geométricos: distância de ligação, ângulos e diedros. O termo não-ligado da energia MM é composto pelas energias de Coulomb e de van der Waals.^{10,123} Estes termos são representados por campos de força determinados por um conjunto de funções desenvolvidas para serem utilizadas nos métodos MM.¹²⁵

Existem várias funções potenciais empíricas que podem ser utilizadas no cálculo da energia MM, Equações 48, 49 e 50. O campo de forças e a maioria das funções potenciais são definidos por duas categorias de termos que tratam as interações dos termos ligados e não-ligados entre os átomos de sistema.

$$U_{\text{não-ligado}} = U_{\text{Lennard-Jones}} + U_{\text{eletrostatico}} + U_{\text{polariz.}} \quad (48)$$

onde,

$$U_{\text{ligado}} = U_{\text{distância}} + U_{\text{ângulo}} + U_{\text{diedro}} + U_{\text{ângulo impróprio}} \quad (49)$$

$$U_{\text{não-ligado}} = U_{\text{Lennard-Jones}} + U_{\text{eletrostatico}} + U_{\text{polariz.}} \quad (50)$$

Os termos da equação 49 são também chamados termos covalentes, uma vez que definem a estrutura covalente da molécula. A distância de ligação e ângulo, são definidos como harmônicos como mostram as equações 51 e 52:

$$U_{\text{distância}} = \sum_{\text{distâncias}} \frac{1}{2} k_r (r - r_0)^2 \quad (51)$$

em que, k_r é a constante de força de ligação, r é o tamanho da ligação entre dois átomos adjacentes e r_0 é a distância de equilíbrio da ligação.

$$U_{\text{ângulo}} = \sum_{\text{ângulos}} \frac{1}{2} k_{\theta} (\theta - \theta_0)^2 \quad (52)$$

em que, k_{θ} é a constante de força para o ângulo e θ_0 é o ângulo de equilíbrio.

O termo correspondente ao diedro é representado na Equação 53, e descreve as mudanças de energia na molécula causadas pela torção em torno de uma de suas ligações. Pode ser descrito pela forma periódica:

$$U_{\text{diedro}} = \sum_{\text{diedros}} \frac{1}{2} v_n [1 + \cos(n\phi - \delta)] \quad (53)$$

na equação 53 v_n é a constante de força, n é a periodicidade do ângulo θ e δ é a fase do ângulo.

O termo impróprio, Equação 54, descreve a energia do movimento de fora-de-plano como um ângulo de diedro impróprio ω .

$$U_{\text{diedro impróprio}} = \sum_{\text{diedros imprópios}} \frac{1}{2} v_n [1 + \cos(n\omega - \delta)] \quad (54)$$

Estas são as 4 considerações mais importantes para representar a energia de ligação em um campo de força. A equação de um campo de força pode ser incrementada com outros termos, como por exemplo, os termos cruzados, com a finalidade de obter resultados em melhor concordância com os dados experimentais.¹²⁵

Os termos não-ligados descrevem a energia das interações intermoleculares do sistema. A Equação 55 representa o potencial de Lennard-Jones que mimetiza as interações de dispersão de longo alcance e as interações repulsivas de curto alcance entre os átomos i e j .

$$U_{LJ} = \sum_{ij} \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \quad (55)$$

A_{ij} e B_{ij} são constantes positivas cujos valores dependem de que tipo de átomos é i e j .

O termo eletrostático tenta descrever a energia proveniente das interações eletrostáticas entre os átomos i e j , mais precisamente a energia da distribuição das cargas pontuais, q_i e q_j . Este termo tem a forma:

$$U_{\text{eletrostático}} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon} \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (56)$$

onde, ϵ é a constante dielétrica do meio e ϵ_0 é a permissividade no vácuo.

A energia de polarização pode ser computada como:

$$U_{\text{polariz}} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \mu_i^T E_i^q \quad (57)$$

μ_i é o momento dipolar produzido pela distribuição de carga do meio na presença de um campo elétrico \mathbf{E}_i , e E_i^q é o campo elétrico de cada átomo resultante da soma dos campos devidos às cargas.

O hamiltoniano das condições de contorno é introduzido para compensar a aproximação feita ao truncar o sistema. Representa a interação entre o sistema e a região de fronteira. Esta região é incluída nos cálculos QM/MM na tentativa de descrever a solvatação do sistema QM/MM. Como os sistemas de fase condensada têm uma extensão infinita, isso torna inviável a sua simulação real. Assim, para estudar a reação em meio solvatado é necessário ter em conta que apenas uma pequena porção do solvente está representada como explícita. Por esta descontinuidade é necessário empregar métodos que mimetizam todo meio solvatado.

Muitas abordagens podem ser utilizadas para simular a continuidade das fases condensadas, entre os mais comuns estão a aplicação das condições de contorno periódicas (PBC) e condições de contorno deformáveis ^{125,152}

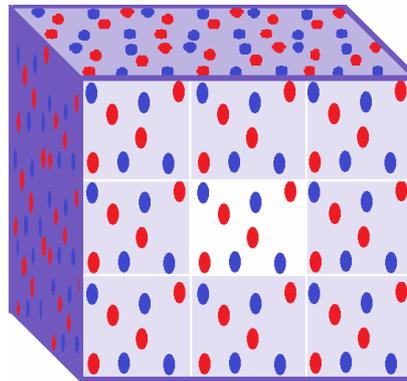


Figura 28. Representação das interações entre a célula unitária (quadrado branco) e suas imagens replicadas. Condições periódicas de contorno em 3D.

A metodologia PBC consiste em selecionar uma pequena parte do sistema (que contenha as partes QM e MM) e colocá-lo dentro de uma caixa (célula unitária) que consiste em moléculas de solvente. Esta célula unitária é replicada em todas as direções do espaço de modo que a fase condensada se modela por infinitas repetições periódicas, Figura 28.

No caso da metodologia de condições de contorno deformáveis, é aplicado um potencial radial para certos os átomos das moléculas do solvente (por exemplo, ao oxigênio da água), de modo que estas moléculas possam continuar reorientando-se, mas seus movimentos de translação estão restritos. O potencial aumenta consideravelmente com a distância do ponto de origem onde foi aplicado inicialmente, isso garante que sejam as moléculas localizadas nas camadas mais externas às que percebam de uma maneira mais acentuada a aplicação da força.

Em geral, sistemas estudados em QM/MM têm um elevado número de átomos, por conseguinte, o número de interações de átomos não-ligantes é enorme. Computacionalmente seria dispendioso calcular a contribuição de energia de todos os pares não-ligantes de átomos de um sistema condensado. Em geral, sistemas estudados em QM/MM têm um elevado número de átomos, por conseguinte, o número de interações de átomos não-ligantes é enorme. Computacionalmente seria muito dispendioso calcular a contribuição de energia de todos os pares não-ligantes de átomos de um sistema condensado. Para resolver este problema são aplicadas funções de truncamento por meio dos métodos de corte (do inglês, Cut-off).¹⁵³

A função de truncamento direto usa o método de truncamento abrupto ignorando todas as interações que estão além das distâncias de corte. Neste método cada termo do potencial não-ligado ($U_{\text{não-ligado}}$) apresentado na equação 50, é multiplicado pela função de truncamento $S(r)$:

$$S(r) = \begin{cases} 1 & r \leq r_c \\ 0 & r > r_c \end{cases} \quad (58)$$

Apesar de simples, alguns inconvenientes são inevitáveis quando se aplicam as funções de truncamento abrupto. Este tipo de função produz descontinuidade nas funções de energia e suas derivadas. Para resolver este problema outros tipos de funções podem ser usadas, como por exemplo as funções suavizadas.

A função de comutação, $S(r)$, Equação 59, é um tipo de função de suavizada. Está implementada de modo que a sua primeira derivada seja contínua no intervalo $r \leq r_{off}$. Esta função utiliza raios de corte, e calcula as interações dentro de um raio interno (r_{on}) a partir do qual é suavizado a zero no raio de corte exterior (r_{off}).

$$S(r) = \begin{cases} 1 & r \leq r_{on} \\ \frac{(r_{off}^2 - r^2)^2 (r_{off}^2 + 2r^2 - 3r_{on}^2)}{(r_{off}^2 - r_{on}^2)^3} & r_{on} < r \leq r_{off} \\ 0 & r > r_{off} \end{cases} \quad (59)$$

A função de deslocamento, $S(r)$, mostrada na Equação 60 é outro tipo de função suavizada. É definida por apenas um raio de corte (r_c) que faz com que a energia de interação vá diminuindo à medida que se aproxima a distância ao raio de corte, sendo desconsiderada a partir deste raio. Esta função pode ser expressa da seguinte forma:

$$S(r) = \begin{cases} \left[1 - \left(\frac{r}{r_c} \right)^2 \right]^2 & r \leq r_c \\ 0 & r > r_c \end{cases} \quad (60)$$

O comportamento destas funções de truncamento, $S(r)$, em função da distância r é mostrado na Figura 29.

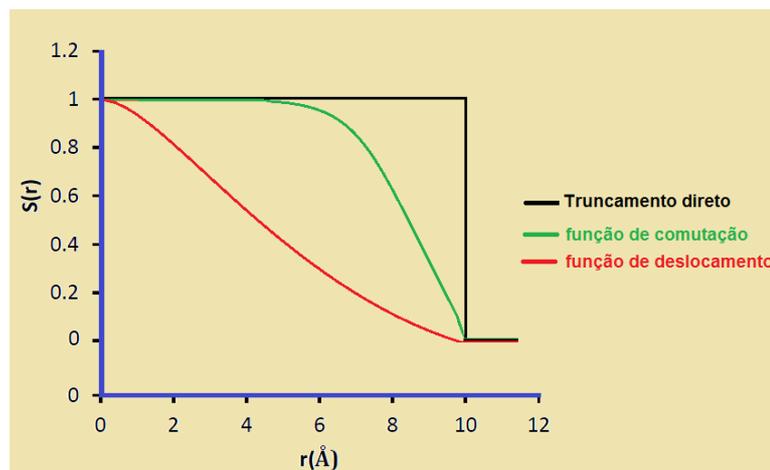


Figura 29. Representação de alguns tipos de funções em função da distância. Raios de corte: $r_c=r_{off}= 10 \text{ \AA}$ e $r_{on}=5 \text{ \AA}$.

3.3.8 Dinâmica Molecular (MD)

O estudo do mecanismo de ação de enzimas em relação aos seus substratos e inibidores é a chave fundamental para o desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento e cura de doenças. Macroscopicamente é possível medir várias propriedades experimentalmente, mas estimar como a interação entre uma determinada enzima e uma molécula ocorre em nível atômico (escala nanométrica) é algo que ainda não é possível observar em um erlenmeyer.

Com o desenvolvimento de hardware de alto desempenho, software e algoritmos apropriados, atualmente é possível simular de forma realista o ambiente onde as interações e as reações químicas ocorrem para explicar como os sistemas macromoleculares funcionam em nanoescala.¹⁵⁴ O desenvolvimento de métodos computacionais que utilizam as equações clássicas newtonianas de movimento e dinâmica, (Equação 61), possibilitaram o estudo do comportamento dos núcleos atômicos ao passo do tempo, nos processos químicos e biológicos dos sistemas macromoleculares.

$$F_i(t) = m_i \vec{a} = m_i \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} = - \frac{\partial U(r_i)}{\partial r_i} \frac{\vec{r}_i}{r_i} \quad (61)$$

em que m_i é a massa da partícula i , a é a aceleração da partícula, r_i é a posições da partícula i no instante (tempo) t .

O método de simulações de dinâmica molecular (MD) é a principal ferramenta para o estudo dos sistemas de interesse bioquímico em fase condensada. O MD é um método que permite: estimar as conformações estruturais evoluindo no tempo e calcular as propriedades termodinâmicas e dinâmicas de moléculas biológicas e seus complexos. Embora esses sistemas sejam constituídos por um grande número de átomos, e que para simular o ambiente intracelular seja necessário um aumento considerável no número de átomos a ser estudado, os métodos de MD nos permite simular de maneira satisfatória o comportamento enzimático. Parafraseando Meller “A essência da simulação é a utilização do computador para modelar um sistema físico.”¹⁵⁴

As primeiras simulações utilizando métodos de MD foram realizados no final dos anos de 1950, por Alder e Wainwright, que estudaram a interação de um sistema composto por esferas rígidas¹⁵⁵, fornecendo importantes *insights* sobre as

interações em meio líquido. Sequencialmente, Rahman realizou as primeiras simulações utilizando um potencial realista para argônio líquido e também fez as primeiras simulações de sistemas moleculares.¹⁵⁶ As primeiras simulações de sistemas proteicos realizadas com MD foram levadas a cabo por Karplus e colaboradores em 1977, que estudaram o mecanismo de inibição da tripsina.¹⁵⁷

Os átomos estão sempre em movimento, com raras exceções e em condições extremas, todos os átomos e partículas que compõem o universo estão em constante movimento. Assim, os núcleos dos átomos que constituem um sistema enzimático em fase condensada ou em solução também se movem continuamente. O estudo destes movimentos em função do tempo, por meio de MD fornece uma quantidade considerável de estados estruturais (configurações conformacionais) e um considerável número de informações que são úteis para prever e estimar, calcular e determinar as propriedades de sistemas macromoleculares.^{154,158}

As diversas configurações conformacionais obtidas durante uma simulação MD carregam informações sobre a energia e propriedades devido às pequenas flutuações na geometria do sistema. Uma das chaves para a simulação precisa de um sistema via MD é ter uma conformação de partida adequada para ele. Por outro lado, para calcular as propriedades termodinâmicas deste mesmo sistema é necessária uma grande quantidade de informação sobre os diferentes estados estruturais acessados pelo sistema.

Com o objetivo de resolver os termos da Equação 61 e para obter uma adequada estrutura (conformação) de partida no estudo de sistemas enzimáticos são utilizados algoritmos nos programas de simulação MD. O cálculo das propriedades termodinâmicas através de vários estados acessados pelo sistema é realizado aplicando as teorias da mecânica estatística.

O movimento do sistema através do espaço de fase é governada pelo hamiltoniano do sistema, Equações 62, 63 e 64, definido em função do momento \vec{p}_i e das posições \vec{r}_i .

$$\hat{H}(\vec{p}_i, \vec{r}_i) = \sum_{i=1}^n \frac{1}{2m_i} \vec{p}_i^2 + U(\vec{r}_i) \quad (62)$$

$$\vec{p}_i = \frac{\partial \hat{H}}{\partial \vec{r}_i} = -\frac{\partial U}{\partial \vec{r}_i} = \vec{F}_i \quad (63)$$

$$\vec{r}_i = \frac{\partial \hat{H}}{\partial \vec{p}_i} = \frac{\vec{p}_i}{m_i} \quad (64)$$

onde $U(r_i)$ é a função de energia potencial.

As simulações MD geram informações em nível microscópico, por exemplo, a posição e a velocidade dos núcleos atômicos do sistema em estudo. A mecânica estatística é usada para converter as informações em nível microscópico nas observáveis macroscópicas como pressão e energia. Assim, os princípios da mecânica estatística são cruciais para o estudo de sistemas enzimáticos via simulações MD.¹⁵⁸

A mecânica estatística oferece uma modelagem matemática rigorosa ao relacionar as propriedades macroscópicas às distribuições e movimento dos átomos e moléculas em sistemas de N-partículas. Esta informação relacionada com propriedades microscópicas calculadas a partir de simulações MD compõe uma ferramenta poderosa na determinação das propriedades termodinâmicas e/ou cinéticas.

3.3.8.1 Algoritmos aplicados à MD

Para determinar as forças que atuam sobre cada partícula de um sistema, os programas de simulação MD executam um algoritmo simples para resolver os termos da Equação 61. Em geral, este algoritmo é executado em seis passos que podem ser descritos como se segue:

- i. Ler o vetor de coordenadas de cada núcleo atômico, $\mathbf{r}_i(t) = (x_i(t), y_i(t), z_i(t))$;
- ii. Ler a velocidade inicial de cada núcleo;
- iii. Integrar a Equação 61;
- iv. Calcular a força atuante em cada núcleo atômico;
- v. Calcular propriedades do sistema;
- vi. Retornar ao passo ii para calcular o próximo estado.

O método das diferenças finitas usando expansão em série de Taylor é um dos métodos mais eficientes para a resolução de equações diferenciais como a equação 61.¹⁵⁹ Sabendo a força que atua sobre cada um dos núcleos é possível calcular a nova posição que cada átomo terá depois de um incremento de tempo Δt , relacionado com a posição $r_i(t)$ e a velocidade $v_i(t)$ no instante anterior (t) . Esta é a idéia principal contida no algoritmo desenvolvido por Loup Verlet em 1967. A Equação 65 descreve o algoritmo de Verlet aplicado à solução da equação 61, tendo em consideração a expansão em série de Taylor de quarta ordem para as posições $t+\Delta t$ e $t-\Delta t$.¹⁶⁰

$$r_i(t + \Delta t) = 2 \vec{r}_i(t) - r_i(t - \Delta t) + \frac{f(t)}{m_i} \Delta t^2 \quad (65)$$

$$\vec{v}_i(t) = \frac{1}{2\Delta t} \left(\vec{r}_i(t + \Delta t) - \vec{r}_i(t - \Delta t) \right) \quad (66)$$

Os algoritmos mais simples utilizados nas simulações MD são baseados no algoritmo do Verlet. A eficiência do algoritmo do Verlet pode ser melhorada implementando as velocidades do último instante no tempo anterior, em vez de recalculá-las para cada novo tempo. Este algoritmo, Equação 67, é chamado Velocity-Verlet.

$$\vec{v}_i(t + \Delta t) = \vec{v}_i(t) + \frac{\Delta t}{2m_i} \left(\vec{F}_i(t) + \vec{F}_i(t + \Delta t) \right) \quad (67)$$

O algoritmo *leapfrog* é outro tipo de algoritmo usado nas simulações MD, Equações 68 e 69. Neste algoritmo, as velocidades são calculadas a cada $\Delta t/2$ e uma vez que as velocidades são obtidas no tempo $t+\Delta t/2$ as posições são atualizadas no tempo $t+\Delta t$.

$$\vec{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \vec{v}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{f(t)}{m_i} \Delta t \quad (68)$$

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = \vec{r}_i(t) + \vec{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) \Delta t \quad (69)$$

O fato de as equações de Newton serem conservativas e a garantia de que o sistema vai evoluir, que a energia total (desde que o hamiltoniano seja independente do tempo), os momentos angular e linear permanecerão constantes (condições de

Eckart)¹²⁵, nos permite acreditar que as trajetórias e as forças obtidas a partir destes algoritmos podem ser utilizadas nas simulações MD.

3.3.8.2 Mecânica estatística aplicada à MD

Um sistema pode ser observado através de suas propriedades macroscópicas e microscópicas. De acordo com a mecânica estatística, as grandezas físicas são obtidas por meio de estados microscópico (configurações microscópicas) do sistema, distribuídos de acordo com um conjunto de estatísticas.¹⁵⁴

O conjunto de parâmetros formados por propriedades termodinâmicas (temperatura, pressão e quantidade de partículas) provindo de um observável macroscópico do sistema é conhecido como o estado termodinâmico do sistema. A partir das equações dos estados termodinâmicos, outras propriedades termodinâmicas podem ser calculadas.¹³⁶

O conjunto de parâmetros constituído pelas propriedades microscópicas (coordenadas atômicas e momento) de um sistema é chamado de estado microscópico ou estado mecânico. Estes também podem ser considerados como coordenadas num espaço multidimensional chamado espaço de fase. O conjunto de pontos no espaço de fase que satisfaz as condições de um estado termodinâmico particular é chamado de *ensemble*.¹⁵⁸

As simulações MD geram conjuntos que correspondem à diferentes conformações do sistema. Um *ensemble* pode ser definido como o conjunto de todos os sistemas possíveis que possuam diferentes microestados, mas compartilham o mesmo estado termodinâmico.¹⁵⁸

Em mecânica estatística, uma observável "experimental" é assumida como a média do ensemble. Estes valores destas médias (Ξ) são definidos como:

$$\langle \Xi \rangle_{ensemble} = \int \int dp_i^N dr_i^N \Xi(p_i^N, r_i^N) \rho(p_i^N, r_i^N) \quad (70)$$

$$\rho(p_i^N, r_i^N) = \frac{1}{Q} e^{\left[\frac{-\hat{H}(p_i^N, r_i^N)}{\kappa_B T} \right]} \quad (71)$$

$$Q = \int \int dp_i^N dr_i^N e^{\left[\frac{-\hat{H}(p_i^N, r_i^N)}{\kappa_B T} \right]} \quad (72)$$

em que, \hat{H} é o hamiltoniano do sistema, T é a temperatura, κ_B é a constante de Boltzmann e Q é a função de partição das condições das simulações selecionadas.

Em simulações MD as observáveis podem ser assumidas como sendo a média do tempo de Ξ , como mostra a Equação 73.

$$\langle \Xi \rangle_{time} = \lim_{\tau \rightarrow \infty} \frac{1}{\tau} \int_{t=0}^{\tau} \Xi(p_i^N(t), r_i^N(t)) dt \approx \frac{1}{M} \sum_{t=1}^M \Xi(p_i^N, r_i^N) \quad (73)$$

com τ definido como tempo de simulação, M é o tempo (passos) da MD e $\Xi(p^N, r^N)$ é o valor instantâneo de Ξ .

Como descrito acima, as observáveis "experimentais" e simulados são calculadas de maneiras diferentes. Essa diferença pode ser resolvida pelo axioma fundamental da mecânica estatística, a hipótese ergódica que consiste em assumir que a média de tempo ($\langle \Xi \rangle_{time}$) é igual à média do ensemble ($\langle \Xi \rangle_{ensemble}$).

No caso de sistemas isolados, onde o número de átomos de N , o volume V e a energia são invariáveis temos um ensemble microcanônico (NVE). Os sistemas nos quais N , V e a temperatura T devam permanecer constantes são chamados de ensemble canônico (NVT)^{125,158}

O *ensemble* canônico (NVT) é o mais útil para as simulações onde serão estudados os sistemas enzimáticos e seus ligantes, desde que a maioria dos processos químicos, na fase condensada, ocorre sob as condições do *ensemble* canônico. Para garantir que o volume seja constante, é necessário o emprego das condições de contorno periódicas para assegurar a conservação da densidade do meio durante a simulação. O número de partículas, N , deve ser sempre constante.

Durante a simulação MD, diferentes tipos de aproximações podem ser utilizadas para manter a temperatura constante, embora a estratégia para esta finalidade em geral ser a mesma: por escalonamento das velocidades ou utilizando um termostato em contacto com o sistema externo.

O controle da temperatura é um ponto importante nas simulações MD. A partir dos termos da termodinâmica estatística a temperatura pode ser definida como:

$$T = \frac{2\langle K \rangle}{N_{df} \kappa_B} \quad (74)$$

em que, $\langle K \rangle$ é a energia cinética média e N_{df} é o número de graus de liberdade do sistema. A Temperatura instantânea T_i pode ser definida pela Equação 74, quando seja considerada apenas a energia cinética instantânea.

A fixação da temperatura pode ser feita pelo escalonamento das velocidades com a razão entre a temperatura instantânea T_i e a temperatura de referência T_{ref} do sistema, como descrito a seguir:

$$\vec{V}_{i,scaled}(t) = \vec{V}_i(t) \sqrt{\frac{T_{ref}}{T_i}} \quad (75)$$

O método de banho com termostato é implementado utilizando algoritmos derivados das equações de Newton. Esses algoritmos apesar de simples são robustos e de fácil implementação em programas de simulação MD. A idéia essencial deste método é considerar que na simulação de um sistema real, este não é isolado, mas interage ou está acoplado a um banho externo. Os mais conhecidos são os banhos de: Andersen, Berendsen, Nosé-Hoover e Langevin ^{125,161}

No algoritmo de Andersen, as velocidades instantâneas de um conjunto de núcleos selecionados aleatoriamente são realocadas usando a distribuição de Maxwell-Boltzmann. Os resultados das simulações obtidos com este modelo não são úteis, uma vez que produz resultados descontínuos. Berendsen e colaboradores trabalharam na melhora do algoritmo de Andersen incluindo um termo adicional para o cálculo das velocidades instantâneas, associando-o a uma força de atrito que é dependente da temperatura de referência.

$$\vec{V}_i(t) = M^{-1}F + \frac{1}{2\tau_T} \left(\frac{T_{bath}}{T_i} \right) V \quad (76)$$

em que, M^{-1} é a força de atrito, T_{bath} é temperatura de referência, no qual para o algoritmo de Berendsen é a temperatura do banho térmico externo, τ_T é a constante de acoplamento e V é o volume total do sistema.

O integrador de Langevin-Verlet (LV), Equação 77, é um análogo estocástico da equação do movimento de Newton, em que forças aleatórias dependentes da velocidade (atrito), são introduzidas de modo que o acoplamento simula o banho com termostato externo ^{125,152}

$$m dv(t) = -\nabla U(x(t)) dt - \gamma m v(t) dt + \sqrt{2\gamma\kappa_B T_{bath}} m^{1/2} dW(t) \quad (77)$$

onde, $x(t)$ é a posição, $v(t)$ é a velocidade, γ é um parâmetro de colisão.¹⁶² $W(t)$ é um vetor padrão independente advindo do processo de Wiener (movimento Browniano). Considerando ξ_j sequência independente, distribuída idêntica e aleatoriamente por variáveis com média 0 e variância 1, podemos considerar que a cada $n \geq 1$ definindo um processo estocástico contínuo no tempo por $W_n(t)$, $t \geq 0$, teremos:

$$W_n(t) = \frac{1}{\sqrt{n}} \sum_{1 \leq j \leq \lfloor nt \rfloor} \xi_j \quad (78)$$

W_n é uma função de passo aleatória com saltos de $\pm \frac{1}{\sqrt{n}}$ n vezes $\frac{k}{n}$, onde $k \in$ ao conjunto dos números inteiros positivos (\mathbb{Z}_+). Uma vez que as variáveis randômicas ξ_j são independentes, os incrementos de $W_n(t)$ também serão.

O algoritmo de LV é empregado para descrever a dinâmica de uma partícula interagindo com um banho térmico.¹²⁵

3.3.8.3 Energia livre de interação em MD

As técnicas de simulação MD exploram o espaço de fase de maneira ampla, por esta razão é possível usá-lo para determinar quantidades termodinâmicas de maneira rigorosa. Assim, vários métodos podem ser aplicados à MD para calcular as energias livres de certos tipos de processo químico, quer em fase gás ou em fase condensada.¹²⁵ Para calcular a energia livre usando dinâmica molecular é necessário ter em conta alguns fatores importantes.

Um deles é o fato de que, durante as simulações MD, a uma dada temperatura, apenas estados de energia mais baixa sejam explorados. Outro fator é o de interesse em expressar a energia livre como uma função das coordenadas de reação

Reescrevendo a função de partição a partir da Equação 70 é possível obter a função de partição Q_{NVT} para um sistema de N partículas indistinguíveis à temperatura e volume constante:

$$Q_{NVT} = \frac{1}{h^{3N} N!} \int dp_i^N \int dr_i^N e^{\left[\frac{-\hat{H}(p_i^N, r_i^N)}{\kappa_B T} \right]} \quad (79)$$

A partir do hamiltoniano descrito na equação 62, é possível realizar a integração ao longo do momento, mantendo a integral, chamada integral de configuração, que depende apenas da posição das coordenadas.¹²⁵ Assim, a função de distribuição de densidade de probabilidade dada na equação 70 pode ser expressa em termos da função de partição Q_{NVT}

$$\rho_{NVT} = \frac{1}{h^{3N} N!} \frac{e^{\left[\frac{-\hat{H}(p_i^N, r_i^N)}{\kappa_B T} \right]}}{Q_{NVT}} \quad (80)$$

No cálculo da energia livre, é útil considerar o ensemble canônico (QNVT), cujas observáveis para a energia livre do sistema é o potencial de Helmholtz (A), Equação 81, adequado para descrever o sistema. Neste caso, a simulação do sistema é feita considerando as condições NVT. Onde consideraremos a energia livre como sendo a energia de Helmholtz.

$$A = -\kappa_B T \ln Q_{NVT} \quad (81)$$

Q_{NVT} pode ser considerado como sendo uma propriedade que depende da energia de cada configuração. Reescrevendo-o como uma média do ensemble:

$$Q_{NVT} \propto \left\langle e^{-\frac{U}{\kappa_B T}} \right\rangle \quad (82)$$

Apesar de atraente, a idéia de obter a energia do sistema a partir do cálculo da Q_{NVT} é inviável devido realizá-lo, pois, como descrito acima, em uma simulação MD apenas alguns estados de mais baixa energia são explorados durante o processo. No entanto existem estratégias que permitem acessar a energia livre em algumas situações.

3.3.8.3.1 Método de Perturbação de Energia Livre (FEP)

O método *alchemical* de perturbação de energia livre (FEP) é uma abordagem utilizada em simulações de MD para obter energias livres de ligação. Nos casos onde a simulação é impossível de ser realizada ou reproduzida em laboratório, o método de FEP é aplicado a fim de se obter energias livres do sistema.^{122,125,163}

Desta forma é possível realizar cálculos da diferença de energia livre entre os estados de um sistema onde o número e o tipo dos átomos é modificado (alquímico). Este método também é chamado por Gao et al. método de aniquilação dupla.^{125,163}

O método FEP está fundamentado nos ciclos termodinâmicos onde a interação do ligante com o seu meio, seja este a proteína ou solvente, é progressivamente aniquiladas. Na técnica de FEP a perturbação do sistema não correspondente a um processo físico. Assim, é possível aplicar uma série de sobreposições de estados não-físicos usando as descrições do FEP.^{122,125,163,164}

Considerando dois estados (Υ), e procedendo ao cálculo da diferença de energia livre entre estes dois estados, associado à equação de Helmholtz, obtemos:^{125,163}

$$\Delta\Upsilon_{I \rightarrow II} = \Upsilon_{II} - \Upsilon_I \quad (83)$$

∴

$$\Delta\Upsilon_{I \rightarrow II} = -\kappa_B T \ln \frac{Q_{II}}{Q_I} \quad (84)$$

Expressando Υ_I e Υ_{II} em termos de Q_{NVT} das equações 79 e 82:

$$\Upsilon_I = -\kappa_B T \ln \left\langle e^{-\frac{\hat{H}_I}{\kappa_B T}} \right\rangle \quad (85)$$

$$\Upsilon_{II} = -\kappa_B T \ln \left\langle e^{-\frac{\hat{H}_{II}}{\kappa_B T}} \right\rangle \quad (86)$$

Assim, $\Delta\Upsilon = \Upsilon_{II} - \Upsilon_I$ é dado por:

$$\Delta\Upsilon(I \rightarrow II) = -\kappa_B T \ln \left\langle e^{-\frac{\hat{H}_{II} - \hat{H}_I}{\kappa_B T}} \right\rangle_I \quad (87)$$

Nesta equação, o hamiltoniano \hat{H} pode ser decomposto em função das energias cinética (dp) e potencial (dr), assim é possível integrar a energia cinética separadamente. A utilidade deste resultado, pois a variação das energias livres para ir do estado Υ_I ao Υ_{II} pode ser obtida pela média do exponencial da variação da energia ($H_{II}-H_I$, ou potencial $U_{II}-U_I$), nas condições dadas pelo estado $\Upsilon(I)$.¹²⁵

Algumas vezes a variação $H_{II}-H_I$ é grande porque o espaço configuracional não foi bem definido. Assim, esta diferença não contribui significativamente na média. A solução deste problema está em introduzir um número ilimitado de estados intermediários entre Υ_I e Υ_{II} , considerando-se que o caminho termodinâmico para ir do estado 1 ao estado 2 não é necessariamente um caminho físico.¹²⁵ Assim, a variação de energia livre é calculada como uma soma de pequenas quantidades:

$$\Delta\Upsilon = \Upsilon_{II} - \Upsilon_I = (\Upsilon_{II} - \Upsilon_{N-1}) + (\Upsilon_{N-1} - \Upsilon_{N-2}) + \dots + (\Upsilon_2 - \Upsilon_1) \quad (88)$$

$$\Delta\Upsilon = \kappa_B T \sum_{i=1}^{N-1} \ln \left\langle e^{-\frac{\hat{H}_i - \hat{H}_{i+1}}{\kappa_B T}} \right\rangle_{i+1} \quad (89)$$

Uma maneira de definir os estados é introduzir um parâmetro de acoplamento ou perturbação ao sistema, λ , permitindo uma transformação contínua do hamiltoniano do estado Υ_I ao Υ_{II} .

$$\hat{H}(p, r, \lambda) = (1 - \lambda) \hat{H}_I(p, r) - \lambda \hat{H}_{II}(p, r) \quad (90)$$

onde, $\lambda=0$ define o estado Υ_I e $\lambda=1$ define o estado Υ_{II} . Uma extensão direta da equação 90 gera o esquema não-linear:

$$\hat{H}(p, r, \lambda) = (1 - \lambda)^n \hat{H}_I(p, r) - \lambda^n \hat{H}_{II}(p, r) \quad (91)$$

Desta forma a diferença de energia livre entre dois estados intermediários com diferentes valores do parâmetro de perturbação λ_I e λ_{II} pode ser calculada. Mais uma vez, cancelando os termos de energia cinética, a diferença é:

$$\Delta\Upsilon_{i \rightarrow j} = -\kappa_B T \ln \left\langle e^{\left(\frac{-U(r, \lambda_j) - U(r, \lambda_i)}{\kappa_B T} \right)} \right\rangle_{\lambda_i} \quad (92)$$

A soma das diferenças de energia livre individuais entre estados intermediários, indo do estado Υ_I para Υ_{II} é diferença total de energia livre:

$$\Delta\Upsilon_{I \rightarrow II} = \sum_{i=0}^{N_w} \Delta\Upsilon_{i \rightarrow (i+1)} \quad (93)$$

onde N_w é o número de estados intermediários (janelas) e os estados $i=0$ e $i=N_w+1$ fazem referência aos estados Υ_I ao Υ_{II} .

Uma vantagem prática da FEP é que as simulações realizadas pelo estado 1 podem ser utilizadas para calcular a diferença de energia livre em ambos os sentidos de um processo químico. O valor das diferenças em ambos os sentidos deve ser igual em grandeza e de sinal oposto. Assim, o valor das duas diferenças é dado por:¹²⁵

$$\Delta\Upsilon_{I \rightarrow II} = - \Delta\Upsilon_{II \rightarrow I} \quad (94)$$

$$\Delta\Upsilon(I \rightarrow II) = -\kappa_B T \ln \left\langle e^{\frac{\hat{H}_{II} - \hat{H}_I}{\kappa_B T}} \right\rangle_I \quad (95)$$

$$\Delta\Upsilon(II \rightarrow I) = -\kappa_B T \ln \left\langle e^{\frac{\hat{H}_I - \hat{H}_{II}}{\kappa_B T}} \right\rangle_{II} \quad (96)$$

O ciclo termodinâmico é uma ferramenta útil na tentativa de modelar os estudos envolvendo os cálculos de diferenças de energia livre entre os dois estados.

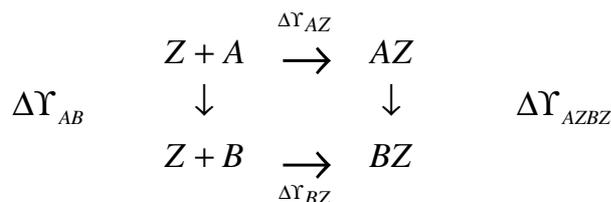


Figura 30. Ciclo termodinâmico com adaptações.¹²⁵

Num ciclo termodinâmico, como mostrado na Figura 30, o cálculo das afinidades de ligação relativas entre o ligante A e B à uma determinada molécula (hospedeira) Z é dada pela soma das energias livres individuais em todo o ciclo. Esta soma é igual a zero, porque a energia livre é uma função de estado termodinâmico. Isto significa que a diferença de energia livre depende apenas da natureza dos estados.

$$\Delta Y_{AZ} + \Delta Y_{AZBZ} - \Delta Y_{BZ} - \Delta Y_{AB} = 0 \quad (97)$$

De acordo com a equação 97, a afinidade de ligação relativa entre os ligantes A e B pode ser determinada como sendo:

$$\Delta Y_{AZ} - \Delta Y_{BZ} \text{ ou } \Delta Y_{AB} - \Delta Y_{AZBZ} \quad (98)$$

Na abordagem desenvolvida por Marti e colaboradores,¹²² a energia potencial utilizada é definida como

$$E_{QM/MM} = \left\langle \Psi \mid \hat{H}_0 \mid \Psi \right\rangle + \left(\sum \left\langle \Psi \mid \frac{q_{MM}}{r_{e,MM}} \mid \Psi \right\rangle + \sum \sum \frac{Z_{QM/MM}}{r_{QM,MM}} \right) \quad (99)$$

$$+ E_{QM/MM}^{vdW} + E_{MM}$$

ou

$$E_{QM/MM} = E_{vacuum} + E_{QM/MM}^{elect} + E_{QM/MM}^{vdW} + E_{MM} \quad (100)$$

onde E_{vacuum} é a energia (vácuo) da região QM polarizada, $E_{QM/MM}^{elect}$ é a termo da energia de interação eletrostática na qual estão incluídos as interações coulombicas dos núcleos dos átomos QM (Z_{QM}) e a interação eletrostática da função de onda polarizada dos elétrons Ψ com as cargas da enzima (q_{MM}), $E_{QM/MM}^{vdW}$ é o termo da energia de interação de van der Waals entre as regiões QM e MM.

Para calcular a diferença de energia livre por FEP dois parâmetros de perturbação λ e γ foram introduzidos nos termos de energia de interação eletrostática e de van der Waals. A energia total do termo de interação QM/MM é agora calculada pela expressão:

$$E_{QM/MM}(\lambda) = \left\langle \Psi \mid \hat{H}_0 \mid \Psi \right\rangle + \lambda \left(\sum \left\langle \Psi \mid \frac{q_{MM}}{r_{e,MM}} \mid \Psi \right\rangle + \sum \sum \frac{Z_{QM/MM}}{r_{QM,MM}} \right) \quad (101)$$

$$+ \gamma E_{QM/MM}^{vdW} + E_{MM}$$

Neste esquema, o parâmetro λ varia suavemente entre os valores de 0 a 1. Quando parâmetro λ tem valor igual 1, isso corresponde a interação completa carga-função de onda MM; e quando λ é igual a 0 representa ausência de interação eletrostática com o campo de força introduzido. Os valores γ também varia entre 0 a 1. Quando este valor é igual a 1 corresponde a uma total interação de van der Waals QM/MM (uma vez que as cargas eletrostáticas do ligante na região QM são aniquilados) e quando o valor é igual a 0, significa que nenhuma interação de van der interação Waals é representada no campo de força.¹²²

O cálculo das diferenças de energia livre de duas janelas consecutivas entre dois estados, a aniquilação das cargas e os parâmetros de van der Waals são realizados através de métodos FEP. A variação total de energia livre é tomada pela soma de todas as janelas que cobrem a transformação completa dos estados, inicial e final. Este procedimento é efetuado em duas etapas representadas nas equações 102 e 103:¹²²

$$\Delta G_{QM/MM}^{elect} = -\frac{1}{\kappa_B T} \left[\sum \ln \left\langle e^{-\kappa_B T [E(\lambda_{i+1}) - E(\lambda_i)]} \right\rangle_{\lambda_i} \right]_{\gamma=1} \quad (102)$$

e

$$\Delta G_{QM/MM}^{vdW} = -\frac{1}{\kappa_B T} \left[\sum \ln \left\langle e^{-\kappa_B T [E(\gamma_{i+1}) - E(\gamma_i)]} \right\rangle_{\gamma_i} \right]_{\lambda=1} \quad (103)$$

O ciclo termodinâmico para calcular a energia livre de ligação (ΔG_{bind}) entre enzima-inibidores por método FEP, neste trabalho é descrito na figura 30.

