

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE FÍSICA

TESE DE DOUTORADO

**Modelagem Molecular de Potenciais Candidatos a
Inibidores da Acetilcolinesterase**

ALESSANDRA SOFIA KIAMETIS

ORIENTADOR: RICARDO GARGANO

CO-ORIENTADOR: JOÃO BATISTA LOPES MARTINS

Brasília, 05 de outubro de 2012

“Você realmente não entende algo se não consegue explicá-lo para a sua avó.” *Albert Einstein*

Agradecimentos

Agradeço primeiro a *Deus*, pai celestial que na sua infinita sabedoria distribuiu aos homens os mais variados dons, dentre eles a curiosidade, a inteligência e a criatividade. Das maiores pérolas que o Senhor lançou sobre a terra está a família. E agradeço à *minha família* por esta conquista, pelos momentos alegres e difíceis, experiências de vida que nos fazem crescer juntos no perdão, no amor e na esperança. Em especial aos meus muitíssimo estimados avós *Anastácia* e *Emmanuel*, meus anjos protetores, guardiões da família e dos bons costumes, que com sua coragem cruzaram o oceano em busca da felicidade; me considero privilegiada por ser um dos belos frutos desta aventura. Ao meu pai *Georges*, o precursor desta minha jornada; lembro-me de todos os livros de ciência e enciclopédias que ganhei na minha tenra idade e que me despertaram a sede pelo saber. E à minha mãe *Maria*, tenho certeza de que se pudesse presenciar este acontecimento ficaria muito contente. Ao *Flávio*, companheiro de todas as horas, que com seu incrível poder de me arrancar sorrisos nos momentos tristes ilumina minha vida e alegra meu coração, fazendo-me uma pessoa melhor todos os dias, capaz de sonhar com um mundo mais feliz. E aos seus pais por me receberem sempre de braços abertos em sua casa.

Sou grata ao Prof. Ricardo Gargano, das pessoas mais engraçadas que já conheci, com simplicidade vive cada dia de uma vez, é feliz com o que tem, acho que todos devíamos aprender com ele. Obrigada por acreditar em mim, seu incentivo, acredite, foi o pontapé inicial de tudo isto. Agradeço ao Prof. João Batista por toda ajuda e profissionalismo. E aos meus amigos físicos William, Evandro, Fábio, Brunno, Mírian, Alexandre e Camila, que tanto me ensinaram sobre os segredos da ciência e estiveram ao meu lado quando o desânimo me abatera, ajudando-me a renovar os votos diários de paciência e persistência.

Aos meus amadíssimos irmãos do movimento arquidiocesano *Acampamento Nossa Senhora Aparecida* por todo carinho, a vocês dedico um agradecimento mais que especial. E às minhas grandes amigas Marinete Paz, Ana Angélica Anton e Michela Rodrigues, fiéis escudeiras que moram no meu coração.

Resumo

A doença de Alzheimer é a principal causa de demência entre pessoas com mais de 65 anos de idade. Embora sua etiologia não seja completamente conhecida, a diminuição dos níveis de acetilcolina tem sido associada à fisiopatologia da doença. A hipótese colinérgica é uma linha terapêutica baseada no aumento do nível de acetilcolina por inibição reversível da enzima acetilcolinesterase (AChE). O presente trabalho tem como objetivo propor possíveis candidatos a inibidores da AChE, concebidos a partir dos derivados fenólicos do líquido da castanha de caju, por meio de modelagem molecular no âmbito da mecânica quântica. Para tanto, várias propriedades eletrônicas importantes no reconhecimento molecular pela enzima foram calculadas para os compostos estudados usando-se o nível de cálculo B3LYP e funções de base 6-311+G(2d,p). A análise de componentes principais revela que alguns destes compostos estão correlacionados com o donepezil, fármaco de atividade biológica conhecida.

Abstract

Alzheimer's disease is the leading cause of dementia among people over 65 years of age. Although its etiology is not fully known, the decreased levels of acetylcholine has been linked to the pathophysiology of the disease. The cholinergic hypothesis is a line therapy based on increasing the level of acetylcholine by reversible inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE). This paper aims to propose possible candidates to AChE inhibitors, designed from the liquid phenolic derivatives of cashew, through molecular modeling in the context of quantum mechanics. To this end, several electronic properties important for the molecular recognition by the enzyme were calculated for the compounds studied using the B3LYP level of calculation and basis set functions 6-311+G(2d,p). The principal components analysis reveals that some of these compounds are correlated to donepezil, a drug with known biological activity.

Sumário

1	Introdução	1
1.1	A Doença de Alzheimer	1
1.2	A Terapia Colinérgica	1
1.3	Os Derivados Fenólicos do Líquido da Castanha de Caju	4
1.4	Objetivo Geral	5
1.5	Planejamento dos Padrões de Estrutura Molecular	6
1.6	O Donepezil	12
2	Metodologias	14
2.1	Análise Conformacional e Minimização de Energia	14
2.2	O Problema Molecular	16
2.2.1	Solução da Equação de Schrödinger Eletrônica	18
2.2.2	A Aproximação de Hartree-Fock	21
2.2.3	Introdução de Funções de Base Espaciais	27
2.3	Teoria do Funcional de Densidade	30
2.4	Descritores Moleculares	33
2.5	Análise de Componentes Principais	37
2.6	O Modelo Contínuo Polarizável	43
3	Resultados e Discussões	47
3.1	Padrão de Estrutura Molecular 1 (PEM-1)	48

3.1.1	Cálculos sem modelo de solvatação	48
3.1.2	Cálculos com modelo de solvatação	50
3.2	Padrão de Estrutura Molecular 2 (PEM-2)	60
3.2.1	Cálculos sem modelo de solvatação	60
3.2.2	Cálculos com modelo de solvatação	62
4	Conclusões e Perspectivas	67
5	Apêndice A - Funções de Base 6-311+G(2d,p)	69

Lista de Tabelas

2.1	Matriz do conjunto de dados iniciais.	38
3.1	Peso das variáveis mais significativas para as componentes principais do PEM-1 no modelo sem solvente.	49
3.2	Autovalores e porcentagens das quatro primeiras componentes principais do PEM-1 no modelo sem solvente.	50
3.3	Peso das variáveis mais significativas para as componentes principais do PEM-1 no modelo com solvente.	51
3.4	Autovalores e porcentagens das quatro primeiras componentes principais do PEM-1 no modelo com solvente.	52
3.5	Peso das variáveis mais significativas para as componentes principais do PEM-1 no modelo com solvente, considerando a energia do orbital HOMO.	54
3.6	Autovalores e porcentagens das quatro primeiras componentes principais do PEM-1 no modelo com solvente, considerando a energia do orbital HOMO.	54
3.7	Donepezil (21) e PEM-1 com respectivos descritores mais significativos para a correlação (cálculos de estrutura eletrônica com modelo de solvente).	58
3.8	Peso das variáveis mais significativas para as componentes principais do PEM-2 no modelo sem solvente.	61

3.9	Autovalores e porcentagens das três primeiras componentes principais do PEM-2 no modelo sem solvente.	61
3.10	Peso das variáveis mais significativas para as componentes principais do PEM-2 no modelo com solvente.	63
3.11	Autovalores e porcentagens das três primeiras componentes principais do PEM-2 no modelo com solvente.	63
3.12	Donepezil (21) e PEM-2 com respectivos descritores mais significativos para a correlação (cálculos de estrutura eletrônica com modelo de solvente).	64

Lista de Figuras

1.1	Interação da AChE e respectivos resíduos com a ACh.	3
1.2	Derivados fenólicos do líquido da castanha de caju (LCC).	5
1.3	Interação entre os sítios ativos da AChE e grupo amino terciário de um dos compostos do PEM-1.	6
1.4	Planejamento estrutural dos derivados do cardol: subunidades farmacofóricas A e B.	7
1.5	Planejamento estrutural dos derivados do ácido anacárdico: subunidades farmacofóricas A e B.	8
1.6	Grupos funcionais adicionados à subunidade farmacofórica A para o PEM-1 e o PEM-2.	9
1.7	Padrão de Estrutura Molecular 1 (PEM-1).	10
1.8	Padrão de Estrutura Molecular 2 (PEM-2).	11
1.9	Donepezil.	12
2.1	Superfície de energia potencial de um dos compostos estudados.	15
2.2	Representação esquemática da otimização dos compostos e cálculo de seus respectivos descritores moleculares.	45
2.3	Análise de componentes principais dos compostos e seus respectivos descritores moleculares.	46
3.1	PC2 versus PC1 para o PEM-1 no modelo sem solvente.	49
3.2	PC2 versus PC1 para o PEM-1 no modelo com solvente.	51

3.3	PC2 versus PC1 para o PEM-1 no modelo com solvente, considerando a energia do orbital HOMO.	53
3.4	Geometria otimizada e orbitais HOMO e LUMO do composto de número 5 do PEM-1.	56
3.5	Geometria otimizada e orbitais HOMO e LUMO do composto de número 7 do PEM-1.	56
3.6	MEP do composto de número 5 do PEM-1 (modelo com solvente). . .	59
3.7	MEP do composto de número 7 do PEM-1 (modelo com solvente). . .	59
3.8	PC2 versus PC1 para o PEM-2 no modelo sem solvente.	60
3.9	PC2 versus PC1 para o PEM-2 no modelo com solvente.	62
3.10	Geometria otimizada e orbitais HOMO e LUMO do composto de número 16 do PEM-2.	65
3.11	MEP do composto de número 16 do PEM-2 (modelo com solvente). .	66

Lista de Abreviaturas

DA	Doença de Alzheimer
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
Ser	Serina
His	Histidina
Glus	Glutamina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Phe	Fenilalamina
Asp	Aspartato
FDA	Food and Drug Administration (Administração de drogas e alimentos)
LCC	Líquido da castanha de caju
PEM-1	Padrão de Estrutura Molecular 1
PEM-2	Padrão de Estrutura Molecular 2
PM5	“Parametric Method Number 5” (Método Paramétrico Número 5)
RHF	“Restricted Hartree-Fock” (Hartree Fock Restrito)
SCF	“Self Consistent Field” (Campo Auto Consistente)
DFT	“Density Functional Theory” (Teoria do Funcional de Densidade)
B3LYP	Funcional híbrido de troca de Becke (B3) combinado com o funcional de correlação de LYP (Lee, Yang, Parr)

HOMO	“Highest occupied molecular orbital” (energia do último orbital molecular ocupado)
HOMO-1	Energia do penúltimo orbital molecular ocupado
LUMO	“Lowest occupied molecular orbital” (energia do primeiro orbital virtual ocupado)
LUMO+1	Energia do segundo orbital virtual ocupado
GAP	Diferença entre os orbitais de fronteira: LUMO-HOMO
N	Carga atômica do nitrogênio pertencente ao grupo amino
log P	Coefficiente de partição (medida quantitativa da lipofilicidade de compostos bioativos)
PCA	“Principal Component Analysis” (Análise de Componentes Principais)
PC1	“Principal Component 1” (Componente Principal 1)
PC2	“Principal Component 2” (Componente Principal 2)
PCM	“Polarizable Continuum Model” (Modelo Contínuo Polarizável)
MEP	“Molecular Electrostatic Potential” (Mapa de Potencial Eletrostático)

Capítulo 1

Introdução

1.1 A Doença de Alzheimer

Descoberta em 1906 [1], a doença de Alzheimer (DA) é um distúrbio neurodegenerativo, de natureza crônica e progressiva, que compromete múltiplas funções cognitivas como a memória, atenção, linguagem, compreensão, aprendizado, orientação e senso crítico [2]. Principal causa de demência entre pessoas com idade superior a 65 anos, muito embora possa manifestar-se a partir dos 40 anos [2], a DA compromete gravemente a qualidade de vida dos portadores e tem sérias implicações para as áreas social, econômica e política em todo mundo.

Considerada uma doença multifatorial [3], atinge cerca de 30 milhões de pessoas no mundo inteiro e, como uma epidemia moderna, o número de pacientes cresce significativamente a cada ano. Estima-se, em 2050, que cerca de 107 milhões de pessoas serão afetadas pela DA [4, 5], haja vista o aumento da longevidade da população e o caráter idade-dependente da doença.

1.2 A Terapia Colinérgica

Apesar de sua etiologia não ser completamente conhecida, diversos fatores como depósitos de β -amilóides [6, 7], agregação de proteína τ [8], estresse oxidativo

[9, 10] e diminuição dos níveis de acetilcolina (ACh) [11] têm sido associados à fisiopatologia da doença [3].

Do ponto de vista neuropatológico, a DA é caracterizada pela degeneração precoce dos neurônios colinérgicos ¹ subcorticais, sobretudo aqueles localizados na parte basal do prosencéfalo (núcleo basal de Meynert), que conferem inervação colinérgica a todo córtex cerebral [12]. A consequente diminuição da neurotransmissão colinérgica deu origem à *Hipótese Colinérgica* [13, 14, 15], na qual o aumento do nível de acetilcolina (ACh) por inibição reversível AChE poderia melhorar o perfil cognitivo dos pacientes [16].

O déficit colinérgico é provocado pela ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) que cataboliza a ACh no processo sináptico. A acetilcolinesterase se assemelha a uma espécie de garganta (*gorge*) estreita (Figura 1.1), com profundidade de aproximadamente 20Å, revestida pelos anéis de 14 resíduos aromáticos [17, 18]. Dentre estes resíduos, vários aminoácidos funcionais foram identificados ², como a tríade catalítica [Ser200, His440, Glu327] [17, 19], o sítio aromático [Trp84, Tyr133, Tyr330, Phe331] [20], o sítio periférico [Trp279, Tyr334] [21] e o bolso acil [Phe288, Phe290] [22].

Após o reconhecimento molecular pelos resíduos aromáticos Asp72 e Tyr70, situados entre o sítio aniônico periférico e o sítio catalítico, a ACh move-se para o fundo do *gorge* ligando-se à tríade catalítica, onde a AChE hidrolisa a ACh em acetato e colina. Ainda entre o sítio aniônico periférico e o sítio catalítico, a ACh interage com os resíduos Phe330, Tyr70 e Tyr121, que atuam por meio de interações hidrofóbicas-aromáticas com espaçadores metilênicos contendo o máximo de 8 carbonos. O sítio aromático é uma subunidade hidrofóbica na qual o grupo amino

¹Neurônios colinérgicos são aqueles que sintetizam e liberam a acetilcolina no nervo pré-sináptico durante a transmissão do impulso nervoso.

²Consulte nomenclatura dos aminoácidos em lista de abreviaturas. O número corresponde à posição do resíduo na sequência de aminoácidos.

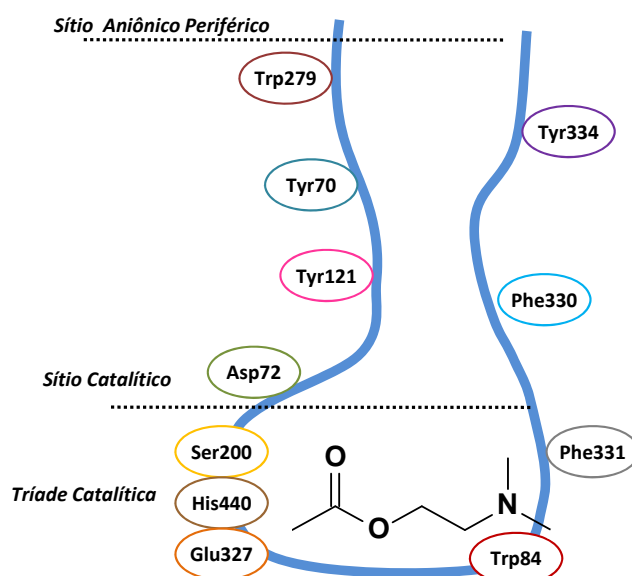


Figura 1.1: Interação da AChE e respectivos resíduos com a ACh.

terciário da ACh interage com o resíduo aromático Trp84 via cátion- π . O resíduo Phe331, também pertencente ao sítio aromático, pode atuar por meio de interações apolares ou π stacking, dependendo do substrato. Ariel et al. [20] sugerem que os resíduos Trp84, Tyr133 e Tyr330 constituem juntos uma espécie de “caminho” aromático que permite a acomodação de diferentes ligantes por meio de vários modos de interação.

A hipótese colinérgica foi a primeira forma racional de tratamento para esta neuropatologia. Os agentes terapêuticos colinérgicos inibem a ação da AChE e impedem a hidrólise da ACh, possibilitando assim a manutenção da concentração do neurotransmissor em nível aceitável. O primeiro fármaco inibidor da AChE aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) foi a tacrina, conhecida comercialmente como *Cognex*. Sua utilização hoje é bastante limitada em virtude dos sérios efeitos colaterais provocados. Após a tacrina foram desenvolvidos o donepezil, de nome comercial *Aricept*, e a rivastigmina, de nome comercial *Exelon*. Recentemente o produto natural galantamina (*Reminyl*) foi aprovado pelo FDA.

A busca por novos agentes químicos com perfil anticolinérgico, capazes de melhorar as funções cognitivas dos pacientes de DA e reduzir os efeitos colaterais provocados pelos fármacos convencionais, tem despertado grande interesse da Física e Química Medicinal. Recentemente, pesquisadores do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista [23] sintetizaram um composto natural isolado a partir da *senna spectabilis* (conhecida como acácia do nordeste) que apresentou as mesmas características de fármacos já comercializados.

1.3 Os Derivados Fenólicos do Líquido da Castanha de Caju

O cajueiro, de nome científico *Anacardium occidentale* e pertencente à família *Anacardiaceae*, é uma planta tropical nativa do Nordeste do Brasil, sendo encontrada principalmente nas zonas costeiras, fazendo parte da vegetação de praias, dunas e restinga. Sua cultura é perene e o gênero está disperso por quase todo território nacional. Somente na região nordeste, a cajucultura compreende uma área plantada superior a 650 mil hectares.

A industrialização da amêndoa contida no interior da castanha do caju, fruto do cajueiro, representa importante atividade econômica para o Brasil. Os estados do Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte e Bahia são responsáveis por mais de 95% da produção nacional. Um total de 170 mil toneladas de amêndoas é beneficiado anualmente no país. A produção de amêndoa da castanha do caju destina-se tradicionalmente à exportação, produzindo uma receita anual de *US\$* 145 milhões de dólares e gerando 36 mil empregos diretos no campo e 15 mil empregos na indústria. O parque industrial brasileiro abrange 11 grandes usinas e 22 fábricas de processamento com capacidade para produzir 270 mil toneladas de amêndoas por ano. Diversos outros produtos são também aproveitados, como, por exemplo, o pseudofruto ou pendúnculo, consumido *in natura* ou utilizado na fabricação de doces, sucos, cajuína e até ração animal.

No processo de industrialização da amêndoa da castanha de caju também extrai-se o líquido da castanha de caju (LCC), um óleo viscoso e acre que corresponde a 25% do peso do fruto *in natura*. Depois de beneficiado, é utilizado em resinas, plastificantes, tintas, vernizes, isolantes térmicos, detergentes, inseticidas, fungicidas e até biodiesel. Não obstante sua importância industrial, o LCC é ainda pouco explorado no Brasil. Os preços praticados no mercado de exportação são irrisórios. Seus principais consumidores, Índia e EUA, o processam e o revendem na forma de produtos de fricção e materiais de revestimento [24].

O LCC constitui uma fonte natural de compostos de cadeia fenólica longa e insaturada. Quando extraído por solvente, apresenta uma composição média de ácido anacárdico (60% – 65%), cardol (15% – 20%), cardanol (10%) e traços de metilcardol (Figura 1.2). Estes derivados fenólicos do LCC são muito versáteis para várias transformações químicas, devido ao seu caráter aromático e acíclico e à existência de diversos grupos funcionais no anel aromático. E principalmente, possuem características eletrônicas e hidrofóbicas importantes no reconhecimento de fármacos ativos pela AChE, constituindo assim um sistema biofórico natural.

