

UFRRJ

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE

**Desenvolvimento de Modelos Empíricos de Predição da
Atividade de Inibidores da enzima acetilcolinesterase de
Torpedo californica e de *Aedes aegypti* utilizando o
Método Semi-Empírico**

Daniel Rosa da Silva

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**Desenvolvimento de Modelos Empíricos de Predição da
Atividade de Inibidores da enzima acetilcolinesterase de
Torpedo californica e de *Aedes aegypti* utilizando o
Método Semi-Empírico**

Daniel Rosa da Silva

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE MODELOS EMPÍRICOS DE
PREDIÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIDORES DA ENZIMA
ACETILCOLINESTERASE DE *TORPEDO CALIFORNICA* E DE
AEDES AEGYPTI UTILIZANDO O MÉTODO SEMI-EMPÍRICO**

DANIEL ROSA DA SILVA

Sob a Orientação do Professor Dr.

Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna

Tese submetida como requisito Parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciências, no
Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica
Área de concentração Modelagem Molecular.

Seropédica, RJ

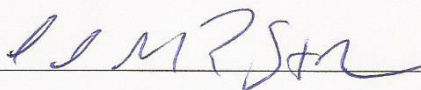
Mai de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DANIEL ROSA DA SILVA

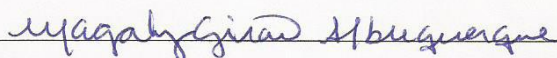
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências,
no Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica, área de concentração em
Modelagem Molecular.

TESE APROVADA EM 21/05/2014

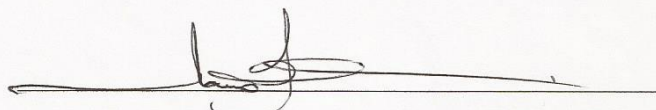


Prof. Dr. Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna, (DQ-ICE-UFRJ)

(Orientador – Presidente)

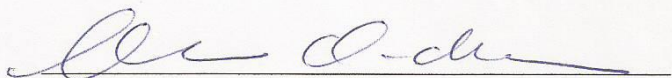


Profª. Dra. Magaly Girão Albuquerque (IQ-UFRJ)



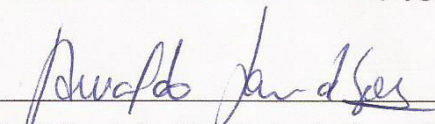
Prof. Dr. Mauro Barbosa de Amorim (IPPN-UFRJ)

Prof. Dr. Marco Edilson Ferreira Lima (DQ-ICE-UFRJ)



Profª. Dra. Clarissa Oliveira da Silva (DQ-ICE-UFRJ)

Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Junior (Hygeia Biotecnologia)



Prof. Dr. Anivaldo Xavier de Souza (CTUR-UFRJ)

DEDICATÓRIA

Agradeço e dedico este trabalho a Deus, a minha esposa Andreza pela total dedicação, amor, carinho e incentivo, a minha saudosa mãe Jussara por tudo que fez por mim (incondicional apoio e incentivo, dedicação, estímulo e amor durante toda sua vida), pois sem o seu apoio não tinha chegado onde estou hoje, ao meu pai Cosme por toda contribuição à minha formação e compreensão, aos meus irmãos, aos meus cunhado(a), as minhas tias e ao meu sogro José e minha sogra Mauricea pela torcida.

AGRADECIMENTOS

Nesta jornada longa da minha vida, este pequeno período não é suficiente para compartilhar a minha satisfação por todos que indireta ou diretamente me ajudaram a chegar neste momento.

Antes de tudo quero agradecer a Deus, por todas as vitórias incontestáveis e magníficas que tem me proporcionado desde meu nascimento até hoje.

Aos meus pais pelo apoio incondicional em todas as decisões que outrora tomei em minha vida.

A minha esposa, amiga e companheira Andreza que se mostrou ser uma pessoa maravilhosa e por sempre estar ao meu lado ajudando e sempre me apoiando nos momentos difíceis.

Aos meus grandes amigos: Vinicius, Douglas, Catarina, Welisson, Paulo, Francis, Anivaldo, Wagner, Aline pelo companheirismo, ajuda e amizade que foram fundamentais para meu trabalho e obtenção de conhecimento, principalmente nos momentos de tensão.

Ao Professor Carlos Maurício pela oportunidade, por creditar a mim a execução deste trabalho, pela paciência e confiança depositada.

Aos professores, João Batista, Mario Geraldo, Rosane, Marco Edilson e Vitor pelo conhecimento adquirido durante todo meu curso de pós-graduação em química que me tornaram o que sou hoje.

A todos os amigos da pós-graduação pelo convívio.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade.

À CAPES por fornecer a bolsa.

E a todos aqueles que sempre torcem pelo meu sucesso, ajudando e incentivando-me.

SUMÁRIO

INDICE DE TABELA	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
INDÍCE DE ESQUEMAS	xv
ABREVEATURAS E SÍMBOLOS	xx
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Inibidores Enzimáticos Reversíveis e Irreversíveis	2
1.1.2 Inibidores Reversíveis	3
1.1.3 Inibidores Irreversíveis	6
1.2 Colinesterases	7
1.3 Usos de Inibidores da AChE na Área de Saúde Humana	10
1.3.1. Inibidores Reversíveis da AChE	10
1.3.2. Inibidores Irreversíveis da AChE	13
1.4 Modelos Quantitativos de Interação	18
1.5 Energia livre de Solvatação	21
1.6 Modelagem comparativa de proteínas	23
1.7 Métodos Computacionais de Modelagem de Estruturas Químicas	26
1.7.1 Mecânica Molecular	26
1.7.2 Docking molecular	28
1.7.3 O programa GOLD	31
1.7.4 Mecânica quântica	33
1.7.5 Equações de Hartree-Fock	34
1.7.6 Combinação linear dos orbitais atômicos (LCAO)	35
1.7.7 Métodos semi-empíricos	36
2. Objetivos	38
3. METODOLOGIA	39
3.1. Construção de um Modelo de AChE de <i>Aedes aegypti</i>	39

3.2. Modelos de inibição das enzimas AChE.	39
3.2.1 Modelos de inibição da enzima AChE de <i>Torpedo californica</i>	41
3.2.2. Modelo de inibição da AChE de <i>Aedes aegypti</i>	44
3.3. Validação do Protocolo de Docagem por Redocagem	47
3.4. Modelo Empirico de Energia Livre	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Modelos de inibição da AChE de <i>Torpedo californica</i>	49
4.1.1 Modelo de Inibição da AChE de <i>T. Californica</i> pela harmana e derivados	52
4.1.2 Modelo de Inibição da AChE de <i>T. californica</i> compostos mesoiônicos	56
4.1.3 Modelo de inibição das β-carbolinas bivalentes	60
4.1.4 Avaliação da construção do modelo do sítio ativo da AChE de <i>Aedes aegypti</i>	65
4.1.5 Estimativa da Qualidade do Modelo	69
4.1.6 Modelo de inibição da AChE de <i>Aedes aegypti</i>	73
4.2 Análise de Interações dos modelos.	78
4.2.1 Interações dos derivados da harmana com a AChE de <i>Torpedo californica</i>	78
4.2.2 Interações dos compostos mesoiônicos com a AChE de <i>Torpedo californica</i>	83
4.2.3 Interações das β-carbolinas com a AChE de <i>Torpedo californica</i>	89
4.2.4 Interações das β-carbolinas com a AChE de <i>Aedes aegypti</i>	93
4.3 Planejamento Racional de Novas Estruturas Buscando Melhorias na Atividade	98
4.3.1 Resultados dos mesoiônicos propostos	102
	103
5. CONCLUSÕES	
5.1 Em relação a enzima AChE de <i>torpedo californica</i>	103
5.2 Em relação a enzima AChE de <i>aedes aegypti</i>	104
6. Bibliografia	105

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos dos inibidores reversíveis em $V_{m\acute{a}x}$ e K_m aparentes.	6
Tabela 2. Dados experimentais da inibição da AChE de <i>T. californica</i> pela harmana e derivados e pelos compostos mesoiônicos.	40
Tabela 3. Valores de atividade de inibição da enzima AChE de <i>A. aegypti</i> (IC_{50} e pIC_{50}) das β -carbolinas bivalentes escolhidas para a construção do modelo de inibição (ROOK <i>et al.</i> , 2010).	45
Tabela 4. Valores de entalpias de interação calculadas pelos métodos PM6 (ΔH^{PM6}) e RM1 (ΔH^{RM1}), números de ligações rotacionáveis (N_{LR}) “congeladas” pela interação e energias livres de solvatação (ΔG_{solv}) dos derivados da harmana.	52
Tabela 5. Valores de contribuição variável de cada termo da equação 27.	53
Tabela 6. Comparação dos valores de $logIC_{50}$ medidos experimentalmente e $logIC_{50}$ teóricos calculados pela Equação 27.	54
Tabela 7. Valores de $logIC_{50}$ medidos experimentalmente ($\mu\text{mol/L}$), entalpia de interação calculada pelos métodos PM6 (ΔH^{PM6}), número de ligações rotacionáveis (N_{LR}) “congeladas” durante a ligação e entalpia de solvatação (ΔH_{solv}) dos inibidores cloridratos mesoiônicos utilizados neste trabalho na forma neutra.	56
Tabela 8. Valores de contribuição variável de cada termo da equação 29.	58
Tabela 9. Valores de $logIC_{50}$ medidos experimentalmente e $logIC_{50}$ teórico calculados pela equação 29.	59
Tabela 10. Valores de pIC_{50} medidos experimentalmente, entalpia de interação calculada pelos métodos PM6 e RM1 (ΔH^{PM6} e ΔH^{RM1} , em kcal/mol), número de ligações rotacionáveis (N_{LR}) “congeladas” durante a ligação e a energia livre de solvatação (ΔG_{solv} , kcal/mol) e entalpia de solvatação (ΔH_{solv} , kcal/mol) das β -carbolinas bivalentes na enzima TcAChE.	60
Tabela 11. Valores de contribuição variável de cada termo da equação 31.	62
Tabela 12. Valores de pIC_{50} medidos experimentalmente e pIC_{50} teórico calculados pela equação 31.	63
Tabela 13: Termos da função de score QMEAN4 para o modelo da AChE de <i>Ae. aegypti</i>	70
Tabela 14. Valores de pIC_{50} medidos experimentalmente em AChE de <i>T. californica</i> , entalpia de interação calculada pelos métodos RM1 e PM6 (ΔH , kcal/mol), número de ligações rotacionáveis (N_{LR}) “congeladas” durante a ligação e a entalpia de solvatação (ΔH_{solv}) das β -carbolinas bivalentes na AChE de <i>Ae. aegypti</i> .	73
Tabela 15. Valores de contribuição variável de cada termo da Equação 33.	75

Tabela 16. Valores de pIC_{50} medidos experimentalmente e de pIC_{50} teóricos calculados pela Equação 33.	77
Tabela 17. Distâncias de interações observadas entre a AChE e a harmana e alguns de seus derivados, após otimização estrutural.	83
Tabela 18. Distâncias de interações observadas no sistema para os derivados compostos mesoiônicos com melhor entalpia de interação.	87
Tabela 19. . Distâncias de interações observadas no sítio catalítico e no sítio periférico nos complexos das β-carbolinas com a AChE de <i>Torpedo californica</i>.	91
Tabela 20. Distâncias de interações observadas no sítio catalítico (SC) e no sítio periférico (SP) nos complexos de algumas β-carbolinas com a AChE de <i>Aedes aegypti</i> após otimização com o método RM1.	96
Tabela 21. Valores de entalpia de interação pelos métodos PM6 (kcal/mol), número de ligações rotacionáveis (N_{LR}) e entalpia de solvatação (ΔH_{solv}, kcal/mol).	99
Tabela 22. Valores de $logIC_{50}$ teóricos calculados pelas equações 29.	100
Tabela 23. Distâncias de interações observadas para os mesoiônicos 18K e 18L.	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura tridimensional da acetilcolinaesterase do <i>Torpedo californica</i> . Em destaque, a tríade catalítica (SILMAN e SUSSMAN, 2005).	8
Figura 2. Exemplos de inibidores comerciais da AChE.	11
Figura 3. <i>Aedes aegypti</i> : adulto, ovos e larvas.	14
Figura 4: Risco de contrair dengue no Brasil (SVS, 2011). DEN-4 é um tipo de dengue que foi detectado em 1981 e está de volta ao país.	15
Figura 5. Exemplos de carbamatos.	16
Figura 6. Exemplos de Organofosforados.	17
Figura 7. Organofosforados temefós, malationa e fenitrotona, usados no controle do <i>Ae. aegypti</i> (SANTOS <i>et al.</i> , 2007).	18
Figura 8. Esquema geral da modelagem comparativa de proteínas (FILHO & ALENCASTRO, 2002).	24
Figura 9. Demonstrações das principais interações ligadas (energias de estiramento, dobramento e torção) e não ligadas consideradas em campo forte, em mecânica molecular. (TOMASI <i>et al.</i> , 2005).	27
Figura 10. Estruturas de duas séries de compostos sintetizados na UFRRJ e avaliados neste estudo: Harmana e derivados e compostos mesoiônicos.	41
Figura 11. Exemplo de um recorte da estrutura selecionada da AChE de <i>T. californica</i> (código 2CMF do PDB) com os aminoácidos localizados a 5 Å da estrutura 18f, para os cálculos semi-empíricos.	43
Figura 12. Estruturas das β -carbolinas bivalentes selecionadas (ROOK <i>et al.</i> , 2010).	44
Figura 13. Exemplo de um recorte da estrutura do modelo para cálculos semi-empíricos da AChE de <i>Ae. aegypti</i> com os aminoácidos localizados a 5 Å da molécula 26.	45
Figura 14. Representação da correlação linear entre os dados experimentais e teóricos para a inibição da AChE pela harmana e seus derivados. R é o coeficiente de correlação linear, Dp representa desvio padrão e N é o número de compostos.	55
Figura 15. Representação da correlação linear entre os dados experimentais e teóricos para a inibição da AChE pelos compostos mesoiônicos. R é o coeficiente de correlação linear, Dp representa desvio padrão.	59
Figura 16. Representação da correlação linear entre os dados experimentais e teóricos para a inibição da AChE de <i>T. californica</i> pelas β -carbolinas. R é o coeficiente de correlação linear, Dp representa desvio padrão.	65
Figura 17. Alinhamento das estruturas primárias da AChE de <i>Aedes Aegypti</i> (Q6A2E2) e da AChE de <i>T. californica</i> (2CMF). Os aminoácidos conservados estão destacados em amarelo e; os que apresentam características semelhantes, em cinza.	66
Figura 18. Sobreposição das estruturas: modelo da AChE de <i>Ae. aegypti</i> (vinho) e AChE de <i>T. californica</i> 2CMF (em azul).	67