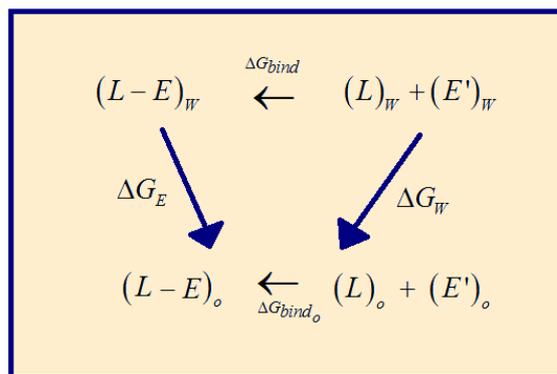


Figura 31. Ciclo termodinâmico do método FEP, com adaptações.¹²²

onde $(L-E)_w$ é o complexo enzima (E) e o ligante (L) em solução, $(E')_w$ é a apoenzima, $(L)_o$ é o ligante no vácuo. De acordo com o esquema da Figura 31 é possível calcular a energia livre de ligação de um ligante e comparar o valor predito com os dados experimentais (usando valores das constantes de inibição K_i e IC_{50}). A ΔG_{bind} pode ser obtida aplicando as Equações 102 e 103, em água (W) e na enzima (E) respectivamente. Desta forma, a ΔG_{bind} é expressa como:

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_W - \Delta G_E \quad (104)$$

Capítulo 4

4. Resultados e Discussão

Compreender como ocorre o processo de funcionamento e de reconhecimento molecular das enzimas que atuam em determinadas doenças é a chave para o desenvolvimento de fármacos que possam atuar de maneira a inibir, ativar, potencializar e também, em muitos casos, curar estas enfermidades. Neste trabalho, foram estudadas distintas moléculas reconhecidas como AChEs, MAOIs, e NTs a fim de elucidar os mecanismos de atuação destas moléculas em seus alvos bioquímicos.

4.1 Estudo de estrutura eletrônica dos sistemas AChEs, NTs e MAOIs

Análises qualitativas e quantitativas foram aplicadas para a obtenção de parâmetros estruturais, topológicos, espaciais, eletrônicos e lipofílicos (Tabela 4), com o objetivo de determinar a contribuição destas propriedades no processo de reconhecimento molecular como inibidores e agonistas das enzimas AChE e isoformas da MAO.

As geometrias de todas as moléculas estudadas foram otimizadas utilizando-se o método *ab initio* DFT com funcional híbrido B3LYP aplicando a função de base 6-31+G(d,p). Estas moléculas foram estudadas no vácuo e em solvente. O efeito do solvente, água, sobre estes sistemas foi avaliado utilizando-se o modelo de solvatação CPCM para todos os sistemas.

A leitura do MSEP destes sistemas foi realizada segundo a seguinte padronização: regiões de alta densidade eletrônica das superfícies de potencial estão relacionadas a valores negativos na escala que acompanha cada imagem (representadas nesse trabalho pelo espectro de cores verde-vermelho). As regiões de baixa densidade eletrônicas estão representadas pelo espectro de cores azul-verde. Todos os valores representados nos MSEP são expressos em kcal/mol.

4.1.1 ACh

Durante o reconhecimento molecular da ACh pela AChE, o nitrogênio quaternário do substrato tem uma forte interação iônica com o grupo carboxila do resíduo Asp72, Figura 32. Além disso, há formação de ligações de hidrogênio entre o grupo éster e a amina do resíduo Asn65 e o OH do resíduo Tyr130.⁶⁵

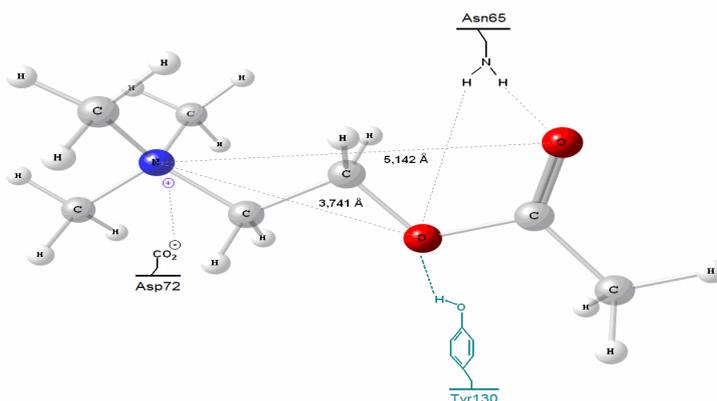


Figura 32. Representação esquemática dos principais pontos de reconhecimento molecular do sistema ACh-AChE.

No desenvolvimento de drogas que possam ser reconhecidas pelos receptores colinérgicos (muscarínicos e nicotínicos) e pela AChE, a enzima responsável pela hidrólise da ACh, alguns parâmetros são essenciais no desenho racional destas moléculas:⁶⁵

- presença de uma região de carga positiva é desejável;
- a distância entre o nitrogênio e o grupo éster, ou o oxigênio de uma carbonila deve estar entre 3,5 e 6,5 Å;
- a presença de um grupo éster ou de um bioisótero com mesma densidade eletrônica é importante;
- drogas com alto grau de liberdade é desejável;
- a presença de grupos metilas ligados ao nitrogênio é desejável - pelo menos duas metilas.

Como pode ser observado na Figura 33, a ACh apresenta o momento de dipolo direcionado ao longo do eixo equatorial da molécula, o alto valor do dipolo está relacionado com a presença da carga positiva do nitrogênio quaternário da molécula. O orbital de fronteira HOMO está distribuído pela região do grupo acetato e o orbital LUMO localizado principalmente nos três grupos metilas ligados ao

nitrogênio quaternário (Me_3N^+). A isodensidade utilizada para renderizar os orbitais de fronteira HOMO e LUMO foi de $\rho=0,03 \text{ e/bohr}^3$.

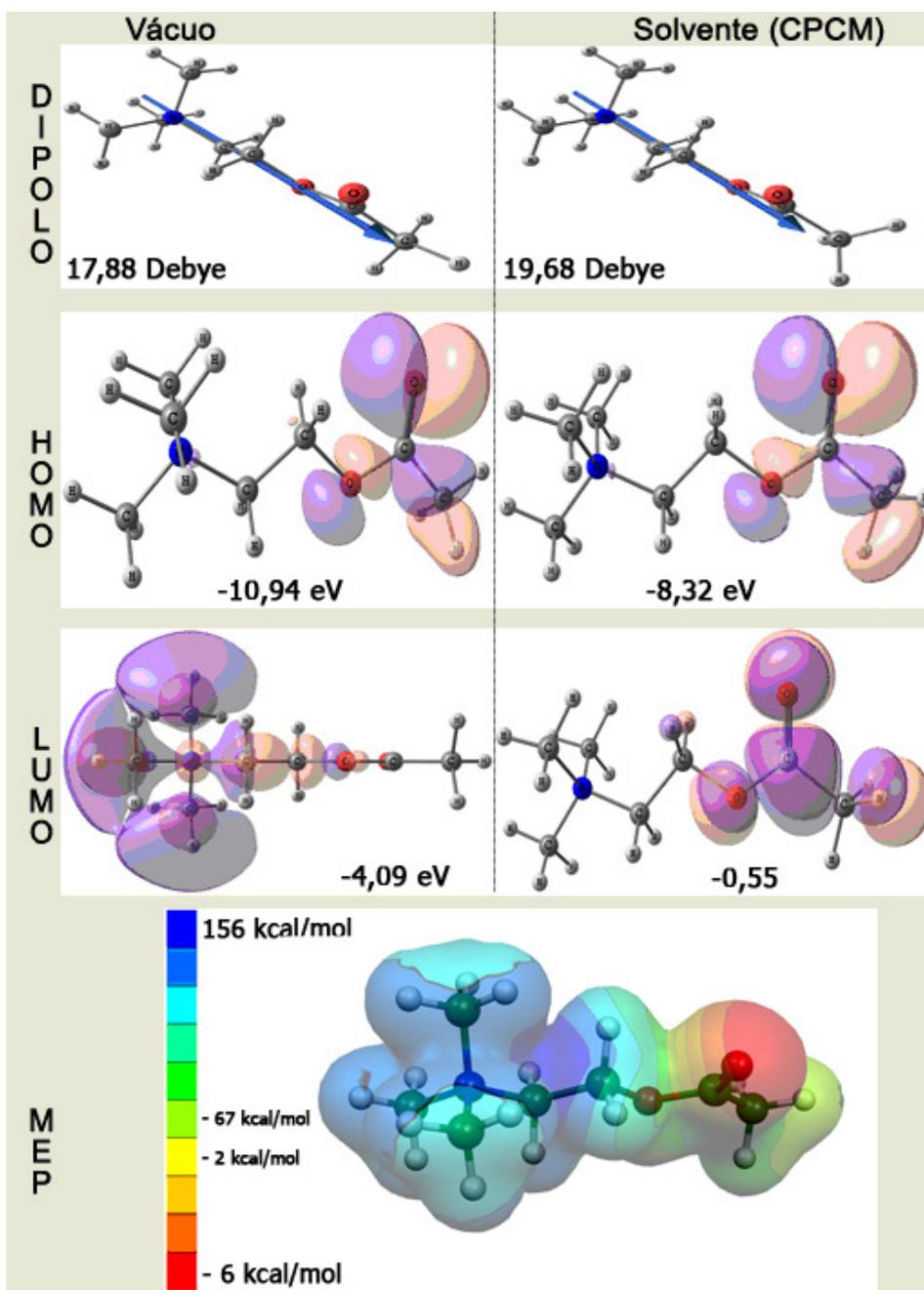


Figura 33. Estrutura otimizada, dipolo, HOMO, LUMO e MSEP da ACh calculadas em nível B3LYP/6-31+G(d,p) e B3LYP/6-31+G(d,p)/CPCM.

A distribuição eletrônica observada no MSEP mostra a molécula dividida em duas regiões, uma com alta densidade eletrônica – acetato, e a outra com baixa densidade eletrônica – colina.

O solvente tem importância significativa no perfil eletrônico da molécula, uma vez que modifica sensivelmente os valores das energias dos orbitais e do momento de dipolo.

4.1.2 NTs

A DA e o ED são exemplos de neuropatologias associadas a modificações nas concentrações de neurotransmissores nas sinapses. Compreender a química dos NTs é uma etapa importante no processo de desenvolvimento de drogas que favoreçam, de maneira eficiente, o aumento do gradiente de concentração de neuromediadores nas sinapses.

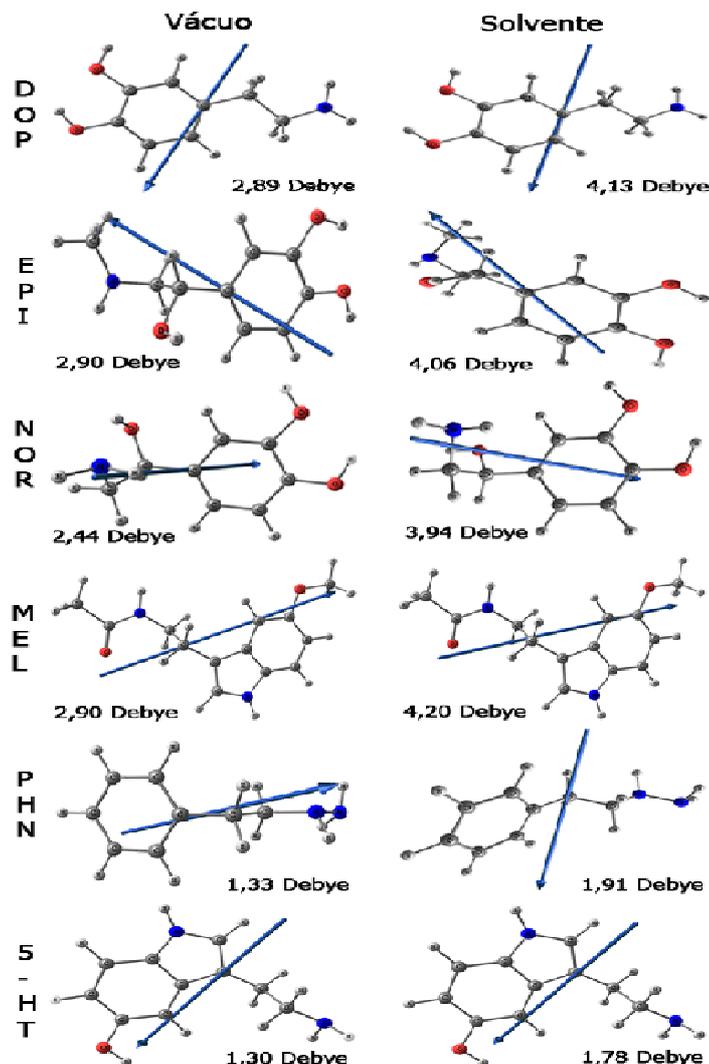


Figura 34. Estrutura otimizada e momento dipolar dos NTs - B3LYP/6-31+G(d,p) e B3LYP/6-31+G(d,p)/CPCM.

As geometrias das moléculas dos neurotransmissores DOP, EPI, NORE, MEL, PHE e 5-HT foram otimizadas e algumas observações importantes foram constatadas. Como mostrado na Figura 34, os momentos de dipolo dos NTs estão quase sempre direcionados para regiões de alta densidade eletrônica. A presença do solvente mostra que o valor do momento de dipolo tem um sensível aumento, principalmente nos NTs que possuem vários grupos hidroxilas na sua estrutura.

Como pode ser observado na Figura 35, a energia dos orbitais HOMO, HOMO-1, LUMO e LUMO+1, seguem a mesma tendência de grupo. Excetuando as energias dos orbitais da ACh obtidas nos cálculos no vácuo, que possuem valores muito acima dos demais NTs, as energias dos orbitais de todos os neurotransmissores não apresentam variações significativas tanto no vácuo quanto em meio solvatado. Excetuando a ACh, que não possui anel aromático em sua estrutura, os demais NTs possuem orbitais HOMO e HOMO-1 distribuídos principalmente sobre os anéis aromáticos e sobre os grupos amino e hidroxila de suas moléculas. Já os orbitais LUMO e LUMO+1 estão distribuídos exclusivamente sobre os anéis aromáticos dos NTs, sobre as ligações opostas a localização do HOMO.

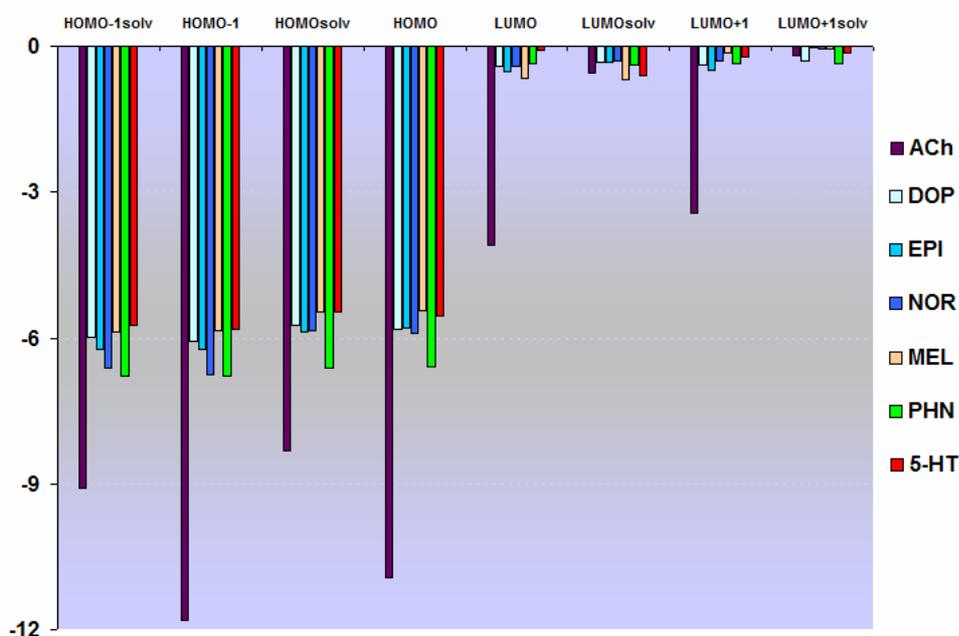


Figura 35. Energia dos orbitais HOMO, HOMO-1, LUMO e LUMO+1 dos NTs - B3LYP/6-31+G(d,p) e B3LYP/6-31+G(d,p)/CPCM.

O MSEPs dos NTs apresentados na Figura 36 mostra que estas moléculas possuem poucas regiões com baixa densidade eletrônica, e que estas estão geralmente localizadas nos heteroátomos doadores de hidrogênio. Isto concorda com a tendência que estes neuromediadores têm de interagir com sistemas por meio de ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas fracas.

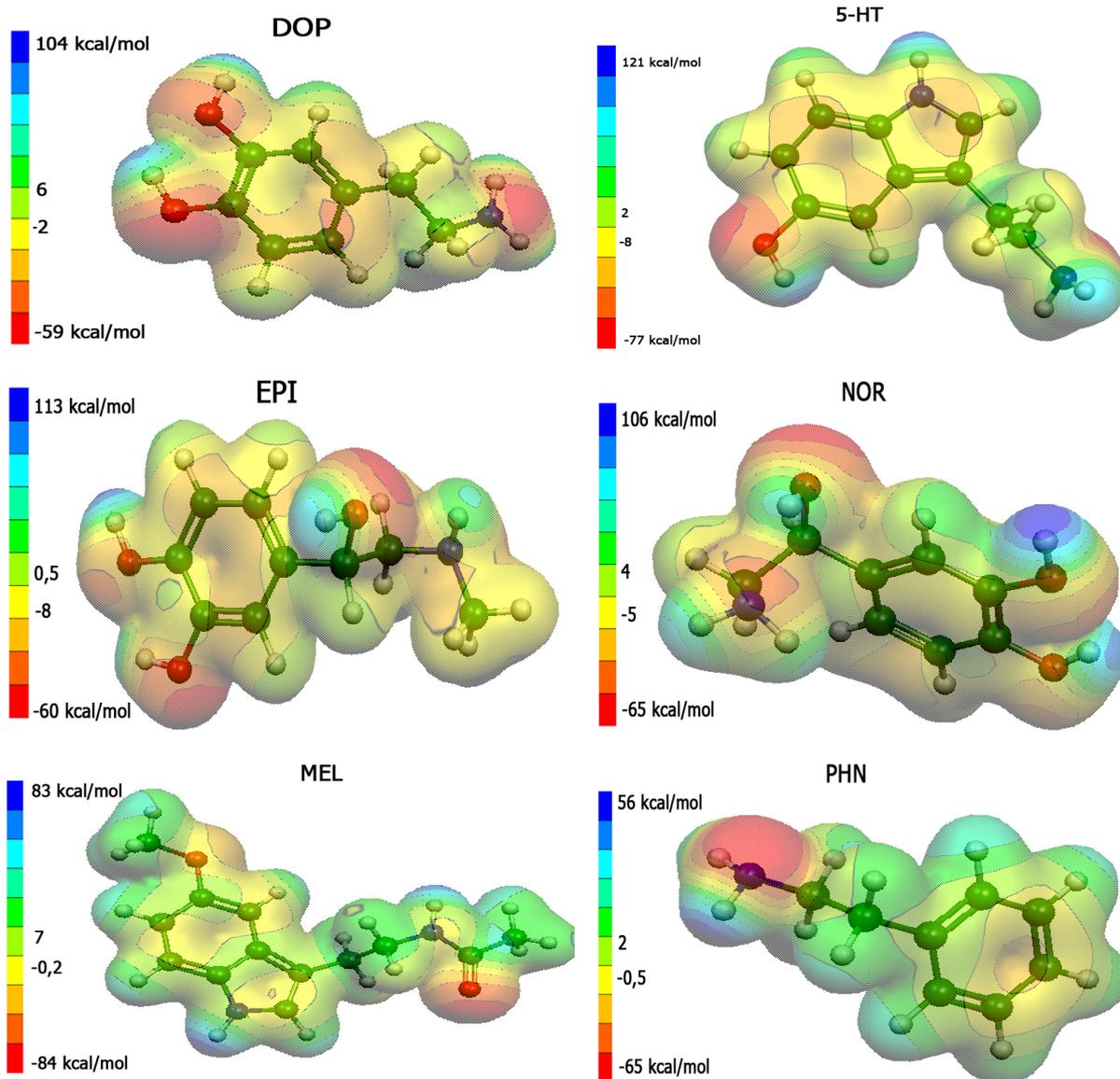


Figura 36. MSEPs dos NTs - B3LYP/6-31+G(d,p) valores expressos em kcal/mol.

As moléculas destes NTs têm considerável quantidade de regiões de alta densidade eletrônica, podendo então interagir com proteínas, em regiões de baixa densidade eletrônica, ou com resíduos carregados positivamente.

4.1.3 AChEIs

Para avaliar o comportamento estrutural e eletrônico das AChEIs foram realizadas otimizações de geometria no nível DFT B3LYP/6-31+G(d,p) para as AChEIs: DNP, DMT, THA, DCV, MTR, SAR, RIV, PHY, PHE, GNT e HUP. Assim como no vácuo, foram observadas as propriedades estruturais, espaciais e eletrônicas das AChEIs em meio solvatado, utilizando método de solvente implícito CPCM. A isodensidade utilizada para renderizar os orbitais de fronteira HOMO e LUMO foi de $\rho=0,03 \text{ e/bohr}^3$.

As AChEIs aqui estudadas estão divididas por classes, como mostrado na Tabela 3. De forma geral, observa-se que os ligantes estudados, se comportam de forma similar dentro das classes a que pertencem. O perfil de cada uma das classes será discutido a seguir.

4.1.3.1 Acridinas

As acridinas THA e DMT são potentes inibidores da AChE. A THA foi o primeiro fármaco aprovado para o tratamento da DA e ainda hoje é molécula de referência no desenvolvimento de novas AChEIs.⁵⁶

Como mostrado na Figura 37, os orbitais de fronteira da THA encontra-se resolvido sob o sistema aromático da molécula e o grupo amino. Regiões de maior interação entre o ligante e a AChE.

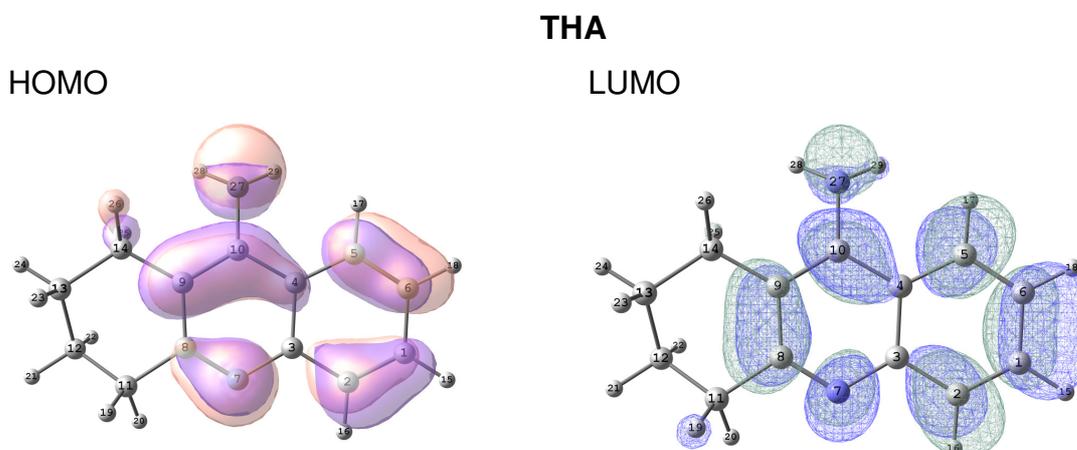


Figura 37. Orbitais HOMO e LUMO da THA. Nível de cálculo: B3LYP/6-31+G(d,p).

O DMT, ou bis(7)-tacrina, é uma AChEI desenvolvida a partir da estrutura da THA. É a molécula de maior tamanho e volume estudado neste trabalho.¹⁷⁴ Os dois orbitais de fronteira HOMO e LUMO, estão localizados nas duas unidades de THA que a compõem, principalmente nas regiões de alta densidade eletrônica da molécula e sob as regiõesceptoras e doadoras de hidrogênio. Isto indica que o DMT deve interagir com outras moléculas principalmente nestes pontos.

4.1.3.2 Alcalóides

Os alcalóides GNT e HUP são AChEIs provenientes de ervas e, a princípio, foram estudadas para outros fins, que não o tratamento da DA.¹⁷⁵

Como podem ser observados na Figura 38, os orbitais HOMO e LUMO da GNT estão ambos localizados nas regiões de alta densidade eletrônica da molécula, assim como foi observado para a HUP. Principalmente sobre os heteroátomos e os sistemas aromáticos destas moléculas, o que permite explicar as interações entre estas AChEIs e a AChE, que ocorrem por meio de interações eletrostáticas tipo ligação de hidrogênio e interações do tipo π -stacking.¹⁰⁴

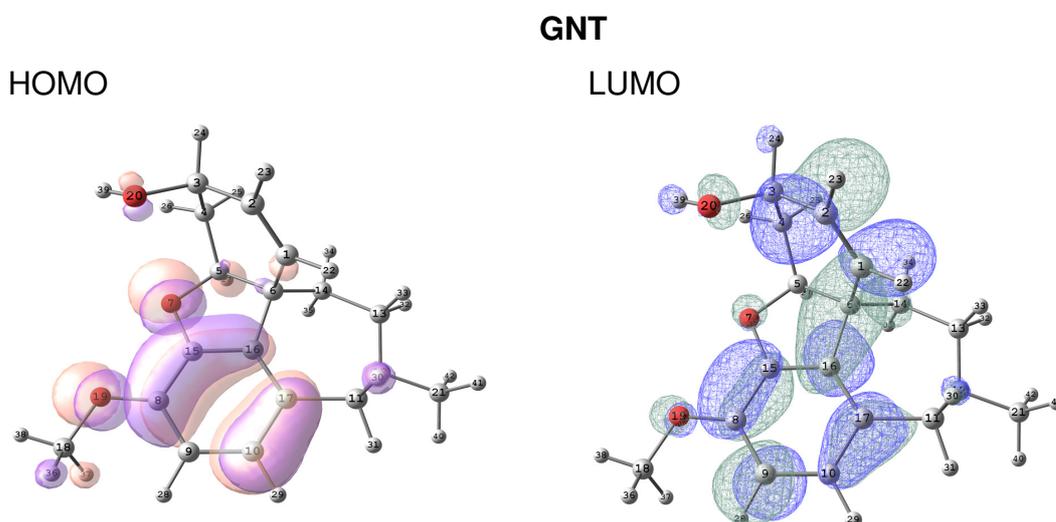


Figura 38. Orbitais HOMO e LUMO do GNT. Nível de cálculo: B3LYP/6-31+G(d,p).

4.1.3.3 Carbamatos

A RIV e o PHE são carbamatos derivados da PHY por modificações moleculares. Estes carbamatos, AChEIs, possuem um número maior de heteroátomos aceptores de hidrogênio (oxigênios e nitrogênios) que doadores em sua estrutura. Como mostrado na Figura 39, os orbitais de fronteira da RIV estão distribuídos em boa parte da molécula, acentuadamente no anel aromático e no grupo carbamato, o que sugere que esta AChEI interage com os resíduos do GORGE por meio de interações eletrostáticas e do tipo π - π entre elétrons do seu sistemas aromáticos e dos resíduos aromáticos da enzima.

A localização dos orbitais dos demais carbamatos aqui estudados, PHE e PHY, segue a mesma tendência da RIV. O HOMO da PHY está distribuído pelo anel benzênico, a junção dos anéis tetraidropiroles e nos heteroátomos da molécula. O orbital LUMO está localizado sob anel benzênico. O orbital HOMO da PHE está definido na parte trimetil-benzil-ditetraidropirol da molécula e o LUMO sob o grupo benzilcarbamato. Isto indica que estas AChEIs podem interagir com distintos resíduos do sítio ativo da AChE.

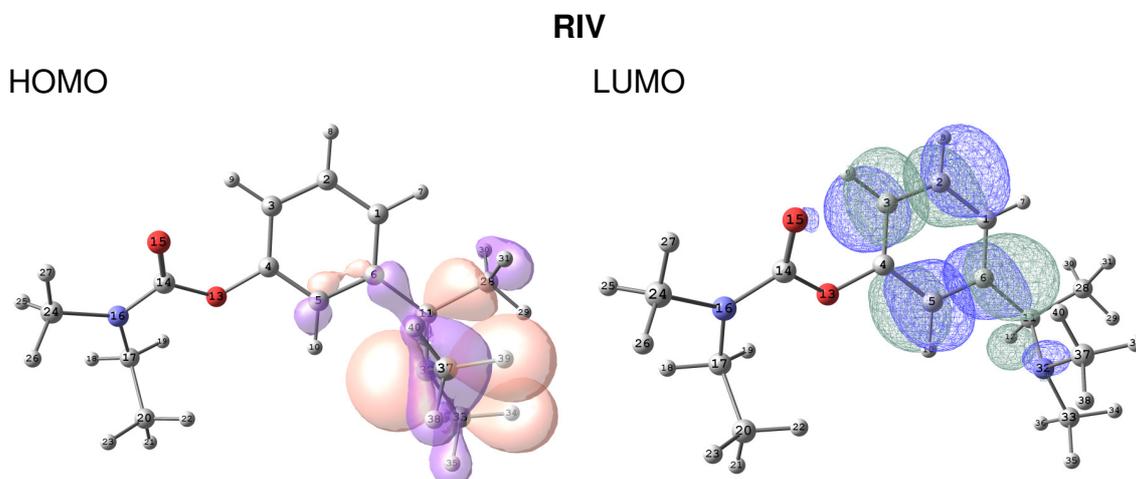


Figura 39. Orbitais HOMO e LUMO da RIV. Nível de cálculo: B3LYP/6-31+G(d,p).

4.1.3.4 Organofosforados

O MTR é uma pró-droga e sua molécula ativa DCV são organofosforados com reconhecida ação inibidora sobre a AChE, já o SAR é um gás utilizado como arma química e age bloqueando irreversivelmente a enzima.

Os organofosforados DCV, MTR e SAR apresentam seus orbitais de fronteira HOMO e LUMO distribuídos principalmente nas regiões de mais alta densidade eletrônica destas AChEIs, mais especificamente sobre os átomos mais eletronegativos (Cl e O), como mostra a Figura 40, os átomos de cloro e oxigênio concentram individualmente a maior participação do HOMO e do LUMO.

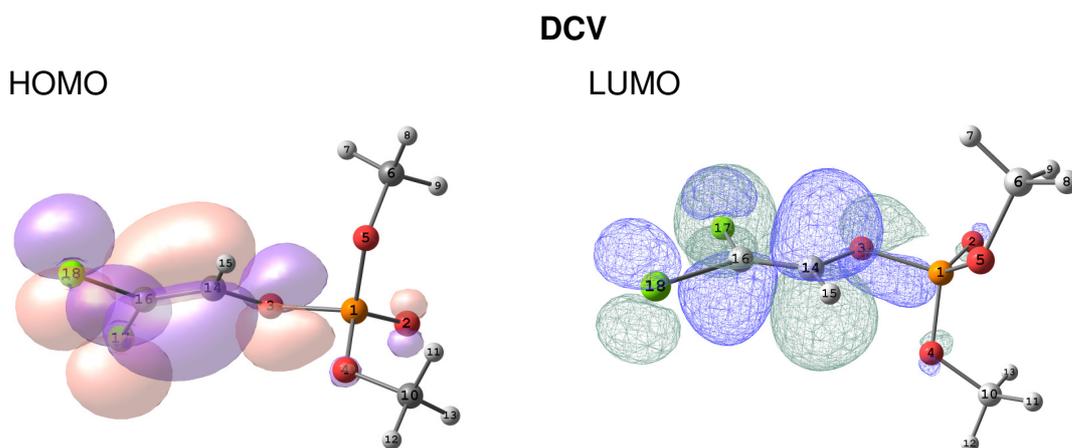


Figura 40. Orbitais HOMO e LUMO do DCV. Nível de cálculo: B3LYP/6-31+G(d,p).

4.1.3.5 Piperidinas

A piperidina DNP foi a segunda droga aprovada pelo FDA para o tratamento do mal de Alzheimer. Sua estrutura é dividida em três grupos, um dimetoxindanona, uma piperidina e uma benzila. O orbital de fronteira HOMO, Figura 41 está localizado sob a piperidina, e o orbital LUMO encontra-se distribuído por toda dimetoxindanona.

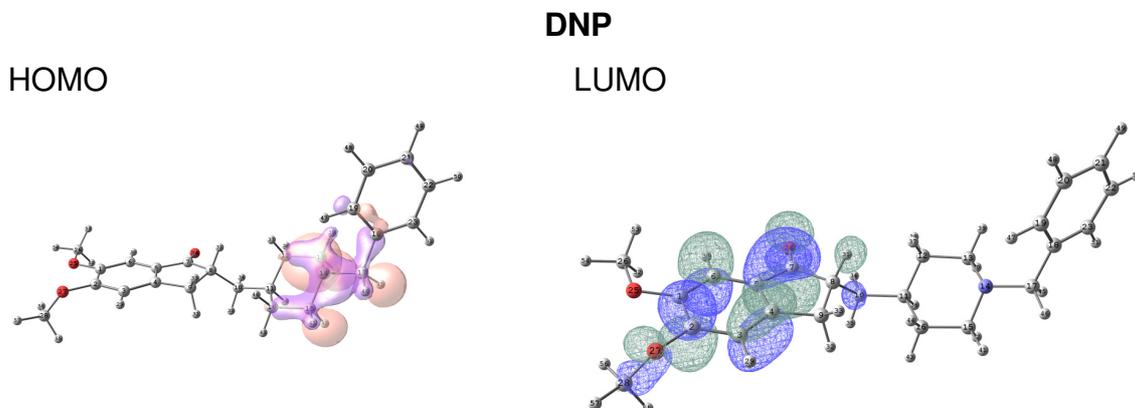


Figura 41. Orbitais HOMO e LUMO do DNP. Nível de cálculo: B3LYP/6-31+G(d,p).

Os valores da energia dos orbitais de fronteira HOMO, HOMO-1, LUMO e LUMO+1, calculados tanto no vácuo (linhas em tons alaranjados) quanto em meio solvatado (linhas em tons azulados) são comparados na Figura 42. De maneira geral, comparando o valor da energia dos orbitais nos dois meios, percebe-se que o solvente não tem efeito significativo na distribuição destes orbitais. Observa-se um suave aumento nos valores destas energias, e conseqüentemente uma pequena diminuição do GAP (LUMO-HOMO).

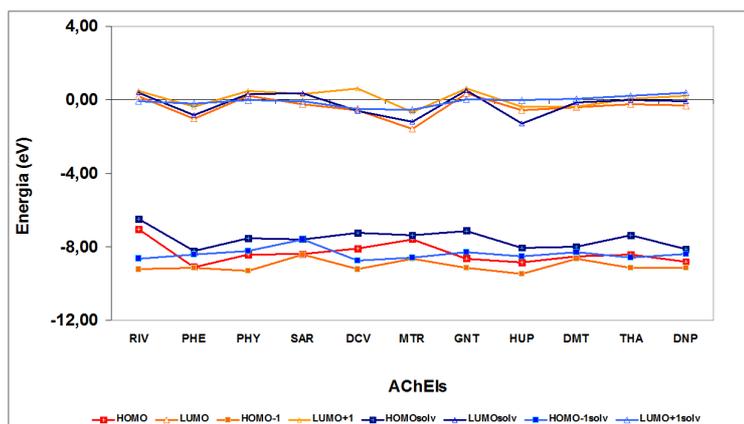


Figura 42. Comportamento da energia dos orbitais HOMO, HOMO-1, LUMO e LUMO+1 das AChEIs - B3LYP/6-31+G(d,p) e - B3LYP/6-31+G(d,p)/CPCM.

A presença de solvente eleva o valor do momento dipolo de todas as AChEIs estudadas, como mostra a Figura 43, de uma forma mais acentuada os valores da HUP, THA e DNP. Estas AChEIs possuem átomos de N e O especialmente disponíveis para realizar interações via ligação de hidrogênio com as moléculas de água do solvente. A presença de um grupo carbonila RC=O (DNP, HUP) e amina primária (THA e HUP) potencializam a acentuada polarização destas moléculas na presença do solvente.

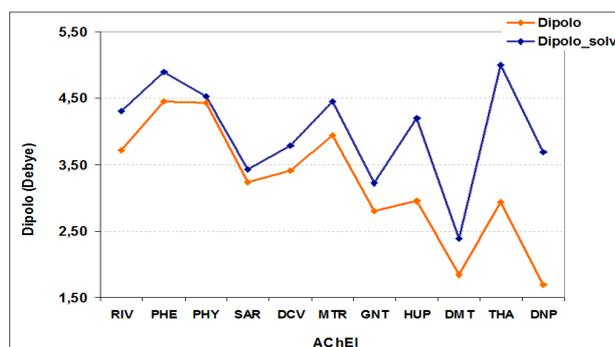


Figura 43. Comportamento do dipolo no vácuo e em meio solvatado, AChEIs - B3LYP/6-31+G(d,p) e - B3LYP/6-31+G(d,p)/CPCM.

