



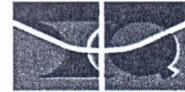
**Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química**

DETERMINAÇÃO TEÓRICA DE PROPRIEDADES RELEVANTES PARA A ATIVIDADE DE INIBIDOR DA ACETILCOLINESTERASE

Érica Cristina Moreno Nascimento

Orientador: **Prof. Dr. João Batista Lopes Martins**

Brasília-DF
Março de 2009



Universidade de Brasília – Instituto de Química

COMUNICADO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado da aluna **Érica Cristina Moreno Nascimento**, intitulada “**Determinação teórica de propriedade relevantes para a atividade de inibidor de acetilcolinesterase**” apresentada no Instituto de Química da Universidade de Brasília em 03 de março de 2009.

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

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

Prof.^a Dr.^a Sonia Maria de Freitas
Membro Titular (IB/UnB)

Brasília, 03 de março de 2009.

À Judith e Sebastião
in memoriam. . .

BAĞIŞLANMIŞ UNUTUŞ

Çok zaman geçti aradan
Unuttuk birbirimizi

Yosun yeşili gözlerin vardı
Sözlerin gümüş temizi

Yorgo Seferis'tem bir dize:
"Ekmeği yê şarabı paylaştık seninle"
Bağlamıştı bizi birbirimize

Bağışlanmış bir unutuş
Zoraki anımsamalardan daha iyi, değil mi?

Zamansız ve adressiz bir teşekkür
Alicısına ulaştıktan sonra güzel değil mi?

Ne çok zaman geçmiş aradan
Unutmuşuz birbirimizi

Yosun yeşili gözlerin vardı
Özlemiş gözlerim gözlerini

(Ybrahim Berksoy)

O esquecimento do perdão

Muito tempo se passou
Esquecemos um ao outro

Você tinha olhos verdes, cor de algas
Suas palavras eram claras como prata

Um verso de Yorgo Seferis diz:
"Compartilhamos vinho e pão"
Estávamos conectados

Um perdão pelo esquecido
É melhor que uma lembrança forçada, não é?

Como é boa a graça que chega sem tempo ou lugar,
quando lhe chega, não é?

Muito tempo se passou
Esquecemos um do outro

Você tinha olhos verdes como algas
Meus olhos perderam os seus...

(Ybrahim Berksoy)

Agradecimentos

Agradeço ...

sempre, pelo sol que me aquece e ilumina, pela lua que me faz sonhar, pelo ar que produz meu alimento, pela água solvatando meu viver, pela terra sustentando meus pés, pelas pessoas possibilitando meu aprender...

Obrigada Senhor, pela Vida!

Agradecida também,

aos meus pais pela oportunidade de viver, principalmente a minha amada mãe Suzana pelo apoio;

às minhas irmãs, Renata e Débora, por aprender a amar...

à minha família, especialmente ao meu “padrinho-pai” Emanuel, minha tia Nena e minha prima Ana Paula;

às irmãs de Fé, Franciscanas e Mensageiras, pelo sorriso permanente e acolhida certa, especial às Irmãs Magda, Inês, Raquel e Maria das Dores;

ao meu orientador, Prof. João Batista Lopes Martins, pelos ensinamentos, paciência, prontidão, exemplo, orientação, confiança e a oportunidade da realização deste trabalho;

aos professores da Universidade de Brasília, e mestres, pelo exemplo de como posso ser profissionalmente e raras às vezes não ser também: Edgardo Garcia, Elaine Maia, Inês Sabioni, Isa Avellar, Lucília dos Santos, Marçal de Oliveira, Márcia Murta, Ricardo Gargano e Roberto Politi;

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

aos amigos, habitantes das minhas graças: Andréa, Clarissa, D. Therezinha, D. Elena, D. Berta, Eliane, Gilmar, Henrique, Lucas, Mônica, Nadir, Sandrinha, Sandra, Thaís;

aos amigos LQCeanos, que me permitem acreditar num lugar para trabalhar, tomar chá e sorrir: Carla, Elton, Fernando, João Paulo, Larissa, Leo, Paulo, Víctor, Cida, Glauciete e Tiago;

aos amigos do IQ, sempre acolhedores: Alessandra, Carol, Daniela, Daniel, Dino, Sandro;

aos funcionários da secretaria do Instituto de Química especialmente Júnior, Inocência, Tiago, Rafael pelos serviços sempre bem prestados e a D. Chiquinha pelos cafezinhos e apoio;

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

a CAPES pelo apoio financeiro,

e finalmente, a Ibrahim, meu poeta, por trazer felicidade ao meu coração.

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é um tipo de demência degenerativa e progressiva de grande preocupação social. Estima-se hoje que, 40 milhões de pessoas no mundo apresentem algum tipo de demência, dentre essas, 25 milhões apresentam sintomas característicos da doença de Alzheimer. As causas da DA não são determinadas, assim, os sintomas da doença podem ser apenas amenizados. A estratégia mais usada para tratar pacientes com DA é a terapia colinérgica, que consiste no uso de fármacos com ação inibitória à acetilcolinesterase (AChE) para impedir o decréscimo da concentração do neuroreceptor acetilcolina nas fendas sinápticas, que é drasticamente diminuída nas regiões neuronais do córtex cerebral de pessoas com DA. As drogas tacrina (THA), donepezil (E2020), galantamina (GALA), rivastigmina (RIVA) e a fisostigmina (PHYSO) são drogas aprovadas para o tratamento da DA, classificadas como inibidoras da acetilcolinesterase (AChEI). Outras drogas como o metrifonato (METRI), diclorvos (DDVP), huperzina A (HUPE), fenserina (PHEN) e o dímero da tacrina (DIMTHA) estão em fases de teste clínicos. Neste trabalho foram determinados parâmetros estruturais, eletrônicos e espaciais das AChEIs, bem como para análise das interações entre estas, a tríade catalítica (Ser200-Glu327-His440) e o sítio ativo (GORGE) da AChE por meio de cálculos *ab initio* e semi-empírico no vácuo e em meio solvatado. O método de multivariáveis de análise das componentes principais (PCA) foi aplicado a 18 parâmetros para determinação do perfil farmacofórico de um bom candidato a AChEI. Os parâmetros foram obtidos por meio dos cálculos nos níveis AM1, PM3, RHF/6-31G*, RHF6-31+G(d,p), B3LYP8/6-31G, B3LYP/6-31+G(d,p) e o modelo de solvatação CPCM no nível RHF/6-31G. O estudo da PCA foi realizado para redução do espaço amostral de propriedades, a fim de obter aqueles que são componentes principais entre essas AChEIs com estruturas moleculares diferenciadas. Propriedades eletrônicas como a energia do orbital HOMO-1 e o coeficiente de partição logP, propriedades estruturais como o tamanho da droga e a distância entre os dois hidrogênios mais ácidos da molécula são algumas das componentes principais utilizadas para a descrição do perfil farmacofórico de candidatos à AChEI.

Palavras –chaves: Doença de Alzheimer, inibidores da acetilcolinesterase, semi-empírico, RHF, DFT, PCA.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a degenerative and progressive type of dementia of great social concern. The latest worldwide estimate shows that 40 million people have some form of dementia, among these, 25 million have symptoms of Alzheimer's disease. The causes of AD are still not determined, thus the symptoms of this disease may only be relieved. Most patients are treated with the cholinergic therapy, which consists in use drugs with inhibitory effects against acetylcholinesterase (AChE), in order to prevent the decrease of the concentration of acetylcholine (the neurotransmitter) in the synaptic region, which is drastically reduced in regions of neuronal cerebral cortex of people with AD. The drugs tacrine (THA), donepezil (E2020), galanthamine (GALA), rivastigmine (RIVA) and physostigmine (PHYSO) were approved for treatment of AD and are classified as inhibitors of acetylcholinesterase (AChEI). Other drugs such as metrifonate (METRI), dichlorvos (DDVP), huperzine A (HUPE), phenserine (PHENE) and the tacrine dimer (DIMTHA) are in clinical testing. In this work calculations were performed in vacuum and in solvated medium at *ab initio* and semi-empirical levels for determination structural, electronic and spatial parameters for AChEIs, as well as analysis of interactions between the AChEIs, the catalytic triad (Ser200-Glu327-His440) and the active site GORGE of AChE. The multivariate method of the principal components analysis (PCA) was applied to selected 18 parameters of AChE for determining the pharmacoforic profile of a good candidate for AChEI. The parameters were obtained from the calculations in AM1, PM3, RHF/6-31G *, RHF6-31 + G (d, p), B3LYP8/6-31G, B3LYP/6-31 + G (d, p) and CPCM solvation model at the RHF/6-31G levels. The PCA study was applied to reduce the sample space of properties to obtain the most relevant properties that are major components of these AChEI, which have different molecular structure. Electronic properties such as the orbital energy of HOMO-1 and the partition coefficient logP, structural properties such as the size of the drug and the distance between the two most acidic hydrogens of the molecule are some main components of the pharmacoforic profile of candidates to AChEI.

Keywords: Alzheimer's Disease, acetylcholinesterase inhibitors, semi-empirical, RHF, DFT, PCA.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1	15
1.1 Introdução	16
1.2 Objetivo	31
CAPÍTULO 2	32
2.1 Metodologia e Referencial Teórico	33
2.2 Métodos	36
2.3 Sistemas AChEIs, SEH-AChEIs e GORGE-AChEIs	43
2.4 Solvatação dos sistemas moleculares: AChEIs, SEH-AChEIs e GORGE-AChEIs utilizando modelos contínuos de solventes	46
2.5 PCA	48
CAPÍTULO 3	52
3.1 Resultados e Discussões	53
3.1.1 Estudo dos sistemas AChEIs, SEH-AChEIs e GORGE-AChEIs	53
3.1.1.1 Otimização da geometria e estudo de estrutura eletrônica das AChEIs	54
3.1.1.2 Otimização da geometria e Estudo de estrutura eletrônica dos sistemas SEH-AChEIs	74
3.1.1.3 Interações Receptor-Ligante (R-L) do sistema GORGE-AChEI	92
3.1.1.4 Mudanças conformacionais e energia de interação do sistema SEH-AChEI	101
3.2 Energia do orbital de fronteira HOMO e GAP: Variações entre os sistemas AChEI e SEH-AChEI	102
3.3 Análise dos Componentes Principais dos sistemas AChEI	103
CONCLUSÕES	110
REFERÊNCIAS	112
ANEXOS	114
Anexo 1 – Artigo Publicado no Chemical Physics Letters	115

Lista de abreviaturas

3D	Três dimensões
Å	Angström: 10^{-10} m
acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChE-AChEIs	Complexos de acetilcolinesterase-inibidores
AChEIs	Drogas inibidoras e bloqueadoras da acetilcolinesterase
AM1	Modelo Austin 1 (Austin Model 1)
AM1-S	Cálculos no nível AM1 com modelo de solvatação COSMO
Asn65	Asparagina, resíduo 65 da acetilcolinesterase
Asp72	Aspartato, resíduo 72 da acetilcolinesterase
B3LYP	Funcional híbrido dependente da densidade eletrônica (Becke 3, Lee, Yang e Parr)
BuChE.	Butirilcolinesterase
CENAPAD	Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho
ChelpG	Charges from Electrostatic Potential Grid Based
CNDO	Desconsideração Completa da Sobreposição Diferencial (Complete Neglect of Differential Overlap)
COSMO	Conductor-like Screening Model
CPMC	Conductor-like Polarizable Continuum Model
DA	Doença de Alzheimer
DDVP	Diclorvos
DFT	teoria do funcional de densidade (density functional theory)
DIMTHA	Dímero da tacrina
E2020	Donepezil
F330	Fenilalanina, resíduo 300 da acetilcolinesterase
FDA	Food and Drug Administration
GALA	Galantamina
GAP	Diferença entre os orbitais de fronteira: LUMO-HOMO
Glu199	Ácido glutâmico, resíduo 199 da acetilcolinesterase,
Glu327	Ácido glutâmico, resíduo 327 da acetilcolinesterase
Gly117	Glicina, resíduo 117 da acetilcolinesterase
Gly118	Glicina, resíduo 118 da acetilcolinesterase
Gly119	Glicina, resíduo 119 da acetilcolinesterase
Gly123	Glicina, resíduo 123 da acetilcolinesterase
GORGE-AChEIs	Complexos entre os resíduos que formam o sítio ativo da acetilcolinesterase e inibidores
H _{don}	Doador de hidrogênio
HF	Hartree-Fock
His440	Histidina, 440 resíduo da acetilcolinesterase
HOMO	Orbital molecular ocupado de energia mais alta (High occupied molecular orbital)

HOMO-1	Orbital molecular ocupado de segunda mais alta energia
H _{recep}	Receptor de hidrogênio
HUPE	Huperzina A
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INDO	Desconsideração Intermediária da Sobreposição Diferencial (Intermediate Neglect of Differential Overlap)
LCAO	linear combination of atomic orbitals
LogP	Coeficiente de partição
LogS	Antilogaritmo da solubilidade
LUMO	Orbital molecular desocupado de energia mais baixa (low unoccupied molecular orbital)
LUMO+1	Orbital molecular desocupado de segunda mais baixa energia
M1	Receptor muscarínico do tipo 1
M2	Receptor muscarínico do tipo 2
M3	Receptor muscarínico do tipo 3
MEP	Mapa de Potencial Eletrostático
METRI	Metrifonato
MINDO	INDO Modificado (Modified INDO)
MNDO	Método Modificado da Desconsideração das Sobreposições Diatômicas (Modified Neglect of Diatomic Overlap)
MOPAC	Pacote de Orbital Molecular (Molecular Orbital Package)
ms	Mili segundos: 10 ⁻³ s
NDDO	Desprezo da Sobreposição Diatômica Diferencial (Neglect of Diatomic Differential Overlap)
nM	Nano Molar: 10 ⁻⁹ mol/litro
NMDA	N-metil-D-aspartato
OH	Hidroxila
OMs	Orbitais moleculares
PCA	Análise de componentes principais
PCM	Modelo polarizável contínuo (Polarizable Continuum Model)
PDB	Banco de dados de proteínas (Protein Data Bank)
Phe288	Fenilalanina, resíduo 288 da acetilcolinesterase
Phe330	Fenilalanina, resíduo 330 da acetilcolinesterase
Phe331	Fenilalanina, resíduo 331 da acetilcolinesterase
PHEN	Fenserina
PHYSO	Fisostigmina
pka	Antilogaritmo da constante de equilíbrio
PM3	Método de Parametrização 3 (Parametric Method 3)
PM3-S	Cálculos no nível PM3 com modelo de solvatação COSMO
PM5	Método de Parametrização 5 (Parametric Method 5)
PPA	Precursor da proteína amilóide
PSA	Área de Superfície Polar

QSAR	Relação quantitativa entre estrutura química e atividade
RHF	Hartree-Fock Restrito (Restrict Hartree-Fock)
RHF-S	Cálculos no nível RHF com modelo de solvatação CPCM
RIVA	Rivastigmina
R-L	receptor-ligante
S200	Serina, resíduo 200 da acetilcolinesterase
SCF	Campo Auto-Consistente (Self Consistent Field)
SEH	Tríade catalítica da acetilcolinesterase
SEH-AChEIs	Complexos de tríade catalítica-inibidores
Ser122-	Serina, resíduo 122 da acetilcolinesterase
Ser124	Serina, resíduo 124 da acetilcolinesterase
Ser200	Serina, resíduo 200 da acetilcolinesterase
Ser200-Glu327-His440	Tríade catalítica da acetilcolinesterase
Ser286	Serina, resíduo 286 da acetilcolinesterase
Ser81	Serina, resíduo 81 da acetilcolinesterase
SNC	Sistema Nervoso Central
TcAChE	Acetilcolinesterase obtida da Torpedo californica
THA	Tacrina
Trp279	Triptofano, resíduo 279 da acetilcolinesterase
Trp84	Triptofano, resíduo 84 da acetilcolinesterase
Tyr121	Tirosina, resíduo 121 da acetilcolinesterase
Tyr130	Tirosina, resíduo 130 da acetilcolinesterase
Tyr70	Tirosina, resíduo 70 da acetilcolinesterase
W84	Triptofano, resíduo 84 da acetilcolinesterase
Ψ	Função de onda
β -A	Proteína beta-amilóide A/4
ϵ	Constante dielétrica
μ M	Micro molar: 10^{-6} mol/litro

Lista de tabelas

Tabela 1	Principais propriedades estruturais e eletrônicas observadas na DDVP otimizada.	56
Tabela 2	Principais propriedades estruturais e eletrônicas observadas na DIMTHA otimizada.	58
Tabela 3	Principais propriedades estruturais e eletrônicas observadas na E2020 otimizada.	60
Tabela 4	Principais propriedades estruturais e eletrônicas observadas na GALA otimizada.	62
Tabela 5	Principais propriedades estruturais e eletrônicas observadas na HUPE otimizada.	64
Tabela 6	Principais propriedades estruturais e eletrônicas observadas na METRI otimizada.	66
Tabela 7	Principais propriedades estruturais e eletrônicas observadas na molécula otimizada da PHEN.	67
Tabela 8	Principais propriedades estruturais e eletrônicas observadas na molécula otimizada da PHYSO.	69
Tabela 9	Principais propriedades estruturais e eletrônicas observadas na RIVA otimizada.	71
Tabela 10	Principais propriedades estruturais e eletrônicas observadas na THA otimizada.	73
Tabela 11	Principais modificações estruturais (ângulos e distâncias) e eletrônicas determinadas na otimização do sistema SEH.	76
Tabela 12	Principais modificações estruturais (ângulos e distâncias) e eletrônicas determinadas na otimização do sistema SEH-DDVP.	78
Tabela 13	Principais modificações estruturais (ângulos e distâncias) e eletrônicas determinadas na otimização do sistema SEH- DIMTHA.	79
Tabela 14	Principais modificações estruturais (ângulos e distâncias) e eletrônicas determinadas na otimização do sistema SEH- E2020.	81
Tabela 15	Principais modificações estruturais (ângulos e distâncias) e eletrônicas determinadas na otimização do sistema SEH- GALA.	82
Tabela 16	Principais modificações estruturais (ângulos e distâncias) e eletrônicas na otimização do sistema SEH- HUPE.	84
Tabela 17	Principais modificações estruturais (ângulos e distâncias) e eletrônicas determinadas na otimização do sistema SEH- METRI.	85
Tabela 18	Principais modificações estruturais (distâncias e diedros) e eletrônicas determinadas na otimização do sistema SEH- PHEN.	87
Tabela 19	Principais modificações estruturais (ângulos e distâncias) e eletrônicas determinadas na otimização do sistema SEH- PHYSO.	88
Tabela 20	Principais modificações estruturais (ângulos e distâncias) e eletrônicas calculadas na otimização do sistema SEH- RIVA.	89
Tabela 21	Principais modificações estruturais (ângulos e distâncias) e eletrônicas determinadas na otimização do sistema SEH- THA.	90
Tabela 22	Visão geral dos resultados B3LYP/6-31G* dos complexos AChEI-SEH.	91
Tabela 23	Energias de interação para os sistemas SEH-AChEIs (kcal.mol ⁻¹).	101
Tabela 24	Propriedades das AChEIs no nível B3LYP/6-31+G(d,p).	104
Tabela 25	Variâncias acumuladas considerando 10 AChEIs e 18 propriedades.	105
Tabela 26	Variâncias acumuladas considerando 10 AChEIs e 6 propriedades.	106
Tabela 27	Equações das PC1, PC2 e PC3 para os níveis de cálculos estudados.	107

Lista de figuras

Figura 1	Casos de demência na população mundial até 2040.	17
Figura 2	Sítio ativo da AChE (pdb:2ACE; 2,5 Å).	21
Figura 3	Mecanismo proposto para hidrólise da ACh pela AChE	22
Figura 4	Estrutura molecular da THA.	23
Figura 5	Estrutura molecular da E2020.	24
Figura 6	Estrutura molecular da PHYSO.	25
Figura 7	Estrutura molecular da RIVA.	26
Figura 8	Estrutura molecular da GALA.	27
Figura 9	Estrutura molecular da PHEN.	27
Figura 10	Estrutura molecular da HUPE.	28
Figura 11	Estrutura molecular da METRI e DDVP.	29
Figura 12	Estrutura molecular da DIMTHA.	30
Figura 13	Estrutura 3D da TCAChe complexada com ACh (pdb:2ACE, 2,5 Å).	33
Figura 14	Matriz de dados $m \times n$ elementos.	49
Figura 15	Estrutura otimizada e MEP do DDVP B3LYP/6-31G*.	55
Figura 16	Estrutura otimizada e MEP do DIMTHA B3LYP/6-31G*.	57
Figura 17	Estrutura otimizada e MEP do E2020 /B3LYP/6-31G*.	59
Figura 18	Estrutura otimizada e MEP da GALA /B3LYP/6-31G*.	61
Figura 19	Estrutura otimizada e MEP da HUPE /B3LYP/6-31G*.	63
Figura 20	Estrutura otimizada e MEP do METRI /B3LYP/6-31G*.	65
Figura 21	Estrutura otimizada e MEP da PHEN B3LYP/6-31G*.	66
Figura 22	Estrutura otimizada e MEP da PHYSO /B3LYP/6-31G*.	68
Figura 23	Estrutura otimizada e MEP da RIVA /B3LYP/6-31G*.	70
Figura 24	Estrutura otimizada e MEP da THA /B3LYP/6-31G*.	72
Figura 25	Estrutura otimizada da tríade SEH/B3LYP/6-31G* e dados cristalográficos de geometria inicial - pdb: 1U65.	76
Figura 26	Mapa de potencial eletrostático do sistema SEH nível DFT/B3LYP/6-31G*.	77
Figura 27	Geometria otimizada do sistema SEH-DDVP - nível DFT/B3LYP/6-31G*.	78
Figura 28	Geometria otimizada do sistema SEH- DIMTHA - nível B3LYP/6-31G*.	79
Figura 29	Geometria otimizada do sistema SEH- E2020 - nível B3LYP/6-31G*.	80
Figura 30	Geometria otimizada do sistema SEH- GALA - nível B3LYP/6-31G*.	82
Figura 31	Mapa de potencial eletrostático do sistema SEH-GALA - nível B3LYP/6-31G*.	83
Figura 32	30. Geometria otimizada do sistema SEH-HUPE - nível B3LYP/6-31G*.	83
Figura 33	31. Geometria otimizada do sistema SEH-METRI - nível B3LYP/6-31G*.	85
Figura 34	Geometria otimizada do sistema SEH – PHEN - nível B3LYP/6-31G*.	86
Figura 35	Geometria otimizada do sistema SEH – PHYSO - nível B3LYP/6-31G*.	88
Figura 36	Mapa de potencial eletrostático do sistema SEH-RIVA - nível B3LYP/6-31G*.	89
Figura 37	Geometria otimizada do sistema SEH – THA nível B3LYP/6-31G*.	90
Figura 38	Superfície do GORGE, geometria otimizada com LocalSCF/PM3 (COSMO).	92
Figura 39	Superfície otimizada do complexo GORGE-DDVP LocalSCF/PM3 (COSMO).	93
Figura 40	Principais interações do complexo GORGE-DIMTHA LocalSCF/PM3 (COSMO).	94

Figura 41	Principais interações do complexo GORGE-E2020 LocalSCF/PM3 (COSMO).	95
Figura 42	Principais interações do complexo GORGE-GALA LocalSCF/PM3 (COSMO).	96
Figura 43	Principais interações do complexo GORGE-HUPE LocalSCF/PM3 (COSMO).	96
Figura 44	Principais interações do complexo GORGE-METRI LocalSCF/PM3 (COSMO).	97
Figura 45	Principais interações do complexo GORGE-PHEN LocalSCF/PM3 (COSMO).	98
Figura 46	Principais interações do complexo GORGE-PHYSO LocalSCF/PM3 (COSMO).	98
Figura 47	Principais interações do complexo GORGE-RIVA LocalSCF/PM3 (COSMO).	99
Figura 48	Principais interações do complexo GORGE-THA LocalSCF/PM3 (COSMO).	100
Figura 49	Energia do HOMO e do GAP (LUMO-HOMO) das AChEIs e dos sistemas SHE-AChEIs para o nível B3LYP/6-31G*	102
Figura 50	Gráfico dos escores PC1 versus PC2 no nível B3LYP/6-31+G(d,p).	108
Figura 51	Gráfico dos escores PC1 versus PC3 no nível B3LYP/6-31+G(d,p).	109

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

Entre os vários tipos de demência existentes os mais comuns e incidentes na população acima dos 60 anos de idade são a Doença de Alzheimer, demências vasculares, doença com corpos de Lewy, doença de Pick.¹ Entende-se por demência um estado ou condição anormal progressiva e degenerativa do funcionamento cerebral, que compromete a função cognitiva, a memória, o comportamento, o estado emocional e a operacionalidade de tarefas cotidianas de um indivíduo.²

São indicados vários fatores de risco para o acometimento de demências, mesmo que ainda não sejam conhecidos todos os mecanismos que as desencadeiem. A maioria das demências é da ordem idade-dependente, além desse fator a hereditariedade, doenças cardiovasculares, uso abusivo de drogas lícitas e ilícitas, diabetes, doenças da tireóide e traumatismo craniano são tidos também como fatores de risco.² Estima-se que 40 milhões de pessoas no mundo apresentem algum tipo de demência, dentre essas, 25 milhões apresentam sintomas característicos da doença de Alzheimer (DA).

Com o crescimento da expectativa de vida, o risco é real para todos que ultrapassam os 60 anos de idade. Em 2002, mais de 8 milhões de pessoas vieram a óbito portando algum tipo de demência, metade delas por DA. As doenças advindas de estado de demência são a 4ª causa de morte na população com mais de 60 anos e dentre essas a DA ocupa, infelizmente, o primeiro lugar.²⁻⁴

No Brasil, com o aumento da expectativa de vida, o número de pessoas com mais de 60 anos tende a aumentar exponencialmente nos próximos 30 anos. Segundo dados do IBGE o número de pessoas acima dos 60 já começou a aumentar e a tendência é o envelhecimento rápido da população, uma vez que a taxa de natalidade do país vem diminuindo ano após ano. Em 2030, estima-se que o país tenha 340 milhões de habitantes, destes 20% estarão acima dos 60 anos de idade.⁵ Com o envelhecimento da população, políticas públicas de saúde capazes de prover melhoria na qualidade de vida da população são necessárias, uma vez ser evidenciado que a partir dos 60 anos 40% da população é acometida por algum tipo de demência, sendo que 10 a 15% da população nessa faixa etária é afetada pela DA, e a partir dos 85 anos de idade essa fração pode chegar a 50% da população.

A Figura 1 mostra o número de casos de demência em 2001 e a expectativa para os anos de 2020 e 2040 na população mundial com maior incidência de casos nos países em desenvolvimento.

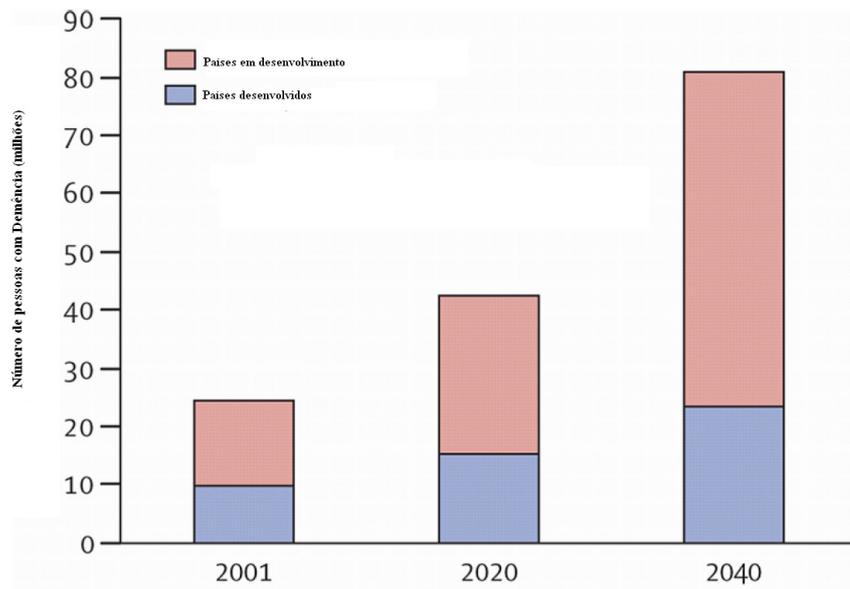


Figura 1. Casos de demência na população mundial até 2040.⁶

A Doença de Alzheimer foi descrita pela primeira vez na literatura pelo psiquiatra alemão Alois Alzheimer em 1907. Alzheimer, após a autópsia de centenas de cérebros observou que em grande parte de suas amostras havia diminuição da massa encefálica, além de manchas escuras e aglomerados fibrilares.⁷ É conhecida erroneamente por “esclerose”, muitos a definem como “mal do século” ou “epidemia silenciosa”, é uma doença pouco divulgada apesar do impacto social gerado, pois, causa grandes modificações nas vidas dos pacientes e de suas famílias.⁴ É uma doença de grande preocupação social, pois é onerosa para a sociedade, para a economia e principalmente para o veio familiar.⁷

A doença não tem cura e sua incidência aumenta com o aumento da idade da população.⁷⁻¹¹ É uma doença degenerativa e progressiva.^{8,11} Os principais sintomas desta doença são perda gradual de memória e do senso crítico, desorientação temporal e espacial, mudanças bruscas de personalidade sem motivo aparente, dificuldade de aprendizado e memorização, queda acentuada na realização de atividades cotidianas e o déficit cognitivo. A evolução da DA é de 5 a 15% da cognição por ano de doença, com um período médio de oito anos desde seu início até seu último estágio.

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

Não se sabe ao certo o que causa a DA, suspeita-se de fatores genéticos, de fatores ambientais e dos hábitos intelectuais praticados ao longo da vida. Os pacientes

acometidos pela DA com histórico da doença na família são chamados paciente com DA do tipo hereditário ou pacientes com DA familiar, estão entre 15 a 20% dos casos conhecidos.¹² Já pacientes com ausência de casos de DA na sua ancestralidade são chamados pacientes com DA do tipo esporádico e não apresentam padrões genéticos que os relacione.^{4,7}

Estudos recentes indicam que no caso de DA do tipo familiar, algumas mutações em alguns genes localizados nos cromossomos 12, 14, 19 e 21 estejam envolvidas diretamente no mecanismo que desencadeia a doença.^{4,7} Como as causas da DA ainda são desconhecidas, várias hipóteses são lançadas para determinar os mecanismos de ação da doença. Algumas características histológicas e bioquímicas são aceitas como relacionadas intrinsecamente com a doença:

- ◆ presença de placas neuríticas, constituídas principalmente pela proteína β -amilóide A/4 (β -A), que se acumulam no meio extracelular neuronal do córtex cerebral; as placas neuríticas são derivadas do precursor da proteína amilóide (PPA) com gene localizado no cromossomo 21, este depósito é considerado neurotóxico;^{4,7,9,11}
- ◆ formação de emaranhados fibrilares, compostos por filamentos da proteína tau hiperfosforilada dentro dos neurônios (intracelular) e de suas projeções ramificadas (dentritos e axônios) principalmente nos neurônios piramidais do córtex cerebral, do lobo temporal, do hipocampo e da amígdala;^{4,7,9,11} acentuada queda na quantidade de neurotransmissores nas regiões sinápticas, dentre eles a acetilcolina (ACh), serotonina, dopamina, noradrenalina, glutamato e a substância P. A ACh tem sua concentração bruscamente diminuída devido a baixa concentração da enzima acetilase, necessária na sua produção dentro do neurônio.^{7-9,11,13,14}

Neurotransmissores são substâncias produzidas nos neurônios, com a função de transportar mensagens químicas entre dois ou mais neurônios. A acetilcolina é o neurotransmissor mais abundante no cérebro e o principal responsável pela propagação do impulso nervoso nas fendas sinápticas. Tem como precursores a colina e a acetil-coenzima A (acetil-CoA), que sob a ação da enzima acetilase, reagem produzindo a acetilcolina dentro das células nervosas que armazenam o neurotransmissor em vesículas sinápticas.^{13,15,16}

A colina é uma substância essencial ao organismo obtida a partir de uma dieta rica em proteínas e pela reabsorção da junção sináptica¹⁶ após a ACh sofrer hidrólise pela ação da enzima acetilcolinesterase (AChE). Já a acetil-coenzima A, encontrada dentro dos neurônios, é proveniente das principais vias geradoras de energia das células.

A transmissão de impulsos nervosos de um neurônio a outro adjacente a ele se dá pela atuação da ACh da seguinte forma: quando um neurônio é estimulado, são liberadas moléculas de ACh que estão armazenadas nas vesículas sinápticas. Essa molécula é difundida pela fenda sináptica até chegar a um neurônio adjacente e estimula a liberação de outra molécula de ACh desse neurônio.

Esse processo é continuado até que as moléculas liberadas cheguem aos receptores de acetilcolina, mais especificamente aos muscarínicos –M- e nicotínicos –N-, onde os impulsos são passados ao neurônio adjacente. Os canais iônicos de $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ são abertos e o fluxo desses íons propaga o impulso resultando em algum processo cognitivo ou de contração muscular. Nesse momento a concentração de ACh na fenda sináptica aumenta de 10 nM para 500 μM em menos de 1 ms.¹⁵ A primeira molécula de ACh liberada é então desativada por hidrólise pela ação da acetilcolinesterase que libera acetato e colina no meio intraneuronal. Esta última será reabsorvida pelo neurônio para produção de outra molécula de ACh.^{4,13,16}

A supressão da quantidade de acetilcolina (ACh), provoca a perda massiva da capacidade de ação do Sistema Nervoso Central (SNC).^{13,17} Além disso, a diminuição na concentração da ACh está relacionada diretamente com o déficit cognitivo, característica marcante em pacientes acometido pela DA.^{4,7-9,11,14}

Em pacientes com DA, a concentração de ACh nas situações de transmissão de impulso neuronais são acentuadamente reduzidas, devido a sua baixa produção dentro dos neurônios, ocasionando o déficit colinérgico, ficando a função cognitiva gravemente comprometida.¹⁸ A fim de tratar a doença, a partir destas informações foi sugerida a hipótese do déficit colinérgico.¹⁴ Além dessa hipótese, várias outras estão sendo propostas, uma vez que as causas e o mecanismo completo que desencadeiam a DA é assunto controverso e não esclarecido: hipótese amilóide, hipótese do glutamato entre outras.

Na hipótese amilóide acredita-se que o acúmulo de placas senis constituídas principalmente pela proteína β -amilóide A/4 (β -A) possa ser evitado utilizando medicamentos que inibam a produção excessiva da β -A.⁴

Já na hipótese do glutamato é suposto que alta concentração desse neurotransmissor promova a entrada anormal (excessiva) de íons Ca^{2+} no interior do neurônio levando-o à morte. Medicamentos como a memantina são utilizados no tratamento de pacientes com DA para impedir que o neurotransmissor atue sobre os receptores de glutamato evitando o fluxo descontrolado de íons cálcio.⁴

A hipótese colinérgica gerou uma corrida na busca de drogas capazes de trazer benefícios e melhora significativa das funções cognitivas de pessoas com DA. Para atacar o problema do déficit colinérgico, várias estratégias foram lançadas por diversos grupos de pesquisa no desenvolvimento de drogas capazes de atenuar os efeitos deletérios da DA. Citando Sugimoto:⁷

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

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

A primeira classe de drogas citadas como inibidoras da ação da enzima acetilcolinesterase, são as chamadas AChEIs e constituem hoje a principal estratégia para o tratamento de pacientes com DA, a terapia colinérgica. O tratamento consiste na melhora da transmissão de impulso nervoso na sinapse. O impedimento da hidrólise da acetilcolina pela AChE, por inibição da enzima é feito por fármacos que interagem com a enzima permitindo a manutenção da concentração do neurotransmissor (acetilcolina), durante os processos de condução de sinal para outros neurônios. O uso de medicamentos corretos, que auxiliem no aumento da concentração de ACh na sinapse, têm efetivamente retardado a evolução da doença.^{4,7}

A AChE é uma enzima alostérica da classe das hidrolases, com 537 resíduos de aminoácidos na sua sequência, encontrada ancorada na membrana pós-sináptica na forma tetramérica. A AChE hidrolisa a ACh, em acetato e colina¹⁹ no sítio catalítico (tríade catalítica) constituído pelos resíduos Ser200-Glu327-His440 (SEH), situado no fundo do seu sítio ativo.^{10,20-23}

O sítio ativo da AChE denominado GORGE (Figura 2) é composto por quatro sub-sítios e tem aproximadamente 20 Å de profundidade. O sítio periférico está localizado na entrada e o sítio ligante de amônio quaternário situa-se na região central do GORGE. Estes dois sub-sítios são constituídos por vários resíduos aromáticos e por isso a totalidade da área que abrangem é denominada sítio aromático da AChE.