- Figura 19. Sobreposição das estruturas do molde e do modelo da AChE de *Ae. aegypti*, na região do sítio periférico e do canal do sítio ativo. O ligante pentileno bis-tacrina está com carbonos em marelo, em ciano, a enzima de *T. californica* (2CMF) e, em verde, o modelo de *Ae. aegypti*. Em destaque, os aminoácidos diferentes entre as estruturas nesta região. 68
- Figura 20. Sobreposição das estruturas do molde e do modelo da AChE de *Ae. aegypti*, na região do sítio catalítico “aniônico”. O ligante pentileno bis-tacrina está com carbonos em marelo, em ciano, a enzima de *T. californica* (2CMF) e, em verde, o modelo de *Ae. aegypti*. Em destaque, os aminoácidos iguais Glu199, Ser200 e His440 entre as estruturas nesta região. 68
- Figura 21. Gráficos de Ramachandran: A) estrutura cristalográfica 2CMF depositada no PDB; B) estrutura modelada no servidor *Swiss Model* para a sequência Q6A2E2 de *Ae. aegypti*. Figuras geradas com o programa Rampage (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>). 69
- Figura 22. Gráfico do QMEAN Z-score do modelo de AChE de *Ae. aegypti*, em comparação com um conjunto de estruturas do PDB. 71
- Figura 23. Z-score do modelo da AChE de *Ae. aegypti*. 71
- Figura 24. Gráfico Anolea / QMAEN modelo da AChE de *Ae. aegypti*. 72
- Figura 25. Representação da correlação linear entre os dados experimentais (AChE de *T. californica*) e teóricos para a inibição (AChE de *Ae. aegypti*) pelas β -carbolinas. R é o coeficiente de correlação linear, Dp representa desvio padrão. 78
- Figura 26. Derivado da harmana no sítio periférico da TcAChE, fazendo interações de empilhamento π com a Tyr67 e Trp276. Carbonos em verde, derivado 17e, em ciano, 17g, em magenta, 17d, em amarelo, 17b, rosa claro, 17, em cinza, 17a, em azul, 17f, em laranja, 17c. Átomos de N em azul e átomos de O em vermelho; os átomos de H foram omitidos para maior clareza. 79
- Figura 27. (A) carbonos da AChE em verde e carbonos da estrutura 17c em laranja; (B) carbonos da AChE em magenta e carbonos da estrutura 17e em azul claro; (C) carbonos da AChE em rosa claro e carbonos da estrutura 17 em verde; (D) sobreposição dos três complexos. Átomos de N em azul e átomos de O em vermelho; os átomos de H foram omitidos para maior clareza. 81
- Figura 28. Complexo da estrutura 17c (carbonos em laranja) no sítio periférico após otimização (carbonos em verde) sobreposta com o sítio vazio (carbonos em ciano). Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho e átomo de S em amarelo; os átomos de H foram omitidos para maior clareza. 82
- Figura 29. Compostos mesoiônicos no sítio periférico da TcAChE. Carbonos em laranja, 18a, em azul, 18b, em branco, 18c, em rosa claro, 18d, em amarelo, 18e, em magenta, 18f, em ciano, 18g e, em verde, 18h. Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho e átomo de S em amarelo; os átomos de H foram omitidos para maior clareza. 84
- Figura 30. (A) complexo da estrutura 18b (carbonos em verde oliva) com a AChE (carbonos em violeta); (B) complexo da estrutura 18d (carbonos em amarelo claro) com a AChE (carbonos em ciano escuro); (C) complexo da estrutura 18e (carbonos em verde claro) com a AChE (carbonos em azul 86

- claro); (D) três complexos sobrepostos juntos. Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho e átomo de S em amarelo; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.
- Figura 31. Estrutura 18d (carbonos em magenta) no sítio periférico após otimização (carbonos em ciano) sobreposta com o sítio vazio (carbonos em verde). Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho; os átomos de H foram omitidos para maior clareza. 88
- Figura 32. Exemplos de interações de β -carbolinas nos sítios catalítico e periférico da TcAChE após *docking* com a função *Chemscore*. Carbonos em magenta, 20i (ligante em abobora), carbonos em ciano 22 (ligante em branco gelo), carbonos em verde 26 (ligante em rosa). Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho; os átomos de H foram omitidos para maior clareza. 89
- Figura 33. (A) complexo da estrutura 20e (carbonos em ciano) com a AChE (carbonos em verde); (B) complexo da estrutura 20i (carbonos em amarelo) com a AChE (carbonos em magenta); (C) complexo da estrutura 22 (carbonos em amarelo) com a AChE (carbonos em rosa claro); (D) complexo da estrutura 26 (carbonos em verde oliva) com a AChE (carbonos em azul claro). Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho e átomo de S em amarelo; os átomos de H foram omitidos para maior clareza. 90
- Figura 34. Estruturas otimizadas dos sítios catalítico e periférico da TcAChE: carbonos em branco, o sítio vazio e, em rosa claro, o complexo TcAChE-22. Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho; os átomos de H foram omitidos para maior clareza. 93
- Figura 35. β -carbolinas nos sítios catalítico e periférico de AaAChE, após *docking* com a função *ChemScore*. Carbonos em magenta, 19 (ligante em salmão), carbonos em ciano, 20i (ligante em laranja), carbonos em amarelo, 20h (ligante em branco gelo), e, carbonos em verde claro, 25c (ligante em azul claro). Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho; os átomos de H foram omitidos para maior clareza. 94
- Figura 36. (A) Complexo da estrutura 19 (carbonos em magenta) com a AChE (carbonos em verde); (B) complexo da estrutura 20h (carbonos em verde oliva) com a AChE (carbonos em amarelo); (C) complexo da estrutura 20i (carbonos em ciano) com a AChE (carbonos em rosa claro); (D) complexo da estrutura 25c (carbonos em amarelo claro) com a AChE (carbonos em laranja). Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho e átomo de S em amarelo; os átomos de H foram omitidos para maior clareza. 95
- Figura 37. Estruturas otimizadas dos sítios catalítico e periférico da TcAChE: carbonos em branco, sítio vazio e, em rosa claro, o complexo AaAChE-20i. Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho; os átomos de H foram omitidos para maior clareza. 98
- Figura 38. Estruturas dos derivados mesoiônicos propostos 18K e 18L. 99
- Figura 39. (A) complexo da estrutura 18K (carbonos em azul) com a AChE (carbonos em verde claro); (B) complexo da estrutura 18L (carbonos em amarelo) com a AChE (carbonos em azul). Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho e átomo de S em amarelo; os átomos de H foram omitidos para maior clareza. 101
- Figura 40. (A) complexo entre a estrutura 18d (carbonos em violeta) com a AChE (carbonos em amarelo) sobreposto com o complexo entre a estrutura 102

18K (carbonos em verde oliva) com a AChE (carbonos em cinza); (B) complexo entre a estrutura 18b (carbonos em marrom) com a AChE (carbonos em magenta) sobreposto com o complexo entre a estrutura 18L (carbonos em verde claro) com a AChE (carbonos em azul). Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho e átomo de S em amarelo; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.

ÍNDICE DE ESQUEMAS

- Esquema 1. Três tipos de inibição reversível. (a) inibidores competitivos 5**
ligam-se ao sítio ativo da enzima.(b) Inibidores incompetitivos ligam-se em um sítio separado, mas une-se apenas ao complexo ES. K_1 é a constante de equilíbrio para a ligação do inibidor à E; K'_1 é a constante de equilíbrio para a ligação do inibidor ES. (c) Inibidores mistos ligam-se a sítios separados, mas podem unir-se quer a E quer a ES (Nelson e Cox, 2002).
- Esquema 2. Para inibição irreversível. 7**
- Esquema 3. Mecanismo de hidrólise da acetilcolina pela AChE (Santos, 9**
2007).

RESUMO

A acetilcolinesterase (AChE) desempenha papéis importantes na neurotransmissão colinérgica central e periférica. Os inibidores da AChE (IAChE) têm aplicação como fármacos e são as principais substâncias hoje licenciadas para o tratamento específico da doença de Alzheimer (DA). A DA é uma desordem neurodegenerativa, de grande impacto sócio-econômico, responsável por 50-60% do número total de casos de demência entre pessoas acima de 65 anos. Embora IAChE irreversíveis em geral não sejam usados com fins medicinais em seres humanos, é comum o seu uso no controle de vetores de doenças, especialmente as transmitidas por mosquitos, com é o caso da dengue. A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 50-100 milhões de pessoas se infectem anualmente, em 100 países.

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de modelos empíricos de previsão da atividade de séries de compostos sintéticos na inibição da AChE. Para isso foram utilizados dados de atividade de inibição da AChE de *Torpedo californica* por compostos mesoiônicos e derivados da harmana, sintetizados por grupos de pesquisa da UFRRJ, e por β -carbolinas bivalentes, obtidos da literatura. O mesmo procedimento foi aplicado para o desenvolvimento de um modelo empírico aplicável para a previsão da atividade de β -carbolinas bivalentes na inibição da AChE de *Aedes aegypti*.

O procedimento geral envolveu o uso de método de *docking* molecular para a geração das estruturas dos complexos entre os ligantes e as enzimas, seguido de cálculos de entalpias de interação em fase gasosa por métodos quânticos semi-empíricos. Para a AChE de *Aedes aegypti* foi necessária a construção prévia de um modelo comparativo da estrutura 3D desta enzima. Os dados de entalpia de interação foram combinados com determinações da energia livre ou da entalpia de solvatação dos ligantes e com estimativas das perdas entrópicas dos ligantes no processo de interação com a enzima para a proposição de equações empíricas de previsão das atividades por ajuste por correlação múltipla aos dados experimentais disponíveis.

Em relação à AChE de *T. californica*, foi possível encontrar três equações com boas correlações uma para cada classe de compostos, que puderam de forma adequada determinar a inibição através dos descritores de energia. A partir da análise das estruturas dos complexos obtidos com os mesoiônicos e das equações de previsão de

atividade correspondentes, foram propostos dois protótipos neste trabalho e suas atividades foram previstas. As duas moléculas foram previstas como mais ativas que as moléculas anteriores (que deram origem aos protótipos), indicando que as modificações foram adequadas. Para a AChE de *Ae. aegypti* também foi possível encontrar uma equação com uma boa correlação com as atividades das β -carbolinas bivalentes, que pode de forma adequada determinar a inibição através dos descritores de energia. Foi proposto um protótipo da β -carbolina bivalente neste trabalho, aplicando-se o conceito de restrição conformacional, e sua atividade foi prevista. A molécula proposta foi prevista como mais ativa que a molécula que deu origem ao protótipo.

Palavras-chave: Semi-empírico, Acetilcolinesterase, *T. californica*, *A. aegypti*.

ABSTRACT

Acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme essential for the central and peripheral cholinergic transmission. AChE inhibitors can be applied as medicines and they are the principal compounds used nowadays for the treatment of Alzheimer's disease (AD). AD is a neurodegenerative disorder, which presents an important socio-economic impact, responsible for 50-60% of the total number of dementia cases among people above 65-years old. Although irreversible AChE inhibitors are not commonly used as medicines for humans, their use is common for the control of disease vectors, especially diseases transmitted by mosquitos, such as dengue fever. The World Health Organization (WHO) estimates that 50-100 million people are infected by the dengue virus annually in 100 countries.

The objective of the present work is the development of empirical models for prediction of the activities of synthetic compounds as inhibitors of AChE. The models were based on activity data for the inhibition of *Torpedo californica* AChE by mesoionic compounds and harmane derivatives, synthesized by research groups from UFRRJ, and bivalent β -carbolines, obtained from the literature. The same procedure was applied to the development of an empirical model for the prediction of bivalent β -carbolines inhibition data of *Aedes aegypti* AChE.

The complete procedure involved the use of the molecular docking procedure for the generation of ligands/enzyme complexes, followed by calculations of the interaction enthalpies in the gas phase by semi-empirical methods. For the study with the *Aedes aegypti* AChE, it was necessary the previous construction of a comparative model of the enzyme's 3D structure. The interaction enthalpy data were combined with data from the ligands solvation free energies or solvation enthalpies together with estimative data of the ligands entropic losses associated to the interaction with the enzyme in order to propose empirical equations for prediction of activities data through regressive fit by multiple correlation with available activity data.

For the *T. californica* AChE, it was possible to develop three equations with good correlations for the three classes of compounds evaluated, which could be successfully applied for the prediction of inhibition data from calculated energy descriptors. Based on the analysis of the obtained structures for the mesoionic compounds and the corresponding empirical equation, we proposed the structures of

two prototypes and determined their predicted activities. Both molecules were predicted as more active AChE inhibitors when compared to the compounds from which the new compounds were designed. For the *Ae. aegypti* AChE, it was possible to find an equation for the calculation of β -carboline activities, which presented a good correlation with the experimental data. It was also proposed a prototype for the β -carboline, based on the conformational restriction concept. Its AChE inhibition activity was calculated and the molecule was predicted as more active the compound from which the new compounds was designed.

Keywords: Semi-empirical, Acetylcholinesterase, *T. californica*, *Ae. aegypti*.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Å	Angstrom
AM1	<i>Austin Model 1</i>
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
Asp	Aspartato
CAS	Canal aniônico do Subsítio
FEP	<i>Free Energy Perturbation</i>
GA	<i>Genetic Algorithm</i>
HF	Hartree-Fock
EF	Eigenvector Following (na pesquisa de mínimo de energia)
Gly	Glicina
ΔH_{int}	Entalpia de interação (complexo – ligante sítio ativo)
ΔH_{solv}	Entalpia de solvatação
ΔG_{solv}	Energia livre de solvatação
His	Histidina
ΔH_{r}	Entalpia de reação
ΔH_{int}	Entalpia de interação
Ile	Iso-leucina
OF	Organofosforado
PAS	Subsítio aniônico periférico
PBT	Pentileno-bis-tacrina
PDB	Protein Data Bank
Phe	Fenilalanina
MM2	<i>Molecular Mechanics 2</i>

MNDO	<i>Modified Neglect of Diatomic Overlap</i>
MNDO/d	<i>Modified Neglect of Diatomic Overlap</i> , incluindo orbitais d
MQ	Mecânica Quântica
NDDO	<i>Neglect of Diatomic Differential Overlap</i>
N _{LR}	Número de Ligações Rotacionáveis
OM	Orbital Molecular
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PM3	<i>Parametric Method 3</i>
PM5	<i>Parametric Method 5</i>
PM6	<i>Parametric Method 6</i>
RM1	<i>Recife Model 2</i>
Ser	Serina
T	Interação de empilhamento π perpendicular
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
I	Inibidor
Glu	Glutamato
BChE	Butirilcolinesterase
IACHe	Inibidores da AChE
DA	Doença de Alzheimer
OMS	Organização mundial de saúde
SVS	Serviço de vigilância sanitária
PEAa	Programa de Erradicação do <i>Ae. Aegypti</i>
LIE	<i>Linear Interaction Energy</i>
<i>TcAChE</i>	acetilcolinesterase <i>de Torpedo californica</i>
<i>AaAChE</i>	acetilcolinesterase <i>de Aedes aegypti</i>

1. INTRODUÇÃO

Praticamente todas as reações bioquímicas são catalisadas por enzimas que, com exceção de uns poucos RNAs catalíticos, são proteínas. As enzimas são catalisadores muito eficientes, podendo aumentar a velocidade das reações por um fator entre 10^5 e 10^{17} . Para serem ativas, algumas enzimas requerem um co-fator químico, que pode estar fraca ou firmemente ligado à enzima, como íons metálicos ou moléculas orgânicas pequenas chamada de coenzimas. Cada enzima é classificada de acordo com a reação específica que ela realiza. (BERG *et al.*, 2008).

As reações catalisadas pelas enzimas são caracterizadas pela formação de um complexo entre o substrato e a enzima (o complexo ES). A ligação ocorre em uma região na molécula da enzima chamada sítio ativo. A função das enzimas e de outros catalisadores é diminuir a energia de ativação da reação e, dessa forma, aumentar a velocidade da reação. O equilíbrio de uma reação não é afetado pela enzima (BERG *et al.*, 2008).

Uma das possíveis origens da energia que permite o aumento da velocidade da reação na enzima são as interações intermoleculares (ligações hidrogênio, interações iônicas e hidrofóbicas, entre outras) entre o substrato e a enzima. O sítio ativo enzimático pode estar estruturado de tal maneira que algumas dessas interações ocorrem preferencialmente no estado de transição da reação, tornando-o mais estável. Além disso, a energia de interação pode aumentar a energia do substrato, tensioná-lo ou provocar uma mudança conformacional na enzima (ajuste induzido). O aumento da energia do substrato e a estabilização do estado de transição reduzem a energia de ativação da reação. Outros mecanismos catalíticos incluem a catálise geral ácido-base e a catálise covalente (BERG *et al.*, 2008; NELSON & COX, 2002).