4.1.3.6 MSEP das AChEIs

De forma geral, observa-se que os MSEPs das AChEIs aqui estudadas apresentam regiões pontuais com grande densidade eletrônica, principalmente sobre os heteroátomos e os anéis benzênico. Porém, observa-se uma maior quantidade de regiões com baixa densidade eletrônica (regiões mais ácidas) distribuída em pontos distintos das moléculas, como pode ser observado no mapa da PHY e do DNP.¹⁷⁵

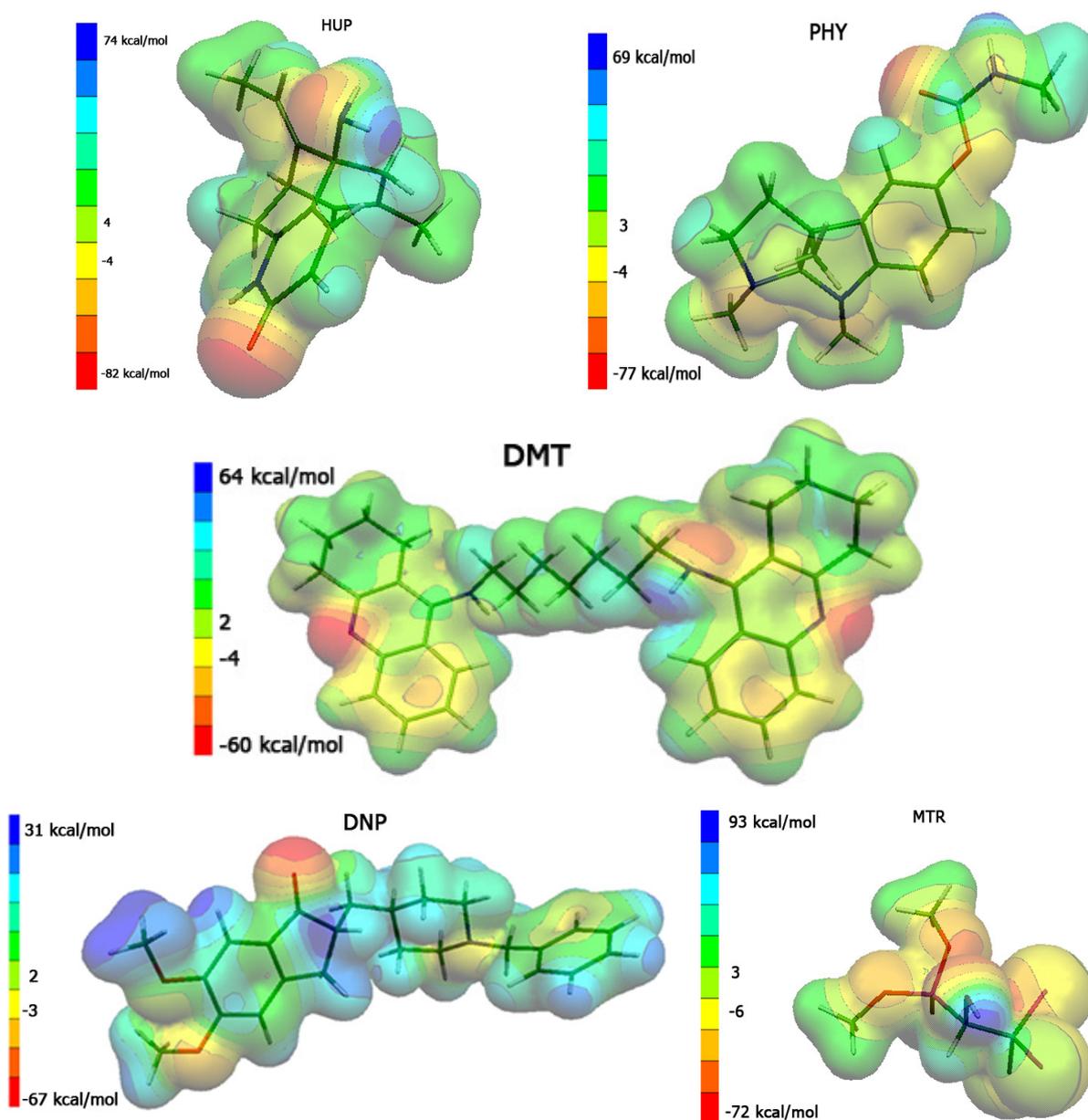


Figura 44. MSEPs das AChEIs - B3LYP/6-31+G(d,p), valores expressos em kcal/mol.

4.1.4 MAOIs

Os inibidores da MAO são moléculas de grande interesse bioquímico. São utilizadas no tratamento do ED. Alguns estudos indicam que algumas destas drogas podem também atuar em outros alvos enzimáticos como a AChE, inibindo-a com menos eficiência que uma AChEI. Estas drogas podem aumentar o poder inibitório de algumas AChEIs quando associadas a elas no tratamento para DA. Como exemplo tem-se a THA que quando associada à MOC tem seu poder inibitório sobre a AChE aumentado acentuadamente.¹⁶⁶ O estudo de estrutura eletrônica das MAOIs é essencial para o entendimento de como estas moléculas são reconhecidas e interagem com a MAO e a AChE.

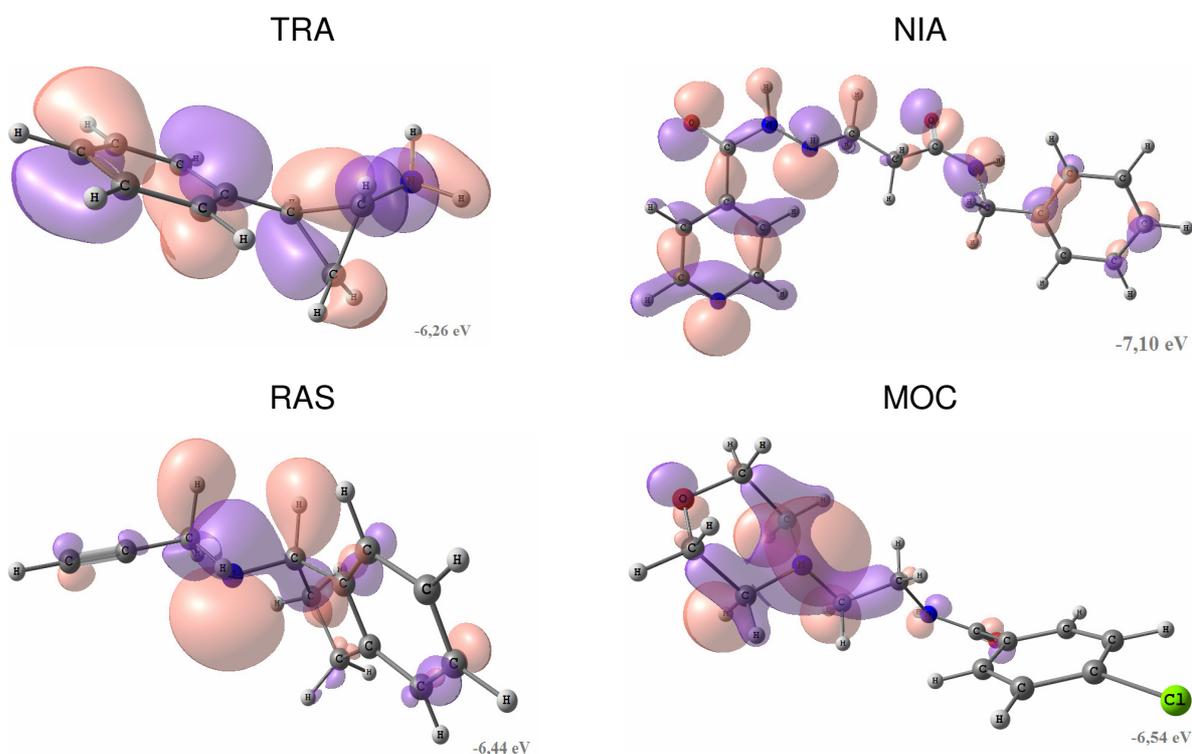


Figura 45. Energia dos orbitais HOMO de algumas MAOIs - B3LYP/6-31+G(d,p).

De maneira geral, todas as MAOIs estudadas neste trabalho apresentam semelhanças na distribuição do orbital de fronteira HOMO, Figura 45. O orbital HOMO está distribuído por toda a molécula, exceto para a MOC, que tem o HOMO concentrado na região dos heteroátomos N e O. A isodensidade utilizada para renderizar os orbitais de fronteira HOMO e LUMO foi de $\rho=0,03 \text{ e/bohr}^3$.

O orbital de fronteira LUMO, também está distribuído por toda a molécula, exceto para o MOC que tem esse orbital sob em regiões onde o HOMO não apresenta contribuição, Figura 46.

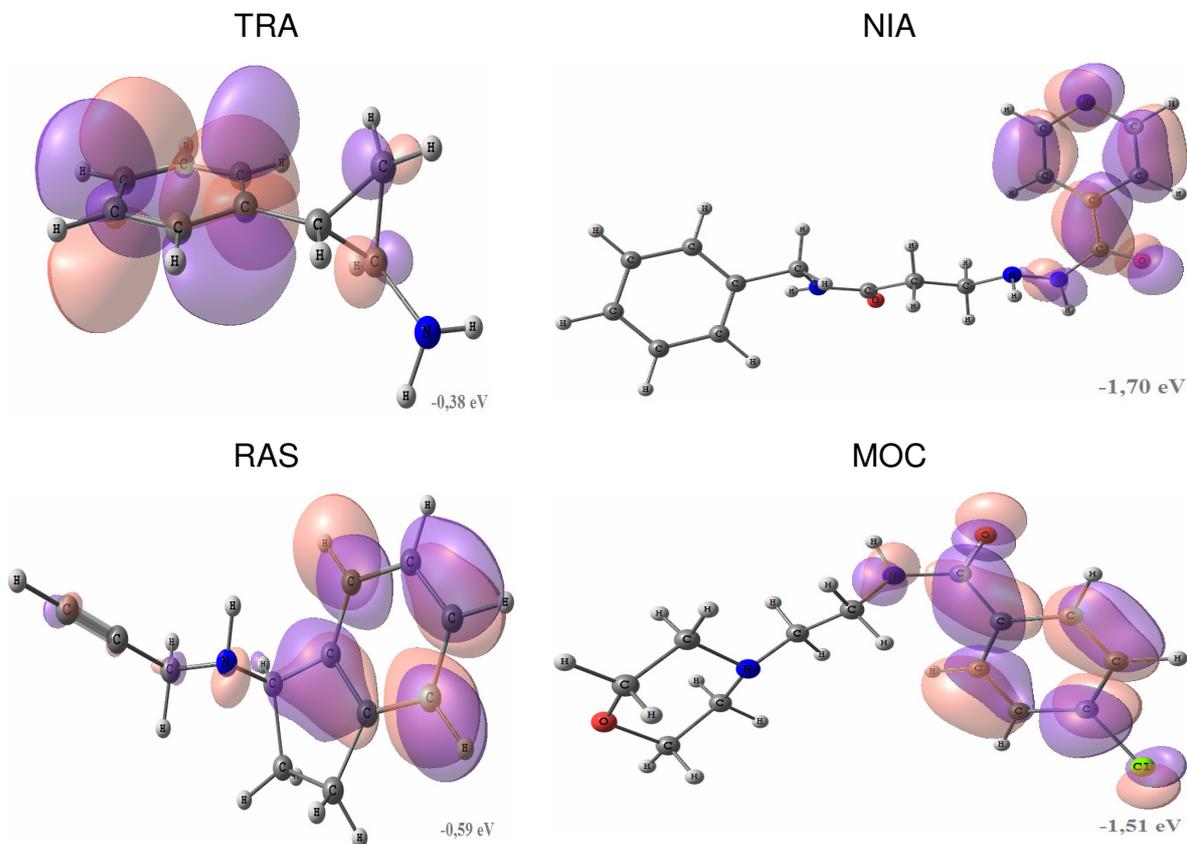


Figura 46. Energia dos orbitais LUMO de algumas MAOIs - B3LYP/6-31+G(d,p).

A presença de solvente não parece afetar acentuadamente a estrutura eletrônica das MAOIs, como pode ser observado na Figura 47, o valor das energias dos orbitais de fronteira calculados em meio solvatado (HOMO_{solv}, HOMO-1_{solv}, LUMO_{solv} e LUMO+1_{solv}) sofrem pouca variação quando comparados com os valores obtidos das energias (HOMO, HOMO-1, LUMO e LUMO+1) quando a molécula está no vácuo.

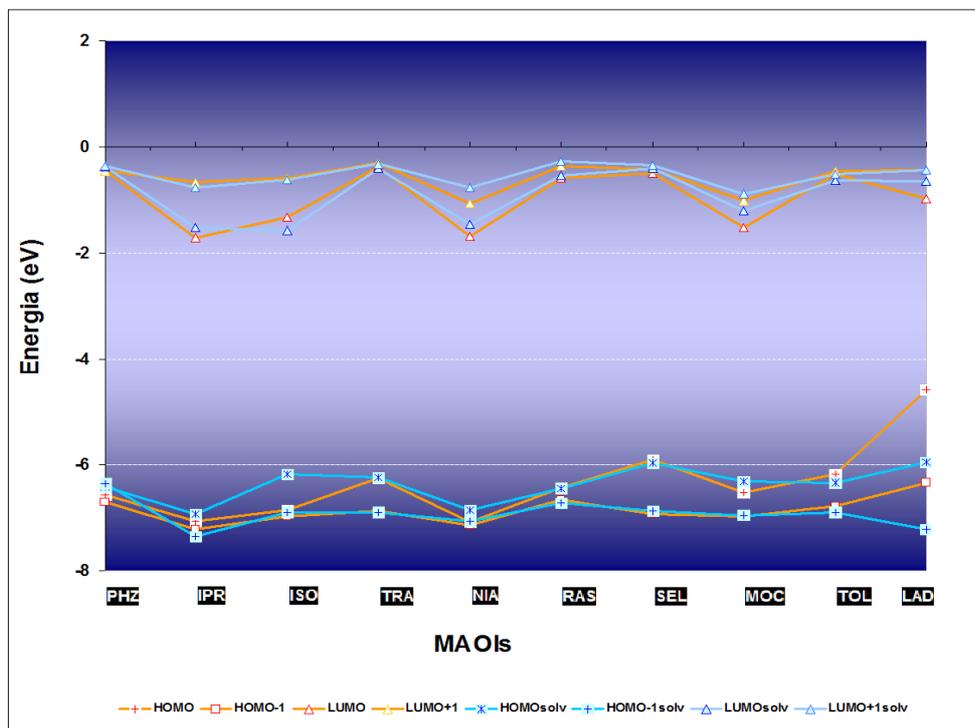


Figura 47. Comportamento da energia dos orbitais HOMO, HOMO-1, LUMO e LUMO+, MAOs - B3LYP/6-31+G(d,p) e - B3LYP/6-31+G(d,p)/CPCM.

As regiões de mais alta densidade eletrônica das MAOs, Figura 48, estão localizadas sob os oxigênios, O e N, principalmente quando estes são aceptores de hidrogênio. Isto sugere que nestas regiões podem ocorrer interações do tipo ligação de hidrogênio com os resíduos de reconhecimento molecular tanto da MAO quanto da AChE ou mesmo ligações covalentes com a hidroxila do Ser200, formando um éster estável como é o caso da RAS.

As regiões de baixa densidade eletrônica estão localizadas sobre os doadores de hidrogênio, isto pode indicar uma interação com regiões de alta densidade eletrônica dos sítios ativos das enzimas AChE, MAO-A e MAO-B

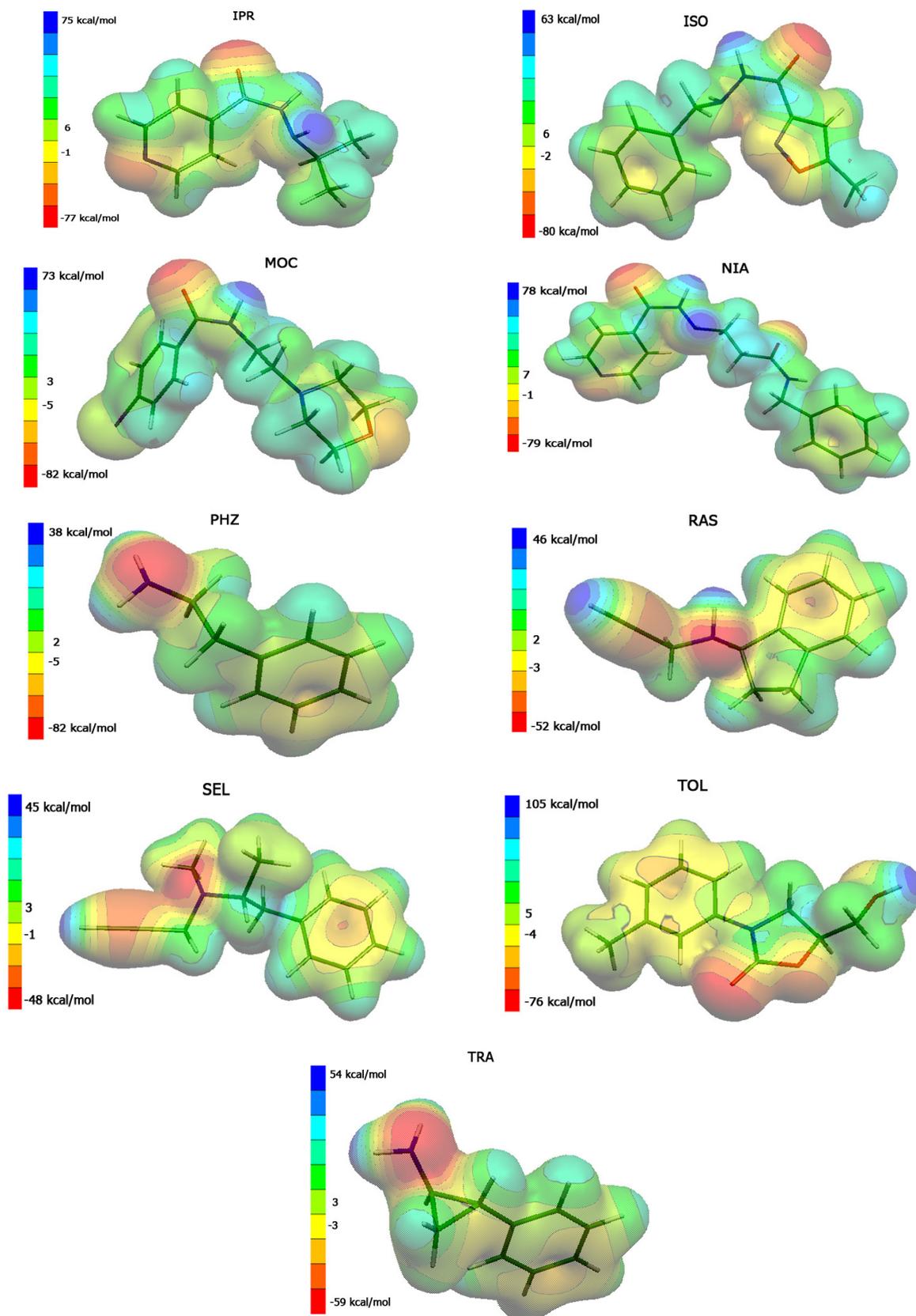


Figura 48. MSEPs das MAOIs - B3LYP/6-31+G(d,p), valores expressos em kcal/mol.

A maioria das MAOIs estudadas neste trabalho possui na sua estrutura, heteroátomos N e O, com exceção da SEL, RAS, PHZ e TRA, que apenas possuem N, Figura 49. Estas quatro MAOIS são as que apresentam menor valor do momento de dipolo, onde seus valores não ultrapassam 2 Debyes para os cálculos no vácuo. As MAOIs TOL, IPR e NIA possuem mais grupos OH e NH em suas estruturas que outras MAOIS, isto ocasiona o valor elevado do momento dipolar destas moléculas. A presença de solvente eleva o valor do momento dipolo de todas as MAOIs, de uma forma mais acentuada os valores da IPR, NIA e TOL.

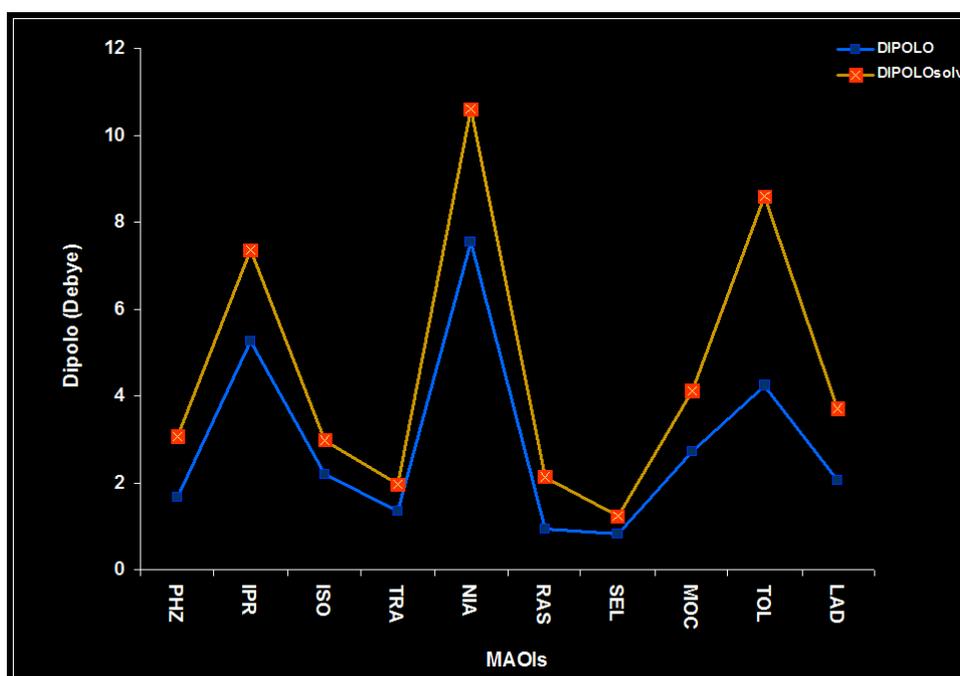


Figura 49. Valores do momento de dipolo das MAOIs - B3LYP/6-31+G(d,p) e B3LYP/6-31+G(d,p)/CPCM.

4.2 Análise dos Componentes Principais

Para análise das componentes principais das propriedades dos sistemas MAOIs, AChEIs e NTs foram realizadas otimizações de geometria no nível DFT B3LYP/6-31+G(d,p) de todas as moléculas estudadas neste trabalho. Foram avaliados os sistemas em separados e em conjunto. A ACh foi a molécula escolhida para confrontar as outras moléculas nesta análise PCA por ser o substrato natural da AChE. Esta escolha foi realizada com foco na busca da correlação do reconhecimento molecular e inibição da AChE pelas AChEIs e MAOIs.

As Tabelas 7, 9 e 11 mostram respectivamente as propriedades obtidas por meio dos estudos de estrutura eletrônica das AChEIs, das MAOIs e dos NTs utilizadas nesta análise de PCA.

4.2.1 NTS

Foram realizadas duas análises PCA para definir quais propriedades têm maior peso na composição química e estrutural dos neurotransmissores estudados. Esta análise é importante para compreender como os NTs se relacionam.

A primeira PCA foi feita com todas as 20 propriedades constantes da Tabela 7 e o conjunto dos 7 NTs, e mostra que 93% das informações do conjunto dos 7 NTs e 20 propriedades (Tabela 8) podem ser representadas por 3 componentes principais.

É válido afirmar que as propriedades observadas e traçadas no gráfico de escore PC1 x PC2 x PC3, representam em até 93% as principais propriedades que caracterizam essas moléculas e as correlacionam com suas funções: neuromediadores.

Tabela 7. Propriedades dos NTs calculadas com método DFT B3LYP/6-31+G(d,p).

NTs	ACh	DOP	EPI	MEL	NOR	PHN	5-HT
HOMO (eV)	-10,94	-5,81	-5,80	-5,43	-5,91	-6,60	-5,54
LUMO (eV)	-4,09	-0,42	-0,53	-0,66	-0,40	-0,37	-0,09
GAP (eV)	6,85	5,39	5,28	4,47	5,51	6,23	5,48
Volume (Å³)	188	179	210	271	188	161	207
Tamanho (Å)	9,033	9,250	10,091	11,936	7,964	8,187	8,809
H-H (Å)	1,786	3,114	3,110	7,499	3,114	1,637	6,955
Dipolo (Db)	17,88	2,89	2,90	2,90	2,44	1,33	1,30
Carga do H⁺	0,163	0,454	0,385	0,358	0,382	0,360	0,413
Carga Het.	-0,572	-1,330	-0,613	-0,736	-0,692	-1,055	-1,074
HOMO-1 (eV)	-11,98	-6,08	-6,23	-5,81	-6,75	-6,78	-5,81
LUMO+1 (eV)	-3,44	-0,38	-0,50	-0,14	-0,31	-0,36	-0,22
PSA	26,3	66,5	72,7	54,12	86,7	26,02	62,04
logP	-1,35	0,17	-0,68	0,84	-0,98	1,43	1,01
H_{rec}	2	3	4	2	4	1	3
H_{don}	0	3	4	2	4	1	2
Sist. Aromático	0	1	1	2	1	1	2
Graus de liberdade	4	2	3	5	2	2	2
dN-O (Å)	3,850	7,400	2,880	2,280	2,740	0	5,510
dN-O=C (Å)	5,590	0	7,000	6,300	6,580	0	0
MM	146,27	153,18	183,20	232,28	169,18	121,18	176,22

Tabela 8. Variâncias acumuladas considerando 7 NTs e 20 propriedades.

Nível de Cálculo	Variância Acumulada PC1 (%)	Variância Acumulada PC2 (%)	Variância Acumulada PC3 (%)
B3LYP/6-31+G(d,p)	51	79	93

A segunda PCA realizada foi feita com o objetivo de determinar de forma sistemática as componentes principais do sistema NTs. Todas as combinações possíveis das 20 propriedades, Tabela 7, foram realizadas para todos os NTs.

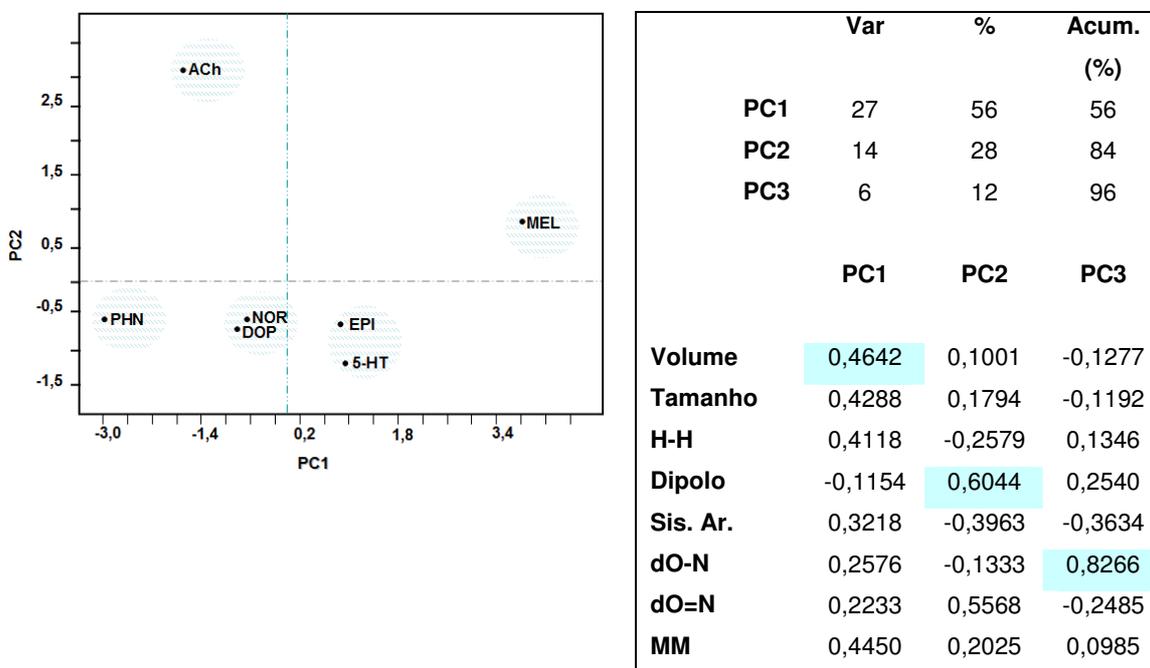


Figura 50. Gráfico dos escores PC1 versus PC2 no nível B3LYP/6-31+G(d,p) para NTs e 8 propriedades.

A Figura 50 mostra a PC1 e PC2 das NTs. Reduzindo o número de variáveis para 8 (descritas na Figura 8, porém mantendo o espaço amostral de 7 objetos (moléculas), observa-se que duas componentes principais representam até 84% das informações que caracterizam estas moléculas como sendo neurotransmissores. Os NTs EPI e 5-HT, NOR e DOP, ACh, PHN, MEL formam distintos grupos como mostrado nas PC1 e PC2 (Figura 50), as propriedades volume e dipolo têm maior peso nestas PCs.

Os elementos de cada um dos os grupos formados, mostram semelhanças entre si, principalmente estrutural. Por exemplo, o grupo NOR-DOP variam apenas a quantidade de grupos hidroxilas em suas moléculas. A ACh e a MEL aparecem muito afastadas de todos os outros NTs, o que indica que sua funcionalidade, de acordo com as oito propriedades que formam as PC1 e PC2, é diferente dos demais, ou ainda que estes NTs são substratos de outros sistemas protéicos, atuando de forma isolada e pontual dentro do SNC, com funções altamente específicas, como é extensamente conhecido.

4.2.2 ACh + AChEIs

Foram realizadas duas análises PCA para determinar quais propriedades qualificam uma droga como AChEI, bem como para tentar explicar quais propriedades destas moléculas estão relacionadas com o reconhecimento molecular frente a AChE.

Tabela 9. Propriedades das AChEIs calculadas com método DFT B3LYP/6-31+G(d,p).

<i>AChEIs</i>	RIV	PHE	PHY	SAR	DCV	MTR	GNT	HUP	DMT	THA	DNP
HOMO (eV)	-7,06	-9,09	-8,41	-8,37	-8,09	-7,61	-8,62	-8,87	-8,51	-8,42	-8,79
LUMO (eV)	0,17	-1,02	0,24	-0,26	-0,57	-1,57	0,35	-0,57	-0,43	-0,26	-0,32
GAP (eV)	7,23	8,07	8,54	8,11	7,52	6,04	8,68	7,52	8,08	8,15	7,92
Volume (Å³)	330,00	410,00	322,00	1,21	222,00	238,00	328,00	222,00	606,00	236,00	453,00
Tamanho (Å)	11,54	12,50	12,86	6,38	8,33	9,52	13,31	8,33	20,34	9,53	17,54
H-H (Å)	2,51	2,47	2,38	1,78	1,85	2,32	2,38	1,63	1,91	1,67	2,10
Dipolo (Db)	3,72	4,45	4,43	3,23	3,41	7,94	2,81	2,96	1,85	2,94	1,70
Carga do H⁺	0,16	0,18	0,24	0,20	0,10	0,24	0,21	0,15	0,19	0,20	0,16
Carga Het.	-0,37	-0,33	-0,34	-0,71	-0,32	-0,34	-0,31	-0,32	-0,29	-0,34	-0,23
HOMO-1 (eV)	-9,23	-9,13	-9,32	-8,41	-9,21	-8,66	-9,14	-9,46	-8,66	-9,16	-9,16
LUMO+1 (eV)	0,49	-0,35	0,48	0,30	0,61	-0,67	0,60	-0,37	-0,37	0,04	0,21
PSA	32,80	44,90	44,80	26,30	44,80	55,80	41,90	58,90	58,50	38,90	38,80
logP	2,86	2,99	1,94	0,45	1,66	0,80	1,39	2,60	3,88	3,13	4,14
H_{rec}	4,00	5,00	5,00	2,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	4,00
H_{don}	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	2,00	4,00	2,00	0,00
Sist. Aromático	1,00	1,00	2,00	0,00	0,00	0,00	2,00	1,00	4,00	2,00	3,00
Graus de liberdade	6,00	1,00	3,00	3,00	4,00	4,00	1,00	0,00	9,00	0,00	2,00
dN-O (Å)	5,79	5,54	5,59	0,00	0,00	0,00	5,23	0,00	0,00	0,00	10,20
dN-O=C (Å)	6,18	6,30	6,27	0,00	0,00	0,00	0,00	6,21	0,00	0,00	6,64
MM	250,34	337,42	275,35	140,00	220,98	257,41	287,35	242,32	492,71	198,26	279,50

A primeira PCA foi feita com todas as 20 propriedades constantes da Tabela 9 e o conjunto das 11 moléculas e mostra que 82% das informações do conjunto das AChEIs e das 20 propriedades (Tabela 10) podem ser representadas por 4 componentes principais.

Tabela 10. Variâncias acumuladas considerando a ACh, 11 AChEIs e 20 propriedades.

Nível de Cálculo	Variância Acumulada PC1 (%)	Variância Acumulada PC2 (%)	Variância Acumulada PC3 (%)	Variância Acumulada PC4 (%)
B3LYP/6-31+G(d,p)	39	57	72	82

A segunda PCA realizada foi feita com o intuito de determinar de forma sistemática as componentes principais do sistema ACh e AChEIs. Foram realizadas todas as combinações possíveis das 20 propriedades, para todos os sistemas estudados neste item.

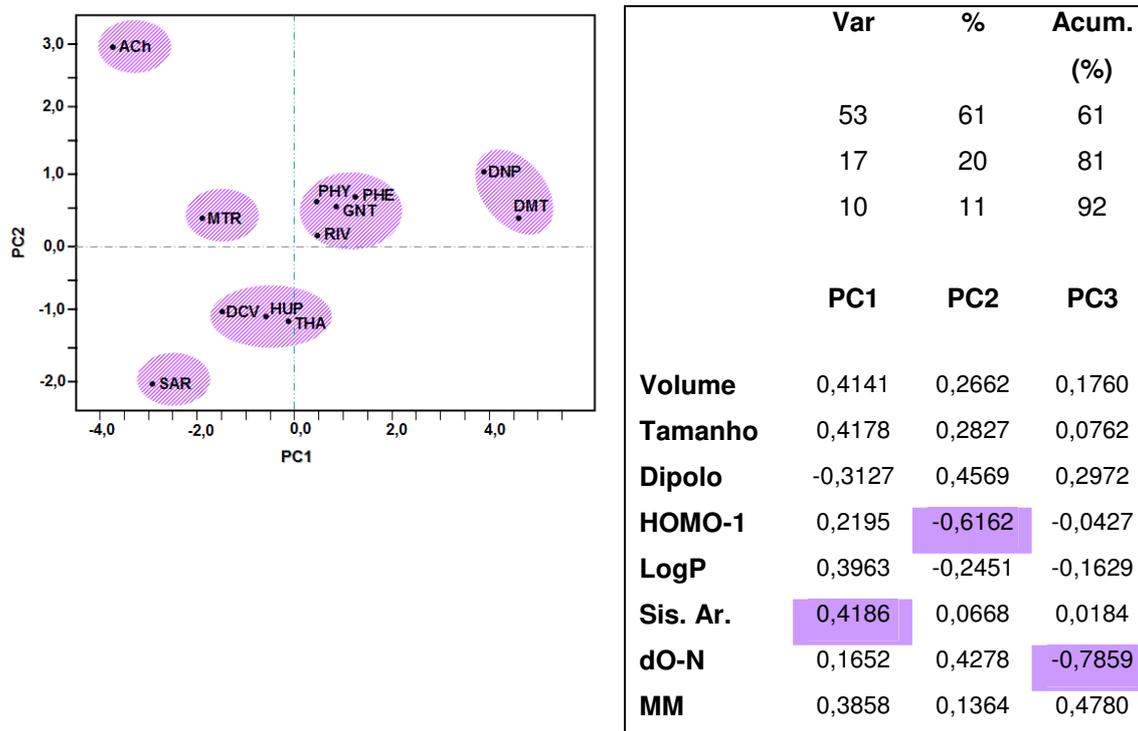


Figura 51. Gráfico dos escores PC1 versus PC2 no nível B3LYP/6-31+G(d,p) para AChEIs, ACh e 8 propriedades.

Reduzindo o número de variáveis para 8, porém mantendo o espaço amostral de 12 objetos (moléculas), observa-se que três componentes principais representam até 92% das informações que caracterizam estas moléculas como sendo AChEIs (Figura 51). As AChEIs RIV, PHY, PHE e GNT se agrupam no mesmo cluster tanto pela PC1 e quanto pela PC2. As AChEIs DCV, HUP e THA pelas mesmas PCs. As drogas DMT e DNP, formam um cluster aproximado pela PC2. Os ligantes ACh, SAR e MTR forma grupos unitários, sugerindo que estas moléculas se comportam de maneiras distintas das demais, quando interagem com a AChE. Estas três moléculas interagem com a enzima por meio de ligação covalente, porém, a ACh e o MTR acilam e deacilam a enzima, enquanto o SAR forma uma ligação covalente irreversível com a AChE.

As propriedades volume, tamanho, dipolo, MM, LogP, número de anéis aromáticos (Sist. Ar.), energia do orbital HOMO-1 e a distância entre o nitrogênio quaternário e o oxigênio não carbonílico (N-O-C) são as propriedades de maior peso para PC1 e PC2 consecutivamente. Desta forma, as interações e o reconhecimento destas AChEIs pela AChE podem ser descritas por estas propriedades.

Na PC1 todas as propriedades, excetuando o dipolo, carregam sinal positivo. Isto evidencia que esta propriedade diferencia a função de agonista e inibidor da AChE, tendo em vista os sistemas estudados. O valor do dipolo da ACh (17,88 Debye) é quase 3 vezes maior que o valor do dipolo da MTR (7,94 Debye), AChEI com maior momento dipolar, seguida da PHE (4,45 Debye).

É perceptível a separação da ACh mesmo com a alta variância desta PCA, isso mostra que apesar dos sistemas ACh e AChEIs serem altamente correlacionados, esses têm funções distintas. Como de fato ocorre, a ACh é o substrato natural da AChE e as AChEIs são moléculas antagonista da ACh, este estudo PCA evidencia isto, como pode ser observado na Figura 51.

4.2.3 MAOIS + NTs

A fim de caracterizar as MAOIs em relação aos NTs para confrontar a atividade inibitória com as similaridades funcionais de neurotransmissão foram realizadas duas análises PCA para o conjunto formado pelos sistemas MAOIs e NTs.

Tabela 11. Propriedades das MAOIs calculadas no nível DFT B3LYP/6-31+G(d,p).