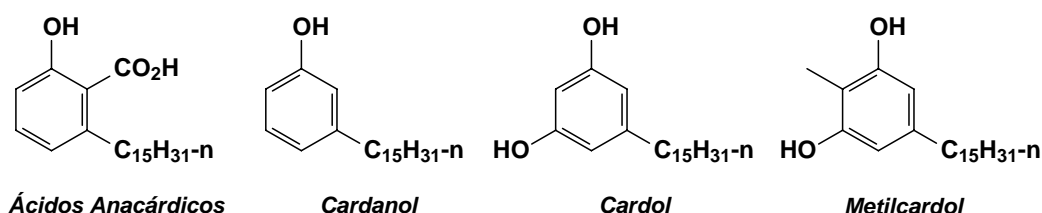


Figura 1.2: Derivados fenólicos do líquido da castanha de caju (LCC).

1.4 Objetivo Geral

O presente trabalho visa realizar uma modelagem molecular, no âmbito do formalismo da Mecânica Quântica, de potenciais candidatos a inibidores da acetilcolinesterase, planejados a partir dos derivados fenólicos do líquido da castanha de

caju, mais especificamente o cardol e o ácido anacárdico.

1.5 Planejamento dos Padrões de Estrutura Molecular

Os potenciais candidatos a inibidores da AChE foram planejados a partir da hibridação molecular de inibidores ativos, como o donepezil, a rivastigmina e o dímero da tacrina, e dois derivados fenólicos do LCC: o *cardol* e o *ácido anacárdico* [25]. Pressupostos teóricos indicam que, tanto a porção aromática do cardol, quanto a do ácido anacárdico, pode interagir com os resíduos Trp279, Tyr70 e Tyr334 por meio de interações aromático-aromático (π -stacking). A droga ficaria então “ancorada” no sítio aniônico periférico, de maneira que a inibição da acetilcolinesterase seja reversível (veja Figura 1.3).

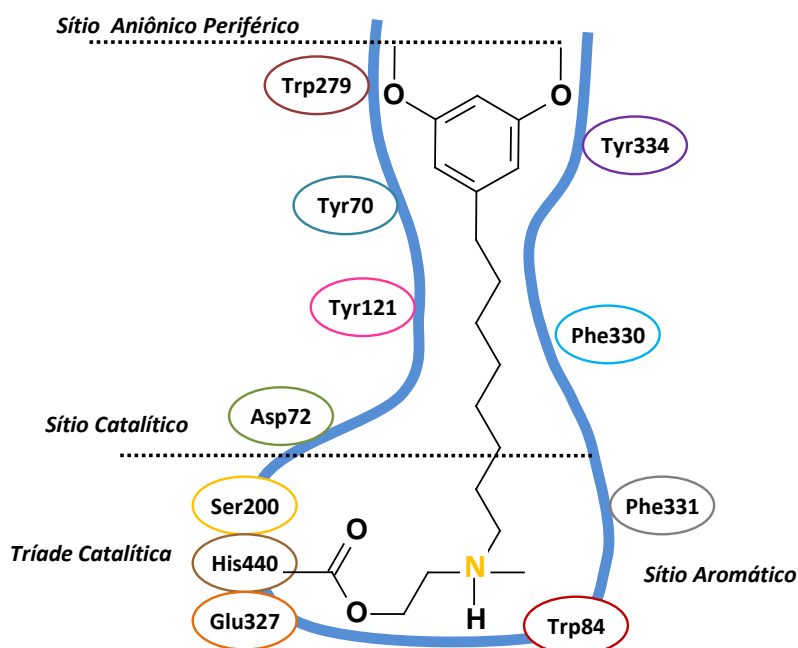


Figura 1.3: Interação entre os sítios ativos da AChE e grupo amino terciário de um dos compostos do PEM-1.

Em termos estruturais, cada composto foi dividido em duas regiões capazes de promover resposta biológica, chamadas de subunidades farmacofóricas (Figuras 1.4 e 1.5). A subunidade farmacofórica **B** determina o tipo de padrão molecular conforme o respectivo derivado fenólico do LCC utilizado. O *cardol* originou o chamado *Padrão de Estrutura Molecular 1*, ou simplesmente, PEM-1. O *ácido anacárdico* originou o chamado *Padrão de Estrutura Molecular 2*, ou simplesmente, PEM-2. A porção aromática contida na subunidade **B** de ambos os padrões de estrutura molecular é reconhecida pela AChE por ser aceitadora de ligação de hidrogênio, reforçando a idéia da ação farmacofórica desta subunidade.

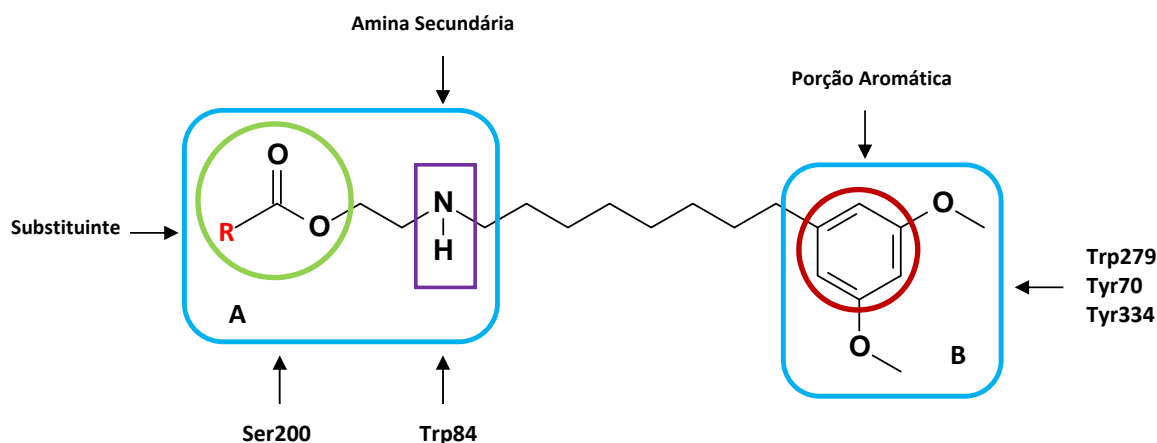


Figura 1.4: Planejamento estrutural dos derivados do cardol: subunidades farmacofóricas A e B.

A subunidade farmacofórica **A** apresenta o grupo funcional amônio terciário³ da acetilcolina, comum a todos os compostos de ambos os padrões de estrutura molecular, previsto para interagir com os resíduos Ser200 (tríade catalítica) e Trp84 (sítio hidrofóbico aromático) no sítio catalítico da AChE. Para melhor avaliar a influência da liberdade conformacional dos compostos de ambos os padrões, foram

³As aminas são uma classe de compostos químicos orgânicos derivados do amoníaco NH_3 . Substituindo-se os três átomos de hidrogênio por três radicais orgânicos (R_1 , R_2 e R_2), tem-se uma amina terciária.

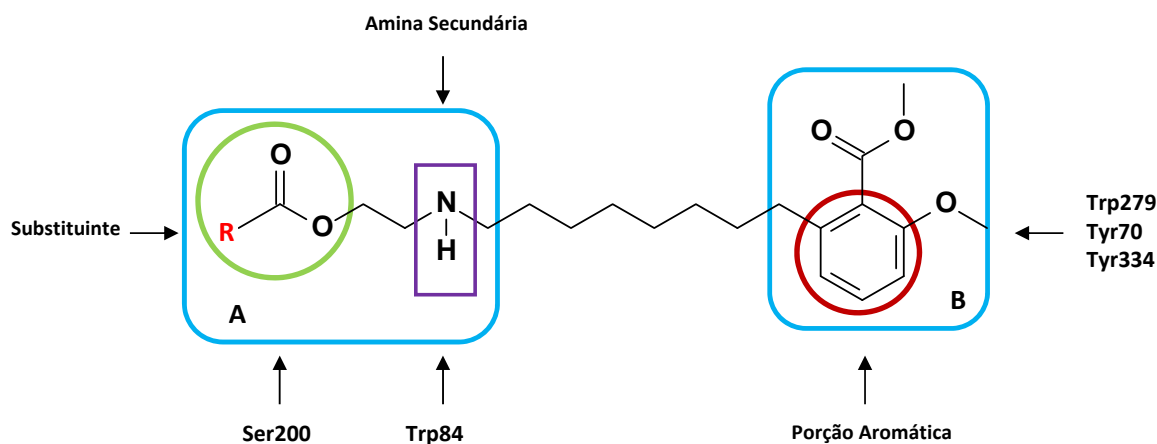


Figura 1.5: Planejamento estrutural dos derivados do ácido anacárdico: subunidades farmacofóricas A e B.

acrescentados à subunidade farmacofórica A outros grupos funcionais (Figura 1.6), entre aminas aromáticas e heterocíclicas³, tais como 3-hidroxipirrolidina, 3-hidroxipiperidina e 4-hidroxipiperidina e piperazina na forma de ésteres (substituinte $\mathbf{R} = CH_3$) ou carbamatos (substituinte $\mathbf{R} = N(CH_3)_2$). Outras possibilidades seriam a adição dos grupos funcionais quinolina e tacrina. A adição de um grupo benzila ao grupo amino terciário, previsto para interagir com o resíduo Phe331, próximo ao Trp84, é uma variação também interessante do ponto de vista das interações ligante-receptor.

Entre as duas subunidades farmacofóricas, ambos os padrões de estrutura molecular apresentam um chamado *espaçador* hidrofóbico, cujo comprimento é de 8, 78Å, que pode interagir com os resíduos Tyr70, Tyr121 e Phe330, localizados entre o sítio aniônico periférico e o sítio catalítico. O espaçador é suficientemente extenso para que a subunidade farmacofórica A alcance o fundo da *gorge* e interaja com a tríade catalítica e o sítio aromático.

³Aminas aromáticas são as que possuem um grupamento amino ligado a um anel aromático e as heterocíclicas são as que possuem a presença de outros heteroátomos.

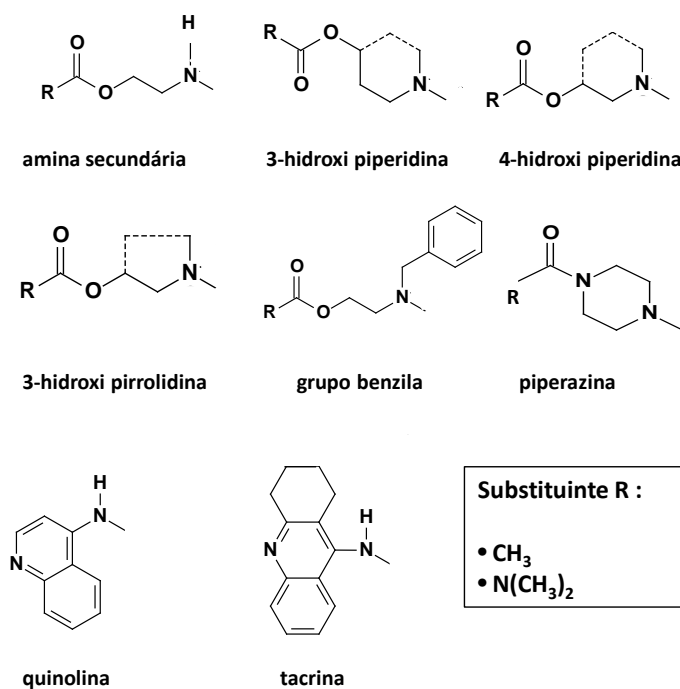


Figura 1.6: Grupos funcionais adicionados à subunidade farmacofórica A para o PEM-1 e o PEM-2.

Para que as moléculas pertencentes ao PEM-1 e PEM-2 apresentem atividade biológica, estas devem possuir estrutura tridimensional capaz de favorecer máxima complementariedade entre seus grupos funcionais e os sítios ativos da enzima acetilcolinesterase. A estratégia de planejamento estrutural dos padrões de estrutura molecular considerou as prováveis interações entre as subunidades farmacofóricas **A** e **B** e os resíduos de aminoácido da enzima. De fato, estudos recentes apontam para uma maior eficiência do fármaco quando de sua interação simultânea com os sítios catalítico e periférico [26]. Conforme disposições feitas até então, foram geradas 20 estruturas moleculares pertencentes ao PEM-1 e 20 estruturas moleculares pertencentes ao PEM-2, totalizando 40 estruturas com vistas de serem modeladas neste trabalho (Figuras 1.7 e 1.8).

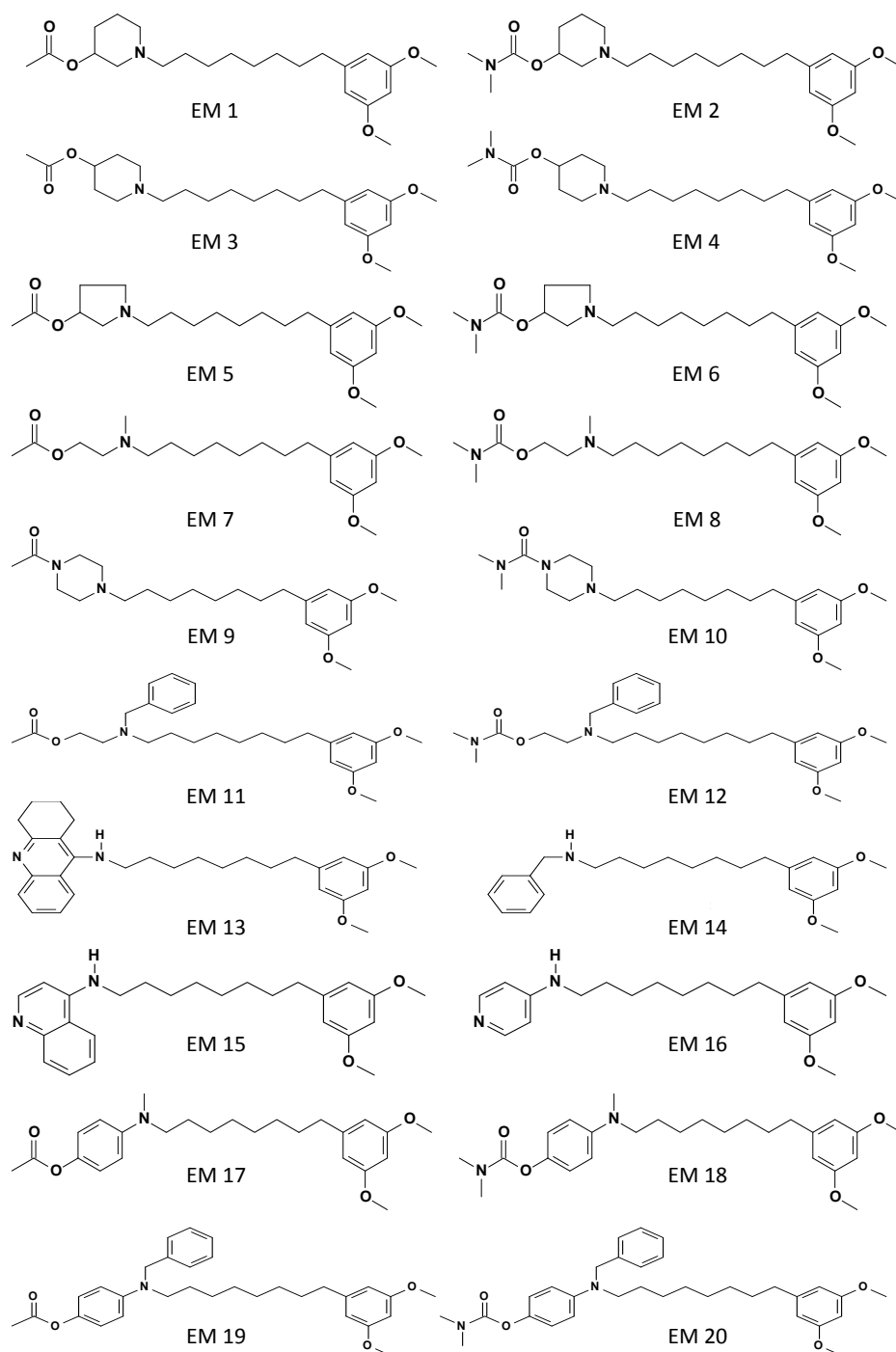


Figura 1.7: Padrão de Estrutura Molecular 1 (PEM-1).

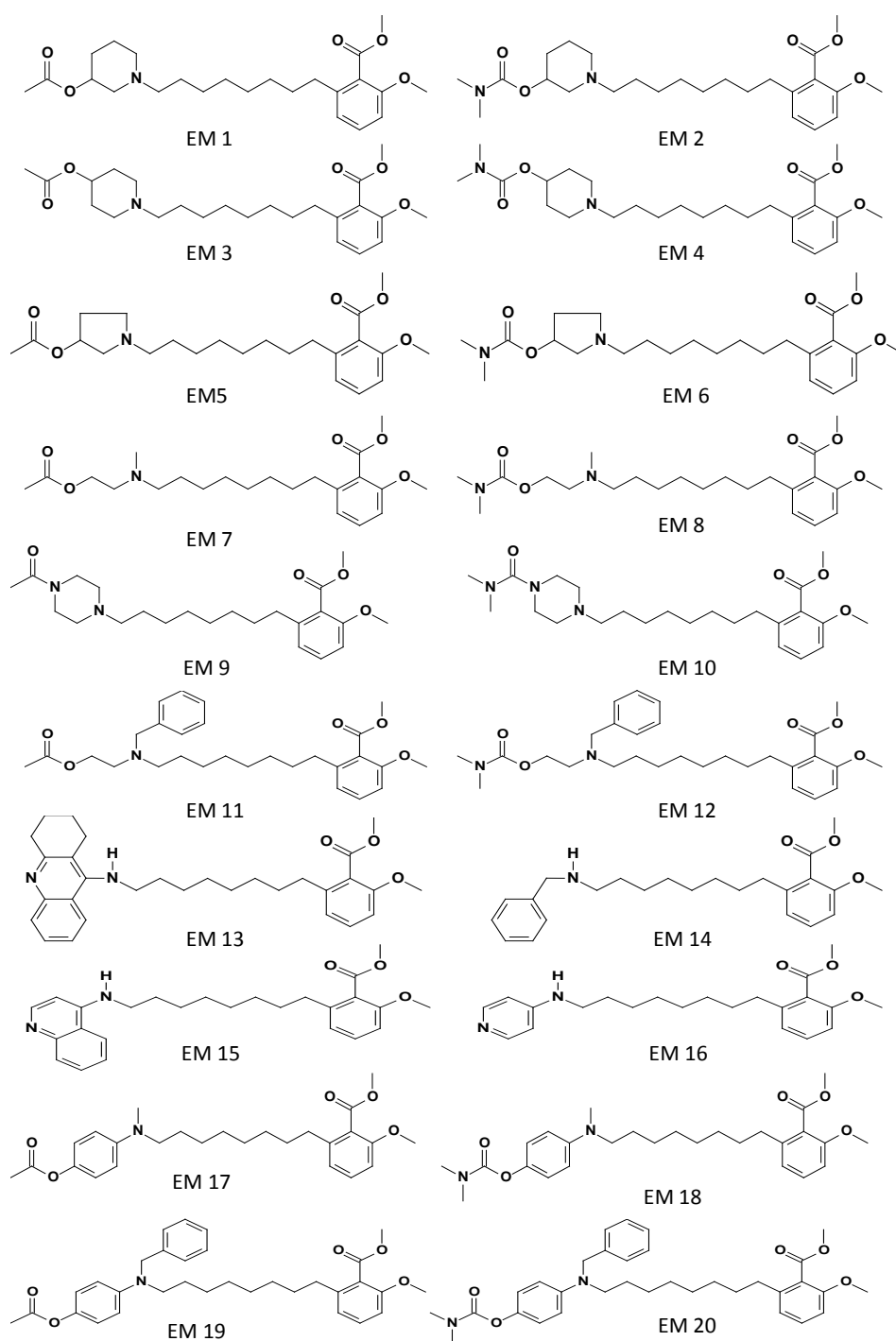


Figura 1.8: Padrão de Estrutura Molecular 2 (PEM-2).

1.6 O Donepezil

Entre os inibidores da AChE de ação terapêutica conhecida, o donepezil (Figura 1.9) é o que mais se assemelha ao conjunto de inibidores estudados em relação à estrutura química e prováveis interações ligante-receptor. Por esta razão, foi escolhido como parâmetro de referência na observação de tendências que possam pressupor atividade biológica dos compostos estudados.