Mecanismos de reação detalhados têm sido propostos para muitas enzimas. A cinética é uma metodologia importante para o estudo dos mecanismos de reação, incluindo os enzimáticos. A maioria das enzimas tem algumas propriedades cinéticas em comum. À medida que a concentração do substrato aumenta, a atividade catalítica de uma concentração fixa de uma enzima aumenta, aproximando-se de uma velocidade máxima (V_{max}), característica na qual praticamente toda enzima está na forma do

complexo ES. A concentração do substrato que produz metade da velocidade máxima é a constante de Michaelis, K_m , que é característica para cada enzima agindo sobre um determinado substrato. A equação de Michaelis-Menten (Equação 1) relaciona a velocidade inicial V_0 de uma reação enzimática com a concentração de substrato $[S]$, a V_{\max} e a constante K_m :

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Eq. 1})$$

Em condições de saturação, a velocidade limite de uma reação catalisada enzimaticamente é descrita pela constante K_{cat} , também chamada número de renovação. A relação K_{cat}/K_m fornece uma boa medida de eficiência catalítica. A equação de Michaelis-Menten é também aplicável a reações com dois substratos, que ocorrem ou pela formação de um complexo ternário ou por uma dupla-troca. Cada enzima tem um pH ótimo (ou intervalo de pH) no qual apresenta atividade máxima (NELSON & COX, 2002).

1.1 Inibidores Enzimáticos Reversíveis e Irreversíveis

Os inibidores enzimáticos são agentes moleculares que interferem com a catálise, diminuindo ou parando as reações enzimáticas. As enzimas catalisam virtualmente todos os processos celulares, de forma que não é surpreendente que inibidores enzimáticos estejam entre os agentes farmacêuticos e os pesticidas mais importantes conhecidos. O estudo dos inibidores enzimáticos também fornece informação valiosa sobre os mecanismos enzimáticos e tem ajudado a definir alguns caminhos metabólicos (MARQUES & YAMANAKA, 2008).

As enzimas são inativadas por substâncias específicas, algumas responsáveis por modificações irreversíveis de um grupo funcional essencial para a atividade catalítica, enquanto outras se ligam de modo reversível às enzimas por interações intermoleculares, sem formação de ligações covalentes.

1.1.2 Inibidores Reversíveis

Um tipo comum de inibição reversível é a competitiva (Esquema 1a) (NELSON & COX, 2002). Um inibidor competitivo compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima. Enquanto o inibidor (I) ocupa o sítio ativo, ele impede a ligação do substrato à enzima. Muitos inibidores competitivos são compostos que se assemelham com o substrato e se combinam com a enzima para formar um complexo, mas sem levar à catálise. Mesmo combinações transitórias desse tipo reduzirão a eficiência da enzima. Levando em consideração a geometria molecular dos inibidores que se assemelham ao substrato, podemos chegar a conclusões sobre que partes do substrato normal se ligam à enzima. A inibição competitiva pode ser analisada quantitativamente pela cinética do estado estacionário. Na presença de um inibidor competitivo, a equação de Michaelis-Menten conduz à equação 2.

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{\alpha K_m + [S]} \quad (\text{Eq. 2})$$

Na eq. 1

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_1}$$

e

$$K_1 = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

Pelo fato de o inibidor ligar-se reversivelmente à enzima, a competição pode ser inclinada a favorecer o substrato, simplesmente, quando se adiciona mais substrato. Quanto [S] exceder [I], a probabilidade de uma molécula de inibidor se ligar à enzima é minimizada e a reação exibe uma V_{\max} normal. Entretanto, a [S] onde $V_0 = 1/2 V_{\max}$, a K_m aparente, aumenta na presença do inibidor por um fator de α . Esse efeito na K_m aparente, combinado com a ausência de um efeito em V_{\max} , é diagnóstico da inibição competitiva e facilmente revelada em um diagrama do duplo recíproco. A constante de equilíbrio para a ligação do inibidor K_1 pode ser obtida a partir do mesmo diagrama (NELSON & COX, 2002).

As duas outras formas de competição reversível, incompetitiva e não competitiva, são frequentemente definidas em termos de enzimas com um único substrato, mas na prática têm sido observadas apenas com enzimas que tem dois ou mais substratos (por exemplo, S_1 e S_2). Um inibidor incompetitivo (esquema 1b) se liga em um sítio diferente do sítio do substrato, porém, diferentemente do inibidor competitivo, liga-se apenas ao complexo ES (CAMPOS, 1999; BERG *et al.*, 2008; NELSON & COX, 2002).

Na presença de um inibidor incompetitivo, a equação de Michaelis-Menten se altera para:

$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + \alpha' [S]} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_i'}$$

e

$$K_i' = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

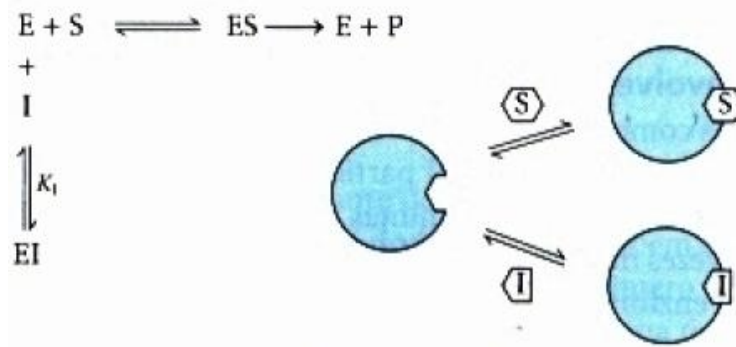
Conforme descrito pela equação 3, em altas concentrações do substrato, V_0 se aproxima de V_{max} . O valor de K_m aparente também diminui porque a $[S]$ requerida para alcançar a metade da V_{max} diminui de um fator de α' .

Um inibidor não competitivo (esquema 1c) também se liga a um sítio diferente do sítio ativo do substrato, mas ele pode se ligar tanto a E como a ES . A equação que descreve a inibição não competitiva é

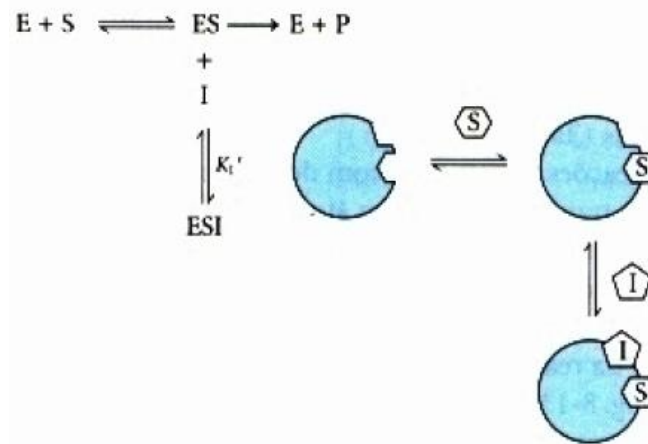
$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]}{\alpha K_m + \alpha' [S]} \quad (\text{Eq. 4})$$

onde α e α' são definidas como anteriormente. Um inibidor não competitivo geralmente afeta tanto K_m como a V_{max} .

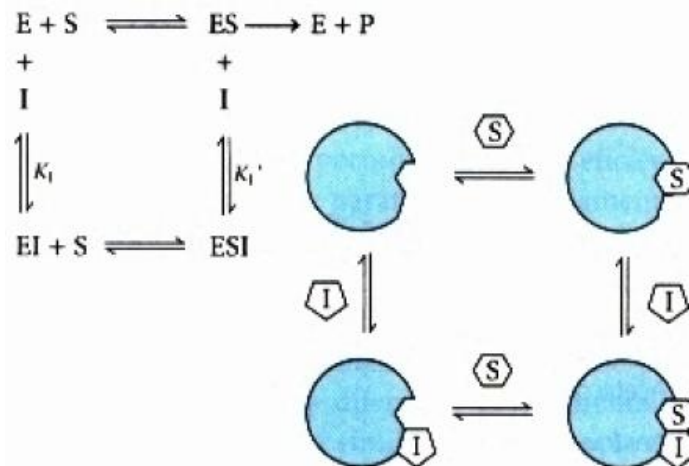
a) **Inibição competitiva**



b) **Inibição incompetitiva**



c) **Inibição não competitiva**



Esquema 1. Inibição reversível de enzimas. (a) inibidores competitivos ligam-se ao sítio ativo da enzima. (b) Inibidores incompetitivos ligam-se em um sítio separado, mas une-se apenas ao complexo ES. (c) Inibidores não competitivos ligam-se a sítios separados, mas podem unir-se tanto a E quanto a ES. K_i é a constante de equilíbrio para a ligação do inibidor à E;

K'_1 é a constante de equilíbrio para a ligação do inibidor ao complexo ES (NELSON & COX, 2002).

Se um inibidor competitivo se liga ao sítio ocupado por S_1 , ele pode atuar como um inibidor competitivo em experimentos nos quais $[S_1]$ é variável. Se um inibidor se ligar ao sítio normalmente ocupado por S_2 , ele pode atuar como um inibidor incompetitivo de S_1 . Os modelos de inibição atualmente observados dependem do fato de as ligações de S_1 e S_2 serem ordenadas ou ao caso. Desse modo, pode-se determinar a ordem com que esses substratos se ligam ao sítio ativo e os produtos são liberados. Frequentemente, o uso de um dos produtos da reação com um inibidor é particularmente informativo. Se somente um dos dois produtos da reação estiver presente, então, a reação inversa não ocorrerá. Contudo, um produto geralmente se ligará em alguma parte do sítio atuando como um inibidor. Os estudos de inibição geralmente são elaborados e podem proporcionar uma descrição detalhada do mecanismo de uma reação do tipo bissubstrato (NELSON & COX, 2002).

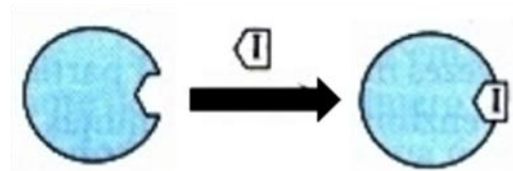
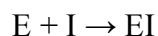
Tabela 2. Efeitos dos inibidores reversíveis em $V_{m\acute{a}x}$ e K_m aparentes.

Tipo de inibidor	$V_{m\acute{a}x}$ aparente	K_m aparente
Nenhum	$V_{m\acute{a}x}$	K_m
Competitivo	$V_{m\acute{a}x}$	αK_m
incompetitivo	$V_{m\acute{a}x} / \alpha'$	K_m / α'
Não competitivo	$V_{m\acute{a}x} / \alpha'$	$\alpha K_m / \alpha'$

1.1.2 Inibidores Irreversíveis

Inibidores irreversíveis são aqueles que reagem com um grupo funcional na molécula da enzima, por exemplo, vai de uma ligação covalente. Os inibidores irreversíveis representam uma ferramenta muito útil no estudo do mecanismo das reações. Os aminoácidos do sítio ativo que apresentam funções catalíticas importantes, frequentemente, são identificados por meio da determinação do aminoácido que está ligado covalentemente ao inibidor depois que a enzima é inativada (BERG *et al.*, 2008;

NELSON & COX, 2002). A inibição irreversível é progressiva, aumentando com o tempo, até atingir máxima inibição. O Esquema 2 representa o processo geral.



Esquema 2. Para inibição irreversível (BERG *et al.*, 2008; NELSON & COX, 2002).

Os inibidores irreversíveis são utilizados tanto para o combate de pragas na agricultura quanto aplicados na Área de Saúde Humana, como no controle de vetores de doenças, por exemplo, *Aedes aegypti*, mosquito transmissor da dengue.

1.2 Colinesterases

As enzimas colinesterases se dividem em acetilcolinesterases (AChE) e butirilcolinesterases (BChE), cada uma com diferentes especificidades por seus substratos (TAYLOR, 1994). As colinesterases pertencem à família das hidrolases de serina, que fazem parte de uma família maior, as alfa/beta (α/β) hidrolases.

Essas enzimas desempenham papéis importantes na neurotransmissão colinérgica central e periférica (NACHMANSOHN & ROTHENBERG, 1945), sendo classificadas de acordo com suas propriedades catalíticas e especificidades a substratos, sensibilidade a inibidores e distribuição tecidual (MASSOULIÉ, 1993).

A AChE tem especificidade para o neurotransmissor acetilcolina (ACh) e interrompe a transmissão dos impulsos nervosos pela rápida hidrólise desse neurotransmissor na membrana pós-sináptica da junção neuromuscular. A BChE catalisa a hidrólise da ACh, mas não é tão específica e possui maior afinidade por substratos mais hidrofóbicos como a butirilcolina, por exemplo.

A primeira determinação da estrutura primária da AChE foi de uma espécie de peixe elétrico, *Torpedo californica* (arraia elétrica), que possui abundante quantidade da enzima em seu órgão elétrico (SCHUMACHER, 1986). Posteriormente, as seqüências da AChE de várias outras espécies foram obtidas, inclusive da humana (SOREQ, 1990).

A AChE de *T. californica* (TcAChE) apresenta grande similaridade em relação à AChE de mamíferos. Por possuir cerca de 60% de identidade em suas estruturas primárias, estas enzimas apresentam grande semelhança em suas estruturas tridimensionais, juntamente com outras enzimas da família de α/β hidrolases (TAYLOR, 1991; CYCGLER, 1993).

O sítio ativo da AChE é constituído por uma tríade catalítica, Ser200, His400 e Glu327, localizada no fundo de um poço de 20 Å de profundidade, com o átomo de O γ do resíduo Ser200 4 Å acima da base do poço (Figura 1). A superfície do poço é em grande parte formada por resíduos aromáticos, com poucos resíduos ácidos. Cerca de 40% do interior da superfície do canal é formado por 14 resíduos aromáticos. Foram identificados resíduos que são componentes de diferentes subsítios participantes na acomodação do substrato. Estes incluem a cavidade da acila, composta pelos resíduos Phe288 e Phe290, o subsítio hidrofóbico, constituído pelos resíduos aromáticos Trp84, Tyr130, Tyr330 e Phe331 e o subsítio “aniônico”, que acomoda grupos positivamente carregados via interação do tipo cátion- π com o resíduo Trp84 (SHAFFERMAN *et al.*, 2005)

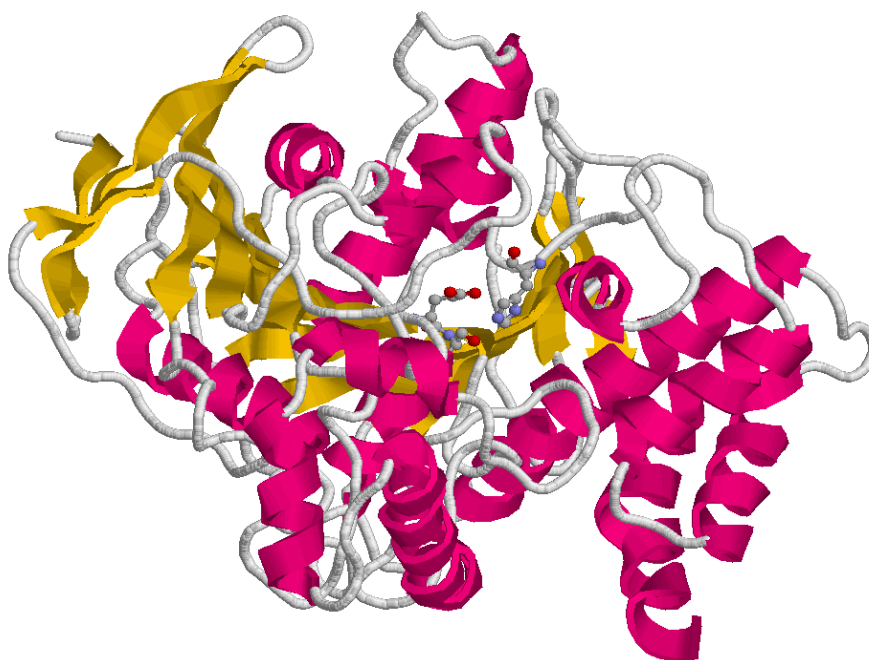
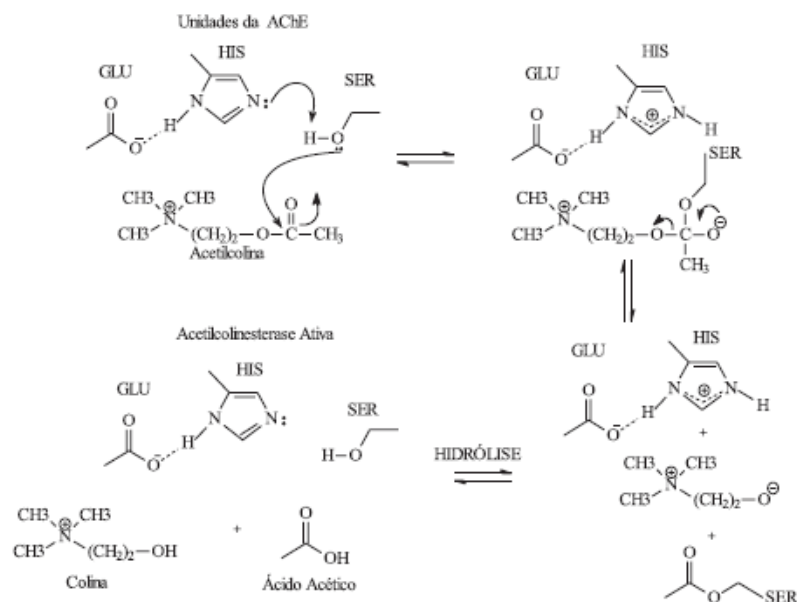


Figura 1. Estrutura tridimensional da AChE do *Torpedo californica* (SILMAN e SUSSMAN, 2005). Em destaque, a tríade catalítica (Ser200, His400 e Glu327).