<i>MAOIs</i>	PHZ	IPR	ISO	TRA	NIA	RAS	SEL	LAD	MOC	TOL
HOMO (eV)	-6,58	-7,08	-6,86	-6,26	-7,10	-6,44	-5,62	-6,20	-6,54	-6,20
LUMO (eV)	-0,47	-1,71	-1,33	-0,38	-1,70	-0,59	-0,50	-0,51	-1,51	-0,51
GAP (eV)	6,11	5,37	5,53	5,88	5,40	5,85	5,42	5,69	5,03	5,69
Volume (Å ³)	175	217	261	171	341	218	251	232,00	293	232
Tamanho (Å)	8,750	9,386	11,573	8,354	14,959	9,855	11,741	10,34	10,817	10,343
H-H (Å)	2,506	2,141	2,416	1,646	2,419	4,358	7,682	4,03	2,403	4,073
Dipolo (Debye)	1,66	5,25	2,18	1,34	7,53	0,92	0,82	4,23	2,72	4,23
Carga do H ⁺	0,370	0,357	0,328	0,341	0,369	0,304	0,231	0,37	0,375	0,366
Carga Het.	-0,775	-0,693	-0,658	-0,925	-0,739	-0,837	-0,670	-0,55	-0,805	-0,552
HOMO-1(eV)	-6,72	-7,24	-6,99	-6,89	-7,16	-6,67	-6,95	-6,79	-6,98	-6,79
LUMO+1(eV)	-0,46	-0,67	-0,60	-0,30	-1,08	0,37	-0,43	-1,02	-1,02	-0,47
PSA	38	54	67,2	26	83,1	12	3,24	49,80	41,6	49,8
logP	1,1	0,37	2,4	1,4	0,87	1,8	2,8	1,20	1,5	1,2
H _{rec}	2	3	4	1	4	1	1	3,00	3	3
H _{don}	2	2	2	1	3	1	0	1,00	1	1
Sist. Arom.	1	1	2	1	2	1	1	1,00	1	1
Graus de liberdade	3	3	4	1	7	2	4	2,00	4	2
dN-O (Å)	0	0	3,560	0	0	0	0	2,25	2,860	2,250
dN-O=C (Å)	0	5,006	4,320	0	4,220	0	0	2,30	6,020	2,300
MM (u a)	136,19	179,22	231,25	133,19	298,34	171,24	187,28	207,23	268,74	207,23

A primeira PCA foi feita com todas as 20 propriedades constantes da Tabela 11 e o conjunto das 10 MAOIs e dos 7 NTs (Tabela 7). A Tabela 12, que mostra que 87% das informações do conjunto das MAOIs, dos NTs e das 20 propriedades, podem ser representadas por 4 componentes principais.

Tabela 12. Variâncias acumuladas considerando 10 MAOIs, 7NTs e 20 propriedades.

Nível de Cálculo	Variância Acumulada PC1 (%)	Variância Acumulada PC2 (%)	Variância Acumulada PC3 (%)	Variância Acumulada PC4 (%)
B3LYP/6-31+G(d,p)	34	57	78	87

Para aumentar a precisão e determinar de forma sistemática as componentes principais desta análise foram realizadas todas as combinações possíveis das 20 propriedades, Tabelas 7 e 11, para todas as MAOIs e NTs.

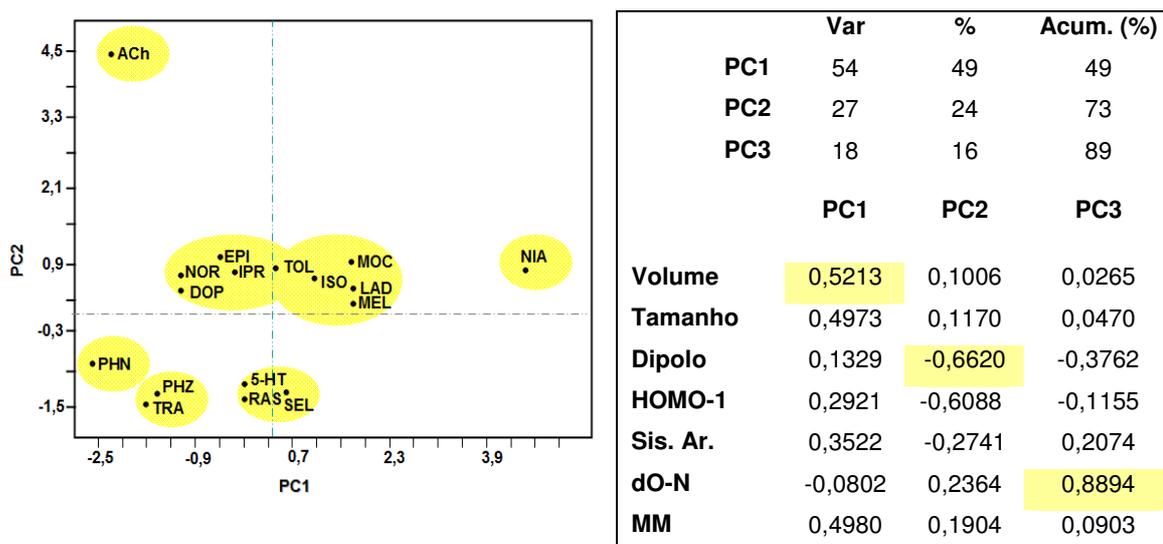


Figura 52. Gráfico dos escores PC1 versus PC2 no nível B3LYP/6-31+G(d,p) para MAOIs, NTs e 7 propriedades.

A Figura 52 mostra o gráfico de escores PC1 *versus* PC2 para moléculas que possuem reconhecimento molecular com as isoformas da MAO. Reduzindo o número de variáveis para 7, e mantendo-se o espaço amostral de 17 objetos (MAOIs e NTs) observa-se que três componentes principais representam 89% das informações que caracterizam similaridades funcionais entre estas moléculas (Figura 52).

Sabe-se que as isoformas da MAO têm como principal função a desaminação de vários neurotransmissores e monoaminas. Os NTs DOP, NOR, MEL e EPI formam um cluster com as MAOIs IPR, TOL, ISO, MOC E LAD, assim como o NT 5-HT forma outro cluster com as MAOIs RAS e SEL, todas estas moléculas tem ação conhecida sobre a MAO-A e B simultaneamente (Figura 52). Estes dois conjuntos têm seus elementos aproximados pela PC1 e pela PC2, componentes principais que têm as propriedades volume e dipolo com maior peso. O NT ACh forma um grupo afastado dos demais objetos nesta PCA o que mostra que esta molécula não tem similaridades funcionais com os outros elementos dos sistemas em estudo.

4.2.4. AChEIs + MAOIS + NTs

Para uma avaliação mais detalhada de quais propriedades das MAOIs estão relacionadas com a ação inibitória da AChE foram confrontadas propriedades de 11 drogas com ação inibitória sobre a AChE, além dos NTs, e das 10 MAOIS.^{174,175}

A primeira PCA (Tabela 13) mostra que 82% das informações, que formam um conjunto com 10 MAOIs, 11 AChEIs, 7 NTs e 20 propriedades, podem ser representadas por 5 componentes principais. Assim, é válido afirmar que as propriedades observadas e traçadas no gráfico de escore PC1 x PC2 x PC3 x PC4 x PC5, representam em até 82% as principais propriedades que caracterizam essas drogas e correlacionam suas funções: moléculas com reconhecimento molecular pela AChE.

Tabela 13. Variâncias acumuladas considerando 11 AChEIs, 10 MAOIs, 7 NTs e 20 propriedades.

Nível de Cálculo	Variância Acumulada a PC1 (%)	Variância Acumulada a PC2 (%)	Variância Acumulada a PC3 (%)	Variância Acumulada a PC4 (%)	Variância Acumulada a PC5 (%)
B3LYP/6-31+G(d,p)	25	47	64	75	82

Para aumentar a acurácia e determinar de forma sistemática as componentes principais desta análise, foram realizadas todas as combinações possíveis das 20 propriedades, Tabelas 7, 9 e 11, para todas as AChEIs, MAOIs e NTs.

Reduzindo o número de variáveis para 6 (descritas a seguir), porém mantendo o espaço amostral de 28 objetos (moléculas), observa-se até 92% das informações que caracterizam estas como sendo reconhecidas pela AChE. A Figura 53 mostra os agrupamentos formados quando todos os sistemas são estudados em uma única PCA.

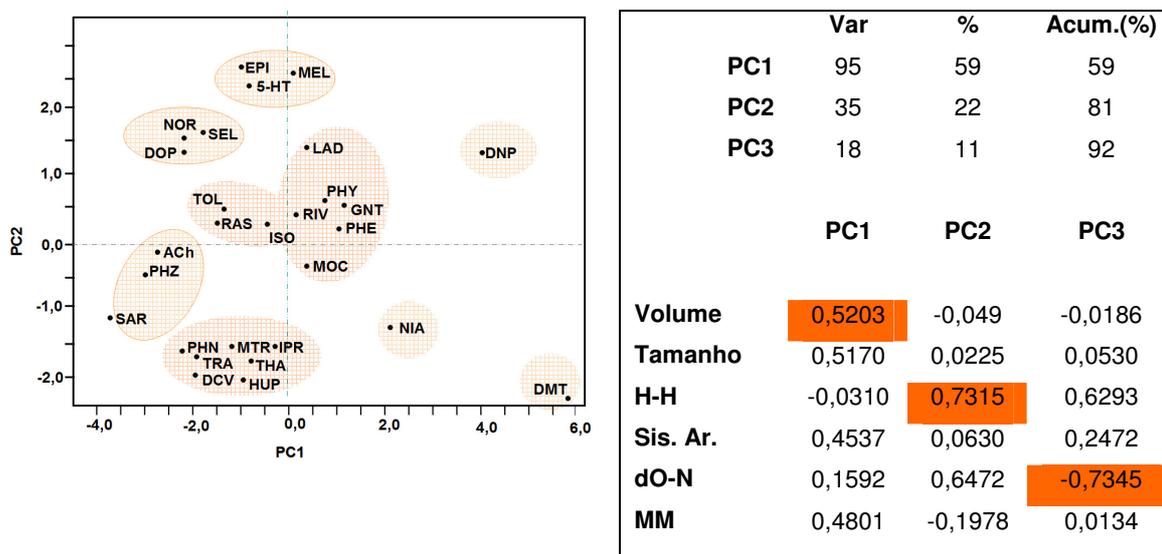


Figura 53. Gráfico dos escores PC1 versus PC2 no nível B3LYP/6-31+G(d,p) para AChEIs, MAOIs, NTs e 6 propriedades.

Todos NTs se aproximam pela PC1 (com 59% da variância), que tem o volume como propriedade de maior peso nesta PCA (Figura 53). Os NTs NOR e DOP, EPI e 5-HT formam um cluster separado dos demais, indicando que estes neurotransmissores possuem propriedades estruturais como volume, tamanho e massa molecular comuns, e por isso são NTs que podem ser reconhecidas por um mesmo sistema.

As AChEIs MTR, THA, HUP e DCV formam um cluster com as MAOIs IPR, TRA e o NT PHN, da mesma forma que as AChEIs RIV, GNT, PHE e PHY formam um aglomerado com as MAOIS MOC, ISO, RAS e TOL; neste cluster, o fármaco híbrido LAD pode ser incluído. Todas estas AChEIs e MAOIs que formam clusters entre si são aproximadas tanto pela PC1 quanto pela PC2 (com 81% da variância). Também é válido afirmar que as propriedades volume, tamanho da droga, distância entre os dois hidrogênios mais ácidos H-H, número de sistemas aromáticos, distância dN-O e a massa molecular, calculados e traçados nos gráficos de escores da Figura 53, PC1 (com 59% da variância) x PC2 (com 22% da variância) x PC3 (com 11% da variância), representam de forma satisfatória 92% da variância de

todos os conjuntos de dados mostrados nas Tabelas 7, 9 e 11. Isto mostra que estas componentes principais carregam informações importantes que correlacionam as AChEIs, as MAOIs e os NTs.

Observa-se na Figura 53, uma aproximação entre as moléculas estudadas principalmente pela PC2 que tem as propriedades H-H e número de sistemas aromático como propriedades com maior peso nesta PC. Analisando detalhadamente todos os elementos são separados pela PC1 que tem o volume e o tamanho como propriedades com maior peso na sua expressão.

4.2.5 ACh + AChEIs + MAOIs

Para refinar a busca por propriedades com relevância na função de inibição da AChE por AChEIs e MAOIs, foram realizadas duas análises PCA. Uma com todas as 20 propriedades anteriormente descritas de todos os inibidores e da ACh. Onde até 79% das informações mais relevantes para esta análise podem ser representadas por quatro componentes principais, Tabela 14.

Tabela 14. Variâncias acumuladas considerando 10 MAOIs, 11 AChEIs, ACh e 20 propriedades.

Nível de Cálculo	Variância Acumulada PC1 (%)	Variância Acumulada PC2 (%)	Variância Acumulada PC3 (%)	Variância Acumulada PC4 (%)
B3LYP/6-31+G(d,p)	29	53	69	79

O segundo estudo PCA para este conjunto de sistemas foi realizado com a redução do número de variáveis (propriedades) para 7, e mantendo o mesmo número de objetos (22 moléculas). Sem alterar o espaço amostral foi conseguido uma melhor representação das informações mais relevantes para a PCA com a redução do número de componentes principais para três e aumento da variância total para 89%.

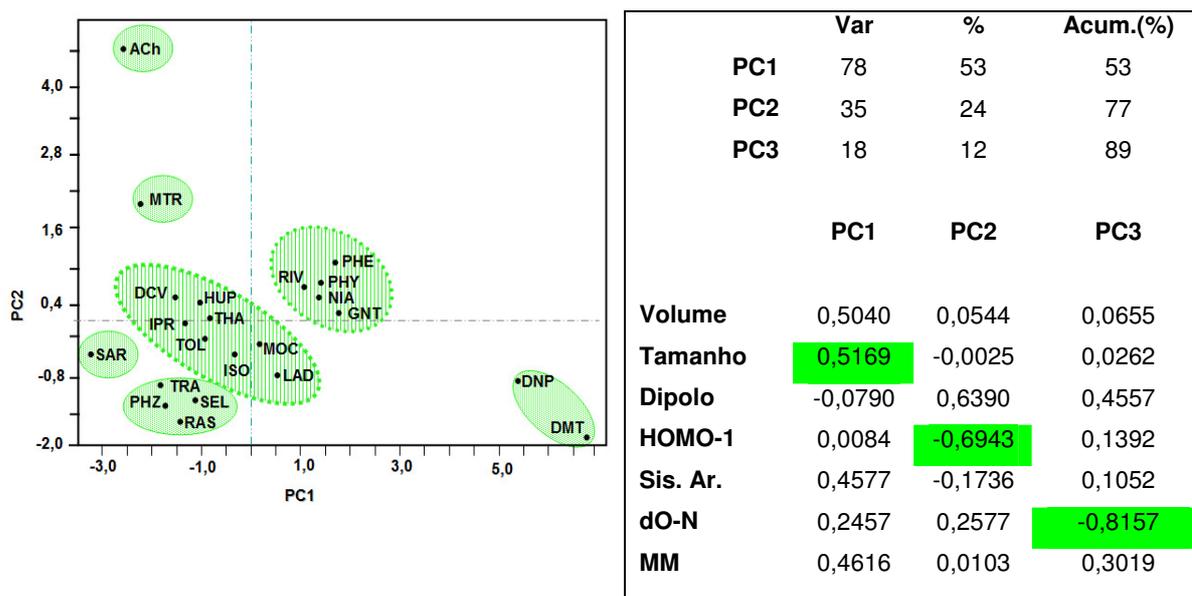


Figura 54. Gráfico dos escores PC1 versus PC2 no nível B3LYP/6-31+G(d,p) para AChEIs, MAOIs, ACh e 7 propriedades.

Como pode ser observado no gráfico dos escores PC1 versus PC2 (Figura 54), dois grupos formados tanto por AChEIs e MAOIs se aglomeram da seguinte forma: DCV-HUP-THA:IPR-TOL-ISO-MOC-LAD; RIV-PHY-PHE-GNT-NIA. Todos os elementos destes grupos se aproximam tanto pela PC1 quanto pela PC2, componentes principais que têm as propriedades: tamanho da molécula e energia do orbital HOMO-1 com maior peso na sua composição.

Também pode ser observadas a formação de cluster somente entre AChEIs e MAOIs, agregados pelas mesmas propriedades. A ACh, NT substrato natural da AChE está localizada muito distante das demais moléculas (Figura 54) influenciada pela PC2, que tem a energia do HOMO-1 e o dipolo com maiores pesos nesta componente principal.

Os gráficos dos escores PC1 versus PC2 mostram que as MAOIs IPR, TOL, ISO, MOC, LAD e NIA tendem a se aglomerar de maneira mais contínua às AChEIs DCV, THA, HUP, RIV, PHE, PHY e GNT. Isto indica que as três componentes principais representam de forma satisfatória a correlação entre estas moléculas e sua atividade como potentes inibidores da AChE.

As propriedades volume, tamanho, número de sistemas aromáticos, distância dN-O, e MM compõem as PC1, PC2 e PC3 aparecem em todos os estudos PCA realizados neste trabalho. Assim, pode-se afirmar que estas propriedades evidenciam o perfil farmacofórico das MAOIs que justifica que estas sejam classificadas também como AChEIs, embora com potencial inibitório menor que as moléculas destinadas a esta ação. Este perfil é um indicador para o desenho de novos fármacos que possam atuar como potentes AChEIs e MAOIs, tendo dupla funcionalidade.

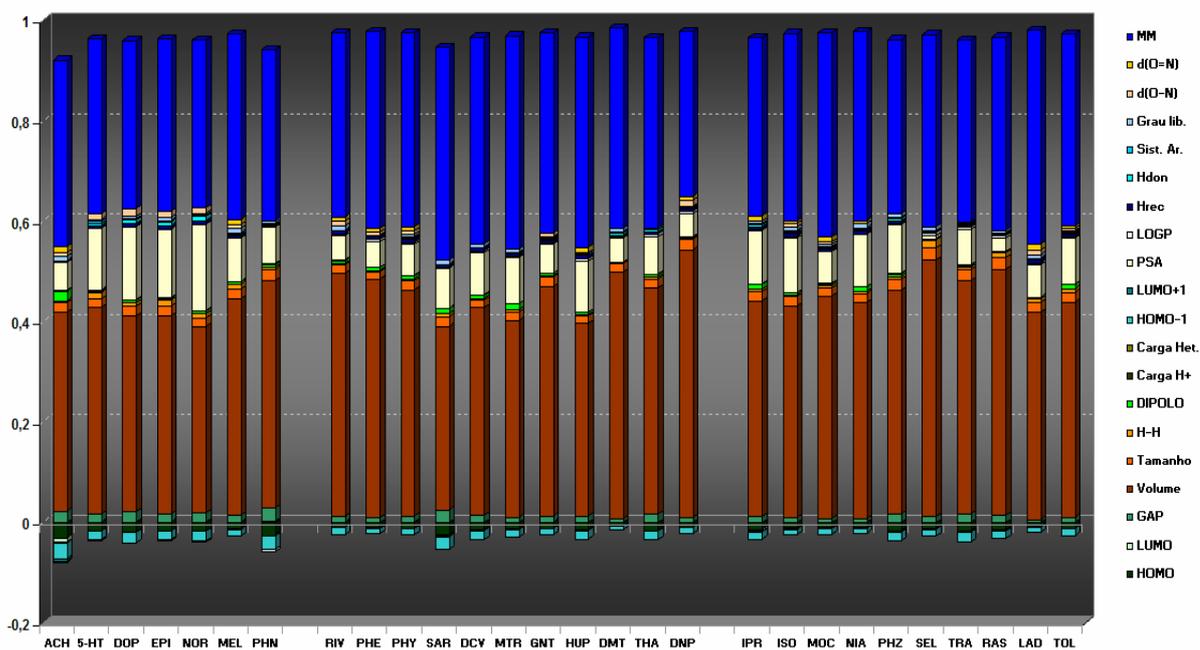


Figura 55. Gráfico dos escores PC1 versus PC2 no nível B3LYP/6-31+G(d,p) para AChEIs, MAOIs, ACh e 20 propriedades.

Além destas propriedades outras como o momento de dipolo, PSA e a distância H-H são propriedades que aportam similaridades entre as moléculas estudadas neste trabalho. Comparando as Figuras 54 e 55, observa-se que as AChEIs e MAOIs que têm perfil similar, ou que mimetizam o perfil da ACh, são as mesmas encontradas nos dois clusters formados por AChEIs-MAOIs na PCA. Principalmente as AChEIs: RIV, PHY, THA, DNP e DMT e as MAOIs: ISO, TOL, NIA e LAD.

4.3 Cálculos da energia livre de interação (ΔG_{bind}) com o método FEP

Primeiramente foram avaliadas as contribuições dos termos das energias de interação eletrostática e de van der Waals para a energia de interação entre os ligantes e o sítio ativo da AChE. Também foram avaliados os valores destas contribuições em solução aquosa. Este estudo foi realizado em função do tempo das dinâmicas MD. Os resultados destes parâmetros são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15. Termos das energias de interação eletrostáticas (e) e de van der Waals (vdW) dos sistemas proteína-ligante (E) e água-ligante (w) em função dos tempos de simulações MD. Valores expressos em kcal mol⁻¹.

Termo eletrostático									
Proteína-ligante (ΔG_{e-E})					Água-ligante (ΔG_{e-w})				
	10 ps	20 ps	50 ps	100 ps		10 ps	20 ps	50 ps	100 ps
ACh	-46,1	-43,5	-42,9	-42,2		-27,7	-28,0	-27,9	-27,8
DMT	-8,6	-7,2	-7,3	-7,6		-8,6	-8,4	-8,5	-8,4
DNP	-10,9	-10,5	-11,0	-11,4		-10,2	-9,7	-9,1	-9,4
GNT	-18,1	-14,6	-13,1	-11,3		-7,9	-7,4	-7,0	-7,1
HUP	-16,1	-13,2	-13,0	-11,4		-8,9	-9,3	-9,4	-9,3
THA	-3,0	-2,4	-1,5	-1,0		-5,5	-5,6	-5,6	-5,4
Termo van der Waals									
Proteína-ligante (ΔG_{vdW-E})					Água-ligante (ΔG_{vdW-w})				
	10 ps	20 ps	50 ps	100 ps		10 ps	20 ps	50 ps	100 ps
ACh	-26,4	-26,4	-26,2	-26,0		-16,0	-15,7	-15,8	-15,9
DMT	-77,2	-74,9	-74,4	-73,9		-43,2	-44,0	-41,7	-41,4
DNP	-52,7	-53,2	-52,6	-51,6		-35,6	-35,1	-34,8	-34,2
GNT	-37,6	-37,9	-37,8	-38,4		-25,0	-25,3	-24,6	-24,8
HUP	-31,8	-32,3	-32,2	-32,1		-21,6	-21,7	-21,9	-21,9
THA	-30,8	-31,0	-30,0	-30,8		-18,2	-18,1	-17,6	-18,2

Como podem ser observados na Tabela 15, os valores dos termos da contribuição eletrostática da energia é dependente do tempo de simulação. Desta forma, os resultados obtidos para as simulações com o tempo de 10 ps esta superestimado.

As diferenças observadas entre os intervalos de 10 a 50 ps são de $5,0 \text{ kcal mol}^{-1}$ (GNT), $4,7 \text{ kcal mol}^{-1}$ (HUP) e $3,2 \text{ kcal mol}^{-1}$ (ACh), enquanto que as variações dos valores de energia para os tempos de simulação de 50 ps a 100ps se reduzem a $1,8 \text{ kcal mol}^{-1}$ (GNT), $1,6 \text{ kcal mol}^{-1}$ (HUP) e $0,7 \text{ kcal mol}^{-1}$ (ACh). Isto posto, é razoável considerar que os valores obtidos nas simulações de 50 e 100 ps são confiáveis para uma análise comparativa. Na realidade, se espera variações menores que 2 kcal mol^{-1} para todos os ligantes.

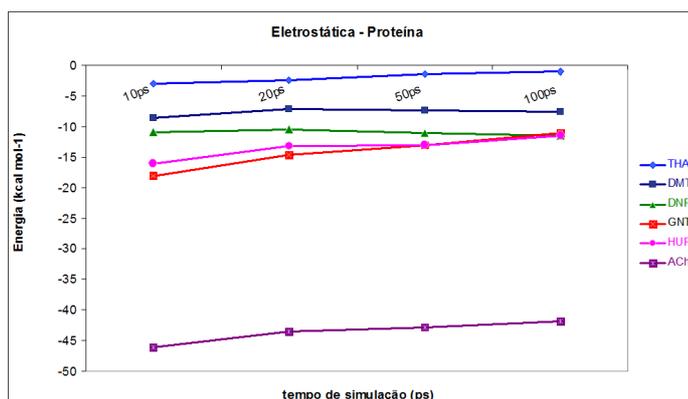


Figura 56. Dependência dos valores dos termos a contribuição eletrostática para a energia no sistema proteína-ligante em função do tempo de simulação MD realizadas com o método FEP.

O termo da contribuição proveniente das interações de van der Waals para a energia, não apresenta dependência significativa com o tempo de simulação. A maior variação observada entre os tempos de 10 e 50 ps foi de $2,8 \text{ kcal mol}^{-1}$ (DMT) enquanto que esta mudança se reduz a $0,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ (DMT) para os tempos de 50 a 100 ps de simulação, Figura 57.

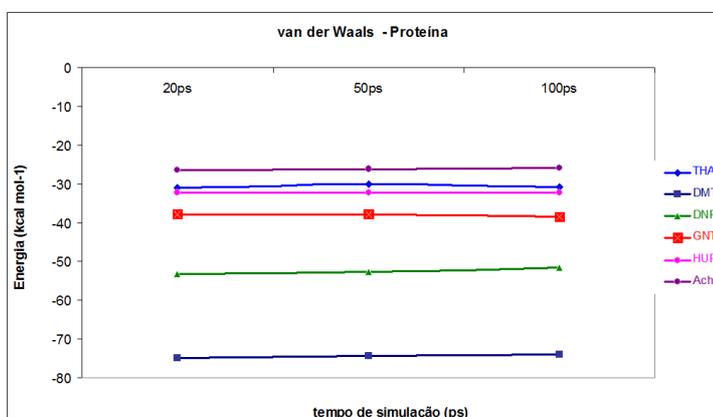


Figura 57. Dependência da energia de van der Waals para o sistema proteína-ligante em função do tempo de simulação MD realizadas com o método FEP.

Devido à alta simetria das interações do sistema água-ligante espera-se, que os termos da contribuição eletrostática e de van der Waals para energia livre de interação não seja dependente do tempo de simulação. Como mostrado na Figura 58, estes termos apresentam rápida convergência de valores para todos os ligantes em tempos de simulação MD.

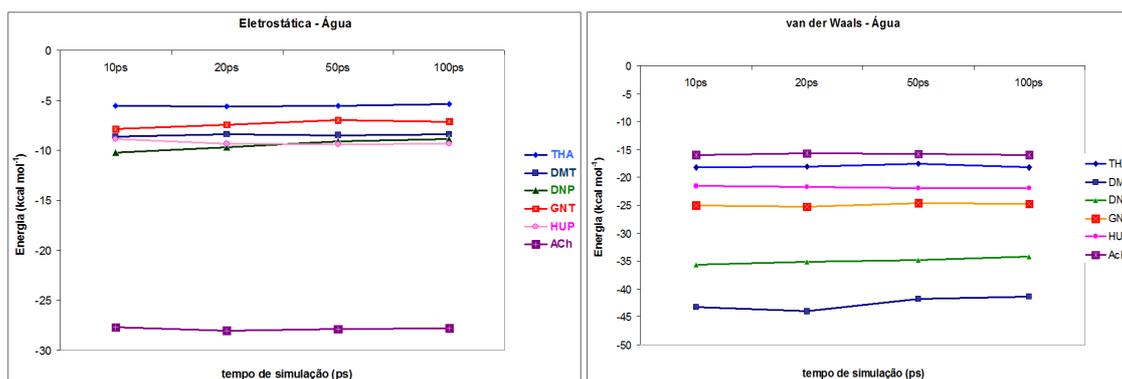


Figura 58. Dependência dos termos das energias eletrostática e de van der Waals para o sistema água-ligante em função do tempo de simulação MD realizadas com o método FEP.

Os gráficos 56, 57 e 58 revelam que a componente eletrostática da energia contribui significativamente para a interação entre a enzima e seu substrato natural, ACh, porém tem menor significância para inibidores como a THA, DMT e DNP. Por outro lado, a componente de van der Waals parece contribuir, em geral, de forma mais significativas para os inibidores da AChE que para o seu substrato natural.

A Tabela 16 traz os valores das constantes de inibição K_i e dos valores de energia livre de interação experimental ($T = 300\text{ K}$) para cada inibidor.

Tabela 16. Valores de K_i , ΔG_{bind} e IC_{50} dos inibidores da AChE.

Inibidor	K_i (nM)	ΔG_{bind} experimental (kcal mol ⁻¹)	IC_{50} (nM)
DMT	$77 \cdot 10^{-6}$ ¹⁰⁵	-17,7	0,029 ¹⁷⁶
DNP	3,0 ¹⁷⁷	-11,5	5,7 ¹⁷⁸
GNT	0,028 – 190 ¹⁷⁹	-9,2 -14,4	86 ¹⁸⁰
HUP	175 ¹⁸¹	-9,3	114 ¹⁸¹
THA	3,8 – 10 ^{177,182}	-7,4 / -10,8	333 ¹⁶⁹

O equilíbrio dinâmico das moléculas de água e da proteína durante a aniquilação dos ligantes durante as simulações MD-FEP pode ser considerado completamente convergido, em ambos os meios, depois do tempo de simulação de 100 ps, assim estes foram os valores selecionados para os cálculos. Estes cálculos foram computados por meio da Equação 104. Portanto, a ΔG_{bind} entre a AChE e suas AChEIS pode ser calculada pela soma dos valores ΔG_{elet} e ΔG_{vdW} :

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{elet}} + \Delta G_{\text{vdW}} \quad (105)$$

A Tabela 17 reporta os valores para o cálculo da energia livre de interação das simulações MD para o tempo de 100 ps. Os termos $\Delta G_{\text{e-w}}$ e $\Delta G_{\text{vdW-w}}$ são, respectivamente, as contribuições das interações eletrostáticas e de van der Waals em água, para a energia livre de interação. $\Delta G_{\text{e-E}}$ e $\Delta G_{\text{vdW-E}}$ são as contribuições dos termos eletrostáticos e de van der Waals em meio enzimático, para a energia livre de interação. Os termos ΔG_{elet} e ΔG_{vdW} corresponde a diferença entre os valores das contribuições das interações eletrostáticas e de van der Waals dos ligantes em água e na enzima.

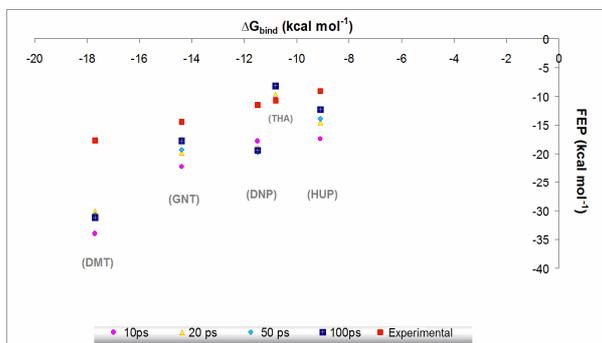
Tabela 17. Valores dos termos eletrostáticos e de van der Waals da energia para os sistemas proteína-ligante e água-ligante. Valores em kcal mol^{-1} .

Ligante	W(água)		E(enzima)		ΔG		ΔG_{bind}	
	$\Delta G_{\text{e-w}}$	$\Delta G_{\text{vdW-w}}$	$\Delta G_{\text{e-E}}$	$\Delta G_{\text{vdW-E}}$	ΔG_{elect}	ΔG_{vdW}	ΔG_{bind}	ΔG_{bind}^*
ACh	-27,8	-15,9	-42,2	-26,0	-14,4	-10,1	-24,5	-
DMT	-8,4	-41,9	-7,6	-73,9	0,8	-32,0	-31,2	-17,7
DNP	-9,4	-34,2	-11,4	-51,6	-2,0	-17,2	-19,4	-11,5
GNT	-7,1	-24,8	-11,3	38,4	-4,2	-13,6	-17,8	-14,4
HUP	-9,3	-21,9	-11,4	-32,1	-2,1	-10,2	-12,3	-9,3
THA	-5,4	-18,2	-1,0	-30,8	4,4	-12,6	-8,2	-7,4

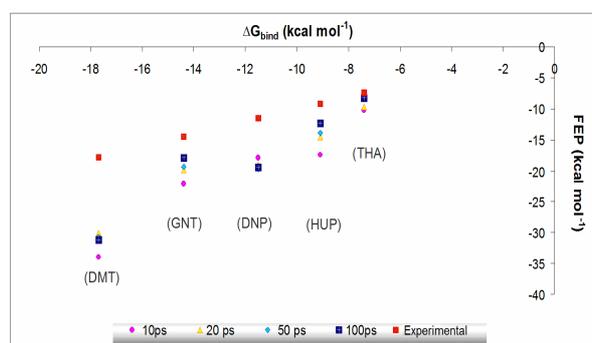
* Experimental.

Como mostrado na Figura 59 e nas tabelas 16 e 17, comparando os valores da energia livre de interação calculados com o método FEP e os valores dos dados experimentais, conclui-se que o DMT^{105,176} é o inibidor mais potente, dentro dos inibidores estudados neste trabalho.

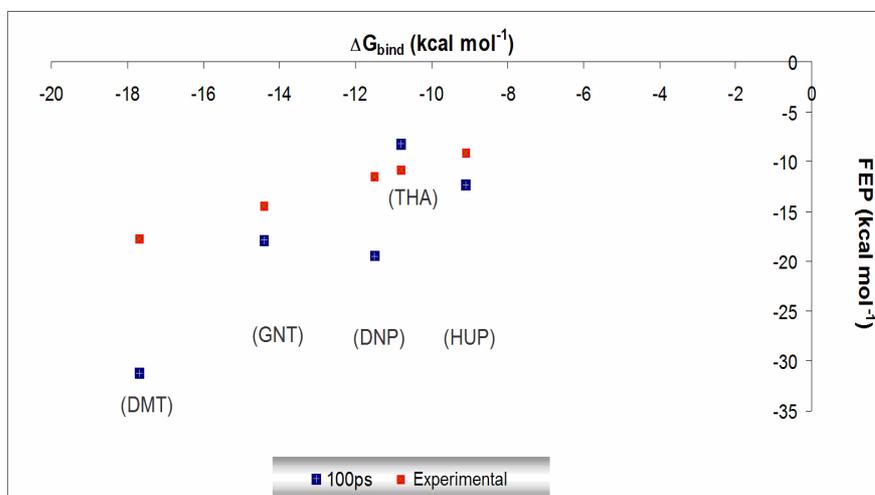
(a)



(b)



(c)



(d)

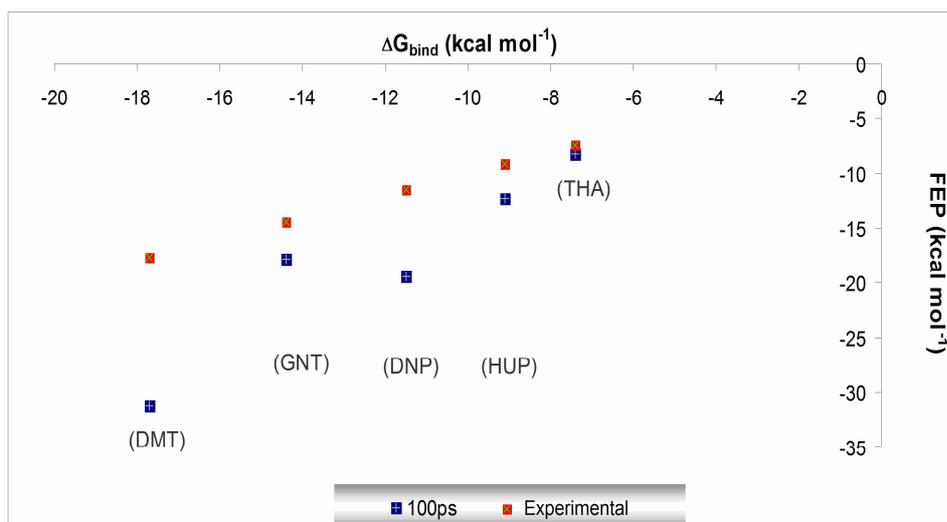


Figura 59. Correlação entre as energias de ΔG_{bind} calculadas teoricamente e os valores experimentais (a)-(c): $K_{i\text{THA}} = 10.0$ nM, (b)-(d): $K_{i\text{THA}} = 3.8$ nM, e preditas.

A Figura 60 traz o diagrama dos valores da energia livre de interação, obtida por diferentes grupos experimentais, e os valores calculados neste trabalho. A excelente concordância na tendência de inibição entre os dados experimentais da sequência (c), IC_{50} e os valores teóricos calculados neste trabalho valida o método FEP como uma excelente ferramenta computacional qualitativa e quantitativa no desenvolvimento de novos fármacos.

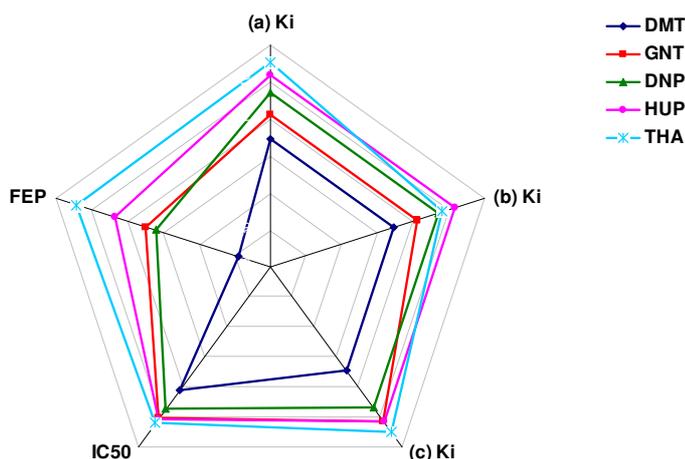


Figura 60. Comparação da ordem de inibição obtida por diferentes métodos: (a) $Ki^{105,177,179,181,182}$, (b) $Ki^{105,177,179,181}$, (c) $Ki^{105,177,181,182}$.

Wlodek e colaboradores também calcularam a energia de interação eletrostática para o complexo AChE-THA com o método Poison-Boltzamn, obtendo valor para ΔG_{bind} de $-0,30 \text{ kcal mol}^{-1}$.¹⁸³ Comparando este valor com o calculado neste trabalho ($-8,2 \text{ kcal mol}^{-1}$) utilizando o método FEP, este último está em maior concordância com os valores experimentais mostrados na Tabela 16.

Ainda para o complexo AChE-THA Han e colaboradores calcularam a energia livre de interação do sistema por o método FEP desenvolvido por seu grupo e obtiveram um valor de $-262,98 \text{ kcal mol}^{-1}$, superestimando em mais de 26 vezes o valor experimental que está entre $-7,4$ e $-10,8 \text{ kcal mol}^{-1}$. Assim, o valor da energia livre de interação da THA calculado pelo método FEP utilizado neste trabalho $-8,2 \text{ kcal mol}^{-1}$, com erro de $\pm 1 \text{ kcal mol}^{-1}$ está dentro da faixa de valores de referência.