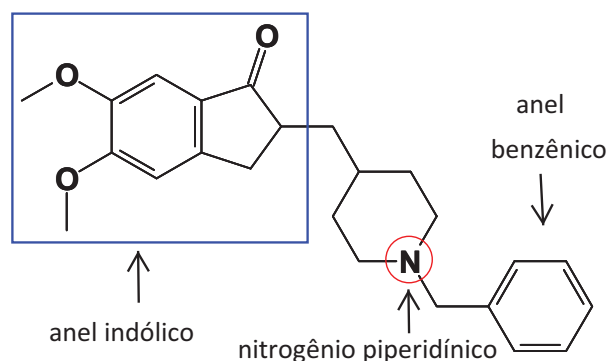


Figura 1.9: Donepezil.

O donepezil apresenta três segmentos que estabelecem interações específicas com a AChE ao longo de toda a extensão do sítio ativo da enzima. São três os grupos de interação: benzílico, nitrogênio piperidínico e anel de indanona. O grupo benzílico interage como o grupo indol do aminoácido Trp84 por meio de ligações π -stacking. Na região mediana da cavidade enzimática, entre o sítio aromático e o sítio periférico, ocorre uma interação do tipo cátion- π entre o nitrogênio piperidínico e o grupo fenil do aminoácido Phe331. Já no sítio periférico, o anel de indanona interage com o grupo indol do aminoácido Trp279, por meio de uma interação $\pi - \pi$ paralela (“face a face”). O donepezil ainda interage com a tríade catalítica por intermédio de moléculas de água.

Apesar do radical indanona do donepezil diferir da porção aromática da subunidade farmacofórica **B** dos padrões estudados, também atua como um aceitador de ligações de hidrogênio, permitindo assim a comparação entre fármaco ativo e os compostos estudados. Ambas as porções interagem com aminoácidos complementares na região mediana da cavidade enzimática, sendo esta outra similaridade. Além disso, o donepezil, assim como a subunidade farmacofórica **A**, apresenta um grupo amino, justificando mais uma vez a escolha do donepezil como parâmetro de possíveis correlações entre os indivíduos.

Muito embora o donepezil não apresente em sua estrutura química o grupo acetil como a subunidade farmacofórica **A** dos padrões estudados, este foi introduzido de forma a copiar a acetilcolina, que é o substrato da AChE. Já a possibilidade de inserção do grupo carbamato na subunidade **A** deve-se ao interesse em avaliar a influência deste grupo no reconhecimento molecular pela AChE, visando a implementação de estudos experimentais.

Capítulo 2

Metodologias

2.1 Análise Conformacional e Minimização de Energia

As diferentes geometrias de uma molécula candidata a fármaco inibidor podem ou não ser bioativas. Neste contexto, a análise conformacional é uma importante ferramenta para o planejamento racional de novos fármacos, auxiliando na determinação tridimensional da interação entre a droga e seu receptor. Variando a orientação espacial das moléculas por meio de rotações dos ângulos diedrais das ligações moleculares, a análise conformacional permite explorar as formas energeticamente favoráveis de uma molécula, as chamadas conformações.

Os compostos-alvo deste estudo, desenhados de forma tridimensional no software CaChe [27], não necessariamente encontram-se na conformação mais estável. Durante a geração destas estruturas, podem ocorrer distorções em relação ao comprimento e ângulos de ligação e ângulos diedrais. Com o objetivo de corrigir tais distorções, as geometrias moleculares são otimizadas pela minimização de energia, procedimento matemático que localiza as conformações estáveis (mínimos de energia) de uma molécula via cálculos de mecânica molecular ou mecânica quântica.

Para identificar a conformação mais estável de uma molécula, com uma energia mínima global (e não apenas local), é necessário gerar várias conformações e

comparar os valores de energia obtidos a cada modificação. Na execução da análise conformacional das moléculas pertencentes ao PEM-1 e PEM-2, os ângulos diedrais foram escolhidos conforme as possíveis interações ligante-receptor (veja figuras 1.4 e 1.5). Combinados dois a dois, os diedros foram rotacionados de 0° a 360° , com um incremento de 15° , gerando inúmeras conformações.

Para a minimização da energia das moléculas, optou-se por cálculos mecânico-quânticos, escolhendo-se para tal, o método semi-empírico *Parametric Method Number 5* (PM5) [27]. O método semi-empírico é menos exato quando comparado ao método *ab initio*, porém, exige menor esforço computacional e tempo de processamento. A energia é calculada utilizando a equação de Schrödinger (seção 2.2) a partir de parâmetros ajustados experimentalmente. Os cálculos mecânico-quânticos, realizados no pacote de cálculo de orbitais moleculares [27], forneceram um mapeamento da *superfície de energia potencial* (SEP) de cada estrutura molecular estudada (veja figura 2.1), permitindo determinar a conformação mais estável para cada par de ângulos diedrais pré-selecionados.

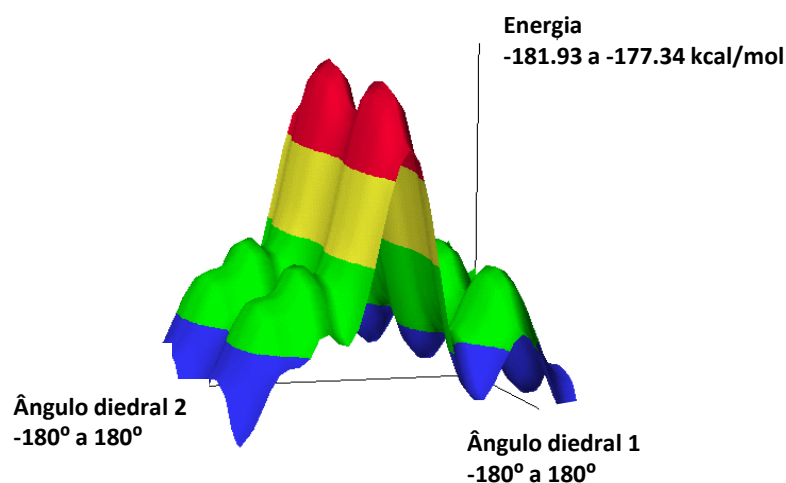


Figura 2.1: Superfície de energia potencial de um dos compostos estudados.

As distintas geometrias de cada uma das 40 estruturas moleculares, oriundas da análise conformacional e minimização da energia previamente descritas, apresentaram, em geral, valores muito próximos para o mínimo de energia. Contudo, o primeiro passo na modelagem de novos fármacos é determinar, com a maior precisão possível, a conformação de fato mais estável de uma molécula. Sendo assim, estas distintas geometrias foram todas reotimizadas segundo cálculos mecânico-quânticos *ab initio*, por meio do pacote computacional Gaussian 09 [28]. Muito embora as estruturas tenham sido reotimizadas, a pré-otimização por meio do método semiempírico PM5 contribuiu para reduzir o tempo de processamento por parte dos cálculos *ab initio*, uma vez que a busca pelo mínimo de energia deu-se a partir de uma conformação pré-estabelecida, supostamente próxima à mais estável. Na realização dos cálculos *ab initio*, utilizou-se o modelo de Hartree-Fock-Restrito (RHF) e funções de base 6-311+G(2d,p), descritos detalhadamente mais adiante.

2.2 O Problema Molecular

As moléculas a serem modeladas neste trabalho possuem de 60 a 80 átomos (cerca de 200 a 280 elétrons), caracterizando, portanto, um problema molecular de muitos corpos. Do ponto de vista da mecânica quântica, um sistema constituído por N elétrons e M núcleos é descrito pela equação de Schrödinger estacionária e não relativística:

$$\hat{H}\Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = E\Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) \quad (2.1)$$

em que \mathbf{r} refere-se às coordenadas eletrônicas, \mathbf{R} refere-se às coordenadas nucleares e \hat{H} é o chamado operador hamiltoniano que, em unidades atômicas, é dado por

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

Os índices i e j referem-se aos elétrons. A distância entre dois elétrons é indicada por r_{ij} e a distância entre um elétron e um núcleo por r_{iA} . A massa dos núcleos é indicada por M_A e a distância entre os mesmos por R_{AB} .

Resolver a equação 2.1, ainda que se utilize algum tipo de método numérico, torna-se praticamente impossível, mesmo para o caso mais simples de uma molécula diatômica. Faz-se então necessário o uso de algum tipo de aproximação que permita tratar separadamente as dinâmicas eletrônica e nuclear. Como os elétrons são muito menos massivos que os núcleos, podem mover-se mais rapidamente. Então, para uma pequena perturbação na configuração nuclear, é razoável pensar que a função de onda eletrônica se ajusta quasi-estaticamente ao movimento dos núcleos. Esta é a idéia central da Aproximação de Born-Oppenheimer (ABO) [29]. Sendo assim, a função de onda pode ser escrita em termos de uma expansão adiabática

$$\Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = \phi(\mathbf{r}; \mathbf{R})\chi(\mathbf{R}) \quad (2.2)$$

onde $\chi(\mathbf{R})$ descreve a dinâmica dos núcleos e $\phi(\mathbf{r}; \mathbf{R})$ representa a função de onda eletrônica que depende explicitamente das coordenadas eletrônicas e parametricamente das coordenadas nucleares.

Substituindo-se a função 2.2 na equação 2.1, o termo de acoplamento $\nabla\phi(\mathbf{r}; \mathbf{R}) \cdot \nabla\chi(\mathbf{R})$ torna-se desprezível haja vista que, no âmbito da ABO, é razoável considerar $\nabla\phi(\mathbf{r}; \mathbf{R}) \approx 0$. Desta forma, a equação de Schrödinger molecular (2.1) desmembra-se em duas outras equações. A primeira, chamada equação eletrônica, é dada por

$$\left[-\sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} - \sum_{A=1}^M \sum_{i=1}^N \frac{Z_A}{r_{iA}} \right] = \epsilon(\mathbf{R}) \phi(\mathbf{r}; \mathbf{R}) \quad (2.3)$$

e que deve ser resolvida para diferentes configurações nucleares fornecendo um conjunto de funções de onda eletrônicas e suas respectivas energias. A segunda, chamada de equação nuclear, é dada por

$$\left[-\sum_{A=1}^M \frac{\nabla_A^2}{2M_A} + V(\mathbf{R}) \right] \chi(\mathbf{R}) = \mathcal{E} \chi(\mathbf{R}) \quad (2.4)$$

em que

$$V(\mathbf{R}) = \epsilon(\mathbf{R}) + \sum_{A=1}^{M-1} \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}}. \quad (2.5)$$

corresponde à superfície de energia potencial do sistema (SEP), a qual rege a dinâmica molecular.

As soluções da equação de Schrödinger nuclear descrevem a vibração, a rotação e a translação da molécula. Contudo, a dinâmica nuclear não é objeto de estudo do presente trabalho e sim as propriedades eletrônicas dos derivados do cardol e ácido anacárdico (PEM1 e PM2), advindas da solução da equação de Schrödinger eletrônica 2.3.

2.2.1 Solução da Equação de Schrödinger Eletrônica

Supondo que não ocorra qualquer interação entre os elétrons da molécula ou, alternativamente, os elétrons se encontrem sob ação de um potencial médio, então o hamiltoniano eletrônico pode ser descrito por

$$\hat{\mathcal{H}} = \sum_{i=1}^N \hat{h}(i) \quad (2.6)$$

onde $h(i)$ é o operador que descreve a energia cinética e a energia potencial do i -ésimo elétron.

Já a função de onda eletrônica, para uma determinada configuração espacial, assume a seguinte forma

$$\phi(\mathbf{r}) = \phi_1(\mathbf{r}_1)\phi_2(\mathbf{r}_2)\dots\phi_N(\mathbf{r}_N). \quad (2.7)$$

Por depender apenas das coordenadas espaciais dos elétrons, a função de onda (2.7) não é capaz de descrever completamente o movimento dos mesmos. É preciso acrescentar informações à respeito do *spin* dos elétrons e, para tanto, introduz-se as funções de spin $\alpha(\omega)$ e $\beta(\omega)$ que correspondem aos estados de *spin up* e *spin down*, respectivamente, sendo ω a chamada variável de *spin*. Estas funções, satisfazem relações de ortonormalidade, ou seja

$$\langle \alpha | \alpha \rangle = \langle \beta | \beta \rangle = 1 \quad (2.8)$$

$$\langle \alpha | \beta \rangle = \langle \beta | \alpha \rangle = 0. \quad (2.9)$$

Neste formalismo, as coordenadas eletrônicas são então descritas por

$$x = \{\mathbf{r}, \omega\} \quad (2.10)$$

e a função de onda eletrônica para um sistema com N elétrons, também conhecida como produto de Hartree, pode ser escrita como

$$\phi(\mathbf{r}) = \chi_1(\mathbf{x}_1)\chi_2(\mathbf{x}_2)\dots\chi_N(\mathbf{x}_N) \quad (2.11)$$

onde a variável x_i representa o conjunto de coordenadas espaciais e de *spin* do i-ésimo elétron. Cada função $\chi(x_i)$ é chamada de *spin orbital molecular*. E para cada orbital espacial molecular $\psi(\mathbf{r})$ é possível formar dois spins orbitais moleculares, ou seja

$$\chi(\mathbf{x}) = \begin{cases} \psi(\mathbf{r})\alpha(\omega) \\ \text{ou} \\ \psi(\mathbf{r})\beta(\omega). \end{cases} \quad (2.12)$$

O hamiltoniano do sistema não faz menção alguma ao *spin* dos elétrons. Por isso, expressar a função de onda eletrônica em termos das coordenadas espaciais e de *spin* não é suficiente para descrever adequadamente a dinâmica eletrônica. Outra condição deve ser imposta à função de onda: a mesma deve ser anti-simétrica com relação à inversão de coordenadas espaciais e de *spin* entre dois elétrons quaisquer, ou seja

$$\phi(x_1, x_2 \dots x_i, \dots x_j, \dots x_N) = -\phi(x_1, x_2 \dots x_j, \dots x_i, \dots x_N). \quad (2.13)$$

Este princípio, que na verdade é uma forma mais geral do princípio da exclusão de Pauli, considera o caráter fermiônico dos elétrons.

O produto de Hartree (2.11) claramente não satisfaz à condição 2.13, além de não levar em consideração a indistinguibilidade dos elétrons. O princípio de anti-simetria naturalmente conduz à uma função de onda do tipo determinante de Slater

$$\phi(x) = \begin{vmatrix} \chi_1(x_1) & \chi_2(x_1) & \cdots & \chi_N(x_1) \\ \chi_1(x_2) & \chi_2(x_2) & \cdots & \chi_N(x_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \chi_1(x_N) & \chi_2(x_N) & \cdots & \chi_N(x_N) \end{vmatrix} \quad (2.14)$$

que retrata a indistinguibilidade dos elétrons e sua natureza fermiônica. A constante $\frac{1}{\sqrt{N!}}$ é um fator de normalização. Em uma notação mais simplificada, escreve-se

$$\phi(x) = |\chi_1 \chi_2 \cdots \chi_N\rangle. \quad (2.15)$$

2.2.2 A Aproximação de Hartree-Fock

No âmbito do formalismo de Hartree-Fock, a função de onda que melhor descreve um sistema com N elétrons no estado fundamental é dada por

$$|\phi_0\rangle = |\chi_1\chi_2\cdots\chi_N\rangle. \quad (2.16)$$

As equações de Hartree-Fock são obtidas por meio do princípio variacional. Definindo o funcional energia como

$$\epsilon_0[\chi_i] = \langle \tilde{\phi}_0 | \mathcal{H} | \tilde{\phi}_0 \rangle \quad (2.17)$$

sujeito ao vínculo da ortonormalidade dos spins orbitais, de forma que

$$\langle \chi_i | \chi_j \rangle = \delta_{ij} \quad (2.18)$$

procura-se por um conjunto de spins orbitais $\{\chi_i\}$ que minimize a expressão da energia para um determinante simples de Slater (2.16). A função tentativa $|\tilde{\phi}_0\rangle$ que minimiza ϵ_0 é a melhor aproximação para a solução da equação de Schrödinger eletrônica. Para solucionar este problema utiliza-se o método dos multiplicadores de Lagrange definindo-se o seguinte funcional

$$\mathcal{L}[\chi_i] = \epsilon_0[\chi_i] - \sum_i^N \sum_j^N \lambda_{ij} (\langle \chi_i | \chi_j \rangle - \delta_{ij}) \quad (2.19)$$

em que λ_{ij} são os multiplicadores de Lagrange; estes últimos devem ser elementos de uma matriz hermitiana, ou seja, $\lambda_{ij} = \lambda_{ij}^*$.

O valor esperado para a energia de Hartree-Fock no estado fundamental, em notação para físicos, é dado por

$$\epsilon_0[\chi_i] = \sum_i^N \langle i | \hat{h} | j \rangle + \frac{1}{2} \sum_i^N \sum_j^N \langle ij | ij \rangle \quad (2.20)$$

sendo

$$\begin{aligned} \langle ij||ij \rangle &= \int \int \chi_i^*(x_1) \chi_j^*(x_2) r_{12}^{-1} \chi_i(x_1) \chi_j(x_2) \\ &\quad - \int \int \chi_i^*(x_1) \chi_j^*(x_2) r_{12}^{-1} \chi_j(x_1) \chi_i(x_2). \end{aligned} \quad (2.21)$$

Para minimizar 2.20, é preciso fazer a variação do funcional \mathcal{L} igual a zero

$$\delta \mathcal{L} = \delta \epsilon_0 - \sum_i^N \sum_j^N \lambda_{ij} \delta \langle \chi_i | \chi_j \rangle = 0 \quad (2.22)$$

considerando-se uma variação infinitesimal dos spins orbitais, isto é $\chi_i \rightarrow \chi_i + \delta \chi_i$.

Com este procedimento chega-se na equação de Hartree-Fock integro-diferencial

$$\begin{aligned} h(x_i) \chi_i(x_1) + \sum_{j \neq i} \left[\int \chi_j^*(x_2) r_{12}^{-1} \chi_j(x_2) dx_2 \right] \chi_i(x_1) \\ - \sum_{j \neq i} \left[\int \chi_j^*(x_2) r_{12}^{-1} \chi_j(x_2) dx_2 \right] \chi_j(x_1) = \epsilon_i \chi_i(x_i) \end{aligned} \quad (2.23)$$

em que

$$h(x_1) = -\frac{1}{2} \nabla_1^2 - \sum_A \frac{Z_A}{r_1} \quad (2.24)$$

é o hamiltoniano de um único elétron interagindo somente com os núcleos.

Reescrevendo 2.23 a equação em termos dos operadores de Coulomb

$$J_j(x_1) \chi_i(x_1) = \left[\int \chi_j^*(x_2) r_{12}^{-1} \chi_j(x_2) dx_2 \right] \chi_i(x_1) \quad (2.25)$$

e de troca

$$K_j(x_1) \chi_i(x_1) = \left[\int \chi_j^*(x_2) r_{12}^{-1} \chi_j(x_2) dx_2 \right] \chi_j(x_1) \quad (2.26)$$

obté-m-se

$$\left[h(x_1) + \sum_{j \neq i} J_j(x_1) - \sum_{j \neq i} K_j(x_1) \right] \chi_i(x_1) = \epsilon_i \chi_i(x_1). \quad (2.27)$$

Analisando as equações 2.25 e 2.26, é fácil verificar que

$$[J_i(x_1) - K_i(x_1)] \chi_i(x_1) = 0. \quad (2.28)$$

Dessa maneira é possível eliminar a restrição $j \neq i$ dos somatórios em 2.27 e definir o chamado operador de Fock

$$f(1) = h(1) + \sum_j J_j(1) - K_j(1). \quad (2.29)$$

A equação de Hartree-Fock integro-diferencial (2.23) torna-se então uma equação de autovalor

$$f(x_1) \chi_i(x_1) = \epsilon_i \chi_i(x_1) \quad (2.30)$$

sendo

$$f(x_1) = h(x_1) + \nu^{HF}(x_1) \quad (2.31)$$

em que o operador

$$\nu^{HF}(x_1) = \sum_j [J_j(x_1) - K_j(x_1)] \quad (2.32)$$

é o chamado potencial de Hartree-Fock.

A equação 2.30 corresponde à equação de Hartree-Fock para um conjunto de spins orbitais $\{\chi_i\}$ genérico. Contudo, o conjunto de spins orbitais pode ser classificado como restrito, caso em que a função de onda espacial é a mesma para as funções de spin α e β , e irrestrito, caso em que a função de onda espacial é diferente para as funções de spin α e β . No presente trabalho será implementado o modelo Hartree-Fock-Restrito (RHF) para os cálculos de estrutura eletrônica.