O mecanismo de hidrólise da ACh (Esquema 3) envolve o ataque nucleofílico da serina da tríade catalítica ao carbono carbonílico do substrato, o que produz um intermediário tetraédrico estabilizado por ligações hidrogênio com grupos NH peptídicos de três resíduos (que formam a cavidade do oxiânion), o qual libera colina, deixando o resíduo de serina acetilado. Ao final, a hidrólise do grupo acetila da serina por meio de uma molécula de água recupera o sítio catalítico da enzima (SANTOS, 2007).



Esquema 3. Mecanismo de hidrólise da acetilcolina pela AChE (Santos, 2007).

Evidências sugerem que a BChE pode atuar como um co-regulador da atividade da ACh no SNC, uma vez que a inibição dessa enzima aumenta de maneira dose dependente os níveis desse neurotransmissor no cérebro (GIACOBINE, 2000). Na ausência da AChE, a BChE parece substituí-la na manutenção da integridade estrutural e fisiológica do sistema colinérgico (MESULAM *et al.*, 2002).

A partir da homologia entre AChE e BChE, MILLARD & BROOMFIELD (1992) propuseram um modelo para a BChE humana com base na estrutura da AChE. Nesse modelo, observou-se, conforme esperado, uma grande similaridade estrutural entre as enzimas. Uma diferença encontrada foi a presença de apenas um resíduo aromático (Phe331 na AChE) na BChE no meio do canal que leva ao sítio ativo (a AChE possui dois, Phe330 e Phe331). Pela ausência da Phe330 e de outros resíduos aromáticos, o sítio ativo é mais espaçoso na BChE do que o da AChE.

1.3 Usos de Inibidores da AChE na Área de Saúde Humana

1.3.1. Inibidores Reversíveis da AChE

Os inibidores da acetilcolinesterase (IACHe) têm aplicação como fármacos e são as principais substâncias licenciadas ativamente, para o tratamento específico da doença de Alzheimer (DA). O aumento da expectativa de vida, no entanto, tem como efeito negativo o aparecimento de doenças degenerativas, típicas de idades mais avançadas, como as várias formas de demência. Dentre estas, a mais importante é, sem dúvida, a DA (CRI, 2008).

A DA é uma desordem neurodegenerativa, de grande impacto sócio-econômico, responsável por 50-60% do número total de casos de demência entre pessoas acima de 65 anos (JUNIOR *et al.*, 2004). Nas últimas décadas, muitos esforços têm sido realizados para tentar esclarecer as causas da DA, com a esperança de que isso resulte no desenvolvimento de tratamentos farmacológicos efetivos e seguros (ORHAN *et al.*, 2007). A DA caracteriza-se pelo acúmulo de um peptídeo chamado beta-amilóide A-42 (A β), que é um fragmento de uma proteína beta-amilóide maior, existente normalmente no cérebro humano. Os níveis elevados desse peptídeo resultam em agregação, formando placas (HARDY & ALLSOP, 1991; HAASS, 1992; MUDHER & LOVESTONE, 2002). Nos estágios iniciais, ocorre a perda de memória recente. À medida que a doença progride, novos sintomas aparecem, como confusão mental, mudanças de humor e irritabilidade. As funções cognitivas superiores, como linguagem, orientação e julgamento, são gravemente afetadas (WALDMAR *et al.*, 2007). Finalmente, funções vitais são perdidas, levando à morte.

Embora não exista cura, alguns compostos são úteis em retardar a deterioração cognitiva causada pela DA (KATALINIC *et al.*, 2010). Os avanços obtidos na compreensão da evolução e das razões moleculares à gênese da DA têm demonstrado que o uso de IACHe pode ser uma forma eficiente de controle da evolução da doença (VIEGAS, 2004). A estratégia baseia-se na correção da função colinérgica cerebral pelo uso de agentes anticolinesterásicos, que levariam a um aumento da ACh disponível. Assim, uma abordagem útil para a descoberta de fármacos para o tratamento da DA é o desenvolvimento de novos IACHe (KATALINIC *et al.*, 2010).

Evidências sugerem que a BChE tem um papel significativo na DA (GREIG *et al.*, 2005; FARLOW, 2007), uma vez que esta enzima está envolvida em funções

neurais como a correção da neurotransmissão colinérgica e não-colinérgica (MESULAM *et al.*, 2002). Estudos indicam que inibidores seletivos da BChE elevam os níveis extracelulares da ACh no cérebro, melhorando o desempenho cognitivo em roedores (HARTMANN *et al.*, 2007), sem os efeitos colaterais adversos dos IACHe seletivos ou não seletivos, tais como náusea e vômito.

Os IACHe são classificados com base na sua reversibilidade e duração da inibição das colinesterases (FORLENZA, 2005). Rivastigmina, galantamina e donepezil (Figura 2) são IACHe reversíveis de duração, respectivamente, curta, intermediária e longa. Um dos primeiros fármacos sintéticos utilizados para o tratamento da DA foi a tacrina (Figura 2), mas devido ao elevado risco de hepatotoxicidade, com o tempo caiu em desuso (PENG, 1995). O donepezil, a rivastigmina e a galantamina continuam sendo usados para o controle dos sintomas de DA. Somente o donepezil é utilizado para o tratamento da DA nos estágios mais avançados da doença (BIRKS, 2006).

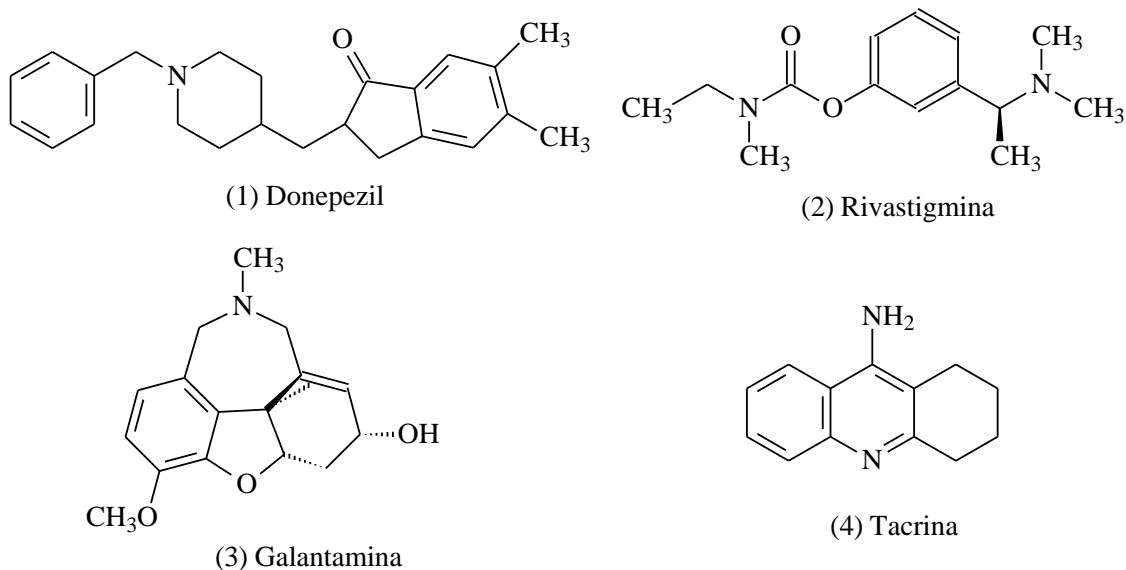


Figura 2. Exemplos de inibidores comerciais da AChE.

O donepezil foi o segundo medicamento a ser aprovado pelo FDA, em 1996, e pela ANVISA, em 2000, para o tratamento de DA. Vários estudos provaram sua eficácia terapêutica (ROGERS *et al.*, 1998). O donepezil apresenta algumas vantagens em relação à tacrina. Sua meia-vida é longa, de aproximadamente 70 horas, permitindo dose única diária. Não é hepatotóxico, sendo desnecessária a monitoração laboratorial (ROGERS *et al.*, 1998).

A galantamina é o fármaco mais recente desse grupo, aprovado pela FDA e pela ANVISA em 2001. A galantamina apresenta adicionalmente ação de modulação alostérica de receptores nicotínicos (ligante potenciador alostérico). Embora não esteja claro o significado clínico dessa modulação, existe relação entre cognição e receptores nicotínicos. Este IChE tem meia vida de aproximadamente 7 horas, podendo ser administrado em duas doses diárias (LEVIN & SIMON, 1998; CACABELOS *et al.*, 1999; CARAMELLI *et al.*, 2004).

Apesar de haver diferenças farmacológicas entre os IChE citados acima ainda em uso, não há vantagens evidentes na eficácia e no perfil de efeitos adversos, além de que esses fármacos não impedem a progressão da demência. Esses medicamentos agem na inibição das colinesterases e permitem uma ação temporal maior da ACh sobre os receptores colinérgicos, mas não têm ação sobre as causas dessa demência, não interferindo, por exemplo, no processo de produção da A β . Entre os efeitos adversos do uso destes medicamentos estão náuseas, problemas gastrointestinais, diarreia, perda de peso, bradicardia, síncope e insônia (DOWNEY, 2008).

Assim, tem havido um esforço contínuo pelo desenvolvimento de novos IChE com propriedades melhores, o que pode ser auxiliado pelo uso de informações estruturais de complexos entre os IChE e a enzima. Estudos computacionais (PANG & KOZIKOWSKI, 1994) sugeriram que a interação da tacrina com a AChE envolveria não apenas o subsítio catalítico “aniônico” (CAS; trata-se de uma terminologia antiga, proposta quando não se sabia ainda a natureza dos aminoácidos que compunham este sítio, que hoje sabe-se ser essencialmente composto por aminoácidos aromáticos), principalmente por de uma interação do tipo empilhamento- π com Trp84 (HAREL *et al.*, 1993), mas, também uma interação de menor afinidade com o anel indólico do resíduo Trp279 no subsítio periférico “aniônico” (PAS, que também sabe-se hoje ser essencialmente composto por aminoácidos aromáticos). Assim, foi previsto que bis-tacrinas, onde duas unidades de tacrina unidas por uma cadeia de hidrocarbonetos de comprimento adequado, teria maior potencial inibitório e seletividade do que a tacrina, esta hipótese foi confirmada pela síntese e avaliação de uma série de bis-tacrinas (PANG *et al.*, 1996; CARLIER *et al.*, 1999). Um desses compostos, a heptileno-bis-tacrina, é 150 vezes mais ativo do que a tacrina e até 250 vezes mais seletivo para a AChE do que para a BuChE (CARLIER *et al.*, 1999). A pentileno-bis-tacrina é menos potente e seletiva do que heptileno-bis-tacrina (CARLIER *et al.*, 1999).

As estruturas cristalográficas foram resolvidas para complexos da AChE de *T. californica* com a pentileno-bis-tacrina e a heptileno-bis-tacrina. O derivado com 7 carbonos ocupa todo o comprimento do canal ao sítio ativo, estabelecendo interações com resíduos aromáticos tanto no CAS (Trp84 e Phe330), na parte inferior do canal, quanto no PAS, próximo da entrada do canal (Tyr70 e Trp279). O derivado com 5 carbonos interage de forma semelhante no fundo do canal, mas o comprimento mais curto não permite uma interação tão efetiva no PAS. Embora o grupo tacrina próximo ao PAS não interaja com o resíduo Trp279, ele desloca o resíduo Phe331, provocando assim um grande rearranjo no laço definido pelos resíduos Trp279-Ser291. A capacidade destes inibidores para induzirem mudanças estruturais de grande escala no canal do sítio ativo da AChE tem importantes implicações para o planejamento de fármacos baseado na estrutura (RYDBERG *et al.*, 2006).

Além do papel catalítico da AChE, ela também age como promotora na formação do peptídeo A β (FAN *et al.*, 2008). Assim, estudos mais recentes têm tido como objetivo a procura de compostos que atuem simultaneamente na inibição da AChE e na agregação de A β catalisada pela AChE (PIAZZI *et al.*, 2007; RIZZO *et al.*, 2009; RIZZO *et al.*, 2010). Esses inibidores se ligam aos sítios da AChE que são responsáveis tanto pela ação catalítica quanto pela agregação de amiloide A β .

1.3.2. Inibidores Irreversíveis da AChE

Embora IACHÉ irreversíveis, em geral, não sejam usados com fins medicinais em seres humanos, é comum o seu uso no controle de vetores de doenças, especialmente as transmitidas por mosquitos, como é o caso da dengue. A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 50-100 milhões de pessoas se infectem anualmente, em 100 países, de todos os continentes, exceto a Europa e Antártica. Destes casos, cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência da dengue. Na região das Américas foram registrados, no início de 2012, mais de 120.000 casos de dengue pelo programa regional da dengue da OMS, com 1.855 casos graves e 40 óbitos, tendo sido verificada a manifestação dos quatro sorotipos de vírus. No Brasil, a doença continua avançando: segundo dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde, em 2013 foram notificados 1.452.489 casos de dengue no país. Comparando esses

resultados com 2012, houve um aumento de quase 2,5 vezes nos casos notificados (589.591 casos em 2012) (<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue>).

Não há tratamento efetivo para a dengue e o principal meio de reduzir sua incidência é pelo do controle do agente transmissor, o mosquito *Aedes aegypti* (Figura 3). O *Ae. aegypti* encontrou no mundo moderno condições muito favoráveis para uma rápida expansão, pela urbanização acelerada que criou cidades com deficiências de limpeza urbana; pela intensa utilização de materiais não-biodegradáveis, como recipientes descartáveis de plástico e vidro; e pelas mudanças climáticas (Funasa, 2002).



Figura 3. *Aedes aegypti*: adulto, ovos e larvas.

Com essas condições, o *Ae. aegypti* espalhou-se por uma área onde vivem cerca de 3,5 bilhões de pessoas em todo o mundo. Nas Américas, está presente desde os Estados Unidos até o Uruguai; só não é encontrado no Canadá e no Chile, por razões climáticas e de altitude (FUNASA, 2002). Em nosso país, as condições sócio-ambientais favoráveis à expansão do *Ae. aegypti* possibilitaram uma dispersão desse vetor que não conseguiu ser controlada com os métodos tradicionalmente empregados no combate às doenças transmitidas por vetores (FUNASA, 2002). Na Figura 4 temos o mapeamento do número de casos de dengue no Brasil no início de 2011 (SVS, 2011).