Kitisripanya e colaboradores¹⁸⁴ determinaram a energia livre de interação para os sistemas AChE-GNT e AChE-HUP por meio do método ONIOM3[MP2/6-31G(d):B3LYP/(6-31G(d,p):PM3)], porém considerando apenas parte do GORGE da AChE. Os autores obtiveram os valores de $\Delta G_{bind} = -17.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $-28.4 \text{ kcal mol}^{-1}$

para GNT e HUP, respectivamente. Comparando esses resultados com os resultados obtidos com o método FEP utilizado neste trabalho (Tabela 17) para os mesmos inibidores, a metodologia empregada é mais eficiente para estimar valores de ΔG_{Bind} para os sistemas AChE-ligantes.

4.4 Estudo das energias livres de interação por resíduo entre a AChE e seus inibidores

O objetivo em estudar e entender o mecanismo do sistema AChE-inibidor é o desenho racional de fármacos capazes de bloquear a atividade da enzima a fim de impedir a hidrólise da AChE nas sinapses colinérgicas.

Foram calculadas e avaliadas as energias de interação entre os inibidores e o meio enzimático, por meio da decomposição por resíduos, a partir das estruturas dos sistemas AChE-AChEI obtidas das simulações de relaxação MD de 1 ns.

4.4.1 DMT

Rydber e colaboradores estudaram o DMT e seu mapa de densidade eletrônico experimentalmente, por técnicas de Raio-X, e observaram que esta AChEI interage com o GORGE por meio de interações de empilhamento do tipo cátion- π e π - π entre os sistemas aromáticos de uma das subunidades de THA da molécula e os anéis aromáticos dos resíduos Trp84 e Phe330.¹⁰⁵ A outra subunidade de THA interage com os resíduos Tyr70 e Trp279 com forças da mesma natureza. Confrontando estes dados com os valores calculados neste trabalho e mostrados na Figura 61, podemos afirmar que os resíduos Trp84, Phe330, Tyr70 e Trp279 aportam a maior contribuição individual à energia de interação do DMT com a AChE.

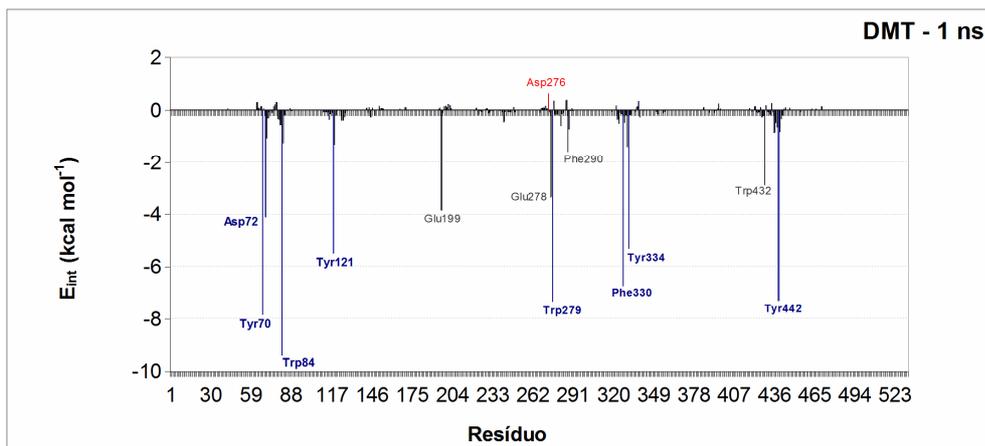


Figura 61. Contribuição por resíduo à energia de interação para o sistema AChE-DMT.

Na Figura 61, observa-se as interações favoráveis e desfavoráveis entre cada resíduo da enzima e o DMT ao tempo de 1 ns de simulação MD. As interações mais fortes são estabelecidas entre o inibidor e os resíduos Asp72, Tyr70, Trp84, Tyr121, Glu199, Trp279, Phe330, Tyr334, Trp432 e Tyr442. Excetuando os resíduos Asp72 e Glu199, todos os demais são resíduos aromáticos pertencentes ao PAS, que recobrem o GORGE da AChE por completo. Este fato explica a grande afinidade entre a AChE e o DMT, como descrito por Rydberg e colaboradores. Também explica a importância das interações de van der Waals nas contribuições para a energia livre de interação e ratifica as observações experimentais sobre o DMT.¹⁰⁵

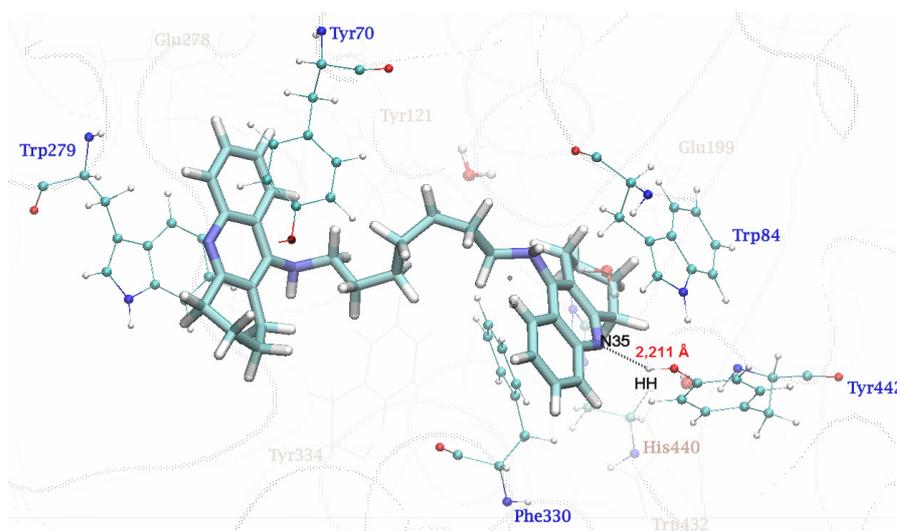


Figura 62. Avaliação qualitativa das interações por resíduo AChE-DMT.

Os resíduos aromáticos interagem com os anéis aromáticos do DMT por meio de diversas interações de van der Waals e também algumas de natureza

eletrostática. As interações acontecem por meio de π -stacking paralelos com os resíduos Tyr70, Trp84, Phe330 e Trp279, e π -stacking tipo T com o resíduo Tyr121, Figura 62. Também é identificada uma interação por meio de ligação de hidrogênio entre o átomo N35 do DMT e o grupo OH do resíduo Tyr442.

4.4.2 DNP

Os estudos de reconhecimento molecular a partir da estrutura cristalográfica do complexo AChE-DNP mostram que este inibidor interage com os resíduos do sítio ativo aniônico e periférico da AChE e não diretamente com a tríade catalítica SEH. Da mesma forma que o DMT, o anel benzênico do DNP interage por π -stacking com o resíduo Trp84. Esta AChEI apresenta várias ligações de hidrogênio entre as moléculas de água estruturais presentes no GORGE e seus heteroátomos.⁹⁸ Os grupos metoxilas fazem interações π - π clássica com o resíduo aromático Trp279. Todas as formas enantioméricas deste inibidor mostraram o mesmo perfil de seletividade frente a AChE, uma vez que se interconvertem rapidamente em solução aquosa por meio de um intermediário ceto-enólico.⁹⁵

O gráfico da Figura 63 mostra as interações entre cada resíduo da AChE com o DNP ao tempo de 1 ns de dinâmica de relaxação. As interações favoráveis mais proeminentes se estabelecem entre o inibidor e os resíduos Tyr70, Trp84, Tyr121, Trp279, Phe330, Phe331, Tyr334 e His440. A interação entre o DNP e o resíduo Glu199 se mostra não favorável.

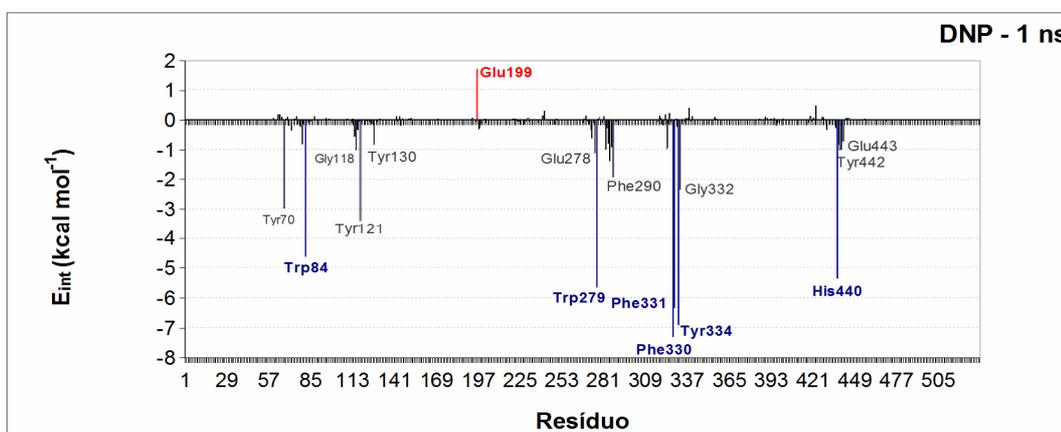


Figura 63. Contribuição por resíduo à energia de interação para o sistema AChE-DNP.

Saxena e colaboradores em estudos de QSAR e modelagem molecular observaram que durante o reconhecimento molecular do DNP pela AChE, o anel benzênico do inibidor interage com o resíduo Trp84, no fundo do GORGE. Outras interações são observadas por estes autores, onde o anel piperidínico da AChEI interage com os resíduos Tyr70, Asp72, Tyr121 e Tyr334 localizados na metade do GORGE. Além destas, interações entre o resíduo Trp279 e o anel indanona do DNP foi observada. No seu estudo, os autores concluem que as interações do DNP com os resíduos aromáticos Phe330 e Trp279 são as responsáveis pela seletividade e a grande afinidade entre a enzima e esta molécula.¹⁷⁷

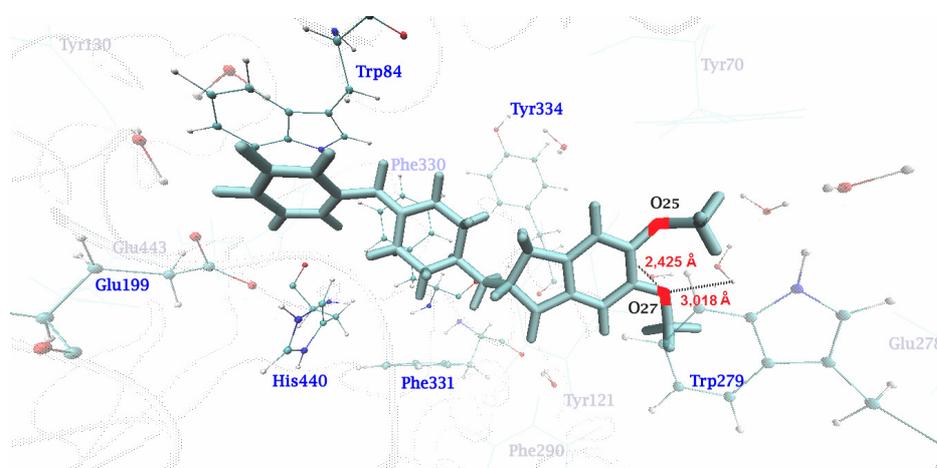


Figura 64. Avaliação qualitativa das interações por resíduo AChE-DNP.

Confrontando as observações qualitativas de Saxena e colaboradores com os resultados quantitativos obtidos neste trabalho, pode-se afirmar que estes corroboram as observações da literatura. Os resíduos que mais contribuem para a inibição da AChE pela ação do DNP são Trp84, Trp279, Phe330, Phe331, Tyr334 e His440 (Figura 64). Também se observa a formação de algumas ligações de hidrogênio formadas entre moléculas de água estruturais no GORGE e o átomo O27 do grupo metoxila do DNP.

4.4.3 GNT

A GNT interage com vários subsítios da AChE, principalmente formando ligações de hidrogênio forte entre o inibidor e os resíduos Ser200, Gly 117 e Glu199, mas também por interações do tipo π - π formando *stacking* com o resíduo Trp84.⁹⁷

Para o sistema AChE-GNT, observa-se que as interações favoráveis mais significativas acontecem entre o inibidor e os resíduos Asp72, Trp84, Gly117, Gly118, Glu199, Ser200 e His440. Duas interações desfavoráveis para o processo de inibição da AChE são observadas entre os resíduos Glu327 (catalítico), Glu443 e a GNT.

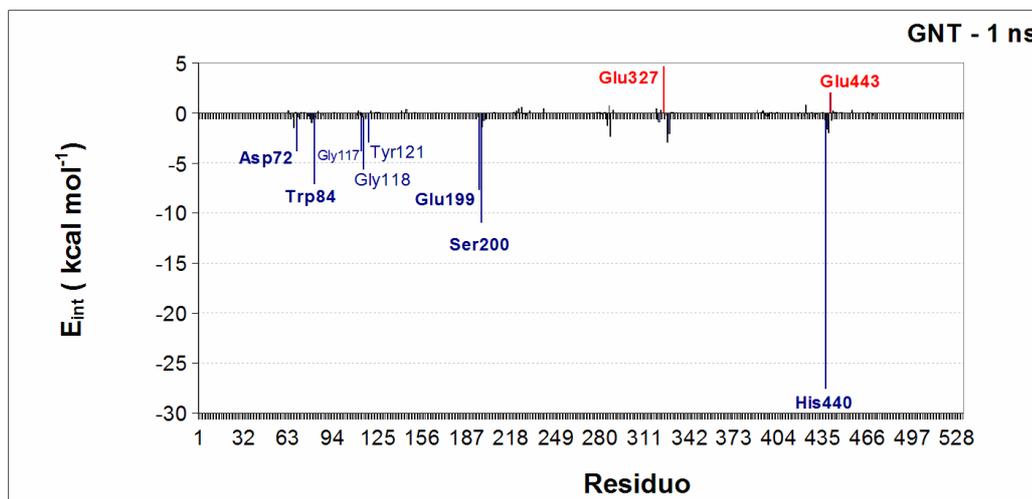


Figura 65. Contribuição por resíduo à energia de interação para o sistema AChE-GNT.

Na Figura 66, observa-se a formação de ligações de hidrogênio curtas (fortes) entre os átomos H39 da GNT e o resíduo Gly117 (1,911 Å); também entre o O20 do inibidor e o resíduo Glu199 (1,979 Å); e entre o átomo O19 da GNT e o resíduo Ser200 (1,991 Å). Outra ligação de hidrogênio é observada entre o átomo O7 da GNT e o resíduo His440 (3,500 Å). Estas interações de natureza eletrostática contribuem de forma significativa no processo de inibição da AChE pela GNT.

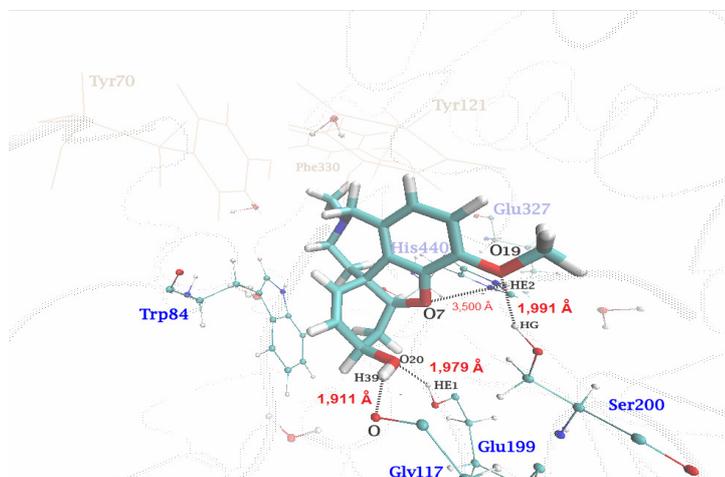


Figura 66. Avaliação qualitativa das interações por resíduo AChE-GNT.

4.4.4 HUP

Estudos teóricos realizados por Camps e colaboradores destacam que o grupo amino da HUP forma ligação de hidrogênio com uma molécula de água estrutural que por sua vez interage com os resíduos Gly117 e Glu199. Além desta interação, a HUP interage por interação do tipo cátion- π com o resíduo Phe330 e por π -stacking com o resíduo Trp84.¹⁸⁵ Outro estudo destaca a interação dos grupos carbonilo e NH do inibidor por formar ligações de hidrogênio com o resíduo Tyr130.⁹⁸

A Figura 67 mostra as contribuições da energia de interação eletrostática por resíduo do sistema AChE-HUP. As contribuições mais favoráveis são estabelecidas entre a HUP e os resíduos Asp72, Trp84, Tyr116, Gly117, Tyr130, Glu199, Glu327, Phe330, His440 e Glu443. Como estas interações são favoráveis, podem explicar, em geral, as energias finais do complexo R-L.

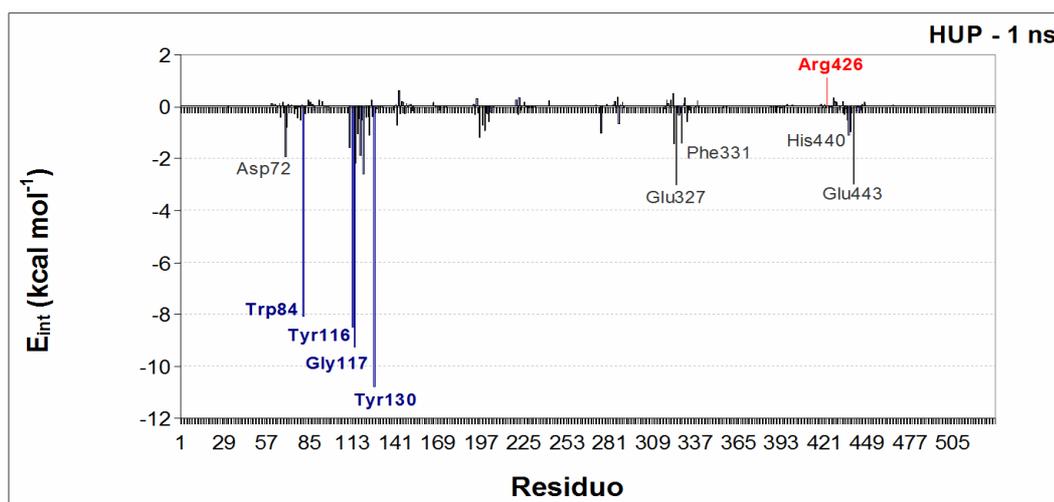


Figura 67. Contribuição por resíduo à energia de interação para o sistema AChE-HUP.

Na figura 68, são mostradas algumas interações entre a HUP e a AChE. Dentre estas, a formação de ligação de hidrogênio entre o átomo O2 da HUP e o resíduo Gly117 (1,897 Å), e também com o resíduo Tyr130 (1,644 Å). Outras ligações de hidrogênio são observadas entre o átomo H19 da HUP e o resíduo Tyr130(2,566 Å). A interação por *p-stacking* entre a HUP e o resíduo Trp84 também é observada neste sistema. Todas estas observação corroboram o exposto na literatura sobre as interações entre a AChE e a HUP.

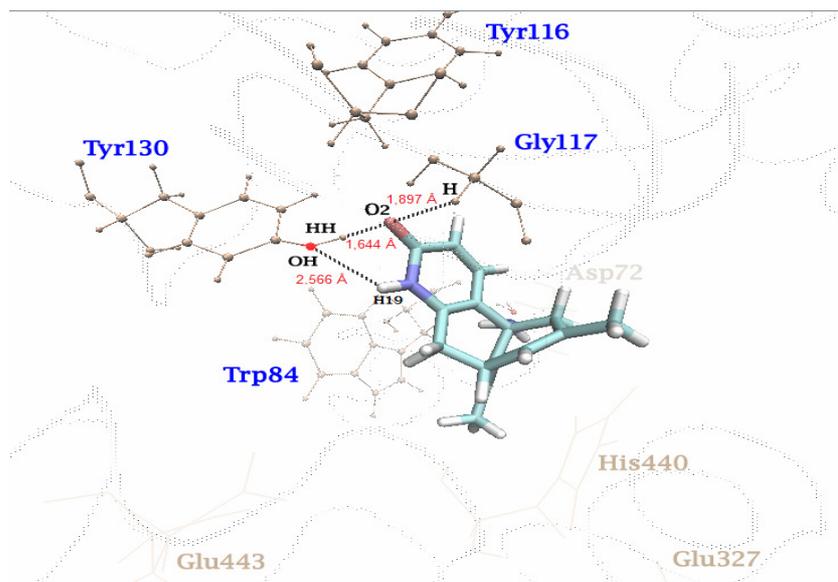


Figura 68. Avaliação qualitativa das interações por resíduo AChE-HUP.

4.4.5 THA

Estudos de docking molecular revelam que a THA é reconhecida pelo GORGE da AChE em diferentes subsítios. A saber: no sítio aniônico por meio de interações hidrofóbicas; no sítio PAS por interações fracas tipo van der Waals e transferência de cargas por meio de elétrons π ⁹³; no sítio catalítico por formação de ligação de hidrogênio com o resíduo His440 e por interações do tipo *stacking* sanduíche com os resíduos Trp84 e Phe300, mais especificamente a formação de um complexo de transferência de carga com o resíduo Trp84.⁵⁵

Simulações MD realizadas por Wlodeck destacam que a THA quando complexada à AChE encontra-se situada entre dois resíduos aromáticos, que implica dizer que parte do potencial de atração entre o inibidor e a enzima é proveniente de interações do tipo π -*stacking*, mais especificamente entre os resíduos Trp84 e Phe330 e a THA.¹⁸³ Outra interação destacada na literatura é a formação de ligação de hidrogênio entre a THA e o resíduo His440, a uma distância de 2,90 Å.^{98,185}

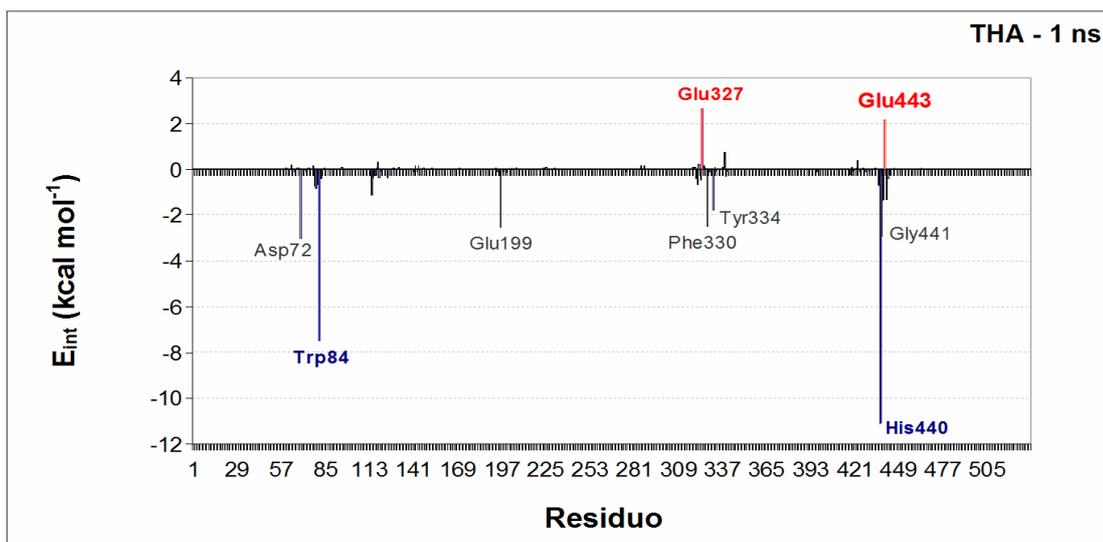


Figura 69. Contribuição por resíduo à energia de interação para o sistema AChE-THA.

As interações favoráveis mais significativas estabelecidas entre a THA e a AChE ocorrem com a participação dos resíduos Asp72, Trp84, Gly118, Glu199, Glu278, Phe330, Tyr334, Trp432 e His440, Figura 69. Estas interações contribuem de forma decisiva nas energias de interação do complexo R-L deste sistema. Duas interações não favoráveis são observadas nos resultados obtidos neste trabalho, são as estabelecidas entre a THA e os resíduos Glu32 e Glu443.

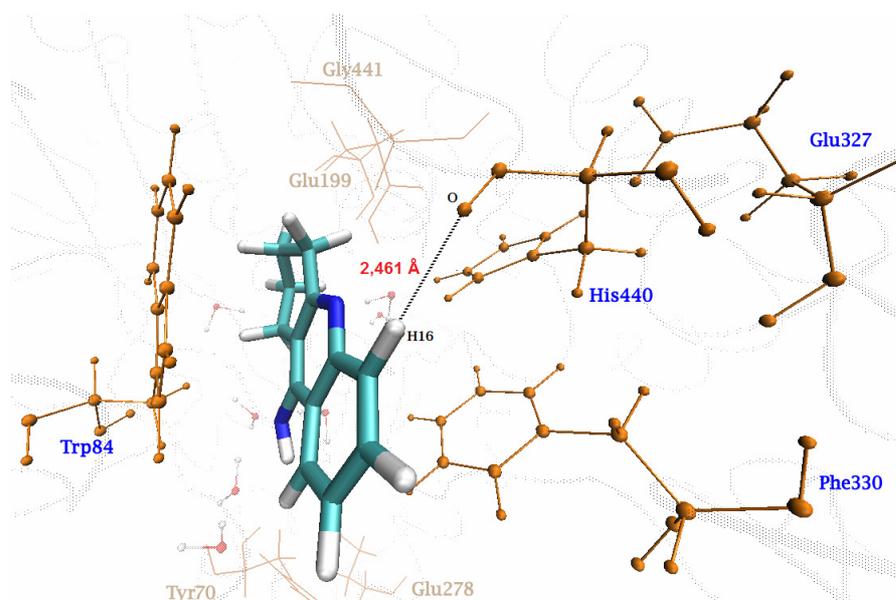


Figura 70. Avaliação qualitativa das interações por resíduo AChE-THA.

Neste estudo pode-se constatar as principais interações relatadas na literatura entre a THA e a AChE: o π -stacking paralelo simultâneo entre os resíduos Trp84 e Phe300, e a formação da ligação de hidrogênio entre o inibidor e o oxigênio carbonílico da cadeia lateral do resíduo His440 (2,461 Å), Figura 70. Os dados da energia de interação por resíduo, Figura 69, apontam para o fato de estes resíduos contribuírem com maior peso no processo de interação deste sistema.

4.4.6 ACh

Na literatura existe um consenso que durante o processo de reconhecimento molecular do NT ACh pela AChE, o nitrogênio quaternário do NT apresenta forte interação com a carga negativa do grupo carboxila do resíduo Asp72. Além da formação de ligações de hidrogênio entre o substrato natural da AChE e os resíduos Asn65 e Tyr130.⁶⁵

Neste trabalho foi estudada a estrutura do complexo de Michaelis do sistema ACh-AChE. Não efetivamente a etapa de acilação da enzima pelo seu substrato natural, mas sim a etapa anterior, mais próxima do reconhecimento molecular e não do processo catalítico propriamente dito.

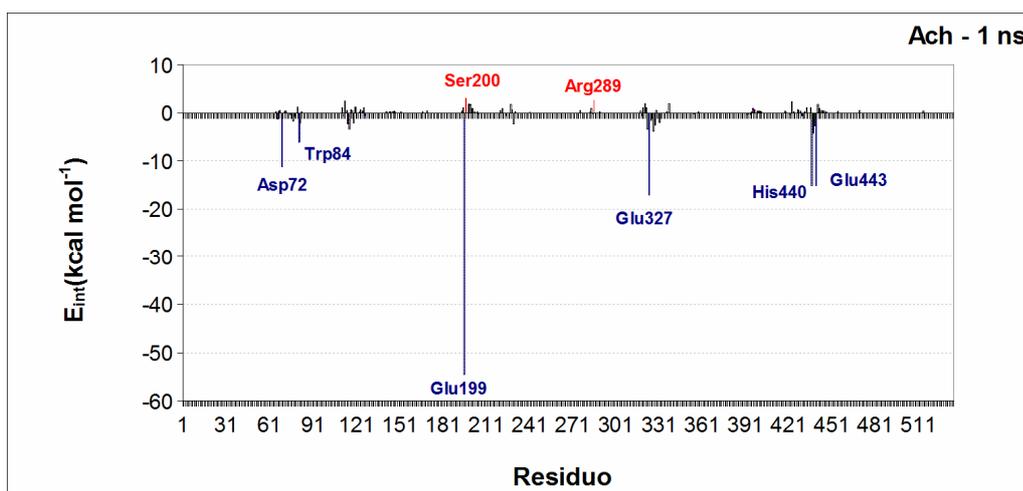


Figura 71. Contribuição por resíduo à energia de interação para o sistema AChE-ACh.

Na Figura 71 observa-se que as interações que contribuem de forma mais significativas no processo de reconhecimento entre a ACh e a AChE são aquelas formadas entre o ligante e os resíduos Asp72, Trp84, Glu199, Glu327, His440 e Glu443. Algumas interações não favoráveis são observadas na resultante do processo de interação deste sistema, são as interações entre a ACh e os resíduos Ser200 e Arg289. Estas interações são os fatores determinantes na formação do complexo ligante-proteína. Todas as interações aqui encontradas foram também reportadas na literatura.¹⁸⁶

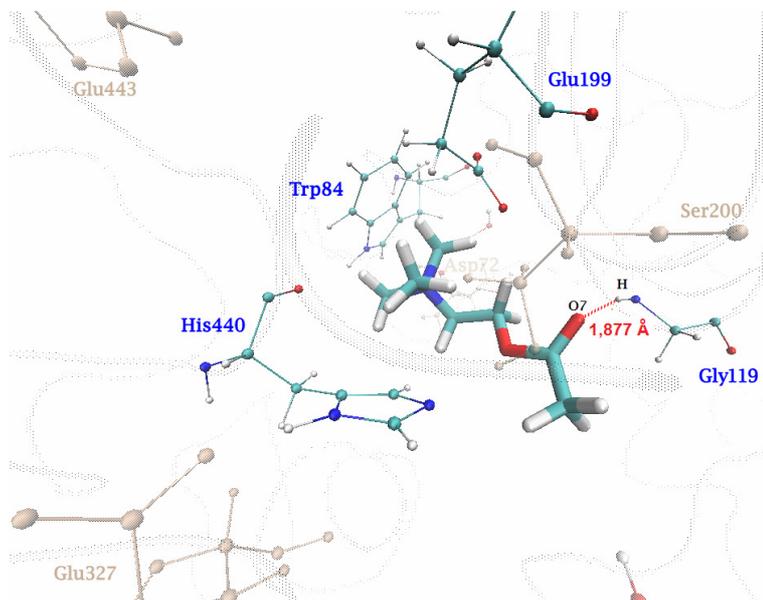


Figura 72. Avaliação qualitativa das interações por resíduo AChE-ACh.

Segundo Harel e colaboradores, os resíduos Trp84 e Phe330 formam um sítio de ligação côncavo, que se rearranja a parte interna do GORGE permitindo a interação destes resíduos com o grupo N^+Me_3 da ACh;⁵⁵ Como mostrado nas Figuras 71 e 72, os resíduos Trp84 e Glu199 têm a maior contribuição individual no processo de reconhecimento molecular e também na energia de interação total do sistema. Também é observado a formação de ligação de hidrogênio entre o átomo O7 da ACh e o resíduo Gly119 (1,877Å). Esta interação é a chave para a orientação do substrato no processo catalítico de hidrólise.

Capítulo 5

5. Conclusões

No presente trabalho foi realizado o estudo teórico de moléculas agonistas e antagonistas utilizadas no tratamento do mal de Alzheimer e da depressão.

Os cálculos das otimizações de geometria e da estrutura eletrônica dos NTs, AChEIs e MAOIs revelaram que o solvente não tem influência significativa nas propriedades eletrônicas destas moléculas. As variações mais acentuadas foram observadas nos valores do momento de dipolo, que tem seu valor modificado quando as moléculas estão em meio solvatado por meio de modelo contínuo. Os valores das energias e a distribuição dos orbitais de fronteira não apresentaram variações drásticas quando se comparados os valores calculados no vácuo e em solvente. A maior variação foi observada no caso dos NTs ACh e MEL, que tiveram o valor do orbital LUMO aumentado quando em solvente.

O estudo do mapa de potencial eletrostático indica que todas as moléculas aqui estudadas têm regiões bem definidas de alta, média e baixa densidade de carga. Nos NTs, estas regiões são pontuais e descrevem o ponto de interação entre estes e seus alvos proteômicos. No caso das AChEIs e MAOIs, são observados perfis similares de densidade de carga onde a alta densidade está localizada sobre os heteroátomos que as constituem. Em algumas AChEIs, como a RIV e o DNP, e também em algumas MAOIs com a NIA e RAS, apresentam mais de uma região de baixa densidade eletrônica (ácida) o que favorece interações do cátion- π e/ou ligações de hidrogênio mais fortes com a AChE e a MAO.

O estudo PCA das 28 moléculas estudadas revelou que as propriedades volume, tamanho, dipolo, número de sistemas aromáticos, distância dN-O, e MM aparecem em todos os estudos PCA realizados. Assim, pode-se afirmar que estas propriedades evidenciam o perfil farmacofórico das MAOIs. Além destas propriedades, outras como o momento de dipolo, PSA e a distância H-H são propriedades que aportam similaridades entre as moléculas estudadas. Este perfil é um indicador para o desenho de novos fármacos que possam atuar como potentes AChEIs e MAOIs, tendo dupla funcionalidade.

Os resultados da energia livre de interação dos sistemas AChE-ligantes calculados com o método FEP reproduzem a tendência dos resultados

experimentais, com excelente precisão tanto em valores absolutos quanto em relação à ordem do poder de inibição dos ligantes frente a AChE.

O estudo da ΔG_{bing} mediante o método FEP foi realizado com AChEIs pertencentes a diferentes classes, porém ainda assim a correlação teórico-experimental pode ser considerada boa, o que permite validar o método empregado.

A análise dos distintos termos (eletrostático e de van der Waals) da energia de interação revela que a contribuição do termo de van der Waals predomina sobre o termo eletrostático. Ainda que este comportamento não seja o habitualmente encontrado na maioria das enzimas, não é de se estranhar que no caso da AChE, devido ao elevado número de resíduos aromáticos existentes no seu sítio ativo, GORGE, e à estrutura química dos inibidores que apresentam um considerável número de sistemas π conjugados, essa predominância seja encontrada.

A análise da energia de interação por resíduo permite determinar os resíduos mais importantes no processo de interação dos diferentes ligantes com a AChE. Foi observado que alguns resíduos como o Trp84, Phe330, Phe331, His440 e o Glu199 contribuem significativamente para a estabilização de todos os sistemas AChE-ligante estudados. Estes resultados estão em concordância com a literatura.

Neste trabalho foi determinado teoricamente a contribuição dos diferentes resíduos para a interação de distintos ligantes com a AChE. Estes resultados reproduzem as observações prévias, tanto teóricas (qualitativas) quanto experimentais (qualitativas e quantitativas).

Este estudo permite compreender com mais detalhes como ocorre a interação de diferentes inibidores com a enzima AChE, e ainda descrever as propriedades mais relevantes que definem o perfil de um bom ligante com a finalidade de inibir ou ativar a enzima. Isto pode ser de grande utilidade na busca de novos inibidores da AChE que possam ser utilizados no tratamento de doenças como a DA e também no desenho racional de drogas multi-alvos.

Capítulo 6

6. Referências

1. IBGE, < <http://censo2010.ibge.gov.br>>, acessado em 03 de novembro de 2014.
2. Census, <www.census.gov>, acessado em 03 de novembro de 2014.
3. LIMITED, A. E. P.; ACCESS ECONOMICS, 2006, p 50.
4. Organization, W. H.; WHO: Paris, 2006, p 187.
5. Nikolaev, A.; McLaughlin, T.; O'Leary, D. D. M.; Tessier-Lavigne, M. Nature 2009, 457, 981.
6. Lent, R. Neurociência da Mente e do Comportamento; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2008.
7. Devlin, T. M. Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas Blüncher São Paulo, 2007.
8. Sant'Anna, G. S. In Centro de Ciências Naturais e Exatas; Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2008, p 91.
9. van der Kamp, M. W.; Mulholland, A. J. Biochemistry 2013, 52, 2708–2728.
10. Warshel, A. Ann. Rev. of Biophysics and Biomolecular Structure 1976, 32, 425.
11. Senn, H. M.; Thiel, W. Angew. Chem. Int. 2009, 48, 1198.
12. Aqvist, J.; Warshel, A. Chem. Rev. 1993, 93, 2523.
13. Marti, S.; Andres, J.; Silla, E.; Moliner, V.; Tunon, I.; Bertran, J. Angew. Chem. Int. 2007, 46, 286.
14. Bechmann, I.; Galea, I.; Perry, V. H. Cell 2007, 28, 5.
15. Sackheim, G. I. L., D. D. Química e Bioquímica para Ciências Biológicas; Manole: São Paulo, 2001.
16. Sugimoto, H.; Ogura, H.; Arai, Y.; Imura, Y.; Yamanishi, Y. Japanese Journal of Pharmacology 2002, 89, 7.

17. Giordano, M.; Dominguez, L. J.; Vitrano, T.; Curatolo, M.; Ferlisi, A.; Di Prima, A.; Belvedere, M.; Barbagallo, M. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 2010, 51, 245.
18. Freitas, H. F.; Paz, O. S.; Castilho, M. S. *Quimica Nova* 2009, 32, 2114.
19. Alzorg, < <http://www.alz.org>>, acessado em 3 de novembro de 2014.
20. Sayeg, N. < <http://www.alzheimermed.com.br>>; acessado em 03 de novembro de 2014.
21. Alcaro, S.; Scipione, L.; Ortuso, F.; Posca, S.; Rispoli, V.; Rotiroti, D. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2002, 12, 2899.
22. Tezer, N. *Journal of Molecular Structure-Theochem* 2005, 714, 133.
23. Racchi, M.; Mazzucchelli, M.; Porrello, E.; Lanni, C.; Govoni, S. *Pharmacological Research* 2004, 50, 441.
24. Sippl, W.; Contreras, J. M.; Parrot, I.; Rival, Y. M.; Wermuth, C. G. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 2001, 15, 395.
25. García, A. G.; GANDÍA, L. *Fronteras en la Enfermedad de Alzheimer*; Eurocolor S.A.: Madrid, 2002.
26. Solomon, K. A.; Sundararajan, S.; Abirami, V. *Molecules* 2009, 14, 1448.
27. Racchi, M.; Mazzucchelli, M.; Lenzken, S. C.; Porrello, E.; Lanni, C.; Govoni, S. *Chemico-Biological Interactions* 2005, 157-158, 335.
28. García, M. S. A.; Riba-Llena, I.; Serra-Basante, C.; Alom, J.; Boopathy, R.; Saez-Valero, J. *Plos One* 2010, 5.
29. Inestrosa, N. C. A., R. J. *Physiology* 1998, 92, 341.
30. McNulty, J.; Nair, J. J.; Little, J. R. L.; Brennan, J. D.; Bastida, J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010, 20, 5290.
31. Zhang, W. W.; Xu, Z. P.; Cui, Y. Y.; Wang, H.; Song, M. K.; Li, J.; Shao, B. Y.; Xia, Z.; Chen, H. Z. *Journal of Neural Transmission* 2009, 116, 1643.
32. Lenzken, S. C. L., C.; Govoni, S.; Lucchelli, A.; Schettini, G.; Racchi, M. *Chemico-Biological Interactions* 2007, 165, 138.