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

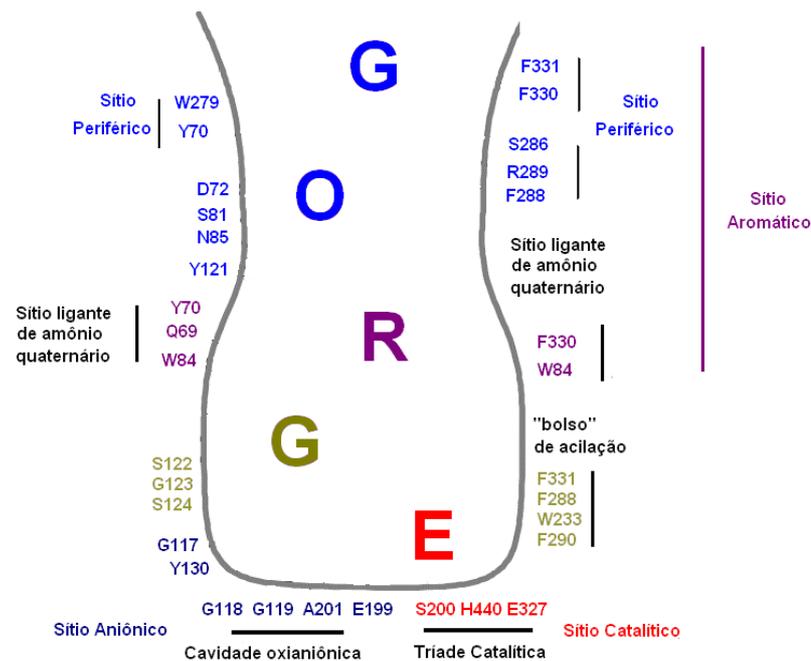


Figura 2. Sítio ativo da AChE (pdb:2ACE; 2,5 Å).²³

Alguns inibidores da AChE agem competindo com a ACh, outros inibem a acilação do grupo OH da Ser200, formando um éster de carbamila, mais estável que o acetato e menos apto a sair do sítio ativo.^{8,19}

O mecanismo proposto para a ação da AChE sobre a ACh (Figura 3) é dividido em duas etapas: a hidrólise da ACh e a acilação do grupo acetila. A acetilcolina, depois de ser reconhecida pelos resíduos Asp72 e Tyr70, situados no sítio periférico da AChE, move-se para o fundo do GORGE, ligando-se à tríade catalítica, mais especificamente à hidroxila da Ser200 que atua como nucleófilo usando um par de elétrons livres do oxigênio de sua hidroxila para atacar a carbonila da ACh formando em seguida um intermediário reativo tetraédrico com a His440 atuando como catalisador básico para aumentar a nucleofilicidade da serina (passos 1 e 2 da Figura 3). Após a formação do intermediário reativo, a histidina, agora ácida, protona o grupo 'O-R' que se torna um melhor grupo de saída que os outros, liberando dessa forma a colina da ACh (passos 3, 4 e 5 da Figura 3). O grupo acila da ACh encontra-se ligado covalentemente com a Ser200. Uma molécula de H₂O interage com a tríade catalítica da AChE, atuando como nucleófilo. O par de elétrons livres do oxigênio da água ataca a carbonila, do grupo acila, formando um novo intermediário reativo que é atacado pela His440 (passo 6 da Figura 3). Em seguida a histidina, novamente ácida, sofre ataque de um par de elétrons livres, do intermediário tetraédrico, que protonado sofre rearranjo liberando o acetato formado (ácido acético) (passos 7, 8, 9 e 10 da Figura 3). Desta forma, a Ser200 é restaurada e o processo se repete enquanto houver impulsos nervosos a serem transmitidos.¹⁹

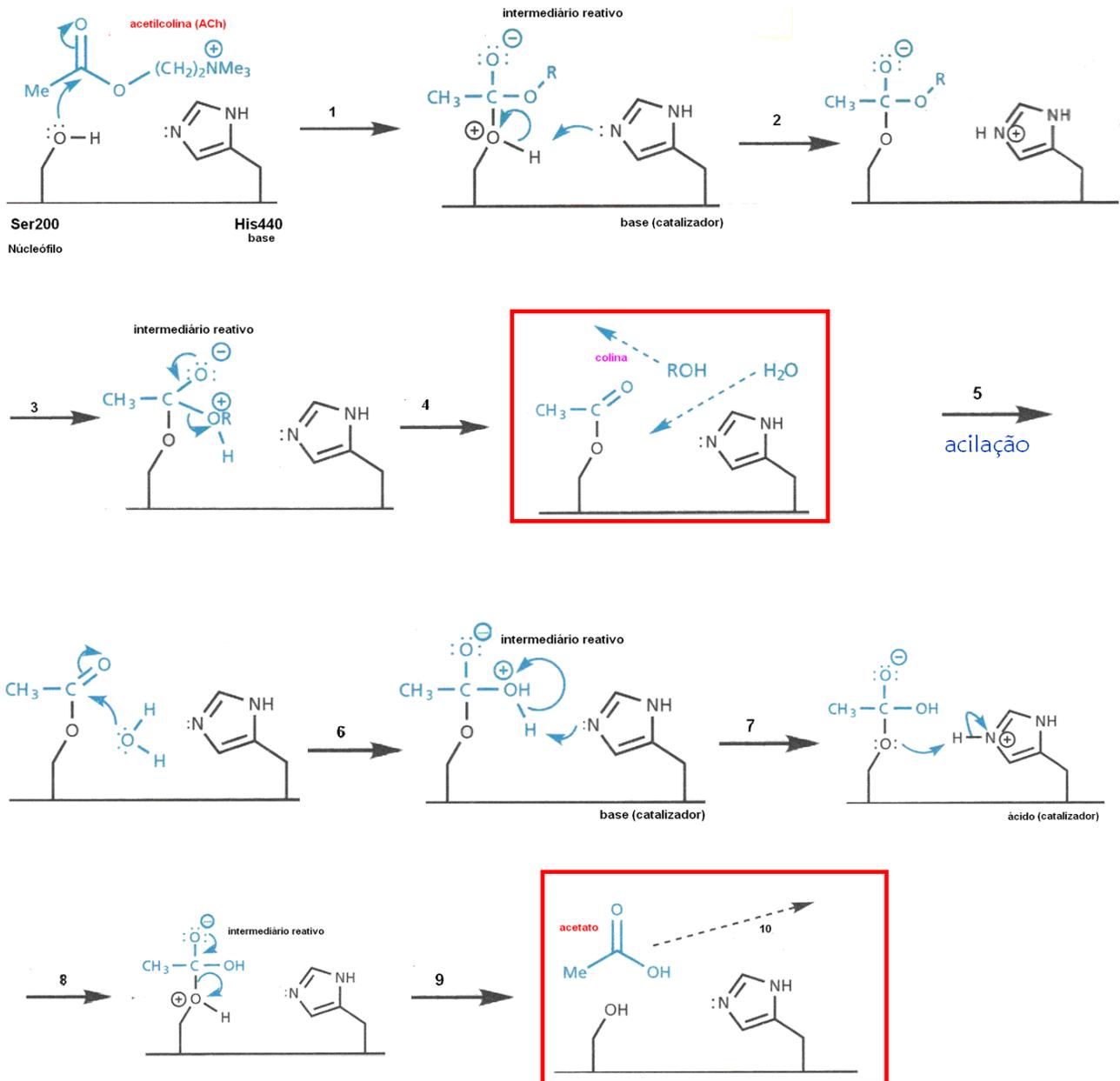
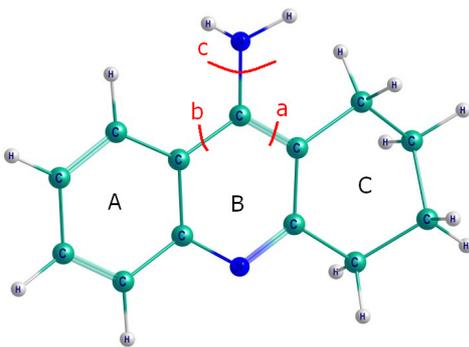


Figura 3. Mecanismo proposto para hidrólise da ACh pela AChE.¹⁹

Algumas drogas atuam como inibidoras da AChE, dentre elas, a tacrina (THA)^{7,19,24} primeiro fármaco aprovado pelo FDA para o tratamento da DA, seguida pelo donepezil (E2020)^{7,10}, pela rivastigmina (RIVA)^{7,10} e pela galantamina (GALA).¹⁰ Outras drogas foram estudadas e testadas clinicamente para serem usadas no tratamento da DA, como a fisostigmina (PHYSO).¹⁴ Algumas outras estão em fase de teste e são candidatas promissoras a aprovação, entre elas, huperzina A (HUPE)^{19,21}, metrifonato (METRI)¹⁰, diclorvos (DDVP)¹⁰, fenserina (PHEN)¹⁰ e dímero da tacrina (DIMTHA).²⁵ Essas drogas são indicadas para o tratamento nas fases leve e moderada, quando o paciente ainda tem atividade cognitiva independente.

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

A tacrina (Figura 4), aprovada para o tratamento de pacientes com DA em 1993,^{26,27} é um derivado da acridina, (1,2,3,4-tetraidro 9-acridinamina) sintetizada em 1945, atuando primeiramente como agente antimicrobiano e bloqueador da monoaminoxidase.²⁴ É comercializada sob os nomes Cognex[®] e Nivalin[®] sendo a detentora de sua patente a indústria farmacêutica Warner-Lambert. Essa droga é um inibidor reversível, não-competitivo e não seletivo para AChE. Tem alta hepatotoxicidade, farmacocinética lenta e alta incidência de efeitos colaterais.²⁷ Aumenta moderadamente a função cognitiva em pacientes com boa tolerância a ela. Embora não seja mais usada ainda é tida como droga de referência na busca de outras AChEIs,²⁴ análogos da tacrina ainda são estudados na busca de uma AChEI mais potente. Na Figura 4 está representada uma molécula de THA com pontos susceptíveis à modificação molecular.



Análogos da THA podem ser formados por:

1. Substituição ou anelação no anel A;
2. Substituição no grupo amino primário;
3. Contração ou expansão do anel C;
4. Substituição com heteroátomos nos anéis A/C;
5. Anelação de anéis no anel C;
6. Substituição no anel C.

Figura 4. Estrutura molecular da THA.

Estudos de “docking” molecular entre a THA e a AChE evidenciaram que a THA é reconhecida no sítio ativo da AChE pelo sítio aniônico por meio de interações hidrofóbicas; no sítio periférico da enzima por interações fracas do tipo van der Waals e transferência de carga via elétrons π ²⁴ e no sítio catalítico da AChE por ligação hidrogênio com o resíduo His440 da tríade catalítica, interação eletrostática do tipo “ π - π stacking” com os resíduos Trp84 e Phe330, mais especificamente forma um complexo de transferência de carga com o resíduo Trp84.²⁰

Em 1996 a segunda AChEI foi aprovada para o tratamento de DA, o donepezil, comercializado como Aricept[®] (Figura 5). Essa droga foi desenvolvida, sintetizada e avaliada pela indústria farmacêutica japonesa Eisai Co., para os quais foram utilizados estudos de reconhecimento molecular e a partir de estudos de QSAR, mesmo antes da determinação da estrutura tridimensional da AChE.²⁸

O donepezil ((R,S)1-benzil-4-[(5,6-dimetoxi-1-oxoindanon)-2-yl]-metil] piperidina) é uma droga da família das N-benzilpiperidinas. É uma AChEI altamente seletiva ligando-se reversivelmente e de forma não-competitiva à AChE.^{7,28,29} O uso desse medicamento resulta em melhoras significativas comparando-a à THA, no tratamento da DA leve e moderada.

Foi desenvolvido para superar as desvantagens da THA. É bem tolerada pelo organismo, apesar de causar efeitos colaterais característicos das AChEIs como náusea, diarreia, constipação, dor de cabeça, tonturas, distúrbios do sono e complicações estomacais.¹⁰

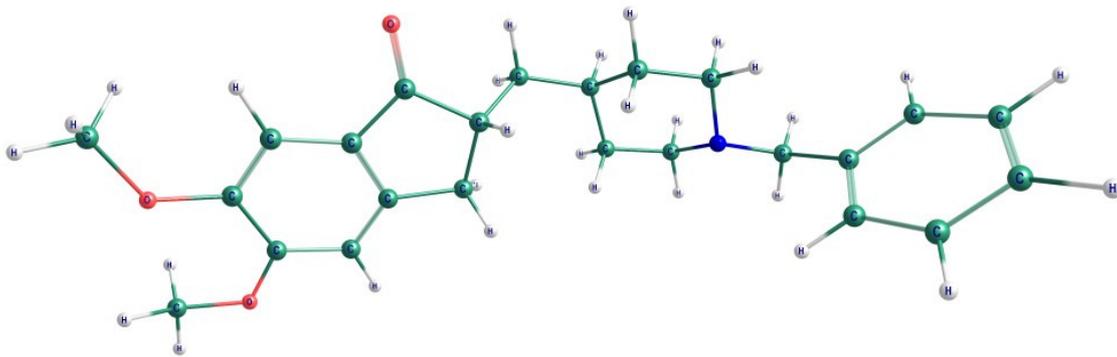


Figura 5. Estrutura molecular da E2020.

Estudos de reconhecimento molecular realizados a partir da estrutura cristalina do complexo AChE-E2020 mostraram que a AChEI interage com resíduos dos sítios aniônicos e periférico da enzima e não diretamente com a tríade catalítica. Similarmente à THA, o anel benzênico da E2020 faz interação eletrostática do tipo “ π - π stacking” com o resíduo Trp84. A E2020 faz várias ligações de hidrogênio dentro do sítio ativo da AChE com moléculas de água estruturais presentes durante sua presença dentro do GORGE.²⁹ Os oxigênios dos dois grupos metoxi fazem interação π - π clássica com o resíduo Trp279 da AChE.²⁹ Todas as formas enantioméricas deste inibidor mostram o mesmo perfil de seletividade, pois se interconvertem rapidamente em solução aquosa via intermediário cetoenólico, existindo, portanto como uma mistura racêmica.²⁶

A terceira AChEI utilizada no tratamento de DA foi a fisostigmina (PHYSO) (Figura 6), um alcalóide natural, pertencente ao grupo dos carbamatos, extraído dos feijões de uma leguminosa nativa do oeste africano conhecida como feijão-de-Calabar (*Physostigma venenosum*).²⁷ Era utilizada por tribos africanas para dar o veredicto em julgamentos de crimes, caso o criminoso ao tomar uma dose do extrato morresse ele era considerado o

autor do crime do qual estava sendo acusado. Sua estrutura foi determinada em 1925.¹⁹ Foi a primeira AChEI estudada clinicamente para ser aplicada no tratamento da DA.¹⁴

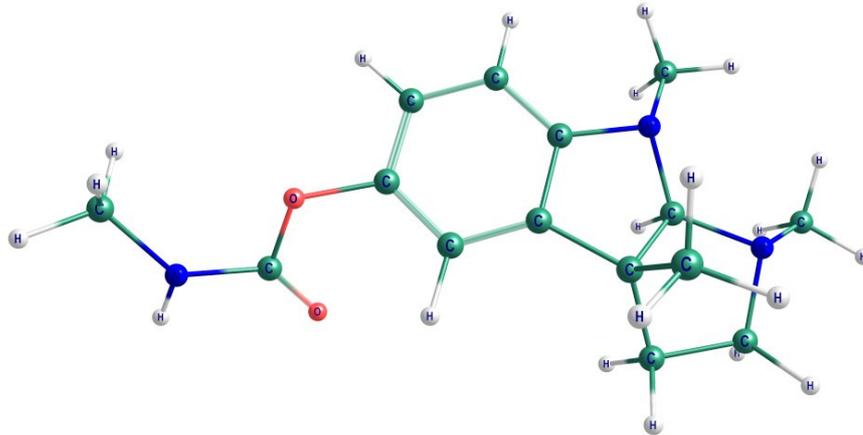


Figura 6. Estrutura molecular da PHYSO.

É seletiva, pseudo-irreversível, para AChE por se complexar ao seu resíduo Ser200 e formar uma ligação pseudo-covalente com o átomo de oxigênio da sua hidroxila. A PHYSO durante os estudos clínicos apresentou baixo índice terapêutico, baixo tempo de meia-vida e biodisponibilidade variável. Apesar de proporcionar melhora da cognição dos pacientes, essa droga foi rejeitada pelo FDA devido a sua baixa eficiência em longo prazo nas fases clínicas II e III.^{7,27} Porém, é uma droga usada ainda hoje para tratar glaucoma, comercializada com o nome de Antilirium[®]. A exemplo da THA, apesar de não ser mais usada no tratamento para DA a PHYSO é objeto de referência no desenvolvimento de novos análogos para o tratamento da DA.

Em meados de 1998 foi aprovada na Europa a rivastigmina (RIVA) (Figura 7) droga derivada da fisostigmina por modificações moleculares. É uma AChEI seletiva e pseudo-irreversível como a PHYSO, porém tem menor seletividade do que sua geradora.^{10,14,26}

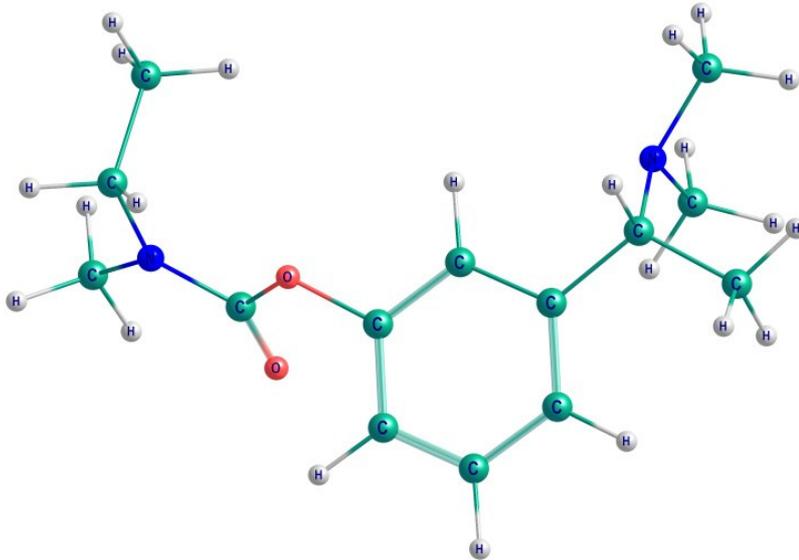


Figura 7. Estrutura molecular da RIVA.

A rivastigmina, diferente da fisostigmina, apresentou perfil farmacológico superior, com boa seletividade e bioatividade considerável in vivo, boa tolerância por parte dos pacientes, propriedades neuroprotetoras e melhora na cognição dos pacientes durante as fases de testes clínicos. Foi aprovada pelo FDA no ano 2000.^{10,14,26} e é comercializada com o nome de Exelon[®], um dos fármacos mais indicados hoje no tratamento de pacientes com DA.

A RIVA é considerada uma AChEI pseudo-irreversível por se complexar à AChE no reconhecimento molecular, carbamilaando a enzima no oxigênio da hidroxila do resíduo Ser200, formando uma ligação covalente com distância de ligação da ordem de 1,39 Å que é lentamente desfeita (descarbamilação). Além da carbamilação, a RIVA interage com os resíduos Trp84 e PheF330.³⁰

A terceira AChEI aprovada pelo FDA para o tratamento da DA foi a galantamina (GALA) (Figura 8). É um alcalóide encontrado em várias plantas da família das *amaryllidaceae*, particularmente numa planta nativa da região do Cáucaso europeu chamada “snow drop”.^{10,28} Foi descoberta acidentalmente por um farmacêutico búlgaro em 1950. O extrato dessa planta era utilizado para tratar dores dos nervos, poliomielite, e usado como anestésico.³¹

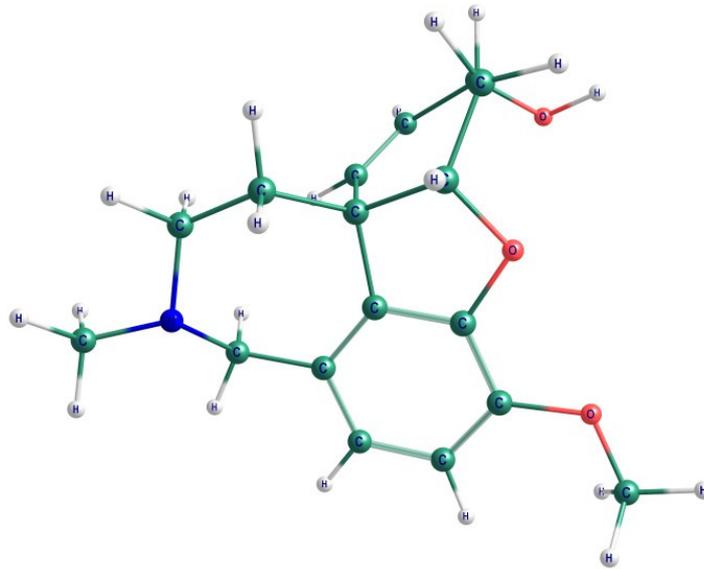


Figura 8. Estrutura molecular da GALA.

Além de ser um inibidor seletivo, competitivo e reversível da acetilcolinesterase é modulador alostérico dos receptores nicotínicos cerebrais, musculares e gangliais.³² Tendo atividade diferenciada sob o sistema nervoso central, facilidade para penetrar a barreira hematoencefálica, boa biodisponibilidade, boa tolerância do organismo, foi aprovada em 2001 para o tratamento da DA por promover melhoras significativas na cognição e outros sintomas não-cognitivos nos pacientes. É comercializada com o nome de Reminyl[®].³²⁻³⁴ A GALA interage com os resíduos do sítio ativo da AChE, principalmente Ser200 e Phe330 por ligações de hidrogênio e com o Trp84 por interações do tipo π - π .²⁸

A fenserina (PHEN) (Figura 9) é um fenil carbamato análogo da fisostigmina. É uma AChEI altamente seletiva e pseudo-irreversível.⁹ Está na fase I dos testes clínicos e é uma promessa por ter janela terapêutica relativamente larga em comparação às outras AChEIs.

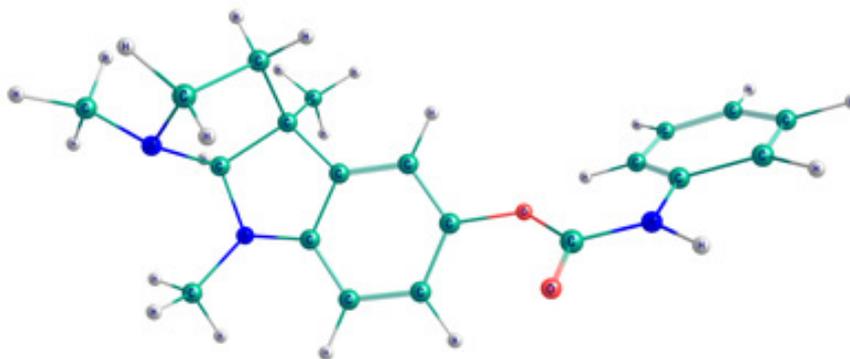


Figura 9. Estrutura molecular da PHEN.

Em estudos pré-clínicos a PHEN apresentou baixa toxicidade, alta biodisponibilidade e acentuada potência na melhora das funções cognitivas, quando comparada com a THA e a PHYSO.¹⁰

A (\pm) huperzina A (HUPE) (Figura 10) é um alcalóide natural obtido da *Huperzia serrata*, planta muito utilizada pela medicina chinesa. É um potente inibidor reversível da AChE³⁵ com potencial para o tratamento de DA, considerando sua ação prolongada sobre o SNC, baixa toxicidade, além de ação protetora sobre os neurônios contra o excesso de glutamato que pode causar a morte das células nervosas.^{14,26}

Está sendo utilizada nos EUA como suplemento alimentar (extrato seco). Como ainda não tem rota sintética definida para ser produzida em larga escala, a busca por análogos tem sido intensificada. Alguns de seus análogos mostraram ser 8 vezes mais potentes que a HUPE.¹⁴

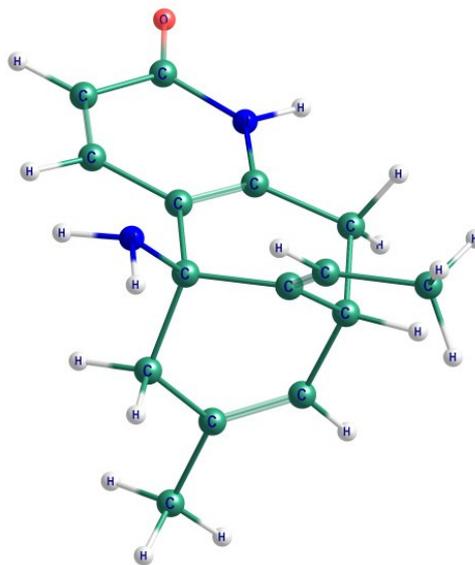


Figura 10. Estrutura molecular da HUPE.

Em estudo de “docking” realizado por Raves (1997) e colaboradores é mostrado que a HUPE tem reconhecimento molecular com a AChE por meio de interações do tipo $\pi-\pi$ com os resíduos Trp84 e Phe330, além da ligação de hidrogênio com o resíduo His440.³⁵

Os compostos organofosforados foram estudados a partir da década de 1920 como poderosos inibidores irreversíveis da AChE. O primeiro deles foi o gás Sarin, utilizado como arma química em guerras.¹⁹ A única droga da classe dos organofosforados estudada como potencial AChEI para o tratamento de pacientes de DA é o metrifonato

(METRI) (Figura 11), uma “pró-droga” não ativa, utilizada inicialmente como anti-helmíntico, que quando metabolizada produz o metabólito ativo 2,2-diclorovinil dimetilfosfato (DDVP) (Figura 9).¹⁴

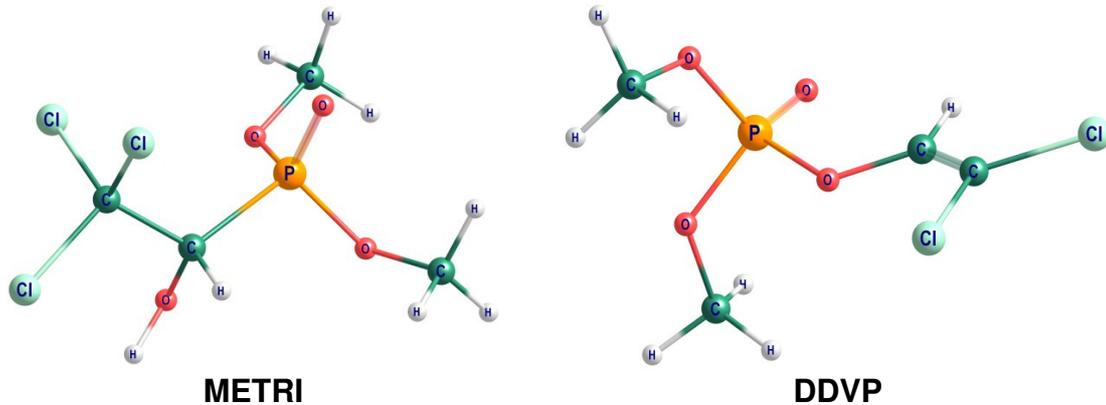


Figura 11. Estrutura molecular da METRI e DDVP.

Quantidades mínimas de DDVP são suficientes para inibir efetivamente a AChE por um longo período de tempo. Estudos pré-clínicos realizados em ratos mostraram melhora significativa na cognição e boa tolerância. Quando testado em humanos, já na fase III dos testes clínicos, os resultados obtidos nos estudos pré-clínicos foram confirmados. Porém, alguns dos efeitos colaterais advindos do uso do metrifonato, como fraqueza muscular e insuficiência respiratória em alguns pacientes levaram os pesquisadores a abandonarem os estudos com estes compostos.

Na busca por drogas mais eficientes tanto para a melhora da função cognitiva dos pacientes quanto na redução de efeitos colaterais, várias outras têm sido obtidas a partir de drogas com conhecida eficiência. Este é o caso do dímero da tacrina (Figura 12), uma AChEI formada a partir de duas unidades da THA ligadas por um esqueleto carbônico de unidades de $(CH_2)_n$, na qual, para $n=7$ o composto formado tem maior seletividade para a AChE.²⁵

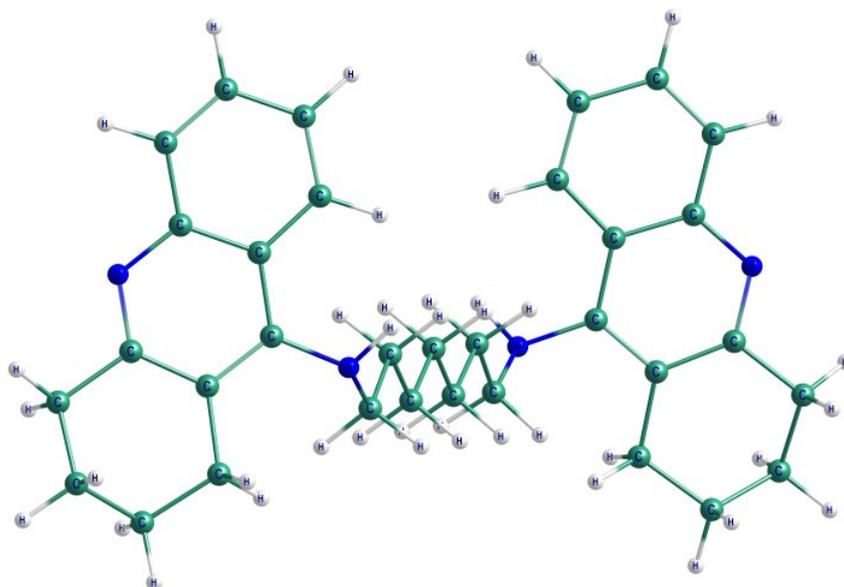


Figura 12. Estrutura molecular da DIMTHA.

Estudos de “docking” realizados por Rydberg e colaboradores (2006) mostraram que o DIMTHA interage com a AChE em todo seu sítio ativo. No sítio aniônico é observado empilhamento entre os anéis das unidades da THA com os anéis dos resíduos Trp84 e Phe330. Nas interações com o sítio periférico também é observado o empilhamento entre os anéis da outra unidade de THA e os anéis dos resíduos Trp279 e Tyr70. Durante o reconhecimento molecular do DIMTHA foi observado um rearranjo na estrutura da tríade catalítica da AChE.²⁵

1.2 Objetivo

O objetivo deste trabalho é relacionar propriedades estruturais e eletrônicas de drogas, consideradas inibidoras da enzima acetilcolinesterase (AChE), com sua atividade, por meio de análise multivariada, buscando componentes principais (PCA) que evidenciem o perfil farmacofórico destas drogas. Desta forma, podendo contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos inibidores da AChE. Para isso, estudos teóricos de estrutura eletrônica de diferentes drogas AChEIs, da interação dessas com a tríade catalítica SEH e com os resíduos do sítio ativo, GORGE, da AChE, por meio de simulação computacional foram realizados. Um fator importante para esta interação é o efeito do solvente, que foi estudado, com diferentes modelos de solvatação e níveis de cálculo quânticos.

CAPÍTULO 2

2.1 Metodologia e Referencial Teórico

Foram realizados cálculos no vácuo e em meio solvatado no nível *ab initio* e semi-empírico para determinação de parâmetros estruturais, espaciais e eletrônicos das AChEIs, bem como para análise das interações e as modificações ocorridas nas AChEIs quando interagindo com os diversos sistemas obtidos a partir da enzima acetilcolinesterase.

Os sistemas estudados foram:

1. AChEIs;
2. resíduos da tríade catalítica da AChE obtida de arraiais da espécie *Torpedo californica* - TcAChE (S200-E327-H440) com todas as AChEIs (SEH-AChEIs);
3. principais resíduos do sítio ativo da TcAChE (GORGE) envolvidos no processo de reconhecimento moléculas das AChEIs citados da literatura Asn65-Tyr70-Asp72-Ser81-Trp84-Gly117-Gly118-Gly119-Tyr121-Ser122-Gly123-Ser124-Tyr130-Glu199-Ser200-Trp279-Ser286-Phe288-Glu327-Phe330-Phe331-His440 com as AChEIs (GORGE-AChEIs).

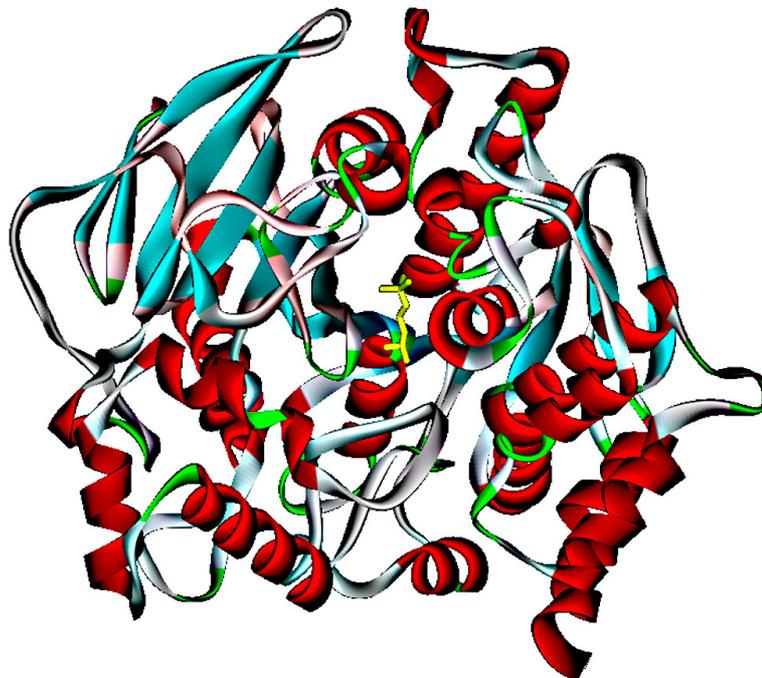


Figura 13. Estrutura 3D da TcAChE complexada com ACh (pdb:2ACE; 2,5 Å).³⁵

A estrutura 3D (Figura 13) da AChE está depositada no Protein Data Bank (PDB) com código de entrada 2ACE, quando complexada com a ACh. As estruturas 3D de algumas drogas complexadas à AChE também foram depositadas no PDB, dentre estas:

AChE-THA (PDB 1ACJ)²⁰, AChE-GALA (PDB 1DX6)²⁸, AChE-E2020 (PDB 1EVE)⁵⁷, AChE-DIMTHA (PDB 2CKM)²⁵, AChE-HUPE (PDB 1VOT)³⁵ e AChE-RIVA (1GQR)³⁰. Essas estruturas foram utilizadas para uma otimização inicial. As estruturas de fármacos que não foram resolvidas e depositadas no PDB foram construídas utilizando o programa GaussView, utilizando dados das estruturas propostas na literatura.

Os fármacos avaliados nesse estudo foram: Tacrina (THA), Donepezil (E2020), Galantamina (GALA), Fisostigmina (PHYSO), Dímero da Tacrina (DIMTHA), Rivastigmina (RIVA), Huperzina A (HUPE), Metrifonato (METRI), Diclorvos (DDVP) e a Fenserina (PHEN).

Para analisar a atividade das AChEIs avaliadas neste estudo, foram utilizadas propriedades eletrônicas e estruturais dos respectivos confôrmeros: dipolo, energia dos orbitais de fronteira (HOMO, HOMO-1, LUMO e LUMO+1), carga dos heteroátomos e dos hidrogênios mais ácidos, volume, distância entre os hidrogênios mais ácidos, tamanho da droga, LogP, LogS, número de receptores e doadores de hidrogênio (H_{recp} e H_{don}), quantidade de anéis aromáticos, GAP (LUMO-HOMO) e o Mapa de Potencial Eletrostático (MEP). Todas estas propriedades foram determinadas para cada AChEI, utilizando diferentes métodos quânticos. O modelo ChelpG foi utilizado para os cálculos das cargas.

As propriedades eletrônicas não são descritas por meio de mecânica molecular, devido a forma como este método avalia o problema de sistemas moleculares, avaliando as equações de movimento e dinâmica newtoniana, que negligenciam a contribuição dos elétrons nas propriedades moleculares.

Para obter o perfil farmacofórico das AChEIs envolvidas nesse estudo utilizou-se o método de análise multivariada para traçar os componentes principais (PCA), a partir das propriedades estudadas. O PCA permite que de um sistema complexo de propriedades seja obtido uma visão das contribuições principais, ou seja, permite reduzir o espaço original das variáveis. O PCA é bastante útil quando o objetivo final é prever a partir de várias amostras e propriedades, como estas amostras se assemelham com relação as suas variáveis. Foram avaliadas as propriedades, com maior peso para a atividade dos compostos conhecidos como AChEIs.

Os estudos teóricos para determinar os parâmetros estruturais e eletrônicos foram realizados por meio dos programas Gaussian 03,³⁶ Mopac 2000,³⁷ LocalSCF,³⁸ CAChe,³⁹ e OSIRIS.⁴⁰ Os estudos PCA foram realizados com o programa MATLAB[®].⁴¹

Para a otimização da geometria e o estudo de estrutura eletrônica tanto das AChEIs quanto do sistema SEH-AChEIs foram realizados cálculos em nível *ab initio* com os métodos RHF e DFT, este último usando o funcional híbrido B3LYP, empregando as

funções de base 6-31G* e 6-31+G(d,p) (com a adição de funções de polarização e difusa). Todos os sistemas foram estudados no vácuo e solvatados com o modelo COSMO e CPMC.

Todas as geometrias dos fármacos foram otimizadas em coordenadas internas com otimização completa de todos os parâmetros geométricos.

Cálculos de frequência vibracional foram utilizados para acompanhar o mínimo de energia das geometrias obtidas, bem como correlacionar com dados experimentais com o método RHF, empregando a função de base 6-31G*.

Os cálculos foram realizados no Laboratório de Química Computacional do IQ-UnB, que conta atualmente com um *cluster* de microcomputadores com disponibilidade para este estudo e no Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho (CENAPAD) de São Paulo localizado na Universidade de Campinas.

2.2 Métodos

Com o advento da teoria quântica no início do século XX, a forma como a matéria passou a ser tratada mudou drasticamente. Os átomos, constituintes básicos das moléculas, foram definidos possuindo núcleo e elétrons. Com o desenvolvimento de ferramentas computacionais (hardwares e softwares) é possível, hoje, tratar sistemas moleculares complexos utilizando métodos aproximados da teoria quântica.

A mecânica quântica considera que a energia de uma molécula pode ser descrita como sendo um somatório de termos energéticos resultantes das interações eletrostáticas entre as entidades que compõem seus átomos: núcleos e elétrons (energia cinética e potencial).

O postulado fundamental da mecânica quântica diz que existe uma função de onda para cada sistema químico, onde um operador matemático pode ser aplicado a esta função resultando em propriedades observáveis desse sistema. A Equação 1 é o foco de estudo dos métodos quânticos para estudo de sistemas químicos e é conhecida como equação de Schrödinger, independente do tempo e sem correções relativísticas;

$$H\Psi = E\Psi \quad (1)$$

no qual, H é um operador matemático que retorna a energia do sistema como um autovalor chamado de operador Hamiltoniano. A função de onda Ψ é que descreve o estado do sistema a partir das coordenadas das posições dos núcleos e dos elétrons, dos átomos da molécula. E o autovalor representa a energia total do sistema.⁴²

O operador Hamiltoniano, descrito na Equação 2, carrega informações a respeito das energias potenciais e cinéticas de um sistema atômico composto por N elétrons e M núcleos. Em unidades atômicas, esse operador assume a forma:

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

no qual i e j representam os N elétrons do sistema; A e B representam os M núcleos; Z é o número atômico; ∇^2 é o operador Laplaciano em função das coordenadas (x, y, z); r_{iA} , r_{ij}

e R_{AB} são respectivamente a distância entre o elétron i e o núcleo A , distância entre os elétrons i e j , e a distância entre os núcleos A e B .

Os primeiros dois termos do operador Hamiltoniano descrevem a energia cinética dos elétrons e dos núcleos, respectivamente. Os outros três termos refletem a interação Coulômbica entre as partículas carregadas eletricamente (potencial).

O quadrado da função de onda, Ψ^2 , fornece a densidade de probabilidade de um elétron ser encontrado dentro do espaço (x, y, z) e quando seu valor é multiplicado pela carga do elétron tem-se a densidade eletrônica, uma observável que pode ser obtida por meio de experimentos da difração de raio-X.⁴³

A equação de Schrödinger só pode ser resolvida analiticamente para um pequeno conjunto de sistemas contendo no máximo 1 elétron e um núcleo. Para resolver parcialmente o problema de sistemas multi-eletrônicos são utilizadas aproximações onde alguns termos do operador Hamiltoniano são considerados constantes ou nulos. A aproximação de Born-Oppenheimer⁴² leva em consideração que sendo os núcleos mais pesados e lentos que os elétrons, as contribuições energéticas relativas ao movimento dos núcleos podem ser desprezadas e o termo de repulsão entre os núcleos pode ser considerado constante. Assim, as contribuições cinéticas exclusivamente nucleares representadas no operador Hamiltoniano da Equação 2 (segundo termo) são eliminadas. O operador H é simplificado e passa ser chamado de operador Hamiltoniano eletrônico (H_{el}), que dá sequência ao surgimento da equação de Schrödinger eletrônica representada pela Equação 4,

$$H_{el} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (3)$$

$$H_{el} \Psi_{el} = E_{el} \Psi_{el} \quad (4)$$

A energia eletrônica total do sistema, $E_{el\text{total}}$, é dada pela soma da energia E_{el} mais a energia nuclear do termo de repulsão dos núcleos. A aproximação de Born-Oppenheimer não permite a solução exata de um sistema em estudo por considerar apenas as descrições eletrônicas.⁴²

O problema em sistemas de mais de dois elétrons consiste em tornar os elétrons entidades indistinguível quando descritos matematicamente, uma vez que a função de onda Ψ não tem qualquer correspondência física por si só. Ao se trocar a posição de dois elétrons quando se eleva Ψ^2 deve-se obter o mesmo valor, sempre, independente da

troca. Mas, como Ψ^2 representa a probabilidade de encontrar os elétrons dentro de um determinado volume, ao se integrar Ψ^2 , Ψ deve ser antissimétrica e normalizada como é exigido pelo princípio da exclusão de Pauli.

Outra aproximação desenvolvida na tentativa de solucionar a equação de Schrödinger para sistemas multieletrônicos é a aproximação de Hartree-Fock, dentro da aproximação de Born-Oppenheimer. Neste método, as funções das interações eletrônicas são trocadas por produtos de funções de um elétron (funções spin-orbital), respeitando o princípio da antissimetria de Pauli. Esse produto resulta num determinante denominado determinante de Slater, no qual cada elemento do determinante é uma função spin-orbital representado na Equação 5.⁴⁴

$$\Psi_{el}(1,2,\dots,N;R) = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \varphi_a(1;R) & \varphi_b(1;R) & \dots & \varphi_n(1;R) \\ \varphi_a(2;R) & \varphi_b(2;R) & \dots & \varphi_n(2;R) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \varphi_a(N;R) & \varphi_b(N;R) & \dots & \varphi_n(N;R) \end{vmatrix}, \quad (5)$$

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

Tomando,

$$\sum J_\ell(1) + K_\ell(1) = v^{HF}(1), \quad (6)$$

$$J_\ell(1)\varphi_i = \left[\int \varphi_\ell^*(2) \frac{1}{r_{12}} \varphi_\ell(2) dr_2 \right] \varphi_i, \quad (7)$$

e

$$K_\ell(1)\varphi_i = \left[\int \varphi_\ell^*(2) \frac{1}{r_{12}} \varphi_\ell(2) dr_2 \right] \varphi_\ell, \quad (8)$$

o termo $v^{HF}(1)$ é o potencial médio que atua sobre o i-ésimo elétron na presença dos demais elétrons, representa uma aproximação para o comportamento do elétron 1 sob a ação do campo gerado pelos outros elétrons. O termo $J_\ell(1)$ é o termo coulômbico ou o

potencial coulômbico médio sentido pelo elétron 1 e representa a média do potencial total proveniente dos demais spin-orbitais atuando sobre o elétron 1 no spin orbital φ_1 . O termo $K_\ell(1)$ é um termo de natureza quântica, denominado termo de troca.