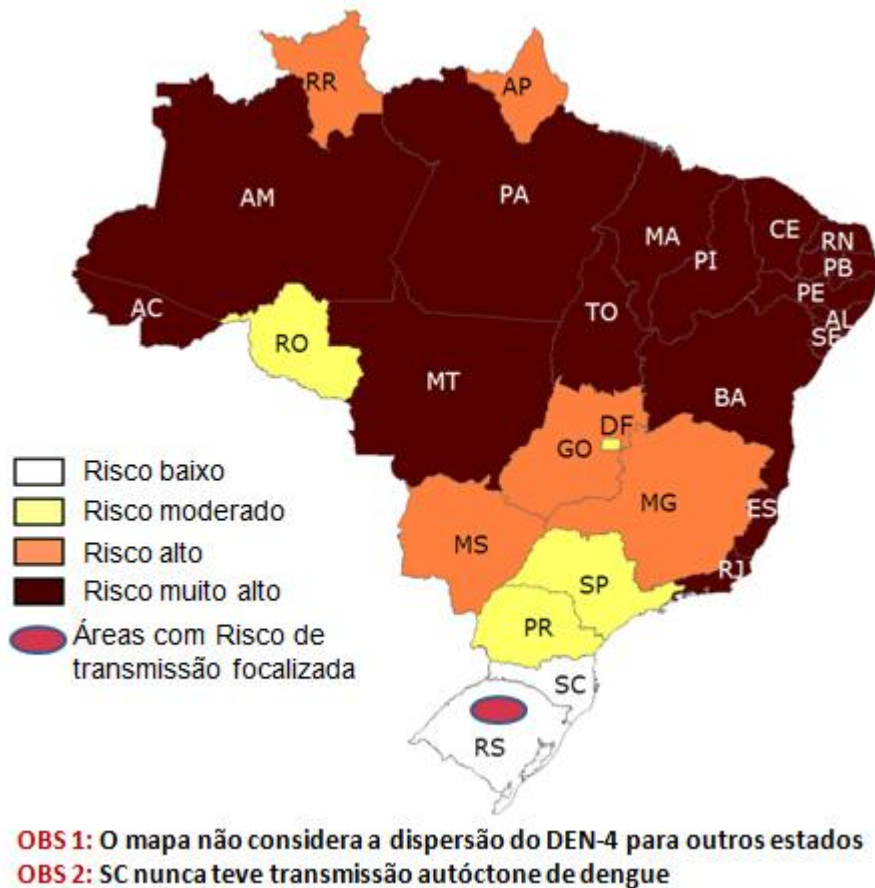


Figura 4: Risco de contrair dengue no Brasil (SVS, 2011). DEN-4 é um tipo de dengue que foi detectado em 1981 e está de volta ao país.

Metil-carbamatos e compostos organofosforados são IACHÉ irreversíveis que têm sido utilizados no controle de vetores de doenças. Os metil-carbamatos são derivados do ácido carbâmico, substâncias reconhecidas como altamente eficientes quanto à ação pesticida, principalmente inseticida. Os compostos deste grupo apresentam as seguintes características: 1) alta atividade inseticida; 2) baixa ação residual, devido à instabilidade química das moléculas; 3) baixa toxicidade em longo prazo, quando comparada com os organofosforados (MÍDIO & SILVA, 1995). São exemplos: carbaril (Sevin), aldicarbe (Temik), carbofurano (Furadan) (Figura 5) (MORTENSEN, 1986, MÍDIO & SILVA, 1995, SOARES, 1998).

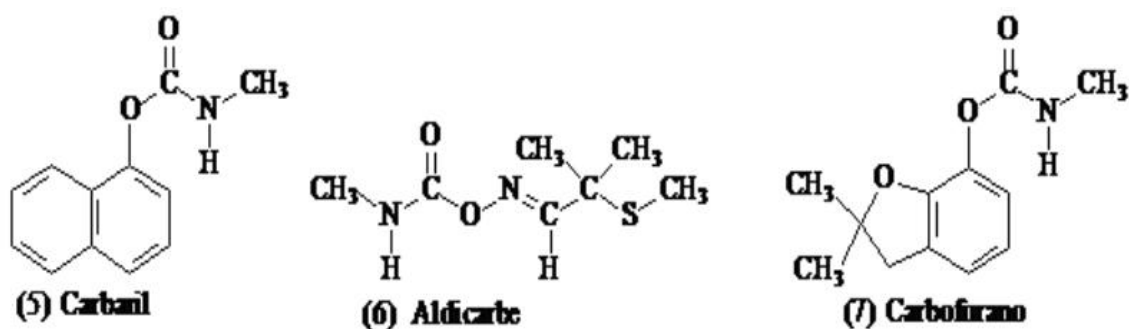


Figura 5. Exemplos de metil-carbamatos.

Os metil-carbamatos podem ser absorvidos por via oral, respiratória e dérmica (LIMA, 1996, MORAES, 1998). A toxicidade dos metil-carbamatos é muito influenciada pelo veículo e pela via de exposição (BARON, 1991). O metabolismo e a eliminação de metil-carbamatos são relativamente rápidos e não há evidências de haver bioacumulação destes compostos (BARON, 1991, MACHEMER & PICKEL, 1994).

Os metil-carbamatos funcionam de forma similar aos organofosforados (OF), ligando-se covalentemente à serina do sítio ativo da AChE, inibindo-a. O fato da inibição da AChE produzida pelos metil-carbamatos ser de mais curta duração é uma das diferenças destes dois grupos de compostos (FORD, 1993; JEYARATNAM & MARONI, 1994; MORGAN, 1998; SOARES, 1998).

Em 1932 os OF foram descobertos como compostos tóxicos para as pessoas, em 1937 e para insetos. Alguns foram usados como agentes de guerra química, como o sarin (GB), soman (GD) e VX (Figura 6), sendo classificados como armas de destruição em massa pela ONU e cuja produção e armazenamento foram considerados proibidos em um tratado assinado em 1993, embora muitos países mantenham estoques destas substâncias. Ainda são a principal classe dos agentes inseticidas incluindo clorpirifós, acefato, paraoxon (Figura 6), normalmente com toxicidade seletiva contra insetos, em comparação com mamíferos (CASIDA & QUISTAD, 2005) (Figura 6).

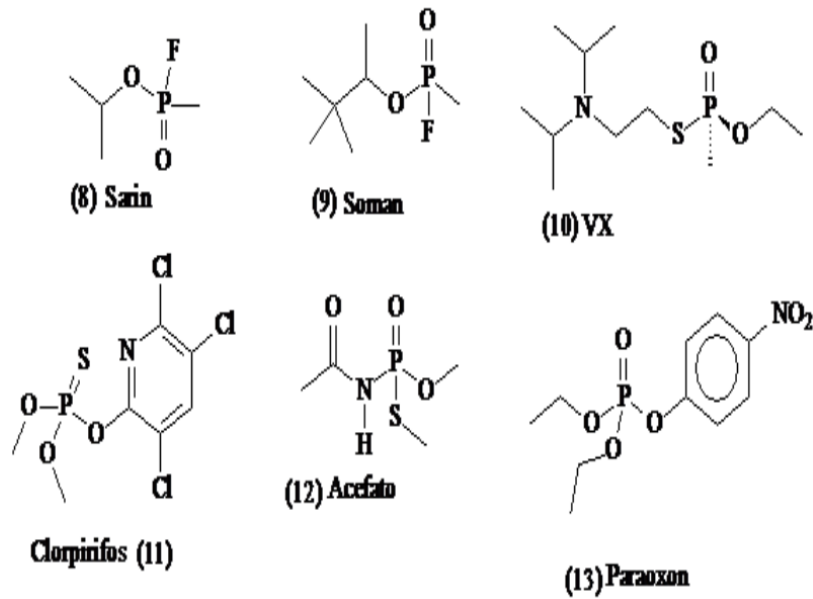


Figura 6. Exemplos de Organofosforados.

Os OF inibem a AChE humana irreversivelmente por fosforilação do grupo hidroxila da serina catalítica, nas fibras colinérgicas dos sistemas nervosos central e periférico (PANGY *et al.*, 2003; ELHANANY *et al.*, 2001; CASTRO, 2002). As fibras colinérgicas são responsáveis pela estimulação de vários órgãos do corpo e dos músculos voluntários, ocorrendo no sistema nervoso central e nos sistemas periféricos simpático e parassimpático. Neste tipo de fibra nervosa, a ACh é responsável pela transmissão do impulso nervoso, através da sinapse, até receptores específicos, que podem ser de dois tipos, nicotínicos e muscarínicos. A terminação do impulso nervoso ocorre através da hidrólise da ACh, realizada pela AChE. Desta forma, a inibição da AChE resulta de acúmulo de ACh em todos os sítios de transmissão colinérgica, com conseguinte superestimulação das estruturas enervadas por aquelas fibras (CASTRO, 2002).

Em 1996, o Ministério da Saúde decidiu rever a estratégia empregada contra o *Ae. aegypti* e propôs o Programa de Erradicação do *Ae. aegypti* (PEAa). Ao longo do processo de implantação desse programa, observou-se a inviabilidade técnica de erradicação do mosquito a curto e médio prazos. O PEAa, mesmo não atingindo seus objetivos, teve méritos ao propor a necessidade de atuação multissetorial e prever um modelo descentralizado de combate à doença, com a participação das três esferas de governo, Federal, Estadual e Municipal (FUNASA, 2002).

A implantação do PEAa resultou em um fortalecimento das ações de combate ao vetor, com um significativo aumento dos recursos utilizados para essas atividades, com as ações de prevenção centradas quase que exclusivamente nas atividades de campo de combate ao *Ae. aegypti* com o uso de inseticidas da classe do OF: o temefós para o controle de larvas; a malationa para o controle perifocal das formas adultas; e a malationa ou a fenitrotiona, na forma de aerossol de ultrabaixo volume, também para o controle das formas adultas (PONTES *et al.*, 2005).

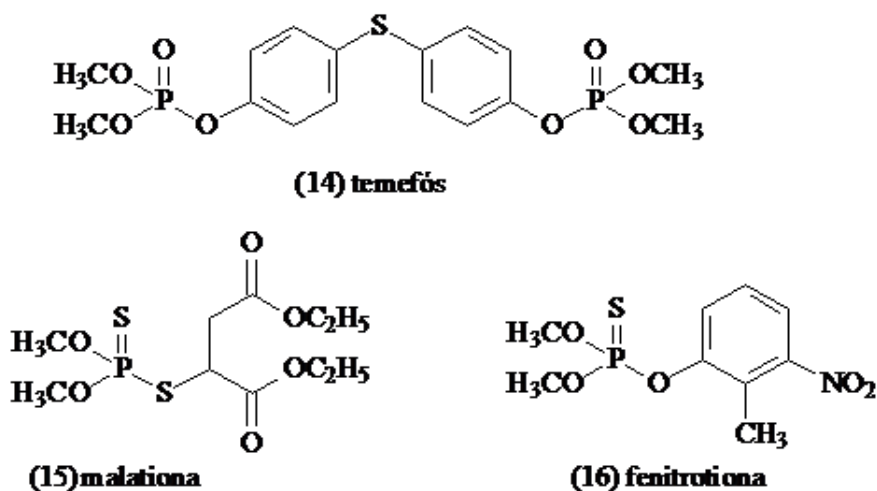


Figura 7. Organofosforados temefós, malationa e fenitrotiona, usados no controle do *Ae. aegypti* (SANTOS *et al.*, 2007).

A resistência aos pesticidas é um dos grandes entraves em programas de controle de insetos envolvendo o uso de produtos químicos. Dentre as consequências do surgimento de resistência estão a aplicação mais frequente de pesticidas; o aumento na dosagem do produto; o uso de misturas indevidas de produtos e a substituição por um outro produto, geralmente de maior toxicidade (GEORGHIOUS, 1983). Esses fatores comprometem os programas de controle de insetos e tornam urgente o desenvolvimento de novas estruturas químicas para uso no controle de insetos.

1.4 Modelos Quantitativos de Interação

O reconhecimento molecular enzima-inibidor é governado por uma combinação de efeitos entálpicos e entrópicos (BROOIJMANS & KUNTZ, 2003), que determinam a energia livre de Gibbs da interação enzima-inibidor (ΔG_{int}), relacionada diretamente à

constante de inibição K_i (igual à constante de *dissociação* do complexo EI , que pode ser obtida experimentalmente), segundo a Eq. 5:

$$\Delta G_{\text{int}} = \Delta H_{\text{int}} - T\Delta S_{\text{int}} = RT \ln K_i \quad (\text{Eq. 5})$$

onde ΔH_{int} é a entalpia de interação, ΔS_{int} é a entropia de interação, T é a temperatura absoluta e R é a constante universal dos gases. Assim, a determinação teórica de ΔG_{int} para um conjunto de inibidores poderia ser usada para se prever quantitativamente as afinidades enzima-inibidor como parte de estudos de planejamento de novos inibidores.

A perturbação de energia livre (FEP, *Free Energy Perturbation*) e a integração termodinâmica (IT) são dois métodos teóricos para estimar ΔG_{int} . Os dois métodos são bastante precisos, com erros de aproximadamente 1 kcal/mol, mas o alto custo computacional envolvido torna-se um problema em estudos com séries extensas de ligantes (VAN GUNSTEREN *et al.*, 1994; KOLLMAN 1993; BROOKS *et al.*, 1988).

A energia de interação linear (*Linear Interaction Energy*, LIE) é outro método usado para a obtenção de ΔG_{int} (HANSSON *et al.*, 1998). Os dados de energia livre obtidos com este método envolvem simulações de dinâmica molecular somente nos estados inicial (ligante em solução) e final (complexo enzima-ligante), reduzindo o custo computacional em comparação com as técnicas FEP e IT. Os efeitos polares e apolares são levados em conta separadamente. A porção eletrostática ou polar pode ser ajustada usando-se a aproximação de resposta linear, enquanto que a apolar é calculada usando-se uma fórmula empírica construída sobre um conjunto de dados experimentais, segundo a Eq. 6.

$$\Delta G_{\text{int}} = \alpha \left(\langle V^{LJ} \rangle_{\text{ligado}} - \langle V^{LJ} \rangle_{\text{livre}} \right) + \beta \left(\langle V^{el} \rangle_{\text{ligado}} - \langle V^{el} \rangle_{\text{livre}} \right) \quad (\text{Eq. 6})$$

Na Eq. 6, $\langle V^{el} \rangle$ representa o valor médio da energia de interação entre o ligante e o meio circundante polar, um termo eletrostático, $\langle V^{LJ} \rangle$ é o valor médio apolar, uma função de Lennard-Jones, α é o fator empírico que surge das interações apolares e β é o correspondente para interações eletrostáticas. O método de LIE é um método eficaz e mais veloz do que os métodos FEP e IT para a determinação de energias livres de interação, mas com um custo computacional ainda relativamente extenso, o que dificulta seu uso em estudos envolvendo muitos ligantes (HANSSON *et al.*, 1998).

O método de Mecânica Molecular/Superfície de Poisson-Boltzmann (MM/PBSA) foi utilizado para calcular a energia livre de interação ΔG_{int} de alguns complexos em água (ZAMPIERI *et al.*, 2007; SRINIVASAN *et al.*, 1998); neste método, ΔG_{int} pode ser aproximado pelos termos descritos na Eq. 7:

$$\Delta G_{int} = \Delta E_{MM} + \Delta G_{solv} - T\Delta S \quad (\text{Eq. 7})$$

onde ΔE_{MM} é a variação da soma das energias de mecânica molecular das moléculas, que pode ser dividido em um termo eletrostático (ΔE_{EL}) e um termo de van der Waals (ΔE_{VDW}), segundo a Eq. 8.

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{EL} + \Delta E_{VDW} \quad (\text{Eq. 8})$$

Ainda na Eq. 7, o termo ΔG_{solv} pode ser subdividido em dois termos de energia, segundo a Eq. 9.

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_P + \Delta G_{NP} \quad (\text{Eq. 9})$$

Na Eq. 9, os componentes polares e apolares da variação da energia livre de solvatação são representados por ΔG_P e ΔG_{NP} , respectivamente.

Outro método usado para o cálculo de ΔG_{int} é a composição de funções empíricas. Estas funções reproduzem uma série de informações experimentais ligadas à energia livre de interação, postulando que ela pode ser dividida como uma soma de diferentes termos de energia independentes (AJAY & MURCKO, 1995), segundo a Eq. 10.

$$\ln K_i = \frac{\Delta G_{int}}{RT} = \sum c_i \Delta G_i \quad (\text{Eq. 10})$$

Na Eq. 10, c_i são coeficientes ajustados empiricamente por método de regressão múltipla e ΔG_i representa qualquer termo independente que irá contribuir para a energia livre de interação do complexo enzima-ligante. Mesmo com as limitações teóricas envolvidas ao se fazer esta aproximação (WILLIAMS & WESTWELL, 1998), esta metodologia empírica tem provido informações muito úteis com custo computacional mais baixo do que os métodos anteriores.