33. Sayed, N. < <http://www.alzheimermed.com.br>>; acessado em 03 de novembro de 2014.
34. Camps, P. Mini Reviews in Medicinal Chemistry 2002, 2, 11.
35. Bartolucci, C.; Haller, L. A.; Jordis, U.; Fels, G.; Lamba, D. Journal of Medicinal Chemistry 2010, 53, 745.
36. Alberts, B. L., J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Biologia Molecular da Célula; Artmed: Porto Alegre, 2004.
37. Roy, K. K.; Dixit, A.; Saxena, A. K. Journal of Molecular Graphics & Modelling 2008, 27, 197-208.
38. Scorzo, C. M.; Fascio, M. L.; D'Accorso, N. B.; Cabrera, M. G.; Saavedra, L. A. Journal of the Brazilian Chemical Society 2010, 21, 43.
39. Senol, F. S.; Orhan, I.; Celep, F.; Kahraman, A.; Dogan, M.; Yilmaz, G.; Sener, B. Food Chemistry 2010, 120, 34.
40. Zoia, C. P.; Tagliabue, E.; Isella, V.; Begni, B.; Fumagalli, L.; Brighina, L.; Appollonio, i.; Racchi, M.; Ferraresea, C. Neurobiology of Aging 2005, 26, 825.
41. Liu, X. Y.; Xu, K. D.; Yan, M.; Wang, Y. P.; Zheng, X. X. Neurochemistry International 2010, 57, 588.
42. Camps, P.; Formosa, X.; Galdeano, C.; Gomez, T.; Munoz-Torrero, D.; Ramirez, L.; Viayna, E.; Gomez, E.; Isambert, N.; Lavilla, R.; Badia, A.; Clos, M. V.; Bartolini, M.; Mancini, F.; Andrisano, V.; Bidon-Chanal, A.; Huertas, O.; Dafni, T.; Luque, F. J. Chemo-Biological Interactions 2010, 187, 411.
43. Abbott, A. Nature 2008, 456, 162.
44. Schnabel, J. Nature 2010, 464, 828.
45. Suganthy, N.; Pandian, S. K.; Devi, K. P. Neuroscience Letters 2010, 468, 216.
46. Romeiro, L. A. S.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. Quim. Nova 2003, 26, 347.
47. Nichols, D. E.; Nichols, C. D. Chem. Rev. 2008, 108, 1614.

48. Kornuma, B. R.; Weikopb, P.; Mollerb, A.; Ronnb, L. C. B.; Knudsen, G. M.; Aznara, S. *Brain Research* 2006, 1073-1074, 262.
49. Ögren, S. O.; Eriksson, T. M.; Elvander-Tottie, E.; D'Addario, C.; Ekström, J. C.; Svenningsson, P.; Meister, B.; Kehr, J.; Stiedl, O. *Behavioural Brain Research* 2008, 195, 54.
50. Moreno, R. A.; H., M. D.; Soares, M. B. M. *Depressão* 1999, 21, 24.
51. Dvir, H.; Silman, I.; Harel, M.; Rosenberry, T. L.; Sussman, J. L. *Chemico-Biological Interactions* 2010, 187, 10.
52. Niu, C. Y.; Xu, Y. C.; Xu, Y.; Luo, X. M.; Duan, W. H.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Zhu, W. L.; Chen, K. X.; Shen, J. H.; Jiang, H. L. *Journal of Physical Chemistry B* 2005, 109, 23730.
53. Barak, D.; Ordentlich, A.; Kaplan, D.; Kronman, C.; Velan, B.; Shafferman, A. *Chemico-Biological Interactions* 2005, 157, 219.
54. Kaur, J.; Zhang, M. Q. *Current Medicinal Chemistry* 2000, 7, 273.
55. Harel, M.; Schalk, I.; Ehretsabatier, L.; Bouet, F.; Goeldner, M.; Hirth, C.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, 90, 9031.
56. Raves, M. L.; Harel, M.; Pang, Y. P.; Silman, I.; Kozikowski, A. P.; Sussman, J. L. *Nature Structural Biology* 1997, 4, 57.
57. Polinsky, R. J. *Clinical Therapeutics* 1998, 20, 634.
58. Wlodek, S. T.; Antosiewicz, J.; Briggs, J. M. *Journal of the American Chemical Society* 1997, 119, 8159.
59. Koellner, G.; Kryger, G.; Millard, C. B.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Steiner, T. *Journal of Molecular Biology* 2000, 296, 713.
60. Felder, C. E.; Botti, S. A.; Lifson, S.; Silman, I.; Sussman, J. L. *Journal of Molecular Graphics & Modelling* 1997, 15, 318.
61. Ripoll, D. R.; Faerman, C. H.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, 90, 5128.

62. Antosiewicz, J.; McCammon, J. A.; Gilson, M. K. *Journal of Molecular Biology* 1994, 238, 415.
63. Wlodek, S. T.; Clark, T. W.; Scott, L. R.; McCammon, J. A. *Journal of the American Chemical Society* 1997, 119, 9513.
64. Asadabadi, E. B.; Abdolmaleki, P.; Barkooie, S. M. H.; Jahandideh, S.; Rezaei, M. A. *Computers in Biology and Medicine* 2009, 39, 1089.
65. Patrick, G. L. *Medicinal Chemistry*; OXFORD: New York, 2005.
66. Henchman, R. H.; Tai, K. S.; Shen, T. Y.; McCammon, J. A. *Biophysical Journal* 2002, 82, 2671.
67. Bartolucci, C. S., M.; Ghidini, E.; Amari, G.; Bolzoni, P. N.; Racchi, M.; Villetti, G.; Delcanale, M.; Lamba, D. J. *Med. Chem* 2006, 49, 5051.
68. Binda, C.; Li, M.; Hubalek, F.; Restelli, N.; Edmondson, D. E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003, 100, 9750.
69. Son, S. Y.; Ma, J.; Kondou, Y.; Yoshimura, M.; Yamashita, E.; Tsukihara, T. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* 2008, 105, 5739.
70. Miller, J. R.; Edmondson, D. E. *Biochemistry* 1999, 38, 13670.
71. Vallejos, G.; Rezendea, M. C.; Casselsb, B. K. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 2002, 16, 95.
72. Wu, G.; Yan, S. *Biomolecular Engineering* 2001, 18, 23.
73. Morón, J. A.; Campillo, M.; Perez, V.; Unzeta, M.; Pardo, L. J. *Med. Chem* 2000, 43, 1684.
74. Edmondson, D. E.; Binda, C.; Mattevi, A. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2007, 464, 269.
75. Kalsner, S. *Brain Research Bulletin* 2000, 52, 467.
76. Kharkar, P. S.; Reith, M. E. A. *J Comput Aided Mol Des* 2008, 22, 1.
77. Nakai, S.; Yoneda, F. *Theor Chem Acc* 2000, 104, 398.

78. Santana, L.; Uriarte, E.; González-Díaz, H.; Zagotto, G.; Soto-Otero, R.; Méndez-Álvarez, E. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 1149.
79. Erdem, S. S.; Yelekçi, K. *Journal of Molecular Structure* 2001, 572, 97.
80. Wouters, J.; Moureau, F.; Evrard, G.; Jegham, S.; Koenig, J. J.; George, P.; Durant, F. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 1999, 7, 1683.
81. Santana, L.; Uriarte, E.; González-Díaz, H.; Quezada, E.; Yáñez, M.; Viña, D.; Orallo, F. *J. Med. Chem.* 2008, 51, 6740.
82. Gasparro, D. M.; Almeida, D. R. P.; Pisterzi, L. F.; Juhasz, J. R.; Viskolcz, B.; Penke, B.; Csizmadia, I. G. *Journal of Molecular Structure* 2003, 666-667, 527.
83. Raddatz, R.; Parini, A.; Lanier, S. M. *The Journal of Biological Chemistry* 1995, 17, 27961.
84. Hasegawa, K.; Kimura, T.; Miyashita, Y.; Funatsu, K. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1996, 36, 1025.
85. Yadav, A.; Sonker, M. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2009, 44, 3866.
86. Jayaprakash, V.; Yabanoglu, S.; Sinha, B. N.; Ucar, G. *Turk J Biochem* 2010, 35, 91.
87. Camps, P.; Formosa, X.; Muñoz-Torrero, D.; Petriguet, J.; Badia, A.; Clos, M. V. *Journal of Medicinal Chemistry* 2005, 48, 1701.
88. Costantino, H. R.; Leonard, A. K.; Brandt, G.; Johnson, P. H.; Quay, S. C. *Bmc Neuroscience* 2008, 9.
89. Miao, Y. Q.; He, N. Y.; Zhu, J. J. *Chemical Reviews* 2010, 110, 5216.
90. Samadi, A.; Marco-Contelles, J.; Soriano, E.; Alvarez-Perez, M.; Chioua, M.; Romero, A.; Gonzalez-Lafuente, L.; Gandia, L.; Roda, J. M.; Lopez, M. G.; Villarroya, M.; Garcia, A. G.; de los Rios, C. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2010, 18, 5861.
91. Akasofu, S.; Kimura, M.; Kosasa, T.; Sawada, K.; Ogura, H. *Chemico-Biological Interactions* 2008, 175 222.
92. Weinstock, M.; Groner, E. *Chemico-Biological Interactions* 2008, 175, 216.

93. Proctor, G. R.; Harvey, A. L. *Current Medicinal Chemistry* 2000, 7, 295.
94. Ul-Haq, Z.; Khan, W.; Kalsoom, S.; Ansari, F. L. *Theoretical Biology and Medical Modelling* 2010, 7.
95. Sugimoto, H.; Yamanishi, Y.; Iimura, Y.; Kawakami, Y. *Current Medicinal Chemistry* 2000, 7, 303.
96. Marques, L. A.; Kool, J.; de Kanter, F.; Lingeman, H.; Niessen, W.; Irth, H. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2010, 53, 609.
97. Greenblatt, H. M.; Kryger, G.; Lewis, T.; Silman, I.; Sussman, J. L. *Febs Letters* 1999, 463, 321.
98. Barril, X. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 2001, 1, 255.
99. Kotani, S.; Yamauchi, T.; Teramoto, T.; Ogura, H. *Chemico-Biological Interactions* 2008, 175, 227.
100. Bastiat, G.; Plourde, F.; Motulsky, A.; Furtos, A.; Dumont, Y.; Quirion, R.; Fuhrmann, G.; Leroux, J. C. *Biomaterials* 2010, 31, 6031.
101. Bailey, J. A.; Lahiri, D. K. *Journal of Neurochemistry* 2010, 112, 843.
102. Bar-On, P.; Millard, C. B.; Harel, M.; Dvir, H.; Enz, A.; Sussman, J. L.; Silman, I. *Biochemistry* 2002, 41, 3555.
103. Kone, S.; Galland, N.; Graton, J.; Illien, B.; Laurence, C.; Guillou, C.; Le Questel, J. Y. *Chemical Physics* 2006, 328, 307.
104. Greenblatt, H. M.; Guillou, C.; Guenard, D.; Argaman, A.; Botti, S.; Badet, B.; Thal, C.; Silman, I.; Sussman, J. L. *Journal of the American Chemical Society* 2004, 126, 15405.
105. Rydberg, E. H.; Brumshtein, B.; Greenblatt, H. M.; Wong, D. M.; Shaya, D.; Williams, L. D.; Carlier, P. R.; Pang, Y. P.; Silman, I.; Sussman, J. L. *Journal of Medicinal Chemistry* 2006, 49, 5491.
106. Lange, J. H. M.; Coolen, H.; van der Neut, M. A. W.; Borst, A. J. M.; Stork, B.; Verveer, P. C.; Kruse, C. G. *Journal of Medicinal Chemistry* 2010, 53, 1338.

107. Rizzo, S.; Bartolini, M.; Ceccarini, L.; Piazzini, L.; Gobbi, S.; Cavalli, A.; Recanatini, M.; Andrisano, V.; Rampa, A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2010, 18, 1749.
108. Wong, K. K.; Ngob, J. C.; Liua, S.; Lina, H.; Huc, C.; Shawb, P.; Wana, D. C. *Chemico-Biological Interactions* 2010, 187, 335.
109. Wang, Y. H., L.; Tang X.; Zhang, H. *Acta Pharmacologica Sinica* 2010, 31, 649.
110. Berton, O.; Nestler, E. J. *Neuroscience* 2006, 7, 137.
111. Wouters, J.; Oomsl, F.; Jegham, S.; Koenig, J. J.; George, P.; Durant, F. *Eur J Med Chem* 1997, 32, 721.
112. Ucar, G.; Gokhanb, N.; Yesilada, A.; Bilgin, A. A. *Neuroscience Letters* 2005, 382, 327.
113. Média, N.; Nobel Média AB <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2013/press.html> acessado em 3 de novembro de 2014.
114. Honarparvar, B.; Govender, T.; Maguire, G. E. M.; Soliman, M. E. S.; Kruger, H. *G. Chem. Rev.* 2013.
115. Média, N.; Nobel Média BA <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1998/> acessado em 3 de novembro de 2014.
116. Swiderek, K.; Tuñón, I.; Moliner, V. *Advanced Review* 2013.
117. Brooijmans, N.; Kuntz, I. D. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2003, 32, 335.
118. Moliner, V.; Martí, S. *J. Chem. Theory Comput.* 2005, 1, 1008.
119. Dapprich, S.; Komaromi, I.; Byun, K.; Morokuma, K. *J. Mol. Struct. (Theochem)* 1999, 462.
120. Martins, J. P. A.; Barbosa, E. G.; Pasqualoto, K. F. M.; Ferreira, M. M. C. *J. Chem. Inf. Model.* 2009, 49, 1428.
121. Lv, W.; Xue, Y. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2010, 45, 1167.
122. Swiderek, K.; Martí, S.; Moliner, V. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2012, 14, 12614.

123. Field, M. J.; Bash, P. A.; Karplus, M. J. *Comput. Chem.* 1990, 11, 700.
124. Gao, J.; Truhlar, D. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2002, 53, 467.
125. Field, M. J. *A practical introduction to the simulation of molecular systems*; Cambridge University Press: Cambridge, 1999.
126. Takahashi, J.; Hijikuro, I.; Kihara, T.; Muruges, M. G.; Fuse, S.; Kunimoto, R.; Tsumura, Y.; Akaike, A.; Niidome, T.; Okuno, Y.; Takahashi, T.; Sugimoto, H. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010, 20, 1718.
127. Truhlar, D.; Garret, B. C. *Acc. Chem. Res.* 1980, 13, 440.
128. Garret, B. C.; Truhlar, D. *Abstr. Pap. Am. Chem. S.* 1980, 180, 233.
129. Leach, A. R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*; Prentice Hall: Essex, 2001.
130. Cramer, C. J. *Essentials of Computational Chemistry*; John Wiley and Sons: West Sussex, 2004.
131. Atkins, P.; J., P. *Physical Chemistry for Life Science*; Oxford: New York, 2005.
132. Levine, I. N. *Físicoquímica*; Mc Graw-Hill: Madrid, 2004.
133. Young, D. *Computational Chemistry*; J. W. Sons: Canada, 2001.
134. Born, M.; Oppenheimer, R. *Annalen Der Physik* 1927, 84, 0457.
135. Szabo, A. O., N. S. . *Modern quantum chemistry : introduction to advanced electronic structure theory*; Courier Dover Publications, INC: New York, 1996.
136. Andrés, J.; Bertran, J. *Theoretical and Computational Chemistry: Foundations, Methods and Techniques*; Universitat Jaume I: Castellón de la Plana, 2007.
137. Becke, A. D.; Edgecombe, K. E. *Journal of Chemical Physics* 1990, 92, 5397.
138. Lee, C. Y., W.; Parr, R.G. . *Phys. Rev. B* 1988, 37, 785.
139. Pople, J. A. S., D. P.; SEGAL, G. A. *JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS* 1965, 42, S129.

140. Huang, N. S., K. J. Med. Chem. 2008, 51, 4862.
141. Roberts, B. C. M., R. L. J. Chem. Inf. Model. 2008, 48, 397.
142. Barone, V. C., M. J. Phys. Chem. 1998, 102, 1995.
143. Klamt, A. J. Phys. Chem. 1995, 99, 2224.
144. Georg, H. C. In Instituto de Física; Universidade de São Paulo: São Paulo, 2006, p 186.
145. Neto, J. M. M. M., G. C. Quim. Nova 1998, 21, 467.
146. Mizutani, M. Y.; Itai, A. Journal of Medicinal Chemistry 2004, 47, 4818.
147. Anderson, T. W. An Introduction to Multivariate Statistical Analysis; John Wiley & Sons: New York, 1984.
148. Afifi, A. A. C., Virginia. Computer-Aided Multivariate Analysis; CHAPMAN & HALL: New York, 1990.
149. Gnanadesikan, R. Methods for statistical data analysis of multivariate observations; John Wiley & Sons: New York, 1997.
150. Marriott, F. H. C. Interpretation of multiple observations; Academic Press: London, 1974.
151. Warshel, A.; Levitt, M. J Mol Biol. 1976, 103, 227.
152. Brunger, A.; Brooks III, C. L.; Karplus, M. Chemical Physics Letters 1984, 105, 495.
153. Field, M. J. A practical introduction to the simulation of molecular systems; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2007.
154. Meller, J. Encyclopedia of Life Sciences, 2001.
155. Alder, B. J.; Wainwright, T. E. J. Chem. Phys. 1957, 27, 1208.
156. Stillinger, F. H.; Rahman, A. J. Chem. Phys. 1974, 60, 1545.
157. McCammon, J. A.; Gelin, B. R.; Karplus, M. Nature 1977, 267, 585.

158. Allen, M. P. Computational Soft Matter: From Synthetic Polymers to Proteins, Lecture Notes; John von Neumann Institute for Computing: Julich, 2004.
159. McQuarrie, D. A. Statistical Mechanics; Harper and Row: New York, NY, 1976.
160. Verlet, L. Phys. Rev. 1967, 158, 98.
161. Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Dinola, A.; Haak, J. R. Journal of Chemical Physics 1984, 81, 3684.
162. Izaguirre, J. A.; Catarello, D. P.; Wozniak, J. M.; Skeel, R. D. Journal of Chemical Physics 2001, 114, 2090.
163. Gao, J.; Kuczera, B.; Tidor, B.; Karplus, M. Science 1989, 244, 1069.
164. Brandsdal, B. O.; Österberg, F.; Almöf, M.; Feierberg, I.; Luzhkov, V. B.; Aqvist, J. Advances in Protein Chemistry 2003, 66, 123.
165. Frenkel, D.; Smit, B. Understanding Molecular Simulation: From algorithms; Academic Press: New York, 2007.
166. Wishart, D. S. K., C.; Guo, A.C.; Cheng, D.; Shrivastava, S.; Tzur, D.; Gautam, B.; Hassanali, M., 2011.
167. Bolton, E. E. W., Y.; Thiessen, P. A.; Bryant, S. H.: Bethesda, 2011.
168. Frisch, M. J., G.W. Trucks, H.B.S., G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R.C., Zakrzewski, V.G., Montgomery, Jr. J.A., Stratmann, R.E., Dapprich, J.C.B.S., Millam, J.M., Daniels, A.D., Strain, K.N.K.M.C., Farkas, O., Tomasi, J., Barone, V., Cammi, M.C.R., Mennucci, B., Pomelli, C., Adamo, C., Clifford, S., Petersson, J.O.G.A., Ayala, P.Y., Cui, Q., Morokuma, K., Rabuck, D.K.M.A.D., Raghavachari, K., Foresman, J.B., Ortiz, J.C.J.V., Stefanov, B.B., Liu, G., Liashenko, A., Komaromi, P.P.I., Gomperts, R., Martin, R.L., Fox D.J., Al-Laham, T.K.M.A., Peng, C.Y., Nanayakkara, A., Gonzalez, C., Challacombe, M., Gill, P.M.W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M.W., Andres, J.L., Gonzalez, C., Head-Gordon, M., Replogle E.S. and Pople, J.A.; Gaussian Inc.,: Pittsburgh, PA, 2009.
169. Tetko, I. V.; Tanchuk, V. Y. J. Chem. Inf. Comput. Sci. 2002, 42, 1136.
170. Sander, T.; Actelion Pharmaceuticals Ltd., Gewerbestrasse 16, 4123 Allschwil, Switzerland, 2001.

171. Rahman, O. M., J.; Foster, A.; Gertler, P.; . In U.S. Patent Nos. 6,857,118; 6,973,644; 6,993,772; 7,010,364; 7,051,333; 7,051,338; 7,096,154; 7,139,686; 7,165,253; 7,181,745; 7,228,239; 7,231,631; 7,237,237; 7,340,441; 7,353,502; 7,359,805; 7,365,311; 7,369,127; 7,400,997; 7,428,737; 7,454,659; 7,454,746; 7,460,123: USA, 2009.
172. Holm, L.; Park, J. *Bioinformatics* 2000, 16, 566.
173. Field, M. J. Personal Communication, 2001.
174. Nascimento, É. C. M. M., J. B. L.; Santos, M. L.; Gargano, R. *Chemical Physics Letters* 2008, 458, 285.
175. Nascimento, É. C. M.; Martins, J. B. L. *Journal of Molecular Modeling* 2010, 17, 1371.
176. Rakonczay, Z. *Acta Biologica Hungarica* 2003, 54, 183.
177. Saxena, A.; Fedorko, J. M.; Vinayaka, C. R.; Medhekar, R.; Radic, Z.; Taylor, P.; Lockridge, O.; Doctor, P. *Eur. J. Biochem* 2003, 270.
178. Ogura, H.; Kosasa, T.; Kuriya, Y.; YAMASHITA, E. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 2000, 22, 609.
179. Khan, M. T. H.; Orhan, I.; Senol, F. S.; Kartal, M.; Sener, B.; Dvorská, M.; Smejkal, K.; Slapetová, T. *Chemico-Biological Interactions* 2009, 181, 383-389.
180. Han, D.; Yang, P. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* 2004, 668, 25.
181. Dvir, H.; Jiang, H. L.; Wong, D. M.; Harel, M.; Chetrit, M.; He, X. C.; Jin, G. Y.; Yu, G. L.; Tang, X. C.; Silman, I.; Bai, D. L.; Sussman, J. L. *Biochemistry* 2002, 41, 10810.
182. Allhomida, A. S.; Al-Rajhi, A. A.; Kamal, M. A.; Al-Jafari, A. A. *Toxicology* 2000, 147, 33.
183. Wlodeck, S. T.; Antosiewicz, J.; McCammon, J. A.; Straatsma, T. P.; Gilson, M. K.; Briggs, J. M. *Biopolymers* 1996, 38, 109.
184. Kitisripanya, N.; Pachareenart, S.; Wolshann, P.; SHannongbua, S. *Nanomedicine* 2011, 7, 60.

185. Camps, P.; El achab, R.; Görbig, D. M.; Morral, J.; Muñoz-Torrero, D.; Badia, A.; Baños, J. E.; Vivas, N. M.; Barril, X.; Orozco, M.; Luque, F. J. J. *Med. Chem* 1999, 42.
186. Harel, M.; Quinn, M.; Nair, H. K.; Silman, I.; Sussman, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 2340.

ANEXOS

Anexo 1 : Artigo publicado no periódico indexado: Journal of Molecular Modeling

Electronic structure and PCA analysis of covalent and non-covalent acetylcholinesterase inhibitors

Érica Cristina Moreno Nascimento · João B. L. Martins

Received: 24 June 2010 / Accepted: 25 August 2010 / Published online: 14 September 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Hartree-Fock and density functional methods were used to analyze electronic and structural properties of known drugs to evaluate the influence of these data on acetylcholinesterase inhibition. The energies of the frontier orbitals and the distances between the more acidic hydrogen species were investigated to determine their contributions to the activity of a group of acetylcholinesterase inhibitors. Electrostatic potential maps indicated suitable sites for drugs-enzyme interactions. In this study, the structural, electronic and spatial properties of nine drugs with known inhibitory effects on acetylcholinesterase were examined. The data were obtained based on calculations at the B3LYP/6-31+G(d,p) level. Multivariate principal components analysis was applied to 18 parameters to determine the pharmacophoric profile of acetylcholinesterase inhibitors. Desirable features for acetylcholinesterase inhibitor molecules include aromatic systems or groups that simulate the surface electrostatic potential of aromatic systems and the presence of a sufficient number of hydrogen acceptors and few hydrogen donors. PCA showed that electronic properties, including the HOMO-1 orbital energy, logP and aromatic system quantity, as well as structural data, such as volume, size and H-H distance, are the most significant properties.

Keywords Acetylcholinesterase inhibitors · Alzheimer's disease · B3LYP · Molecular modeling · PCA

É. C. M. Nascimento (✉) · J. B. L. Martins
Laboratório de Química Computacional, LQC,
Universidade de Brasília, Instituto de Química,
CP 4478,
Brasília, DF CEP 70904-970, Brazil
e-mail: ericamoreno@unb.br

Introduction

Given that the concentration of acetylcholine (ACh) is markedly reduced in patients with Alzheimer's disease (AD), the cholinergic hypothesis represents one of the most useful approaches in the design of new agents for the treatment of this progressive neurodegenerative disorder [1–6]. To maintain adequate levels of ACh inside the synaptic pocket, drugs have been used to inhibit the hydrolysis of acetylcholine by blocking the enzymatic action of acetylcholinesterase (AChE) [1].

AChE is a hydrolytic allosteric enzyme that anchors on the postsynaptic membrane in a tetrameric form [7]. The active site is approximately 20 Å in length (i.e., the gorge) and has four subsites. The Asp72 residue of the gorge is responsible for the molecular recognition of ACh. ACh hydrolysis into choline and acetic acid (Fig. 1) takes place at the catalytic site composed of the residues Ser200-Glu327-His440 located at the bottom of the *Torpedo californica* gorge [2, 8, 9].

Several acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) can prevent the acylation of the hydroxyl group of Ser200 of AChE [10–12]. In some cases, the hydrolysis of these inhibitors yields a carbamoyl ester that is more stable than the normal acetate form and less able to exit the active site [7, 10]. A number of AChEIs are reversible competitive inhibitors of acetylcholine, such as tacrine (THA) [1], donepezil (E2020) [2], rivastigmine (RIVA) [1], galantamine (GALA) [2] and physostigmine (PHYSO) [3].

Experimental and theoretical studies have been performed to develop new, more efficient AChEI drugs [4, 13–20]. Among these target species, huperzine A (HUPE) [21], tacrine dimer (DIMTHA) [22], metrifonate (METRI) and its metabolite dichlorvos (DDVP) [2] are seen as potential

(PDB code 1DX) [31], E2020 (PDB code 1EVE) [38], DIMTHA (PDB code 2CKM) [22], HUPE (PDB code 1VOT) [23] and RIVA (PDB code 1GQR) [39]. However, the three-dimensional structures of PHYSO, METRI and DDVP were not found in a complex with AChE, and so the structures were modeled using the GaussView 4.1 program [40]. All molecules were studied in the neutral form.

The pharmacophoric profile of the AChEI molecules was acquired using multivariate PCA. This method was used to correlate the studied AChEI molecules properties and their inhibitory activity as well as to reduce the data number of initial parameters to the most relevant electronic and structural properties. The 18 parameters used in PCA were the dipole, HOMO, HOMO-1, LUMO and LUMO + 1 energies, heteroatom charge, hydrogen charge of the most acidic atom, molecular volume (using GaussView program), distance between the most acid hydrogen atoms (H-H distance), logarithm of 1-octanol/water partition coefficient (logP), logarithm of aqueous solubility (logS), the number of hydrogen receptors and donors (H_{recp} and H_{don} , respectively), the number of aromatic rings, the LUMO-HOMO gap, molecular size (i.e., the largest intramolecular distance), rotation degrees of freedom and topological polar surface area. Note that optimized geometries were used. PCA was conducted using the auto-stepping method because the structural and electronic properties have different dimensions.

The main purpose of PCA is to explain the structure of variance and covariance of a random vector consisting of p -random variables through constructing linear combinations of original variables, which are called principal components (PC) and which are not correlated. Thus, the most important information and relevance of complex data can be viewed in a simplest way [41]. The study was conducted using the PCA auto scale method since the electronic and structural properties have very different dimensions. This method involves centering the data by the average and then these new values are divided by their standard deviation. Thus, each variable present zero mean and variance equal to one, giving the same significance for all variables [41]. We generated two PCA analyses, in the first case four principal components were generated for the entire data. Secondly, three principal components were generated, yielding a most representative system in relation to the total variance.

Results and discussion

Root mean square deviation (RMSD) of optimized geometries

The root mean square deviation (Table 1) was used to compare the variation of geometry in relation to PDB

structures (or input geometries). The RMSD values for DDVP, METRI and RIVA were larger than 1.000 Å for all methods used. This is probably due to the large degree of freedom of these molecules. The PDB of the complexed RIVA structure (1GQR) showed two fragments for the AChEI molecule [39]. This is likely the cause of its higher RMSD value. B3LYP/6-31+G(d,p) showed the smallest RMSD values for all AChEI molecules except DDVP, GALA and PHYSO. Therefore, this method could be used to study the geometrical data of the optimized structures.

The electronic structure of AChEI molecules

The results of the ChelpG charge analysis at RHF/6-31G*, RHF/6-31+G(d,p), B3LYP/6-31G* and B3LYP/6-31+G(d,p) levels for the AChEI optimized geometries are shown in Fig. 2. Figure 3 depicts the optimized geometries and dipole moments of the AChEI molecules at B3LYP/6-31+G(d,p).

In general, the ChelpG charge values do not appear to depend on which method and basis set was applied, as there is no significant difference among the obtained values. Therefore, the B3LYP/6-31+G(d,p) level was applied throughout this study. The ChelpG values (Fig. 2) for the two most acidic hydrogen atoms, H_a and H_b (see Fig. 3), showed the same trend for all methods and basis sets used. When connected to the same heteroatom, H_a and H_b had close values. Specifically, HUPE (Fig. 3c) and THA (Fig. 3d) were very similar. In most cases, when the H_a species was bonded directly to the heteroatom (i.e., N or O) with a large negative charge (e.g., PHYSO), the ChelpG charge was approximately 6.5 times greater than the ChelpG charge of H_b . Nitrogen and oxygen charges showed almost the same behavior for all basis sets and levels except for HUPE. HUPE had the largest dipole moment value (Fig. 3) caused by the two heteroatoms that have the largest ChelpG charge values of -1.013 and -0.670 au.

Throughout this study, results are reported for the most extended basis set, that is, 6-31+G(d,p) at the B3LYP level. The self-consistent field (SCF) orbital energy values of the HOMO orbital (Fig. 4) are higher than -5.95 eV except for the organophosphate irreversible inhibitors, DDVP and METRI, which exhibited the largest values of HOMO and HOMO-1. These are the most relevant orbitals for the interaction of the studied drugs with the AChE catalytic subsite. The make-up of the frontier orbitals may be crucial for the activity of these drugs vis-à-vis their target enzyme [14].

Comparing the LUMO energies of the AChEI molecules (Fig. 4), two different groups appear. The first group includes DDVP, RIVA, PHYSO and GALA with module values ranging from 0.30 eV to 0.60 eV. THA, DIMTHA, METRI, HUPE and E2020 constitute the second group and

Table 1 RMSD values (Å) between the PDB (or initial geometry) data and the theoretical results

	RHF/6-31G*	RHF/6-31+G(d,p)	B3LYP/6-31G*	B3LYP/6-31+G(d,p)
DDVP	2.287	2.586	2.418	2.578
METRI	3.077	3.012	3.020	3.003
HUPE	0.392	0.396	0.303	0.243
THA	0.156	0.148	0.150	0.140
DIMTHA	0.313	0.286	0.328	0.287
GALA	0.177	0.485	0.314	0.310
E2020	0.585	0.573	0.565	0.379
PHYSO	0.182	0.177	0.291	0.203
RIVA	4.354	4.236	4.331	4.312

have LUMO energies (or modules) ranging from 1.00 eV to 2.00 eV.

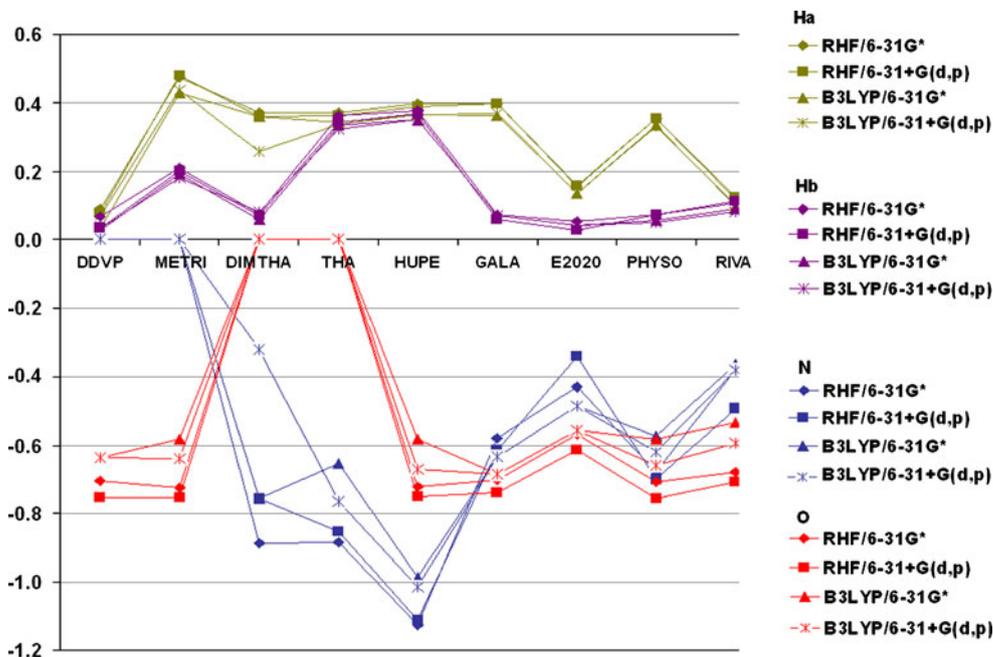
Frontier molecular orbital maps of AChEI molecules

It is reasonable to suppose that the interaction of AChEI molecules with the active site of AChE could be explained in terms of the frontier and inner orbitals. Furthermore, because the energy values of HOMO-1 are close to HOMO (Fig. 4), these orbitals were included in this study. Figure 5 shows the calculated B3LYP/6-31+G(d,p) HOMO, LUMO and HOMO-1 maps for the THA and DIMTHA structures. The other AChEIs showed almost the same pattern, and thus, only the most important differences are discussed.

The HOMOs of THA (Fig. 5a) and DIMTHA (Fig. 5b) are located on the hydrogen acceptor or donor groups of these molecules. To be exact, they are located around the nitrogen atoms and the aromatic systems. These groups of orbitals are probably the major orbitals responsible for

AChEI-AChE complex formation. E2020 has its HOMO distributed around the oxygen atoms of the two methoxy groups. GALA's HOMO is located near the most electro-negative atoms of the molecule, where the main contributions are from the region with the aromatic system and the oxygen atoms. The HOMO of HUPE is distributed over the aromatic system and heteroatoms, mainly in the region with carbonyl. Thus, this region may interact with molecules with high electron affinity. PHYSO and RIVA have their HOMOs outside the carbamate moiety. In both cases, these orbitals are mainly located at the benzene ring and the tertiary amine.

The HOMOs of DDVP and METRI are located mainly on the most negative oxygen atom (i.e., the one bonded to the phosphorous atom) as well as above the double bond where the π electron contribution of the DDVP molecule is found. The differences in the behavior of the HOMO and the HOMO-1 of DDVP and METRI are due to the presence of a phosphorous atom. In conclusion, all studied AChEI

Fig. 2 ChelpG charge values for AChEI molecules at RHF and B3LYP levels using 6-31G* and 6-31+G(d,p) basis sets

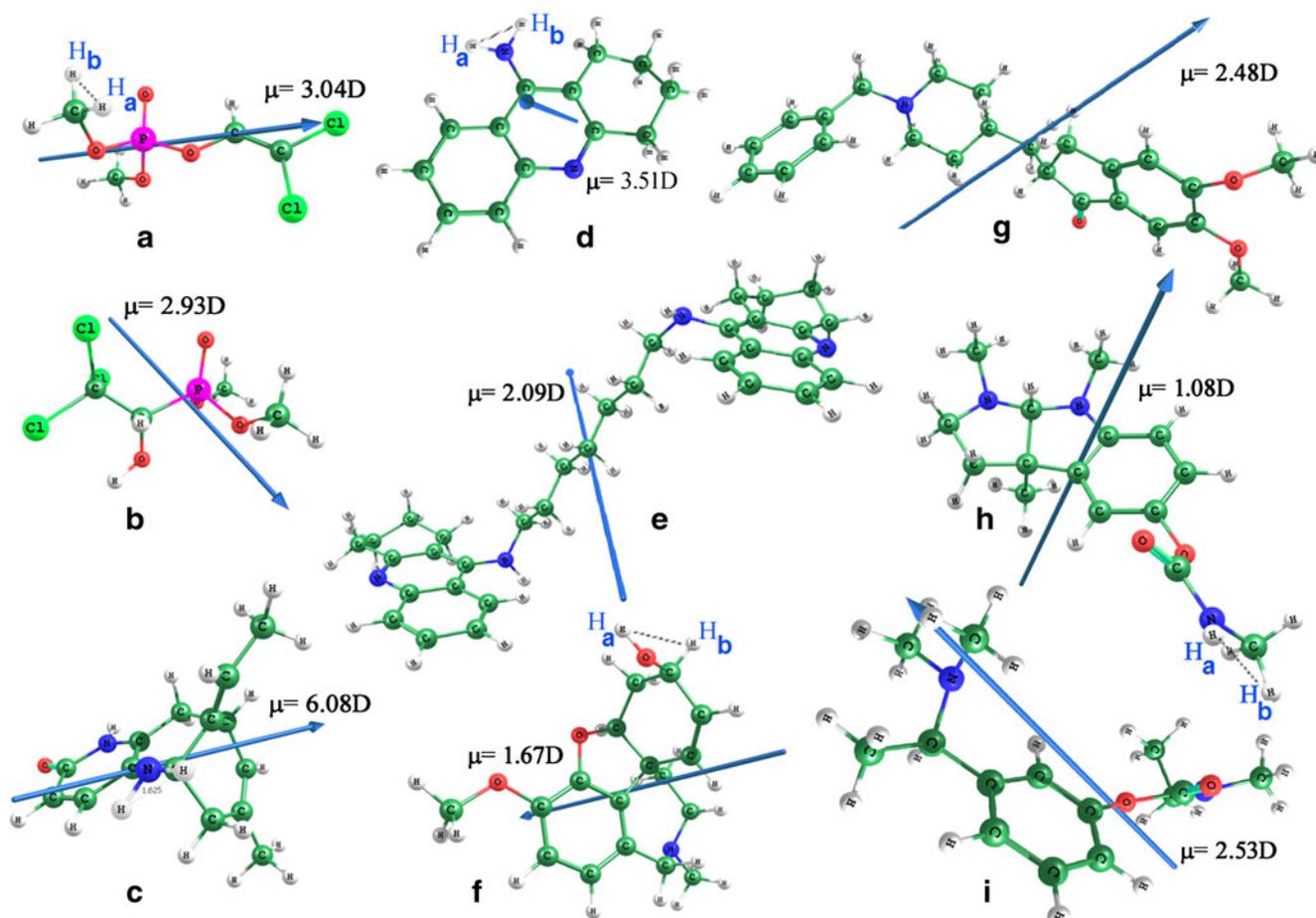


Fig. 3 Dipole and optimised structures of AChEI molecules at the B3LYP/6-31+G(d,p) level. (a) DDVP, (b) METRI, (c) HUPE, (d) THA, (e) DIMTHA, (f) GALA, (g) E2020, (h) PHYSO, (i) RIVA

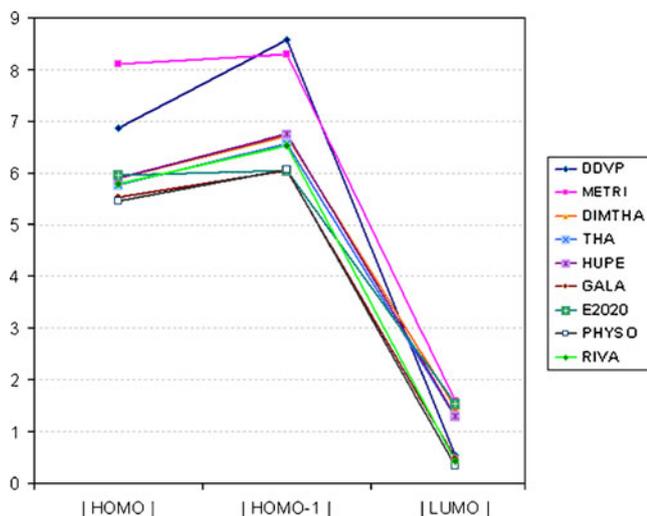


Fig. 4 HOMO, LUMO and HOMO-1 energy values of AChEI molecules at the B3LYP/6-31+G(d,p) level, in eV

molecules have their HOMO located in regions of higher electronegativity except in the case of dichlorvos.