A equação de Hartree-Fock (HF) é uma equação de autovalor definida da seguinte forma

$$F(1) \varphi_i(1;R) = \varepsilon_i \varphi_i(1;R) \quad (9)$$

onde, F é o operador monoelétrônico de Fock dado pela Equação 10,

$$F(1) = h(1) + \sum [2 J_\ell(1) + K_\ell(1)] \quad (10)$$

O desafio em solucionar a equação HF está na resolução analítica das integrais multi-eletrônicas constantes dos sistemas com mais de um elétron.

O método do campo auto-consistente (self consistent Field, SCF) é utilizado para resolver as equações de Fock, enquanto que a aproximação LCAO (linear combination of atomic orbitals) é a forma analítica usada para resolver a função de onda do sistema.

Para resolver a Equação 9 pelo método SCF é feita a escolha prévia de um conjunto de orbital de spin-orbital $\varphi_i^{(0)}$. Esta solução gera um novo conjunto de spin-orbitais $\varphi_i^{(1)}$ que são então novamente aplicados à Eq. 9 gerando novo conjunto de spin-orbitais $\varphi_i^{(2)}$, que são aplicados novamente à mesma equação, de forma iterativa, até que seja encontrado um valor que convirja a densidade eletrônica e/ou a energia do sistema.⁴⁴

A aproximação LCAO é usada para resolver a Eq. 9 de maneira mais rápida. Proposto por C. J. Roothaan, este método é conhecido como Hartree-Fock-Roothaan. Neste método os orbitais moleculares são representados por uma combinação linear dos orbitais atômicos. Dessa forma, cada spin-orbital é expandido como sendo um conjunto de funções conhecidas. Essas funções são chamadas funções de base ($g_v(\mathbf{r})$):

$$\phi_p(\mathbf{r}) = \sum_{v=1}^{\text{funções de base}} C_{vp} g_v(\mathbf{r}) \quad (11)$$

em que, C_{vp} são os coeficientes das N funções de base a serem determinados. Assim, em princípio, a resolução da equação HF permite serem encontrados resultados próximos da

solução exata da equação de Schrödinger, desde que seja utilizado um número muito grande de funções de base. As funções mais utilizadas para estudos de sistemas moleculares são as funções do tipo gaussianas, que são definidas pela Equação 12 como:

$$g(x,y,z) = N x^l y^m z^n e^{-\alpha r^2} \quad (12)$$

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

Ao aplicar as aproximações de Hartree-Fock e LCAO simultaneamente na equação de Schrödinger, é obtida a equação de Roothaan-Hall na forma matricial:⁴²

$$\mathbf{F} \mathbf{C} = \mathbf{S} \mathbf{C} \boldsymbol{\epsilon} \quad (13)$$

em que, $\boldsymbol{\epsilon}$ é uma matriz diagonal que contém as energias dos orbitais, \mathbf{S} é a matriz de superposição, \mathbf{C} é a matriz dos coeficientes e \mathbf{F} é a matriz de Fock.

A Equação 14 mostra a matriz de Fock em termos de unidades atômicas, o primeiro termo corresponde à energia potencial e cinética dos elétrons individualmente, enquanto o segundo termo gera as interações intereletrônicas:

$$F_{\mu\nu} = (\phi_\mu \left| -\frac{1}{2} \nabla^2 - \sum_A \frac{Z_A}{r_A} \right| \phi_\nu) + \sum_{\lambda} \sum_{\sigma}^{f. \text{ base } f. \text{ base}} P_{\lambda\sigma} \left[(\phi_\mu \phi_\nu \left| \phi_\lambda \phi_\sigma \right. - \frac{1}{2} (\phi_\mu \phi_\lambda \left| \phi_\nu \phi_\sigma \right. \right] \quad (14)$$

A matriz de densidade é o termo \mathbf{P} e pode ser definida como o quadrado dos coeficientes dos orbitais moleculares (OMs) somado em todo o espaço que eles ocupam:

$$P_{\lambda\sigma} = 2 \sum_i^{OMs} C_{\lambda i} C_{\sigma i}^* \quad (15)$$

O método SCF é utilizado na solução da equação de Roothaan-Hall para a determinação da energia do conjunto de bases infinito. As energias obtidas não representam a energia total do sistema, mas boa parte da energia eletrônica. Esses métodos negligenciam uma pequena parte da energia de repulsão eletrônica, gerada pelo movimento dos elétrons do sistema, a essa energia dá-se o nome de energia de

correlação eletrônica. Portanto, a energia exata do sistema é dada pela soma das energias obtidas pelos métodos que resolvem a equação de Hartree-Fock e a energia de correlação eletrônica,

$$E_{\text{exata}} = E_{\text{correlação}} + E_{\text{HF}}. \quad (16)$$

Buscando encontrar valores mais precisos para as energias dos sistemas estudados nesse trabalho, optou-se, também, por estudar os sistemas AChEIs e SEH-AChEIs por meio da teoria do funcional de densidade (DFT), através do funcional híbrido B3LYP. Este funcional inclui uma mistura do termo de troca Hartree-Fock com troca-correlação DFT.

A DFT é um dos métodos mais utilizados na atualidade para o estudo de estrutura eletrônica de sistemas condensados moleculares. Diferente do método Hartree-Fock, a DFT inclui no seu escopo um termo para a energia de correlação eletrônica. Kohn e Sham deram uma nova roupagem à DFT e os resultados de cálculos obtidos com a DFT em muitos casos são mais próximos dos dados experimentais do que os resultados de cálculos HF. Além de proporcionar um valor de energia mais representativo, a DFT ainda proporciona maior velocidade na realização dos cálculos frente a outros métodos que calculam a energia de correlação eletrônica de sistemas multieletrônicos⁴² desde que o funcional não seja híbrido.

A DFT relaciona os estados de energia mínima de um conjunto de elétrons sob a influência de um campo elétrico externo (Coulômbico) em função da densidade eletrônica do sistema.

A energia calculada pela DFT inclui além dos termos avaliados pela energia HF uma redefinição da energia de troca HF por um funcional de troca, e adiciona um funcional de correlação para a energia de correlação. A função de onda do estado fundamental de um sistema e as propriedades consequentes deste estado são, então, funções da densidade eletrônica, uma observável.

O funcional híbrido B3LYP foi proposto por Stephens et al. em 1994. Neste funcional é usado o termo não-local de correlação dada pela expressão de Lee, Parr e Yang⁴⁵ dependente da densidade eletrônica $\rho(r)$ e o funcional VWN para correlação local modificado também dependente de $\rho(r)$.

A obtenção das cargas dos átomos de um sistema é uma importante variável no estudo de estrutura eletrônica. Para o estudo das cargas foi empregado o método CHELPG que apresenta menor dependência da função de base.

O CHELPG (Charges from Electrostatic Potential Grid Based) é um método que deriva as cargas por meio do potencial eletrostático do sistema. Foi proposto por Breneman e Wiberg em 1990 definindo as cargas a partir de uma malha na qual a molécula ou o sistema em estudo é colocado, considera apenas os pontos que estejam distantes até 2,8 Å do raio de van der Waals dos átomos, assim as contribuições de carga de cada átomo do sistema são determinadas. Este método reproduz de maneira satisfatória o momento dipolar obtido pelos cálculos SCF.⁴³

2.3 Sistemas AChEIs, SEH-AChEIs e GORGE-AChEIs

Foram utilizados as aproximações AM1 e PM3 do método semi-empírico para otimização da geometria e o estudo de estrutura eletrônica tanto das AChEIs quanto do sistema SEH-AChEIs. Estes métodos também foram empregados na análise das interações dos sistemas SEH-AChEIs. Nestes cálculos, as cargas são determinadas pela distribuição de Mulliken, procedimento padrão do programa Mopac.

Os métodos semi-empíricos foram desenvolvidos na tentativa de associar a termodinâmica, cinética química, mecânica quântica e a teoria da ligação de elétrons de valência. Este método objetiva mesclar teoria com resultados experimentais na construção da superfície de energia potencial de um sistema. É uma ferramenta útil no estudo de sistemas moleculares de maior número de átomos, devido ao baixo custo computacional e a rapidez na execução das iterações de seus algoritmos. No caso de sistemas biológicos com milhares de átomos, o uso de hamiltonianos semi-empíricos é permitindo por métodos de escalonamento verdadeiramente linear (LocalSCF e MOZYME), onde é utilizada a localização de orbitais moleculares completos de enzimas, proteínas, DNA e etc.⁴²

Os métodos semi-empíricos de estrutura eletrônica surgiram com o intuito de reduzir o tempo computacional gasto no tratamento de sistemas moleculares com muitos átomos, onde o tratamento destes por métodos *ab initio* é na maioria das vezes, ainda, impossível. Reduz drasticamente o número de integrais bieletrônicas utilizadas na construção da matriz de Fock para os cálculos HF e considera somente, em princípio, explicitamente os elétrons de valência. A proposta feita por Pople em 1965⁴⁶ deu origem a três aproximações, o CNDO “Complete Neglect of Differential Overlap”, INDO “Intermediate Neglect of Differential Overlap” e NDDO “Neglect of Diatomic Differential Overlap”. Destes, o último é o mais aplicado, por meio das parametrizações, MINDO, MNDO, AM1, PM3 e PM5.

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

tipo Slater, e também fazem uso da teoria de orbitais moleculares para construir a função de onda molecular.⁴²

Neste trabalho, foram utilizados os métodos semi-empíricos AM1 e PM3 para análise qualitativa das interações dos sistemas SEH-AChEIs, GORGE-AChEIs. Todos os sistemas foram estudados no vácuo e solvatado com o modelo COSMO.

O método AM1 (Austin Model 1) é um derivado do MNDO, desenvolvido por Dewar et al. em 1985, onde a inclusão de funções do tipo Gaussianas esféricas, nas integrais de repulsão core-core, melhoraram significativamente os resultados das repulsões entre os átomos. No método MNDO, estas mesmas repulsões eram superestimadas. Com a implementação das funções Gaussianas, primeiramente nos átomos de C, H, O e N, foi possível descrever, de maneira confiável, as ligações de hidrogênio de sistemas biológicos. Depois o método foi parametrizado para os átomos de B, Si, S, F, Cl, Br, I, Hg, Zn.⁴²

O método PM3 (Parametric Method 3) foi um melhoramento, realizado por Stewart, da técnica de parametrização do AM1. O ponto forte do PM3 é a melhor concordância dos resultados das entalpias de formação, das geometrias e da energia de ionização. Os átomos parametrizados usando PM3 foram: H, C, Si, Ge, Sn, Pb, N, P, As, Br, O, S, Se, Te, F, Cl, Bi, I, Al, Be, Mg, Zn, Cd, Hg.⁴²

Os métodos semi-empíricos são implementados em muitos pacotes computacionais, inclusive muitos deles gratuitos. Isso tem ajudado a difundir seu uso em aplicações nos mais diversos campos.

As geometrias dos sistemas SEH-AChEIs e GORGE-AChEIs foram otimizadas também utilizando o método de escalonamento verdadeiramente linear LocalSCF, com as funções de onda dos métodos AM1 e PM3. Foram analisadas, qualitativamente, a energia de interação desses sistemas, para elucidar os mecanismos de reconhecimento molecular do mesmo em nível eletrônico.

Sistemas macromoleculares receptor-ligante (R-L) contêm uma quantidade de átomos que inviabiliza o cálculo teórico de suas propriedades eletrônicas e estruturais, por meio de métodos quânticos. O ideal para determinação dos mecanismos de reconhecimento molecular, é que os valores relativos a energia de interação R-L fosse obtidos por métodos puramente quânticos, nos quais os elétrons dos átomos são considerados durante os cálculos. O método LocalSCF permite, de forma, rápida a obtenção de alguns parâmetros envolvidos na interação R-L, utilizando orbitais moleculares localizados (LMOs) não-ortogonais expandidos num espaço finito.

O LocalSCF é um método quântico verdadeiramente linear que tem implementado os Hamiltonianos semi-empíricos das aproximações NDDO, MNDO, AM1, PM3 e PM5 nas bases sp, para estudar sistemas macromoleculares.³⁸

A função de energia do LocalSCF é obtido pela minimização dos LMOs não-ortogonais (diferentemente do MOZYME) por um funcional que emprega termos de correção de ortogonalização não explícitos, a Equação da energia é descrita por

$$E \approx E^0 - 2 \cdot \sum_{i \neq j} S_{ij} \cdot F_{ij} + \sum_{i \neq j} G_{ij} \cdot S_{ij}^2 \quad (17)$$

em que E^0 é o termo da energia dos LMOs, considerando-os estritamente ortogonais. F_{ij} e S_{ij} são as matrizes de Fock e de superposição respectivamente, nas bases dos LMOs i e j . O segundo termo é uma função penalidade para evitar o aumento da não-ortogonalidade dos LMOs durante os cálculos SCF. Os elementos da matriz G_{ij} são constantes e obtidos por meio de uma série de experimentos mantendo a convergência do SCF rápida e sem entraves.

No LocalSCF, os coeficientes dos LMOs em bases atômicas são obtidos pela solução iterativa do gradiente SCF, pela Equação 18

$$\frac{\partial E}{\partial C_{i\mu}} = 0 \quad (18)$$

onde $C_{i\mu}$ é o coeficiente linear do orbital de base atômica ϕ_m para o LMO ψ_i .

O funcional do LocalSCF é um método de aproximação variacional para otimizar coeficientes dos LMOs, fixados nos centros atômicos, por expansão finita controlada. O funcional de energia do LocalSCF não especifica como a expansão é obtida. Assim, várias estratégias podem ser usadas para manter a expansão dos orbitais o menor possível e ainda permitir a obtenção de propriedades moleculares com acurácia.

2.4 Solvatação dos sistemas moleculares: AChEIs, SEH-AChEIS e GORGE-AChEIs utilizando modelos contínuos de solventes.

O solvente tem papel importante na catálise e processo de reconhecimento molecular, sendo muitas vezes participante ativo da função biológica resultante. Moléculas de água são encontradas nas estruturas de Raios-x, obtidas de complexos receptor-ligante, mostrando a sua importância na interação da enzima com seu ligante. Assim, é importante levar em consideração as moléculas de água durante os estudos das interações de reconhecimento molecular.^{47,48}

A AChE, possui dentro do seu sítio ativo algumas moléculas de águas estruturais, que ajudam na catalise e no processo de reconhecimento da ACh. Algumas moléculas de água estruturais e outras classificadas como solventes exercem importante papel no reconhecimento molecular das AChEIs pela AChE, intermediando esse mecanismo por meio de ligações de hidrogênio entre os resíduos e os inibidores. Estima-se que 16 a 22 moléculas de água transitem pelo sítio ativo da AChE durante os processos de reconhecimento molecular tanto do substrato, a ACh, quanto de outros ligantes, sejam eles agonistas modificados ou antagonistas da AChE.¹⁷

Foram estudados os comportamentos dos sistemas moleculares AChEIs, SEH-AChEIS e GORGE-AChEIs utilizando modelos contínuos de solvente em água, considerando a constante dielétrica da água $\epsilon=78,4$ (25 °C). Para estudar a influência do solvente sobre as propriedades eletrônicas e estruturais das AChEIs foi utilizado o modelo CPCM com os métodos *ab initio* RHF/6-31G* e DFT B3LYP/6-31+G(d,p).

Para estudar a influência do solvente nas interações dos sistemas SEH-AChEIS e GORGE-AChEIs, considerando-se que todos possuem mais de 80 átomos, utilizou-se o modelo de solvatação COSMO para estudar a influência do solvente na geometria e energia de interação do macrossistema GORGE-AChEIs, obtidas com o método do LocalSCF com os modelos AM1 e PM3.

Modelos contínuos de solvente podem ser ferramentas úteis na modelagem de soluções líquidas que consideram o solvente como um meio contínuo de constante dielétrica uniforme ϵ . Foram utilizados neste trabalho os modelos de solvatação contínuo CPCM (Conductor-like Polarizable Continuum Model) e o modelo COSMO.

O modelo CPCM descreve o soluto de forma quântica, no qual se determina por diferenciação numérica o potencial da superfície, enquanto que de forma auto-

consistente, se integra o solvente junto com o potencial da superfície. A cavidade é definida considerando que as moléculas de soluto estão completamente dentro de um espaço, formado por esferas centradas nos átomos do soluto, ou num conjunto de átomos do soluto. A superfície é corrigida pela adição de outras esferas não centradas em átomos para simular a exclusão da superfície do solvente. Após esse procedimento a superfície é particionada em pequenos espaços denominados mosaico.⁴⁹ O modelo CPCM é utilizado para melhorar a energia livre de solvatação e a geometria das moléculas envolvidas em mecanismos de reações e interações químicas.

O método COSMO é um modelo de solvatação implícita, que representa a influência do solvente nas propriedades moleculares, considerando o solvente como um contínuo. Considera que o soluto é completamente envolvido pelo solvente, onde este último tem cargas livres. Essas cargas são distribuídas na superfície da cavidade, as quais são determinadas pela imposição de que os potenciais se cancelam nessa superfície.⁵⁰ Para realizar os cálculos do modelo CPCM foram utilizados os softwares Gaussian03 enquanto que para o modelo COSMO foi utilizado o software CAChe.

2.5 PCA

Para traçar os componentes principais, dos dados obtidos, foi utilizado o método de análise multivariada PCA. Foram avaliadas as propriedades com maior peso para a atividade dos compostos como potenciais AChEIs. A participação da interação droga-enzima foi estudada em todos os níveis de cálculo utilizados.

No estudo de sistemas químicos existem muitas variáveis, de natureza diversificada, desde propriedades externas a este sistema até as propriedades intrínsecas a ele. Porém, nem todas as variáveis geradas são relevantes para representar este sistema. Geralmente a escolha das variáveis importantes na representação de um sistema químico é baseada na experiência ou na intuição química, critérios subjetivos que podem desprezar variáveis importantes.⁵¹

Dessa forma, técnicas estatísticas são aplicadas aos estudos de sistemas químicos para obtenção mais precisa das propriedades que o represente, dentre estas está a técnica de análise multivariada – Análise de Componentes Principais – PCA, uma das técnicas mais empregadas na quimiometria para analisar conjuntos de dados contendo muitas variáveis. A PCA objetiva a redução do número de variáveis e a escolha linearmente independente das melhores propriedades para representar um determinado sistema (componentes principais).⁵²

Neste trabalho, todas as propriedades estruturais e eletrônicas das AChEIs estudadas, obtidas a partir da otimização em nível semi-empírico e *ab initio* com os métodos RHF e DFT (com funcional híbrido B3LYP) nas base 6-31+G(d,p), foram consideradas. As seguintes propriedades exaustivamente exploradas nos estudos de PCA são: dipolo, energia dos orbitais de fronteira (HOMO, HOMO-1, LUMO e LUMO+1), carga dos heteroátomos e dos hidrogênios mais ácidos, volume, distância entre os hidrogênios mais ácidos, LogP, LogS, número de receptores e doadores de hidrogênio (H_{recp} e H_{don}), quantidade de anéis aromáticos, GAP (LUMO-HOMO), tamanho da droga e área de superfície polar (PSA). Estas propriedades podem ser visualizadas como as coordenadas de pontos num espaço de dimensão 10 (número de AChEIs), em que cada eixo esta associado a uma propriedade (variável).

O estudo PCA foi realizado usando o método de autoescalamento, pois as propriedades eletrônicas e estruturais não têm a mesma escala de unidade. Foram gerados três componentes principais para o conjunto de dados.

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

Considerando um experimento químico realizado com m moléculas resultando em n propriedades, em estudos utilizando PCA o tratamento dos dados (\mathbf{D}) do sistema é feito considerando as n variáveis (propriedades) do sistema executadas sobre m objetos (moléculas) de maneira que é gerada uma matriz \mathbf{D} (Figura 14) formada por $m \times n$ elementos. A j -ésima variável é representada por um vetor coluna e o i -ésimo objeto é representado por um vetor linha, também chamado de vetor resposta e pode ser descrito por um ponto no espaço n -dimensional.

$$\mathbf{D} = \begin{bmatrix} d_{11} & d_{12} & d_{13} & \dots & d_{1j} & \dots & d_{1n} \\ d_{21} & d_{22} & d_{23} & \dots & d_{2j} & \dots & d_{2n} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \dots & \vdots & \dots & \vdots \\ d_{m1} & d_{m2} & d_{m3} & \dots & d_{mj} & \dots & d_{mn} \end{bmatrix}$$

Figura 14. Matriz de dados $m \times n$ elementos.

O principal objetivo da PCA é explicar a estrutura da variância e covariância de um vetor qualquer, composto de p -variáveis aleatórias por meio da combinação linear das n -variáveis originais, chamada de componentes principais (PCs).⁵³

De maneira simplificada, a PCA para duas variáveis X_1 e X_2 , é feita da seguinte forma:

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

$$e_1 = E_1 - \bar{E}_1 \quad (19)$$

e

$$e_2 = E_2 - \bar{E}_2 \quad (20)$$

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

No estudo PCA a idéia é criar novas variáveis, PC1, PC2, PC3, PCn-1, chamadas de componentes principais, que são funções lineares de e_1 e e_2 escritas da seguinte forma

$$PC_1 = a_{11}e_1 + a_{12}e_2 \quad (21)$$

e

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

de maneira que, a qualquer conjunto de valores dos coeficientes a_{11} , a_{12} , a_{21} e a_{22} , podem ser introduzidos N valores e_1 e e_2 e serão obtidos N novos valores PC_1 e PC_2 .³⁵

Assim,

$$\overline{PC_1} = \overline{PC_2} = 0 \quad (23)$$

$$\text{Var } PC_1 = a_{11}^2 S_1^2 + a_{12}^2 S_2^2 + 2 a_{11} a_{12} r S_1 S_2 \quad (24)$$

e

$$\text{Var } PC_2 = a_{21}^2 S_1^2 + a_{22}^2 S_2^2 + 2 a_{21} a_{22} r S_1 S_2 \quad (25)$$

onde,

$$S_i^2 = \text{Var } X_i \quad (26)$$

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

- i) O valor da variância (Var) da PC1 deve ser o maior possível.
- ii) Os N valores das PC1 e PC2 não se correlacionam.
- iii) $a_{11}^2 + a_{12}^2 = a_{21}^2 + a_{22}^2$.

Aplicando o exposto acima para o caso de P variáveis (e_1, e_2, \dots, e_p), cada PC é uma combinação linear das variáveis e . Ademais, todos os coeficientes desta combinação linear deverão satisfazer as três condições abaixo:⁵⁴

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

As PCs podem ser encaradas como eixos de máxima distribuição dos objetos. Podemos visualizar a disposição dos objetos nestes novos conjuntos de eixos. A figura formada pela projeção dos objetos nas componentes principais é denominada de gráfico de escores. Suas coordenadas são obtidas a partir do produto da matriz de dados pela matriz de autovetores. Se os dois ou três primeiros autovetores explicarem uma quantidade significativa da variância total, um gráfico de escores em que eles são as coordenadas pode mostrar projeções, acuradas, em poucas dimensões do espaço original de maior dimensão.⁵⁵⁻⁵⁶

CAPÍTULO 3

3.1 Resultados e Discussões

3.1.1 Estudo dos sistemas AChEIs, SEH-AChEIs e GORGE-AChEIS

Para compreender as interações entre as AChEIs e a AChE foram realizados estudos distintos de sistemas da AChE e das AChEIs. Análises qualitativas e quantitativas foram realizadas para obtenção de parâmetros geométricos e eletrônicos capazes de elucidar como ocorre a interação entre o receptor e o ligante.

As geometrias de sistemas com até 80 átomos (AChEIs) foram otimizadas utilizando-se os métodos semi-empíricos AM1 e PM3, os métodos *ab initio* RHF e DFT, com funcional híbrido B3LYP, ambos em duas funções de base a 6-31G* e 6-31+G(d,p). O efeito do solvente, água, sobre estes sistemas foi avaliado utilizando-se os modelos de solvatação CPCM para sistemas com até 80 átomos, e COSMO para todos os sistemas com mais átomos.

Para sistemas com até 150 átomos (SEH-AChEIs) foram realizados cálculos de otimização de geometria com todos os níveis citados. Para sistemas com mais de 80 átomos, porém foi utilizada somente a função de base menor, 6-31G*, devido ao tempo computacional gasto na realização destes cálculos. Por impedimentos de software, o único modelo de solvatação utilizado nas investigações sobre o comportamento dos sistemas maiores foi o COSMO, que é, via de regra, um modelo satisfatório para estudo de sistemas biológicos.

Os sistemas com mais de 150 átomos (GORGE-AChEIs) foram estudados à luz do método LocalSCF nos níveis semi-empíricos AM1 e PM3. O efeito do solvente sobre esses sistemas foi estudado com o modelo COSMO.

No sistema AChEI, a THA apresenta o menor número de átomos, 29, e o DIMTHA o maior número 77. Já para os sistemas provenientes da AChE o número de átomos componentes do sistema é maior, o sistema SEH possui 53 átomos, assim, os sistemas SEH-AChEIs têm entre 82 átomos (SEH-THA) e 130 átomos (SEH-DIMTHA). Foram considerados para o sistema GORGE-AChEIs, 25 aminoácidos, o que computa 431 átomos só para o GORGE, assim, o menor dos sistemas estudados foi o GORGE-THA (460 átomos) e o maior GORGE-DIMTHA (508 átomos).

Dentre esses sistemas foram observados as características estruturais, espaciais e eletrônicas das drogas com conhecido comportamento inibidor da AChE, bem como o comportamento destas em presença de água, através de modelos de solvatação COSMO e CPCM.

3.1.1.1 Otimização da geometria e estudo de estrutura eletrônica das AChEIs

Para avaliar o comportamento estrutural e eletrônico das AChEIs foram realizadas otimizações de geometria nos níveis AM1, AM1-Solvente, PM3, PM3-Solvente, RHF/6+31G*, RHF/6-31+G(d,p), RHF-Solvente/6-31G*, B3LYP/6-31G* e B3LYP/6-31+G(d,p) para todas as AChEIs. As tabelas constantes desta sessão mostram as principais modificações observadas nas estruturas otimizadas das drogas, bem como a localização dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO e o mapa de potencial eletrostático (MEP) para avaliação dos possíveis locais de interação entre as AChEIs e a tríade catalítica da AChE e também entre as drogas e o GORGE da AChE.

Para facilitar a leitura dos MEP das AChEIs é padronizado que as regiões de alta densidade eletrônica das superfícies de potencial sejam relacionadas a valores negativos na escala que acompanha cada imagem (representadas nesse trabalho pelo espectro de cores verde-vermelho). As regiões de baixa densidade eletrônicas são representadas pelo espectro de cores azul-verde.

DICLORVOS

A molécula de DDVP apresenta 4 graus de liberdade torsionais, localizados ao longo da cadeia principal da molécula e 4 regiões aceptoras de hidrogênio, localizadas nos seus 4 átomos de oxigênio (O2, O3, O4 e O5) (Figura 15(a)). O orbital de fronteira HOMO está localizado em boa parte da molécula, tendo maior representatividade nas regiões com alta densidade eletrônica, principalmente nas regiões onde se encontram os átomos mais eletronegativos (Cl, O e P) como pode ser visto na (Figura 15(a)). Os valores das energias dos orbitais de fronteira estão descritas na Tabela 1.

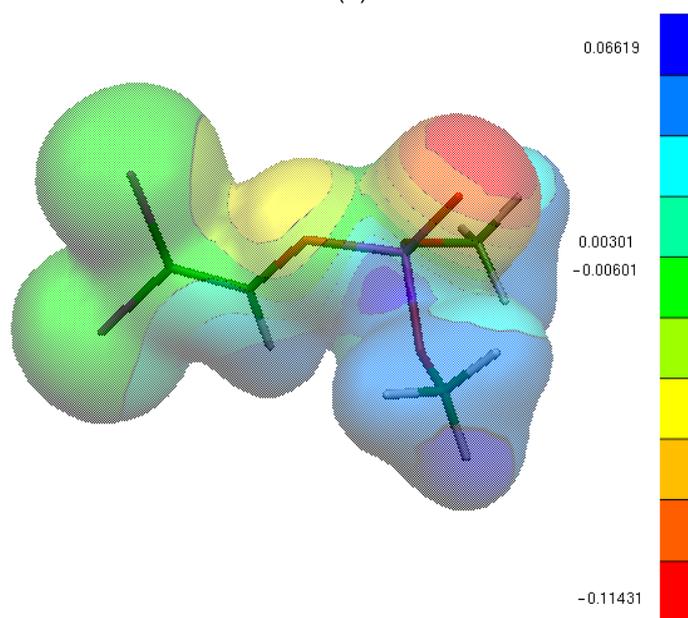
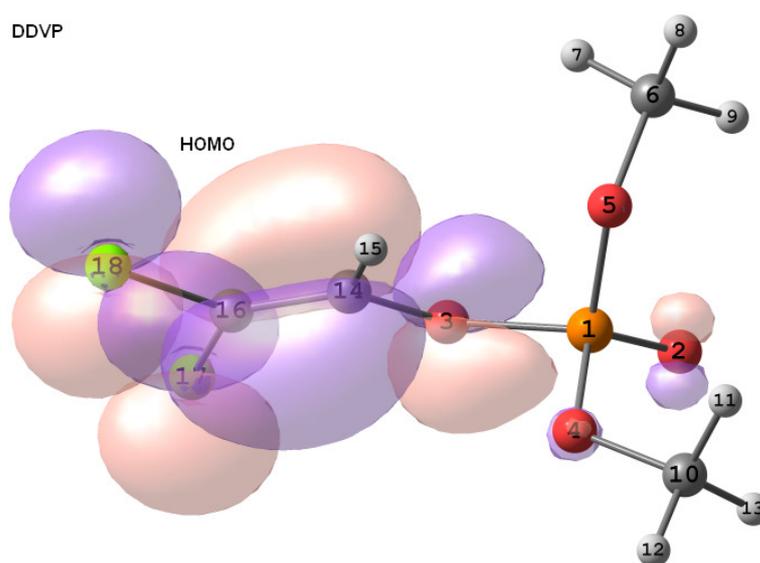


Figura 15. Estrutura otimizada (a) e MEP (b) do DDVP B3LYP/6-31G*.

As regiões de mais alta densidade eletrônicas estão localizadas sob os oxigênios, O2 e O3, ligados diretamente com o átomo de fósforo, isto sugere que estes dois átomos de oxigênio sejam receptores de hidrogênios e podem participar das interações do tipo ligação de hidrogênio com os aminoácidos da tríade catalítica da AChE ou mesmo ligações covalentes, com a hidroxila do Ser200, formando um éster estável.¹⁴ As regiões preenchidas pelos dois grupos metila mostram ter baixa densidade eletrônica. Podendo vir a interagir com regiões com alta densidade eletrônica do sítio ativo da AChE.

As principais modificações com relação à geometria de partida, construída com dados da literatura, na estrutura do DDVP observadas foram as variações nos ângulos torsionais de diedros H12O4P1Cl18 (-92,559°) e H12P1O5H8 (95,802°). A Tabela 1 mostra os valores para esses diedros em alguns níveis de cálculo.

Tabela 1. Principais propriedades estruturais e eletrônicas observadas na DDVP otimizada.

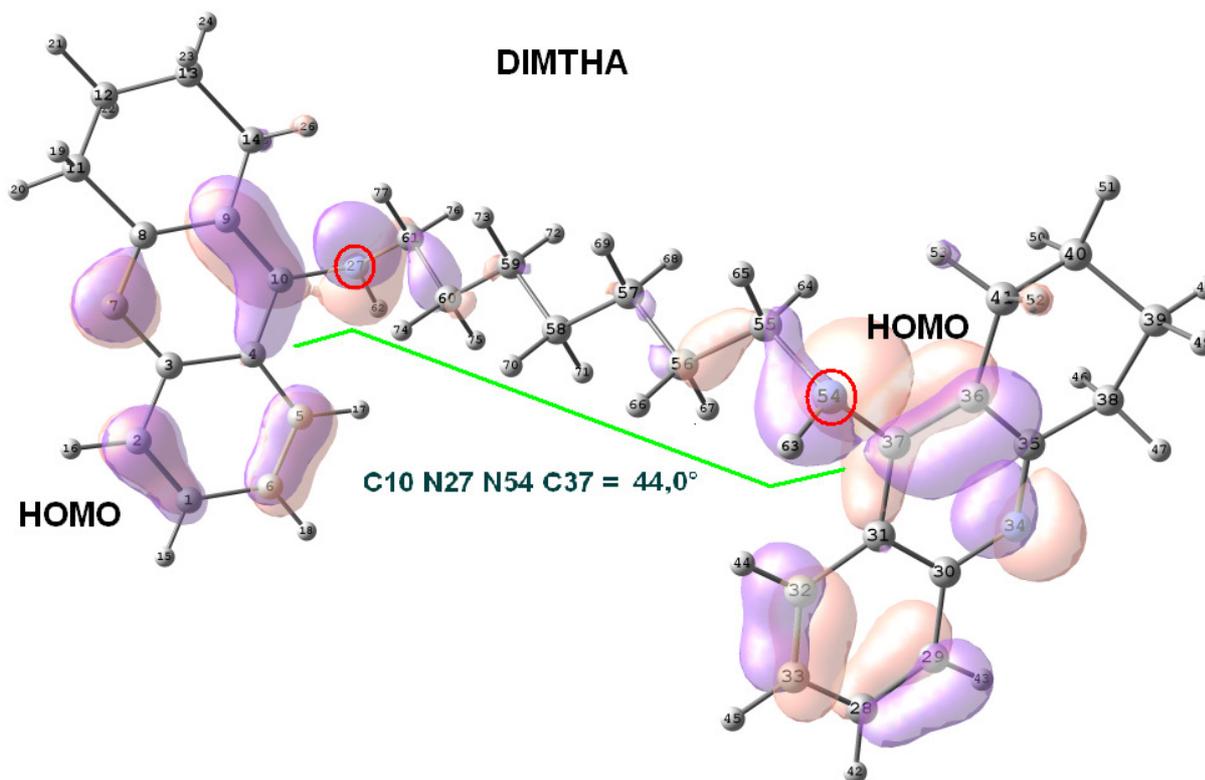
	AM1	AM1-S ^(a)	PM3	PM3-S ^(b)	RHF /6-31G*	RHF-S /6-31G* ^(c)	B3LYP/ 6-31G*
H12O4P1Cl18(°)	74,736	68,384	-57,512	42,921	-56,088	41,811	-168,669
H12P1O5H8(°)	47,879	-177,669	147,534	79,711	-147,935	72,687	-137,186
HOMO (eV)	-8,09	-9,81	-8,66	-8,99	-9,88	-9,79	-6,69
LUMO(eV)	-0,57	-0,01	-0,12	-0,26	4,18	4,15	0,19

(a) AM1-S: cálculo AM1 usando modelo de solvente COSMO. (b) PM3-S: cálculo PM3 usando modelo de solvente COSMO. (c) RHF-S: cálculo RHF usando modelo de solvente contínuo PCM

Os valores da energia dos orbitais de fronteira tanto nos cálculos semi-empíricos quanto nos cálculos RHF estão dentro da mesma faixa de valores (Tabela 1). Não foram observadas diferenças significativas entre os dados dos cálculos da molécula no vácuo e solvatada, nos níveis de cálculo realizados. Assim, o solvente parece não ter efeitos consideráveis nas propriedades do DDVP.

DÍMERO DA TACRINA

O dímero da tacrina (Figura 16(a)) é uma AChEI desenvolvida a partir da estrutura da THA. Tem o maior volume (607 Å³) e o maior tamanho (19,144 Å) entre as drogas estudadas.⁵⁷ Sua molécula apresenta quatro hidrogênios que podem ser doados e quatro átomos aceptores de hidrogênios (N7, N27, N34 e N54).



(a)

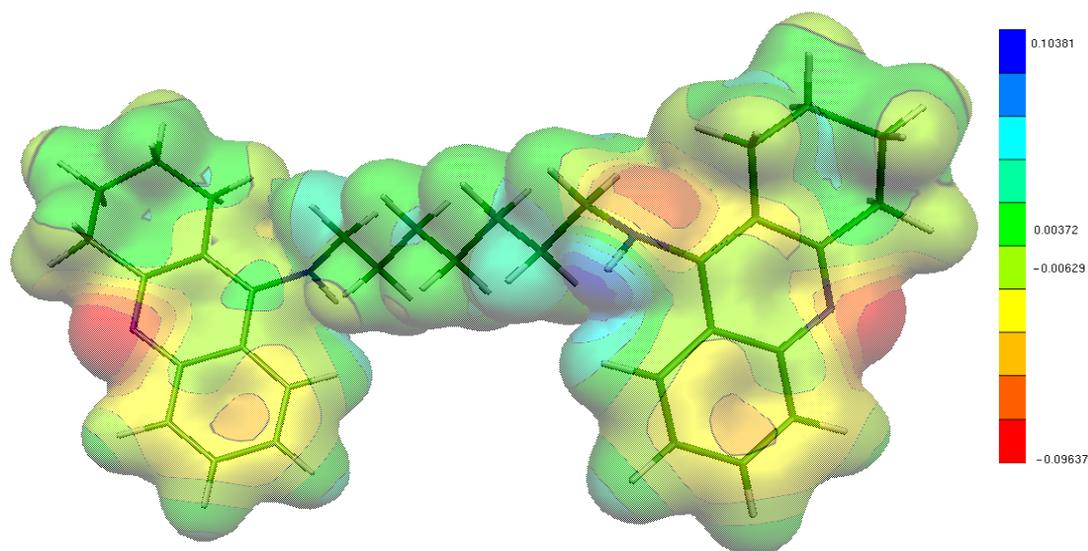


Figura 16. Estrutura otimizada (a) e MEP (b) do DIMTHA B3LYP/6-31G*.

Cálculos realizados no nível B3LYP/6-31G* permitiram analisar os orbitais de fronteira HOMO e LUMO, bem como os valores de energia atribuídos a eles (Tabela 2). Os dois orbitais de fronteira estão localizados nas regiões de alta densidade eletrônica da molécula (Figura 16(a) e 16(b)), principalmente nas regiõesceptoras e doadoras de hidrogênio (N7, N27, N54 e N34). Isto indica que o DIMTHA deve interagir com outras moléculas principalmente nestes pontos.

Os nitrogênios 27 e 54, circulados em vermelho na Figura 14 (a), têm a maior carga negativa da molécula (-0,63), diferenciando-se em menos de 0,08 das cargas dos outros dois nitrogênios. Desta forma, as regiões delimitadas por estes átomos podem ser os pontos principais de interações e ataques eletrofílicos de outras moléculas.

A principal modificação estrutural observada com relação a estrutura depositada do DIMTHA no PDB, sob o código 2CKM, em todos os níveis de cálculo é a modificação do diedro C37N54N27C10 (44,0°), chegando a variações de até 198° para outra direção, quando comparado com a geometria de partida. Para o caso da geometria obtida com os cálculos AM1-S. Esta molécula apresenta alto grau de liberdade torsional quando comparada com a THA, o que pode justificar uma variação tão alta neste ângulo de diedro.

Tabela 2. Principais propriedades estruturais e eletrônicas observadas na DIMTHA otimizada.

	AM1	AM1-S ^(a)	PM3	PM3-S ^(b)	RHF /6-31G*	RHF-S /6-31G* ^(c)	B3LYP/ 6-31G*
C37N54N27C10(°)	-153,403	-154,368	-132,533	-120,190	132,533	130,338	135,929
HOMO (eV)	-8,51	-9,12	-8,78	-9,26	-7,95	-8,04	-5,56
LUMO(eV)	-0,43	-0,44	-0,64	-0,54	2,57	-2,44	-1,11

(a) AM1-S: cálculo AM1 usando modelo de solvente COSMO. (b) PM3-S: cálculo PM3 usando modelo de solvente COSMO. (c) RHF-S: cálculo RHF usando modelo de solvente contínuo PCM

A presença de solvente afeta pouco a estrutura eletrônica desta AChEI, como pode ser observado nos dados da Tabela 2, o valor das energias dos orbitais HOMO E LUMO sofrem pouca variação quando comparados com os valores obtidos quando a molécula é considerada no vácuo. Mas a diferença entre o HOMO e o LUMO é o maior encontrado dentre as AChEIs.

E2020

O donepezil foi a segunda droga aprovada pelo FDA para o tratamento do mal de Alzheimer. É uma molécula que possui estrutura geométrica com 2 graus de liberdade torsionais e quatro regiões aceptoras de hidrogênio (N14, O24, O25 e O27), onde provavelmente acontecem muitas interações entre esta e os resíduos do sítio ativo da

AChE. Sua estrutura é dividida em três grandes grupos, um dimetoxindanona, uma piperidina e uma benzila.