Um conjunto restrito de spins orbitais tem a seguinte forma

$$\chi_i(\mathbf{x}) = \begin{cases} \psi_j(\mathbf{r})\alpha(\omega) \\ \text{ou} \\ \psi_j(\mathbf{r})\beta(\omega). \end{cases} \quad (2.33)$$

Isto significa que cada spin orbital pode ser ocupado por dois elétrons com diferentes *spins* mas com a mesma forma analítica para a função de onda espacial. Considerando que os sistemas moleculares em estudo possuem um número N par de elétrons, os cálculos de estrutura eletrônica serão realizados à nível de *camada fechada*, ou seja, supõe-se que os elétrons estão todos emparelhados, de maneira que $N/2$ orbitais espaciais são duplamente ocupados.

Multiplicando-se pela direita a equação de Hartree-Fock (2.30) por $\alpha(\omega_1)$, obtém-se

$$f(\mathbf{x}_1)\psi_j(\mathbf{r}_1)\alpha(\omega_1) = \epsilon_j\psi_j(\mathbf{r}_1)\alpha(\omega_1) \quad (2.34)$$

onde ϵ_j é a energia do orbital espacial ψ_j idêntica à ϵ_i , energia do spin orbital χ_i . Multiplicando-se agora a equação 2.30 pela esquerda por $\alpha^*(\omega_1)$ e integrando-se nas coordenadas de spin, chega-se à

$$\left[\int d\omega_1 \alpha^*(\omega_1) f(\mathbf{x}_1) \alpha(\omega_1) \right] \psi_j(\mathbf{r}_1) = \epsilon_j \psi_j(\mathbf{r}_1). \quad (2.35)$$

Escrevendo-se o operador de Fock (2.29) na forma

$$f(\mathbf{x}_1) = h(\mathbf{r}_1) + \sum_m^N \int d\mathbf{x}_2 \chi_m^*(\mathbf{x}_2) r_{12}^{-1} (1 - \mathcal{P}_{12}) \chi_m(\mathbf{x}_2) \quad (2.36)$$

onde \mathcal{P}_{12} é o operador de troca de spin, e substituindo o mesmo na equação 2.35, esta última torna-se

$$\begin{aligned}
f(\mathbf{r}_1)\psi_j(\mathbf{r}_1) &= h(\mathbf{r}_1)\psi_j(\mathbf{r}_1) + \sum_m^N \int d\omega_1 d\mathbf{x}_2 \alpha^*(\omega_1) \chi_m^*(\mathbf{x}_2) r_{12}^{-1} \chi_m(\mathbf{x}_2) \alpha(\omega_1) \psi_j(\mathbf{r}_1) \\
&\quad - \sum_m^N \int d\omega_1 d\mathbf{x}_2 \alpha^*(\omega_1) \chi_m^*(\mathbf{x}_2) r_{12}^{-1} \chi_m(\mathbf{x}_2) \alpha(\omega_2) \psi_j(\mathbf{r}_2) \\
&= \epsilon_j \psi_j(\mathbf{r}_1).
\end{aligned} \tag{2.37}$$

em que $f(\mathbf{r}_1)$ é o operador de Fock camada fechada, dado por

$$f(\mathbf{r}_1) = \int d\omega_1 \alpha^*(\omega_1) f(\mathbf{x}_1) \alpha(\omega_1). \tag{2.38}$$

Em se tratando de um sistema camada fechada, a soma sobre os spins orbitais corresponde a duas somas iguais para as funções de spin α e β , isto é

$$\sum_m^N \rightarrow \sum_m^{N/2} + \sum_{\bar{m}}^{N/2}. \tag{2.39}$$

Sendo assim, é possível escrever

$$\begin{aligned}
f(\mathbf{r}_1)\psi_j(\mathbf{r}_1) &= h(\mathbf{r}_1)\psi_j(\mathbf{r}_1) \\
&+ \sum_m^{N/2} \int d\omega_1 d\omega_2 d\mathbf{r}_2 \alpha^*(\omega_1) \psi_m^*(\mathbf{r}_2) \alpha^*(\omega_2) r_{12}^{-1} \psi_m(\mathbf{r}_2) \alpha(\omega_2) \alpha(\omega_1) \psi_j(\mathbf{r}_1) \\
&+ \sum_m^{N/2} \int d\omega_1 d\omega_2 d\mathbf{r}_2 \alpha^*(\omega_1) \psi_m^*(\mathbf{r}_2) \beta^*(\omega_2) r_{12}^{-1} \psi_m(\mathbf{r}_2) \beta(\omega_2) \alpha(\omega_1) \psi_j(\mathbf{r}_1) \\
&+ \sum_m^{N/2} \int d\omega_1 d\omega_2 d\mathbf{r}_2 \alpha^*(\omega_1) \psi_m^*(\mathbf{r}_2) \alpha^*(\omega_2) r_{12}^{-1} \psi_m(\mathbf{r}_1) \alpha(\omega_1) \alpha(\omega_2) \psi_j(\mathbf{r}_2) \\
&+ \sum_m^{N/2} \int d\omega_1 d\omega_2 d\mathbf{r}_2 \alpha^*(\omega_1) \psi_m^*(\mathbf{r}_2) \beta^*(\omega_2) r_{12}^{-1} \psi_m(\mathbf{r}_1) \beta(\omega_1) \alpha(\omega_2) \psi_j(\mathbf{r}_2) \\
&= \epsilon_j \psi_j(\mathbf{r}_1).
\end{aligned} \tag{2.40}$$

Realizando as integrações sobre $d\omega_1$ e $d\omega_2$, devido às relações de ortonormalidade das funções de spin (2.9), o último termo da equação acima torna-se nulo. Já os termos de coulomb são idênticos, portanto, têm-se que

$$f(\mathbf{r}_1)\psi_j(\mathbf{r}_1) = h(\mathbf{r}_1)\psi_j(\mathbf{r}_1) + \left[2 \sum_m^{N/2} \int d\mathbf{r}_2 \psi_m^*(\mathbf{r}_2) r_{12}^{-1} \psi_m(\mathbf{r}_2) \right] \psi_j(\mathbf{r}_1) - \left[\sum_m^{N/2} \int d\mathbf{r}_2 \psi_m^*(\mathbf{r}_2) r_{12}^{-1} \psi_j(\mathbf{r}_2) \right] \psi_m(\mathbf{r}_1) = \epsilon_j \psi_j(\mathbf{r}_1). \quad (2.41)$$

Trocando os índices m por a , o operador de fock camada fechada pode ser escrito como

$$f(\mathbf{r}_1) = h(\mathbf{r}_1) + \sum_a^{N/2} \int d\mathbf{r}_2 \psi_a^*(\mathbf{r}_2) (2 - \mathcal{P}_{12}) r_{12}^{-1} \psi_a(\mathbf{r}_2) \quad (2.42)$$

ou, equivalentemente,

$$f(1) = h(1) + \sum_a^{N/2} 2J_a(1) - K_a(1) \quad (2.43)$$

onde os operadores de troca e de coulomb camada fechada são definidos como

$$J_a(1) = \int d\mathbf{r}_2 \psi_a^*(\mathbf{r}_2) r_{12}^{-1} \psi_a(\mathbf{r}_2) \quad (2.44)$$

e

$$K_a(1)\psi_i(1) = \left[\int d\mathbf{r}_2 \psi_a^*(\mathbf{r}_2) r_{12}^{-1} \psi_i(\mathbf{r}_2) \right] \psi_a(1). \quad (2.45)$$

Estas duas últimas equações são análogas àsquelas encontradas para um conjunto de spins orbitais genérico (2.25 e 2.26), exceto pelo fator 2 que ocorre no operador de coulomb. E o somatório na equação 2.43 é sobre os $N/2$ espaciais orbitais $\{\psi_a\}$ ocupados. Desta forma, a equação espacial de Hartree-Fock camada fechada é dada por

$$f(1)\psi_j(1) = \epsilon_j\psi_j(1). \quad (2.46)$$

A energia de Hartree-Fock camada fechada do i -ésimo elétron, considerando-se as funções de spin já integradas, é dada por

$$\epsilon_i = \langle i|h|i\rangle + \sum_{j=1}^{N/2} 2\langle ij|ij\rangle - \langle ij|ji\rangle \quad (2.47)$$

ou, simplificadamente

$$\epsilon_i = h_{ii} + \sum_{j=1}^{N/2} 2J_{ij} - K_{ij} \quad (2.48)$$

Somando-se todas as energias dos orbitais espaciais têm-se que

$$\sum_{i=1}^{N/2} \epsilon_i = \sum_{i=1}^{N/2} h_{ii} + \sum_{i=1}^{N/2} \sum_{j=1}^{N/2} 2J_{ij} - K_{ij} \quad (2.49)$$

Sabendo que a energia total do sistema é dada por

$$E_0 = 2 \sum_{i=1}^{N/2} h_{ii} + \sum_{i=1}^{N/2} \sum_{j \neq i}^{N/2} 2J_{ij} - K_{ij} \quad (2.50)$$

e, substituindo 2.49 na expressão acima, pode-se escrever a energia total como sendo

$$E_0 = \sum_{i=1}^{N/2} (h_{ii} + f_{ii}) = \sum_{i=1}^{N/2} (h_{ii} + \epsilon_i). \quad (2.51)$$

2.2.3 Introdução de Funções de Base Espaciais

Por se tratar de uma equação não-linear, a equação espacial de Hartree-Fock camada fechada (2.46) deve ser resolvida iterativamente, exigindo portanto, soluções numéricas. Para tanto, segundo a contribuição de Roothaan [30], pode-se introduzir um conjunto de funções de base espaciais conhecidas, de maneira que

a equação diferencial 2.46 seja convertida em um conjunto de equações algébricas solucionáveis por técnicas de matriz padrão.

Expandindo-se linearmente os orbitais espaciais em termos de um conjunto K de funções de base, têm-se que

$$\psi_i = \sum_{\mu=1}^K C_{\mu i} \phi_{\mu} \quad i = 1, 2, \dots, K \quad (2.52)$$

onde $C_{\mu i}$ são os coeficientes desta expansão a serem determinados.

Para que esta expansão seja exata, o conjunto $\{\phi_{\mu}\}$ deve ser completo. Contudo, por questões de ordem computacional, na prática é impossível definir um conjunto infinito de funções de base. Por este motivo, a escolha das funções de base torna-se tão importante para os cálculos de estrutura eletrônica; esta deve fornecer a expansão mais “exata” possível, sobretudo para os orbitais espaciais $\{\psi_i\}$ que estão ocupados em $|\Psi_0\rangle$ e que determinam a energia do estado fundamental. Por serem bem apropriadas para descrever as moléculas a serem modeladas no trabalho, foram escolhidas as funções de base 6-311+G(2d,p) [31] para os cálculos em questão (veja apêndice A).

O problema do cálculo dos orbitais moleculares de Hartree-Fock, portanto, reduz-se ao cálculo dos coeficientes $C_{\mu i}$ da expansão linear, sendo possível obter uma matriz para estes coeficientes. Substituindo 2.52 na equação de Hartree-Fock (2.46) tem-se que

$$f(1) \sum_{\nu} C_{\nu i} \phi_{\nu}(1) = \epsilon_i \sum_{\nu} C_{\nu i} \phi_{\nu}(1) \quad (2.53)$$

Multiplicando a equação acima por $\phi_{\mu}^*(1)$ pelo lado esquerdo e integrando, a equação diferencial torna-se a seguinte equação matricial

$$\sum_{\nu} C_{\nu i} \int d\mathbf{r}_1 \phi_{\mu}^*(1) f(1) \phi_{\nu}(1) = \epsilon_i \sum_{\nu} C_{\nu i} \int d\mathbf{r}_1 \phi_{\mu}^*(1) \phi_{\nu}(1) \quad (2.54)$$

sendo

$$S_{\mu\nu} = \int d\mathbf{r}_1 \phi_\mu^*(1) \phi_\nu(1) \quad (2.55)$$

a chamada matriz de *overlap*, sendo esta hermitiana, haja vista que as funções de base $\{\phi_\mu\}$ além de ortonormais são linearmente independentes e,

$$F_{\mu\nu} = \int d\mathbf{r}_1 \phi_\mu^*(1) f(1) \phi_\nu(1) \quad (2.56)$$

a chamada matriz de Fock, também hermitiana.

Assim a equação de Hartee-Fock na forma matricial, também conhecida como equação de Hartee-Fock-Roothaan, é dada por

$$\sum_{\nu} F_{\mu\nu} C_{\nu i} = \epsilon_i \sum_{\nu} S_{\mu\nu} C_{\nu i} \quad i = 1, 2, \dots, K \quad (2.57)$$

ou simplesmente

$$\mathbf{FC} = \epsilon \mathbf{SC}. \quad (2.58)$$

O método utilizado para resolver a equação de auto-valor (2.58) é o método do Campo Auto-Consistente ou SCF (do inglês “ *Self Consistent Field* ”) [29], considerando um conjunto finito de funções de base. No caso em que a base é completa, alguns autores referem-se à solução de 2.58 como o limite de Hartree-Fock. O procedimento computacional, em linhas gerais, consiste em:

- Dado um conjunto inicial de coeficiente $\{C_i\}$, constrói-se a matriz de fock \mathbf{F} .
- Pela minimização da energia, resolvendo-se a equação 2.58, obtém-se um novo conjunto de coeficientes $\{C'_i\}$ e um conjunto de autovalores $\{\epsilon'\}$.
- Constrói-se uma nova matriz \mathbf{F} e repete-se o procedimento. O teste de convergência se dá por meio de comparação entre as energias ou os elementos da matriz \mathbf{C} de duas iterações sucessivas.

Segundo a aproximação de Hartree-Fock (AHF) cada elétron de um átomo ou molécula interage com um campo médio gerado pelos demais elétrons. Através da AHF é possível obter até 99% da energia no estado fundamental no cálculo de estrutura eletrônica molecular. Para obter o restante desta energia, importante para os cálculos de muitas propriedades eletrônicas, é preciso incluir os efeitos de correlação eletrônica, sendo necessária a utilização dos chamados métodos pós Hartree-Fock que, em sua maioria, tem como ponto de partida a AHF.

2.3 Teoria do Funcional de Densidade

A teoria do funcional de densidade ou DFT (*Density Functional Theory*) é uma teoria mecânico quântica moderna, bastante difundida na física computacional, que surgiu como uma atraente alternativa de solução do hamiltoniano de sistemas de muitos corpos. Permite calcular propriedades moleculares do estado fundamental de sistemas multieletrônicos, exigindo menor esforço computacional e espaço de memória quando comparada com os métodos *ab initio* tradicionais, baseados nas equações de Hartree-Fock-Rootham.

A variável fundamental no formalismo DFT é a densidade eletrônica $\rho(r)$, que descreve como se dá a distribuição de carga em uma molécula. Assim, a função de onda no estado fundamental e, portanto, os observáveis deste estado, são funcionais da densidade eletrônica $\rho(r)$. Os dois teoremas a seguir, propostos por Hohenberg e Kohn [32], formam a base teórica do DFT:

- O potencial externo V_{ext} sentido pelos elétrons é um funcional da densidade eletrônica.
- A energia do estado fundamental $E[\rho(r)]$ é mínima para a densidade exata $\rho_0(r)$.

O primeiro teorema estabelece que a energia pode ser escrita como um funcional único da densidade eletrônica do estado fundamental, ou seja, $E = E[\rho_0(r)]$. O segundo, assegura que a energia do estado fundamental obedece ao princípio variacional, isto é, $E[\rho_0(r)] < E[\rho(r)]$.

Segundo o modelo de partículas não interagentes entre si proposto por Kohn e Sham [33], o funcional energia pode ser escrito por

$$E_{KS}[\rho] = T_0[\rho] + U_H[\rho] + V_{ext}[\rho] + V_{XC}[\rho] \quad (2.59)$$

em que $T_0[\rho]$ é a energia cinética média de um sistema não interagente de elétrons com a mesma densidade eletrônica ρ de um sistema interagente, $U_H[\rho]$ é o termo de interação coulombiana média entre os elétrons e $V_{ext}[\rho]$ é o potencial efetivo externo no qual as partículas se movem. O termo $V_{XC}[\rho]$, que inclui a contribuição da interação elétron-elétron não clássica (troca e correlação), contém a correção da energia cinética ($T - T_0$) e da energia de Hartree ($U - U_H$).

O formalismo de partícula independente inclui os efeitos de interação de muitos corpos, sendo, portanto, formalmente exato. Minimizando o funcional energia em relação à densidade eletrônica aplicando-se o método dos multiplicadores de Lagrange, obtém-se as equações que descrevem o estado do sistema, chamadas equações de Kohn-Sham:

$$\left(-\frac{\nabla^2}{2} + V_{ef}\right)\psi_i = \epsilon_i\psi_i \quad (2.60)$$

em que ϵ_i são os autovalores e ψ_i as autofunções. O potencial efetivo V_{ef} é um funcional da densidade, $V_{ef} = V_{ef}[\rho]$:

$$V_{ef} = \int \frac{\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r}' + v(\vec{r}) + \frac{\delta E_{XC}[\rho]}{\delta \rho} \quad (2.61)$$

em que o termo E_{XC} é o chamado potencial de troca-correlação que inclui os efeitos de correlação de todas as partículas.

Uma vez que o potencial efetivo depende da densidade eletrônica, as equações de Kohn-Sham (2.60) podem ser resolvidas por meio de um procedimento auto-consistente, assim como as equações de Hartree-Fock-Roothaan, sendo a densidade eletrônica escrita em termos dos orbitais moleculares ϕ_i :

$$\rho(\vec{r}) = \sum_i^N |\phi_i(\vec{r})|^2. \quad (2.62)$$

A etapa mais difícil na resolução das equações de Kohn-Sham (2.60) é determinar o funcional de troca-correlação, pois não existe forma analítica exata para este, exceto no modelo de gás de elétrons. Portanto, o funcional de troca-correlação deve ser tratado por meio de aproximações.

A abordagem dos *funcionais híbridos* como aproximação para o funcional de troca-correlação foi introduzida por Axel Becke em 1993 [34]. Os funcionais híbridos são escritos como a combinação linear de funcionais DFT “puros” e o termo de troca exato do método de Hartree-Fock [35]. O funcional de troca de Becke, denominado B3 [34], combinado com o funcional de troca de Lee, Yang e Parr, denominado LYP [36], deu origem ao chamado funcional híbrido B3LYP:

$$E_{XC}^{B3LYP} = (1 - a_0 - a_x)E_x^{LSD} + a_0E_x^{HF} + a_xE_x^{B88} + (1 - a_c)E_c^{VWN} + a_cE_c^{LYP} \quad (2.63)$$

em que os parâmetros, escolhidos de forma a reproduzir energias de atomização, potenciais de ionização e energias atômicas totais [37], são: $a_0 = 0,20$, $a_x = 0,72$ e $a_c = 0,81$. O termo E_x^{HF} é a energia de troca de Hartree-Fock, os termos E_x^{LSD} e E_c^{VWN} são oriundos da aproximação da densidade local [38].

A razão para a escolha do DFT nos cálculos das energias eletrônicas dos compostos a serem modelados, reside no fato de que a confiabilidade nos resultados obtidos pelo método é comparável a cálculos *ab initio* mais rigorosos, incluindo os efeitos de correlação eletrônica. Além disto, o DFT viabiliza o estudo de sistemas

moleculares com elevado número de átomos (elétrons), como é o caso, com um custo computacional relativamente menor.

O funcional híbrido B3LYP, apresentado nesta seção, foi adotado como funcional de troca-correlação para calcular a energia eletrônica mínima das várias conformações, obtidas previamente via método semi-empírico (segundo seção 2.1), de cada molécula estudada. Então, para cada composto, determinou-se a conformação de fato *mais estável* a ser modelada e suas respectivas energias do último e penúltimo orbital ocupado, energia do primeiro e do segundo orbital ocupado, diferença de energia entre o primeiro orbital virtual e o último orbital ocupado e carga eletrônica do nitrogênio pertencente ao grupo amina, comum a todas as estruturas de ambos os padrões moleculares. A importância destas propriedades no planejamento dos candidatos a fármaco inibidor é descrita, em detalhe, na próxima seção.