Estes modelos possuem um conjunto de resultados entálpicos e entrópicos, que incluem dados que podem ser determinados de forma separada, como a entalpia relacionada à interação do complexo enzima-ligante, dessolvatação do ligante, restrições da mobilidade do ligante após a interação e incluindo rotações internas entre os átomos que possuem ligação simples no ligante. Ainda que muitos termos sejam

necessários para descrever minuciosamente a energia de interação, um número limitado de termos cuidadosamente selecionados pode ser suficiente para o caso de uma série de moléculas similares estruturalmente.

Um exemplo é o estudo desenvolvido por Oliveira e colaboradores que aplicaram o método a inibidores da metaloenzima fosfodiesterase 4 (PDE4) e obtiveram a seguinte função empírica (OLIVEIRA *et al.*, 2006):

$$\Delta G_{\text{int}} = 0,012(\Delta G_{\text{solv}} + 44,95)^2 + 0,12\Delta H_{\text{int}} + 1,55N_{LR} - 42,38 \quad (\text{Eq. 11})$$

Na Eq. 11, o termo ΔH_{int} está relacionado à energia de interação enzima-ligante em fase gasosa, ΔG_{solv} à energia livre de solvatação do ligante, e N_{LR} ao número de ligações do ligante que têm rotação livre restringida como consequência da interação com a enzima; este último termo está relacionado diretamente com o custo entrópico envolvido no processo de perda de liberdade conformacional do ligante provocada pela interação enzima-ligante. Vários métodos podem ser usados para calcular os termos entálpicos envolvidos na interação entre o ligante e a enzima, que são baseados em funções que variam desde totalmente empíricas, como a mecânica molecular, até totalmente teóricas (métodos *ab initio*), passando pelos chamados métodos semi-empíricos (JENSEN, 1999). O termo ΔH_{int} da equação 11 foi calculado após um processo de otimização onde se fez uso de cálculos quânticos semi-empíricos com o método PM3 (STEWART, 1989-a,b).

A interação do ligante com a enzima provoca restrições às rotações internas. Searle e colaboradores determinaram que, para cada rotação restrita como resultado da interação com a enzima, a perda entrópica ($T\Delta S$ a 300 K) está entre -0,38 e -0,86 kcal/mol (-1,59 e -3,60 kJ/mol) (SEARLE & WILLIAMS, 1992; SEARLE *et al.*, 1992).

1.5 Energia Livre de Solvatação

Analisar os efeitos do solvente sobre as estruturas químicas é fundamental para a descrição dos processos químicos que ocorrem na fase condensada, sendo que mesmo informações extraídas de modelos teóricos simplificados são úteis na busca da compreensão do processo de solvatação (GRANT & RICHARDS, 1995).

O tipo mais simples de modelo considera o solvente de forma implícita (modelos de contínuo). Este modelo não considera o solvente composto por moléculas individuais, mas como um efeito de campo médio. Uma vantagem dos modelos de contínuo é o baixo custo computacional, muito inferior quando comparado com modelos explícitos. Os modelos implícitos são apropriados para uma estimativa rápida de energias livres de solvatação (RAUX, 2001)

A energia livre de solvatação em modelos de solvente implícito pode ser convenientemente dividida em dois termos. Um termo polar onde as interações de curto alcance entre o soluto e o solvente são consideradas (trabalho de cavitação e interação de dispersão soluto-solvente), e um termo polar-eletrostático, onde as interações eletrostáticas são tratadas. Consequentemente, a energia livre de solvatação pode ser escrita como a soma das energias livres não-polar (ΔG_{np}) e eletrostática (ΔG_{el}) (TRUHLAR *et al.*, 1996), segundo a Eq. 12.

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{np} + \Delta G_{el} \quad (\text{Eq. 12})$$

Um outro modelo alternativo a se considerar é o método COSMO (Conductor-like Screening Model) (KLAMT & SCHUURMANN, 1993), disponível no programa Mopac. Este modelo de contínuo permite o cálculo da entalpia de solvatação descrita pela diferença entre a entalpia de formação em solução (ΔH_{sol}) e a entalpia de formação em fase gasosa ($\Delta H_{gás}$), segundo a Eq. 13.

$$\Delta H_{solv} = \Delta H_{sol} - \Delta H_{gás} \quad (\text{EQ. 13})$$

Nos casos onde as entropias de solvatação são muito menores do que as entalpias de solvatação, o uso do método COSMO pode ser uma alternativa interessante na comparação do efeito da solubilidade nos dados de atividade biológica.

Uma abordagem geral para os modelos de solvatação mais discretos é a combinação do tratamento explícito para um pequeno número de moléculas do solvente com o modelo de contínuo para as vizinhanças (ALEMAN & GALEMBECK, 1998). Modelos pertencentes a esta abordagem podem produzir bons resultados mesmo nos sistemas onde as moléculas do solvente estão fortemente ligadas ao soluto, além de fornecer possíveis informações sobre o processo de solvatação (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2002). O maior problema associado com estes modelos de solvatação

discreto/contínuo é o custo e a qualidade da parte discreta do sistema. Outro modelo desenvolvido que pode fornecer bons resultados sem utilizar uma quantidade elevada de moléculas do solvente é o EFP (Effective Fragment Potential). O modelo EFP representa as interações intermoleculares fracas entre as moléculas do soluto, descrita por mecânica quântica, e as moléculas do solvente representadas pelos fragmentos do potencial efetivo (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2002).

1.6 Modelagem Comparativa de Proteínas

A modelagem comparativa (ou por homologia) é uma técnica utilizada para predição de estruturas 3D de proteínas (BAJORATH *et al.*, 1993; JOHNSON *et al.*, 1994; ROST & SANDER, 1996). Algumas conclusões gerais foram obtidas a partir de observações armazenadas ao longo dos anos sobre as construções de proteínas com estruturas determinadas experimentalmente, dentre elas (GRANT & RICHARDS, 1995):

- I. Homologia entre seqüências de aminoácidos implica em semelhança estrutural e funcional;
- II. Proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas, principalmente constituídas de elementos de estrutura secundária: hélices α e fitas (ou folhas) β ;
- III. As principais diferenças estruturais entre proteínas homólogas ocorrem nas regiões externas, constituídas, principalmente, por alças (“loops”), que ligam os elementos de estruturas secundárias.

A modelagem de uma proteína (proteína-alvo) pelo método comparativo baseia-se no conceito de evolução molecular. Parte-se do princípio de que a semelhança entre as estruturas primárias destas proteínas e de proteínas homólogas de estruturas tridimensionais conhecidas (proteína-molde) implica em similaridade de estruturas entre elas. Em bibliotecas de acesso público contendo estruturas de proteínas determinadas experimentalmente, podem ser feitas buscas por estruturas moldes em potencial para proteínas homólogas. De uma lista de possíveis candidatos, a estrutura molde é escolhida com base em um conjunto de normas, como o grau de similaridade entre a seqüência a ser modelada e as seqüências molde, a qualidade experimental da estrutura (resolução), a presença de ligantes e cofatores. Embora em muitos casos a seqüência alvo possa ser modelada por apenas um único molde, às vezes é necessário empregar

mais de uma estrutura molde, cada uma usada para modelar um ou mais domínios estruturais distintos da proteína-alvo (BORDOLI *et al.*, 2009).

Os métodos correntes de modelagem de proteínas por homologia implicam, basicamente em quatro passos sucessivos (SANTOS FILHO & ALENCASTRO, 2002):

- identificação e seleção de proteínas-molde;
- alinhamento das seqüências de resíduos;
- construção das coordenadas do modelo;
- validação

A Figura 8 mostra um esquema geral do processo de modelagem comparativa de proteínas. Para cada um dos passos existe um grande número de métodos, programas e servidores específicos na rede mundial de computadores (Internet).

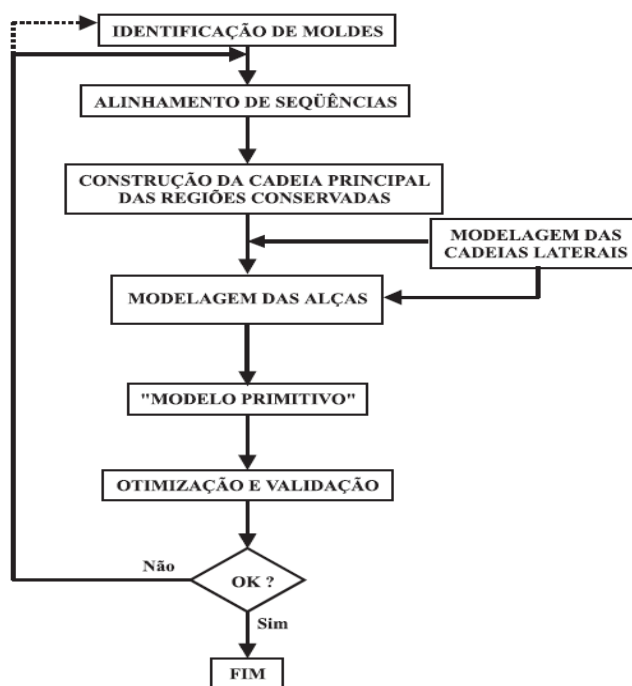


Figura 8. Esquema geral da modelagem comparativa de proteínas (SANTOS FILHO & ALENCASTRO, 2002).

A avaliação da qualidade da estrutura de uma proteína modelada é uma etapa fundamental em todo o sistema, uma vez que ela irá delimitar sua possível aplicação. A porcentagem de identidade entre as seqüências da proteína a ser modelada e do molde é geralmente admitida como uma primeira avaliação da qualidade do modelo, uma vez

que existir uma associação direta entre o grau de identidade das sequências de proteínas e o desvio dos átomos de carbono alfa ($C\alpha$) de seus cernes em comum (CHOTHIA & LESK, 1986). Em geral, quando o grau de identidade é superior a cerca de 30%, considera-se que é possível obter um modelo confiável (ROST, 1999).

A qualidade estereoquímica do modelo é de importância fundamental. O programa mais utilizado na avaliação dos parâmetros estereoquímicos, o PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1993), avalia os comprimentos de ligação, os ângulos planos, a planaridade dos anéis de cadeias laterais, a quiralidade, as conformações das cadeias laterais, a planaridade das ligações peptídicas, os ângulos torcionais da cadeia principal e das cadeias laterais, o impedimento estérico entre pares de átomos não ligados e a qualidade do gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN *et al.*, 1968). O gráfico de Ramachandran é particularmente útil porque ele define os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis e orienta a avaliação da qualidade de modelos teóricos ou experimentais de proteínas.

É necessário avaliar também as interações entre a estrutura modelada e o meio, essencialmente água. Neste tipo de análise, pode-se usar o programa WHATCHECK (HOOFT *et al.*, 1996), que dá informações sobre a formação de regiões centrais hidrofóbicas, a acessibilidade de resíduos e átomos a moléculas de solvente (água), a distribuição espacial de grupos iônicos, a distribuição das distâncias atômicas e das ligações hidrogênio da cadeia principal. No mesmo contexto, o programa PROSAIL (SIPPL *et al.*, 1993) avalia o ambiente de cada aminoácido da proteína modelada (validação localizada), tendo como referência o ambiente esperado em proteínas análogas de alta resolução.

Outras metodologias baseadas em mecânica molecular, cálculos de energia livre de solvatação ou métodos estatísticos têm sido testados (SAUDER *et al.*, 2000). Estas metodologias são, em princípio, capazes de estimar a qualidade da estrutura terciária dos modelos de proteínas.

A elaboração de modelos por comparação ou homologia requer o uso de programas especializados em executar estas etapas, como a entrada nos bancos dados de estruturas de proteínas. Em meio aos programas desenvolvidos para fazer estes trabalhos, tem se destacado o servidor *Swiss-Model* [SCHWEDE *et al.*, 2003], que pode ser acessado livremente na rede pelo site <http://swissmodel.expasy.org>. Este servidor foi

o primeiro a permitir que as etapas necessárias para a modelagem de proteínas fossem feitas de forma automatizada.

1.7 Métodos Computacionais de Modelagem de Estruturas Químicas

A modelagem molecular tem sido empregada para, além de interpretar dados experimentais, suprir limitações destes dados. Esta poderosa ferramenta vem se desenvolvendo muito nas últimas décadas devido ao desenvolvimento de computadores e programas de computador cada vez mais sofisticados (HEHRE *et al.*, 1998).

Para se modelar a estrutura 3D de um conjunto de átomos ligados entre si, pode-se usar vários tipos de métodos, cuja escolha irá depender do tipo de estudo. Pode-se dividi-los em dois grandes grupos: os métodos clássicos, como a mecânica molecular, e os métodos quanto-mecânicos, como os métodos semi-empíricos e *ab initio*.

1.7.1 Mecânica Molecular

O procedimento geral dos métodos de mecânica molecular (MM) é usar funções parametrizáveis para descrever as diversas interações entre os átomos que compõem a molécula, ou seja, fundamenta-se na possibilidade de particionar a energia total do sistema em termos independentes. A forma de tais funções depende da interação que se quer descrever.

A MM é um método com aplicação potencial em moléculas em seus estados eletrônicos fundamentais, onde cada átomo é representado por uma esfera com uma massa particular, em geral, sua respectiva massa atômica. As ligações químicas são representadas por “molas” conectando as esferas, formando os sistemas moleculares. A geometria dos sistemas moleculares é descrita pela diferença das distâncias (ou tamanhos) de ligação, ângulos de ligação e ângulos diedros (ângulos de torção), tratados em função de valores “ideais”, junto com as interações interatômicas à distância, como as de van der Waals (vdW) e as de Coulomb – as chamadas interações não ligadas, pois não dizem respeito a átomos diretamente ligados (Figura 9). Assim sendo, as equações obtidas por MM consideram apenas os núcleos dos átomos, na forma mencionada de esferas, e não incluem os elétrons nos cálculos (OLIVEIRA, 2005; JENSEN, 1999).

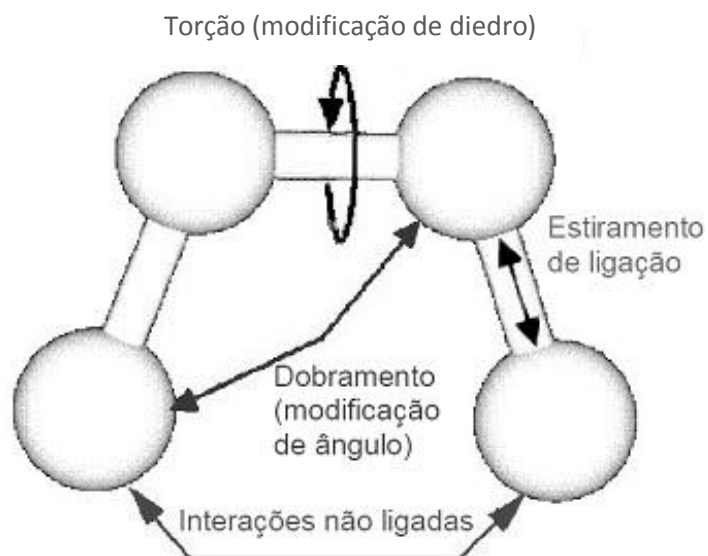


Figura 9. Demonstrações das principais interações ligadas (energias de estiramento, dobramento e torção) e não ligadas consideradas em campos de força em mecânica molecular (TOMASI *et al.*, 2005).

Os cálculos de MM são utilizados para a determinação de geometrias e conformações de equilíbrio de moléculas, com energias relativas a cada nova geometria determinada pela variação gradual das coordenadas dos átomos do sistema molecular para produzir diferentes confôrmeros (OLIVEIRA, 2005; SILVA 2005). Os cálculos de MM possuem a vantagem da simplicidade conceitual e computacional (ALMEIDA *et al.*, 2005), o que faz com que estes cálculos sejam extremamente rápidos, com as interações não-ligadas ocupando a maior parte do tempo de cálculo. Suas aplicações são geralmente relacionadas a compostos orgânicos (incluindo biomacromoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos), mas as aplicações em compostos organometálicos e compostos de coordenação aumentam progressivamente. Como os cálculos de MM são muito mais rápidos que os cálculos mecânicos-quânticos, sistemas com até centenas de milhares de átomos podem ser tratados por este método (GROOT & GRUBBMULLER, 2001).