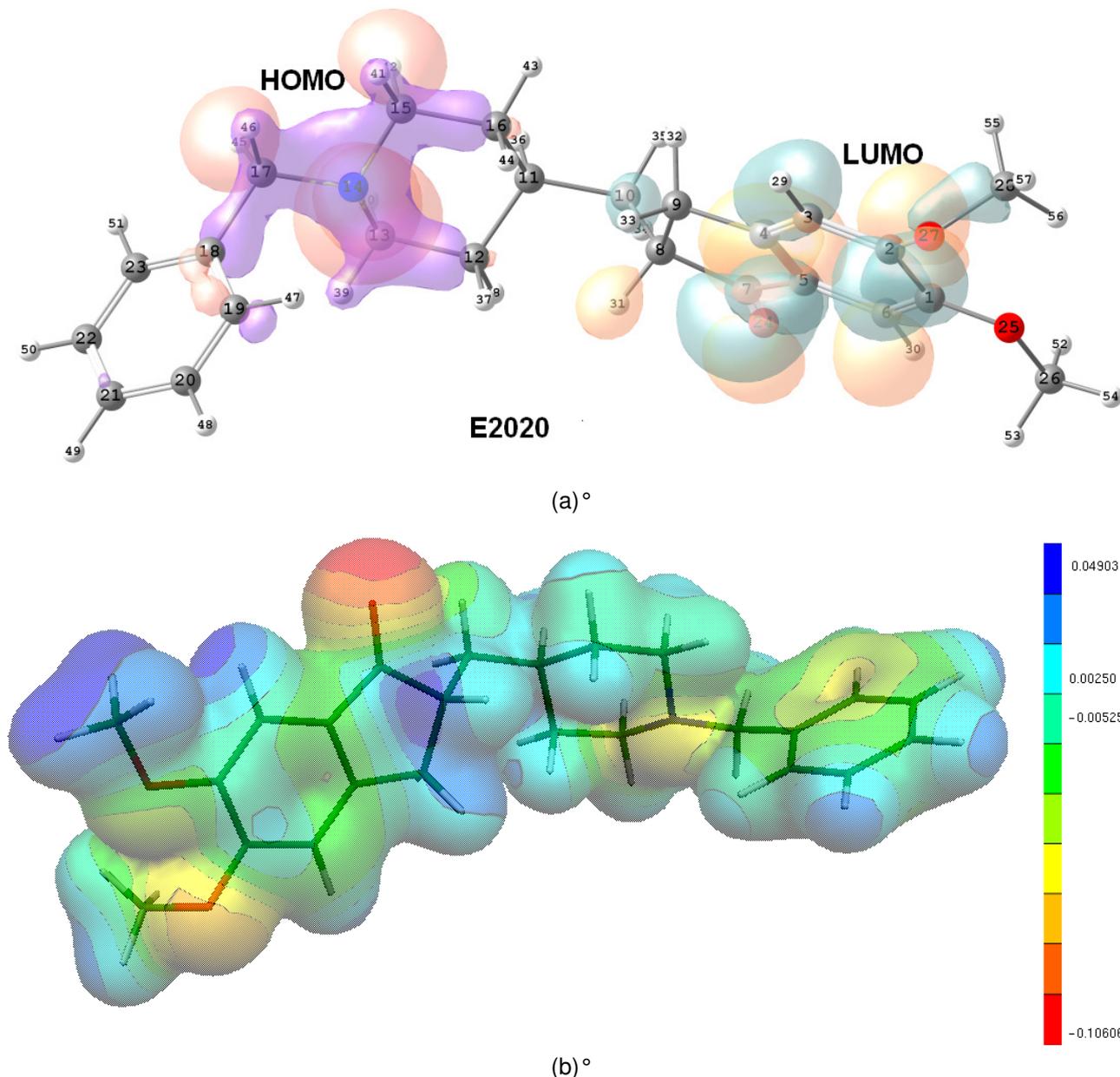


Figura 17. Estrutura otimizada (a) e MEP (b) do E2020 B3LYP/6-31G*.

Segundo os cálculos realizados no nível B3LYP/6-31G*, o orbital de fronteira HOMO (superfície sólida, Figura 17(a)) está localizado na piperidina da E2020. Já o orbital LUMO encontra-se distribuído por toda dimetoxindanona. Os valores de energia dos orbitais de fronteira encontram-se na Tabela 3.

No MEP da E2020, Figura 17(b), pode ser observada regiões bem definidas de alta densidade eletrônica (cor vermelha) como nos oxigênios da dimetoxindanona e no anel benzênico da benzila. As regiões mais ácidas (menor densidade eletrônica, cor azul)

estão localizadas nas extremidades dos grupos, principalmente nos hidrogênios dos dois grupos metoxilas.

Tabela 3. Principais propriedades estruturais e eletrônicas observadas na E2020 otimizada.

	AM1	AM1-S ^(a)	PM3	PM3-S ^(b)	RHF /6-31G*	RHF-S /6-31G* ^(c)	B3LYP/ 6-31G*
H47C17N4H41(°)	-101,602	-103,218	-86,187	-106,600	-104,703	-104,883	-104,206
C19C18C17N14(°)	54,503	43,006	79,036	42,317	47,584	52,584	48,778
HOMO (eV)	-8,79	-9,17	-8,88	-9,17	-8,41	-8,53	-8,55
LUMO(eV)	-0,32	-1,74	0,35	-0,75	2,63	2,30	1,73

(a) AM1-S: cálculo AM1 usando modelo de solvente COSMO. (b) PM3-S: cálculo PM3 usando modelo de solvente COSMO. (c) RHF-S: cálculo RHF usando modelo de solvente contínuo PCM

Os dois ângulos torsionais diedrais H47C17N4H41 (-86,187°) C19C18C17N14 (79,036°) foram os que mais apresentaram modificações com relação à estrutura depositada no PDB sob o código 1EVE, para estrutura E2020 otimizada nos diferentes níveis de cálculos que foi estudada. Como pode ser observado na Tabela 3, as variações para os diedros foram maiores para os resultados obtidos nos cálculos RHF e B3LYP.

A presença do solvente não altera a estrutura eletrônica da E2020 indicado pela modificação da energia dos orbitais de fronteira ou pela distribuição de densidade eletrônica. Porém, observa-se que a variação dos ângulos diedrais é maior quando a droga está solvatada para os cálculos semi-empíricos.

GALANTAMINA

A GALA é uma AChEI seletiva, competitiva e reversível da AChE. Esta possui na sua estrutura molecular quatro aceptores de hidrogênio (O7, N12, O19 e O20) e um doador de H (O20) (Figura 18(a)).

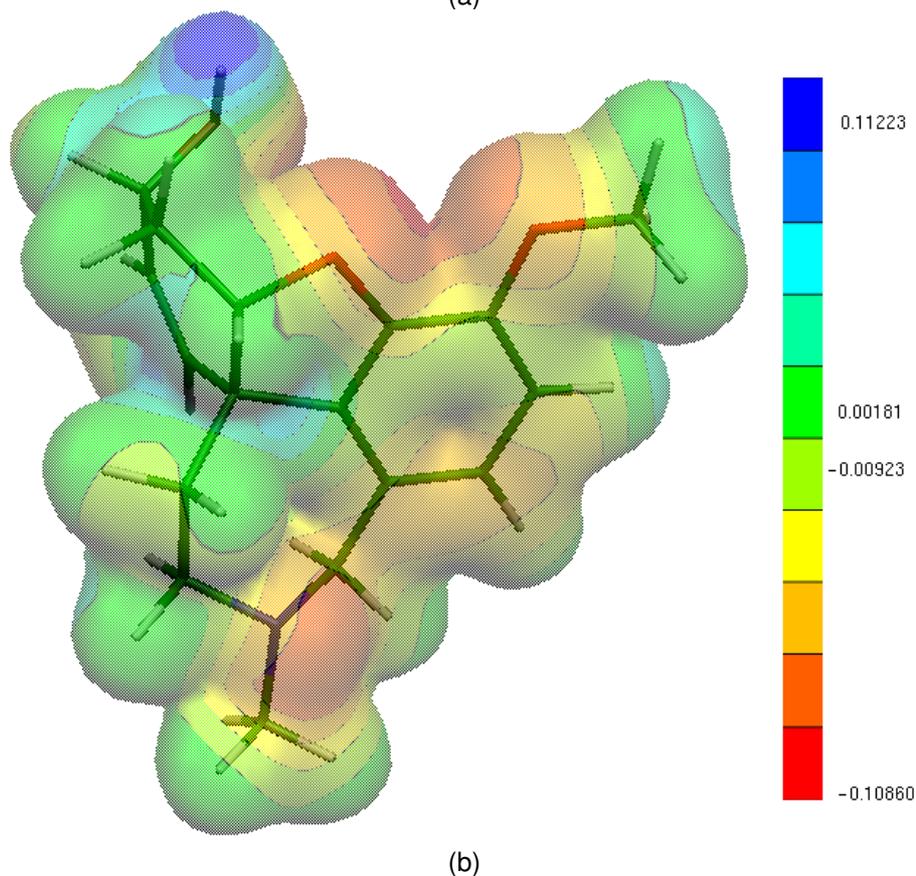
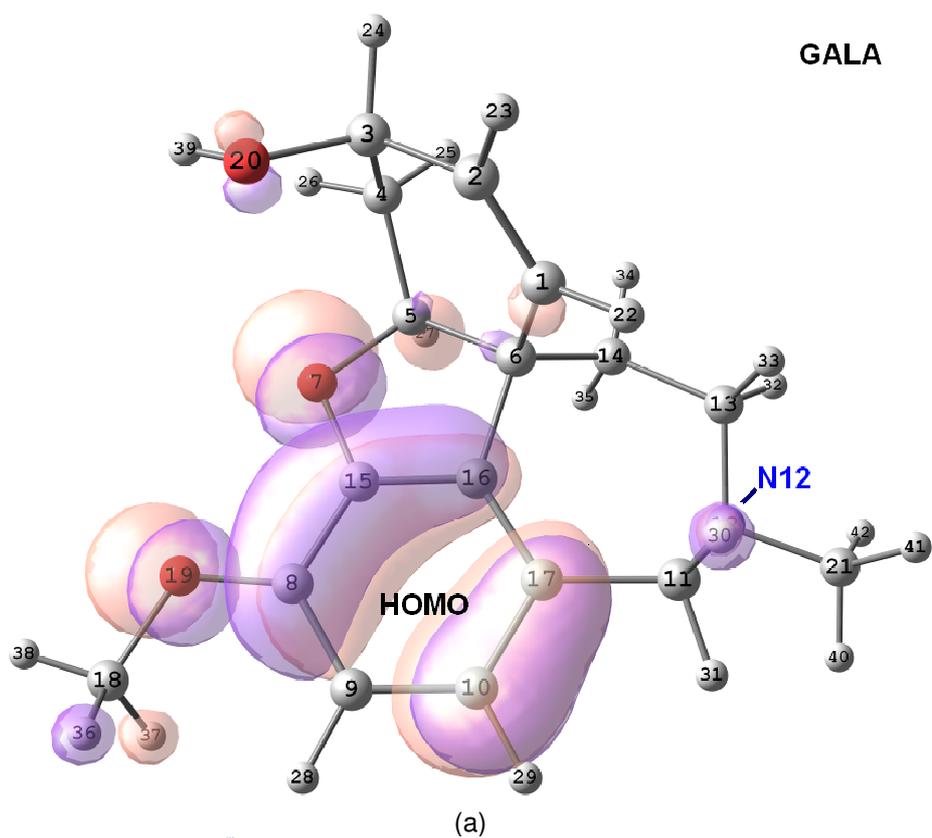


Figura 18. Estrutura otimizada (a) e MEP (b) da GALA B3LYP/6-31G*.

A GALA possui na sua estrutura apenas um grau de liberdade torsional, localizado no grupo metoxila ($-\text{OCH}_3$). Porém, em todos os cálculos realizados neste estudo, o diedro que apresentou maior variação na geometria otimizada em relação à geometria

depositada no PDB, sob o código 1DX6, foi o diedro H39O20O7O19 (96,2°). Este diedro é formado pelos átomos de oxigênio e hidrogênio localizados na região de mais alta densidade eletrônica da molécula (O7, O19 e O20) e na região de mais baixa densidade (H39) (Figura 18(b)).

O orbital de fronteira HOMO (superfície sólida) está distribuído nas regiões de alta densidade eletrônica da E2020 (anel benzênico e átomos de oxigênio), e os valores de sua energia não sofre influência do solvente, como pode ser verificado nos dados da Tabela 4.

Tabela 4. Principais propriedades estruturais e eletrônicas observadas na GALA otimizada.

	AM1	AM1-S ^(a)	PM3	PM3-S ^(b)	RHF /6-31G*	RHF-S /6-31G* ^(c)	B3LYP, 6-31G*
H39O20O7O19 (°)	-72,497	-72,497	-84,801	-84,801	-87,779	-88,523	-87,953
HOMO (eV)	-8,62	-8,91	-8,65	-8,95	-7,98	-8,09	-8,12
LUMO(eV)	-0,35	0,02	0,24	-0,02	3,82	3,71	1,65

(a) AM1-S: cálculo AM1 usando modelo de solvente COSMO. (b) PM3-S: cálculo PM3 usando modelo de solvente COSMO. (c) RHF-S: cálculo RHF usando modelo de solvente contínuo PCM

HUPERZINA A

A HUPE é uma promissora candidata ao tratamento da DA. Sua estrutura molecular é mostrada na Figura 19, possui átomos aceptores e doadores de hidrogênio. Sua área de superfície polar (58,5) é a mais alta dentre as AChEIs estudadas neste trabalho. Interage com a AChE por ligações de hidrogênios e interações entre grupos com alta densidade de elétrons π .³⁵

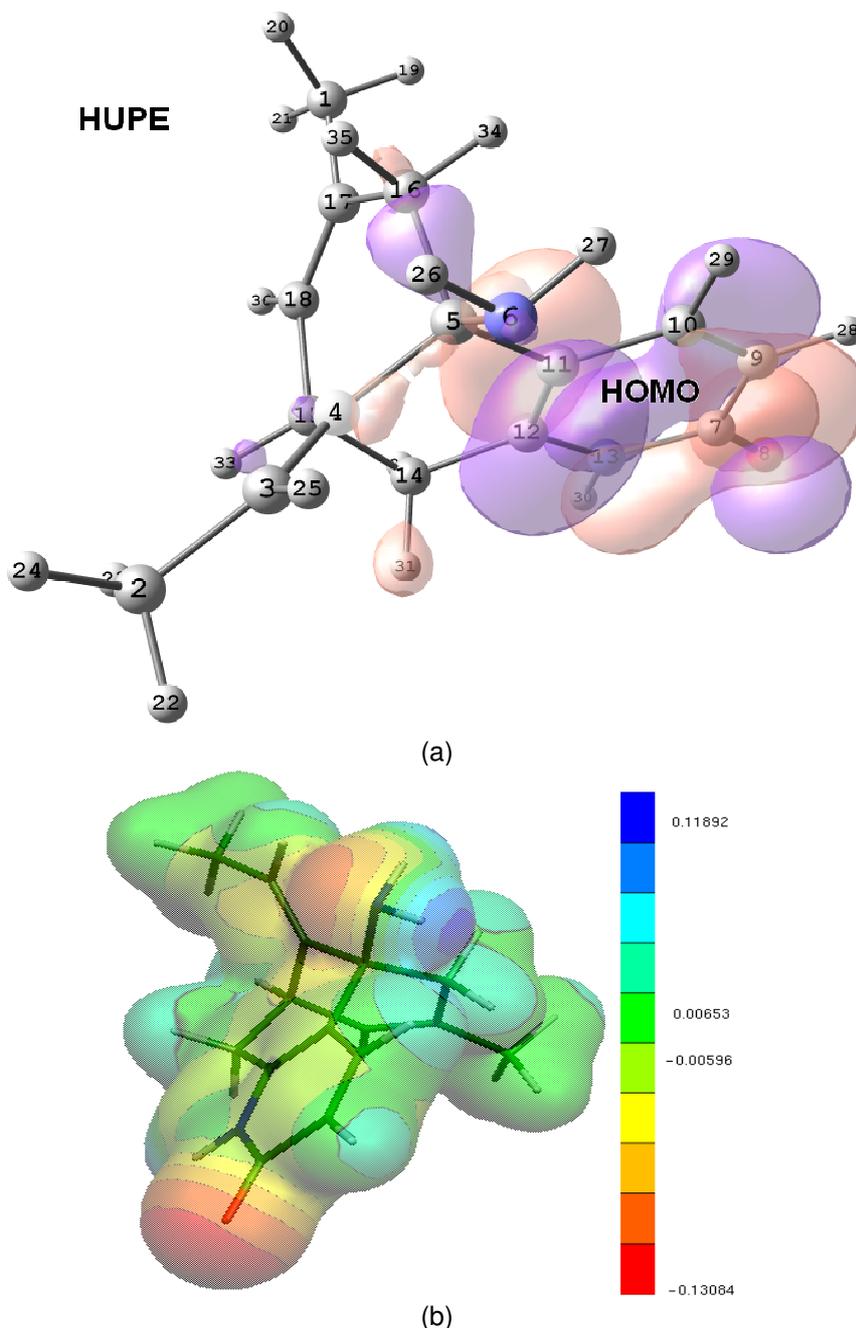


Figura 19. Estrutura otimizada (a) e MEP (b) da HUPE B3LYP/6-31G*.

O HOMO e o LUMO da HUPE localizam-se nas regiões de mais alta densidade eletrônica (Figura 19(a) e (b)), principalmente sob os heteroátomos (N6, O8, N13). Os valores de energia do HOMO são concordantes para os cálculos AM1, PM3 e RHF no vácuo e considerando os efeitos do solvente água apresenta valor menor para os cálculos B3LYP, porém é sabido que neste nível de cálculo os valores de energia deste orbital tende a ser menor.

Tabela 5. Principais propriedades estruturais e eletrônicas observadas na HUPE otimizada.

	AM1	AM1-S ^(a)	PM3	PM3-S ^(b)	RHF /6-31G*	RHF-S /6-31G* ^(c)	B3LYP, 6-31G*
H26N6C4C3 (°)	-90,656	-47,239	-53,134	-51,779	-53,378	-50,664	-56,064
C1C17C11O8 (°)	-50,109	-53,874	-62,837	-53,369	-53,838	-53,902	-52,851
HOMO (eV)	-8,87	-8,88	-7,62	-8,88	-8,01	-8,16	-5,53
LUMO(eV)	-1,23	-0,26	-1,84	-0,44	3,12	3,02	1,57

(a) AM1-S: cálculo AM1 usando modelo de solvente COSMO. (b) PM3-S: cálculo PM3 usando modelo de solvente COSMO. (c) RHF-S: cálculo RHF usando modelo de solvente contínuo PCM

Foi constatado a variação dos ângulos torsionais H26N6C4C3 (-67,710°) e C1C17C11O8 (-62,334) da estrutura otimizada nos diversos níveis explorados com relação à estrutura depositada no PDB sob código 1VOT. Como mostrado na Tabela 5, o solvente não altera significativamente os valores desses ângulos quando comparados com os resultados das otimizações no vácuo.

METRIFONATO

O METRI é um organofosforado com reconhecida ação inibidora sobre a AChE. Sua estrutura molecular (Figura 20(a)), revela um alto grau de liberdade torsional sobre o eixo principal da molécula. Possui quatro átomos receptores (O2, O3, O4 e O16) de hidrogênio e um grupo doador (O16H17).

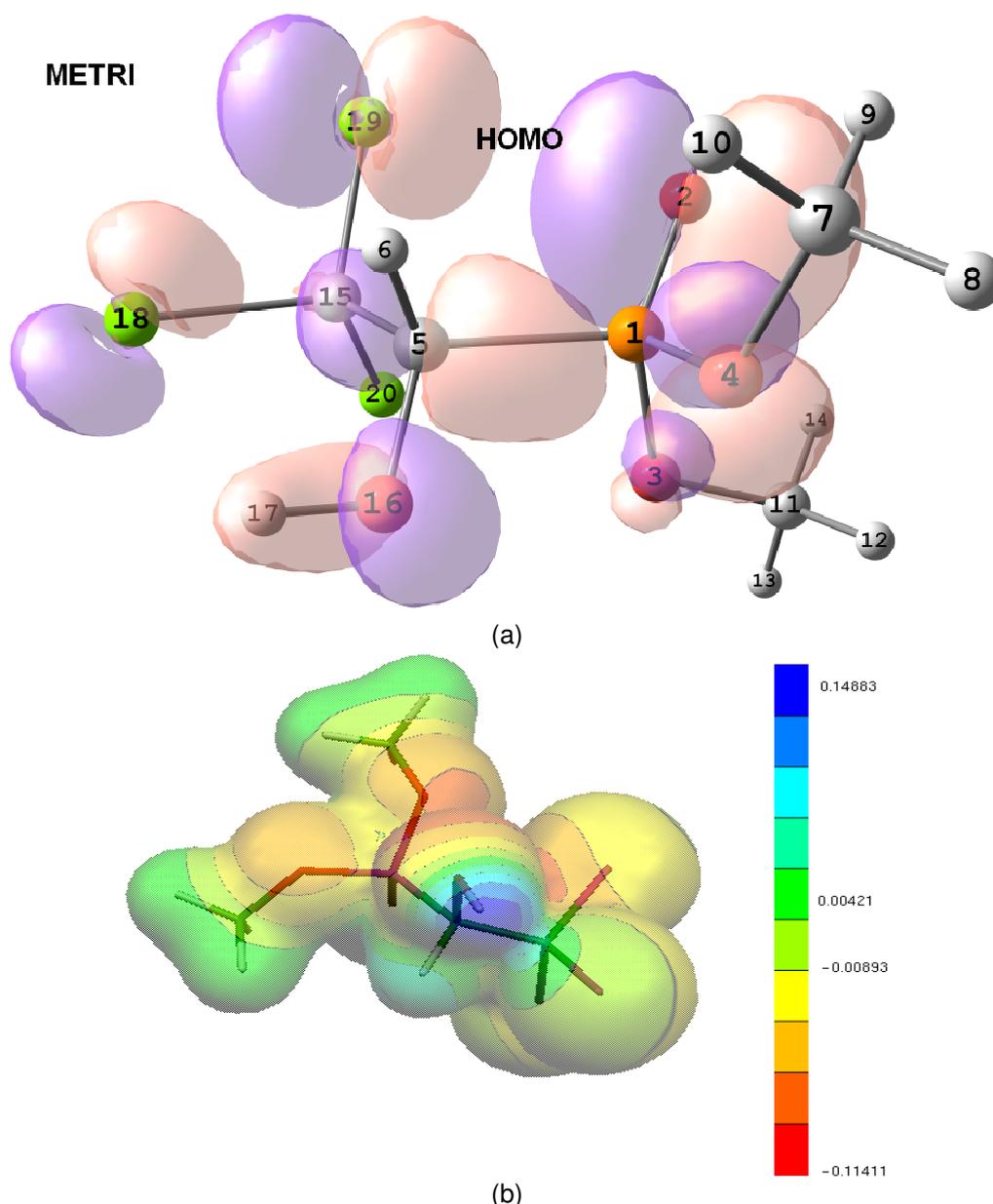


Figura 20. Estrutura otimizada (a) e MEP (b) do METRI /B3LYP_6-31G*.

O átomo de fósforo concentra a maior participação do orbital de fronteira HOMO, seguido pelos demais heteroátomos presentes na molécula, Figura 20(a). Este orbital está distribuído ao longo da molécula de forma homogênea sobre os heteroátomos.

Apesar do alto grau de liberdade torsional, foram observados na otimização da geometria da molécula em todos os níveis de cálculos realizados apenas dois ângulos de diedro com modificações nos seus valores, a saber, H8O4P1H12 ($-128,356^\circ$) e H8O4P1H12 ($-134,344^\circ$) quando comparados com a estrutura de partida construída no programa GaussView[®] a partir de dados da literatura. A Tabela 6 apresenta os valores para estes diedros, neste caso o solvente parece influenciar a geometria do METRI, principalmente no ângulo de diedro H8O4P1H12 com variações entre os cálculos no vácuo da ordem de 29° para os valores RHF.

Tabela 6. Principais propriedades estruturais e eletrônicas na METRI otimizada.

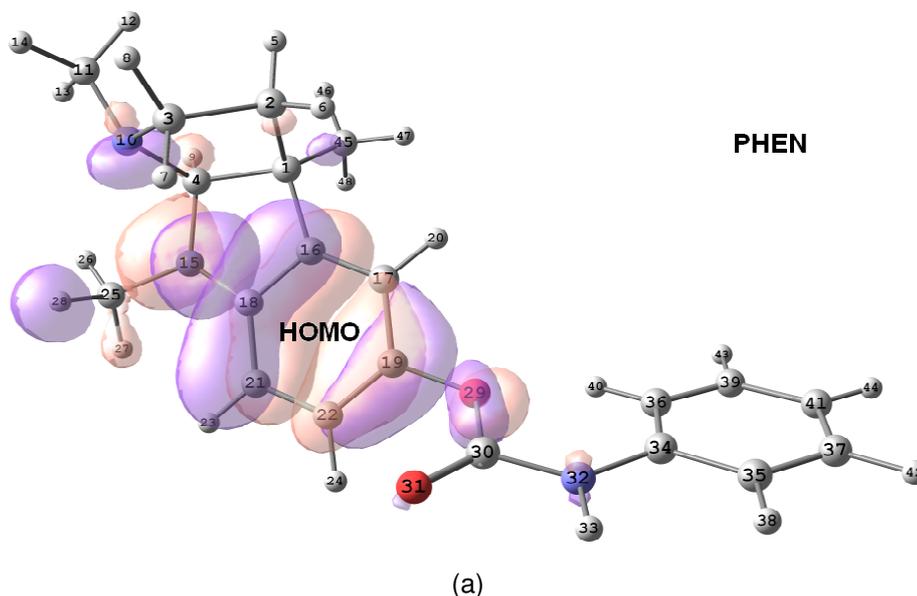
	AM1	AM1-S ^(a)	PM3	PM3-S ^(b)	RHF /6-31G*	RHF-S /6-31G* ^(c)	B3LYP/ 6-31G*
H12O3P1Cl18 (°)	101,311	-169,414	26,307	-168,914	-164,238	-168,611	-164,646
H8O4P1H112 (°)	-164,824	107,312	76,150	107,317	80,568	109,561	146,282
HOMO (eV)	-7,61	-10,69	-9,06	-10,65	-11,77	-11,84	-7,81
LUMO(eV)	-1,57	-0,49	-0,57	-0,49	3,44	3,40	-1,29

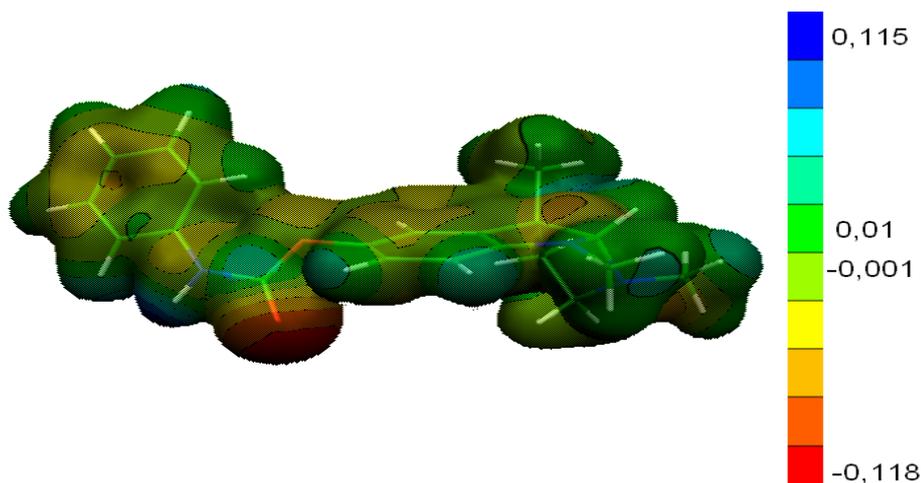
(a) AM1-S: cálculo AM1 usando modelo de solvente COSMO. (b) PM3-S: cálculo PM3 usando modelo de solvente COSMO. (c) RHF-S: cálculo RHF usando modelo de solvente contínuo PCM

O solvente afeta de maneira significativa as energias dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO do METRI.

FENSERINA

A PHEN é um carbamato altamente seletivo para AChE. Possui cinco átomos aceptores (nitrogênios e oxigênios) e um doador de hidrogênio (amina secundária). É uma AChEI com volume (391 Å³) e área de superfície polar (44,9) pequenos apesar do grande tamanho (14,808 Å). Sua estrutura, mostrada na Figura 21(a), está dividida em duas partes: benzilcarbamato e um grupo de três anéis fundidos (trimetil-benzil-ditetraidropirol) acoplados a três grupos metilas, conferindo um caráter hidrofóbico à molécula que tem coeficiente de partição, logP, estimado em 2,49.





(b)
Figura 21. Estrutura otimizada (a) e MEP (b) da PHEN B3LYP/6-31G*.

Os orbitais de fronteira estão localizados em regiões distintas da molécula, segundo os cálculos B3LYP/6-31-G* (Figura 21a). O HOMO está definido na parte do trimetil-benzil-ditetraidropirol e LUMO no grupo do benzilcarbamato. Isto indica que esta AChEI pode interagir com resíduos distintos do sítio ativo da AChE. Os valores das energias dos orbitais HOMO e LUMO são mostrados na Tabela 7. Estes não apresentam significativa influência do solvente na sua população eletrônica.

Os anéis aromáticos benzênicos, o oxigênio da carbonila do benzilcarbamato juntamente com os três grupos metilas são as regiões de mais alta densidade eletrônica definidas a partir dos cálculos B3LYP/6-31G* (Figura 21(b)). A molécula da PHEN apresenta apenas uma região de baixa densidade eletrônica localizada no nitrogênio doador de próton (N32), o que indica que neste ponto pode ocorrer uma forte interação com resíduos nucleofílicos da AChE, como a His440.

Tabela 7. Principais propriedades estruturais e eletrônicas observadas na molécula otimizada da PHEN.

	AM1	AM1-S ^(a)	PM3	PM3-S ^(b)	RHF /6-31G*	RHF-S /6-31G* ^(c)	B3LYP/ 6-31G*
C30N32C34H44(°)	101,708	-167,363	125,694	-173,485	179,815	178,216	177,496
H13N10N15H26(°)	-160,449	-31,583	-12,106	-37,632	-103,556	-20,755	-32,361
H20C1C2H6(°)	-146,904	-19,707	165,805	-10,752	-37,627	9,734	25,801
H24O31 (Å)	3,996	2,822	4,205	4,096	2,924	3,364	2,731
HOMO (eV)	-9,09	-8,70	-8,86	-8,63	-6,92	-7,68	-7,06
LUMO(eV)	-1,02	-0,14	-1,32	-0,95	3,19	3,62	1,53

(a) AM1-S: cálculo AM1 usando modelo de solvente COSMO. (b) PM3-S: cálculo PM3 usando modelo de solvente COSMO. (c) RHF-S: cálculo RHF usando modelo de solvente contínuo PCM

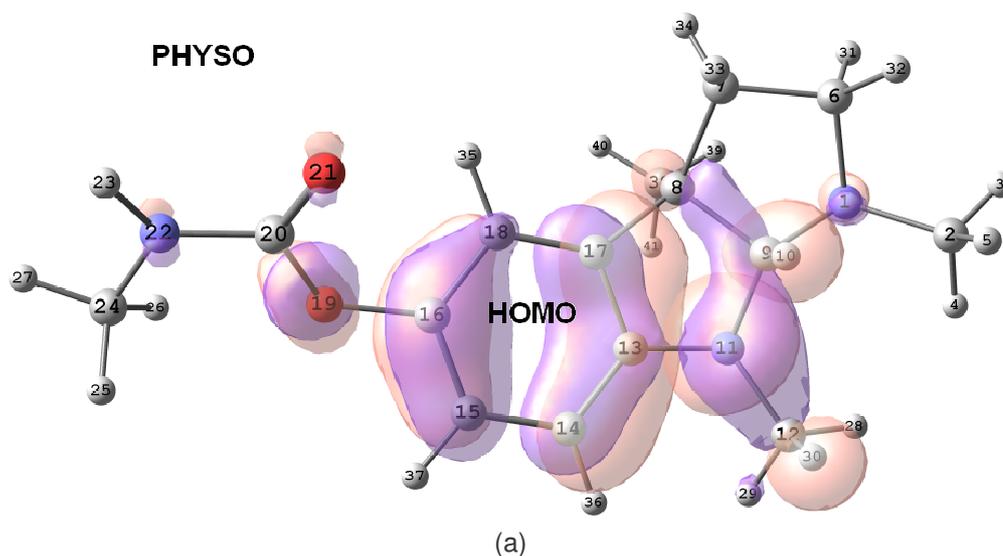
Alguns ângulos diedrais da PHEN levaram a uma maior dificuldade de otimização, a geometria de partida construída no programa GaussView[®] necessitou de muitos ciclos de otimização. Os diedros C30N32C34H44 (-158,842°) H13N10N15H26 (10,463°) e H24C1C2H6 (-68,153°) sofrem drásticas modificações nos seus valores com variações de até 170°, com relação a geometria de partida (Tabela 7).

A distância entre os átomos H24 e O31 (1,259 Å) demonstra que a PHEN tem uma interação intermolecular forte, do tipo ligação hidrogênio. Foram feitas tentativas de otimização utilizando um maior número de interações intramoleculares, entretanto a estrutura de mínimo global de energia foi a de menor número de interações intramoleculares. O solvente parece influenciar nesta interação, diminuindo sua força, como mostram os cálculos AM1 (3,996 Å) e AM1-S (2,822 Å).

FISOSTIGMINA

A PHYSO é um alcalóide extraído da *Physostigma venenosum*. Foi a primeira AChEI estudada clinicamente para tratar pacientes com DA.¹⁴ É um carbamato que tem na sua estrutura molecular cinco átomos aceptores (nitrogênios e oxigênios) e um doador de hidrogênio (amina secundária), serviu de referência para o desenvolvimento da PHEN e da RIVA.

A molécula da PHYSO é objeto de estudo e ponto de partida para obtenção de novas AChEIs da classe dos carbamatos.



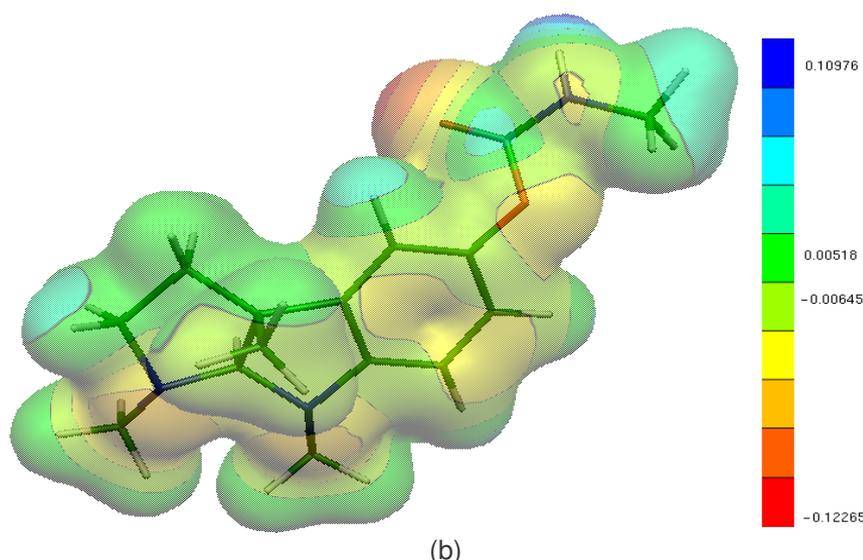


Figura 22. Estrutura otimizada (a) e MEP (b) da PHYSO B3LYP/6-31G*.

O HOMO da PHYSO está distribuído por quase toda estrutura (Figura 22(a)), tendo maior população no anel benzênico, na junção dos anéis dos tetraidropiroles e nos heteroátomos da molécula. Como mostrado na Tabela 8, o solvente não influencia nos valores da energia dos orbitais de fronteira da PHYSO.

Através do MEP da PHYSO (Figura 22(b)), é possível visualizar maior quantidade de regiões com densidade eletrônica alta. O grupo carbamato apresenta uma região máxima de alta densidade e uma região mínima de densidade eletrônica, isto indica que importantes interações podem ocorrer nesta região.

Tabela 8. Principais propriedades estruturais e eletrônicas observadas na molécula otimizada da PHYSO.

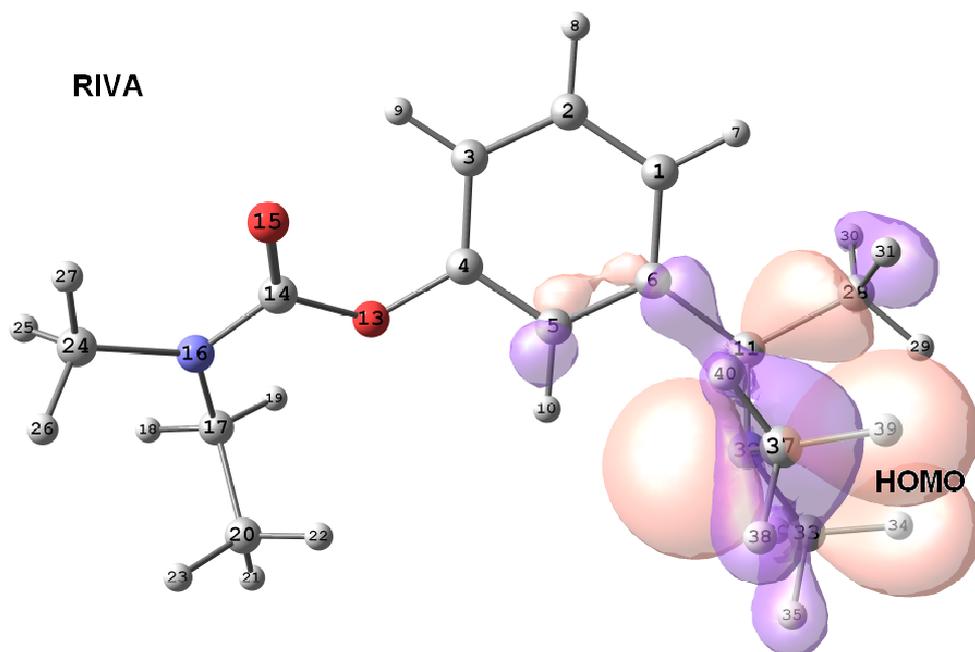
	AM1	AM1-S ^(a)	PM3	PM3-S ^(b)	RHF /6-31G*	RHF-S /6-31G* ^(c)	B3LYP, 6-31G*
O19C20N22C24(°)	-52,236	-62,564	-83,533	-63,586	-64,998	90,225	-49,110
H35C18O19O21(°)	13,094	14,426	27,792	22,058	4,824	3,971	9,430
HOMO (eV)	-8,41	-8,56	-8,56	-8,62	-7,75	-8,03	-5,15
LUMO(eV)	0,24	0,00	0,06	0,20	3,96	3,69	0,15

(a) AM1-S: cálculo AM1 usando modelo de solvente COSMO. (b) PM3-S: cálculo PM3 usando modelo de solvente COSMO. (c) RHF-S: cálculo RHF usando modelo de solvente contínuo PCM

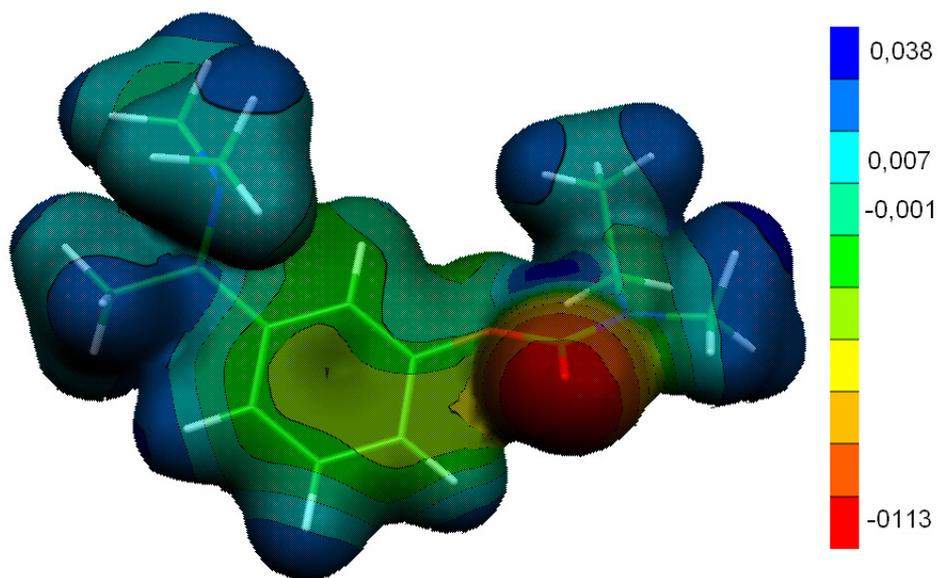
Modificações estruturais foram observadas nas estruturas otimizadas da PHYSO quando comparadas com a estrutura de partida construída no programa GaussView[®]. Os ângulos de diedro H35C18O19O21(85,533°) e O19C20N22C24 (27,792°) apresentaram maior variação em relação à geometria inicial.