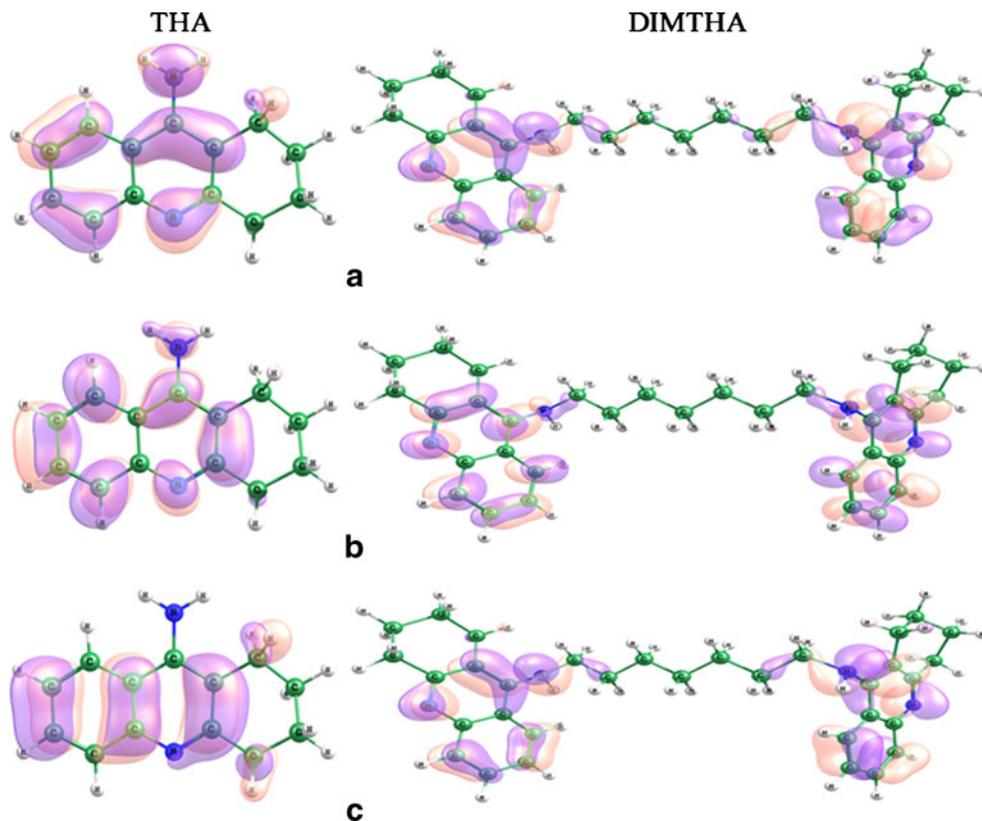
The LUMOs (Fig. 5) of THA and DIMTHA have the same distribution as the HOMOs. RIVA has a LUMO located in the opposite side of the HOMO. However, the most acidic hydrogen atoms of THA, RIVA, HUPE and GALA are inside the LUMO contribution region. According to previous literature [31, 39], RIVA and GALA show hydrogen interaction with the catalytic triad of AChE.

The HOMO-1 orbital (Fig. 5) is located in a region different from their HOMO and LUMO orbitals. Herlem et al. [32] have suggested many analogues of GALA using molecular modifications in its HOMO-1, wherein substituent groups were added to nitrogen in the tertiary amine.

Molecular electrostatic potential (MEP)

Figure 6 shows the MEP maps of some of the studied AChEI molecules. The maps indicate regions of hydrogen bond interaction. In general, the regions that present high negative densities are able to transfer charges and interact

Fig. 5 (a) HOMO, (b) LUMO and (c) HOMO-1 maps of THA (left) and DIMTHA (right) molecules at the B3LYP/6-31+G(d,p) level



through π - π bonding with the aromatic systems from the AChE gorge residues.

As expected, the oxygen atoms of DDVP, METRI, HUPE, GALA, E2020, PHYSO and RIVA are in the regions of higher negative density. This fact suggests that these oxygen atoms can act as proton acceptors, thus participating in hydrogen bonding interaction with the catalytic triad of AChE or even taking part in a covalent bond with the hydroxyl group of Ser200 residue. These

oxygen bonds would yield a more stable ester that could remain inside the gorge [3]. The regions of low negative density are located mainly near the methyl groups. This suggests that these sites could interact with the aromatic residues of AChE.

For THA and DIMTHA (Fig. 6), there is a symmetric distribution of negative density, wherein the regions with the highest negative density surround nitrogen in the pyridine ring. Therefore, such molecules exhibit specific interaction with the active site of AChE. As suggested by Rydberg et al. [22], DIMTHA could interact with the AChE active site by means of van der Waals interactions. They have argued that this interaction occurs through stacking of the aromatic rings of the two tetrahydroaminoacridine units with the rings of Trp84 and Phe330, which are the residues of the anionic site, and Tyr70 and Trp279 in the peripheral binding site.

RIVA and E2020 display different behavior in relation to the other AChEI molecules. RIVA and E2020 have regions with lower negative density than the other inhibitors, but they have a small number of hydrogen donors. This may explain their high affinity with the active enzyme site [7].

The most acidic hydrogen atoms are located in the region with low negative density, as expected. The H-H distance shows no direct correlation with variations in the electrostatic potential of AChEIs (Fig. 6). These results suggest that AChEIs with an H-H distance between 1.625

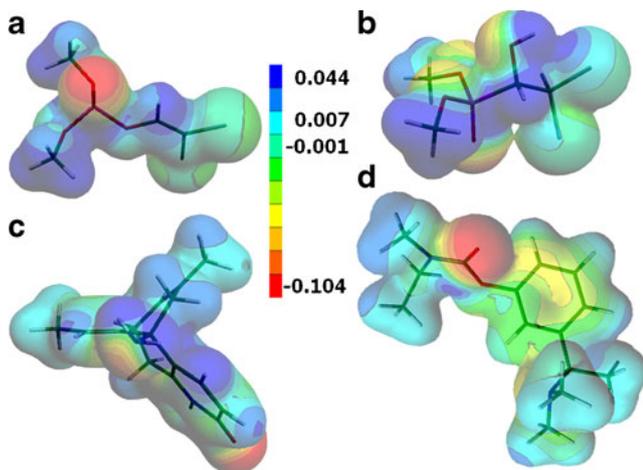


Fig. 6 Molecular electrostatic potential map, in a.u., calculated at the B3LYP/6-31+G(d,p) level for (a) DDVP, (b) METRI, (c) HUPE and (d) RIVA

and 2.460 Å and ΔEP between 0.185 and 0.305 a.u. are potential inhibitors of AChE.

Docking studies have indicated that the hydrogen atoms of RIVA [39], THA [8, 27], GALA [31] and HUPE [23] interact directly with the catalytic triad of AChE. Figures 5 and 6 show that the most acidic hydrogens (Fig. 3) located near the lowest negative density atoms are also inside the LUMO orbital for RIVA, THA, GALA and HUPE. Therefore, the interaction sites of AChEIs with the catalytic triad are located in the region with the most acidic hydrogens (Fig. 3).

Mapping the pharmacophoric profile of AChEIs using PCA

B3LYP/6-31+G(d,p) level results were subjected to PCA analysis. The PCA cumulative variance using four principal components, namely, PC1, PC2, PC3 and PC4, were 38.3, 59.2, 73.2 and 83.3%, respectively. To increase accuracy and to determine the most relevant properties, a systematic study was carried out for all possible combinations of 18 properties for all nine drugs.

The variable set was reduced to six and maintained the original sample space of nine objects (i.e., AChEIs); this set included molecular volume, molecular size, H-H distance, HOMO-1 energy, partition coefficient $\log P$ and the number of aromatic rings. The information that best describes the drugs may be represented by three principal components. Figure 7 depicts the $PC1 \times PC2$ and $PC1 \times PC3$ scores. PC1 comprises 63.5% of the variance, while PC2 accounts for 19.1% of the variance. PC3 accounts for 9.1% of the variance. Together, these three principal components satisfactorily account for more than 90% of the variance of the entire data set.

Equations 1, 2 and 3 show the calculated PC1, PC2 and PC3 coefficients. PC1 mainly represents drug volume and size, which are structural parameters. PC2 represents H-H

distance, which is also structural parameter. PC3 mainly consists of HOMO-1 orbital energy. All six properties listed are positive in PC1. In other words, the six properties contribute to the first principal component in Eq. 1.

$$PC1 = 0.4849_{\text{volume}} + 0.4666_{\text{Size}} + 0.1277_{\text{H-H}} + 0.3776_{\text{HOMO-1}} + 0.4162_{\log P} + 0.4636_{\text{Arom.}} \quad (1)$$

$$PC2 = -0.0106_{\text{volume}} + 0.0258_{\text{Size}} + 0.8822_{\text{H-H}} + 0.2767_{\text{HOMO-1}} - 0.3313_{\log P} - 0.1857_{\text{Arom.}} \quad (2)$$

$$PC3 = -0.3792_{\text{volume}} - 0.4129_{\text{Size}} - 0.1638_{\text{H-H}} + 0.7927_{\text{HOMO-1}} + 0.1820_{\log P} + 0.0420_{\text{Arom.}} \quad (3)$$

Figure 7 shows that PC1 tends to cluster the AChEI molecules by the six selected properties, forming groups of the well-defined AChEI molecules GALA, RIVA and PHYSO. The distribution along PC1 is reasonable because AChEIs with similar molecular volumes are considerably closer to one another (i.e., GALA, RIVA and PHYSO as well as HUPE and THA). AChEI molecules with smaller molecular volumes appear in the negative score region, while AChEIs with molecular volumes between 236 and 606 Å³ are in positive score regions.

In addition, PC2 is dominated by H-H distance, which separates compounds into two groups according to the distance between the two most acid hydrogen atoms. The first group has H-H values of less than 2.0 Å. The second group has H-H values of higher than 2.0 Å. Table 1 shows that E2020 has intermediate values for all properties except $\log P$, which has a negative coefficient and is the dispersion element of PC2.

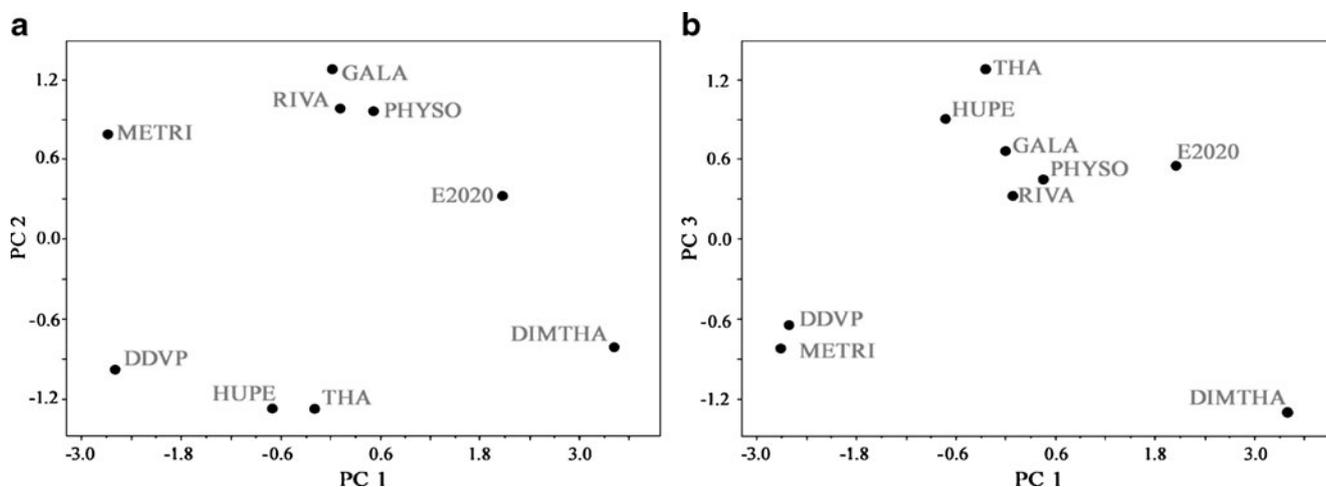


Fig. 7 (a) PC1 versus PC2 and (b) PC1 versus PC3 at the B3LYP/6-31+G(d,p) level using the six specified properties

There are two patterns in PC3 that group together DDVP and METRI together as well as GALA, PHYSO, and RIVA. These groupings can be explained by observing that PC3 is dominated by the orbital energy of HOMO-1. These molecules have similar HOMO-1 and molecular volume values (Table 1).

The equations generated through PCA indicate that the electronic properties are most important for the studied AChEI molecules. These include the energy of HOMO-1, logP and the number of aromatic rings. The structural parameters that also contribute strongly include volume, size and H-H distance of the molecules.

Conclusions

In accordance with the electronic and structural study of various acetylcholinesterase inhibitors presented in this paper, the following conclusions can be made. First, the polarity parameter can be used as an activity descriptor. Second, in addition to HOMO and LUMO, HOMO-1 also makes important contributions to inhibitor activity. Third, the electrostatic potential maps indicate suitable regions for effective binding with AChE by means of hydrogen bonding; they also identify appropriate regions for peripheral interaction. Fourth, the potential maps suggest that dichlorvos and carbamate derivatives have a covalent character in their interaction with the catalytic triad of AChE. Fifth, PCA showed that electronic properties, including the HOMO-1 orbital energy, logP and aromatic system quantity, as well as structural data, such as volume, size and H-H distance, are the most significant properties (i.e., these properties comprised the principal components of the pharmacophoric profiles of the studied AChEIs). According to these results, a good candidate for the inhibition of the acetylcholinesterase enzyme for the treatment of AD should include logP values between 0.8 and 4.9, logS between -5.0 and -1.5 and a polar surface area between 30.0 and 60.0 Å². The number of torsional degrees of freedom sufficient to rearrange the inhibitor adequately inside the AChE active site is also important. Other desirable features for AChEI molecules include aromatic systems or groups that simulate the surface electrostatic potential of aromatic systems and the presence of a sufficient number of hydrogen acceptors and few hydrogen donors. Furthermore, according to data obtained at the B3LYP/6-31+G(d,p) level, inhibitors should have an HOMO-1 orbital energy between -8.60 and -6.00 eV, molecular volumes between 180 and 650 Å³, molecular sizes between 7.0 and 20.0 Å and a distance between the two most acidic hydrogen between 1.600 and 2.500 Å. Together, all of these properties are critical to the pharmacophoric profiles of the studied AChEIs molecules.

Acknowledgments The authors are indebted to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia dos Materiais em Nanotecnologia, and Financiadora de Estudos e Projetos for financial support and Laboratório de Química Computacional/Universidade de Brasília (LQC/UnB) for computation support. The authors would like to thank Dr. Maria L. dos Santos/Universidade de Brasília for her assistance.

References

1. Sugimoto H, Ogura H, Arai Y, Iimura Y, Yamanishi Y (2002) Research and development of donepezil hydrochloride, a new type of acetylcholinesterase inhibitor. *Jap J Pharmacol* 89(1):7–20
2. Racchi M, Mazzucchelli M, Porrello E, Lanni C, Govoni S (2004) Acetylcholinesterase inhibitors: Novel activities of old molecules. *Pharmacol Res* 50(4):441–451
3. Camps P, Muñoz-Torrero D (2002) Cholinergic drugs in pharmacotherapy of alzheimer's disease. *Mini Rev Med Chem* 2(1):11–25
4. Tezer N (2005) Ab initio molecular structure study of alkyl substitute analogues of alzheimer drug phenserine: Structure-activity relationships for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory action. *J Mol Struct THEOCHEM* 714(2–3):133–136
5. Haviv H, Wong DM, Silman I, Sussman JL (2007) Bivalent ligands derived from huperzine a as acetylcholinesterase inhibitors. *Curr Top Med Chem* 7(4):375–387
6. Dvir H, Wong DM, Harel M, Barril X, Orozco M, Luque FJ, Muñoz-Torrero D, Camps P, Rosenberry TL, Silman I, Sussman JL (2002) 3d structure of torpedo californica acetylcholinesterase complexed with huprine × at 2.1 angstrom resolution: Kinetic and molecular dynamic correlates. *Biochemistry* 41(9):2970–2981
7. Patrick GL (2005) Medicinal chemistry, 3rd edn. New York, Oxford
8. Harel M, Schalk I, Ehretsabatier L, Bouet F, Goeldner M, Hirth C, Axelsen PH, Silman I, Sussman JL (1993) Quaternary ligand-binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc Nat Acad Sci USA* 90:9031–9035
9. Koellner G, Kryger G, Millard CB, Silman I, Sussman JL, Steiner T (2000) Active-site gorge and buried water molecules in crystal structures of acetylcholinesterase from torpedo californica. *J Mol Biol* 296(2):713–735
10. Alcaro S, Scipione L, Ortuso F, Posca S, Rispoli V, Rotiroti D (2002) Molecular modeling and enzymatic studies of the interaction of a choline analogue and acetylcholinesterase. *Bioorg Med Chem Lett* 12(20):2899–2905
11. Hurley MM, Wright JB, Lushington GH, White WE (2003) Quantum mechanics and mixed quantum mechanics/molecular mechanics simulations of model nerve agents with acetylcholinesterase. *Theor Chem Acc* 109(3):160–168
12. Zhang YK, Kua J, McCammon JA (2002) Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: An ab initio qm/mm study. *J Am Chem Soc* 124(35):10572–10577
13. Bolognesi ML, Bartolini M, Cavalli A, Andrisano V, Rosini M, Minarini A, Melchiorre C (2004) Design, synthesis, and biological evaluation of conformationally restricted rivastigmine analogues. *J Med Chem* 47(24):5945–5952
14. de Paula AAN, Martins JBL, dos Santos ML, Nascente LD, Romeiro LAS, Areas T, Vieira KST, Gamboa NF, Castro NG, Gargano R (2009) New potential ache inhibitor candidates. *Europ J Med Chem* 44(9):3754–3759
15. de Paula AAN, Martins JBL, Gargano R, dos Santos ML, Romeiro LAS (2007) Electronic structure calculations toward

- new potentially ache inhibitors. *Chem Phys Lett* 446(4–6):304–308
16. Han DX, Yang P (2004) A new method for ranking tacrine derivatives binding affinities with acetylcholinesterase via finite difference thermodynamic integration. *J Mol Struct THEOCHEM* 668:25–28
 17. Nascimento ECM, Martins JBL, dos Santos ML, Gargano R (2008) Theoretical study of classical acetylcholinesterase inhibitors. *Chem Phys Lett* 458(4–6):285–289
 18. Senapati S, Cheng YH, McCammon JA (2006) In-situ synthesis of a tacrine-triazole-based inhibitor of acetylcholinesterase: Configurational selection imposed by steric interactions. *J Med Chem* 49(21):6222–6230
 19. Sippl W, Contreras JM, Parrot I, Rival YM, Wermuth CG (2001) Structure-based 3d qsar and design of novel acetylcholinesterase inhibitors. *J Comput Aided Mol Des* 15(5):395–410
 20. Tai KS (2004) Simulations on many scales: The synapse as an example. *Pure Appl Chem* 76(2):295–302
 21. Barak D, Ordentlich A, Kaplan D, Kronman C, Velan B, Shafferman A (2005) Lessons from functional analysis of ache covalent and noncovalent inhibitors for design of ad therapeutic agents. *Chem Biol Interact* 157:219–226
 22. Rydberg EH, Brumshtein B, Greenblatt HM, Wong DM, Shaya D, Williams LD, Carlier PR, Pang YP, Silman I, Sussman JL (2006) Complexes of alkylene-linked tacrine dimers with torpedo californica acetylcholinesterase: Binding of bis(5)-tacrine produces a dramatic rearrangement in the active-site gorge. *J Med Chem* 49(18):5491–5500
 23. Raves ML, Harel M, Pang YP, Silman I, Kozikowski AP, Sussman JL (1997) Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine a. *Nat Struct Biol* 4(1):57–63
 24. Sugimoto H, Yamanishi Y, Imura Y, Kawakami Y (2000) Donepezil hydrochloride (e2020) and other acetylcholinesterase inhibitors. *Curr Med Chem* 7(3):303
 25. Zhu WL, Gu JD, Jiang HL, Chen JZ, Liu DX, Lin MW, Chen KX, Ji RY, Cao Y (1998) Ir spectrum and normal mode analysis of the anti-alzheimer's disease natural product huperzine a: A quantum chemistry density-functional theory (dft) investigation. *Sci China Ser B-Chem* 41(6):616–622
 26. Zhu WL, Jiang HL, Chen JZ, Gu JD, Liu DX, Lin MW, Chen KX, Ji RY, Cao Y (1998) Characteristics of huperzine a structure in huperzine a acetylcholinesterase complex - a quantum chemistry study. *Acta Chim Sin* 56(3):233–237
 27. Proctor GR, Harvey AL (2000) Synthesis of tacrine analogues and their structure-activity relationships. *Curr Med Chem* 7(3):295–302
 28. Kaur J, Zhang MQ (2000) Molecular modelling and qsar of reversible acetylcholinesterase inhibitors. *Curr Med Chem* 7(3):273–294
 29. Wlodek ST, Antosiewicz J, McCammon JA, Straatsma TP, Gilson MK, Briggs JM, Humblet C, Sussman JL (1996) Binding of tacrine and 6-chlorotacrine by acetylcholinesterase. *Biopolymers* 38(1):109–117
 30. Barril X, Orozco M, Luque FJ (2001) Towards improved acetylcholinesterase inhibitors: A structural and computational approach. *Mini Reviews in Med Chem* 1:255–266
 31. Greenblatt HM, Kryger G, Lewis T, Silman I, Sussman JL (1999) Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 angstrom resolution. *FEBS Lett* 463(3):321–326
 32. Herlem D, Martin MT, Thal C, Guillou C (2003) Synthesis and structure-activity relationships of open d-ring galanthamine analogues. *Bioorg Med Chem Lett* 13(14):2389–2391
 33. Kone S, Galland N, Graton J, Illien B, Laurence C, Guillou C, Le Questel JY (2006) Structural features of neutral and protonated galanthamine: A crystallographic database and computational investigation. *Chem Phys* 328(1–3):307–317
 34. Mizutani MY, Itai A (2004) *J Med Chem* 47:4818
 35. Afifi AAC (1990) *Computer-aided multivariate analysis*. Chapman & Hall, New York
 36. Prado MAS, Garcia E, Martins JBL (2006) Theoretical study of cytosine-mg complex. *Chem Phys Lett* 418(1–3):264–267
 37. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JA, Montgomery J, Vreven T, Kudin KN, Burant JC, Millam JM, Iyengar SS, Tomasi J, Barone V, Mennucci B, Cossi M, Scalmani G, Rega N, Petersson GA, Nakatsuji H, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Klene M, Li X, Knox JE, Hratchian HP, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Ayala PY, Morokuma K, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Zakrzewski VG, Dapprich S, Daniels AD, Strain MC, Farkas O, Malick DK, Rabuck AD, Raghavachari K, Foresman JB, Ortiz JV, Cui Q, Baboul AG, Clifford S, Cioslowski J, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Martin RL, Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW, Johnson B, Chen W, Wong MW, Gonzalez C, Pople JA (2004) *Gaussian 03, Rev. D1*. Gaussian Inc, Pittsburgh
 38. Kryger G, Silman I, Sussman JL (1999) Structure of acetylcholinesterase complexed with e2020 (aricept (r)): Implications for the design of new anti-alzheimer drugs. *Structure* 7(3):297–307
 39. Bar-On P, Millard CB, Harel M, Dvir H, Enz A, Sussman JL, Silman I (2002) Kinetic and structural studies on the interaction of cholinesterases with the anti-alzheimer drug rivastigmine. *Biochemistry* 41(11):3555–3564
 40. Frisch A, II RDD, Keith TA, Millan J (2007) *Gaussview4.1*. Gaussian Inc, Wallingford
 41. Jolliffe IT (2002) *Principal component analysis*. Springer, New York

Anexo 2

Capítulo de livro publicado no livro “Principal Componente Analysis – Multidisciplinary Applications”.

Pharmacophoric Profile: Design of New Potential Drugs with PCA Analysis

Érica C. M. Nascimento and João B. L. Martins
*Universidade de Brasília, LQC, Instituto de Química
Brazil*

1. Introduction

Searching for the pharmacophoric profile based on the concepts of chemical and structural contribution of the receptor active sites as well as receptor ligand interactions are fundamental for the development of new potential drugs for several different diseases and body dysfunctions such as degenerative brains disorders, Alzheimer disease, Parkinson's, diabetes Mielittus, cancer and many others known sickness conditions.

Basically, a pharmacophore describes the main molecular features regarding the recognition of a ligand by a biological macromolecule. In accord to the IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) Pharmacophore can be considered as "the largest common denominator shared by a set of active molecules to specific biological target" (Wermuth et al., 1998).

A pharmacophore is defined by the pharmacophoric descriptors that are a set of electronic, structural, electrostatic and topological properties. Those descriptors can be obtained by experimental and theoretical studies. Experimental studies like X-ray crystallography, spectroscopic measurements are used to define some atomic properties of a molecule, but need a previous job - a synthesis of such molecule. Thus, in this way theoretical studies eliminate this previous job the *in silico* experiments or the theoretical studies are important tools to know a molecule before this one gets synthesized.

In modern computational chemistry, pharmacophores are used to define the essential features of one or more molecules with the same biological activity. In the past few years, it has been common that the drug discovery has a contribution from pharmacophore modeling to identify and develop new potential molecules with desired biological effect (Steindl et al., 2006).

Therefore, in order to enhance the insights to identify potential new medicinal drugs many computational strategies are widely used (Steindl et al., 2006; Tasso, 2005). Mathematics and chemical molecular modeling applied on bioinformatics are important examples of these strategies. Multivariate analysis (principal component analysis - PCA) and quantum chemistry calculations (density functional theory - DFT) are some of them, and can led to the identification of the main information required to describe the essential pharmacophore profile.

PCA has been used to find new potential molecules in a series of biological systems (Carotti et al., 2003; de Paula et al., 2009; Nascimento, et al., 2011). It is a method abundantly used in a lot of multivariate analysis (Jolliffe, 2002). This method has two main aims: to decrease variable sets in the problems of multivariate data and to select the best properties (linearly independents) that describe the system (principal components). According to Jolliffe (Jollife, 2002) the central idea of PCA analysis "is to reduce the dimensionality of a data set in which there are a large number of interrelated variables, while retaining as much as possible of the variation present in the data set. This reduction is achieved by transforming to a new set of variables, the principal components, which are uncorrelated, and which are ordered so that the first *few* retain most of the variation present in *all* of the original variables. Computation of the principal components reduces to the solution of an eigenvalue-eigenvector problem for a positive-semidefinite symmetric matrix".

Although it may seem a simple technique, PCA can be applied in a lot of problems with several variables, such as the problems involving the determination of the pharmacophoric profile of a particular class of molecules.

There are different pretreatment methods for the data analysis, e.g., mean-centering and autoscaling. This work covers the second method. The autoscaling is very similar to the mean-centering with additional paths.

First, it is calculated the mean of the data matrix \mathbf{X} , where the columns correspond to the variables and the lines are the samples (or objects). The mean is the j^{th} column vector of a data matrix:

$$\bar{x}_n = \frac{1}{M} \sum_{m=1}^M x_n \quad (1)$$

After mean-centering the standard deviation (Equation 2) for each column is calculated and the autoscaling is obtained by the division of standard deviation (Equation 3).

$$s_n^2 = \frac{1}{M-1} \sum_{m=1}^M (x_n - \bar{x}_n)^2 \quad (2)$$

$$\bar{x}_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{s_i} \quad (3)$$

Within the autoscaling all variables are adjusted to the same range, such that each variable has a zero mean, while the standard deviation is one. Therefore, autoscaling is important for data set where the variables have different units.

DFT is a method to investigate the electronic structure of many-body systems, like atoms and molecules (Cramer, 2004). This method can be used to calculate electronic and structural properties of molecules with biological activity like new drugs to treat a disease. Applying functional that are spatially dependent on the electronic density of multi-electronics systems.

The application of human and economic resources to improve life quality has promoted benefits and has led to the increasing on the number of diseases known as age-dependent.

Among these diseases the most frequently are the dementias, diabetes and cardiovascular disease. Among the several types of dementia existing and the most common incidents in the population over 60 years of age are Alzheimer's disease (AD), vascular dementia and Pick's disease. It is estimated that 45 million people worldwide have some kind of dementia, among these, 18 million have symptoms characteristic of Alzheimer's disease. AD is a disease that has no determined cause, and therefore their treatment is based on drugs that only treat the disease in order to remediate the cognitive functions and slow down the degenerative advance. (Sugimoto, 2002)

AD is a kind of dementia that affects neural cognitive function. Thus, one of the most widely used strategies for the treatment of this disease consists in blocking off the hydrolysis (Figure 1) of the neurotransmitter acetylcholine in cholinergic synapses of neurons, this strategy is called cholinergic hypothesis, nowadays a major target in the development of drugs that benefits and improves the chemical balance of the concentration of acetylcholine in patients with AD (Tezer, 2005; Camps, 2005; Costantino, 2008).

Some drugs act as inhibitors of AChE, among them, tacrine first drug approved by FDA for the treatment of AD (Sugimoto, 2002; UI-haq, 2010), followed by donepezil (Sippl, 2001), rivastigmine (Sugimoto, 2002; UI-haq, 2010) and galantamine (Sippl, 2001). Other drugs have been clinically studied and tested for use in the treatment of AD, such as physostigmine (Sippl, 2001; UI-haq, 2010; Bartolucci, 2006). Some others are being tested and are promising candidates for the approval, including, Huperzine A (Patrick, 2005; Barak, 2005), metrifonate (Sippl, 2001) and phenserine (Sippl, 2001; UI-haq, 2010). These drugs are indicated to treat mild to moderate stages of AD, when the patient still has independent cognitive activity.

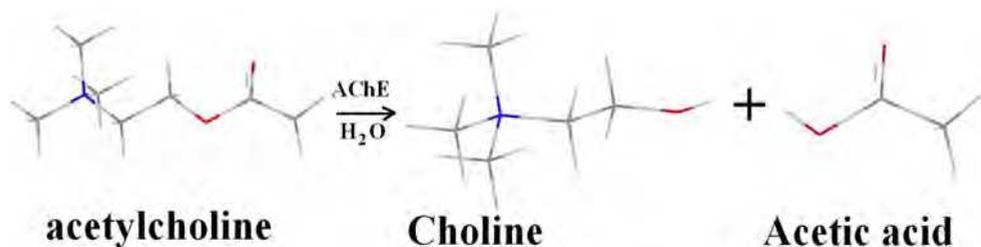


Fig. 1. Hydrolysis of acetylcholine

Chemically, the inhibitors mentioned above have in common the inhibitory action of AChE, but have different structure and chemical nature. The geometries of some AChEIs are shown in Figure 2. Organophosphates, alkaloids and acridines, are some of the classes of drugs that inhibit acetylcholinesterase and are used in the treatment of AD. This raises the question: what are the electronic, structural, topological and chemical properties that correlate these different classes of drugs as inhibitors of the same biological target?

The brain is the most complex system of the human body and main focus of biochemical and neuromolecular studies of the twenty -first century. The research and development of drugs that act more effectively in the treatment and the study of brain's diseases mechanisms are subject to various areas of knowledge.

PCA have been used to find new potential molecules in a series of biological systems (Carotti, 2003; de Paula, 2009; de Paula, 2007; Li, 2009; Nascimento, 2011; Nascimento, 2008; Rocha, 2011; Steindl, 2005). A methodology based on PCA for the pharmacophore identification of the acetylcholinesterase inhibitors (AChEI) was recently used (de Paula, 2009; de Paula, 2007; Fang, 2011; Nascimento, 2011; Nascimento, 2008). In this chapter the electronic, structural, topological and chemical properties of studied molecules, were taken from the theoretical procedures and related to the activity by means of the multivariate analysis PCs that provides the pharmacophoric profile of these AChEIs.

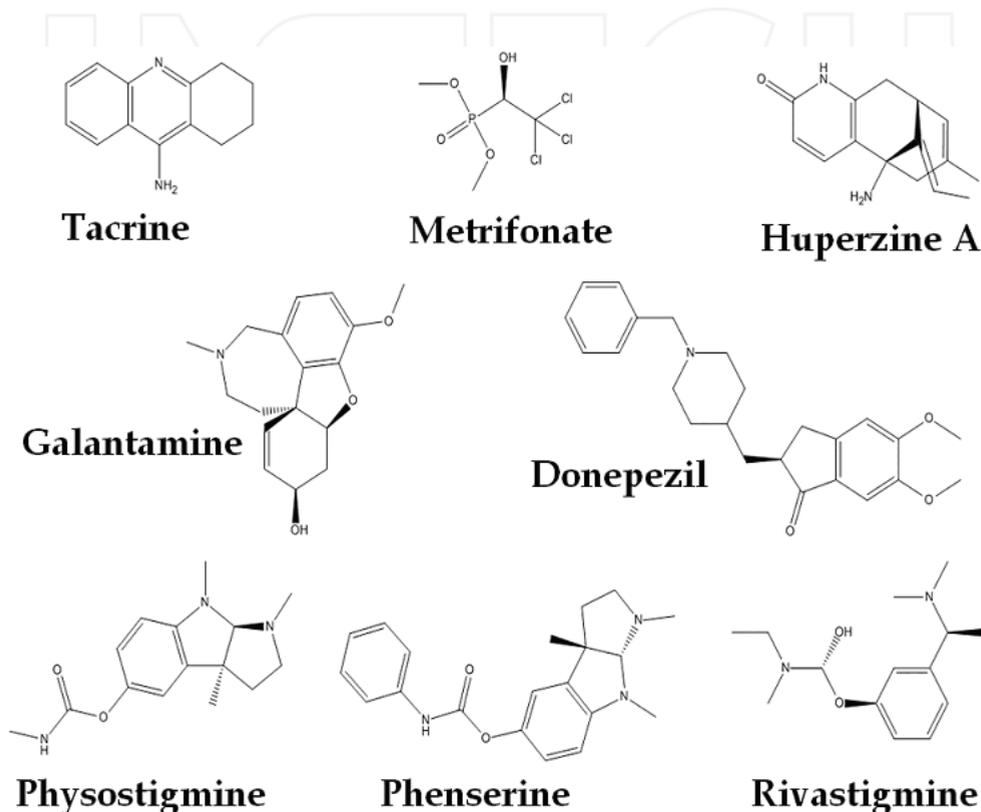


Fig. 2. Structures of some acetylcholinesterase inhibitors.

2. Mapping the pharmacophoric profile of acetylcholinesterase inhibitors

2.1 Acetylcholinesterase inhibitors, the AChEIs molecules

The cholinesterase inhibitors can be used for various purposes, as chemical warfare weapons such as sarin gas, in diseases treatment, e.g., the Alzheimer's disease treated with rivastigmine. There were used two different concepts to the rational design of inhibitors of this enzyme:

- drugs that have the molecular recognition in the catalytic site of AChE, doing preferably covalent bonds with the hydroxyl of the serine residue 200, this bond may be reversible or irreversible;
- drugs that are recognized by the to active site of the enzyme, which act by blocking the entry of the natural substrate, the neurotransmitter acetylcholine at the active site of AChE.

Some drugs that inhibit the function of the enzyme have also neuroprotective function, acting more effectively in the AD treatment. These drugs act in a negative way in the process of hyperphosphorylation of β -amyloid protein, inhibiting the breakdown of this protein and consequently the formation of amyloid plaques.

The inhibitors tacrine (THA), donepezil (E2020), rivastigmine (RIVA), galantamine (GALA), metrifonate (METRI), dichlorvos (DDVP), phenserine (PHEN), physostigmine (PHYSO), huperzine A (HUPE) and the tacrine dimer (DIMTHA) been studied theoretically by means of molecular modeling. From these studies, the mapping of pharmacophoric profile of these AChEIs was important to elucidate the correlation of such molecules as drugs to treating Alzheimer's disease.