2.4 Descritores Moleculares

A ação terapêutica de um fármaco decorre de sua interação com seu receptor biológico dentre outros fatores. Interações eletrostáticas, estéricas e lipofílicas influenciam diretamente na distribuição do fármaco nos sítios de ligação que constituem o sistema biológico. Sendo assim, a atividade biológica de um fármaco depende de fatores relacionados não somente com sua estrutura molecular, mas também de propriedades físico-químicas específicas.

Dois fármacos estruturalmente semelhantes, porém distintos quanto suas propriedades físico-químicas, podem apresentar resposta biológica diversa. Os descritores moleculares de uma estrutura química, que abrangem desde parâmetros físico-químicos, eletrônicos, até características geométricas e topológicas, correspondem a valores numéricos bem definidos, que, quando analisados estatisticamente, permitem explicar a atividade biológica de uma molécula de forma qualitativa e quantitativa. Um conjunto adequado de descritores moleculares, capaz de sele-

cionar, dentre indivíduos de um certo grupo molecular, aqueles que possuem melhor perfil farmacofórico, representa uma poderosa ferramenta no planejamento racional de novos fármacos.

Os descritores moleculares mais amplamente utilizados no desenho de fármacos podem ser classificados como:

- **Descritores Constitucionais:** trazem informações relacionadas aos elementos constituintes da estrutura da molécula como, por exemplo, a massa molecular, o número total de átomos, o número de ligações simples, duplas, triplas ou aromáticas, assim como o número de anéis aromáticos.
- **Descritores Geométricos:** trazem informações relacionadas ao arranjo espacial dos átomos constituintes da molécula como, por exemplo, a superfície molecular e o volume molecular.
- **Descritores Eletrônicos:** trazem informações sobre as propriedades eletrônicas das moléculas, determinadas a partir de cálculos mecânico-quânticos, bem como descrevem a influência dos grupos funcionais e substituintes na densidade de distribuição eletrônica. São exemplos as cargas atômicas, as energias dos orbitais de fronteira, as energias eletrônicas, momentos de dipolo, quadrupolo, potencial de ionização, afinidade eletrônica e calor de formação. Além destes, podem ser incluídos parâmetros de polarizabilidade e refratividade molar.
- **Descritores de Lipofilia e Solubilidade:** são parâmetros relacionados com a distribuição do fármaco no organismo. Em especial, o coeficiente de partição ($\log P$), definido como o logaritmo da razão entre a solubilidade de uma substância em um solvente orgânico e a solubilidade da mesma em água, traz informações sobre a permeabilidade do fármaco através da membrana plasmática.

No presente trabalho, alguns descritores eletrônicos foram obtidos usando-se o nível de cálculo B3LYP e funções de base 6-311+G(2d,p), como dito na seção anterior, para cada conformero mais estável de cada um dos compostos de ambos os padrões estudados. O valor mínimo da energia eletrônica é um critério importante para o estudo de estrutura-atividade de fármacos, já que corresponde à geometria de equilíbrio da molécula. Também dentre os descritores eletrônicos adotados no trabalho, destacam-se as energias dos orbitais de fronteira:

- HOMO (do inglês *highest occupied molecular orbital*) - energia do último orbital molecular ocupado.
- HOMO-1 - energia do penúltimo orbital molecular ocupado.
- LUMO (do inglês *lowest occupied molecular orbital*) - energia do primeiro orbital virtual ocupado.
- LUMO+1 - energia do segundo orbital virtual ocupado.

A energia dos orbitais de fronteira contribui para o entendimento do caráter elétron-doador e/ou elétron-aceitador de um composto, fornecendo informações à respeito de uma possível formação de um complexo de transferência de carga entre ligante e receptor. A energia do HOMO reflete o caráter elétron-doador do composto, ao passo que a energia do LUMO, reflete o caráter elétron-aceitador. Assim, quanto maior a energia do HOMO, maior é a capacidade elétron-doadora e, quanto menor a energia do LUMO, maior será a capacidade elétron-aceitadora do composto. Os descritores referentes à energia dos orbitais de fronteira têm-se mostrado relevantes para a modelagem fármaco-receptor, descrevendo bem o reconhecimento molecular por parte da enzima acetilcolinesterase de seus inibidores [40, 41, 42, 43, 44].

Por meio da diferença de energia entre o primeiro orbital virtual e o último orbital ocupado, também determinou-se a quantidade de energia necessária para

a transição de um elétron do orbital HOMO para o orbital LUMO, o chamado GAP de energia. Este descritor eletrônico permite uma melhor compreensão sobre a estabilidade e a transferência de energia que ocorre entre a enzima acetilcolinesterase e seus inibidores [45].

Outra propriedade eletrônica importante para a compreensão da transferência de carga envolvida na interação doador-receptor é a distribuição eletrônica molecular em termos de cargas atômicas. No caso deste trabalho, avaliou-se a carga atômica do nitrogênio (N) pertencente ao grupo amino, comum a todas as estruturas moleculares estudadas, em razão deste grupo funcional teoricamente interagir com o resíduo Trp84 do sítio aromático da enzima. A partir da densidade eletrônica escrita em termos dos orbitais moleculares (2.62), obtidos por meio de procedimento *ab initio* SCF (seção 2.2) executado no Gaussian09, os valores da carga atômica do nitrogênio foram calculados pela análise populacional de Mulliken [46].

O efeito da polarizabilidade na formação do complexo droga-receptor também é importante para o design de fármacos, pois mede o quanto a densidade eletrônica de uma molécula é distorcida por um campo externo, como por exemplo, o campo gerado por outra molécula. Esta propriedade eletrônica foi calculada para todos os compostos, por meio de técnicas de relação quantitativa de estrutura-atividade (QSAR), usando-se o pacote computacional HyperChem 6.0 [47].

Com o intuito de enriquecer o trabalho com descritores não eletrônicos, porém significativos do ponto de vista do desenho de fármacos [48, 49], foram calculados o volume molecular, a massa molecular, a área polar superficial (psa) e a energia de hidratação de cada composto estudado. Os valores foram obtidos também por meio de técnicas de relação quantitativa de estrutura-atividade (QSAR), usando-se o pacote computacional HyperChem 6.0.

O log P é um descritor de lipofilia e solubilidade comumente utilizado no estudo de estrutura-atividade de fármacos [50, 51], pois mede a diferença de solubi-

lidade do composto em duas fases imiscíveis e em equilíbrio. Está relacionado com o transporte e a distribuição da droga no organismo, indicando quanto tempo a droga permanece ativa no mesmo. Seu valor foi calculado para cada um dos compostos da mesma maneira como foram calculados os valores dos outros descritores não eletrônicos.

Todos os procedimentos apresentados até então, desde a análise conformacional e minimização de energia até a obtenção de descritores eletrônicos por meio do nível de cálculo B3LYP, bem como de descritores geométricos, constitucionais e de solubilidade e lipofilia, foram aplicados também ao fármaco bioativo donepezil. A caracterização de diferentes estruturas devido à escolha, fundamentada na literatura, de descritores apropriados, visa possibilitar a busca por similaridades entre as mesmas. Mais precisamente, no presente trabalho, busca-se por uma correlação entre o donepezil, de perfil terapêutico conhecido, e algum dos compostos candidatos a fármaco inibidor. No entanto, interpretar tal conjunto de parâmetros moleculares, com intuito de conhecer os principais fatores responsáveis pela interação ligante-receptor biológico, requer um método multivariado de análise em razão do elevado número de propriedades. Deste modo, a análise de componentes principais, devidamente detalhada na próxima seção, foi convenientemente escolhida para revelar tendências entre os inibidores estudados.

2.5 Análise de Componentes Principais

Análise de Componentes Principais [52], ou simplesmente PCA (do inglês *Principal Components Analysis*), é um método estatístico multivariado que permite identificar padrões em um conjunto de dados iniciais com um grande número de variáveis correlacionadas. A técnica reduz o problema para um novo conjunto de variáveis não correlacionadas, chamadas de *componentes principais* (PC), que respondem pela maior parte das variáveis originais.

O conjunto de descritores definido para cada uma das 20 moléculas dos dois padrões estudados, além do fármaco ativo donepezil, contém 13 propriedades (HOMO-1, HOMO, LUMO, LUMO+1, GAP, carga atômica do nitrogênio, mínimo de energia eletrônica, polarizabilidade, volume molecular, massa molecular, área superficial polar, energia de hidratação e log P). Assim, a matriz do conjunto de dados iniciais de cada padrão de estrutura molecular, incluindo o fármaco ativo donepezil, tem dimensão 21×13 . Para melhor representá-la, será adotada a seguinte notação:

- N indivíduos - correspondem às estruturas moleculares do padrão em estudo (sendo um destes o fármaco ativo donepezil).
- M variáveis - correspondem às propriedades calculadas para as estruturas moleculares do padrão em estudo (além do fármaco ativo donepezil).

A matriz do conjunto de dados iniciais, que é assimétrica ($N \neq M$), apresenta então o formato a seguir, onde o termo geral x_{nm} representa o valor calculado para a m -ésima variável do n -ésimo indivíduo.

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>	\dots	<i>Variável M</i>
<i>Indivíduo 1</i>	x_{11}	x_{12}	\dots	x_{1M}
<i>Indivíduo 2</i>	x_{21}	x_{22}	\dots	x_{2M}
\vdots	\vdots	\vdots	\ddots	\vdots
<i>Indivíduo N</i>	x_{N1}	x_{N2}	\dots	x_{NM}

Tabela 2.1: Matriz do conjunto de dados iniciais.

A proposta deste trabalho visa apontar indivíduos que de alguma maneira se assemelhem ao donepezil e, conseqüentemente, possam exibir resposta biológica assim como o fármaco ativo. Como as variáveis originais são todas correlacionadas e a dimensão da matriz é muito grande, a análise simultânea de todos os parâmetros

moleculares torna-se inviável, sendo difícil estabelecer padrões entre os indivíduos ou mesmo distingui-los uns dos outros. Não é possível neste caso apontar explicitamente uma correlação entre algum ou alguns dos indivíduos e o donepezil, tampouco dizer quais descritores contribuem mais significativamente para esta correlação. Neste sentido, o método PCA atende às expectativas do projeto à medida que diminui consideravelmente a dimensionabilidade do problema, permitindo a visualização direta de similaridades entre os indivíduos.

As variáveis da matriz do conjunto de dados iniciais (2.1) possuem naturezas distintas, não podendo ser comparadas entre si. Desta forma, é preciso tornar estas variáveis adimensionais, com média nula e variância unitária. Para tanto, escreve-se o termo geral do conjunto de dados modificados como sendo

$$y_{mn} = \frac{x_{nm} - \bar{x}_m}{\sigma_m} \quad (2.64)$$

em que

$$\bar{x}_m = \frac{\sum_{n=1}^N x_{nm}}{N} \quad (2.65)$$

é a média aritmética dos valores calculados para a m-ésima variável e

$$\sigma_m = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^N (x_{nm} - \bar{x}_m)^2}{N - 1}} \quad (2.66)$$

é o desvio-padrão da m-ésima variável.

Este tratamento dado às variáveis originais transforma a matriz inicial em uma nova matriz simétrica de ordem $m \times m$, chamada de matriz de covariância $C(Y)$, que pode ser expressa como

$$C(Y)_{m \times m} = Y_{m \times n}^T Y_{n \times m} \quad (2.67)$$

ou simplesmente

$$C(Y) = Y^T Y \quad (2.68)$$

em que os elementos da matriz Y e sua transposta são descritos pela relação 2.64. A matriz de covariância $C(Y)$ tem, portanto, a seguinte estrutura

$$C(Y) = \begin{pmatrix} c_{11} & c_{12} & \cdots & c_{1m} \\ c_{21} & c_{22} & \cdots & c_{2m} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ c_{m1} & c_{m2} & \cdots & c_{mm} \end{pmatrix}$$

sendo o termo geral dado por

$$c_{mm'} = \sum_{n=1}^N \left(\frac{x_{nm} - \bar{x}_m}{\sigma_m} \right) \left(\frac{x_{nm'} - \bar{x}_{m'}}{\sigma_{m'}} \right). \quad (2.69)$$

Os termos da diagonal principal ($m = m'$) da matriz $C(Y)$ representam a variância de determinada variável. A variância é uma medida estatística de dispersão que revela o quão distantes os valores medidos se encontram do valor esperado. Assim, quanto maior os valores da diagonal principal, maior é a dispersão. Já os termos fora da diagonal principal ($m \neq m'$) correspondem aos termos de covariância; esta é uma medida estatística que revela como duas medidas variam conjuntamente. Logo, quanto menor o valor de um termo fora da diagonal principal, menor será a correlação entre duas variáveis.

Como a idéia é diminuir ao máximo a correlação entre as variáveis em estudo, é preciso minimizar os termos fora da diagonal principal da matriz $C(Y)$. Por outro lado, se a dispersão de uma variável particular for maximizada em relação ao valor esperado (que no caso é o parâmetro, ou seja, o valor relativo ao donepezil) e ainda assim algum valor referente à certo indivíduo se encontrar próximo do valor esperado, significa que aquele indivíduo está correlacionado com o fármaco ativo para aquela variável.

O método para maximizar os termos da diagonal principal e minimizar os termos fora da mesma consiste em diagonalizar a matriz de covariância $C(Y)$. Para tanto, toma-se então uma matriz P formada por vetores de base ortogonais que correspondem aos *autovetores* da matriz de covariância $C(Y)$, sendo que os *autovalores* associados correspondem à variância de cada componente principal. Assim, determinar a PC de maior relevância, isto é, aquela que responde pela maior parte das variáveis originais, implica em encontrar o autovetor associado ao maior autovalor. Em linhas gerais, resolver o problema de autovetor e autovalor significa, neste caso, alinhar os vetores de base com o eixo de máxima variância, ou seja

$$CP = VP \quad (2.70)$$

em que V é a matriz dos autovalores.

Uma vez que os autovalores estão ordenados e pareados, o m -ésimo autovalor corresponde ao m -ésimo autovetor. Escrevendo os autovalores da matriz V em ordem decrescente, tem-se

$$V = \begin{pmatrix} \textit{Variância da PC1} & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & \textit{Variância da PC2} & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & \textit{Variância da PC3} \end{pmatrix}$$

sendo $\textit{Variância da PC1} \geq \textit{Variância da PC2} \geq \cdots \geq \textit{Variância da } m\text{-ésima PC}$.

Escrevendo os autovetores também em ordem decrescente, a matriz P tem a seguinte estrutura

$$P(Y) = \begin{pmatrix} p_{11} & p_{12} & \cdots & p_{1m} \\ p_{21} & p_{22} & \cdots & p_{2m} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ p_{m1} & p_{m2} & \cdots & p_{mm} \end{pmatrix}$$

Desta maneira, as componentes principais são escritas em termos de uma combinação linear das variáveis modificadas, sendo que os coeficientes são os elementos de cada vetor coluna da matriz P . As componentes principais são obtidas em ordem decrescente de importância; a primeira componente principal (PC1), de maior relevância, é a combinação linear das variáveis com maior variância nos dados originais. O termo geral de uma PC pode ser expresso pela relação

$$PC_m = \sum_{m=1}^M y_{m'/m} * p_{m'/m} \quad (2.71)$$

Em geral, as duas primeiras componentes principais já são suficientes para identificar quais indivíduos estão melhor correlacionados e para quais descritores esta correlação é ótima. Plotando-se as duas componentes principais, a visualização da distribuição dos indivíduos em relação ao parâmetro é direta, já que o problema inicial tornou-se bidimensional. Se as duas componentes juntas ainda não respondem pela maior parte das variáveis originais pode-se também plotar a terceira componente para auxiliar na identificação de similaridades.

Como o número de descritores moleculares é grande, são muitas as PCs provenientes da combinação linear destas variáveis. Num primeiro momento, realizando a análise de componentes principais considerando-se todas as variáveis, observou-se que a PC1 trazia menos de 50% da informação à respeito de uma suposta correlação, tornando a interpretação dos dados duvidosa. Desta maneira, combinando-se os elementos do conjunto de descritores de todas as formas possíveis,

selecionou-se grupos menores de descritores que pudessem fornecer PCs que obedecessem a critérios pré-estabelecidos (veja capítulo 3) para só então fazer-se a plotagem das duas primeiras componentes principais e a observação de padrões. A análise de componentes principais foi realizada utilizando-se o software STATÍSTICA 8.0 [53].

2.6 O Modelo Contínuo Polarizável

O Modelo Contínuo Polarizável, ou simplesmente PCM (do inglês, *Polarizable Continuum Model*), é um método comumente usado no planejamento de fármacos com auxílio do computador para avaliar os efeitos de *solvatação*. Neste modelo, as energias são calculadas imergindo-se o soluto (o fármaco no caso) em uma cavidade no interior do campo solvente de reação [39]. O método cria a cavidade do soluto por meio de um conjunto de esferas de van der Waals que se sobrepõem, centradas nos átomos do soluto. Se cada molécula do solvente fosse considerada separadamente, o custo computacional da modelagem seria tão grande que impediria cálculos *ab initio*. Modelando o solvente como um contínuo polarizável, e não como moléculas individuais, os cálculos *ab initio* tornam-se viáveis.

Neste modelo, a energia do sistema, autovalor do operador hamiltoniano que contém o potencial de interação soluto-solvente, tem *status* de energia livre, denominada energia livre em solução G_{sol} tal que

$$G_{sol} = G_{eletr} + G_{cav} + G_{rep-disp} \quad (2.72)$$

onde G_{eletr} , G_{cav} e $G_{rep-disp}$ são, respectivamente, as componentes eletrostática, de cavitação e repulsão-dispersão da energia livre em solução.

Fazendo-se os cálculos de estrutura eletrônica com o funcional híbrido B3LYP para os vários confôrmeros de cada composto estudado, sem a presença do solvente, determinou-se a conformação mais estável de cada estrutura molecular con-

forme descrito na seção 2.3. A seguir, fez-se o *single point* para estas conformações de mínima energia. Para avaliar como a distribuição dos candidatos a fármaco nas componentes principais é afetada em *meio aquoso*, repetiu-se o *single point* para a geometria de equilíbrio de cada um dos compostos utilizando-se novamente o DFT e implementando-se agora o PCM. Os mesmos descritores que haviam sido antes calculados sem o modelo de solvatação foram recalculados com a presença do solvente segundo as metodologias usadas até então. Desta maneira, fez-se análise de componentes principais para dois grandes grupos distintos de moléculas em ambas as situações: sem presença de solvente e com presença de solvente. As metodologias utilizadas podem ser melhor visualizadas por meio das representações esquemáticas a seguir (veja figuras 2.2 e 2.3).

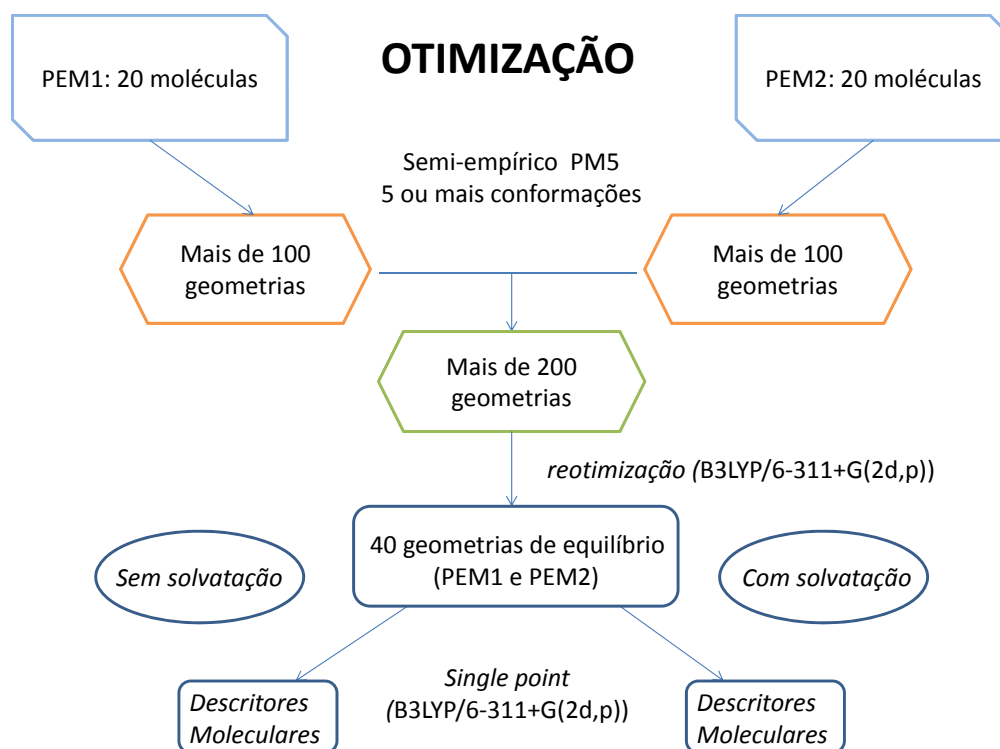


Figura 2.2: Representação esquemática da otimização dos compostos e cálculo de seus respectivos descritores moleculares.