RIVASTIGMINA

A RIVA é uma droga derivada da PHYSO por modificações moleculares, cuja estrutura tem alto grau de liberdade torsional e é um carbamato. Como as outras AChEIs da classe dos carbamatos possui muitos aceptores (O13, O15, N16 e N32) e poucos ou nenhum doador de hidrogênio (grupos metilas) na sua estrutura.



(a)



(b)

Figura 23. Estrutura otimizada (a) e MEP (b) da RIVA B3LYP/6-31G*.

Diferente dos outros carbamatos, que são AChEIs, a RIVA tem o orbital HOMO localizado fora da região do grupo carbamato, segundo cálculos B3LYP/6-31G* (Figura

23(a)). Os valores das energias dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO da RIVA são mostrados na Tabela 9 e não indicam modificações com a droga sob a influência do meio solvatado.

O grande diferencial da RIVA em relação aos outros carbamatos está na sua densidade eletrônica. Como pode ser observado na Figura 23(b), a RIVA possui menor quantidade de regiões com alta densidade eletrônica e maior quantidade de regiões com menor densidade eletrônica, mesmo não tendo grupos doadores de hidrogênio característicos.

Tabela 9. Principais propriedades estruturais e eletrônicas observadas na RIVA otimizada.

	AM1	AM1-S ^(a)	PM3	PM3-S ^(b)	RHF /6-31G*	RHF-S /6-31G* ^(c)	B3LYP/ 6-31G*
H22C17N16O13(°)	-90,180	-20,790	-58,586	-21,506	-21,475	-21,560	-21,720
H21C17N32C23(°)	47,786	-53,703	-58,699	57,624	62,163	61,842	62,597
N16-N32 (Å)	7,544	7,253	7,509	7,262	6,751	6,821	6,94
HOMO (eV)	-7,06	-9,33	-7,45	-9,35	-8,72	-8,93	-5,59
LUMO(eV)	0,17	-0,01	0,11	0,13	3,93	3,70	0,08

(a) AM1-S: cálculo AM1 usando modelo de solvente COSMO. (b) PM3-S: cálculo PM3 usando modelo de solvente COSMO. (c) RHF-S: cálculo RHF usando modelo de solvente contínuo PCM

Os diedros H21C17N32C23 e H22C17N16O13 apresentaram valores diferentes nos semiempíricos no vácuo, com relação aos semiempíricos/solvente e *ab initio* e todos estes com os valores dos diedros da estrutura de partida depositada no pdb sob o código 1GQR. A distância entre os dois nitrogênios N16-N32 (5,960 Å) é diferente em todos os cálculos realizados, isto indica que esta medida pode ser importante na minimização da energia do sistema RIVA.

TACRINA

A THA foi a primeira droga aprovada para o tratamento da DA. Apresenta na sua estrutura dois doadores (N7 e N27) e dois aceptores de H (N27). É uma acridinamina referência no desenvolvimento de novas AChEIs.

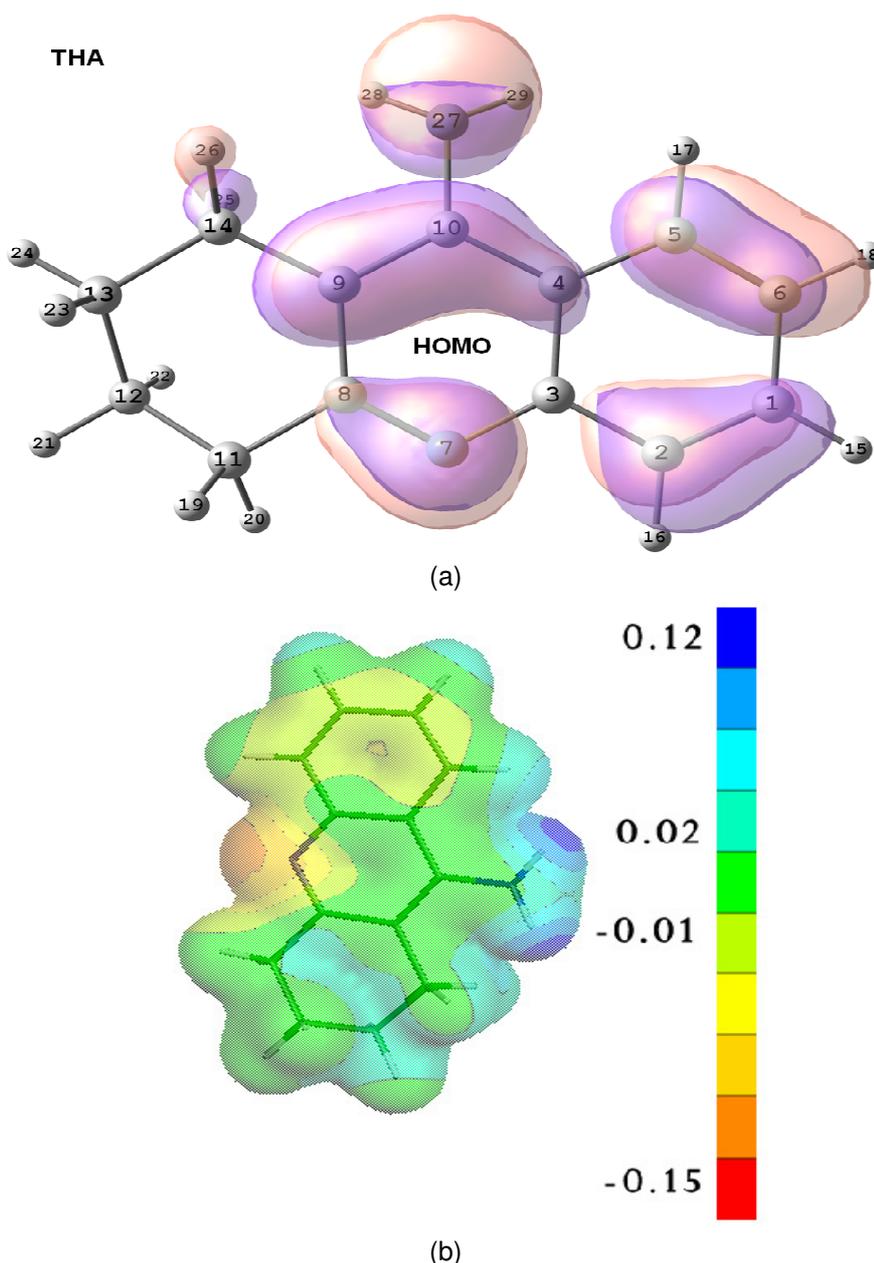


Figura 24. Estrutura otimizada (a) e MEP (b) da THA B3LYP/6-31G*.

O HOMO da THA está resolvido parte sob o sistema aromático da molécula e parte na amina primária. Os valores das energias do HOMO e do LUMO, Tabela 10, são concordantes entre os cálculos AM1/AM-S, PM3/PM3-S e RHF/RHF-S, indicando que o solvente não interfere na população dos orbitais de fronteira.

A Figura 24(b) mostra o MEP da THA gerado a partir do cálculo B3LYP/6-31G*. Observa-se uma região de alta densidade eletrônica num dos lados da molécula e uma região de baixa densidade eletrônica do outro lado, traçando uma linha imaginária passando pelo plano nodal da molécula, que pode indicar interações diferenciadas dentro do sítio ativo da AChE.

Tabela 10. Principais propriedades estruturais e eletrônicas observadas na THA otimizada

	AM1	AM1-S ^(a)	PM3	PM3-S ^(b)	RHF /6-31G*	RHF-S /6-31G* ^(c)	B3LYP/ 6-31G*
H2C17N16O13(°)	-44,660	-41,841	-31,328	-37,167	-41,631	-41,167	-41,989
HOMO (eV)	-8,42	-8,61	-8,14	-8,68	-7,73	-7,83	-5,46
LUMO (eV)	-0,26	-0,54	-0,34	-0,79	2,79	2,63	-0,89

(a) AM1-S: cálculo AM1 usando modelo de solvente COSMO. (b) PM3-S: cálculo PM3 usando modelo de solvente COSMO. (c) RHF-S: cálculo RHF usando modelo de solvente contínuo PCM

Estruturalmente foi observada modificação em apenas um ângulo torsional da THA, H2C14C10N27 (-44,668°) em relação a estrutura de partida obtida do pdb com entrada 1ACJ, fato talvez explicado pela rigidez da estrutura desta AChEI. Segundo os valores da Tabela 10, as maiores variações foram observadas nos cálculos AM1 e PM3. O solvente não interfere nos parâmetros geométricos da THA.

3.1.1.2 Otimização da geometria e Estudo de estrutura eletrônica dos sistemas SEH-AChEIs

O sistema SEH representa a tríade catalítica do sítio ativo da AChE, formada pelos resíduos Ser200, Glu327 e His440. Neste estudo os aminoácidos foram considerados nas suas formas neutras, para reduzir o tempo de cálculo computacional dos cálculos, uma vez que a análise realizada para estes sistemas é qualitativa, utilizando dados experimentais a fim de aproximar o modelo utilizado ao real.

As geometrias de partida dos sistemas SEH-AChEIs foram obtidas a partir das estruturas de entradas do PDB para as drogas DIMTHA (pdb: 2CKM), E2020 (pdb: 1EVE), HUPE (pdb: 1VOT), GALA (pdb: 1DX6), RIVA (pdb: 1GQR) e THA (pdb: 1ACJ), já para as drogas DDVP, METRI, PHEN e PHYSO foi utilizada as estruturas construídas por meio do software GaussView[®] combinada com as estruturas de entrada do pdb 1U65 para a tríade (SEH). Essas estruturas foram otimizadas nos níveis de cálculo AM1, AM1-Solvente, PM3, PM3-Solvente, B3LYP/6-31G*. O modelo de solvatação utilizado para estes sistemas foi o COSMO e o solvente a água.

Foram analisadas características estruturais do complexo SEH-AChEI, como distâncias de ligação e ângulos de diedro observados previamente na otimização da geometria das AChEIs. O diedro característico da tríade catalítica foi também analisado, para verificar como ocorre o processo de interação entre estes dois sistemas, bem como as principais modificações ocasionadas nos sistemas quando o complexo é formado.

Dentre as características eletrônicas foram analisadas o comportamento dos orbitais de fronteira, HOMO e LUMO, energias e localização. As análises realizadas no texto a seguir são correspondentes ao nível de cálculo B3LYP/6-31G* para todos os sistemas descritos.

SEH

Os três resíduos da tríade catalítica da AChE– Ser200-Glu327-His440 são hidrofílicos. A serina é um resíduo polar neutro, o glutamato um resíduo ácido e a histidina um resíduo polar básico.

Na tríade catalítica da AChE, a His440 atua como um nucleófilo e desprotona a hidroxila da Ser200 para ativá-la, como nucleófilo, que ataca o neurotransmissor ACh hidrolisando-o em acetil e colina.¹⁹

O processo de desprotonação da serina deve ser rápido e eficiente, para garantir a continuação da sinapse neuronal. Esta se dá ocorre por meio de ligações de hidrogênio. Portanto, a distância máxima, entre o nitrogênio do anel imidazol da His440 e o hidrogênio da hidroxila da serina, não deve ultrapassar a de uma ligação hidrogênio (3,5 Å) de longo alcance.

A Figura 25 mostra a geometria do sistema SEH otimizada com cálculos B3LYP/6-31G*, bem como os orbitais de fronteira, HOMO e LUMO, sobrepostos. Nesta figura, estão caracterizadas as distâncias dos principais pontos de interação entre os resíduos da tríade, que foram designados pelas letras **a** (1,961 Å), **b** (1,812 Å) e **c** (2,844 Å), assim como o ângulo diedro H10N40H45O29 (-56,6°) formado por estes átomos foram analisados para determinar a integridade do sistema SEH

O orbital de fronteira HOMO (-6,04 eV) tem sua população completa sobre a região delimitada pela His440, principalmente no anel imidazol (Figura 25). O LUMO (-0,96 eV) está localizado sobre o Glu327. Estes dados demonstram que estes são os pontos mais susceptíveis a interações no sistema SEH.

Geometria inicial tríade - PDB (1U65):

Diedro:

H10N40H45O29= -56,600°

Distâncias:

a = 1,961 Å

b = 1,812 Å

c = 2,844 Å

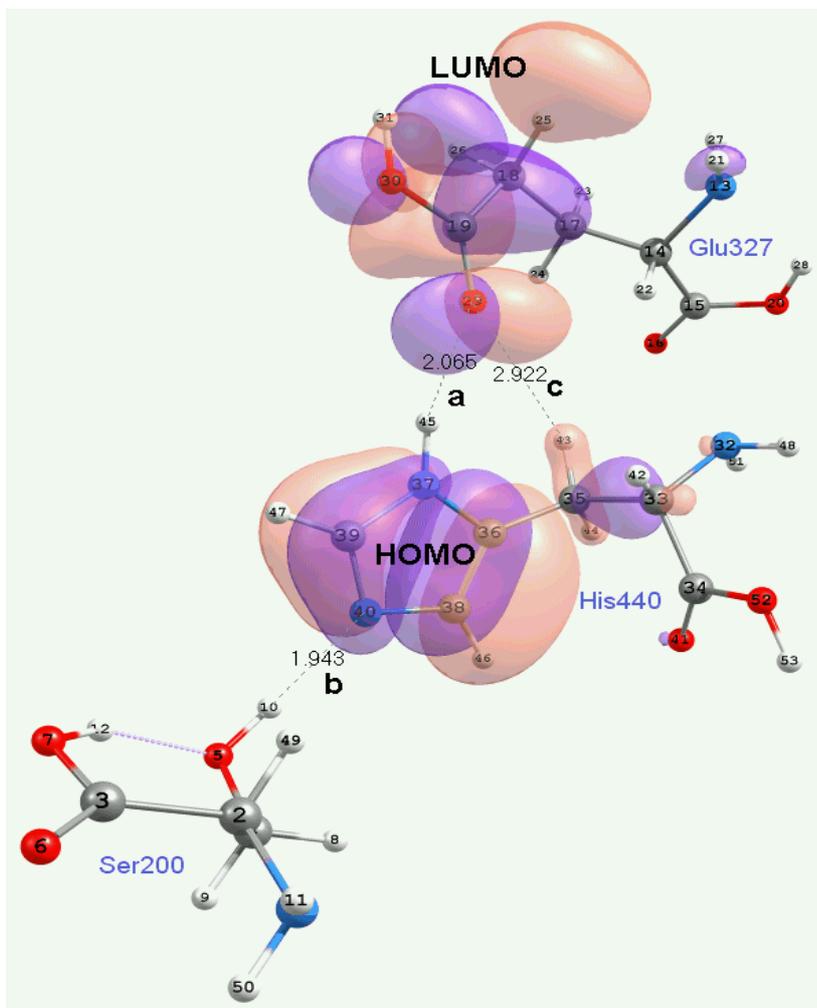


Figura 25. Estrutura otimizada da tríade SEH B3LYP/6-31G* e dados cristalográficos de geometria inicial - pdb: 1U65.

O ângulo de diedro da tríade H10N40H45O29 sofreu variações bruscas nos diferentes níveis de cálculo, como por ser observado na Tabela 11. Porém, a estrutura obtida nos cálculos B3LYP nos mostra que as distâncias **a**, **b** e **c** não apresentam alterações significativas, mantendo a integridade do sistema SEH.

Tabela 11. Principais modificações estruturais (ângulos e distâncias) e eletrônicas determinadas na otimização do sistema SEH.

	AM1	AM1-S	PM3	PM3-S	B3LYP/6-31G*
H10N40N45O29(°)	177,024	69,942	-44,977	148,43	-137,6
HOMO (eV)	-8,89	-9,22	-9,05	-9,54	-6,04
LUMO (eV)	-0,15	0,68	-0,38	0,48	-0,96
Dist. SEH- a (Å)	2,163	2,137	1,820	2,427	2,065
Dist. SEH- b (Å)	2,543	4,627	1,785	1,773	1,943
Dist. SEH- c (Å)	3,709	3,893	3,345	3,713	2,922

O MEP do sistema SEH (Figura 26) mostra que as regiões de alta densidade eletrônica estão localizadas, principalmente, nos grupos carboxílicos dos resíduos e no oxigênio da hidroxila da Ser200. Os grupos amino dos resíduos e o hidrogênio da hidroxila da Ser200 têm a menor densidade eletrônica.

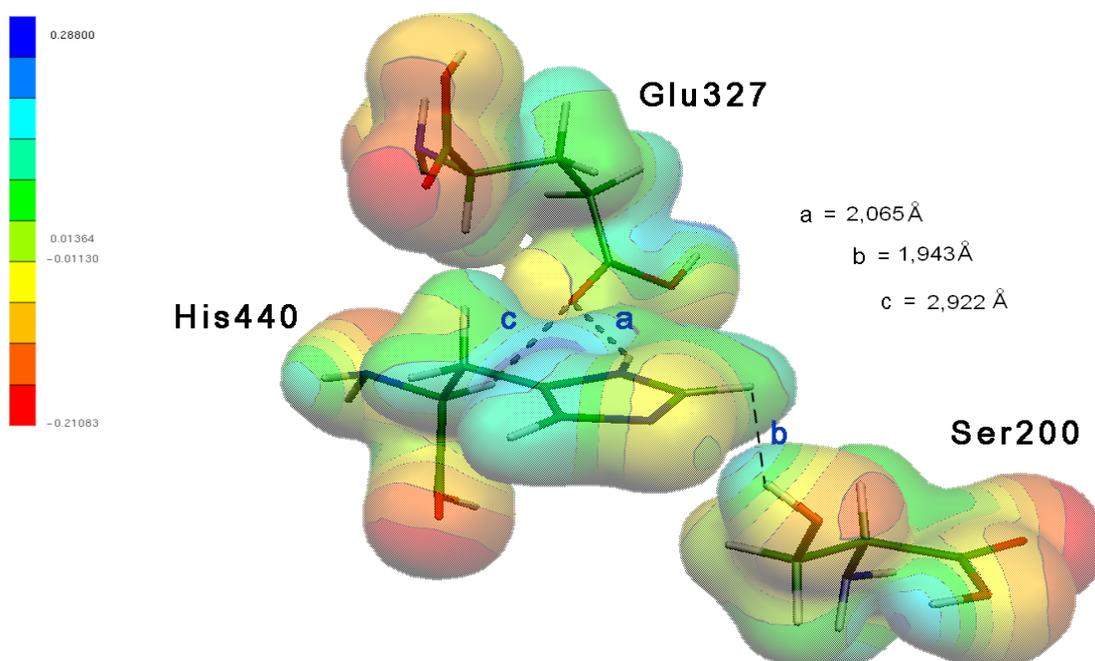


Figura 26. Mapa de potencial eletrostático do sistema SEH nível B3LYP/6-31G*.

SEH-DICLORVOS

Com os cálculos B3LYP/6-31G* foi visualizada (Figura 27) uma interação de hidrogênio entre o oxigênio com a maior carga negativa da DDVP O2 (-0,576) e o hidrogênio do anel imidazol da His440.

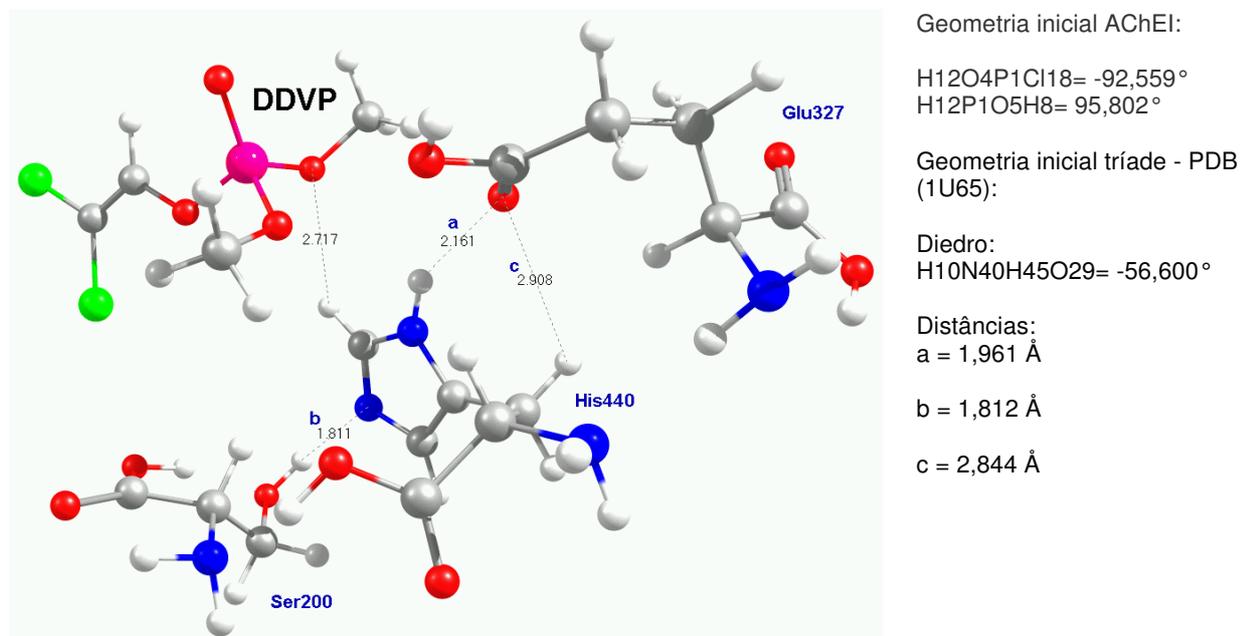


Figura 27. Geometria otimizada do sistema SEH-DDVP - nível B3LYP/6-31G*.

Assim como ocorreu nas otimizações das estruturas das AChEIs os ângulos de diedros têm seus valores alterados quando estas interagem com a SEH. O diedro H12P1O5H8 (95,802°), no sistema AChEI a média de 72,687°, enquanto que para o sistema SEH-DDVP é 108,655°, para os cálculos B3LYP (Tabela 12).

Tabela 12. Principais modificações estruturais (ângulos e distâncias) e eletrônicas determinadas na otimização do sistema SEH-DDVP.

	AM1	AM1-S	PM3	PM3-S	B3LYP/6-31G*
H12O4P1Cl18(°)	-167,128	109,940	-59,512	42,921	109,690
H12P1O5H8(°)	-126,662	-99,249	85,534	79,711	108,655
HOMO (eV)	-9,45	-9,20	-8,68	-8,99	-6,44
LUMO (eV)	-1,10	-0,19	-0,13	-0,24	-1,09
H10N40N45O29(°)	70,503	-177,772	84,888	128,255	146,730
Dist. SEH- a (Å)	2,123	2,206	1,798	2,536	2,161
Dist. SEH- b (Å)	2,690	3,991	1,783	1,809	1,811
Dist. SEH- c (Å)	2,286	2,772	3,344	2,869	2,908

SEH-DÍMERO DA TACRINA

Cálculos B3LYP/6-31G* do sistema SEH-DIMTHA (Figura 28) mostram que o DIMTHA interage com Glu327 formando uma ligação de hidrogênio (2,489 Å).

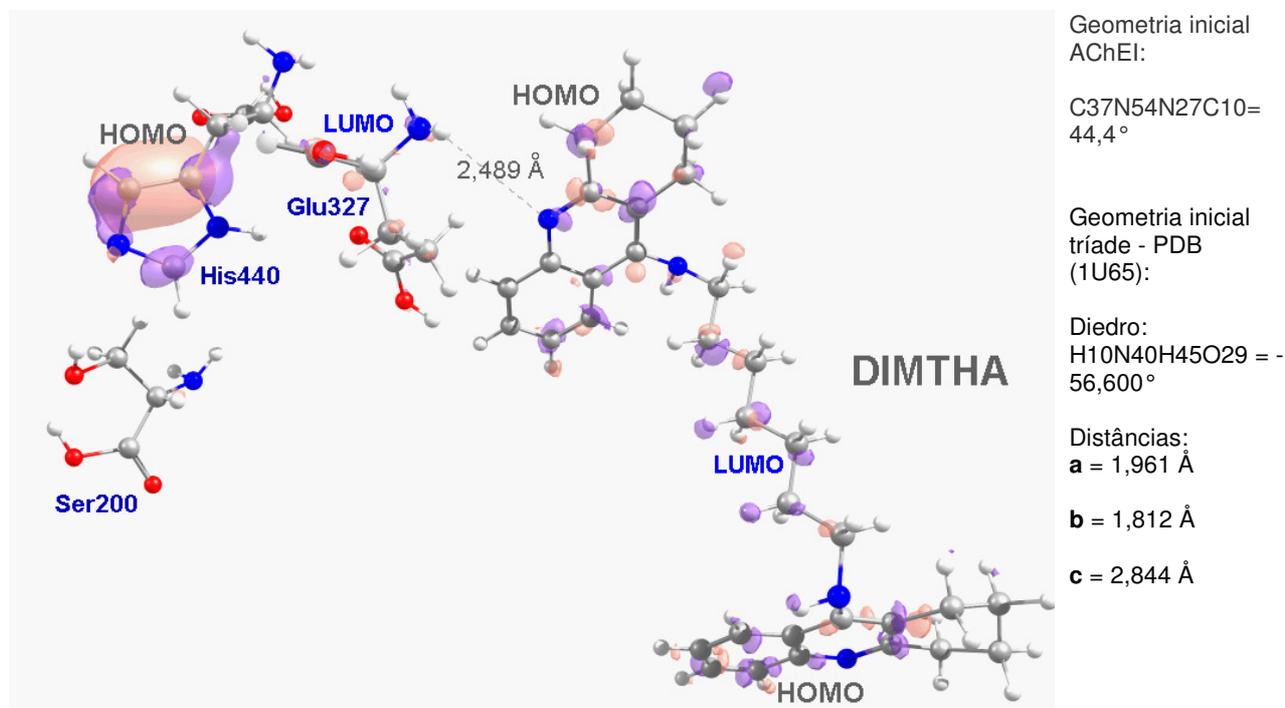


Figura 28. Geometria otimizada do sistema SEH- DIMTHA nível B3LYP/6-31G*.

O HOMO (-5,82 eV) do sistema está localizado na AChEI (na acridina) e na His440. É interessante notar que o DIMTHA está dividido entre o HOMO na acridina e o LUMO no alceno. A Figura 28 mostra que interação entre os dois sistemas ocorre entre o hidrogênio da amina da Glu327 e o nitrogênio da piridina da droga.

Tabela 13. Principais modificações estruturais (ângulos e distâncias) e eletrônicas determinadas na otimização do sistema SEH- DIMTHA.

	AM1	AM1-S	PM3	PM3-S	B3LYP/6-31G*
C37N54N27C10(°)	144,887	154,369	123,459	120,191	-179,849
HOMO (eV)	-8,92	-8,92	-6,19	-9,00	-5,82
LUMO (eV)	-0,07	-0,71	-0,25	-0,52	-2,10
H10N40N45O29(°)	48,139	49,592	4,986	70,791	21,372
Dist. SEH- a (Å)	2,141	2,135	1,618	2,490	2,000
Dist. SEH- b (Å)	2,554	2,764	1,661	1,773	1,803
Dist. SEH- c (Å)	4,264	3,996	3,499	4,284	4,441

Ainda sobre a geometria otimizada com os cálculos B3LYP/6-31G*, observa-se que as distâncias **a** e **b** da tríade (Tabela 13) são mantidas dentro do tamanho aceitável para interações do tipo ligação hidrogênio. Porém a distância **c** (4,441 Å) ultrapassa este limite e o ângulo de diedro da tríade catalítica varia de mais de 100°, evidenciando uma alteração na configuração da tríade como proposto por Ridberg e colaboradores.²⁵ O ângulo interno do diedro da DIMTHA (-179,849°) também variou muito em relação a AChEI isolada (135,929°), mostrando que a droga também sofre rearranjo da geometria quando interage com a SEH.

SEH-DONEPEZIL

O sistema SEH-E2020 tem dois pontos de interação por ligação de hidrogênio entre a SEH e a droga (Figura 29).

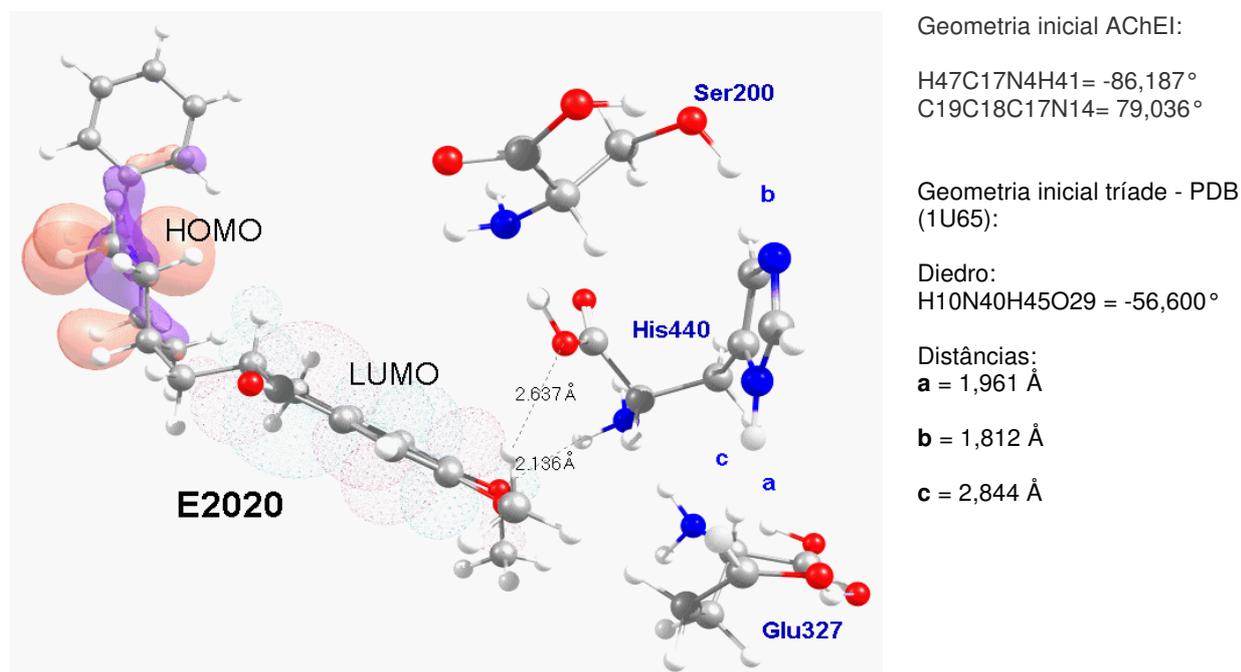


Figura 29. Geometria otimizada do sistema SEH- E2020 - nível B3LYP/6-31G*.

O HOMO e o LUMO deste sistema estão localizados ambos na E2020, e apenas o LUMO interage com o HOMO da tríade, tanto na parte ácida (2,637 Å) quanto na parte básica (2,136 Å) da His440. Sugerindo que as interações da E2020 com a AChE são de natureza não-covalente.

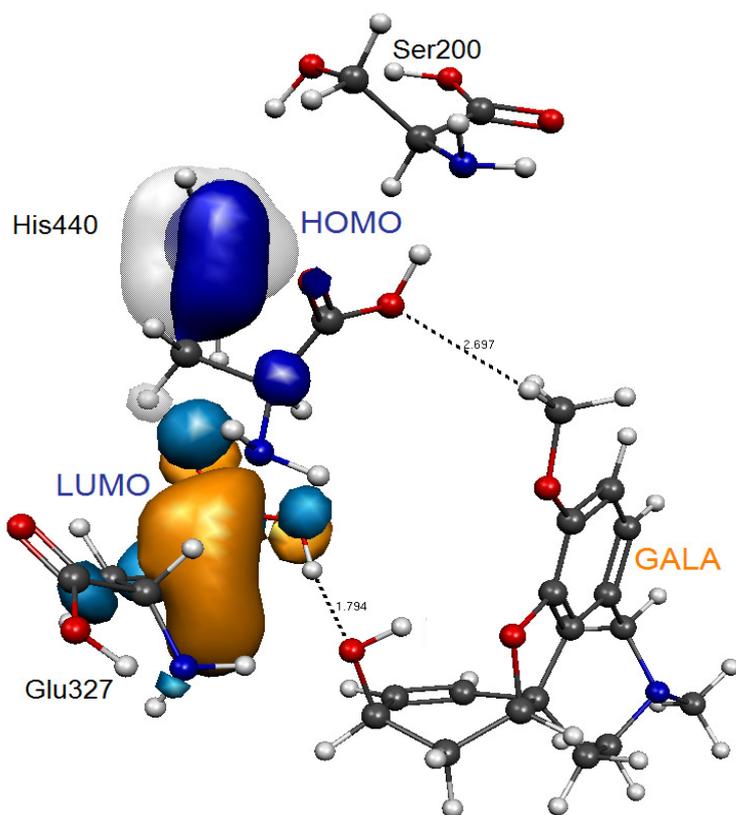
Tabela 14. Principais modificações estruturais (ângulos e distancias) e eletrônicas determinadas na otimização do sistema SEH- E2020.

	AM1	AM1-Solv.	PM3	PM3-Solv.	B3LYP/6-31G*
H47C17N4H41(°)	90,788	-100,169	144,083	98,689	116,206
C19C18C17N14(°)	51,068	55,467	73,978	-114,607	44,861
HOMO (eV)	-9,14	-9,14	-8,98	-9,25	-5,87
LUMO (eV)	-0,67	-0,67	-0,76	-0,82	-1,56
H10N40N45O29	72,283	73,980	11,351	-95,121	22,690
Int. SEH- a (Å)	2,168	2,139	1,809	2,521	1,922
Int. SEH- b (Å)	2,537	2,765	2,441	1,777	1,818
Int. SEH- c (Å)	3,960	2,332	3,354	3,295	3,439

Os diedros H47C17N4H41 (-104,206°) da E2020 e H10N40N45O29 (-56,6°) da SEH têm seus valores alterados para (116,206°) e (22,690°) respectivamente, mostrando que os sistemas quando interagem sofrem rearranjo considerável na sua geometria. Porém, os valores das distâncias características não sofrem modificações estruturais que descaracterizem a tríade catalítica da AChE, sugerindo que a E2020 interage fracamente com a tríade.

SEH- GALANTAMINA

No sistema SEH-GALA observam-se duas ligações de hidrogênio entre os sistemas SEH e GALA. Greenblat e colaboradores afirmam, por meio de estudos de docking molecular rígido e utilizando dinâmica molecular, que a GALA interage com a Ser200.²⁸ Os resultados mostrados na Figura 30 revelam que a GALA pode interagir com o orbital LUMO da tríade formando ligação hidrogênio forte (1,794 Å) e com o HOMO também por ligação hidrogênio (2,697 Å).



Geometria inicial AChEI:

H39O20O7O19= -96,2°

Geometria inicial tríade - PDB (1U65):

Diedro:
H10N40H45O29 = -56,600°

Distâncias:
a = 1,961 Å

b = 1,812 Å

c = 2,844 Å

Figura 30. Geometria otimizada do sistema SEH- GALA - nível B3LYP/6-31G*.

Os dados da Tabela 15 mostram que os ângulos de diedro da SEH e da GALA também são modificados quando estes sistemas interagem. A tríade tem suas distâncias características modificadas, **a** e **b** são reduzidas aumentando a força da interação eletrostática (ligação hidrogênio). Como os valores destas distâncias encontram-se abaixo do valor máximo de uma ligação hidrogênio, a SEH não sofre descaracterização, sugerindo assim que a GALA interage com este sistema.

Tabela 15. Principais modificações estruturais (ângulos e distâncias) e eletrônicas determinadas na otimização do sistema SEH- GALA.

	AM1	AM1-S	PM3	PM3-S	B3LYP/6-31G*
H39O20O7O19 (°)	21,980	23,640	77,457	29,527	-15,745
HOMO (eV)	-8,62	-8,94	-8,65	-9,04	-5,96
LUMO (eV)	0,35	-0,01	0,24	-0,08	-0,92
H10N40N45O29	157,133	49,592	70,612	164,589	-178,024
Dist. SEH- a (Å)	2,157	2,127	2,456	2,459	1,887
Dist. SEH- b (Å)	2,552	2,598	2,434	1,763	1,797
Dist. SEH- c (Å)	3,417	3,759	3,967	3,650	3,309

A Figura 31 mostra o MEP do sistema SEH-GALA, destacando a ligação hidrogênio (1,794 Å) formada entre o O20 da hidroxila da GALA e hidrogênio da carboxila do Glu327.

É observada a conexão entre uma das regiões de alta densidade eletrônica da GALA (Figura 18) e uma das regiões de baixa densidade eletrônica da Glu327 (Figura 25).

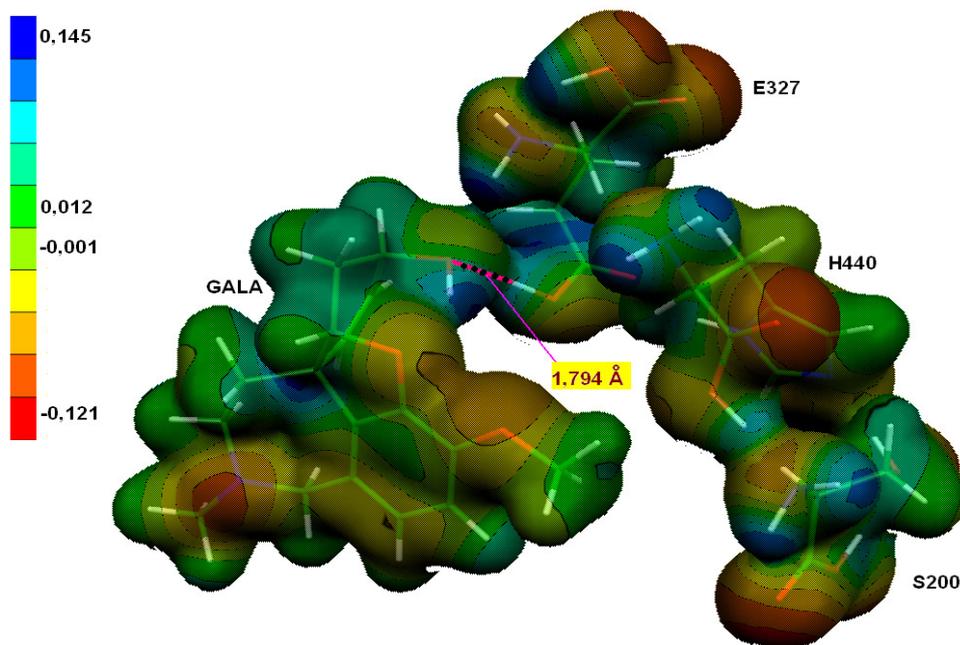
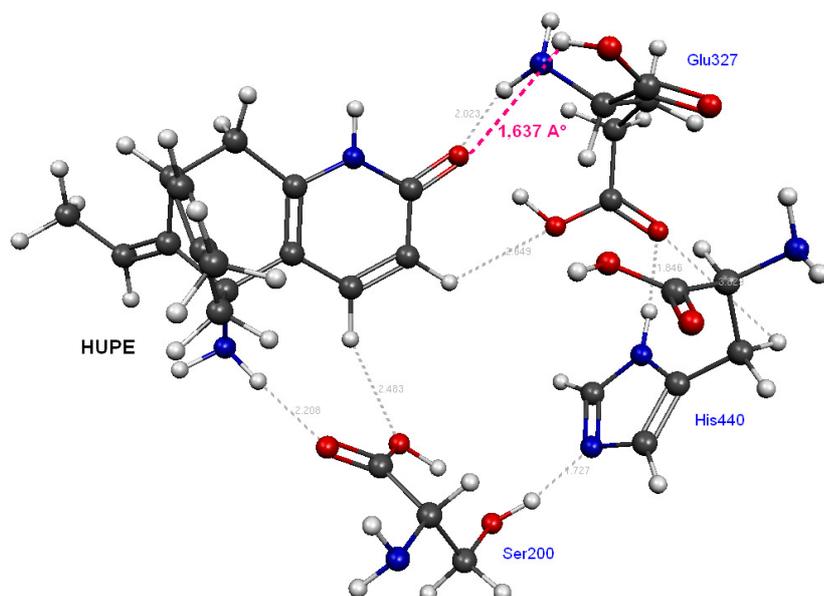


Figura 31. Mapa de potencial eletrostático do sistema SEH- GALA - nível B3LYP/6-31G*.