O método permite a construção de uma expressão de energia chamada campo de força (OLIVEIRA, 2005). De forma simplificada, o campo de força é escrito como uma soma de termos, cada um descrevendo a energia necessária para a “distorção” da molécula de uma forma particular (Equação 14):

$$E_{MM} = E_{str} + E_{bend} + E_{tors} + E_{vdW} + E_{el} + E_{cross} \quad (\text{Eq. 14})$$

Na Eq. 14, E_{str} representa a função de energia para o estiramento da ligação, E_{bend} representa a energia requerida para o dobramento de um ângulo, E_{tors} é a energia torsional para rotação de uma ligação (modificação do ângulo diedro), E_{vdW} e E_{el} descrevem as interações não-ligadas entre dois átomos (van der Waals e eletrostática, respectivamente) e E_{cross} descreve o acoplamento entre os três primeiros termos, formando os chamados termos cruzados (JENSEN, 1999). Os campos de força da MM são utilizados integral ou parcialmente por vários programas como um método rápido de otimização estrutural, ou em meio a várias técnicas diferenciadas, como o docagem (docking) molecular, que será explicado a seguir.

1.7.2 Docagem Molecular

Na década de 1980, surgiu a técnica de docagem (ou atracamento ou ancoramento) molecular (*docking*), utilizada quando as estruturas dos ligantes (moléculas pequenas) e do seu sítio ativo de interação (geralmente de uma proteína) estão disponíveis, ou ainda para a docagem entre duas proteínas (KUNTS *et al.*, 1982).

A identificação das características moleculares responsáveis pelo reconhecimento entre estruturas em sistemas biológicos é um assunto complexo, de difícil simulação computacional. Com isto, a docagem molecular é, geralmente, conceituada como um processo multi-etapas, onde cada passo introduz mais graus de complexidade para a predição dos modos de interação do ligante com a proteína, os chamados posicionamentos, ou “poses”, que são combinações de orientações e conformações moleculares (KITCHEN *et al.*, 2004; BROOIJAMS & KUNTZ, 2003).

A avaliação de todas as poses possíveis em um domínio protéico geraria um número enorme de combinações, geralmente bilhões. Qualquer solução para este problema requer uma excelente técnica de pesquisa e amostragem, capaz de explorar adequadamente as orientações e as conformações de interação entre a proteína e o ligante, e um bom entendimento do processo de reconhecimento molecular, para o desenvolvimento das chamadas “funções de pontuação”, funções capazes de classificar as poses de forma rápida e comparativa. Portanto, o processo é iniciado com a aplicação de algoritmos de docagem capazes de posicionar as pequenas moléculas em um sítio de interação na proteína, fazendo uma amostragem efetiva de regiões no espaço próximas a

soluções “corretas”, sem que seja necessária uma investigação exaustiva de todas as poses (McCONKEY *et al.*, 2002; JONES *et al.*, 1997).

Devido aos graus de liberdade das conformações possíveis em uma molécula, o teste das várias possibilidades deve ser efetuado com acurácia suficiente para identificar a pose associada às melhores interações entre o receptor e a enzima, mas com velocidade suficiente para permitir a avaliação de centenas de compostos. Os algoritmos são complementados pelas funções de pontuação, designadas para classificar as poses, por exemplo, pela avaliação de interações entre os compostos e os alvos proteicos, além de incluir efeitos entrópicos e de solvatação (GOHLKER & KLEBE, 2002; HALPERIN *et al.*, 2002).

Para avaliar os métodos de docagem, é importante considerar como os ligantes e proteínas são representados pelos programas. Existem três representações básicas:

I – Representação atômica: em geral, apenas é usada em conjunção com funções de energia potencial, ou durante procedimento de ordenamento, avaliação de vários resultados de pontuações iniciais, para uma reprodução de interação mais próxima possível da realidade – pela complexidade computacional da avaliação das interações atômicas repetidamente (HALPERIN *et al.*, 2002).

II – Representação de superfície: programas baseados neste tipo de representação de superfície são apenas utilizados para ancoramento entre duas proteínas (o chamado ancoramento proteína/proteína), pelo alinhamento de pontos de superfície, minimizando o ângulo entre as superfícies das duas moléculas (NOREL *et al.*, 1999).

III – Representação em grade: o uso de grades de energia potencial, iniciado por Goodford em 1985, é feito por vários programas para o cálculo de energia, acumulando informações sobre a contribuição da energia da proteína como pontos em uma grade ou rede, para que sejam lidas e utilizadas durante a pontuação da pose do ligante. Isto é feito, por exemplo, com a soma de interações de Coulomb (Equação 15) e de vdW (equação 16), modelada como uma função 12-6 de Lennard-Jones (KITCHEN *et al.*, 2004):

$$E_{Coul}(r) = \sum_{i=1}^{N_A} \sum_{j=1}^{N_B} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (\text{Eq. 15})$$

$$E_{vdW}(r) = \sum_{i=1}^{N_A} \sum_{j=1}^{N_B} 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (\text{Eq. 16})$$

Nas Eq. 15 e Eq. 16, N_A e N_B representam o número de átomos das moléculas A e B , respectivamente, q a carga de cada átomo; r_{ij} a distância entre eles e ϵ_0 é a constante dielétrica; ϵ representa a profundidade do poço do potencial; e σ o diâmetro de colisão de átomos i e j (GOODFORD, 1985).

Os algoritmos utilizados para explorar o espaço das orientações e conformações do ligante são divididos em três categorias básicas. A primeira constitui os denominados métodos sistemáticos, com algoritmos que exploram todos os graus conformacionais da molécula, mas que possui o problema denominado “explosão conformacional”. Vários fragmentos moleculares são docados no sítio, sendo então ligados covalentemente um ao outro, podendo ainda ser dividido em regiões rígidas (núcleos) e flexíveis (cadeias laterais) (LEACH, 2001).

Uma segunda categoria engloba os denominados métodos estocásticos, que atuam promovendo mudanças aleatórias em ligantes, de acordo com funções de probabilidade, implementadas principalmente por duas metodologias: “Monte Carlo” e “Algoritmo Genético (AG)”; esta última utilizada por vários programas, incluindo o programa GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking”, otimização genética para docagem de ligantes – CCDC Ltd.). O AG utiliza uma estratégia evolucionária para explorar a variabilidade estrutural de um ligante flexível, testando, simultaneamente vários modos disponíveis de ligação em um sítio ativo proteico parcialmente flexível (KITCHEN *et al.*, 2004; JONES *et al.*, 1997).

Os métodos de simulação constituem a terceira categoria, sendo a técnica de dinâmica molecular (simulação dos movimentos e do espaço conformacional de sistemas de partículas atômicas [GOODMAM, 2000]) a mais utilizada neste tipo de método. Estes cálculos são mais demorados, por se tratarem de processos dinâmicos complexos, e devem apenas ser utilizados quando não há uma grande barreira de

energia a ser ultrapassada para a docagem, sendo necessário utilizar diferentes fragmentos proteicos para que a técnica seja aplicada de forma mais adequada.

A avaliação e o ordenamento (classificação) das poses são um aspecto crucial para da docagem, onde são usadas funções de pontuação, compreendendo várias suposições e simplificações na avaliação dos complexos formados. Os principais tipos de funções de pontuação são: as baseadas em campo de força, as empíricas e as baseadas em conhecimento (KITCHEN *et al.*, 2004).

Os métodos estocásticos podem buscar por poses com funções de pontuação baseadas em campo de força, implementadas com termos que combinam informações de diferentes pontuações para balancear erros e melhorar a probabilidade na identificação de poses “reais”. Tal implementação é denominada “pontuação de consenso”, fazendo com que as imperfeições no método de busca sejam diminuídas (KITCHEN *et al.*, 2004).

1.7.3 Programa GOLD

Na maioria dos programas de docagem molecular, as proteínas são consideradas rígidas, o que corresponderia à existência de uma proteína em apenas um estado conformacional, previamente definido. Porém, as proteínas se adaptam conformacionalmente a um determinado ligante, para que o complexo tenha menor energia possível (ajuste induzido). Portanto, um bom modelo deve considerar algum tipo de flexibilidade da proteína, para que cada ligante interaja, com a mais alta afinidade, com a conformação da proteína de mais baixa energia – a conformação mais provável de ser encontrada ao interagir com um determinado ligante (CARLSON, 2002; CARLSON & McCAMMON, 2000).

O programa GOLD foi desenvolvido por Jones e colaboradores (1997) para explorar a flexibilidade conformacional do ligante com possibilidade de conferir também flexibilidade parcial à proteína (algumas cadeias laterais e até fragmentos da cadeia polipeptídica), fazendo com que a docagem não seja feita com a proteína completamente rígida (JONES *et al.*, 1997).

A presença de moléculas de água é comum em estruturas cristalográficas e estas podem ser consideradas livres para girar ou até para se deslocar translacionalmente no programa GOLD. Para avaliar se uma molécula de água deve ser ou não deslocada, o programa avalia a energia livre associada com a transferência da molécula do interior do solvente até seu sítio de interação no complexo proteína/ligante. Desta forma, o requerimento fundamental de que o ligante precisa deslocar moléculas de água solvatantes da proteína para nela se ajustar é respeitado com grande sucesso na identificação do sítio ativo experimental (JONES *et al.*, 1997).

O AG é inspirado nas idéias da Teórica da Evolução, com a seleção de operadores genéticos como o cruzamento e as mutações que atuam sobre o “código genético” das poses, que define a orientação e conformação de cada uma delas. O AG otimiza as soluções encontradas em várias situações, sendo considerado um dos melhores algoritmos de otimização estocásticas, encontrando soluções muito próximas às “verdadeiras” (as encontradas por métodos experimentais, como a cristalografia e difração por raios-X). Tal método tem sido recomendado para problemas complexos, que envolvem muitas variáveis (COSTA FILHO & POPPI, 1999; MORRIS *et al.*, 1998).

O AG envolve seis etapas básicas: a codificação das variáveis, a criação da população inicial, a avaliação da resposta (aptidão), o cruzamento, a mutação e a seleção. A codificação das variáveis consiste na criação dos “cromossomos”, formados por possíveis soluções (ou seja, pelas conformações e orientações de um ligante frente a uma proteína\sítio ativo), que podem ser definidas por um grupo de valores descrevendo a orientação e a conformação do ligante docado, ou seja, seu genótipo; enquanto as coordenadas atômicas de um ligante correspondem ao seu fenótipo.

Com isto, temos a criação da população inicial, constituídas por vários cromossomos. A aptidão dos indivíduos da população é calculada a partir dos valores descritos acima, baseados no mérito relativo das soluções encontradas, para saber quais cromossomos serão capazes de gerar a melhor resposta esperada, determinando com qual probabilidade este cromossomo irá cruzar. Pares randômicos de cromossomos são cruzados, onde novas gerações e cromossomos herdarão características de seus “pais”. Alguns passarão pelo processo de mutação, onde ocorrem permutações nas informações

contidas nos genes. A seleção da descendência destas gerações é baseada na aptidão do cromossomo: aqueles que melhor se ajustam ao seu ambiente são selecionados, e aqueles que não se adaptam bem são abandonados (COSTA FILHO & POPPI, 1999; MORRIS *et al.*, 1998; JONES *et al.*, 1997).

1.7.4 Mecânica quântica

A Mecânica Quântica (MQ) descreve as moléculas em função da relação entre núcleo e elétrons, levando em conta a dualidade partícula-onda da matéria, permitindo, que, ao invés de se deslocar ao longo de uma trajetória perfeitamente definida, uma partícula seja descrita por uma função de onda (ψ), e como tal, para um sistema de massa diminuta, haja indeterminação na sua posição. A função de onda não contém características deterministas, mas probabilísticas (ATKINS & PAULA, 2004; JENSEN, 1999).

Cálculos da química quântica, embora significativamente mais exigentes do ponto de vista computacional, são rotineiramente utilizados, pois permitem obter resultados quantitativos da termodinâmica e da cinética molecular, propriedades de estados de transição, estabilidade relativa de moléculas e mecanismos de reações químicas. Nesta metodologia, a descrição das moléculas é dada pelas interações entre os núcleos e os elétrons e a geometria molecular é dada pelos arranjos de energia mínima dos núcleos e elétrons. Os métodos da MQ baseiam-se na equação de Schrödinger, proposta pelo cientista de mesmo nome, em 1926, para a determinação da função de onda de um sistema (Equação 17), que, no caso particular do átomo de hidrogênio (próton de massa infinita), tem solução exata (ATKINS & PAULA, 2004).

$$\left[\frac{-\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V(x, y, z) \right] \psi(x, y, z) = E\psi(x, y, z) \quad (\text{Eq. 17})$$

Na Eq. 17, ∇^2 é o Laplaciano, \hbar é a constante de Planck h dividida por 2π , m é a massa da partícula, $\psi(x,y,z)$ é uma função de onda associada ao movimento da partícula, $V(x,y,z)$ é um operador associado à energia potencial e E é a energia total da partícula. Esta é a equação de Schrödinger nas três dimensões (x,y,z) , independente do tempo. A equação independente do tempo é suficiente para resolver os chamados problemas estacionários, que constituem muitos dos problemas de química (ALCÁCER,

2007). Todo o termo entre colchetes representa os operadores de energia cinética e potencial e constitui um único operador matemático, chamado hamiltoniano H (Eq. 18).

$$H\psi(r) = E\psi(r) \quad (\text{Eq. 18})$$

Na Eq. 18, r representa o conjunto das três coordenadas do espaço.

1.7.5 Equações de Hartree-Fock

A solução exata da equação 18 só é possível para sistemas de dois corpos um elétron e um núcleo. Para sistemas com mais do que um elétron, foram desenvolvidos métodos aproximados, o mais popular é o método de Hartree-Fock (HF). Na aproximação de HF, a função de onda multieletrônica é obtida pelo uso de um determinante de produtos das funções de um elétron, chamado determinante de Slater (ROGER, 2003).

Em uma molécula, a função de onda espacial dos elétrons é chamada orbital molecular (OM). Nas equações de Hartree-Fock (Eq. 19), considera-se que um elétron no OM X_i está submetido ao campo dos núcleos e ao campo médio dos outros elétrons em seus OM fixos, X_j (LEACH, 2001).

$$f_i X_i = \sum_j \varepsilon_{ij} X_j \quad (\text{Eq. 19})$$

Na Eq. 19, f_i é chamado de operador de Fock, que é um Hamiltoniano efetivo monoelétrônico para um elétron no sistema multieletrônico.

O operador de Fock depende do próprio orbital X_i e assumido que cada elétron se “move” num campo fixo provocado pelo núcleo e demais elétrons. Ao se resolver estas equações, obtém-se o conjunto X_i e, por sua vez, a energia do estado eletrônico para cada geometria nuclear (ANTUNES *et al.*, 1999).

A estratégia de resolução das equações de Hartree-Fock é chamada de Método do Campo Auto-consistente (SCF), que pode ser resumida nas seguintes etapas:

- 1- Arbitra-se um conjunto de OM iniciais X_i ;
- 2- Com este conjunto, calculam-se os operadores necessários;

3- Resolvem-se as equações de Hartree-Fock;

4- Novo conjunto X_i é obtido; recomeça-se a etapa 2.

O método SCF é iterativo e prossegue refinando as soluções X_i , reduzindo a energia eletrônica total até que se alcance um dado valor que, segundo um critério de convergência, não muda na interação seguinte; nesse momento, a autoconsistência foi atingida (CASTRO, 2002).