A representação esquemática 2.3 mostra a grande quantidade de casos a serem analisados na busca pelas componentes principais mais significativas para formação de agrupamentos de compostos. Cada caso corresponde à combinação linear de três ou mais variáveis, dentre um conjunto de 13 descritores moleculares para cada composto, de maneira que o número de componentes principais geradas é igual ao número de variáveis consideradas menos um. O presente trabalho contemplou todos os casos possíveis, que foram estudados com auxílio de um programa análise combinatória desenvolvido pelo grupo [43, 44], possibilitando avaliar com bastante precisão a influência de cada variável para a correlação e descartando resultados pouco significativos.

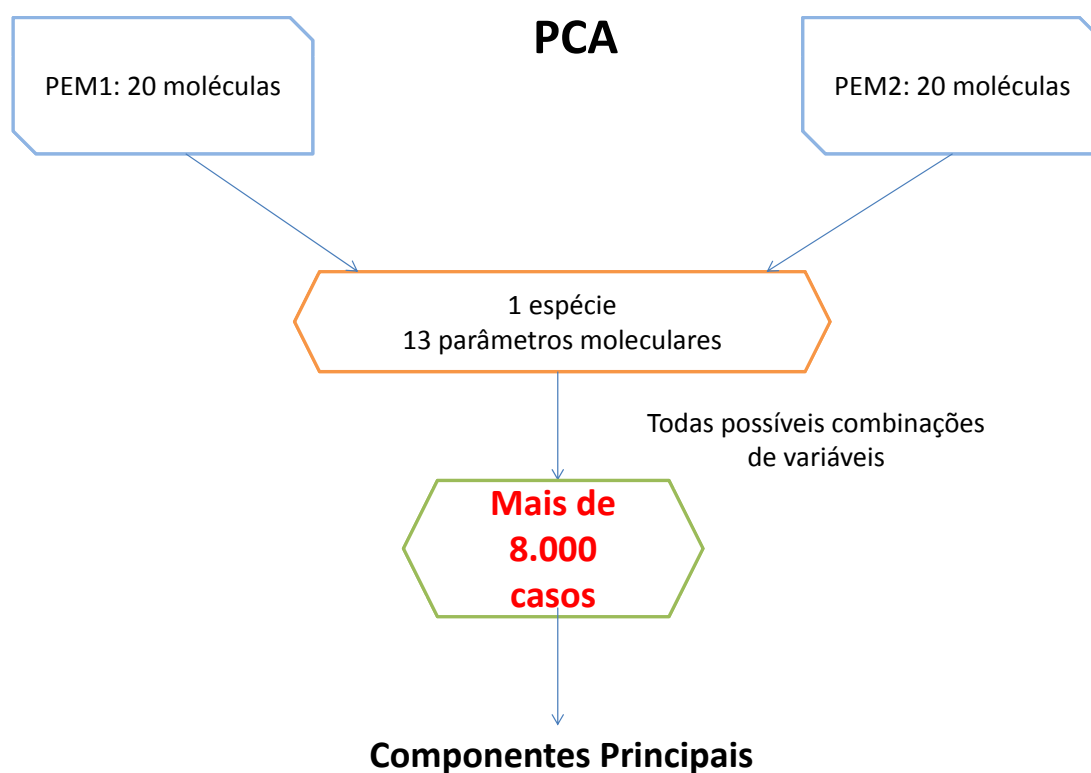


Figura 2.3: Análise de componentes principais dos compostos e seus respectivos descritores moleculares.

Capítulo 3

Resultados e Discussões

Existem inúmeras possíveis combinações lineares para os descritores em questão, gerando-se uma grande quantidade de componentes principais que, por vezes, podem trazer pouca informação à respeito de uma suposta correlação. Para assegurar a confiabilidade dos resultados, foram selecionadas, para uma posterior *análise de cluster* (agrupamento), somente as combinações nas quais a primeira componente principal (PC1) apresentou variância igual ou superior a 75%.

Em alguns casos, não observou-se qualquer tipo de agrupamento, muito embora a dispersão das variáveis tenha sido maximizada em relação ao parâmetro. Nestas situações, o conjunto de descritores que geraram as componentes principais não se mostraram adequados para correlacionar algum dos indivíduos com o fármaco. Na busca pelo conjunto de descritores de fato mais significativo para a correlação, procurou-se selecionar os resultados não somente pelo critério da variância mas também pela distribuição dos indivíduos nas duas componentes principais e sua proximidade em relação ao donepezil.

3.1 Padrão de Estrutura Molecular 1 (PEM-1)

3.1.1 Cálculos sem modelo de solvatação

Sucessivas análises, conforme critérios mencionados no início deste capítulo, revelaram uma espécie de “padrão” na distribuição dos indivíduos nas duas componentes principais para diferentes conjuntos de descritores. Em geral, estruturas moleculares como as de número **1**, **3**, **5**, **7** e **8** (Figura 1.7) permaneceram próximas ao donepezil para as duas componentes principais, ao passo que estruturas como as de número **13**, **19** e **20** permaneceram sempre bem afastadas. No entanto, para um conjunto particular de descritores, um dos compostos parece estar mais relacionado com o fármaco que os demais.

Observando o gráfico 3.1, é possível identificar um cluster envolvendo o fármaco ativo donepezil, indivíduo de número **21**, e o indivíduo de número **5**, no caso em que *o modelo de solvatação PCM não fora utilizado* nos cálculos de estrutura eletrônica dos compostos pertencentes ao PEM-1. Os descritores identificados como mais apropriados para este agrupamento são o log P, a carga atômica do nitrogênio, a massa molecular, a polarizabilidade e o volume molecular, sendo que estes três últimos contribuem mais efetivamente para a primeira componente principal (PC1), responsável por cerca de 78% da informação à respeito desta correlação (veja tabelas 3.1 e 3.2). Para a segunda componente principal (PC2), responsável por cerca de 14% da informação à respeito da correlação (veja tabelas 3.1 e 3.2), observa-se a preponderância do log P. Na maioria dos casos, as moléculas **5**, **7**, **14** e **16** encontram-se próximas ao donepezil em relação à PC1. No entanto, o log P, quando adicionado ao conjunto de descritores que geram as componentes principais, tende a aproximar os indivíduos de número **5** e **7** ao donepezil, em relação à PC2. Já os outros, como os de número **14** e **16**, permanecem afastados em relação à mesma componente. Esta é uma evidência de que o comportamento farmacocinético dos compostos candidatos a fármaco é relevante para a correlação almejada.

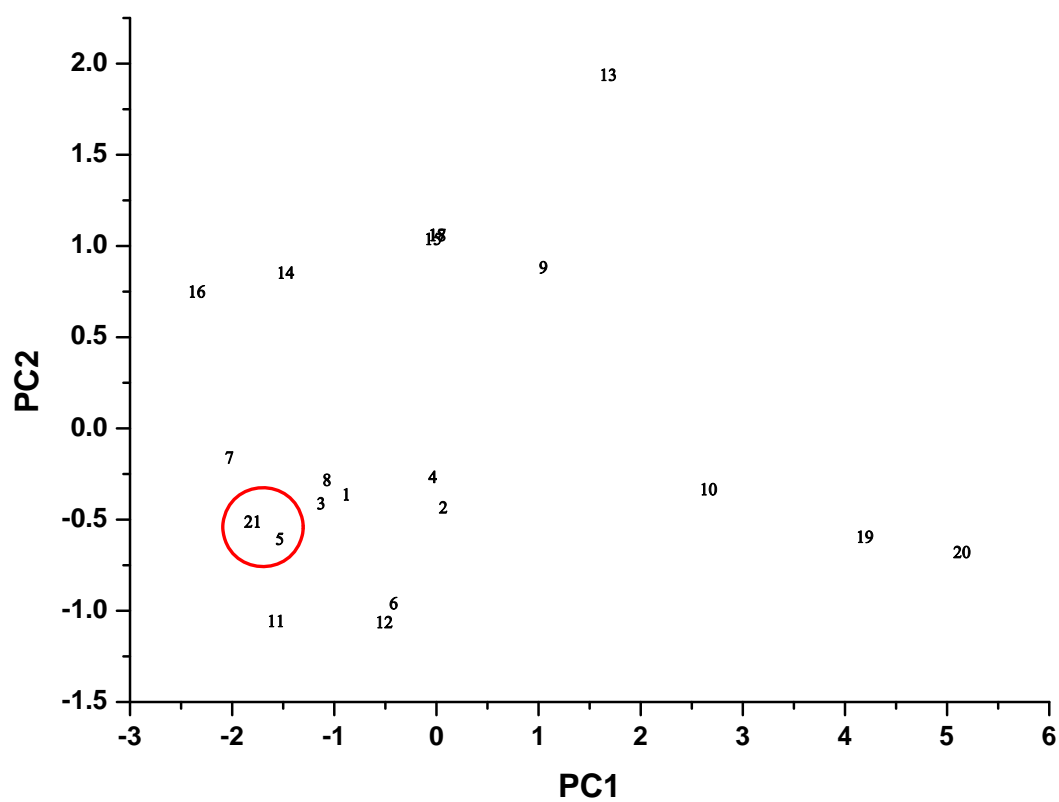


Figura 3.1: PC2 versus PC1 para o PEM-1 no modelo sem solvente.

VARIÁVEIS	PC1	PC2	PC3	PC4
Nitrogênio	0.384590	-0.624692	0.672803	0.094872
Polarizabilidade	0.498112	0.104093	-0.096629	-0.554874
Massa	0.492791	-0.088306	-0.327738	-0.358063
Volume	0.482526	-0.086461	-0.453700	0.719422
log P	0.358191	0.763968	0.474071	0.193229

Tabela 3.1: Peso das variáveis mais significativas para as componentes principais do PEM-1 no modelo sem solvente.

	Autovalor	Porcentagem	Acumulativo
PC1	3.929865	78.59730	78.59730
PC2	0.726758	14.53515	93.13245
PC3	0.302094	6.04188	99.17434
PC4	0.034008	0.68016	99.85450

Tabela 3.2: Autovalores e porcentagens das quatro primeiras componentes principais do PEM-1 no modelo sem solvente.

3.1.2 Cálculos com modelo de solvatação

Ao utilizar-se o modelo de solvatação PCM nos cálculos de estrutura eletrônica dos compostos pertencentes ao PEM-1, ao longo de sucessivos estudos, a análise de componentes principais exhibe novamente uma espécie de “padrão” no qual, em geral, indivíduos como os de número **1, 3, 5, 7, 8, 9, 14 e 16**, encontram-se próximos ao fármaco em relação à PC1, enquanto indivíduos como os de número **11, 12, 13, 19 e 20** permanecem bem afastados.

Dentre os possíveis casos de combinações lineares de descritores passíveis de discussão, conforme critérios mencionados no início deste capítulo, surge aquele que contempla os mesmos descritores que ora foram significativos para o modelo sem solvatação: o log P, a carga atômica do nitrogênio, a massa molecular, o volume molecular e a polarizabilidade (veja tabela 3.3). Observa-se no gráfico 3.2 que o indivíduo de número **5** continua próximo ao indivíduo de número **21**, tal como no resultado apresentado na seção anterior (veja gráfico 3.1), sobretudo em relação à PC1, responsável por 80% da informação à respeito da correlação (veja tabela 3.4), na qual predomina a contribuição da massa molecular, a polarizabilidade e o volume molecular (veja tabela 3.3). Porém agora, o indivíduo de número **7** parece estar melhor correlacionado com o fármaco do que os demais, sobretudo em relação à PC2, na qual predomina a contribuição do log P (veja tabela 3.3).

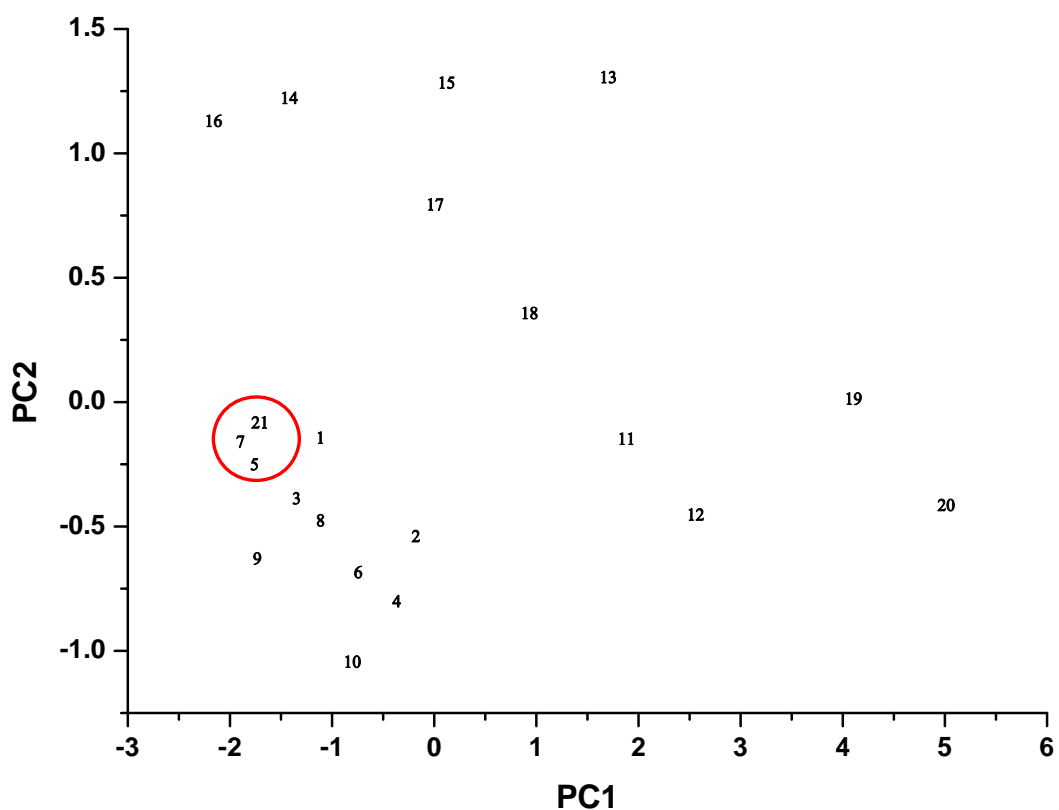


Figura 3.2: PC2 versus PC1 para o PEM-1 no modelo com solvente.

VARIÁVEIS	PC1	PC2	PC3	PC4
Nitrogênio	0.411701	-0.135081	0.901246	0.003391
Polarizabilidade	0.488379	0.009958	-0.219572	-0.608027
Massa	0.478794	-0.274834	-0.258640	-0.251193
Volume	0.470392	-0.327159	-0.266770	0.727125
log P	0.376133	0.893917	-0.038517	0.196173

Tabela 3.3: Peso das variáveis mais significativas para as componentes principais do PEM-1 no modelo com solvente.

	Autovalor	Porcentagem	Acumulativo
PC1	4.040845	80.81690	80.81690
PC2	0.533076	10.66153	91.47843
PC3	0.377218	7.54435	99.02278
PC4	0.039478	0.78956	99.81234

Tabela 3.4: Autovalores e porcentagens das quatro primeiras componentes principais do PEM-1 no modelo com solvente.

A presença do solvente nos cálculos de estrutura eletrônica dos compostos provocou algumas alterações significativas na análise de componentes principais. Considerando-se o mesmo conjunto de descritores e, comparando-se os gráficos 3.1 e 3.2, verifica-se que a separação entre as moléculas **9** e **10** e o donepezil diminuiu consideravelmente, enquanto que as moléculas **11**, **12**, **15** e **17** se afastaram ainda mais do fármaco. A distância entre as moléculas **1**, **2**, **3**, **4**, **6**, **8**, **14** e **16** e o donepezil, em ambas as situações, manteve-se aproximadamente a mesma. As moléculas **13**, **19** e **20** permaneceram bem distantes. O modelo com solvente, portanto, parece determinar com maior precisão possíveis correlações.

Apontar indivíduos como potenciais candidatos a inibidores da AChE exige a determinação de um conjunto de descritores com capacidade altamente preditiva, não correlacionados entre si, que sejam capazes de selecionar indivíduos que, quando imersos em meio aquoso, de fato se assemelhem ao fármaco ativo. Neste contexto, a energia do orbital HOMO surge como um diferencial no que tange esta seleção. Esta propriedade eletrônica, ao ser considerada na análise de componentes principais juntamente com o log P, a carga atômica do nitrogênio, a massa molecular, o volume molecular e a polarizabilidade, produz um novo agrupamento cuja correlação é plenamente visível, como mostra o gráfico 3.3. Para esta nova configuração, a separação entre o fármaco e o indivíduo de número **7** é notoriamente ínfima.

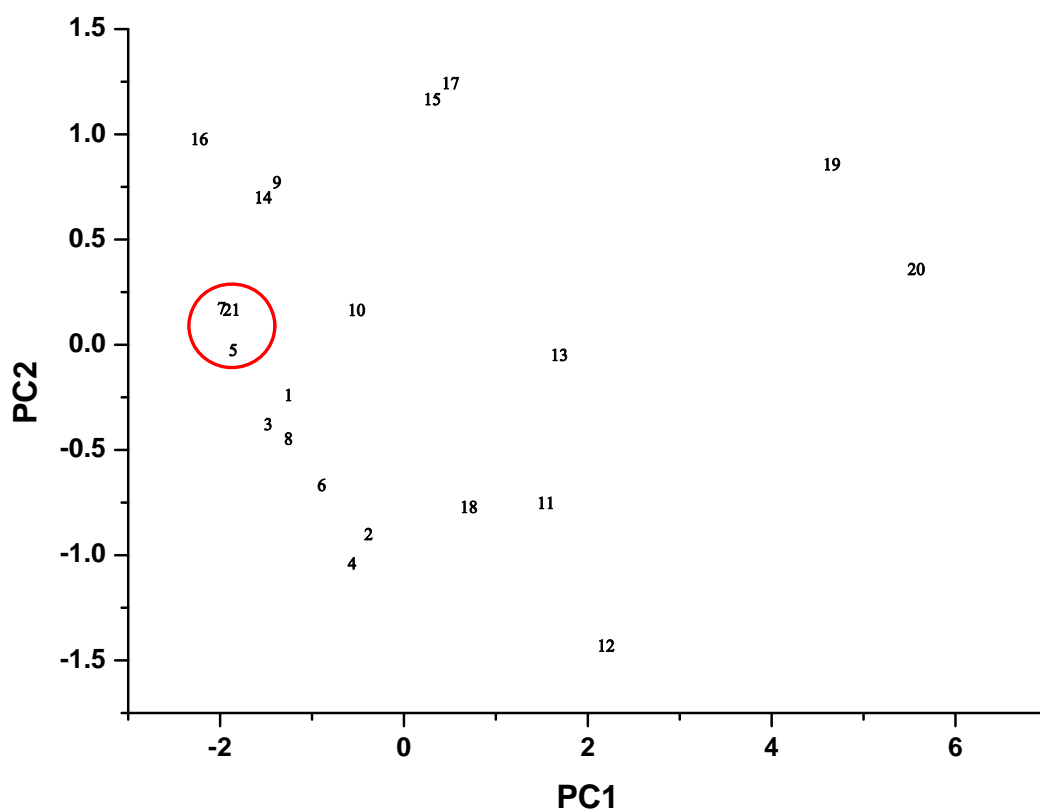


Figura 3.3: PC2 versus PC1 para o PEM-1 no modelo com solvente, considerando a energia do orbital HOMO.