SEH- HUPERZINA A

A HUPE interage com todos os resíduos da tríade catalítica da AChE formando interações fracas do tipo cátion- π .³⁵



Geometria inicial AChEI:

H26N6C4C3 = -67,710°
C1C17C11O8 = -62,334°

Geometria inicial tríade - PDB
(1U65):

Diedro:
H10N40H45O29 = -56,600°

Distâncias:
a = 1,961 Å

b = 1,812 Å

c = 2,844 Å

Figura 32. Geometria otimizada do sistema SEH-HUPE - nível B3LYP/6-31G*.

Os resultados apresentados (Figura 32) mostram que a HUPE pode interagir com todos os resíduos da SEH, formando ligação hidrogênio com todos eles, particularmente entre o oxigênio da sua carbonila com o hidrogênio da carboxila do Glu327 (1,643 Å).

Tabela 16. Principais modificações estruturais (ângulos e distâncias) e eletrônicas na otimização do sistema SEH- HUPE.

	AM1	AM1-S	PM3	PM3-S	B3LYP/6-31G*
H26N6C4C3 (°)	76,189	45,236	52,653	39,652	-100,137
C1C17C11O8 (°)	-52,635	53,820	-38,030	36,525	16,810
H10N40N45O29	-9,559	47,823	47,183	57,820	42,900
HOMO (eV)	-8,26	-8,87	-8,42	-8,07	-6,02
LUMO (eV)	-0,06	-0,25	-0,05	0,25	-1,61
Int. SEH- a (Å)	2,333	2,133	1,816	2,133	1,846
Int. SEH- b (Å)	2,641	3,087	1,788	4,213	1,727
Int. SEH- c (Å)	5,099	3,941	3,590	2,322	3,829

Os ângulos de diedros medidos na otimização da estrutura do sistema SEH-HUPE variam consideravelmente, sugerindo um rearranjo dos dois sistemas. As distâncias características da tríade catalítica, **a** (1,846 Å), **b** (1,727 Å) e **c** (3,829 Å) mostram que apesar da medida **c** estar 0,329 Å acima de ser caracterizada como ligação hidrogênio, o diedro da SEH é mantido pelo eixo que o forma (átomos das distâncias **a** e **b**).

SEH-METRIFONATO

As interações mostradas na Figura 33 entre o METRI e a SEH sugerem que esta droga, pode interagir com a AChE, desde que consiga atravessar a barreira hematoencefálica, por ser considerado uma pró-droga.¹⁴

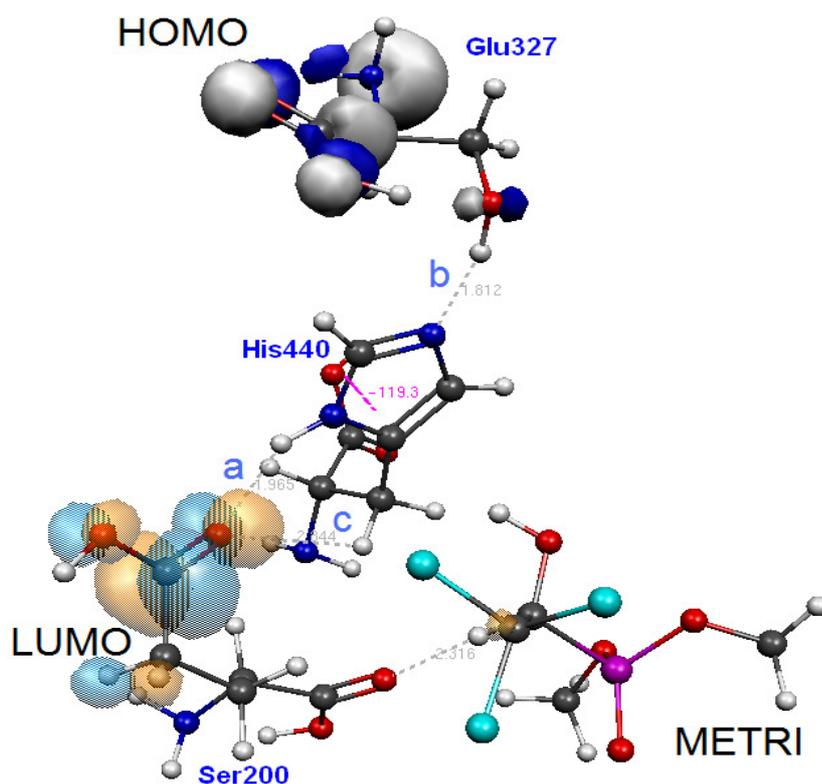


Figura 33. Geometria otimizada do sistema SEH-METRI - nível B3LYP/6-31G*.

Geometria inicial AChEI:

H12O3P1Cl18=-128,356°

H8O4P1H112=134,344°

Geometria inicial tríade - PDB
(1U65):

Diedro:

H10N40H45O29 = -56,600°

Distâncias:

a = 1,961 Å

b = 1,812 Å

c = 2,844 Å

O complexo formado entre o METRI e a SEH da AChE, é feito pela formação de uma ligação hidrogênio (2,316 Å) entre o LUMO da SEH transferido, no sistema SEH-METRI, para a Ser200 (-1,09 eV) e o HOMO da METRI localizado parcialmente no H6 (-7,81 eV).

As modificações diedrais ocorrem tanto no METRI quanto na SEH, sugerindo rearranjo estrutural destes sistemas. As distâncias **a**, **b** e **c** são levemente modificadas sem perderem a característica de ligação hidrogênio entre os átomos que as compõe, evidenciando que o METRI se liga a SEH, sem descaracterizá-la como tríade catalítica da AChE.

Tabela 17. Principais modificações estruturais (ângulos e distâncias) e eletrônicas determinadas na otimização do sistema SEH- METRI.

	AM1	AM1-S	PM3	PM3-S	B3LYP/6-31G*
H12O3P1Cl18 (°)	-112,699	-168,461	-166,402	-134,250	165,6
H8O4P1H112 (°)	-94,319	77,731	-140,067	-62,346	108,6
HOMO (eV)	-8,95	-9,21	-9,60	-9,45	-6,23
LUMO (eV)	-0,83	-0,74	-0,36	-0,39	-1,09
H10N40N45O29	-14,631	73,430	34,744	-42,734	-119,3
Dist. SEH- a (Å)	3,449	2,149	1,817	1,803	1,965
Dist. SEH- b (Å)	2,645	4,665	1,776	1,761	1,812
Dist. SEH- c (Å)	2,509	3,876	3,485	3,488	2,844

SEH-FENSERINA

O complexo entre os sistemas SEH e PHEN mostrado na Figura 34 sugere interações desta AChEI com a tríade catalítica por forças eletrostáticas fracas (3,482 e 3,462 Å).

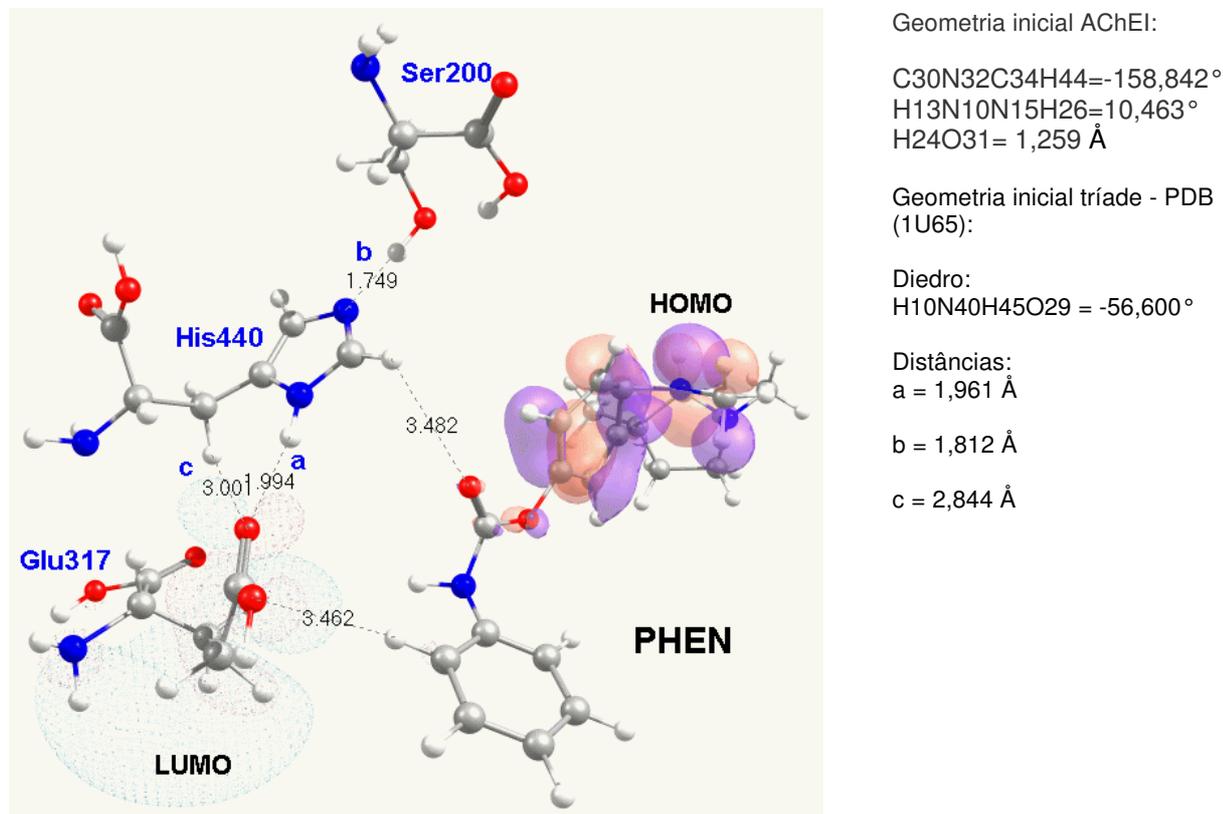


Figura 34. Geometria otimizada do sistema SEH-PHEN nível B3LYP/6-31G*.

A energia do HOMO (4,62 eV) decresce, em módulo, consideravelmente quando o sistema SEH (6,04 eV) e PHEN (7,06 eV) interagem. Sugerindo a formação de um complexo pouco estável.

A distância interatômica H24O31 (4,729 Å) da PHEN aumenta consideravelmente, desfazendo a possível interação intramolecular identificada na otimização da geometria da molécula sozinha (2,731 Å).

As distâncias **a**, **b** e **c** (Tabela 18) da tríade apresentaram pouca variação quando comparadas com a geometria de partida do sistema (Figura 34). Houve no sistema SEH apenas modificação considerável no ângulo torsional de diedro. Estas modificações estruturais evidenciam que a presença da PHEN diante da tríade catalítica não a desativa.

Tabela 18. Principais modificações estruturais (distâncias e diedros) e eletrônicas determinadas na otimização do sistema SEH- PHEN.

	AM1	AM1-S	PM3	PM3-S	B3LYP/6-31G*
C30N32C34H44(°)	173,352	-161,746	-158,437	-147,741	-122,490
H13N10N15H26(°)	-56,890	-31,568	-53,711	-31,606	-50,892
H24O31	2,488	3,173	3,814	3,240	4,729
HOMO (eV)	-8,84	-8,57	-8,98	-8,72	-4,62
LUMO (eV)	0,45	-0,08	0,85	-0,19	-1,52
H10N40N45O29	-169,693	-4,695	38,918	93,905	-143,408
Dist. SEH- a (Å)	2,326	2,319	1,840	2,632	1,995
Dist. SEH- b (Å)	2,649	5,421	1,780	1,770	1,747
Dist. SEH- c (Å)	3,112	4,361	3,473	3,781	2,996

SEH-FISOSTIGMINA

O complexo entre o sistema do carbamato PHYSO e SEH é mostrado na Figura 35. Observam-se várias ligações de hidrogênio formadas entre o orbital de fronteira HOMO (-5,69 eV) do sistema localizado na AChEI e o orbital LUMO (-0,64 eV) localizado no Glu327. A interação entre a PHYSO e a Ser200 (2,604 Å) sugere que essa AChEI interage com a tríade catalítica da AChE.

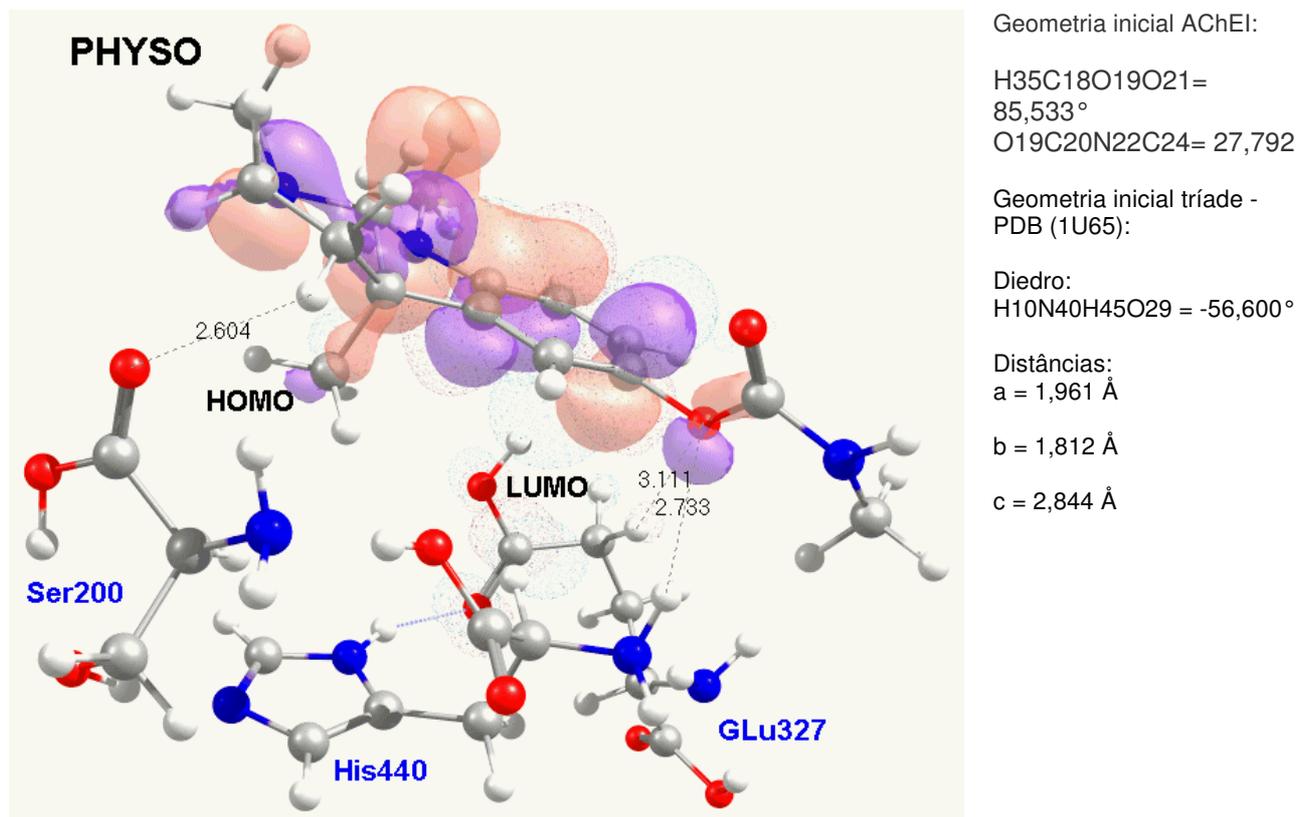


Figura 35. Geometria otimizada do sistema SEH - PHYSO nível B3LYP/6-31G*.

Com relação aos ângulos de diedro da PHYSO, o diedro H35C18O19O21 (9,430°) dobra de tamanho quando a droga está no sistema SEH-PHYSO (18,886°). Sugerindo que a AChEI modifica seu arranjo espacial para interagir com a tríade.

As modificações estruturais na tríade quando complexada com a PHYSO são observadas na modificação do diedro H10N40N45O29 (134,228°), sugerindo a manutenção das características de catálise da tríade pelas ligações de hidrogênio formadas entre os seus resíduos (Tabela 19).

Tabela 19. Principais modificações estruturais (ângulos e distâncias) e eletrônicas determinadas na otimização do sistema SEH- PHYSO.

	AM1	AM1-S	PM3	PM3-S	B3LYP/6-31G*
O19C20N22C24(°)	-50,419	61,909	-81,322	-47,865	-57,139
H35C18O19O21(°)	16,904	14,126	30,965	6,443	18,886
HOMO (eV)	-8,50	-8,76	-8,65	-8,88	-5,69
LUMO (eV)	-0,13	0,02	-0,24	0,32	-0,64
H10N40N45O29	152,938	4,735	-17,156	-100,428	134,228
Dist. SEH- a (Å)	2,135	2,131	1,834	2,118	1,905
Dist. SEH- b (Å)	2,634	5,647	2,472	2,708	1,782
Dist. SEH- c (Å)	3,442	5,07	3,320	2,380	2,898

SEH- RIVASTIGMINA

O complexo formado entre a RIVA e a SEH é mostrado na Figura 36. Sugere uma interação eletrostática fraca entre o oxigênio da hidroxila da Ser200 e um dos grupos metila da RIVA (3,895 Å).

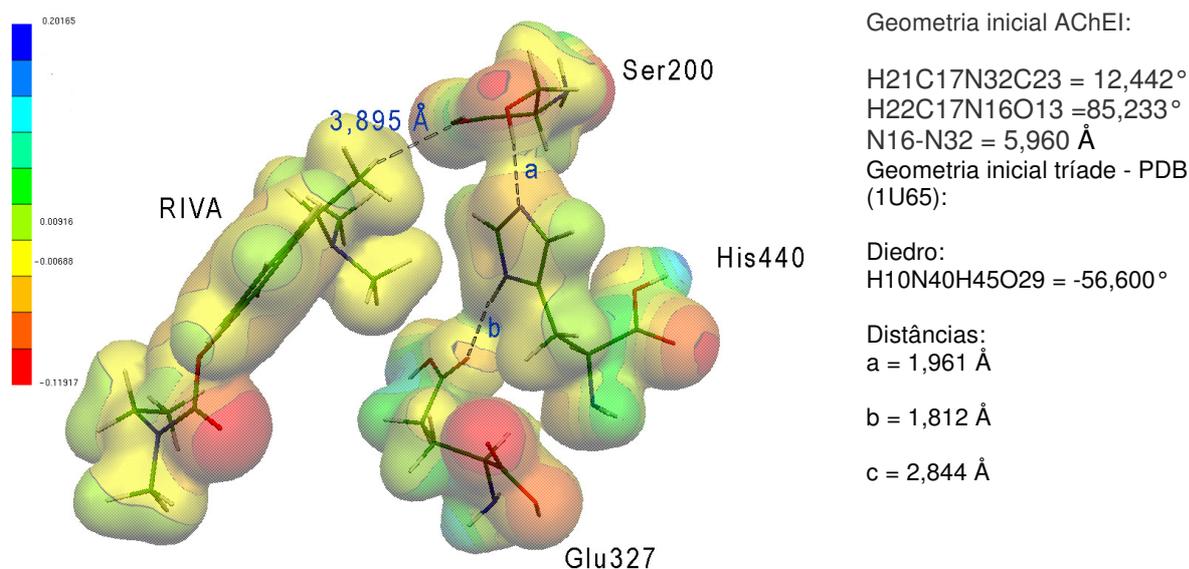


Figura 36. Mapa de potencial eletrostático do sistema SEH - RIVA nível B3LYP/6-31G*.

As distâncias características da SEH **a** (1,927 Å), **b** (1,799 Å) e **c** (2,970 Å) calculadas mantêm as propriedades da tríade (Tabela 20). Verificou-se uma ligeira diminuição da energia do orbital HOMO (-5,31 eV), do complexo formado em relação aos orbitais dos sistemas SEH (-6,04 eV) e RIVA (-5,59 eV), o que pode justificar a fraca interação formada.

Tabela 20. Principais modificações estruturais (ângulos e distâncias) e eletrônicas calculadas na otimização do sistema SEH- RIVA.

	AM1	AM1-Solv.	PM3	PM3-Solv.	B3LYP/6-31G*
H26C14C10N27(°)	-23,595	-24,099	-10,045	-22,981	-47,555
N16-N32 (Å)	7,481	7,609	7,216	6,725	6,945
HOMO (eV)	-7,24	-9,23	-7,58	-9,42	-5,31
LUMO (eV)	0,40	0,05	0,34	-0,16	-1,04
H10N40N45O29	-82,433	72,976	68,232	94,484	-112,154
Dist. SEH- a (Å)	2,199	2,124	1,802	2,525	1,927
Dist. SEH- b (Å)	2,708	4,292	1,779	3,637	1,799
Dist. SEH- c (Å)	3,427	4,020	3,690	2,628	2,970

SEH- TACRINA

A THA interage com a tríade catalítica da AChE por meio de ligações de hidrogênio (Glu327 = 2,624 Å) e interações eletrostáticas fracas do tipo forças de van der Waals com os demais resíduos (Figura 37).

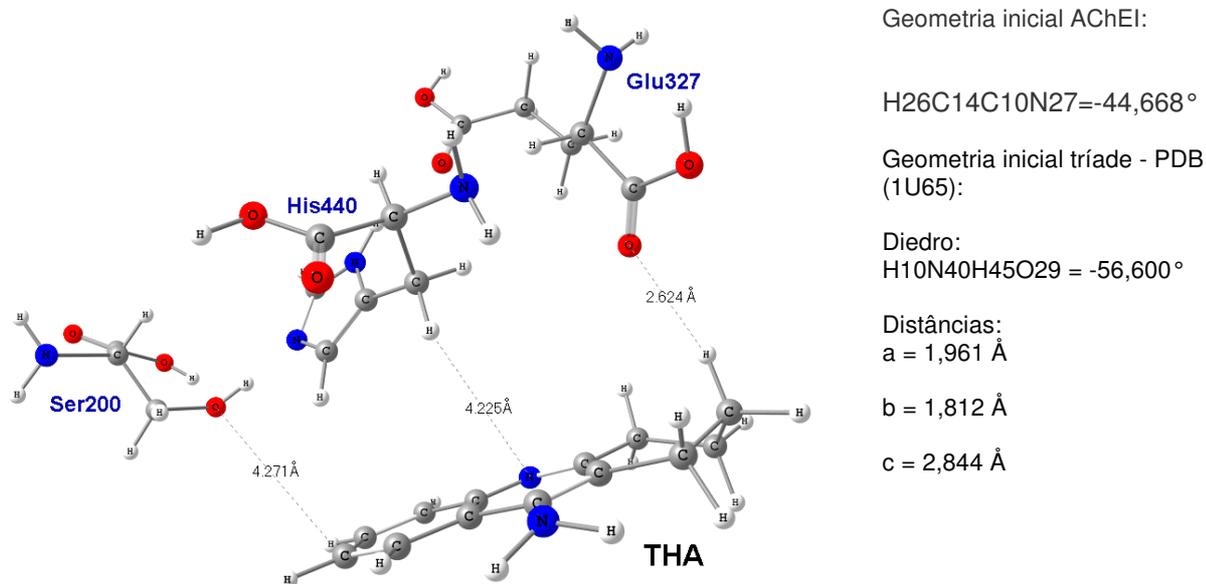


Figura 37. Geometria otimizada do sistema SEH – THA nível B3LYP/6-31G*.

Como mostrado na Tabela 21 há modificação significativa do diedro da SEH, e ligeiras modificações no tamanho das distâncias **a**, **b** e **c**, sugerindo que a THA interage com os resíduos da tríade sem desativar sua função.

Tabela 21. Principais modificações estruturais (ângulos e distâncias) e eletrônicas determinadas na otimização do sistema SEH- THA.

	AM1	AM1-S	PM3	PM3-S	DFT/B3LYP_6-31G*
H22C17N16O13(°)	62,372	-43,248	-98,183	-36,150	-41,416
HOMO (eV)	-8,77	-8,62	-8,32	-8,71	-5,61
LUMO (eV)	-0,78	-0,56	-0,29	-0,80	-1,54
H10N40N45O29	145,994	-148,299	-38,262	-45,530	-154,188
Int. SEH- a (Å)	2,049	2,110	1,831	1,798	2,024
Int. SEH- b (Å)	2,649	4,318	1,779	1,766	1,736
Int. SEH- c (Å)	3,510	3,214	3,164	3,579	2,908

A Tabela 22 apresenta os resultados gerais de todos os complexos AChEIs-SEH. Como se pode verificar a PHEN é a que menos estabiliza o valor do orbital HOMO com relação a SEH, enquanto que a DDVP e a METRI são as que mais estabilizam o HOMO,

portanto as mais estáveis. Estas três últimas AChEIs e a THA são as que apresentam menor variação no ângulo H10N40N45O29. As distâncias **a**, **b**, e **c** apresentam menor variação com relação a SEH, com exceção da DIMTHA e HUPE.

Tabela 22. Visão geral dos resultados B3LYP/6-31G* dos complexos AChEI-SEH.

	H10N40N45O29 (°)	a (Å)	b (Å)	c (Å)	HOMO(eV)	LUMO(eV)
<i>PDB</i>	-56,60	1,961	1,812	2,844	-	-
<i>SEH</i>	-137,60	2,065	1,943	2,922	-6,04	-0,96
<i>SEH-DDVP</i>	-146,73	2,161	1,811	2,908	-6,44	-1,09
<i>SEH-DIMTHA</i>	-179,85	2,000	1,803	4,441	-582	-2,1
<i>SEH-E2020</i>	22,69	1,922	1,818	3,439	-5,87	-1,56
<i>SEH-GALA</i>	-178,02	1,888	1,797	3,309	-5,96	-0,92
<i>SEH-HUPE</i>	42,90	1,846	1,727	3,829	-6,02	-1,61
<i>SEH-METRI</i>	-119,30	1,965	1,812	2,844	-6,23	-1,09
<i>SEH-PHEN</i>	-143,41	1,995	1,747	2,996	-4,62	-1,52
<i>SEH-PHYSO</i>	134,228	1,905	1,782	2,898	-5,69	-0,64
<i>SEH-RIVA</i>	-112,154	1,927	1,799	2,970	-5,31	-1,04
<i>SEH-THA</i>	-154,188	2,024	1,736	2,908	-5,61	-1,54

3.1.1.3 Interações Receptor-Ligante (R-L) do sistema GORGE-AChEI

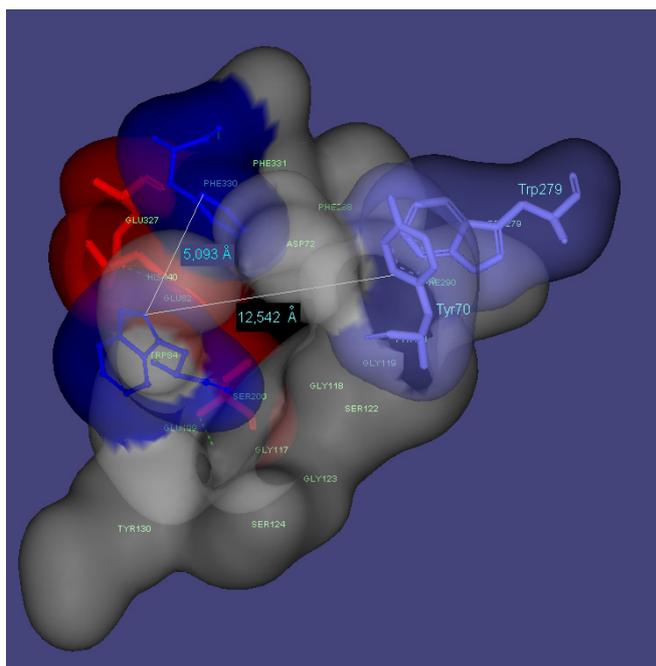
Foram realizados cálculos para avaliar qualitativamente a interação e o reconhecimento molecular entre os resíduos do sítio ativo da AChE (GORGE) e as AChEIs. O sítio ativo é composto principalmente pelos resíduos Asn65-Gln69-Tyr70-Asp72-Ser81-Trp84-Gly117-Gly118-Gly119-Tyr121-Ser122-Gly123-Ser124-Tyr130-Glu199-Ser200-Ala201-Trp279-Ser286-Phe288-Phe290-Glu327-Phe330-Phe331-His440.

Utilizando-se a metodologia do LocalSCF, nos níveis semi-empírico AM1, PM3 no vácuo e em meio solvatado, pelo método COSMO, foram obtidos dados de distâncias de interação, formação de ligação hidrogênio, interações eletrostáticas entre as AChEIs e os resíduos do GORGE.

Devido a similaridade nos resultados obtidos, serão apresentados os parâmetros relativos ao nível semi-empírico PM3 em meio solvatado, o qual pode representar de forma simplificada o ambiente intracelular, onde ocorre a interação entre a AChE e as drogas inibidoras de sua função biológica.

Foram observadas alterações estruturais da tríade catalítica – Ser200-Glu327-His440 na formação do complexo por meio das distâncias de interação destes resíduos, previamente medidos no arquivo PDB 1U65 ($a=1,961\text{Å}$ $b=1,812\text{Å}$ e $c=2,844\text{Å}$), já descrito neste trabalho, bem como o ângulo torsional de diedro ($H10N40H45O29= -56,600^\circ$) que caracteriza essa tríade.

GORGE



SEH			
a (Å)	b(Å)	c(Å)	H10N40H45O29(°)
1,961	1,785	2,740	-150,245

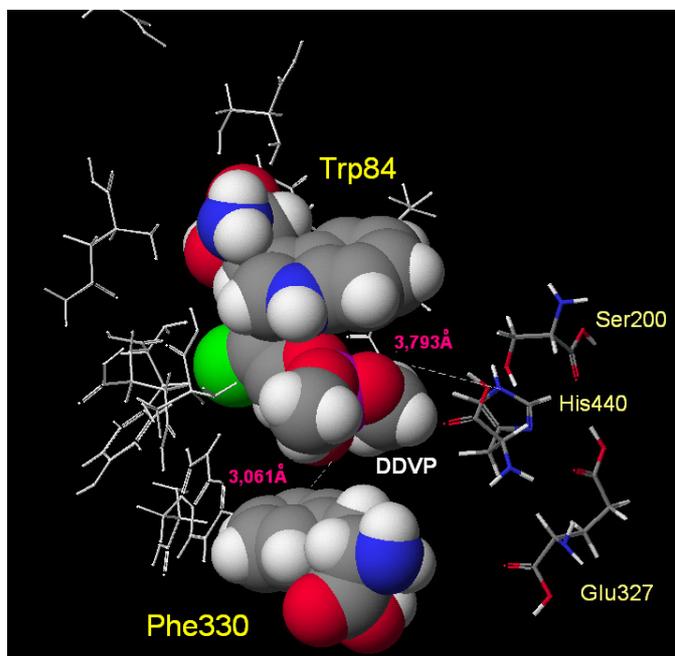
Figura 38. Superfície do GORGE, geometria otimizada com LocalSCF-PM3 (COSMO).

O GORGE está representado na Figura 38, onde está evidenciada a tríade catalítica na região em vermelho. Segundo os parâmetros **a**, **b** e **c**, e o ângulo de diedro mensurados, a estrutura foi mantida constante com distância pertinente com a formação de ligações de hidrogênio.

A região em azul escuro corresponde aos resíduos do sítio ligante de amônio quaternário, Trp84 e Phe330, envolvidos diretamente na atividade das AChEs, por fazerem interações do tipo π - π entre os anéis aromáticos, principalmente o Trp84 com interações localizadas no seu anel indólico.

A região azul clara mostra os resíduos do sítio periférico da AChE, localizados na entrada do GORGE. AChEs com tamanhos maiores que 7,000 Å podem interagir com os este sítio, além de interagirem com os resíduos aromáticos do sítio subsequente, por meio de interações fracas do tipo van der Waals, cátion- π , e π - π . A distância entre os resíduos Trp84 e Tyr70 (12,542 Å) é suficiente para garantir a interação entre regiões ricas em elétrons π das AChEs. Juntos, o sítio ligante de nitrogênio quaternário e o sítio periférico recebem o nome de sítio aromático da AChE.

GORGE - DDVP



SEH			
a (Å)	b(Å)	c(Å)	H10N40H45O29(°)
6,069	5,851	3,458	34,185

Figura 39. Superfície otimizada do complexo GORGE-DDVP LocalSCF/PM3 (COSMO).

Os dados obtidos neste estudo mostram que o DDVP apresenta baixa afinidade com a tríade catalítica, fazendo apenas uma ligação de hidrogênio muito fraca (3,793 Å) entre o hidrogênio da hidroxila da His440 com seu oxigênio.

Nas estruturas otimizadas foram observadas interações mais significativas entre os resíduos do sítio aromático. A Figura 39 mostra que o DDVP está localizado entre o Trp84 e o Phe330, formando uma espécie de sanduíche, por interações do tipo π - π entre os anéis aromáticos destes resíduos e os elétrons π dos átomos de oxigênio do DDVP.

GORGE - DIMTHA

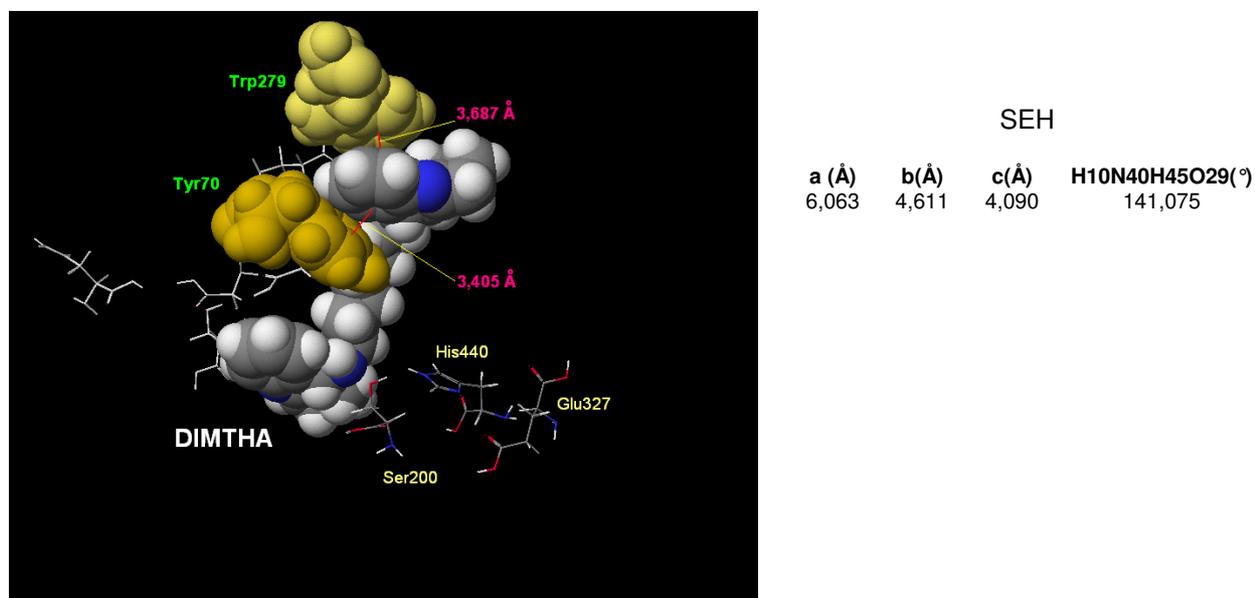


Figura 40. Principais interações do complexo GORGE-DIMTHA LocalSCF/PM3 (COSMO).

Como mostra a Figura 40, a DIMTHA interage com o sítio periférico da AChE por meio de interações eletrostáticas fracas do tipo van der Waals e π - π . Os resíduos Trp279 e Tyr70 são os principais responsáveis pelo reconhecimento desta AChEI no GORGE.

GORGE - E2020

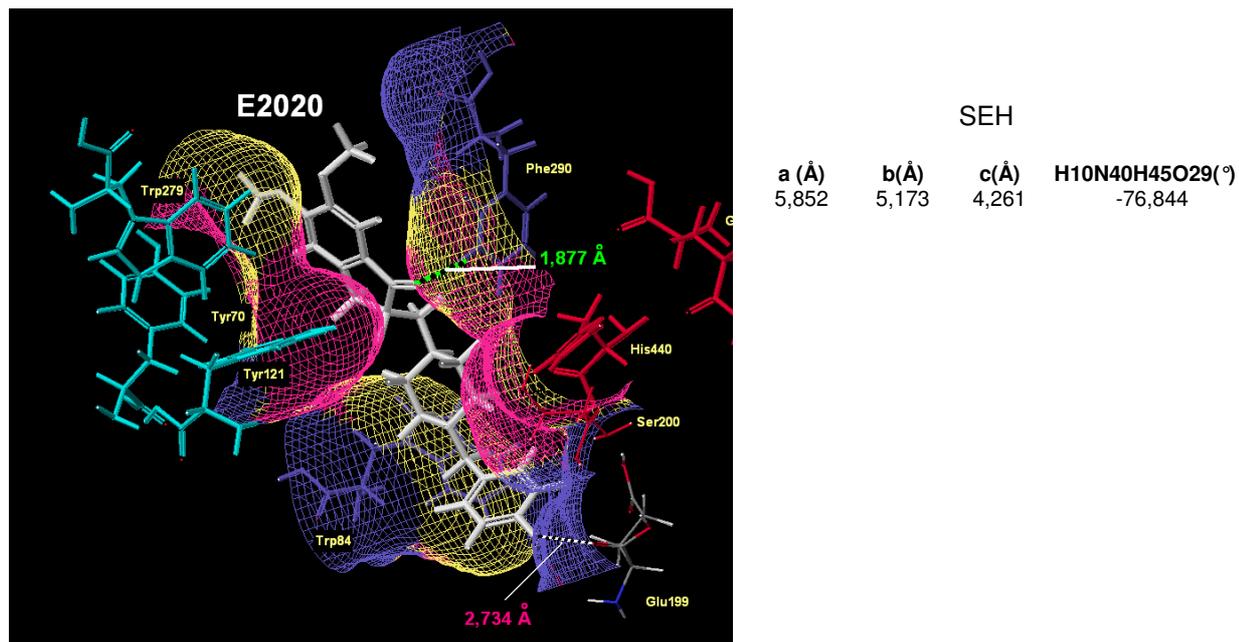


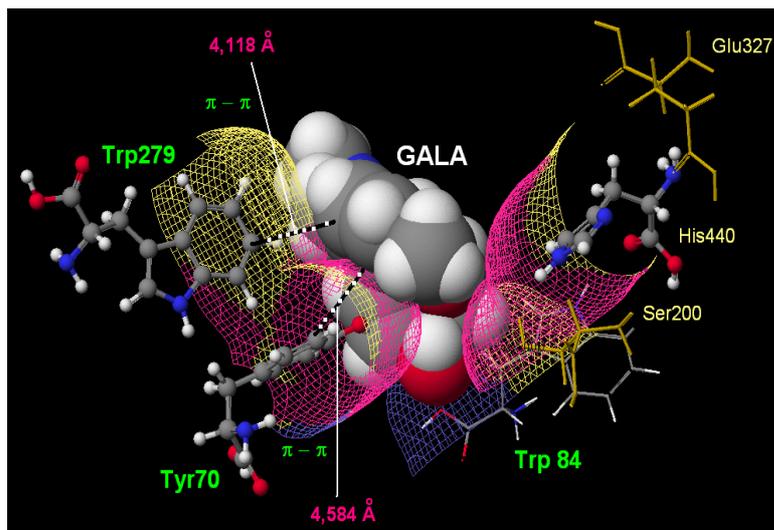
Figura 41. Principais interações do complexo GORGE-E2020 LocalSCF/PM3 (COSMO).

As interações entre a E2020 e os resíduos do GORGE estão representadas na Figura 41. As ligações de hidrogênio formadas entre a carbonila da parte dimetoxindanona da E2020 com o resíduo hidrogênio benzílico do Phe290 (1,887 Å) e o hidrogênio benzílico da E2020 com a carbonila do Glu199 (2,734 Å) mostram como esta AChEI, aprovada pelo FDA e largamente utilizada no tratamento da DA, interage com o GORGE da AChE.