2.2 Molecular modeling

Molecular modeling is one of the fields of theoretical chemistry that has been a great development in recent decades. The rational drug design is an area of application of molecular modeling of high relevance. Predict computationally a molecule with pharmacological activity and a drug candidate brings the expectation of reducing the search time and the cost in the molecular synthesis process and the clinical tests *in vitro* and *in vivo*.

The molecular modeling is characterized by applications of classical mechanics, quantum mechanics and stochastic methods like Monte Carlo in chemical and biochemical systems. One possibility is the prediction of spatial behavior and chemical interaction between a receptor and its biological substrate (ligand). Another is the calculation of molecular properties relevant to determining how this interaction takes place. Modeling the system receptor-ligand (RL) is possible to obtain important information about the interactions. These RL interactions establish the functionality of a given molecule. However, only the studies of interactions do not provide enough parameters to the development of new ligand.

The properties of a molecule can be obtained by theoretical calculations using classical mechanics and quantum mechanics. In the molecular mechanics approach, the classical mechanics deals with the problem without taking into account the electrons. Thus, electronic properties can only be treated by methods of electronic structure by means of quantum mechanical calculations. The main properties that describe a molecule are classified according to how it is defined spatially.

With the development of computational tools (hardware and software) it is possible today to treat complex molecular systems using approximate methods of quantum theory. Quantum mechanics considers that the energy of a molecule can be described as a sum of terms of energy resulting from electrostatic interactions between core and electrons (kinetic and potential energy). The fundamental postulate of quantum mechanics describes a wave function for each chemical system where a mathematical operator can be applied to this

function resulting in observable properties of such system. Equation 4 is the focus of the study of quantum methods for the description of chemical systems and is known as the Schrödinger equation, independent of time and without relativistic corrections;

$$H\Psi = E\Psi \quad (4)$$

where H is a mathematical operator that returns the energy eigenvalue of the system as an operator called the Hamiltonian. Ψ is the wave function that describes the system state from the coordinates of the positions of nuclei and electrons of the atoms in the molecule. E is the eigenvalue, and represents the total energy of the system.

2.2.1 Computational modeling of AChEIs

The theoretical studies of AChEIs were performed using the Gaussian03 program package (Frisch, 2004) in order to determine the best electronic and geometrical parameters of AChEIs molecules. Was have used DFT at the B3LYP hybrid functional level with 6-31+G(d,p) basis set. The geometries of the target drugs were first optimized using internal coordinates in order to minimize all geometric data.

AChEI structures were taken from Protein Data Bank (PDB). Specifically, the structure of AChEI complexed with AChE included the inhibitors tacrine (PDB code 1ACJ), galantamine (PDB code 1DX), donepezil (PDB code 1EVE), tacrine dimer (PDB code 2CKM), huperzine A (PDB code 1VOT) and rivastigmine (PDB code 1GQR). However, the three-dimensional structures of physostigmine, phenserine, metrifonate and dichlorvos were not found in a complex with AChE, and so the structures were modeled using the GaussView 4.1 program.

In order to analyze the activity of such AChEIs, we have computed the electronic and structural properties of those molecules: dipole, frontier molecular orbital energies Highest Occupied Molecular Orbital and Lowest Unoccupied Molecular Orbital (HOMO, HOMO-1, LUMO and LUMO+1), charge of heteroatoms, charge of most acid hydrogens, volume, distance between the most acid hydrogens - H-H, molecule size, LogP (partition coefficient/lipophilicity), LogS (solubility), number of H-bond acceptors, number of H-bond donors, number of aromatic rings, gap (HOMO-LUMO), and map of electrostatic potential (MEP). The charge used was from the ChelpG (i.e., the charge from electrostatic potentials using a grid-based method) population analysis.

2.3 Electronic structure of AChEI molecules

Table 1 shows the values for some calculated properties for the studied AChEIs. The values of the HOMO orbital energies are different when comparing the organophosphate DDVP and METRI (higher values) and other AChEIs. Thus, the values of the orbital HOMO-1 energy for these organophosphates are almost similar while the values of this energy for other AChEIs, structurally different, are between -6.04 and -6.75, indicating that this orbital may be important in process of interaction of these drugs with acetylcholinesterase.

Properties such as volume, size of the molecule, logP and dipole have different values for each AChEI. Although some of these molecules are of the same class, the calculated values for the same property changes sharply, as the volume between DDVP and METRI.

	DDVP	METRI	DIMTHA	THA	HUPE	GALA	E2020	PHYSO	RIVA	PHEN
Dipole (D)	3.04	2.93	2.09	3.51	6.08	1.67	2.48	1.08	2.53	1.85
Charge H ⁺ (ua)	0.070	0.438	0.260	0.339	0.365	0.371	0.136	0.333	0.103	0.281
Charge N (ua)	0	0	-0.320	-0.766	-1.013	-0.632	-0.484	-0.619	-0.378	-0.753
Charge O (ua)	-0.638	-0.639	0	0	-0.670	-0.685	-0.554	-0.659	-0.594	-0.505
HOMO (eV)	-6.86	-8.11	-5.90	-5.76	-5.90	-5.53	-5.95	-5.46	-5.79	-5.23
HOMO-1 eV)	-8.57	-8.30	-6.71	-6.56	-6.75	-6.04	-6.05	-6.08	-6.53	-6.43
LUMO (eV)	-0.54	-1.59	-1.47	-1.28	-1.30	-0.48	-1.53	-0.33	-0.43	0.52
LUMO+1(eV)	0.42	0.70	-0.58	-0.46	0.36	-0.14	-0.48	-0.07	0.21	0.51
GAP (eV)	6.32	6.52	4.47	4.49	4.60	5.53	4.41	5.12	5.36	5.75
H-H (Å)	1.796	2.307	1.998	1.683	1.625	2.373	2.342	2.324	2.460	2.250
Volume (Å ³)	185	207	606	236	286	329	454	321	312	332
Size (Å)	7.849	7.068	19.386	9.516	9.051	10.290	12.281	12.927	11.242	14.808
logP	1.66	0.80	3.88	3.13	2.60	1.39	4.14	1.94	2.86	2.99
logS	-1.44	-1.77	-4.98	-3.16	-2.47	-2.23	-4.93	-2.44	-1.89	-4.2
PSA(Å ²)	44.8	55.8	58.5	38.9	58.9	41.9	38.8	44.8	32.8	44.9
H-donnor	0	1	4	2	2	1	0	1	0	1
H-acceptor	4	4	4	2	4	4	4	5	4	5
Aromatic ring	4	0	4	2	1	2	2	2	1	1

H⁺: most acid hydrogen of the molecule. H-H: distance between the most acid hydrogens.

Table 1. Electronic and structural data of AChEIs from B3LYP/6-31+G(d,p) level of calculation.

The distribution of frontier orbitals in the molecule is important to determine which atoms are most relevant for the interaction between the ligand and the receptor, during the activity of such drug with the biological target. Figure 3 shows the regions of the frontier orbitals of RIVA. The LUMO of RIVA is located in an unusual region for orbitals poor in electrons, since the benzyl ring is by definition the region of high electronic density. RIVA have the HOMO and LUMO in the opposite region of carbamate moiety.

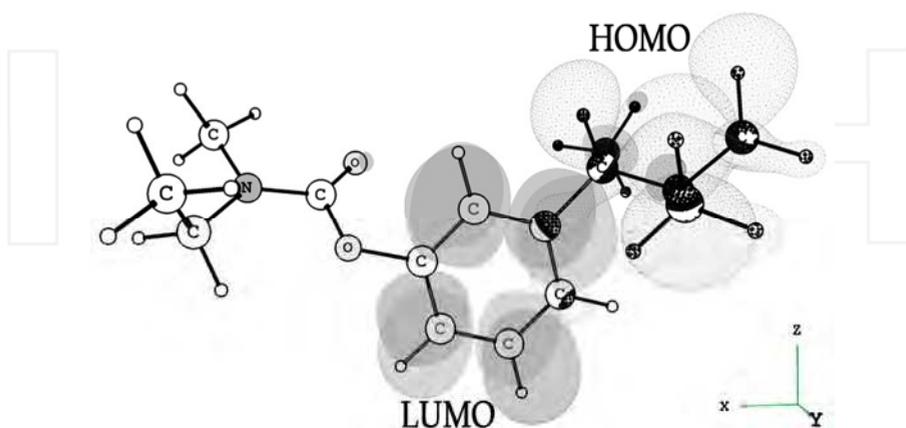


Fig. 3. HOMO and LUMO of RIVA calculated at B3LYP/6-31+G (d,p) level.

Figure 4 shows the MEP for all drugs studied. The maps indicate that all AChE have well-defined regions of high electron density (red) and low density (dark blue). These regions are likely points of interaction with AChE through electrostatic interactions like hydrogen bonding. Other electron density regions of AChE present mostly negative, indicating that these regions may have electrostatic interactions such as charge transfer, interactions with π - π systems of aromatic residues in the active site of AChE. According to the literature (2003; de Paula et al., 2009; Nascimento, et al., 2011) RIVA interacts with the Ser200 residue of the catalytic triad through the carbamoyl moiety.

The regions of highest electronic density are located under the oxygen atoms in DDVP, METRI, HUPE, GALA, E2020, PHYSO, RIVA suggesting that these oxygens are receptors of hydrogens that can share in interactions, such as hydrogen bonding with the residues of the AChE catalytic triad or promoting covalent bonds, with the hydroxyl group of Ser200 (Camps, 2002). The rivastigmine (Figure 4h) and donepezil (Figure 4f) have more regions with low electronic density than other drugs, which is important for the interaction with the receptor site. The molecular volume is an important descriptor for drug design, and it is shown that some inhibitors are more linear which should improve the binding to two or more parts of the enzyme.

2.4 Mapping of the pharmacophoric profile of AChEIs via PCA

The mapping of pharmacophoric profile of AChEIs was conducted by means of PCA analysis, using of the data set obtained from calculations of the properties obtained for each molecule. For the analysis of principal components the geometry optimizations were performed at the level B3LYP/6-31 + G (d, p). The properties amount is shown in Table 1.

PCA was used to correlate 18 properties of 10 AChEI molecules to reduce the initial parameter set and determine the most relevant data for the acetylcholinesterase inhibition. PCA was conducted using the autoscaling method because the structural and electronic properties have different dimensions.

Since the structural and electronic properties have very different dimensions, autoscaling method is required. This normalization method consists in moving and stretching axes, centering the data on average and divides them by their standard deviation. Thus, each variable present zero mean and variance equal 1, giving the same significance for all variables (Jolliffe, 2002).

The first PCA showed that 83.3% on average of the information set formed by 10 AChEIs and 18 properties, obtained through the calculation performed in this work can be represented by four principals components (38.3% variance to PC1; 59.2% cumulative variance to PC2, 73.2% cumulative variance to PC3, 83.3% cumulative variance to PC4).

In studies of systems of many variables with PCA, it is desirable the lowest possible number of principal components that properly represent over 90% of cumulative variance. Thus, to increase the accuracy and determine the principal components we have used all combinations of 18 properties for the 10 AChEIs studied. Then the PCA was taken from the most relevant properties in relation to the total variance with the lower number of principal components.

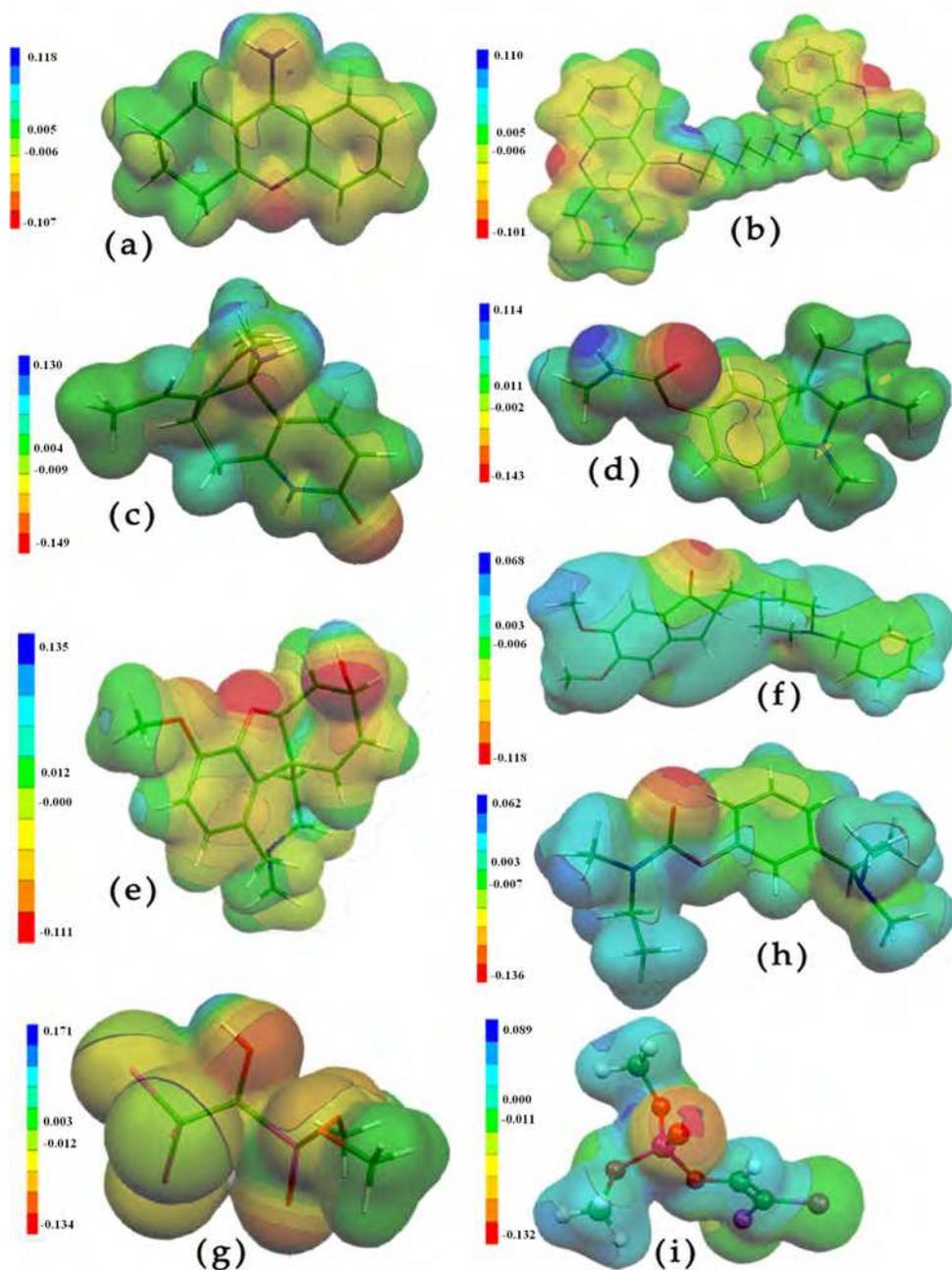


Fig. 4. Map of electrostatic potential of AChEIs calculated at B3LYP/6-31+G(d,p) level. (a) tacrine, (b) tacrine dimer, (c) huperzine A, (d) phenserine, (e) galantamine, (f) donepezil, (g) metrifonate, (h) rivastigmine, (i) dichlorvos.

In a second part, only 6 variables were used (shown below) with the 10 objects (AChEIs), these results in a 92% of total variance with information that characterizes these drugs in three principal components. Therefore, PCA (Figure 5) suggests that following properties are responsible for 92% of variance (63.5% for PC1 and 19.1% for PC2): volume, size of the molecule, distance between the two most acid hydrogens, energy of HOMO-1 frontier orbital, logP partition coefficient, and the number of aromatic rings (Table 2). In other words, these properties describes well the whole set of molecules data.

	PC1	PC2	PC3
B3LYP/6-31+G(d,p)	63.5 %	82.6%	91.7%

Table 2. Total cumulative variance (%) using 10 AChEIs and 6 properties

Equations 5, 6 and 7 show the scores of the PC1, PC2 and PC3. The PC1 is essentially the volume, size, partition coefficient- log P and number of aromatic rings of the drug (structural and electronic parameters), the PC2 represents the distance H-H (structural parameter) while the PC3 mainly represents the energy of the HOMO-1 orbital (electronic parameter).

$$PC1 = 0.48_{\text{volume}} + 0.46_{\text{Size}} + 0.13_{\text{H-H}} + 0.37_{\text{HOMO-1}} + 0.42_{\text{logP}} + 0.44_{\text{Arom.}} \quad (5)$$

$$PC2 = -0.01_{\text{volume}} + 0.02_{\text{Size}} + 0.88_{\text{H-H}} + 0.28_{\text{HOMO-1}} - 0.33_{\text{logP}} - 0.19_{\text{Arom.}} \quad (6)$$

$$PC3 = -0.38_{\text{volume}} - 0.40_{\text{Size}} - 0.16_{\text{H-H}} + 0.79_{\text{HOMO-1}} + 0.18_{\text{logP}} + 0.04_{\text{Arom.}} \quad (7)$$

Figure 5 shows that the molecules are grouped into some main groups in regard to PC1, one of these are the GALA, RIVA, PHEN and PHYSO which forms a cluster and these are the FDA approved drugs. HUPE, THA form other group with two potent inhibitors acetylcholinesterase. Therefore, volume, π - π systems and drug size are important parameters that correlate the AChEIs.

On other hand PC2 is dominated by the HH distance (score: +0.88), which separates compounds according to the distance between the two hydrogens more acidic in two groups: one that found them have H-H values smaller than 2.0 Å, and other group of objects that have values greater than those cited.

Figure 6 depicts the scores of PC1 versus PC3. In this case there are two standards in PC3 DDVP / METRO and GALA / PHYSO / RIVA / PHEN, this is reasonable, since PC3 represent the orbital energy of HOMO-1 (+0.79) (Equation 7), these AChEIs have values close to the HOMO-1 and the volume, as shown in Table 1. Figures 5 and 6, Equations (5, 6 and 7) generated in the PC indicates that the electronic parameters - orbital energy of HOMO-1, log P and number of aromatic systems - and the structural parameters - volume, size of the drug and H-H- are the most significant properties of AChE in this multivariate analysis.

3. Applications of PCA from pharmacophoric profile of the AChEIs

From the pharmacophore profile determined by means of PCA and electronic structure calculations, other classes of molecules can be considered to be classified as AChEI. Therefore, it is important to note that, when added other objects, the new plotted PCs should have accumulative variance equal or larger than the original PCA (Table 3). That is, the original data set is the reference.

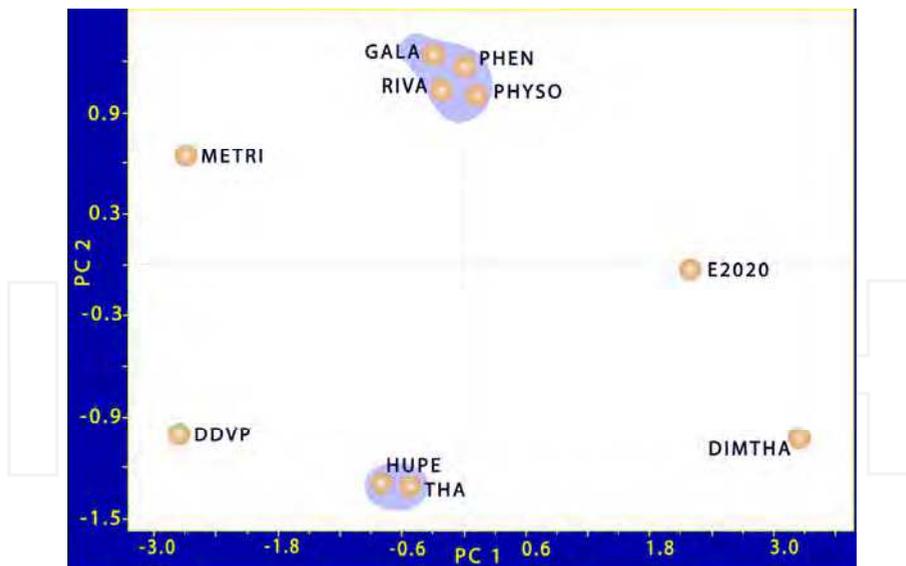


Fig. 5. PC1 versus PC2 scores from B3LYP/6-31+G(d,p) data.

	PC1	PC2	PC3
B3LYP/6-31+G(d,p)	71 %	86%	94%

Table 3. Total cumulative variance (%) using 10 AChEIs, 2 new molecules, 1 substrate and 6 properties.

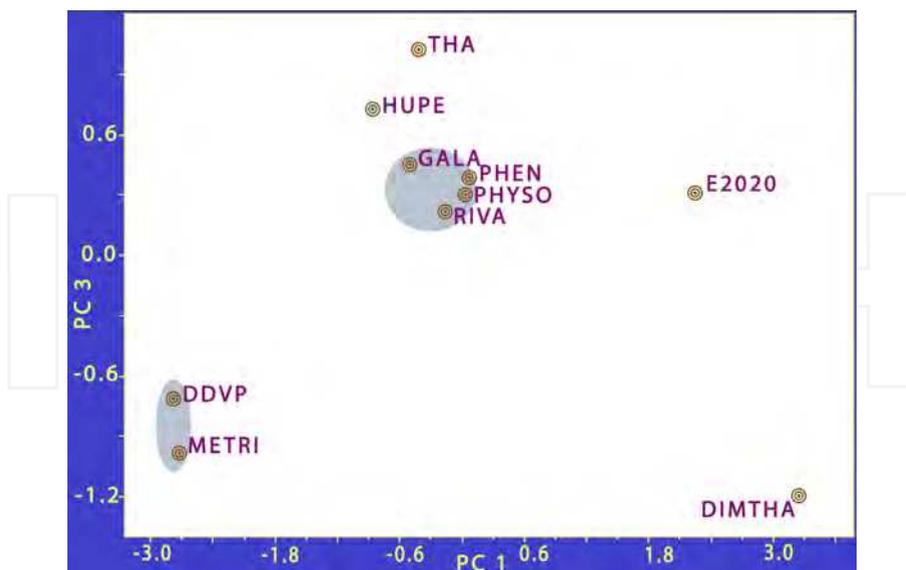


Fig. 6. PC1 versus PC3 scores from B3LYP/6-31+G(d,p) data.

The following are some applications explored. One possible application is the identification of dual biological activity of molecules. Another is the identification of activity against the function of acetylcholinesterase inhibitor, i.e., how behaves the natural substrate of the enzyme.

MOL1 and MOL2 with different biological activity from AChEIs were studied. We have also added another compound on the data set, acetylcholine (acetylcholinesterase substrate). Within these data from the properties obtained through electronic structure calculations, the new PCA was generated. These three objects were added to the 10 other objects of the first PCA which determined the pharmacophoric profile of AChEIs.

As shown in Figure 7, the natural substrate reorients the axis of the PCs and is completely opposed to the other (active) drugs. The acetylcholine is close to some of AChEIs by PC1, which have the properties of volume, size and number of aromatic rings with more high scores. Although acetylcholine is not an inhibitor it must have some properties correlated with the AChEIs. All molecules that are recognized by a protein have a certain set of properties that allows this recognition.

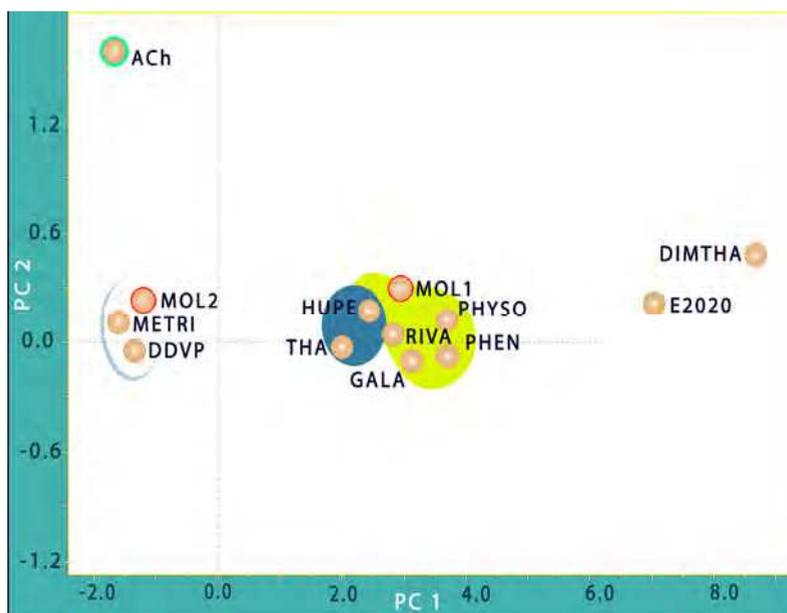


Fig. 7. PC1 versus PC2 scores from 10 AChEIs, 2 new molecules and ACh at B3LYP/6-31+G(d,p) level.

According to the PCA the two new drugs can be classified as AChEIs, although it is not possible to determine whether they have efficacy in the treatment of Alzheimer's disease. It is important to note that the effectiveness of a drug depends also on other factors that are difficult or much complex for modeling.

As shown in Figure 7, the natural substrate reorients the axis of the PCs and is completely opposed to the other (active) drugs. The acetylcholine is close to some of AChEIs by PC1,

which have the properties of volume, size and number of aromatic rings with large scores. Although acetylcholine is not an inhibitor it must have some properties correlated with the AChEIs.

All molecules that are recognized by a protein have a certain set of properties that allows this recognition. As shown in Figure 8, in the case of acetylcholinesterase specifically, molecular modeling studies showed that during the molecular recognition of acetylcholine, the quaternary nitrogen of the substrate has a strong ionic interaction with the carboxyl group of the residue Asp72. In addition, there is formation of hydrogen bonds between the amine and ester group of the residue Asn65 and Tyr130 (Patrick, 2005).

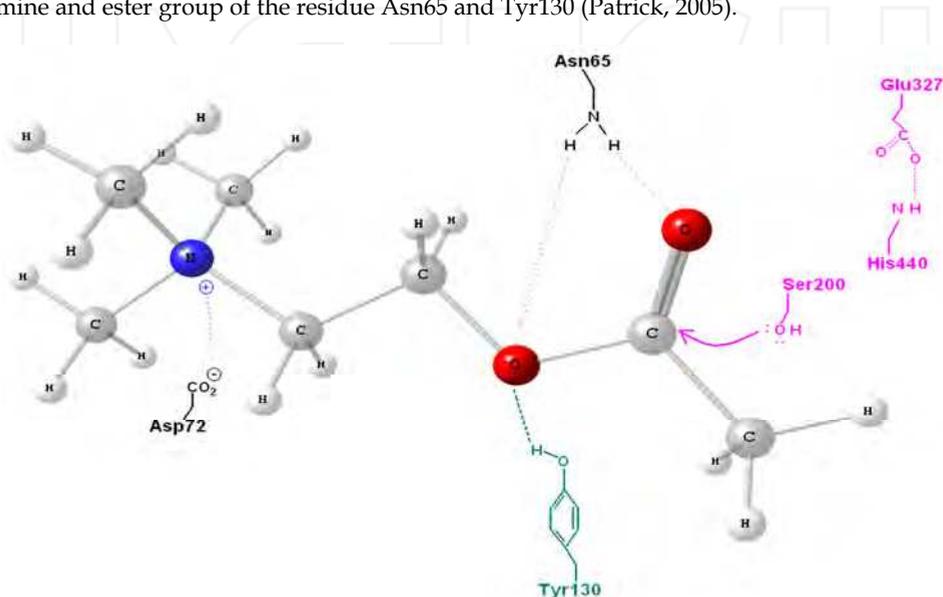


Fig. 8. PC1 Optimized structure of acetylcholine and main points of molecular recognition in acetylcholinesterase at B3LYP/6-31+G(d,p) level.

4. Conclusion

All studied AChE inhibitors are recognized as drugs that act effectively in the treatment of AD, even if some are not recommended due to unwanted side effects. From the computer modeling, applied by electronic structure calculations and PCA of known AChEIs with potential for the treatment of AD, it is possible to conclude that the properties relevant to the inhibitory activity are:

1. The HOMO-1 orbital is the most important property, characteristic of all drugs.
2. The study of the electrostatic potential map indicates that all AChEIs have well-defined regions of high and low electronic density, and these regions are the likely points of interaction with acetylcholinesterase, through electrostatic interactions such as hydrogen bonding. In some cases, such as dichlorvos, rivastigmine and physostigmine, it is possible to predict a bond with covalent character to the catalytic triad of the enzyme.

3. The H-H distance between 1.625-2.460Å, volume, and logP are also relevant for the pharmacophoric profile.
4. The electronic properties - orbital energy of the HOMO-1, log P and number of aromatic systems - and the structural parameters volume, size of the drug and H-H distance are the most significant properties in this study, the main components of the pharmacophore profile of AChEIs.
5. From the pharmacophore profile determined using PCA and electronic structure calculations, other classes of molecules can be considered to be classified as AChEI.

In addition to the structural and electronic properties mentioned above, an efficient inhibitor should have good bioavailability, cross the blood brain barrier with relative ease, to have high selectivity for acetylcholinesterase compared to butylcholinesterase; be able to form a complex reversible or pseudo-reversibly with AChE, be non-competitive compared to natural substrate. All these properties are jointly sharing in the profile of AChE pharmacophore studied in this work.

5. Acknowledgments

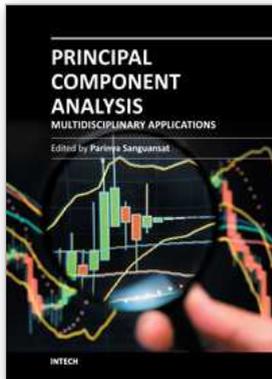
The authors are indebted to CNPq, INCTMN, FINEP, and CAPEs for financial support and Laboratório de Química Computacional/Universidade de Brasília (LQC/UnB) for computation resource.

6. References

- Barak, D.; Ordentlich, A.; Kaplan, D.; Kronman, C.; Velan, B. & Shafferman, A. (2005). Lessons from functional analysis of AChE covalent and noncovalent inhibitors for design of AD therapeutic agents. *Chemico-Biological Interactions*, Vol.157, No.SI, (December 2005), PP 219-226, ISSN 0009-2797
- Bartolucci, C.; Siotto, M.; Ghidini, E.; Amari, G.; Bolzoni, P. N.; Racchi, M.; Villetti, G.; Delcanale, M. & Lamba, D. (2006). Structural Determinants of Torpedo californica Acetylcholinesterase Inhibition by the Novel and Orally Active Carbamate Based Anti-Alzheimer Drug Ganstigmine (CHF-2819). *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol.49, No.17, (August 2006), pp.5051-5058. ISSN 0022-2623
- Camps, P. & Munoz-Torrero, D. (2002). Cholinergic Drugs in Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, Vol.2, No.1, (February 2002), pp.11-25, ISSN 1389-5575
- Camps, P.; Formosa, X.; Munoz-Torrero, D.; Petrignet, J.; Badia, A. & Clos, M. V. (2005). Synthesis and pharmacological evaluation of huprine-tacrine heterodimers: Subnanomolar dual binding site acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol.48, No.6, (March 2005), pp. 1701-1704, ISSN 0022-2623
- Carotti, A.; Altornare, C.; Savini, L.; Chlasserini, L.; Pellerano, C.; Mascia, M. P.; Maciocco, E.; Busonero, F.; Mameli, M.; Biggio, G. & Sanna, E. (2003). High affinity central benzodiazepine receptor ligands. Part 3: Insights into the pharmacophore and pattern recognition study of intrinsic activities of pyrazolo[4,3-c]quinolin-3-ones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol.11, No.23, (November 2003), pp. 5259-5272, ISSN 0968-0896

- Costantino, H. R.; Leonard, A. K.; Brandt, G.; Johnson, P. H. & Quay, S. C. (2008). Intranasal administration of acetylcholinesterase inhibitors. *Bmc Neuroscience*, Vol.9, No.3, (December 2008), pp. 1-3, ISSN 1471-2202
- Cramer, C. J. (November 22, 2004). *Essentials of Computational Chemistry* (2nd), Wiley, ISBN 047-0091-82-7, West Sussex
- de Paula, A. A. N.; Martins, J. B. L.; dos Santos, M. L.; Nascente, L. D.; Romeiro, L. A. S.; Areas, T.; Vieira, K. S. T.; Gamboa, N. F.; Castro, N. G. & Gargano, R. (2009). New potential AChE inhibitor candidates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol.44, No.9, (September 2009), pp. 3754-3759, ISSN 0223-5234
- de Paula, A. A. N.; Martins, J. B. L.; Gargano, R.; dos Santos, M. L. & Romeiro, L. A. S. (2007). Electronic structure calculations toward new potentially AChE inhibitors. *Chemical Physics Letters*, Vol.446, No.4-6, (October 2007), pp. 304-308, ISSN 0009-2614
- Frisch, M. J., G.W. Trucks, H.B.S., G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R.C., Zakrzewski, V.G., Montgomery, Jr. J.A., Stratmann, R.E., Dapprich, J.C.B.S., Millam, J.M., Daniels, A.D., Strain, K.N.K.M.C., Farkas, O., Tomasi, J., Barone, V., Cammi, M.C.R., Mennucci, B., Pomelli, C., Adamo, C., Clifford, S., Petersson, J.O.G.A., Ayala, P.Y., Cui, Q., Morokuma, K., Rabuck, D.K.M.A.D., Raghavachari, K., Foresman, J.B., Ortiz, J.C.J.V., Stefanov, B.B., Liu, G., Liashenko, A., Komaromi, P.P.I., Gomperts, R., Martin, R.L., Fox D.J., Al-Laham, T.K.M.A., Peng, C.Y., Nanayakkara, A., Gonzalez, C., Challacombe, M., Gill, P.M.W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M.W., Andres, J.L., Gonzalez, C., Head-Gordon, M., Replogle E.S. & Pople, J.A. (2003), Gaussian03, Gaussian Inc.,Pittsburgh, PA
- Jolliffe, I. T. (October 1, 2002). *Principal Component Analysis* (2nd), Springer, ISBN 038-7954-42-2, New York
- Lima, P.; Bonarini, A. & Mataric, M. (2004). *Application of Machine Learning*, InTech, ISBN 978-953-7619-34-3, Vienna, Austria
- Nascimento, E. C. M. & Martins, J. B. L. (2011). Electronic structure and PCA analysis of covalent and non-covalent acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of Molecular Modeling*, Vol.17, No.6, (June 2011), pp. 1371-1379, ISSN 1610-2940
- Nascimento, E. C. M.; Martins, J. B. L.; dos Santos, M. L. & Gargano, R. (2008). Theoretical study of classical acetylcholinesterase inhibitors. *Chemical Physics Letters*, Vol.458, No.4-6, (June 2008), pp. 285-289, ISSN 0009-2614
- Patrick, G. L. (2005) *An Introduction to Medicinal Chemistry* (3rd), Oxford University Press, ISBN 019-9275-00-9, New York
- Rocha, J. R.; Freitas, R. F. & Montanari, C. A. (2011). The GRID/CPCA approach in drug Discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, Vol.5, No.4, (April 2011), pp. 333-346, ISSN 1746-0441
- Sipl, W.; Contreras, J. M.; Parrot, I.; Rival, Y. M. & Wermuth, C. G. (2001). Structure-based 3D QSAR and design of novel acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, Vol.15, No.5, (May 2001) pp.395-410, ISSN 0920-654X
- Steindl, T. M.; Crump, C. E.; Hayden, F. G. & Langer, T. J. (2005). Pharmacophore modeling, docking, and principal component analysis based clustering: Combined computer-assisted approaches to identify new inhibitors of the human rhinovirus coat protein. *Journal of Medicinal Chemistry* , Vol. 48, No.20, (October 2005), pp. 6250-6260, ISSN 0022-2623

- Steindl, T. M.; Schuster, D.; Wolber, G.; Laggner, C. & Langer, T. J. (2006). High-throughput structure-based pharmacophore modelling as a basis for successful parallel virtual screening. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, Vol.20, No.12, (December 2006), pp. 703-715, ISSN 0920-654X
- Sugimoto, H.; Ogura, H.; Arai, Y.; Iimura, Y. & Yamanishi, Y. (2002). Research and development of donepezil hydrochloride, a new type of acetylcholinesterase inhibitor. *Japanese Journal of Pharmacology*, Vol.89, No.1, (May 2002), pp. 7-20, ISSN 0021-5198
- Tasso, S. M.; Bruno-Blanch, L. E.; Moon, S. C. & Estiú, G. L. (2000). Pharmacophore searching and QSAR analysis in the design of anticonvulsant drugs. *Journal of Molecular Structure-Theochem*, Vol. 504, No. , (June 2000), pp. 229-240, ISSN 0166-1280
- Tezer, N. (2005). Ab initio molecular structure study of alkyl substitute analogues of Alzheimer drug phenserine: structure-activity relationships for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory action. *Journal of Molecular Structure-Theochem*, Vol.714, No.2-3, (February 2005), pp. 133-136, ISSN 0166-1280
- Ul-Haq, Z.; Khan, W.; Kalsoom, S. & Ansari, F. L. (2010). In silico modeling of the specific inhibitory potential of thiophene-2,3-dihydro-1,5-benzothiazepine against BChE in the formation of beta-amyloid plaques associated with Alzheimer's disease. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, Vol.7, No. 22, (June 2010), pp. 2-26, ISSN 1742-4682
- Wermuth, C. G.; Ganellin, C. R.; Lindberg, P. & Mitscher, L. A. (1998). Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure and Applied Chemistry*, Vol.70, No.5, (May 1998), pp. 1129-1143, ISSN: 0033-4545



Principal Component Analysis - Multidisciplinary Applications

Edited by Dr. Parinya Sanguansat

ISBN 978-953-51-0129-1

Hard cover, 212 pages

Publisher InTech

Published online 29, February, 2012

Published in print edition February, 2012

This book is aimed at raising awareness of researchers, scientists and engineers on the benefits of Principal Component Analysis (PCA) in data analysis. In this book, the reader will find the applications of PCA in fields such as taxonomy, biology, pharmacy, finance, agriculture, ecology, health and architecture.

How to reference

In order to correctly reference this scholarly work, feel free to copy and paste the following:

Érica C. M. Nascimento and João B. L. Martins (2012). Pharmacophoric Profile: Design of New Potential Drugs with PCA Analysis, Principal Component Analysis - Multidisciplinary Applications, Dr. Parinya Sanguansat (Ed.), ISBN: 978-953-51-0129-1, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/principal-component-analysis-multidisciplinary-applications/pharmacophoric-profile-design-of-new-potential-drugs-with-pca-analysis->

INTECH
open science | open minds

InTech Europe

University Campus STeP Ri
Slavka Krautzeka 83/A
51000 Rijeka, Croatia
Phone: +385 (51) 770 447
Fax: +385 (51) 686 166
www.intechopen.com

InTech China

Unit 405, Office Block, Hotel Equatorial Shanghai
No.65, Yan An Road (West), Shanghai, 200040, China
中国上海市延安西路65号上海国际贵都大饭店办公楼405单元
Phone: +86-21-62489820
Fax: +86-21-62489821