Observando o gráfico 3.3, é possível verificar dois grupos com comportamentos distintos. As moléculas de **1-10**, assim como **14** e **16**, formam o grupo dos indivíduos que encontram-se mais próximos ao donepezil que os demais, particularmente em relação à PC1. A polarizabilidade, propriedade que revela como a alteração dos grupos substituintes altera a distribuição de cargas como um todo, é a que mais contribui para a PC1, responsável por cerca de 75% da informação à respeito da correlação (veja tabelas 3.5 e 3.6). A massa e o volume molecular dão contribuição da mesma ordem da polarizabilidade para a PC1, indicando que não só quesitos eletrônicos mas também geométricos e constitucionais são importantes para a correlação.

VARIÁVEIS	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
HOMO	0.350168	0.716398	-0.396236	-0.446476	0.088171
Nitrogênio	0.393345	0.152718	-0.332982	0.842631	-0.032341
Polarizabilidade	0.457672	-0.173769	0.124255	-0.158304	-0.607487
Massa	0.445605	-0.358579	-0.090939	-0.186564	-0.262035
Volume	0.434289	-0.438719	-0.099729	-0.135747	0.722610
log P	0.355004	0.334966	0.835742	0.111084	0.176952

Tabela 3.5: Peso das variáveis mais significativas para as componentes principais do PEM-1 no modelo com solvente, considerando a energia do orbital HOMO.

	Autovalor	Porcentagem	Acumulativo
PC1	4.532432	75.54053	75.54053
PC2	0.591934	9.86556	85.40610
PC3	0.509278	8.48796	93.89406
PC4	0.321402	5.35671	99.25076
PC5	0.035588	0.59313	99.84389

Tabela 3.6: Autovalores e porcentagens das quatro primeiras componentes principais do PEM-1 no modelo com solvente, considerando a energia do orbital HOMO.

As moléculas de **1-8** têm em comum a distribuição dos orbitais de fronteira. O orbital HOMO, para as moléculas de **1-8**, concentra-se totalmente no anel dimetoxi-fenil. Já o orbital LUMO concentra-se na região da subunidade farmacofórica B, mais especificamente nos grupos acetil (moléculas **1, 3, 5, 7**) e carbamoil (moléculas **2, 4, 6, 8**), sendo esta uma boa evidência de que o orbital LUMO é fortemente afetado por estes substituintes. As moléculas **14** e **16** possuem uma distribuição dos orbitais de fronteira diferente das moléculas de **1-8**; para a de número

14 tanto o orbital HOMO como o orbital LUMO se concentram no anel dimetoxifenil, para a de número **16** tem-se o orbital LUMO distribuído no dimetoxifenil e o orbital HOMO distribuído na região do anel aromático ligado ao grupo amino terciário. Contudo, os compostos **14** e **16**, em termos de estrutura molecular, se assemelham mais ao donepezil que os demais. Apesar de o donepezil não apresentar o grupo acetil, comparando-se os compostos **2**, **4**, **6**, **8**, que contêm o grupo carbamoil, e os compostos **1**, **3**, **5**, **7**, que contêm o grupo $N(CH_3)_2$, estes últimos parecem estar melhor correlacionados com o donepezil.

As moléculas **11**, **12**, **13**, **15**, **17-20** formam o grupo dos compostos que pouco se correlacionam com o donepezil, em particular em relação à PC1. As moléculas **19** e **20**, são as de maior volume, $1558,14\text{\AA}^3$ e $1643,55\text{\AA}^3$, respectivamente, e, em todas as observações, foram as que menos se correlacionaram com o fármaco, provavelmente devido à um impedimento de ordem espacial para o reconhecimento molecular por parte da enzima. A razão para os indivíduos **11** e **12** estarem pouco correlacionados com o fármaco possivelmente deve-se à adição do grupo benzila ao grupo amino terciário. Os compostos **13** e **15**, têm por grupo substituinte uma ramificação do dímero da tacrina, o que talvez provoque um desvio desses indivíduos em relação ao fármaco. Por fim, a adição de um anel aromático ao grupo amino terciário nos compostos **17** e **18**, possivelmente é um fator que também afeta a correlação.

Em todas as análises realizadas conforme critérios descritos no início deste capítulo, os indivíduos **5** e **7** mantiveram-se sempre próximos ao donepezil, seja para o modelo sem solvatação como para o modelo com solvatação. As figuras 3.4 e 3.5 apresentam a geometria otimizada e os orbitais HOMO e LUMO dos compostos **5** e **7**, respectivamente. Em ambos os casos, o HOMO está localizado no anel aromático das estruturas moleculares indicando que a porção aromática dos possíveis candidatos a fármaco deve interagir com o sítio periférico, de acordo com

previsões teóricas. As energias do orbital orbital HOMO para os compostos **5** e **7** têm valores bem próximos: $-8.747eV$ e $-8.755eV$, respectivamente.

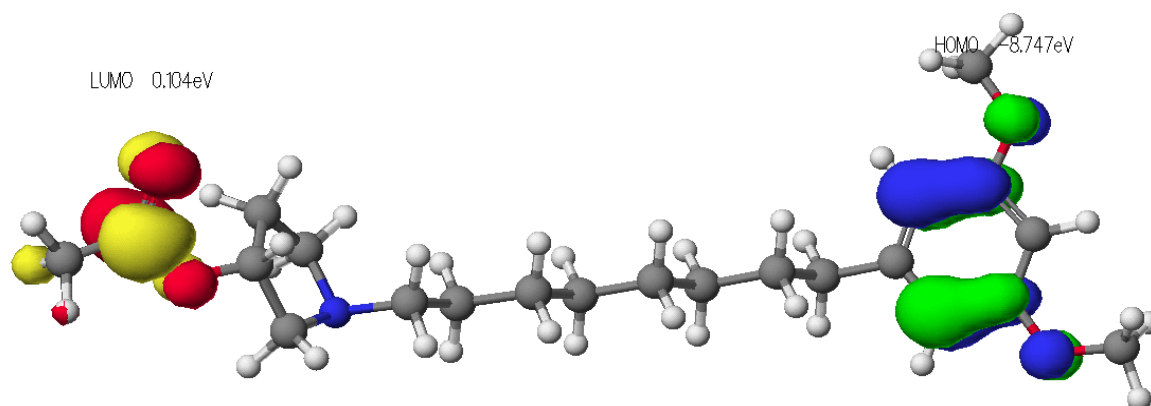


Figura 3.4: Geometria otimizada e orbitais HOMO e LUMO do composto de número **5** do PEM-1.

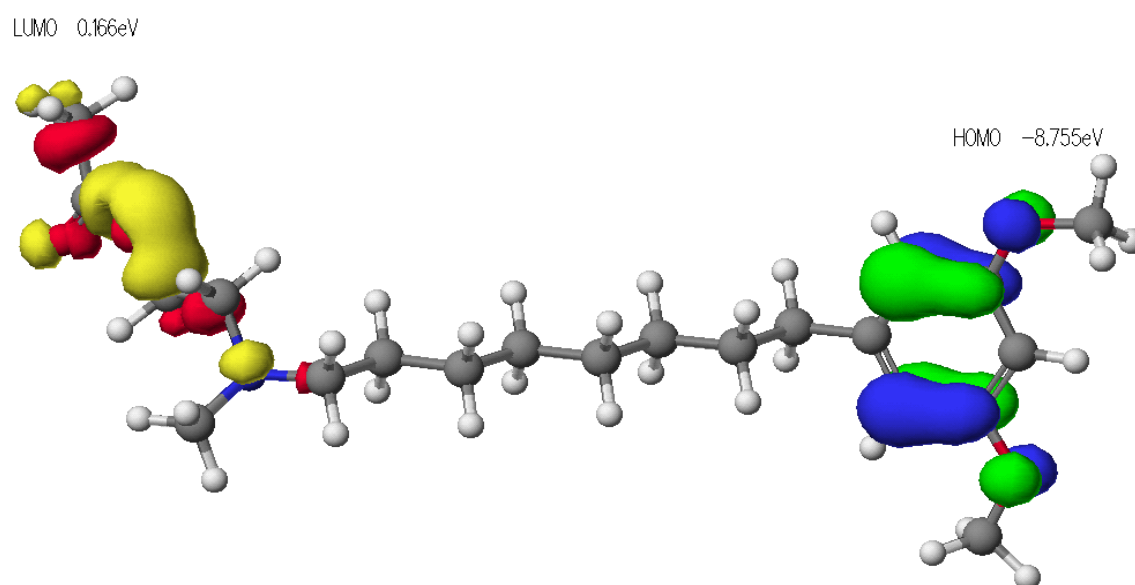


Figura 3.5: Geometria otimizada e orbitais HOMO e LUMO do composto de número **7** do PEM-1.

O leitor pode estar se perguntando neste instante o porquê da energia do orbital HOMO não ter sido computada na análise de componentes principais para o modelo sem solvente. A explicação é simples: após estudos sistemáticos, para esta propriedade, curiosamente em nenhum momento observou-se formação de cluster em que a PC1 obtivesse variância igual ou superior à 75%. No entanto, para os cálculos de estrutura eletrônica que valeram-se do modelo com solvente, a inclusão da energia do orbital HOMO no conjunto de descritores mais relevantes diminuiu a separação entre alguns compostos e o fármaco em relação à PC2, em especial o indivíduo de número **7** (compare gráficos 3.2 e 3.3), haja vista a predominância desta propriedade para a segunda componente principal (veja tabela 3.3).

A segunda componente principal (PC2) é responsável por quase 10% da informação à respeito da correlação (veja tabela 3.6). Além da energia do orbital HOMO, contribuem significativamente para a PC2, a carga atômica do nitrogênio e o log P. Levando-se em consideração as prováveis interações entre o grupo amino terciário e o resíduo Trp84 da enzima, a contribuição da carga do nitrogênio para a correlação está de acordo com as previsões teóricas que direcionaram o planejamento dos compostos. O log P trata das partições hidrofílica e hidrofóbica, que estão relacionadas com a distribuição da droga no organismo. O log P do donepezil mostra como as forças hidrofóbicas exercem papel importante no processo de ligação à albumina por parte dos inibidores da AChE, como sugerido em Ibrahim et al [54]. O valor do log P do donepezil está mais relacionado com os valores do log P das moléculas **3-8**, como mostra a tabela de descritores 3.7.

As moléculas **5** e **7**, as quais apresentam uma maior correlação com o donepezil, também são as que apresentam, dentre as moléculas de **1-14**, a menor distância $N - O$, entre 3.57 – 3.66Å. A diferença entre estas duas moléculas é que a de número **7** possui uma par de elétrons solitário contribuindo para o orbital LUMO, em contraste com a molécula de número **5** (veja figuras 3.4 e 3.5).

Tabela 3.7: Donepezil (**21**) e PEM-1 com respectivos descritores mais significativos para a correlação (cálculos de estrutura eletrônica com modelo de solvente).

Moléculas	Polariza- bilidade (\AA^3)	HOMO (u.a)	N (u.a)	log P	Massa (u.m.a)	Volume (\AA^3)
1	43.57	-6.10	-0.05	4.12	391.55	1301.45
2	47.52	-6.09	-0.06	4.09	420.59	1383.76
3	43.57	-6.09	-0.09	3.72	391.55	1299.77
4	47.52	-6.09	-0.09	3.69	420.59	1384.47
5	41.73	-6.09	-0.06	3.67	377.52	1253.98
6	45.68	-6.08	-0.05	3.64	406.57	1344.65
7	40.67	-6.09	-0.03	3.72	365.51	1248.50
8	44.62	-6.09	-0.06	3.69	394.55	1309.37
9	43.21	-5.81	-0.03	3.14	376.54	1247.14
10	46.39	-5.81	-0.01	3.11	405.58	1326.62
11	50.33	-6.10	0.23	5.50	441.61	1459.30
12	54.28	-6.08	0.14	5.47	470.65	1536.44
13	54.20	-5.90	-0.07	7.03	446.63	1421.43
14	42.90	-6.09	-0.05	5.47	355.52	1227.25
15	48.30	-5.85	0.05	6.16	392.54	1272.70
16	41.03	-6.10	-0.05	4.96	342.48	1153.55
17	47.30	-5.65	-0.06	5.71	413.56	1328.31
18	50.61	-6.06	-0.06	5.66	442.60	1416.29
19	56.96	-5.46	0.36	6.67	489.65	1558.14
20	60.27	-5.42	0.36	6.62	518.70	1643.55
21	43.28	-6.14	0.02	3.69	379.50	1161.11

O mapa de potencial eletrostático ou MEP (do inglês “ *Molecular Electrostatic Potential* ”) foi gerado, a partir dos orbitais moleculares obtidos pelo procedimento SCF, para os compostos de número **5** e **7** (Figuras 3.6 e 3.7). O objetivo da MEP é localizar regiões de maior ou menor potencial eletrostático na molécula, contribuindo para o melhor entendimento de como se dá a interação fármaco-receptor. A região de coloração avermelhada indica um potencial negativo frente à aproximação de uma carga pontual positiva. Para ambas as estruturas, a região atrativa se concentra no oxigênio do grupo acetil, sugerindo uma ligação do tipo hidrogênio com o resíduo Ser200.

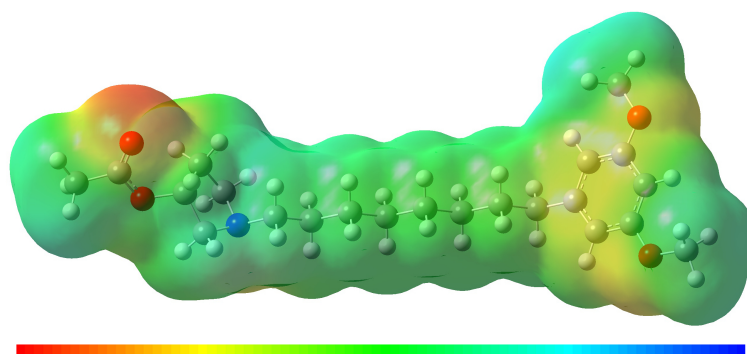


Figura 3.6: MEP do composto de número **5** do PEM-1 (modelo com solvente).

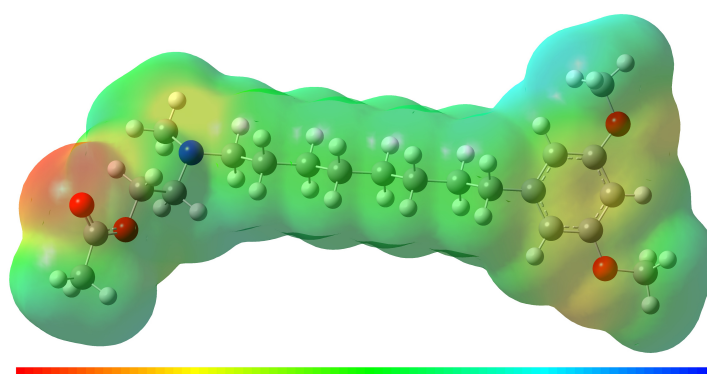


Figura 3.7: MEP do composto de número **7** do PEM-1 (modelo com solvente).

3.2 Padrão de Estrutura Molecular 2 (PEM-2)

3.2.1 Cálculos sem modelo de solvatação

O gráfico 3.8 apresenta o melhor resultado encontrado, após sucessivas análises conforme critérios mencionados no início deste capítulo, para o caso em que o *modelo de solvatação PCM não fora* utilizado nos cálculos de estrutura eletrônica dos compostos pertencentes ao PEM-2. Observa-se um agrupamento em que a separação entre o fármaco, indivíduo de número **21**, e as estruturas moleculares **5** e **7** (Figura 1.8), em relação às duas primeiras componentes principais, é notoriamente ínfima. Os descritores identificados como mais apropriados para este agrupamento são a carga eletrônica do nitrogênio, o log P, a polarizabilidade e a massa, sendo que estes dois últimos contribuem mais efetivamente para a PC1, responsável por cerca de 79% à respeito da correlação (veja tabelas 3.8 e 3.9).

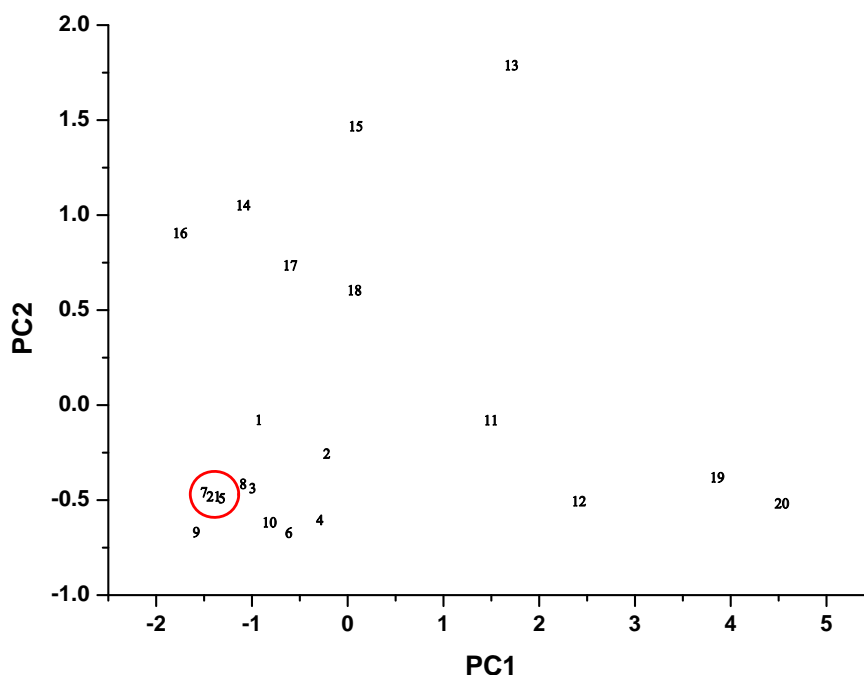


Figura 3.8: PC2 versus PC1 para o PEM-2 no modelo sem solvente.

O comportamento dos indivíduos segue, em geral, as mesmas tendências observadas na distribuição dos indivíduos equivalentes (mesmos grupos funcionais) pertencentes ao PEM-1. As moléculas de **1-10**, assim como **14** e **16**, permanecem sempre mais próximas ao donepezil em relação à PC1 que as demais. As moléculas **11-13**, **19** e **20** tendem sempre a ficar mais afastadas.

VARIÁVEIS	PC1	PC2	PC3
Nitrogênio	0.473556	-0.565433	0.674157
Polarizabilidade	0.548733	0.057172	-0.380736
Massa	0.535855	-0.203155	-0.509396
log P	0.433009	0.797336	0.375590

Tabela 3.8: Peso das variáveis mais significativas para as componentes principais do PEM-2 no modelo sem solvente.

	Autovalor	Porcentagem	Acumulativo
PC1	3.186763	79.66981	79.66981
PC2	0.580996	14.52490	94.19471
PC3	0.221043	5.52609	99.72080

Tabela 3.9: Autovalores e porcentagens das três primeiras componentes principais do PEM-2 no modelo sem solvente.

Assim como para o PEM-1, não observou-se a formação de cluster algum em que a energia do orbital HOMO estivesse inclusa no conjunto de descritores mais significativos de uma provável correlação. A não ser pelo volume molecular, os descritores determinantes para o agrupamento são os mesmos apresentados na seção anterior referente ao PEM-1, no caso em que também os cálculos de estrutura eletrônica foram realizados sem solvente (compare tabelas 3.1 e 3.8). Outra

similaridade reside no fato de que o log P mostra-se mais expressivo que os demais descritores para a PC2, responsável por cerca de 14% da informação à respeito da correlação.

3.2.2 Cálculos com modelo de solvatação

Considerando o modelo de solvatação PCM nos cálculos de estrutura eletrônica dos compostos pertencentes ao PEM-2, o melhor resultado encontrado conforme os procedimentos adotados está representado no gráfico 3.9. Observa-se que o indivíduo que melhor se correlaciona ao donepezil (**21**) desta vez é a estrutura molecular de número **16** (Figura 1.8). Os indivíduos de número **5** e **7**, que mostraram-se muito próximos ao fármaco no modelo sem a presença do solvente, agora encontram-se bem afastados em relação à PC2, para a qual a contribuição da energia do orbital HOMO é mais expressiva que a contribuição dos demais descritores.