Diferentemente do que afirma Kryger e colaboradores em estudos de docking molecular da E2020 com a AChE e utilizando dinâmica molecular, o reconhecimento da E2020 pelo Phe290 (1,887 Å) observado neste trabalho é mais acentuado do que pelo Phe330 (3,700 Å) ²⁸.

São ainda observadas interações entre os anéis aromáticos da E2020 e os resíduos Trp84, Tyr70, Tyr121 e Trp279, evidenciando que esta AChEI é reconhecida principalmente pelo sítio aromático da AChE.

GORGE - GALA



SEH

a (Å)	b(Å)	c(Å)	H10N40H45O29(°)
6,214	5,141	3,696	-12,607

Diedro GALA:

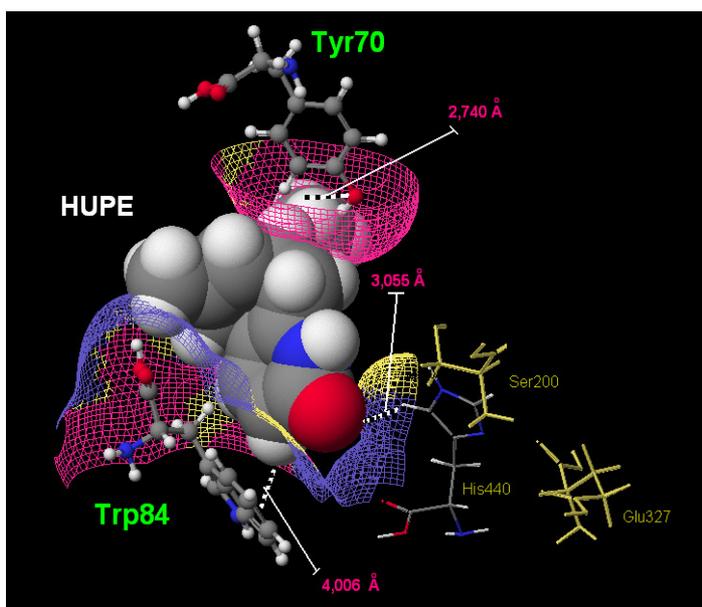
H39O20O7O19=	22,127°
(pdb: 1DX6=)	-87,802°

Figura 42. Principais interações do complexo GORGE-GALA LocalSCF/PM3 (COSMO).

Em contraste com os resultados obtidos por Greenblat e colaboradores (1999), em estudos de docking molecular com GALA e a AChE, a AChEI participa de interação do tipo π - π mais forte com o anel indólico do Trp279 (4,118 Å), Figura 42, do que com o anel indólico do Trp84 (4,770 Å), e não o contrário como afirma o pesquisador²⁸.

A GALA faz interação fraca entre o oxigênio do seu grupo metoxi e o hidrogênio do grupo amino do anel imidazol da His440 (4,103 Å). Estes resultados demonstram que esta AChEI atua no GORGE da AChE formando várias interações fracas.

GORGE - HUPE



SEH

a (Å)	b(Å)	c(Å)	H10N40H45O29(°)
6,163	5,055	3,800	-13,727

Figura 43. Principais interações do complexo GORGE-HUPE LocalSCF/PM3 (COSMO).

Como observado por Raves e colaboradores (1997) na estrutura cristalográfica da HUPE há interações de menor distância entre a AChEI e o resíduo Trp84 (4,006 Å) do que o encontrado por Greenblat para a GALA³⁵ (4,770 Å). Porém, foi verificado neste estudo que há formação de ligação de hidrogênio entre um hidrogênio da HUPE e a hidroxila do Tyr70 (2,740 Å) e entre a sua carbonila e o hidrogênio do anel imidazol da His440 (3,055 Å). Esses resultados estão de acordo com aqueles apresentados por Raves et al. e indicam que a HUPE apresenta maior afinidade pelo GROGE do que GALA.

GORGE - METRI

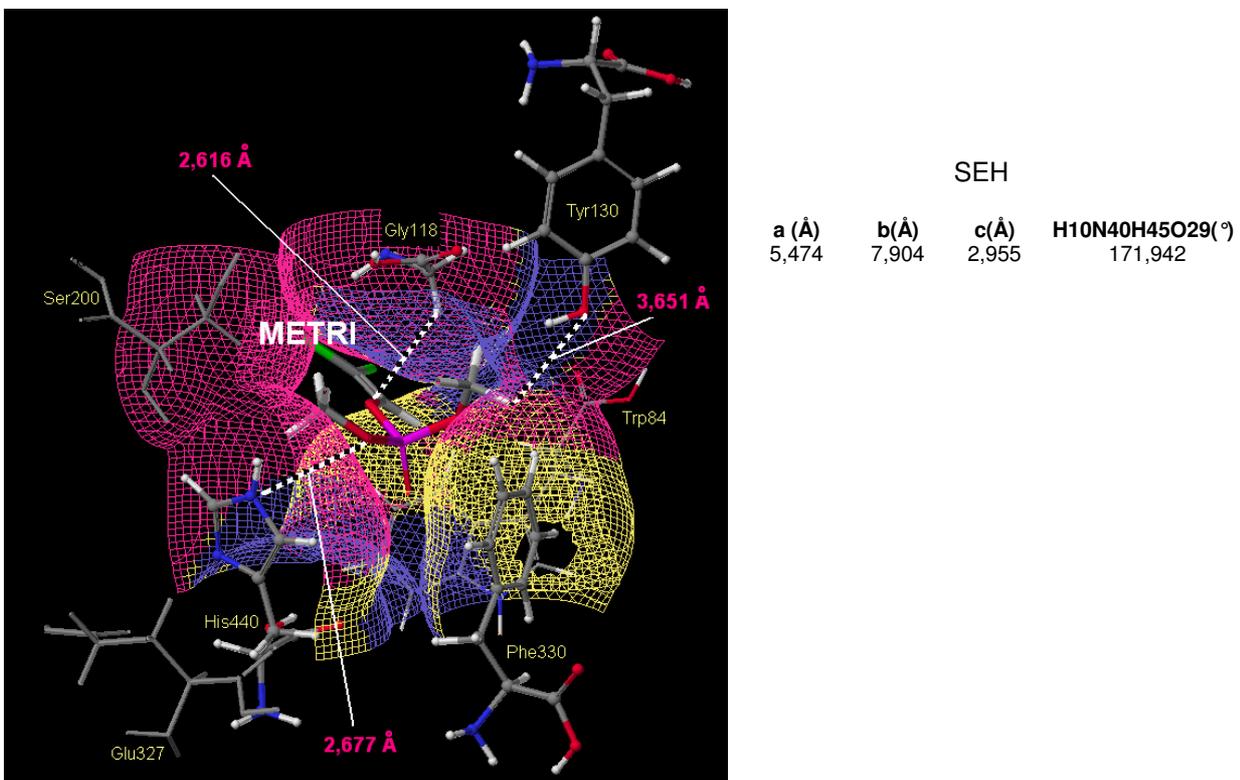
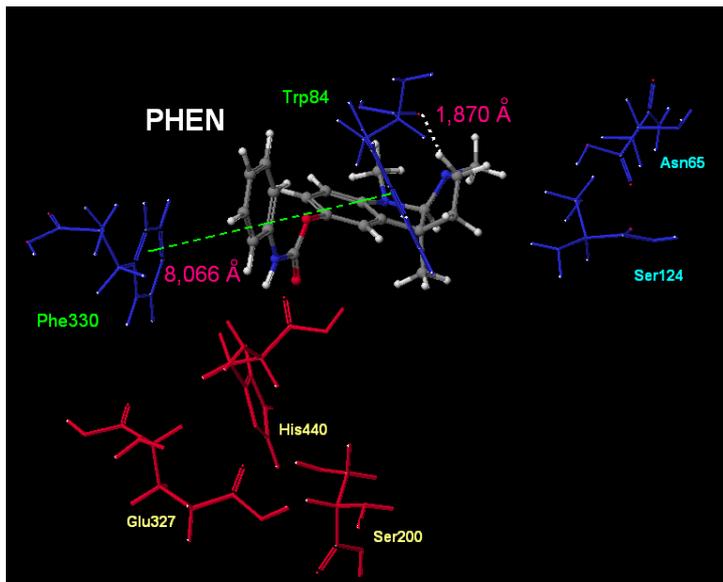


Figura 44. Principais interações do complexo GORGE-METRI LocalSCF/PM3 (COSMO).

Para METRI, observa-se que esta interage com o resíduo His440 da tríade catalítica formando uma ligação hidrogênio forte (2,667 Å). É citado que esta AChEI forma ligação covalente com a tríade catalítica da AChE, promovendo um complexo estável (pseudo-reversível), por meio de uma acilação da Ser200¹⁴. Nestas estruturas foram observadas, também, interações do tipo π - π com os resíduos sítio aromático do GORGE, Figura 44.

GORGE - PHEN

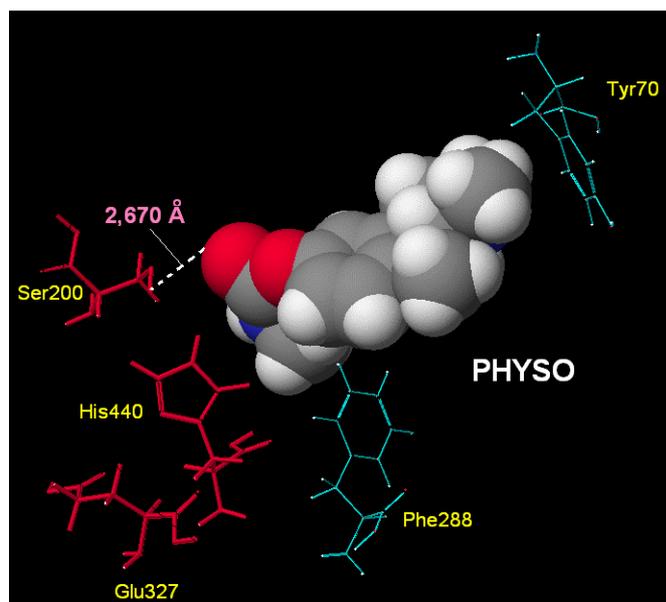


SEH			
a (Å)	b (Å)	c (Å)	H10N40H45O29(°)
6,236	4,665	3,564	11,469

Figura 45. Principais interações do complexo GORGE-PHEN LocalSCF/PM3 (COSMO).

A PHEN é um análogo da fisostigmina, altamente seletiva para AChE⁹. A Figura 45 mostra algumas interações encontradas neste estudo, a que mais chama a atenção é entre um hidrogênio do anel pirrol da PHEN e a carbonila do Trp84 (1,870 Å).

GORGE - PHYSO



SEH			
a (Å)	b (Å)	c (Å)	H10N40H45O29(°)
6,168	4,764	3,453	-14,764

Figura 46. Principais interações do complexo GORGE-PHYSO LocalSCF/PM3 (COSMO).

A Figura 46, mostra a PHYSO representada pelo modelo de bolas (raio de van der Waals) interagindo com vários resíduos aromáticos. Todos os grupos metilas da AChEI

estão interagindo com os anéis aromáticos dos resíduos. O anel benzênico da PHYSO está fazendo interação do tipo T (π - π) com o anel benzênico do Phe288.

Foi observada uma ligação de hidrogênio forte entre a carbonila da PHYSO e a hidroxila do resíduo Ser200 (2,670 Å), o que demonstra a grande afinidade desta droga com a tríade catalítica.

GORGE - RIVA

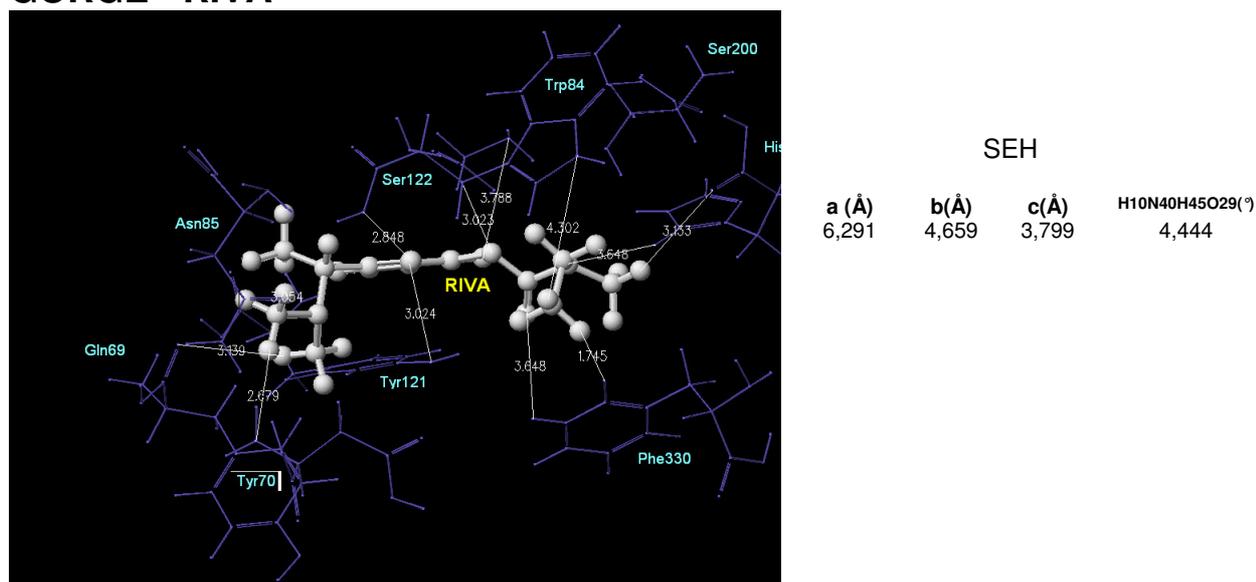


Figura 47. Principais interações do complexo GORGE-RIVA LocalSCF/PM3 (COSMO).

Conforme mostrado na Figura 47, a RIVA interage de forma intensa e efetiva com os principais resíduos do GORGE. Forma ligação de hidrogênio com a Ser122 (2,848 Å), em contraste resultados de docking realizados que citam ser esta interação mais forte com o resíduo Ser200 (~1,39 Å)³⁰, na qual a AChEI formaria uma ligação covalente (carbamilação).

GORGE - THA

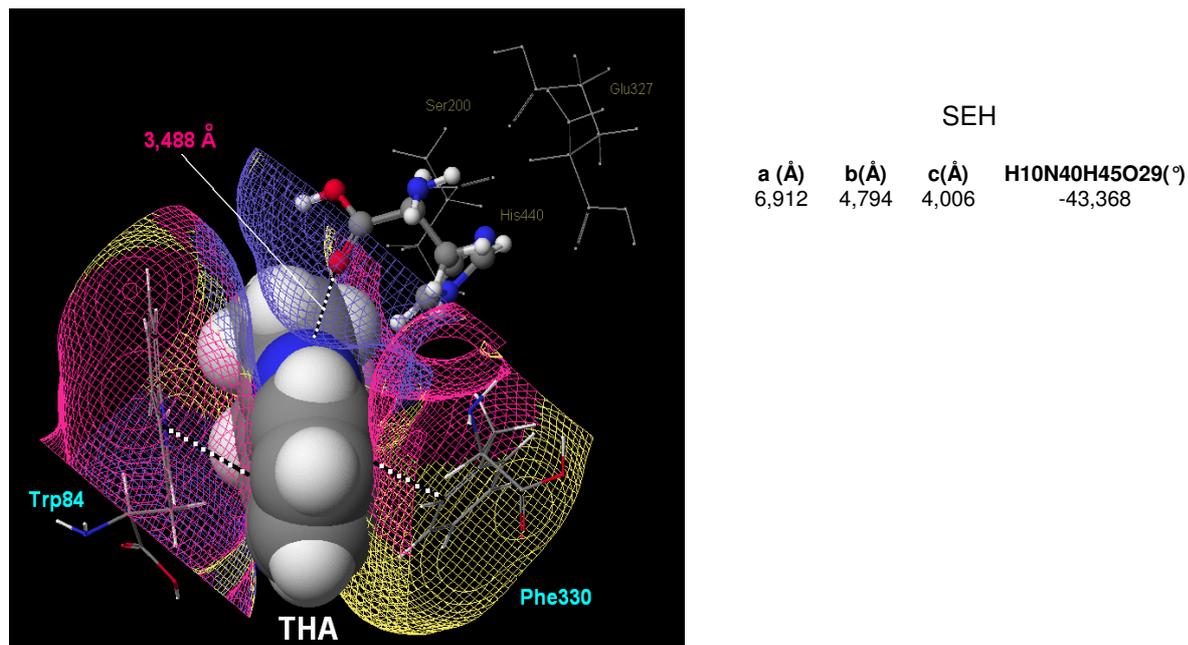


Figura 48. Principais interações do complexo GORGE-THA LocalSCF/PM3 (COSMO).

Estudos de “docking” mostram que a THA complexa com a AChE por meio de um empilhamento dos anéis da acridinaminicos com os resíduos Trp84 e Phe330 e que a droga é reconhecida molecularmente por formar ligação hidrogênio com o resíduo His440 da tríade catalítica ²⁰. No presente trabalho, foram observadas as interações da THA do tipo π - π stacking com os resíduos TRP84 (4,233 Å) e PHE330 (3,736 Å), além da formação de ligação hidrogênio da droga com o resíduo HIS440 (3,488 Å), corroborando com os estudos de docking molecular.

3.1.1.4 Mudanças conformacionais e energia de interação do sistema SEH-AChEI

Conforme observado nas Figuras 38 a 48, todas as principais distâncias de interação por ligação hidrogênio da tríade catalítica da AChE sofreram desvios acentuados, quando forma complexo com as AChEIs. Além disso, foi verificado, para todos os complexos, uma variação no ângulo de diedro formado entre os três resíduos da tríade superiores a 100°.

A energia de interação entre os sistemas SEH-AChEIs foram determinadas levando-se em consideração os calores de formação obtidos nos cálculos PM3 e PM3-S. Considera-se, neste trabalho, a energia de interação (E_i) a variação entre os calores de formação do sistema SEH-AChEI ($E_{SEH-AChEI}$) e a soma das energias de formação individuais dos sistemas SEH e AChEI ($E_{SEH} + E_{AChEI}$) isolados, segundo a Equação 27.

$$E_i = E_{SEH-AChEI} - (E_{SEH} + E_{AChEI}) \quad (27)$$

Tabela 23. Energias de interação para os sistemas SEH-AChEIs (kcal.mol⁻¹).

	DDVP	DIMTHA	E2020	GALA	HUPE	METRI	PHEN	PHYSO	RIVA	THA
<i>PM3</i>	-66,21	11,51	-1,18	-22,85	-159,52	-31,83	-159,22	-58,37	-26,63	-5,95
<i>PM3-S</i>	7,28	86,57	7,13	0,71	-36,77	4,71	10,33	0,46	-0,86	2,01
<i>B3LYP</i> <i>/6-31G*</i>	19,554	12,896	63,159	57,053	33,821	16,675	55,391	24,091	-1,210	120,357

As energias de interação para os sistemas SEH-AChEIs no nível de cálculo PM3 são todas negativas, excetuando o sistema SEH-DIMTHA (11,51 kcal.mol⁻¹). No nível de cálculo B3LYP/6-31G* as energias de interação são todas positivas, exceto para o sistema SEH-RIVA (-1,210 kcal.mol⁻¹). Os valores da Tabela 23 mostram que o solvente influencia as interações entre a tríade catalítica da AChE e as AChEIs. Os valores positivos para a maioria das energias de interação quando o sistema SEH-AChEI foi solvatado pelo método de solvente contínuo COSMO mostram que o solvente desfavorece a formação do complexo SEH-AChEI, excetuando as drogas HUPE e RIVA no qual o solvente participa na formação dos complexos.

Os valores positivos para energia de interação indicam que a interação entre a maioria das AChEIs e a tríade tem caráter não-covalente na interface de formação do

complexo. Na presença do solvente as AChEIs têm seus graus de liberdade reduzidos devido a interação com moléculas do mesmo, isto contribui para uma menor interação entre as drogas e a tríade.

3.2 Energia do orbital de fronteira HOMO e GAP: Variações entre os sistemas AChEI e SEH-AChEI

É observado uma diminuição do valor da energia do orbital de fronteira HOMO das AChEIs quando elas interagem com a tríade da AChE em relação ao HOMO da tríade. A Figura 49 mostra as energias, em módulo, dos orbitais HOMO das AChEIs e do sistema SEH-AChEIs obtidas utilizando o método DFT, com o funcional híbrido B3LYP e a função de base 6-31G*.

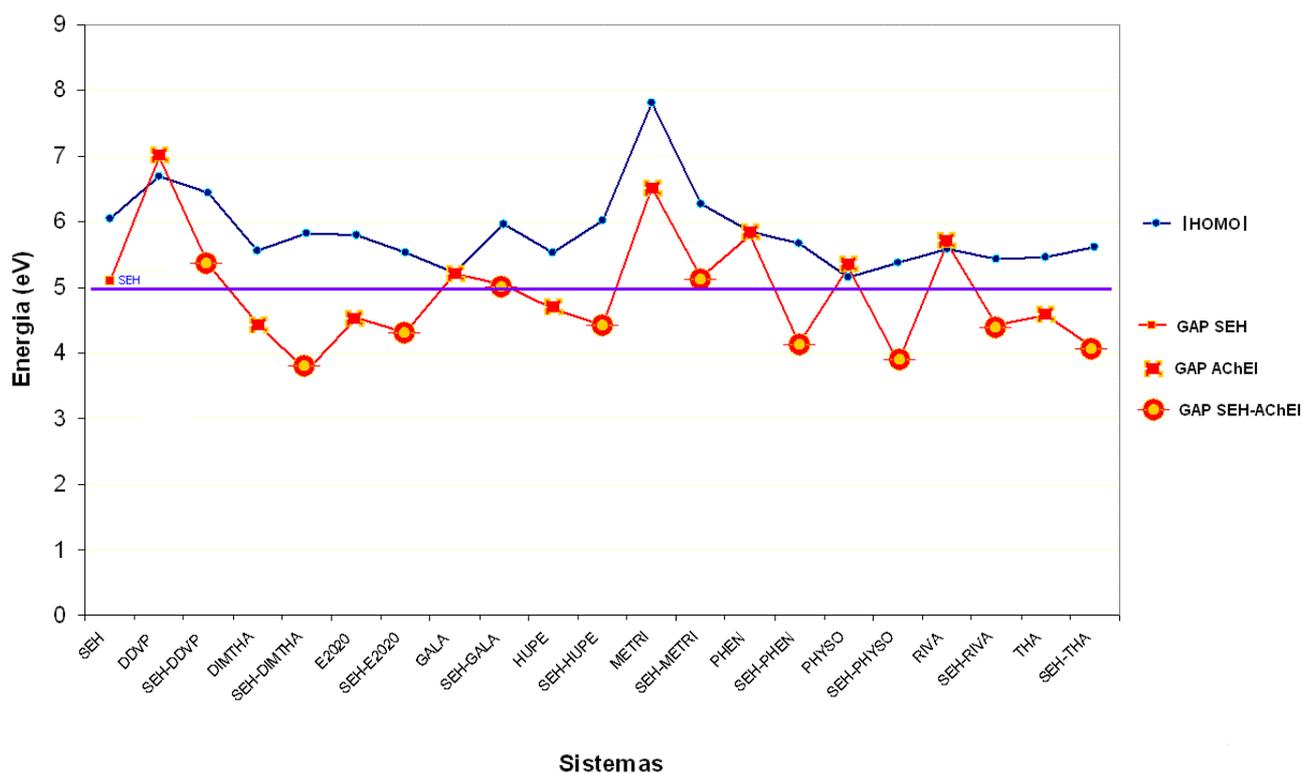


Figura 49. Energia do |HOMO| e do GAP (LUMO-HOMO) das AChEIs e dos sistemas SHE-AChEIs para o nível B3LYP/6-31G*. O tracejado contínuo é apenas para visualização.

O GAP (LUMO-HOMO) do sistema SEH-AChEIS tem uma queda acentuada em relação ao GAP das AChEIs (Figura 49). Os sistemas SEH-AChEIs das drogas DIMTHA,

E2020, HUPE, PHEN, PHYSO, RIVA e THA mostram os maiores decréscimos do GAP quando comparados com o GAP da SEH, isto indica o aumento da reatividade para a interação SEH-AChEIs. É sabido que as drogas PHEN, PHYSO e RIVA interagem de forma pseudo-irreversível com a AChE, fato que pode ser corroborado pelos dados obtidos neste trabalho.

Drogas com maior possibilidade de formação de ligação de covalente com a AChE, quando complexadas com a tríade catalítica mostraram valor do orbital HOMO muito maior que o orbital da tríade sem a droga.

3.3 Análise dos Componentes Principais dos sistemas AChEI

Para a análise das componentes principais foram realizadas otimizações de geometria nos níveis AM1, PM3, RHF/6-31G*, RHF/6-31+G(d,p), RHF-Solvente/6-31G*, B3LYP/6-31G*, B3LYP/6-31+G(d,p). Para melhor visualização dos resultados, apenas as propriedades das AChEIs no nível B3LYP/6-31+G(d,p) são mostradas na Tabela 24. A PCA mostra que em média 82,0% das informações que formam um conjunto com as 10 AChEIs estudadas neste trabalho e 18 propriedades (Tabela 25), obtidas por meio dos níveis de cálculo utilizados, neste trabalho, podem ser representadas por quatro componentes principais. Assim, é válido afirmar que as propriedades observadas e traçadas nos gráficos de escores PC1 x PC2 X PC3 x PC4 representam em até 86,4%, como mostrada na Tabela 25, as principais propriedades que caracterizam essas drogas e sua função em comum: inibidor da AChE.

Tabela 24. Propriedades das AChEIs no nível B3LYP/6-31+G(d,p)†

AChEIs	DDVP	DIMTHA	E2020	GALA	HUPE	METRI	PHEN	PHYSO	RIVA	THA
<i>DF/B3LYP</i>	6-31+G(d,p)									
HOMO (eV)	-6,86	-5,90	-5,95	-5,05	-5,90	-8,11	-5,23	-5,46	-5,79	-5,75
LUMO (eV)	-0,54	-1,47	-1,54	0,48	-1,30	-1,59	0,52	-0,34	-0,43	-1,27
GAP (eV)	6,32	4,47	4,41	5,53	4,60	6,52	5,75	5,12	5,36	4,49
Volume(Å ³)	185	606	454	329	286	207	391	321	312	236
Tamanho(Å)	7,849	19,386	12,254	10,290	9,051	7,068	14,808	12,927	11,242	9,516
H-H (Å)	1,796	1,998	2,342	2,369	1,625	2,307	2,491	2,319	2,460	1,683
Dipolo (De)	3,06	2,09	2,67	1,67	6,04	2,94	2,20	1,08	2,63	3,51
Carga do H	0,071	0,260	0,150	0,340	0,364	0,438	0,092	0,320	0,1360	0,900
Carga Het.	-0,638	-0,32	-0,470	-0,470	-1,013	-0,639	-0,826	-0,480	-0,594	-0,63
PSA	44,8	58,5	38,8	41,9	58,9	55,8	44,9	44,8	32,8	38,9
Sist. Aromá.	0	4	3	2	1	0	1	2	1	2
HOMO-1(eV)	-8,57	-6,71	-6,07	-6,03	-6,75	-8,30	-6,07	-6,08	-6,53	-6,56
LUMO+1(eV)	0,42	-0,58	-0,48	-0,14	0,36	0,70	0,51	-0,07	0,21	-0,46
H _{rec}	4	4	4	4	4	4	5	5	4	2
H _{don}	0	4	0	1	2	1	1	1	0	2
logP	1,66	3,88	4,14	1,39	2,60	0,80	2,99	1,94	2,86	3,13
logS	-1,44	-4,98	-4,93	-2,23	-2,47	-1,77	-4,2	-2,44	-1,89	-3,16
Grav. de liberdade	4	9	2	1	0	4	2	3	6	0
Energia SCF	-1719,3439	-1500,7622	-1212,5023	-940,6846	-967,2005	-2180,1257	-1096,1629	-898,9638	-806,7532	-613,9925

Tabela 25. Variâncias acumuladas considerando 10 AChEIs e 18 propriedades.

<i>Nível de Cálculo</i>	<i>Variância Acumulada PC1 (%)</i>	<i>Variância Acumulada PC2 (%)</i>	<i>Variância Acumulada PC3 (%)</i>	<i>Variância Acumulada PC4 (%)</i>
AM1	53,4	69,6	79,2	85,8
PM3	38,6	61,1	73,5	82,8
RHF/6-31G*	40,5	59,8	72,9	81,9
RHF/6-31+G(d,p)	36,4	58,1	72,2	82,9
RHF-S/6-31G*(a)	43,5	63,8	76,8	86,4
B3LYP/6-31G*	42,5	63,1	75,5	84,8
B3LYP/6-31+G(d,p)	38,3	59,2	73,2	83,3

(a) RHF-S, cálculo RHF usando modelo de solvente contínuo PCM

Para aumentar a acurácia e determinar de forma sistemática as componentes principais dos sistemas estudados, foram realizadas todas as combinações possíveis das 18 propriedades, Tabela 24, em todos os níveis de cálculo para todas as 10 AChEIs.

Reduzindo o número de variáveis para 6 (descritas a seguir), porém mantendo o espaço amostral de 10 objetos (AChEIs), observa-se até 94,4% (Tabela 26) das informações que caracterizam essas drogas como AChEIs. Em média 91,0% das informações contidas no conjunto das 10 AChEIs estudadas e 6 propriedades obtidas por meio de vários níveis de cálculo podem ser representadas por três componentes principais. Assim, é válido afirmar que as propriedades: Volume, tamanho da droga, distância entre os 2 hidrogênios mais ácidos H-H, energia do orbital de fronteira HOMO-1, coeficiente de partição logP e o número de sistemas aromáticos, calculados e traçados nos gráficos de escores da Figura 50, PC1 (com 63,5% da variância) x PC2 (com 19,1 % da variância) X PC3 (com 9,1% da variância), representam de forma satisfatória mais de 90% da variância de todo o conjunto de dados mostrados na Tabela 24, por exemplo.

Tabela 26. Variâncias acumuladas considerando 10 AChEIs e 6 propriedades.

Nível de Cálculo	Variância Acumulada PC1 (%)	Variância Acumulada PC2 (%)	Variância Acumulada PC3 (%)
AM1	57,7	80,6	94,4
PM3	67,3	86,5	92,6
RHF/6-31G*	69,5	87,6	93,9
RHF/6-31+G(d,p)	61,7	83,3	91,0
RHF-S/6-31G*	63,4	83,8	91,3
B3LYP/6-31G*	63,9	81,9	92,9
B3LYP/6-31+G(d,p)	63,5	82,6	91,7

A Tabela 27 mostra os coeficientes das PC1, PC2 e PC3 para todos os níveis de cálculos abordados nesse estudo, inclusive uma amostragem do sistema solvatado. A PC 1 representa, essencialmente, o volume e o tamanho da droga (parâmetros estruturais), a PC2 representa a distância H-H e a energia do orbital HOMO-1 (parâmetros estrutural e eletrônico) enquanto a PC3 representa principalmente a distância H-H. Os pesos (os coeficientes nas equações que definem a PCs.) estão marcados em negrito na Tabela 27 para enfatizar estes dados.

É importante observar que todas as 6 propriedades elencadas estão representadas na PC1 de forma positiva, ou seja, todas estas propriedades participam da primeira componente principal, todas são componentes importantes para representar o sistema, visto que em média 62% da variância é representada pela PC1, Tabela 26.

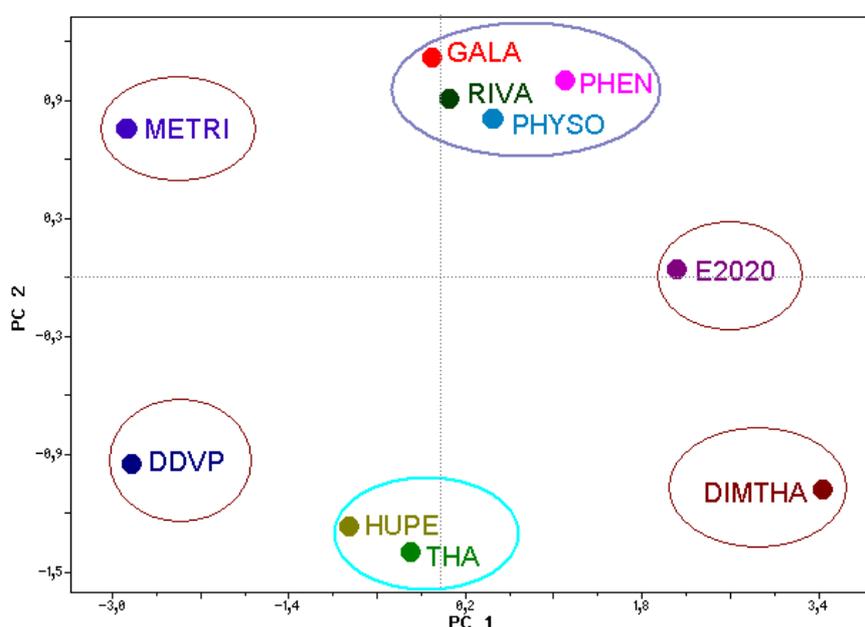
Tabela 27. Equações das PC1, PC2 e PC3 para os níveis de cálculos estudados.

AM1
PC1= 0,51793 _{volume} + 0,52262 _{Tamanho} + 0,01768 _{H-H} + 0,22324 _{HOMO-1} + 0,40834 _{logP} + 0,49166 _{Sist.Arom.}
PC2= 0,14124 _{volume} + 0,12950 _{Tamanho} + 0,69394 _{H-H} + 0,50972 _{HOMO-1} - 0,4345 _{logP} - 0,1819 _{Sist.Arom.}
PC3= 0,07176 _{volume} + 0,07186 _{Tamanho} + 0,63435 _{H-H} - 0,7458 _{HOMO-1} + 0,17533 _{logP} + 0,01820 _{Sist.Arom.}
PM3
PC1= 0,46471 _{volume} + 0,47826 _{Tamanho} + 0,03967 _{H-H} + 0,41926 _{HOMO-1} + 0,40400 _{logP} + 0,46340 _{Sist.Arom.}
PC2= 0,03607 _{volume} + 0,02113 _{Tamanho} + 0,90491 _{H-H} + 0,23836 _{HOMO-1} - 0,3466 _{logP} - 0,0488 _{Sist.Arom.}
PC3= 0,17042 _{volume} + 0,23636 _{Tamanho} + 0,34618 _{H-H} - 0,6741 _{HOMO-1} + 0,0041 _{logP} - 0,2807 _{Sist.Arom.}
RHF/6-31G*
PC1= 0,46346 _{volume} + 0,46860 _{Tamanho} + 0,17974 _{H-H} + 0,41254 _{HOMO-1} + 0,41032 _{logP} + 0,44131 _{Sist.Arom.}
PC2= 0,21725 _{volume} + 0,05485 _{Tamanho} + 0,88341 _{H-H} - 0,1398 _{HOMO-1} - 0,3197 _{logP} - 0,2181 _{Sist.Arom.}
PC3= -0,1326 _{volume} - 0,3426 _{Tamanho} + 0,05453 _{H-H} + 0,78566 _{HOMO-1} - 0,4622 _{logP} + 0,17627 _{Sist.Arom.}
RHF-S/6-31G*
PC1= 0,45120 _{volume} + 0,45090 _{Tamanho} + 0,13073 _{H-H} + 0,39605 _{HOMO-1} + 0,39499 _{logP} + 0,44210 _{Sist.Arom.}
PC2= 0,07989 _{volume} + 0,16413 _{Tamanho} + 0,76441 _{H-H} - 0,0165 _{HOMO-1} - 0,0112 _{logP} - 0,0903 _{Sist.Arom.}
PC3= 0,28599 _{volume} + 0,09197 _{Tamanho} + 0,34295 _{H-H} - 0,2633 _{HOMO-1} - 0,6838 _{logP} + 0,06504 _{Sist.Arom.}
RHF/6-31+G(d,p)
PC1= 0,43989 _{volume} + 0,45579 _{Tamanho} + 0,12443 _{H-H} + 0,40426 _{HOMO-1} + 0,40248 _{logP} + 0,45234 _{Sist.Arom.}
PC2= 0,26320 _{volume} + 0,12767 _{Tamanho} + 0,72974 _{H-H} - 0,1037 _{HOMO-1} - 0,0686 _{logP} - 0,1299 _{Sist.Arom.}
PC3= 0,01694 _{volume} - 0,0188 _{Tamanho} + 0,43447 _{H-H} + 0,05883 _{HOMO-1} - 0,6743 _{logP} + 0,13567 _{Sist.Arom.}
B3LYP/6-31G*
PC1=0,33196 _{volume} + 0,48077 _{Tamanho} + 0,49468 _{H-H} + 0,11101 _{HOMO-1} + 0,43269 _{logP} + 0,46305 _{Sist.Arom.}
PC2= -0,0334 _{volume} + 0,08975 _{Tamanho} + 0,12105 _{H-H} + 0,92930 _{HOMO-1} - 0,3077 _{logP} - 0,1338 _{Sist.Arom.}
PC3= 0,92896 _{volume} - 0,2751 _{Tamanho} - 0,1934 _{H-H} + 0,04848 _{HOMO-1} - 0,0508 _{logP} - 0,1377 _{Sist.Arom.}
B3LYP/6-31+G(d,p)
PC1= 0,48490 _{volume} + 0,46665 _{Tamanho} + 0,12768 _{H-H} + 0,37764 _{HOMO-1} + 0,41622 _{logP} + 0,46364 _{Sist.Arom.}
PC2= -00106 _{volume} + 0,02583 _{Tamanho} + 0,88224 _{H-H} + 0,27672 _{HOMO-1} - 3,3313 _{logP} - 0,1857 _{Sist.Arom.}
PC3= - 0,3792 _{volume} - 0,4129 _{Tamanho} - 0,1638 _{H-H} + 0,79272 _{HOMO-1} + 0,18205 _{logP} + 0,04200 _{Sist.Arom.}

Na Figura 50 observa-se que PC 1 tende a agrupar as AChEIs pelas seis propriedades selecionadas. Observa-se a formação de grupos de AChEIs bem definidos, três das cinco AChEIs já aprovadas pelo FDA no tratamento da DA se agrupam, formando um cluster, GALA, RIVA, PHYSO e PHEN. A distribuição ao longo de PC 1 é satisfatória, desde que as AChEIs com valores para volume parecidos se aproximam

consideravelmente – GALA/RIVA/PHYSO/PHEN e HUPE/THA. AChEIs com volume menores estão em escores negativos, já as AChEIs com volume entre 236 e 606 Å³ estão em escores positivos.

Por outro lado a PC 2 é dominada pela distância H-H (+0,88224), que separa os compostos, de acordo com a distância entre os dois hidrogênios mais ácidos, em dois grupos: o primeiro em que as AChEIs têm valores de H-H menores que 2,0 Å, o segundo grupo formado por objetos que tenham valores maiores que os citados. É clara a separação entre os grupos; verifica-se na Tabela 24. que a E2020 tem valores intermediários para todas as propriedades, exceto para logP, que tem coeficiente negativo e é elemento de dispersão da PC2.