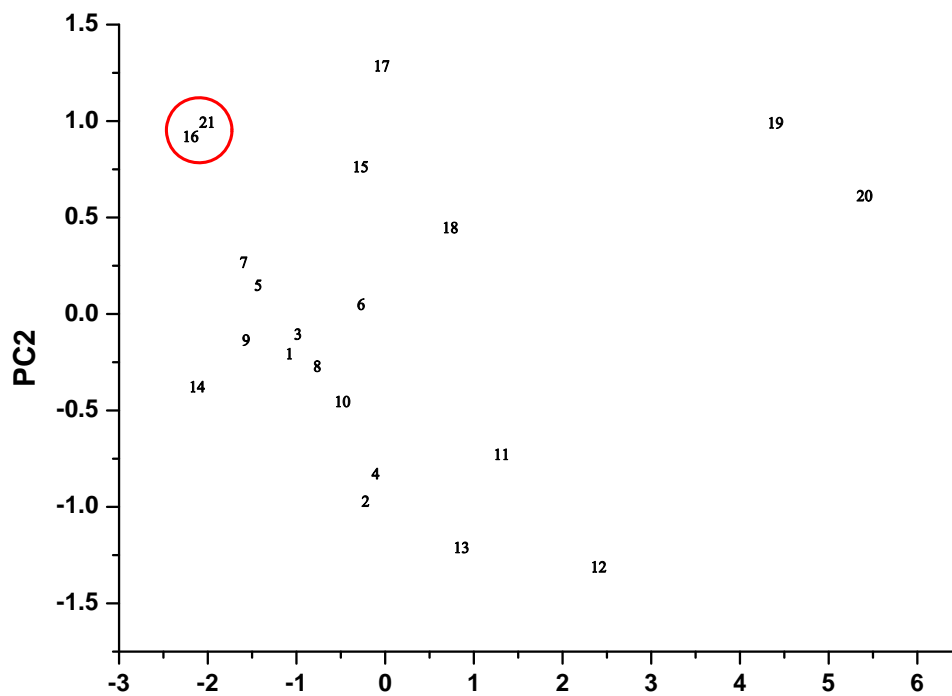


Figura 3.9: PC2 versus PC1 para o PEM-2 no modelo com solvente.

VARIÁVEIS	PC1	PC2	PC3
HOMO	0.367352	0.852401	-0.358881
Nitrogênio	0.433330	0.179907	0.873089
Energia Mínima	-0.479416	0.246280	0.260668
Volume	0.470093	-0.370413	-0.191164
Polarizabilidade	0.475868	-0.207813	-0.066545

Tabela 3.10: Peso das variáveis mais significativas para as componentes principais do PEM-2 no modelo com solvente.

	Autovalor	Porcentagem	Cumulativo
PC1	4.046394	80.92788	80.92788
PC2	0.577924	11.55847	92.48635
PC3	0.288814	5.77629	98.26264

Tabela 3.11: Autovalores e porcentagens das três primeiras componentes principais do PEM-2 no modelo com solvente.

Os descritores identificados como mais apropriados para esta correlação são a energia do orbital HOMO, a carga eletrônica do nitrogênio, o mínimo de energia eletrônica, o volume molecular e a polarizabilidade (veja tabela 3.10). Contribuem mais efetivamente para a PC1, responsável por cerca de 80% da informação sobre a correlação (veja tabela 3.11), o volume e a polarizabilidade. A energia do orbital HOMO, juntamente com o mínimo da energia eletrônica, mostram-se mais expressivas para a PC2. A energia mínima surgiu como descritor relevante em todos os casos analisados e seu valor, correspondente à molécula 16, está mais próximo do valor obtido para o fármaco ativo que as demais estruturas (veja tabela 3.12). Já o log P, apesar de ter se mostrado significativo na maioria dos casos estudados, não aparece quando a dispersão das variáveis é maximizada em relação ao parâmetro.

Tabela 3.12: Donepezil (**21**) e PEM-2 com respectivos descritores mais significativos para a correlação (cálculos de estrutura eletrônica com modelo de solvente).

Moléculas	Polariza- bilidade (\AA^3)	HOMO (u.a.)	N (u.a.)	Energia Eletrônica (u.a.)	Volume (\AA^3)
1	44.85	-6.21	-0.08	-1368.17	1349.55
2	48.80	-6.27	-0.08	-1462.86	1435.98
3	44.85	-6.17	-0.07	-1368.17	1358.18
4	48.80	-6.23	-0.06	-1462.86	1436.96
5	43.02	-6.19	-0.06	-1328.83	1305.39
6	46.96	-6.05	-0.05	-1423.53	1388.55
7	41.95	-6.20	-0.02	-1290.72	1299.25
8	45.90	-6.19	-0.06	-1385.41	1377.03
9	44.49	-6.26	-0.08	-1308.96	1301.72
10	48.35	-6.20	-0.06	-1403.64	1383.67
11	51.61	-6.17	0.15	-1521.83	1502.83
12	55.56	-6.20	0.20	-1616.53	1588.91
13	55.48	-6.23	-0.03	-1501.74	1479.66
14	44.19	-6.42	-0.06	-1215.23	1278.72
15	49.58	-5.90	0.04	-1345.65	1325.56
16	42.31	-6.12	-0.05	-1191.97	1204.42
17	46.75	-5.70	-0.07	-1403.87	1359.22
18	50.06	-5.79	-0.08	-1498.57	1448.08
19	58.24	-5.47	0.36	-1674.30	1607.83
20	61.55	-5.43	0.37	-1769.00	1694.67
21	43.28	-6.14	0.02	-1212.80	1161.11

Em termos estruturais o indivíduo de número **16** se assemelha mais ao donepezil do que os indivíduos **5** e **7**. A molécula **16** possui um anel benzênico heterocíclico (ligado a um grupo amino), onde está concentrado o orbital HOMO (Figura 3.10), evidenciando o caráter elétron doador do composto nessa região. Este grupo funcional possivelmente interage com o resíduo Trp84 da AChE.

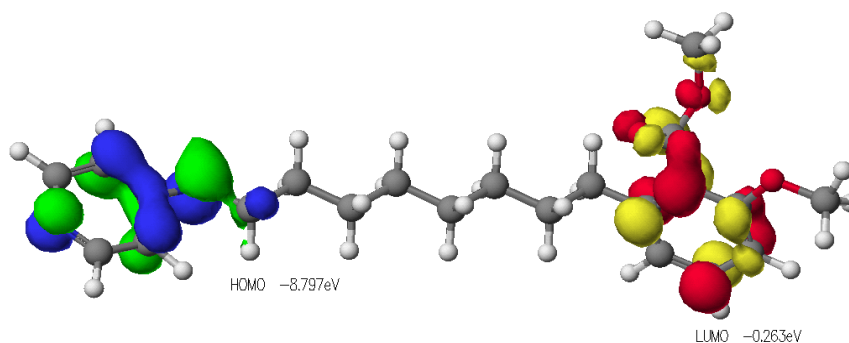


Figura 3.10: Geometria otimizada e orbitais HOMO e LUMO do composto de número **16** do PEM-2.

O orbital LUMO concentra-se no anel dimetoxi-fenil da molécula **16**, pressupondo uma interação entre este grupo e os resíduos aromáticos do sítio periférico da AChE. Comparando-se a distribuição dos orbitais de fronteira não só deste composto como dos compostos **5** e **7**, também do PEM-2, com seus equivalentes (mesmos grupos funcionais) do PEM-1, observa-se uma inversão na distribuição destes orbitais de fronteira em relação às subunidades farmacofóricas. A presença do grupo carboxila para os compostos derivados do ácido anacárdico parece de alguma maneira afetar tal distribuição. E mais, possivelmente, o caráter ácido do grupo carboxila afeta as interações ligante-receptor em meio aquoso uma vez que a análise de componentes principais com o modelo de solvatação para o PEM-2 apresentou mudanças bem mais expressivas que para o PEM-1. O agrupamento observado no modelo com solvente para o PEM-1 alterou-se pouco se comparado ao agrupamento no modelo sem solvente. O mesmo já não se pode dizer para o PEM-2; quando o solvente é

incluído nos cálculos de estrutura eletrônica, o *cluster* envolvendo o fármaco ativo é completamente distinto daquele observado no modelo sem solvente.

O mapa de potencial eletrostático (MEP) para composto de número **16** (Figura 3.11) indica que ocorre ligação do tipo hidrogênio entre o oxigênio do grupo acetil do anel dimetoxi-fenil e o sítio aniônico periférico (região atrativa, de coloração avermelhada) e também entre o nitrogênio do anel benzênico heterocíclico e o sítio catalítico (região atrativa, de coloração avermelhada).

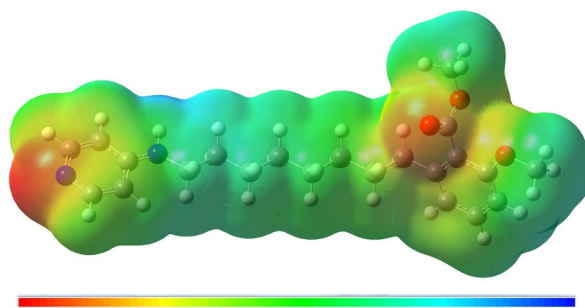


Figura 3.11: MEP do composto de número **16** do PEM-2 (modelo com solvente).

Capítulo 4

Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho, um amplo conjunto de descritores moleculares pôde ser determinado para um grande número de compostos candidatos a inibidores da AChE: 20 derivados do cardol (PEM-1) e 20 derivados do ácido anacárdico (PEM-2). Todas as geometrias foram exaustivamente estudadas de maneira que a conformação mais estável de cada estrutura molecular foi caracterizada com grande precisão.

A análise de componentes principais revelou tendências em comum entre os candidatos a inibidores da AChE pertencentes ao PEM-1 e PEM-2. Algumas estruturas moleculares como 19 e 20, de ambos os padrões estudados, praticamente não se correlacionaram com o donepezil em momento algum. Outras mantiveram-se próximas ao fármaco ativo, ao menos em relação à PC1, na maioria dos casos. O trabalho sugere que os compostos 5 e 7, do PEM-1, e 16, do PEM-2, são potencialmente bioativos, haja vista que mostraram-se bem correlacionados com o fármaco ativo para um conjunto seletivo de descritores moleculares e os resultados teóricos revelaram-se bastante coerentes.

Em meio aquoso, a energia do orbital HOMO surge como propriedade eletrônica importante para a correlação. Juntamente com a carga atômica do nitrogênio do grupo amino, o orbital HOMO indica prováveis interações ligante-receptor do tipo π -stacking no sítio aniônico periférico da enzima e do tipo ligação

de hidrogênio no bolso acil. Os mapas de potencial eletrostático dos compostos sugeridos como potencialmente bioativos auxiliam na identificação das prováveis interações ligante-receptor. O estudo da orientação preferencial destas interações para a formação de um complexo estável (*docking*) seria uma perspectiva futura.

Em virtude de estudos sistemáticos de reconhecimento de padrões por meio de PCA e dos bons valores de variância obtidos, assim como a observação de agrupamentos envolvendo o fármaco ativo, os descritores definidos como mais apropriados para a correlação dos candidatos preferenciais de cada padrão com o donepezil nortearão as análises experimentais que darão continuidade ao presente trabalho. Um futuro estudo de atividade biológica revelará a possível ação terapêutica destes compostos. Em verdade, pode-se encontrar na literatura estudos de atividade com o peixe elétrico que indicam a ação terapêutica de compostos anticolinérgicos similares aos compostos estudados [43], reforçando a tese de que os potenciais candidatos sugeridos no presente trabalho possivelmente exibem resposta biológica.

Ainda existe a perspectiva de verificar a correlação de outros compostos, também derivados do líquido da castanha de caju, cujos cálculos de estrutura eletrônica estão em andamento, com o donepezil e outros fármacos ativos, valendo-se da metodologia aqui utilizada.

Capítulo 5

Apêndice A - Funções de Base

6-311+G(2d,p)

O conjunto de funções de base mínimo é a representação mais simples de um orbital atômico, compreendendo apenas as funções de base necessárias para acomodar todos os elétrons de um átomo. Fazer uma diferenciação entre os elétrons mais internos e os elétrons da camada de valência de um átomo é uma maneira de construir-se um conjunto de funções de base mais acurado. Bastante difundido em cálculos de estrutura eletrônica, o conjunto de funções de base 6-311+G(2d,p) [31] é construído de maneira que os orbitais internos (*core*) sejam representados em termos de seis funções Gaussianas primitivas. Já para os átomos de maior número atômico de uma molécula, são usadas três Gaussianas para representar os orbitais de valência. E para os átomos de menor número atômico, usa-se uma função Gaussianas para os orbitais de valência mais internos e outra função Gaussianas para os orbitais de valência mais externos. Considerando que a molécula se encontre em uma região onde há presença de campo elétrico, a distribuição de cargas em torno do núcleo atômico torna-se assimétrica. Para contemplar este efeito, introduz-se funções de base *polarizadas* do tipo *d* para representar átomos mais pesados (L_i a F) e do tipo *p* para os átomos de hidrogênio originando assim, o conjunto

de funções de base chamado 6-311+G(2d,p). O sinal “+” indica que as Gaussianas usadas para construir os orbitais dos átomos mais pesados são do tipo mais difusas, que descrevem melhor densidades eletrônicas mais delocalizadas.

O uso do conjunto de funções de base 6-311+G(2d,p) nos cálculos de estrutura eletrônica dos candidatos a inibidores da AChE deste trabalho já justifica-se pelo fato desta base ser bastante extensa, sendo suficiente para descrever os sistemas em questão. Ademais, em estudos anteriores a este, também envolvendo modelagem molecular de outros compostos candidatos a inibidores da AChE [43, 44], outras bases foram empregadas nos cálculos de estrutura eletrônica e aquela que conduziu aos resultados mais bem sucedidos fora a base 6-311+G(2d,p), motivando sua escolha para a modelagem deste trabalho.

Apêndice B

Artigo aceito para publicação.

Referências Bibliográficas

- [1] A. Alzheimer, Neurologisches Centralblatt 23 (1906) 1129.
- [2] P.T. Francis, A.M. Palmer, A.M. Snape, G.K. Wilcock, J. Neurol Neurosurg Psychiatry 66 (1999) 137.
- [3] K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, Neurobiol Aging 21 (2000) 901.
- [4] K.A. Jellinger, J. Neural Transm. 113 (2006) 1603.
- [5] R. León, A.G. Garcia, J. Marco-Contelles, Med. Res. Rev. (2011) DOI 10.1002/med.20248.
- [6] A. Castro, A. Martinez, Curr Pharm Des 12 (2006) 4377.
- [7] E. Karran, M. Mercken, B. D. Strooper, Nature Rev. Drug Discov. 10 (2011) 698.
- [8] A.C. Alonso, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Nat Med 2 (1996) 783.
- [9] J.K. Andersen, Nat Med 10 (2004) S18.
- [10] M. Dumont, M.F. Beal, Free Rad. Biol. Med. 51 (2011) 1014.
- [11] J.L. Cummings, Rev Neurol Dis 1 (2004) 60.
- [12] N.A.J. Boyle, V. Talessa, E. Giovannini, G. Rosi, S.J. Norton, J. Med. Chem. 40 (1997) 3009.

-
- [13] R.T Bartus, R.L. Dean III, B. Beer, A.S. Lippa, *Science* 217 (1982) 408.
- [14] G. Benzi, A. Moretti, *Eur. J. Pharmacol.* 346 (1998).
- [15] E. Giacobine, R. Becker, *Alzheimer's disease: Molecular biology to therapy* (1997) 188.
- [16] F. Mangialasche et al, *Lancet Neurol.* 9 (2010) 702.
- [17] J.L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science* 253 (1991) 872.
- [18] H. Dvira, I. Silmanb, M. Harela, T.L. Rosenberryc, J.L. Sussman, *Chemico-Biological Int.* 187 (2010) 10.
- [19] A. Shaffemman et al., *EMBO J.*, 11 (1992) 3561.
- [20] N. Ariel, A. Ordentlich, D. Barak, T. Bino, B. Velan, A. Shafferman, *Biochem. J.*, 335 (1998) 95.
- [21] J.P. Colletir. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 128 (2006) 4526.
- [22] A. Ordentlich et al., *J. Biol. Chem.*, 268 (1993) 17083.
- [23] J.R. Viegas, V.S. Bolzani, *Química Nova* 27 (2004) 655.
- [24] S.E. Mazzetto, D. Lomonaco, G. Mele, *Química Nova* 32 (2009) 732.
- [25] L.A.S Romeiro, *Desenvolvimento de Novos Agentes Neuroativos Planejados a Partir de Derivados do Líquido da Castanha de Caju, Úteis no Tratamento da Doença de Alzheimer, Projeto de Pesquisa*, UCB, 2007.
- [26] A. Castro, A. Martinez, *Mini Rev. Med. Chem.*, 3 (2001) 267.
- [27] J.J.P. Stewart, Fujitsu Limited: Tokyo, Japan, 2003.

-
- [28] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Jr. Montgomery, T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople, Gaussian09, Inc., Wallingford, CT, USA, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2009.
- [29] A. Szabo, N. Ostlund, N. Modern Quantum Chemistry, Dover, 1996.
- [30] C.C.J. Roothaan, New developments in molecular orbital theory, *Rev. Mod. Phys.*, 98 (1993) 5648.
- [31] K.I. Ramachandran, G. Deepa, K. Namboori, Computational Chemistry and Molecular Modeling, India, 2008.
- [32] P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev.*, 864 (1964) 136.
- [33] W. Khon, L.J. Sham, *Phys. Rev.*, A1133 (1965) 140.
- [34] A.D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 98 (1993) 1372.
- [35] W. Khon, A.D. Becke., C.R.G. Parr, *J. Phys. Chem.*, 100 (1996) 12974.

-
- [36] C. Lee, W. Yang, C.G.R. Parr, *Phys. Rev. B*, 37 (1998) 785.
- [37] A.D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 98 (1993) 5648.
- [38] S.J. Vosko, L. Wilk, M. Nusair, *Can. J. Phys.*, 58 (1980) 1200.
- [39] S. Miertus, E. Scrocco, J. Tomasi, *Chem. Phys.*, 55 (1981) 117.
- [40] J.C. Bassurto, C.F. Sandoval, J.M. Cruz, A.R. Dominguez, L.M.E Fonseca, J.G.T Ferrara, *European Journal of Medical Chemistry* 42 (2007) 10.
- [41] J. Wang, J. Gu, J. Leszczynski, *J. Phys. Chem. B*, 13 (2006) 7567.
- [42] R. Lo, T. Bandyopadhyay, B. Gangul, *J. Mol. Graph. Model.*, 29 (2011) 1039.
- [43] A.A.N. De Paula, J.B.L. Martins, M.L. dos Santos, L.C. Nascente, L.A.S. Romeiro, T.F.M.A. Areas, K.S.T. Vieira, N.F. Gambo, N.G. Castro, R. Gargano, *European Journal of Medical Chemistry* 44 (2009) 3754.
- [44] A.A.N. de Paula, J.B.L. Martins, R. Gargano, M.L. dos Santos, L.A.S Romeiro, *Chem. Phys. Lett.*, 446 (2007) 304.
- [45] S. Sakkiyah, K.W. Lee, *Acta Pharmacologica Sinica* 33 (2012) 964.
- [46] R.S. Mulliken, *J. Chem. Phys.*, 23 (1955) 1833.
- [47] HyperChem, *Computational Chemistry*, New York, 1996.
- [48] E.C. Nascimento, J.B.L. Martins, *Journal of Molecular Modeling*, 17 (2011) 1371.
- [49] E.C. Nascimento, J.B.L. Martins, R. Gargano, M.L. dos Santos, *Chem. Phys. Lett.*, 458 (2008) 285.
- [50] O.A. Raevsky, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 4 (2004) 1041.

- [51] H. Pajouhesh, G.R. Lenz, *NeuroRx*. 2, 4 (2005) 541.
- [52] I.T Jolliffe, *Principal Component Analysis*, Springer-Verlag, New York, 2002.
- [53] StatSoft, 2008, Oklahoma.
- [54] F. Ibrahim, C. Andre, M. Thomassim, Y.C. Guillaume, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 48 (2008) 1345.