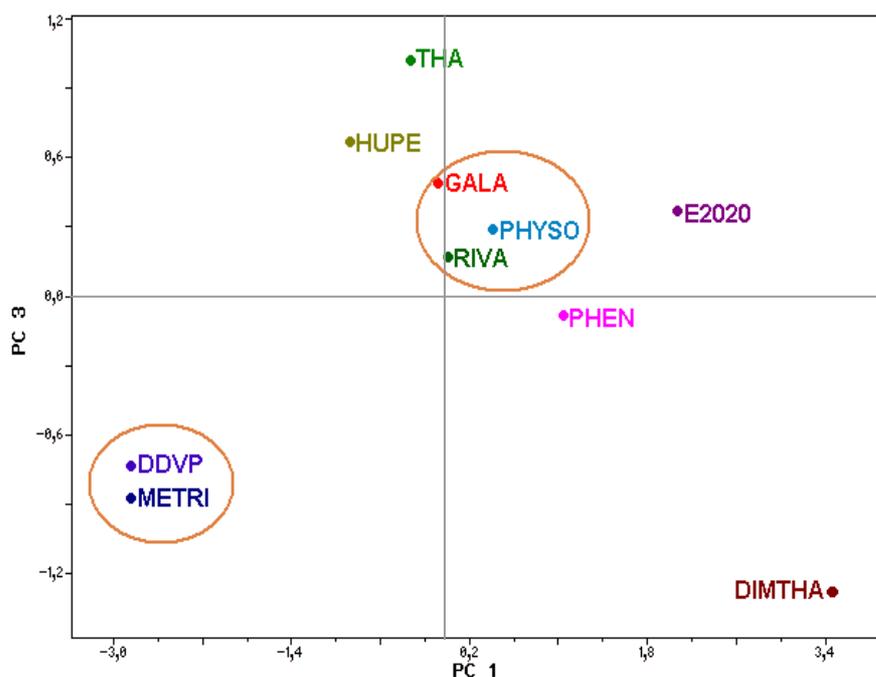


$$PC1 = 0,48490_{\text{volume}} + 0,46665_{\text{Tamanho}} + 0,12768_{\text{H-H}} + 0,37764_{\text{HOMO-1}} + 0,41622_{\text{logP}} + 0,46364_{\text{Sist.Arom.}}$$

$$PC2 = -0,01060_{\text{volume}} + 0,02583_{\text{Tamanho}} + 0,88224_{\text{H-H}} + 0,27672_{\text{HOMO-1}} - 0,33130_{\text{logP}} - 0,18570_{\text{Sist.Arom.}}$$

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

Na Figura 51, é apresentado o gráfico dos escores de PC1 versus PC3. Nessa Figura há 2 padrões em PC3 DDVP/METRI e GALA/PHYSO/RIVA, este é razoável, uma vez que PC3 é dominada pela energia do orbital HOMO-1 (+0,79272) (ver a equação que define PC3), essas AChEIs são as que apresentam valores próximos para o HOMO-1 e para o volume, como pode ser conferido na Tabela 24.



$$PC1 = 0,48490_{\text{volume}} + 0,46665_{\text{Tamanho}} + 0,12768_{\text{H-H}} + 0,37764_{\text{HOMO-1}} + 0,41622_{\text{logP}} + 0,46364_{\text{Sist.Arom.}}$$

$$PC3 = -0,37920_{\text{volume}} - 0,41290_{\text{Tamanho}} - 0,16380_{\text{H-H}} + 0,79272_{\text{HOMO-1}} + 0,18205_{\text{logP}} + 0,04200_{\text{Sist.Arom.}}$$

Figura 51. Gráfico dos escores PC1 versus PC3 no nível B3LYP/6-31+G(d,p).

Como pode ser visto nas Figuras 50 e 51 as equações das PCs geradas nos indicam que os parâmetros eletrônicos - energia do orbital HOMO-1, logP e quantidade de sistemas aromáticos - e os parâmetros estruturais - volume, tamanho da droga e H-H - são as propriedades mais significativas neste estudo das AChEIs.

CONCLUSÕES

Os cálculos das otimizações da geometria das AChEIs revelaram que o solvente tem influência apenas nas propriedades estruturais das mesmas, principalmente nos ângulos torsionais de diedros. Os parâmetros eletrônicos são pouco alterados quando as AChEIs estudadas estão solvatadas, utilizando o modelo contínuo de solvatação. Desta forma, o comportamento eletrônico das AChEIs é pouco influenciado pela presença do solvente, quando analisado por meio de modelos contínuos.

O estudo do mapa de potencial eletrostático indica que todas as AChEIs têm regiões bem definidas de alta densidade eletrônica e de baixa densidade, e estas regiões são os pontos passíveis de interação com a AChE por meio de interações eletrostáticas do tipo ligação hidrogênio. Outras regiões das AChEIs com média densidade eletrônica podem interagir com sistemas aromáticos dos resíduos do GORGE da AChE.

A interação entre a maioria das AChEIs estudadas e a tríade catalítica Ser200-Glu327-His440 ocorre por meio de ligações de hidrogênio. A rivastigmina e a tacrina não apresentaram nos níveis de cálculo estudados para o sistema SEH-AChEIs interações fortes diretamente com a SEH.

Nenhuma das AChEI interagiu covalentemente com os resíduos do sítio catalítico, o que reforça a idéia de que o reconhecimento molecular destas pela AChE ocorre primariamente por interações eletrostáticas do tipo ligação de hidrogênio, forças de van der Waals, interações entre sistemas aromáticos (π - π) e transferências de cargas entre complexos íon- π . Para a rivastigmina e a tacrina foram observadas interações fortes com resíduos do sítio ativo, não especificamente com os resíduos da tríade catalítica.

Os principais resíduos envolvidos no reconhecimento molecular das AChEIs pela AChE são os componentes da tríade catalítica Ser200, Glu327 e His440; os resíduos do sítio ativo Asn65, Gln69, Tyr70, Trp84, Gly118, Tyr121, Ser122, Ser124, Tyr130, Glu199, Trp279, Phe290 e Phe330.

O estudo PCA revelou que as propriedades eletrônicas - energia do orbital HOMO-1, logP e quantidade de sistemas aromáticos - e os parâmetros estruturais - volume, tamanho da droga e H-H- são as propriedades mais significativas neste estudo, sendo componentes principais do perfil farmacofórico das AChEIs.

Por fim, um bom candidato a inibidor da enzima acetilcolinesterase deve apresentar: valores para o coeficiente de partição entre 0,8 e 4,9; logS entre -5,0 e -1,5; área de superfície polar entre 30,0 e 60,0 Å²; número considerável de graus de liberdade

torsional para poder se rearranjar de forma adequada ao GORGE; preferencialmente sistemas aromáticos ou grupos que simulem superfícies de densidade eletrônica dos sistemas aromáticos (anel benzênico); quantidade suficiente de aceptores de hidrogênio e pouca quantidade de doadores de hidrogênio. Além disso, de acordo com os dados obtidos com o nível de cálculo B3LYP/6-31G*, o inibidor deve apresentar: energia do orbital HOMO-1 entre -8,60 e -6,00 eV; volume entre 180 e 650 Å³; tamanho entre 7,0 e 20,0 Å; e a distância entre os dois hidrogênios mais ácidos da molécula entre 1,600 – 2,500 Å.

Além das propriedades estruturais e eletrônicas citadas acima, as AChEIs devem apresentar boa biodisponibilidade, atravessar a barreira hematoencefálica com certa facilidade, ter alta seletividade pela AChE em relação à BuChE, complexar-se reversível ou pseudo-reversivelmente com a AChE, ser não-competitiva comparada a ACh.

Todas estas propriedades em conjunto são participantes do perfil farmacofórico das AChEIs estudadas neste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Pivetta, M. *Pesquisa Fapesp*; **2008**, 21, 16.
2. LIMITED, A. E. P.; *ACCESS ECONOMICS*, **2006**, 50.
3. Organization, W. H.; WHO: Paris, **2003**, 187.
4. Sayeg, N.; AlzheimerMed - Informação e Solidariedade. Disponível em <<http://www.alzheimermed.com.br>>, acessado em janeiro de **2009**.
5. IBGE. Projeção da População Brasileira para 1-VII de 2005 (Revisão 2004); IBGE, **2004**.
6. Ferri, C. P.; Prince, M.; Brayne, C.; Brodaty, H.; Fratiglioni, L.; Ganguli, M.; Hall, K.; Hasegawa, K.; Hendrie, H.; Huang, Y. Q.; Jorm, A.; Mathers, C.; Menezes, P. R.; Rimmer, E.; Sczufca, M.; *Alzheimers Dis*, I.; *Lancet*. **2005**, 366, 2112.
7. Sugimoto, H.; Ogura, H.; Arai, Y.; Iimura, Y.; Yamanishi, Y.; *Japanese Journal of Pharmacology*. **2002**, 89, 7.
8. Alcaro, S.; Scipione, L.; Ortuso, F.; Posca, S.; Rispoli, V.; Rotiroti, D.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2002**, 12, 2899.
9. Tezer, N.; *Journal of Molecular Structure-Theochem*. **2005**, 714, 133.
10. Racchi, M.; Mazzucchelli, M.; Porrello, E.; Lanni, C.; Govoni, S.; *Pharmacological Research*. **2004**, 50, 441.
11. Sippl, W.; Contreras, J. M.; Parrot, I.; Rival, Y. M.; Wermuth, C. G.; *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. **2001**, 15, 395.
12. Inestrosa, N. C. A., R.; *J. Physiology*. **1998**, 92, 341.
13. Sackheim, G. I. L.; *Química e Bioquímica para Ciências Biológicas*; Manole: São Paulo, **2001**.
14. Camps, P.; *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. **2002**, 2, 11.
15. Alberts, B. L., J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Biologia Molecular da Célula*; Artmed: Porto Alegre, **2004**.
16. Devlin, T. M. *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas* Blüncher São Paulo, **2007**.
17. Henchman, R. H.; Tai, K. S.; Shen, T. Y.; McCammon, J. A.; *Biophysical Journal*. **2002**, 82, 2671.
18. Francis, P. T.; *J Neurosurg Psychiatry*. **1999**, 66, 137.
19. Patrick, G. L. *Medicinal Chemistry*, OXFORD: New York, **2005**.
20. Harel, M.; Schalk, I.; Ehretsabatier, L.; Bouet, F.; Goeldner, M.; Hirth, C.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L.; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **1993**, 90, 9031.
21. Barak, D.; Ordentlich, A.; Kaplan, D.; Kronman, C.; Velan, B.; Shafferman, A.; *Chemico-Biological Interactions*. **2005**, 157, 219.
22. Niu, C. Y.; Xu, Y. C.; Xu, Y.; Luo, X. M.; Duan, W. H.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Zhu, W. L.; Chen, K. X.; Shen, J. H.; Jiang, H. L.; *Journal of Physical Chemistry B*. **2005**, 109, 23730.
23. Koellner, G.; Kryger, G.; Millard, C. B.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Steiner, T.; *Journal of Molecular Biology*. **2000**, 296, 713.
24. Proctor, G. R.; Harvey, A. L.; *Current Medicinal Chemistry*. **2000**, 7, 295.
25. Rydberg, E. H.; Brumshtein, B.; Greenblatt, H. M.; Wong, D. M.; Shaya, D.; Williams, L. D.; Carlier, P. R.; Pang, Y. P.; Silman, I.; Sussman, J. L.; *Journal of Medicinal Chemistry*. **2006**, 49, 5491.
26. Sugimoto, H.; Yamanishi, Y.; Iimura, Y.; Kawakami, Y.; *Current Medicinal Chemistry*. **2000**, 7, 303.
27. Kaur, J.; Zhang, M. Q.; *Current Medicinal Chemistry*. **2000**, 7, 273.
28. Greenblatt, H. M.; Kryger, G.; Lewis, T.; Silman, I.; Sussman, J. L.; *Febs Letters*. **1999**, 463, 321.
29. Barril, X.; *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. **2001**, 1, 255.
30. Bar-On, P.; Millard, C. B.; Harel, M.; Dvir, H.; Enz, A.; Sussman, J. L.; Silman, I.; *Biochemistry*. **2002**, 41, 3555.

31. Greenblatt, H. M.; Guillou, C.; Guenard, D.; Argaman, A.; Botti, S.; Badet, B.; Thal, C.; Silman, I.; Sussman, J. L.; *Journal of the American Chemical Society*. **2004**, 126, 15405.
32. Kone, S.; Galland, N.; Graton, J.; Illien, B.; Laurence, C.; Guillou, C.; Le Questel, J. Y.; *Chemical Physics*. **2006**, 328, 307.
33. Hu, X. D.; Tu, Y. O.; Zhang, E.; Gao, S. H.; Wang, S. H.; Wang, A. X.; Fan, C. A.; Wang, M.; *Organic Letters*. **2006**, 8, 1823.
34. Herlem, D.; Martin, M. T.; Thal, C.; Guillou, C.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2003**, 13, 2389.
35. Raves, M. L.; Harel, M.; Pang, Y. P.; Silman, I.; Kozikowski, A. P.; Sussman, J. L.; *Nature Structural Biology*. **1997**, 4, 57.
36. Frisch, M. J., G.W. Trucks, H.B.S., G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R.C., Zakrzewski, V.G., Montgomery, Jr. J.A., Stratmann, R.E., Dapprich, J.C.B.S., Millam, J.M., Daniels, A.D., Strain, K.N.K.M.C., Farkas, O., Tomasi, J., Barone, V., Cammi, M.C.R., Mennucci, B., Pomelli, C., Adamo, C., Clifford, S., Petersson, J.O.G.A., Ayala, P.Y., Cui, Q., Morokuma, K., Rabuck, D.K.M.A.D., Raghavachari, K., Foresman, J.B., Ortiz, J.C.J.V., Stefanov, B.B., Liu, G., Liashenko, A., Komaromi, P.P.I., Gomperts, R., Martin, R.L., Fox D.J., Al-Laham, T.K.M.A., Peng, C.Y., Nanayakkara, A., Gonzalez, C., Challacombe, M., Gill, P.M.W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M.W., Andres, J.L., Gonzalez, C., Head-Gordon, M., Replogle E.S. and Pople, J.A.; Gaussian Inc.,: Pittsburgh, PA, **2003**.
37. Stewart, J. J. P.; Fujitsu Limited: Tokyo, Japan, 2003.
38. Bugaenko, V. L. B., V. V.; Andreyev, A. M.; Anikin, N. A.; Anisimov, V. M. . Fujitsu Limited: Tokyo, Japan, **2005**.
39. CAChe, G.; Fujitsu Limited: Krakow, Poland, **2006**.
40. Sander, T.; Actelion Pharmaceuticals Ltd., Gewerbestrasse 16, 4123 Allschwil, Switzerland, **2001**.
41. Rahman, O. M., J.; Foster, A.; Gertler, P.; . In U.S. Patent Nos. 6,857,118; 6,973,644; 6,993,772; 7,010,364; 7,051,333; 7,051,338; 7,096,154; 7,139,686; 7,165,253; 7,181,745; 7,228,239; 7,231,631; 7,237,237; 7,340,441; 7,353,502; 7,359,805; 7,365,311; 7,369,127; 7,400,997; 7,428,737; 7,454,659; 7,454,746; 7,460,123: USA, **1994-2009**.
42. Cramer, C. J. *Essentials of Computational Chemistry*; John Wiley and Sons: West Sussex, **2004**.
43. Maciel, G. S. In Instituto de Química; Universidade de Brasília: Brasília, **2005**.
44. Szabo, A. O., N. S. *Modern quantum chemistry : introduction to advanced electronic structure theory*; Courier Dover Publications, INC: New York, **1996**.
45. Lee, C. Y., W.; Parr, R.G. ; *Phys. Rev. B*. **1988**, 37, 785.
46. Pople, J. A. S., D. P.; SEGAL, G. A.; *JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS*. **1965**, 42, S129.
47. Huang, N. S., K.; *J. Med. Chem*. **2008**, 51, 4862.
48. Roberts, B. C. M., R. L.; *J. Chem. Inf. Model*. **2008**, 48, 397.
49. Barone, V. C., M.; *J. Phys. Chem*. **1998**, 102, 1995.
50. Klamt, A.; *J. Phys. Chem. .* **1995**, 99, 2224.
51. Neto, J. M. M. M., G. C.; *Quim. Nova*. **1998**, 21, 467.
52. Mizutani, M. Y.; Itai, A.; *Journal of Medicinal Chemistry*. **2004**, 47, 4818.
53. Anderson, T. W. *An Introduction to Multivariate Statistical Analysis*; John Wiley & Sons: New York, **1984**.
54. Affifi, A. A. C., Virginia. *Computer-Aided Multivariate Analysis*; CHAPMAN & HALL: New York, **1990**.
55. Gnanadesikan, R. *Methods for statistical data analysis of multivariate observations*; John Wiley & Sons: New York, **1997**.
56. Marriott, F. H. C. *Interpretation of multiple observations*; Academic Press: London, **1974**.
57. Nascimento, É. C. M.; Martins, J. B. L.; Santos, M. L.; Gargano, R.; *Chemical Physics Letters*. **2008**, 458, 285.

ANEXO**Anexo 1 – Artigo Publicado no Chemical Physics Letters**



Theoretical study of classical acetylcholinesterase inhibitors

Érica C.M. Nascimento^a, João B.L. Martins^{a,*}, Maria L. dos Santos^a, R. Gargano^b

^a Universidade de Brasília, Instituto de Química, Caixa Postal 4478, CEP 70904-970 Brasília, DF, Brazil

^b Instituto de Física, Universidade Brasília, CP 4455, CEP 70919-970 Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 March 2008

In final form 3 May 2008

Available online 9 May 2008

ABSTRACT

Semi-empirical, RHF and DFT calculations were carried out to study well known acetylcholinesterase inhibitors, i.e., tacrine, donepezil, galantamine, physostigmine, and tacrine dimer (bis-tacrine). Electronic and structural parameters were used in order to correlate the acetylcholinesterase inhibition activity with their molecular structure. The optimized geometries of these drugs were analyzed by multivariate PCA statistical method. Frontier orbital energies (HOMO and LUMO), the (HOMO–LUMO) gap and the distance between more acidic hydrogen species were used to determine principal components. The PCA results indicated that these drugs were ordered into three groups according to the first principal component: galantamine/physostigmine, donepezil/tacrine dimer and tacrine.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Alzheimer disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder, and is one of the most common causes of mental deterioration of elderly population [1]. The causes of AD have not been clearly understood. It has been observed that the suppression of acetylcholine (ACh) leads to a massive loss of capacity of central nervous system [1]. Taking into consideration that the cognitive deficit is a consequence of the decrease in the cholinergic neurotransmission, the most successful approach for the symptomatic treatment of AD is the cholinergic hypothesis [2]. For that reason, some acetylcholinesterase inhibitors (AChEI) have been used as a therapeutic strategy for the deficiency in ACh in patients with AD [3,4]. Recently, there has been increasing evidence for the involvement of *N*-methyl *D*-aspartate (NMDA) receptor antagonists in the pathogenesis of AD [5,6].

Several experimental and theoretical methods have been applied to study acetylcholinesterase, as well as potential and classical inhibitors of acetylcholinesterase [7–17].

Acetylcholinesterase (AChE) catalytic site consists of the Ser200–Glu327–His440 (SEH) triad [18], responsible for its resultant hydrolysis, and a so-called anionic subsite, which is located at the bottom of a deep and narrow gorge. This anionic subsite recognizes the quaternary ammonium group of the substrate. A second, 'peripheral', anionic site exists 14 Å apart from the active site. The catalytic triad is named 'the aromatic gorge', and several studies invoke aromatic groups as a general feature of quaternary-ligand binding sites [19]. AChE is an enzyme that catalyses the hydrolysis of the neurotransmitter ACh at the synaptic cleft into its two components choline and acetic acid. Thus the cholinergic

neuron, and the next nerve impulse can be transmitted across the synaptic gap [20]. AChE has one of the fastest reaction rates among the enzymes, breaking up each molecule into about 80 μs [21].

Some of AChE inhibitors are competitive with ACh in order to prevent its hydrolysis. Notwithstanding, acylation of OH group of S200 is also inhibited in order to yield a carbamyl ester. This is more stable than the acetate and less capable of leaving the active site [20].

Drugs such as tacrine (THA), donepezil (E2020), galantamine (GALA), physostigmine (PHYSO) and tacrine dimer (DIMTHA) are some classical AChE inhibitors. THA was the first drug approved by FDA for the AD treatment. The dynamic mechanism of E2020 binding to acetylcholinesterase has been studied using molecular dynamics [8], while conformers of galantamine have been experimentally and theoretically investigated [9]. These drugs have the inhibition of AChE in common, although they have distinct chemical structure as well as functional groups.

The main purpose of this study is to correlate the structural and electronic properties of these drugs and their activity which was performed by means of principal components analysis (PCA). It could indicate an important component to understand how these drugs, that feature different chemical structures, are inhibitors of a unique enzyme.

2. Computational details

Semiempirical AM1 and PM3 methods, as well as *ab initio* RHF and DFT at the B3LYP hybrid functional level were applied in this study. For the *ab initio* and B3LYP methods the 6-31G^{*} and 6-31+G(d,p) basis sets were used. The geometries of the target drugs were optimized using internal coordinates. The theoretical calculations were performed using the GAUSSIAN 03 [22] and MOPAC 2007

* Corresponding author. Fax: +55 6132734149.
E-mail address: lopes@unb.br (J.B.L. Martins).

[23] programs in order to determine the best electronic and geometrical parameters.

The X-ray crystal structure of the *Torpedo* AChE (PDB code 1EEA) [24,25] model was obtained from the Brookhaven Protein Data Bank (PDB). The geometries of AChEI were taken from PDB data when available. The X-ray crystallographic structure of the *Torpedo Californica* AChE–tacrine complex was taken from PDB code 1ACJ [19]. AChE–galantamine complex used PDB code 1DX6 [26]. AChE–donepezil complex used PDB code 1EVE [27]. AChE–physostigmine analogue complex used PDB code 1OCE [28]. Tacrine dimer–AChE complex has no PDB file available. These inhibitors molecules (Fig. 1) were fully optimized at B3LYP, RHF, AM1 and PM3 levels.

The electronic and structural properties, e.g., dipole moments, frontier orbital energies (HOMO and LUMO), acidity of hydrogens, molecular size (largest intramolecular distance), molecular volume, distance between the most acid hydrogens (H–H), and the molecular electrostatic potential (MEP) were calculated for the studied AChEI molecules. The charges from electrostatic potentials using a grid based method (ChelpG) was used in order to study the charge distribution and to understand the electrostatic interactions of these molecules.

The multivariate statistical method of PCA was used to correlate between the properties of studied AChEI molecules and their activity. Recently this method was used for the study of rivastigmine analogues [11]. This method reduces the initial parameter number (electronic and structural properties) for the most relevant structure. Six parameters were used in the PCA analysis: HOMO orbital energy, (HOMO–LUMO) gap, H–H distance (see Fig. 1), hydrogen

charge for the most acid atom, molecular size (largest intramolecular distance), and molecular volume, using all calculations levels.

3. Results and discussion

3.1. Electronic structure and optimized geometries of AChEI molecules

The values of calculated electronic parameters for AChEI molecules for B3LYP/6-31+G(d,p) level are presented in Table 1. ChelpG charges for the most acid hydrogen atom have similar values for the GALA, THA, DIMTHA, and PHYSO AChEI investigated. However, E2020 has a significantly smaller value; probably because this drug

Table 1
Electronic and geometrical parameters data for optimized AChEI structures by B3LYP/6-31+G(d,p) method

	THA	GALA	E2020	DIMTHA	PHYSO
HOMO (eV)	-5.76	-5.05	-5.95	-5.90	-5.46
Gap (eV)	4.49	5.53	4.41	4.43	5.12
Volume (Å ³)	236	329	454	606	321
C–N (Å)	1.386	1.468	1.465	1.443	1.362
N–H (Å)	1.009	–	–	1.013	1.008
C–O (Å)	–	1.436	1.364	–	1.373
O–H (Å)	–	0.967	–	–	–
H–H (Å)	1.683	2.360	2.342	1.998	2.319
Charge H ⁺	0.30	0.34	0.15	0.26	0.32
Size (Å)	9.516	10.290	17.254	19.386	12.927

Gap stands for the difference of energy between LUMO and HOMO orbitals. Size stands for the molecular size.

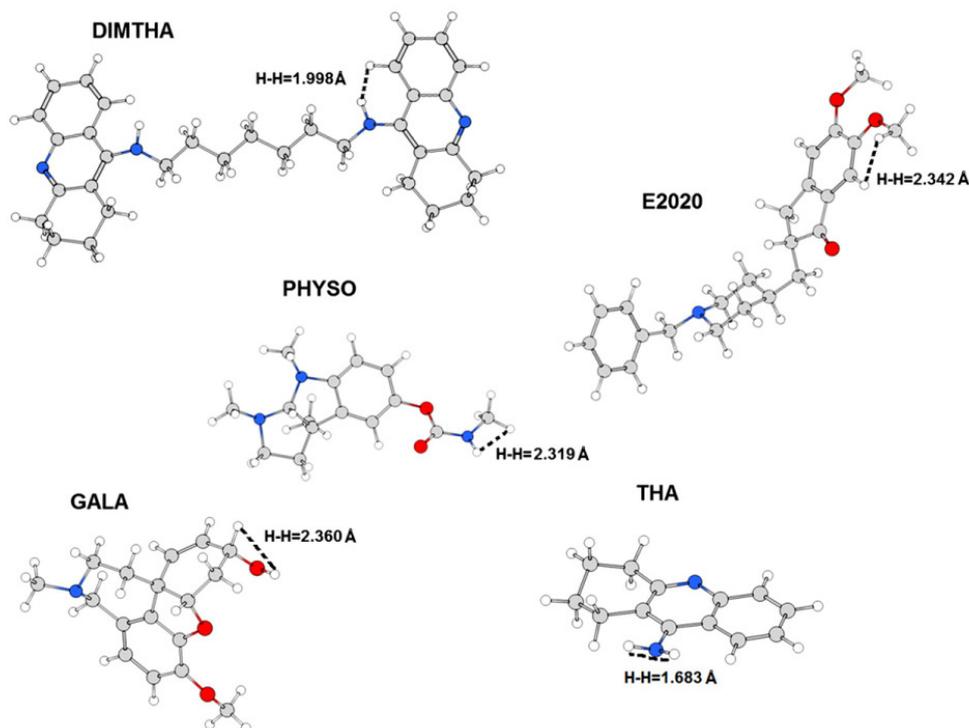


Fig. 1. Optimized structures of AChEI molecules at B3LYP/6-31+G (d,p) level.

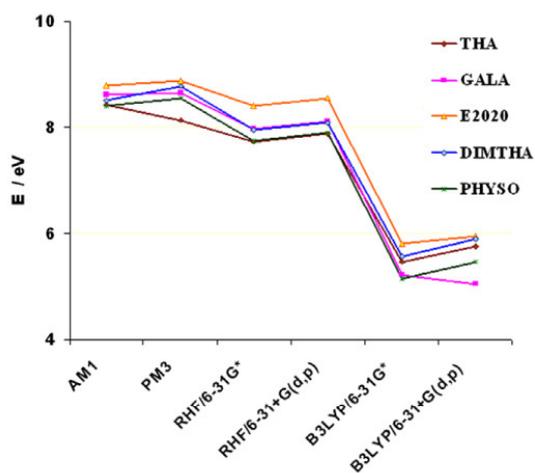


Fig. 2. Calculated HOMO orbital energy.

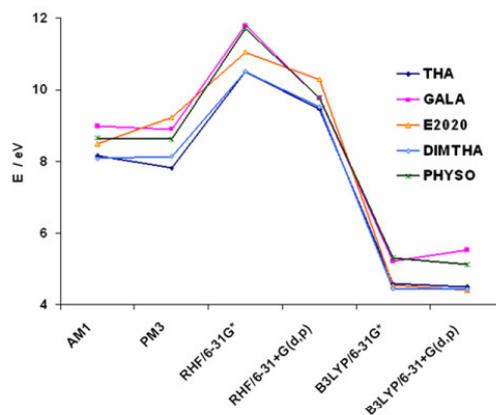


Fig. 3. Calculated (HOMO-LUMO) gap energy for different methods and basis sets.

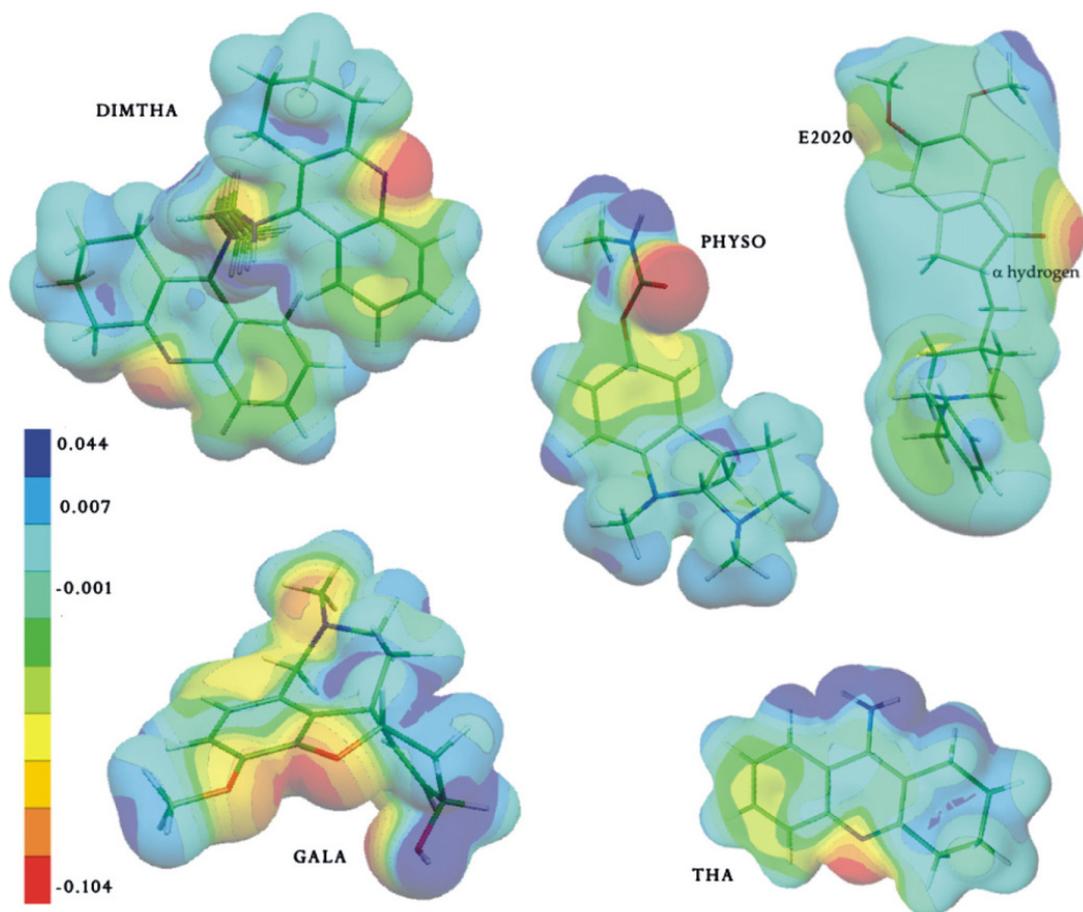


Fig. 4. Molecular electrostatic potential map calculated at B3LYP/6-31+G(d,p) level.

has no hydrogen directly bonded to the heteroatom. These results suggest that the mechanism for the interaction of E2020 with AChE is different from the other investigated AChEI. The energies of HOMO orbital of these molecules have values between 5.05 and 5.95 eV. The HOMO values are very close despite these drugs have different chemical structure and functional groups. The similarity between the values of some parameters (Table 1) indicates that such properties should be correlated.

In relation to the conformation, the optimized structures obtained have the dihedral angles with large deviation from the initial PDB structure used in this Letter. DIMTHA has the largest deviation between the different levels used, where the dihedral angle (φ) of C37–N54–N27–C10 has the value of 207° /AM1 and 136° /B3LYP/6-31+G(d,p) in a staggered conformation (Fig. 1). The GALA molecule points out a modification of conformation in order to get its three oxygen atoms close to each other. The E2020 features a shortening of the distance between the rings, yielding a folded conformation, and its value is 3.382 Å at B3LYP/6-31+G(d,p) level (while the PDB has the value of 5.322 Å).

Fig. 2 depicts the behavior of orbital energy for each AChE inhibitors for different basis set and methods used. B3LYP HOMO values are smaller than RHF and semiempirical methods. This is a known behavior of B3LYP orbital energies. The HOMO values were nearly the same for the entire set of drugs using the same basis set at each calculation level concerned to this study. E2020 has the highest HOMO value while THA, GALA and PHYSO have the lowest HOMO value. Therefore, the HOMO value is suitable to the PCA analysis, since this property is important for describing the interaction of AChEI-receptor. THA and DIMTHA have the smallest gap energy (Fig. 3). In general, AChEI gap energy using RHF and semiempirical methods was larger than B3LYP level values.

3.2. Molecular electrostatic potential (MEP)

The MEP of the entire set of drugs is depicted in Fig. 4 at B3LYP/6-31+G(d,p) level. The MEP from the studied drugs suggests potentially donor regions of protons in the neighborhood of a heteroatom (nitrogen or oxygen). E2020 is the exception since this drug

has no hydrogen bonded to the heteroatom. However, this drug has other donor regions in order to act in the mechanism of AChE inhibitor. The MEP shows that both hydrogens bonded to heteroatoms and to the neighbor carbonyl group have a positive charge. Therefore, the heteroatom from most drugs and the α -carbon from the carbonyl-containing compounds are possible donors of acid hydrogen.

3.3. Root mean square deviation (RMSD)

RMSD was also used in order to compare the starting geometries to the available PDB data for this set of molecules and the theoretical methods used for the optimization.

The largest RMSD value was found for the E2020 (0.585 Å) structure using the RHF/6-31G^{*} level. E2020 molecule has several torsion angles which explain this RMSD value. For the PHYSO molecule the largest RMSD was between the PDB structure and the optimized one at the RHF/6-31G^{*} level (0.499 Å), probably due to the seven bonds available for torsion in the PHYSO structure. GALA showed the largest RMSD value for the B3LYP/6-31G^{*} (0.292 Å) level. Three oxygen atoms approach closer to each other in the optimized structure. This suggests a formation of a highly density region of negative charge, i.e., a nucleophilic region which is important for the acylation reaction. The largest RMSD value for THA was obtained at the optimized RHF/6-31G^{*} level (0.156 Å). Among the studied drugs, the THA has the smallest deviation, mainly due to the torsion of the primary amine group.

For DIMTHA the largest RMSD values were obtained with the optimized semiempirical AM1 geometry and B3LYP/6-31G^{*} (0.328 Å) level. Among the five studied drugs, this molecule has 10 bonds available for torsion (excluding the rings). DIMTHA showed an anti conformation for the (CH₂)_n chain, and its dihedral angle was near to 180° for the B3LYP method (Fig. 1).

The RMSD between the PDB structure and the optimized semiempirical PM3 method has the smallest value among the applied methods. For all drugs the RMSD value was zero. Therefore, the semi-empirical PM3 method is in good agreement to the PDB data.

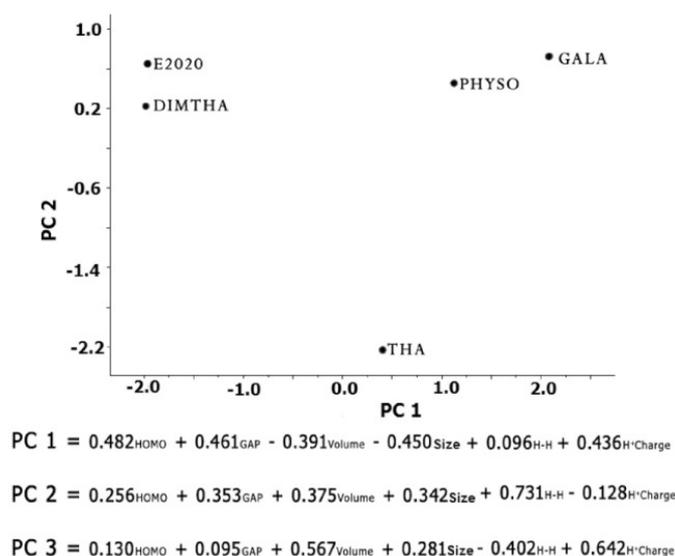


Fig. 5. PC1 versus PC2 for the properties obtained at B3LYP/6-31+G(d,p) level. The loadings (coefficients) of PC1, PC2 and PC3 are shown.

3.4. Principal components analysis (PCA)

Firstly, the variance was optimized attempting various combinations of the parameters described in Table 1. In order to construct the PCs of Fig. 5, six descriptors were used, i.e., HOMO orbital energy, gap energy, H–H distance, most acid hydrogen charge, molecular size (largest intramolecular distance), and molecular volume. These parameters at B3LYP/6-31+G(d,p) level, a matrix of 5×6 (drugs \times parameters), were used for the PCA analysis, which generated PCs with three subsets (Fig. 5). The first subset contains THA, the second E2020 and DIMTHA, and the third PHYSO and GALA. The PCA resulted in three principal components, which accounted for 99.0% of the variance in the original matrix. The first principal component (PC) describes some 62.2% of the total variance in the descriptor data set and the second PC a further 26.9%. Fig. 5 shows the equations for the first three principal components.

From the PCA equations the electronic (HOMO energy, H^+ charge) and structural parameters (H–H distance and volume) are the most significant properties for these AChE inhibitors. PC1 equation shows that the main contribution is from HOMO orbital energy and gap energy. PC2 shows that the main contribution arises from structural parameters (H–H distance and Volume). PC3 is mainly dominated by the H^+ charge. PCs for this set of data showed that the distance and the most acid hydrogen charges act dispersing PC1 and PC2.

4. Conclusions

Drugs that inhibit the action of acetylcholinesterase enzyme are among the most used therapeutic strategies in order to ease certain symptoms of AD disease. The geometric and electronic properties of the optimized acetylcholinesterase inhibitors (tacrine, donepezil, galantamine, physostigmine, and the tacrine dimer) were investigated. Although these drugs exhibit common action at acetylcholinesterase, they have different chemical structures and functional groups. For the PCA analysis we used the orbital energy, (HOMO–LUMO) gap, hydrogen charge, distance between most acid hydrogens, and the drug volume and size. The PCA multivariate method showed that the principal components of electronic and geometric property sets are the most important data to characterize these drugs. According to these results, this set of drugs was clustered in three special groups: GALA/PHYSO, E2020/DIMTHA, and THA. Consequently, these groups can be explored with the aim to understand the mechanism of action of these AChEI drugs

and also to facilitate the development and design of new active AChE inhibitors.

Acknowledgments

This study is supported by CNPq, Funpe/UnB, and FINATEC. The authors are indebted to the reviewers for their comments and suggestions.

References

- [1] R.H. Henchman, T. Kaihsu, S. Tongue, A. McCamman, *Biophys. J.* 82 (2002) 2671.
- [2] A. Musial, M. Bajda, B. Malawska, *Curr. Med. Chem.* 14 (2007) 2654.
- [3] H. Sugimoto, H. Ogura, Y. Arai, Y. Limura, Y. Yamanishi, *Jpn. J. Pharmacol.* 89 (2002) 7.
- [4] N.C. Inestrosa, M.C. Dinamarca, A. Alvarez, *FEBS J.* 275 (2008) 625.
- [5] E.J. Popke, *Toxicol. Sci.* 72 (2003) 185.
- [6] D.M. Robinson, G.M. Keating, *Drugs* 66 (2006) 1515.
- [7] Y. Paukku, A. Michalkova, D. Majumdar, J. Leszczynski, *Chem. Phys. Lett.* 422 (2006) 317.
- [8] C.Y. Niu et al., *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 23730.
- [9] S. Kone, N. Galland, J. Graton, B. Illien, C. Laurence, C. Guillou, J.Y. Le Questel, *Chem. Phys.* 328 (2006) 307.
- [10] H.F. Ji, H.Y. Zhang, *Theochem-J. Mol. Struct.* 767 (2006) 3.
- [11] 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.
- [12] C. da Silva, V.L. Campo, I. Carvalho, C.A. Taft, *J. Mol. Graph.* 25 (2006) 169.
- [13] I. Correia, N. Ronzani, N. Platzer, B.T. Doan, J.C. Beloeil, *J. Phys. Org. Chem.* 19 (2006) 148.
- [14] Y.H. Cheng, X.L. Cheng, Z. Radic, J.A. McCammon, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 6562.
- [15] N. Tezer, *Theochem-J. Mol. Struct.* 714 (2005) 133.
- [16] Y.K. Zhang, J. Kua, J.A. McCammon, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 10572.
- [17] M.K. Gilson, et al., *Science* 263 (1994) 1276.
- [18] P.H. Axelsen, M. Harel, I. Silman, J.L. Sussman, *Protein Sci.* 3 (1994) 188.
- [19] M. Harel, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90 (1993) 9031.
- [20] G.L. Patrick, *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford, Oxford, 2005.
- [21] D.M. Quinn, *Chem. Rev.* 87 (1987) 955.
- [22] M.J. Frisch et al., *GAUSSIAN 03*, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.
- [23] J.J.P. Stewart, *MOPAC2007**, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, 2007.
- [24] M.L. Raves et al., *Structure and function of cholinesterases and related proteins*, Plenum Publishing Corporation, New York, 1998.
- [25] J.L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science* 253 (1991) 872.
- [26] H.M. Greenblatt, G. Kryger, T. Lewis, I. Silman, J.L. Sussman, *FEBS Lett.* 463 (1999) 321.
- [27] G. Kryger, I. Silman, J.L. Sussman, *Struct. Fold. Des.* 7 (1999) 297.
- [28] C. Bartolucci, E. Perola, L. Cellai, M. Brufani, D. Lamba, *Biochemistry* 38 (1999) 5714.