1.7.6 Combinação Linear dos Orbitais Atômicos (LCAO)

Roothan propôs que os orbitais de Hartree-Fock fossem representados como uma combinação linear dos orbitais atômicos puros (*Linear Combination of Atomic Orbital*), que compreende uma combinação de um grupo de funções conhecidas, denominadas funções de base (**Equação 20**) (LEVINE, 2000):

$$\Psi_i = \sum_{v=1}^k C_{vi} \varphi_v \quad (\text{Eq. 20})$$

Na Eq. 20, os orbitais φ_v correspondem aos orbitais atômicos (AO) (as funções de base). A proposta vem da noção de que nas proximidades de cada núcleo da molécula, as soluções de um elétron vão ser semelhantes às soluções de um átomo monoelétrônico. Para a **Equação 20**, existem K funções de base onde nem todos os OA estão ocupados por elétrons. Conjunto de bases mínimo é o menor número de funções com a capacidade de acomodar todos os elétrons de um sistema molecular (LEACH, 2001). Para melhorar a qualidade da representação dos elétrons são acrescentadas funções de base adicionais, como é o caso dos conjuntos de bases com funções difusas e de polarização. Para um dado conjunto de base e um dado determinante de Slater, o melhor conjunto de coeficientes C_{vi} é aquele para o qual a energia é mínima (Eq. 21).

$$\frac{\partial E}{\partial C_{vp}} = 0 \quad (\text{Eq. 21})$$

O objetivo, então, é determinar o conjunto de coeficientes que minimiza a energia do sistema (LEACH, 2001).

1.7.7 Métodos Semi-Empíricos

Com a evolução da informática, os computadores tornaram-se mais rápidos, mas a aplicação dos métodos de primeiros princípios (chamados métodos *ab initio*) em sistemas com um grande número de átomos ainda pode levar a tempos de cálculo excessivamente longos (SOUZA, 2008).

Uma alternativa é utilizar modelos semi-empíricos, proveniente diretamente dos modelos HF (LEACH, 2001). Primeiro, a dimensão do problema é reduzida por tratar apenas os elétrons da camada de valência (os demais são considerados parte fixa do núcleo, formando o caroço ou “core”). Os átomos de hidrogênio e hélio são representados por uma função simples do tipo $1s$. Elementos do segundo período incluem funções simples do tipo s e um conjunto de funções do tipo p , por exemplo, $2s$, $2p_x$, $2p_y$, $2p_z$; para elementos de transição pode ser incluído um conjunto de funções do tipo d . Integrais de dois elétrons são desprezadas ou parametrizadas. Como exemplos de métodos semi-empíricos têm-se o CNDO (POPLE & SEGAL, 1965), INDO (POPLE *et al.*, 1965), MNDO (DEWAR, 1977-a,b), MNDO/d (THIEL, 1994), NDDO (POPLE, 1965), SAM1 (DEWAR *et al.*, 1993), RM1 (ROCHA *et al.*, 2006), PM6 (STEWART, 2007) e, o mais recente, PM7 (STEWART, 2013).

Simplificações adicionais foram introduzidas para agilizar os cálculos e, mais importante ainda, foi desenvolvido um método para a introdução dos parâmetros empíricos. As parametrizações semi-empíricas são baseadas na reprodução de uma extensa variedade de dados experimentais, incluindo geometria no equilíbrio, calores de formação, momentos de dipolo e potencial de ionização. Os métodos AM1 (DEWAR, 1985) e PM3 (STEWART, 1989-a,b) incorporam, essencialmente, as mesmas aproximações mas diferem em suas parametrizações. Ambos têm sido largamente usados na literatura e embora as diferenças nos resultados sejam pequenas, o método PM3 é considerado, basicamente, uma melhoria do método AM1 em termos de parametrização.

O método RM1 possui a mesma estrutura algébrica e o mesmo número de parâmetros do método AM1, porém foi parametrizado de uma forma muito mais elaborada (ROCHA *et al.*, 2006). Assim como AM1, as propriedades utilizadas no conjunto de parametrização foram: calor de formação, momento de dipolo, potencial de

ionização e variáveis geométricas (comprimentos e ângulos de ligação). O método RM1 foi testado com base na comparação de todas as propriedades envolvidas na parametrização e com os métodos AM1 e PM3. Os resultados revelam que o método RM1 apresenta um avanço sobre os métodos anteriores (ROCHA *et al.*, 2006).

O método PM6 também é considerado uma melhoria em comparação aos métodos AM1 e PM3 em termos de parametrização, sendo a maior parte das aproximações utilizadas idêntica às aquelas usadas nos métodos AM1 e PM3. As diferenças estão no melhoramento da avaliação das interações, otimizações geométricas, calor de formação, momento de dipolo, potencial de ionização e uso de parâmetros para orbitais *d* de metais de transição (STEWART, 2007). Este novo modelo é um pouco melhor que o seu predecessor, RM1. O erro médio entre as entalpias de formação, calculadas por este método, em 1373 moléculas usadas como referência, compreendendo elementos relevantes biologicamente, é de 4,4 kcal/mol, enquanto no RM1 é de 5,0 kcal/mol.

Em 2013, foi disponibilizado um novo hamiltoniano, PM7, criado para descrever com maior precisão as interações não covalentes. A geometria prevista pelo método PM7 apresenta uma melhoria sobre o método PM6. Erros nas geometrias de sólidos orgânicos simples previstas pelo PM7 são cerca de 26% menores do que aquelas previstas pelo PM6. Parte disto pode ser atribuída às alterações nas aproximações para a melhoria da otimização dos parâmetros, mas a contribuição mais importante foi a melhor representação das interações intermoleculares (STEWART, 2013).

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

O objetivo deste estudo é desenvolver modelos de previsão da atividade de séries de compostos sintéticos na inibição da AChE de *Ae. aegypti* e de *T. californica*. Identificar e elucidar os prováveis mecanismos envolvidos na inibição, pois a elucidação destes mecanismos poderá auxiliar o planejamento de substâncias anti-AChE. Para isso é preciso:

1. Construir um modelo da enzima AChE de *Ae. aegypti*, que possa contribuir para os estudos de predição da atividade de compostos com potencial inseticida contra o vetor da dengue;
2. Identificar parâmetros teóricos que estejam associados com o processo de inibição enzimática da AChE de *Ae. aegypti* e de *T. californica*;
3. Estabelecer uma relação quantitativa entre estes parâmetros com a atividade inibitória de um conjunto de compostos (β -carbolinas, compostos mesoiônicos, harmana e derivados), com o intuito de se propor modelos de predição de atividade;
4. Utilizar os modelos propostos para a proposição de novos compostos com atividade anti-AChE.

3. METODOLOGIA

Para elucidar os possíveis mecanismos e propor modelos de inibição da AChE de *Ae. aegypti* e *T. californica* pelos compostos β -carbolínicos, compostos mesoiônicos, harmana e derivados, buscou-se desenvolver modelos de inibição baseados em termos de energia envolvidos na interação proteína-ligante, com o objetivo de se prever a atividade dos compostos. A seguir, são descritas as etapas envolvidas neste procedimento.

3.1. Construção de um Modelo de AChE de *Aedes aegypti*

Devido à ausência de uma estrutura cristalográfica, inicialmente foi feita uma varredura no sítio Swiss Prot/TrEMBL (<http://www.expasy.ch/sprot/>), um banco de dados de acesso público de sequências primárias de proteínas, buscando-se estruturas da AChE de *Ae. aegypti*. Até a realização deste trabalho, estavam depositadas cinco sequências da AChE de *Ae. aegypti* no banco de dados, sendo selecionada a de código Q6A2E2 (MORI *et al.*, 2007), por esta apresentar o maior número de aminoácidos (702).

Esta sequência foi usada na construção do modelo tridimensional no servidor Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/>), selecionando-se o melhor molde com a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), que foi a estrutura cristalográfica depositada no PDB sob o código 2CMF, uma AChE de *T. californica* complexada com o inibidor pentileno-bis-tacrina, obtida com resolução de 2,5 Å (RYDBERG *et al.*, 2006).

3.2. Modelos de Inibição das Enzimas AChE

3.2.1 Modelos de Inibição da AChE de *Torpedo californica*

A primeira estrutura escolhida para o desenvolvimento dos estudos para os modelos de predição foi a AChE do *T. californica* (RYDBERG *et al.*, 2006), por esta ser a enzima que cuja inibição foi avaliada experimentalmente em projetos de Doutorado desenvolvidos por alunos do PPGQ/UFRRJ (Tabela 2) e por possuir muitos

dados experimentais disponíveis na literatura. Os inibidores da AChE de *T. Californica* foram divididos em três séries:

- i. O produto natural harmana (**17**), isolada pelo aluno de Doutorado do PPGQ Marcelo F.A. Araujo, orientado pelo Dr. Mário G. Carvalho, e seus derivados, preparados pelo Dr. Arthur. E. Kümmerle, (estruturas **17a** – **17g**, descritas na Figura 10) (TORRES *et al.*, 2011).
- ii. Compostos mesoiônicos sintetizados pelo aluno de Doutorado do PPGQ, Welisson Ferreira da Silva, orientado pelo Dr. Marco Edilson Ferreira Lima, e avaliados pela aluna de iniciação científica, Paolla Cruz Linhares, orientada pelo Dr. Vitor M. Rumjanek (estruturas **18a** – **18h**, descritas na Figura 10).
- iii. β -carbolinas bivalentes (estruturas **19** – **26**, descritas na Figura 12), cujos dados de atividade foram obtidos da literatura (Tabela 3) (ROOK *et al.*, 2010)

Tabela 2. Dados experimentais da inibição *in vitro* da AChE de *T. californica* pela harmana e derivados e pelos compostos mesoiônicos.

Harmana e derivados	IC ₅₀ (μ M) ^a	Compostos mesoiônicos	IC ₅₀ (μ M) ^b
17	380	18a	85,95 \pm 1,01
17a	5,33	18b	11,02 \pm 2,02
17b	6,36	18c	25,67 \pm 2,60
17c	7,15	18d	57,53 \pm 0,38
17d	4,13	18e	40,96 \pm 2,11
17e	9,66	18f	20,21 \pm 0,14
17f	5,71	18g	195,95 \pm 0,42
17g	1,74	18h	0,97 \pm 0,43

^a Linhares (UFRRJ, 2012, dados não publicados).

^b Torres (UFRRJ, 2011).

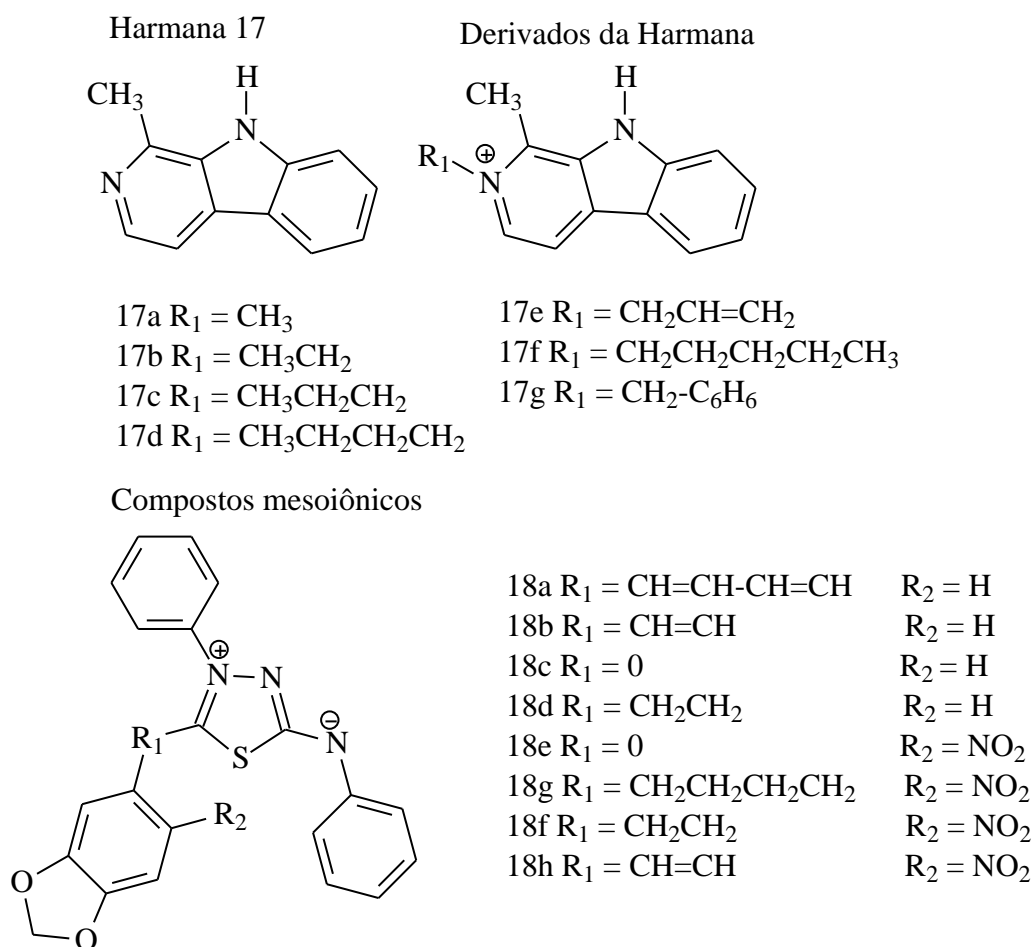


Figura 10. Estruturas de duas séries de compostos sintetizados na UFRRJ e avaliados neste estudo: Harmana e derivados e compostos mesoiônicos.

Esta enzima possui algumas estruturas cristalográficas disponíveis no banco de dados de acesso público *Protein Data Bank* (PDB). Foi usada a AChE do *T. californica*, depositada no PDB com o código 2CMF (RYDBERG *et al.*, 2006). Essa estrutura nativa contém uma molécula do inibidor pentileno-bis-tacrina co-cristalizada, que ocupa tanto o sítio catalítico quanto o sítio periférico.

Para a elucidação dos possíveis mecanismos de inibição e os dados cinéticos experimentais da AChE de *T. californica* pela harmana e derivados, compostos mesoiônicos e β -carbolinas bivalentes, procedeu-se com a docagem dos compostos, usando o programa GOLD (CCDC Ltd), nos sítios catalítico e periférico da enzima.

As estruturas dos compostos mesoiônicos, derivados da harmana e β -carbolinas bivalentes foram construídas e otimizados com o campo de força MMFF no programa

Spartan'08 (Wavefunction, Inc.). Os compostos foram, então, docados na enzima usando o programa GOLD 5.1 (CCDC Ltd.) para identificar as melhores formas de interação entre a molécula do ligante e a proteína. Para efetuar esse cálculo, foi preciso identificar um átomo próximo ao sítio ativo para definição do raio máximo no qual o ligante iria interagir com a proteína; foram escolhidos dois átomos para a AChE de *T. californica*: o átomo de oxigênio da cadeia lateral do resíduo do sítio catalítico, Ser200, e o átomo de carbono C_{ζ2} da cadeia lateral do resíduo do sítio periférico Trp276. O valor do raio do sítio de interação empregado foi de 15 Å. Após a docagem, foram selecionadas entre as diversas poses, aquelas com os melhores valores de pontuação. Foi escolhida a função de pontuação *ChemScore* (ELDRIDE *et al.*, 1997), por esta levar aos melhores resultados de redocagem no processo de validação.

Tendo sido identificada a melhor pose entre cada ligante e a proteína, foi efetuado o recorte da estrutura, utilizando o programa Rasmol 2.6 (SAYLE, 1995). O recorte tem por finalidade diminuir o tamanho da estrutura com a qual serão efetuados os cálculos quânticos, diminuindo o tempo de cálculo. O recorte foi feito selecionando-se todos os aminoácidos com ao menos um átomo localizado dentro de um raio de 5 Å, tendo como centro cada ligante. O modelo de trabalho inicial foi constituído dos resíduos Tyr67, Val68, Asp69, Gly77, Ser78, Glu79, Met80, Trp81, Asn82, Pro83, Ser119, Asp273, Trp276, Asn277, Leu279, Phe281, Asp282, Ser283, Ile284, Phe285, Arg286, Phe327, Phe328, Tyr331 e Trp429 (Figura 11). Os resíduos foram selecionados de modo a se considerar as várias subunidades que compõe os sítios de interação da enzima.

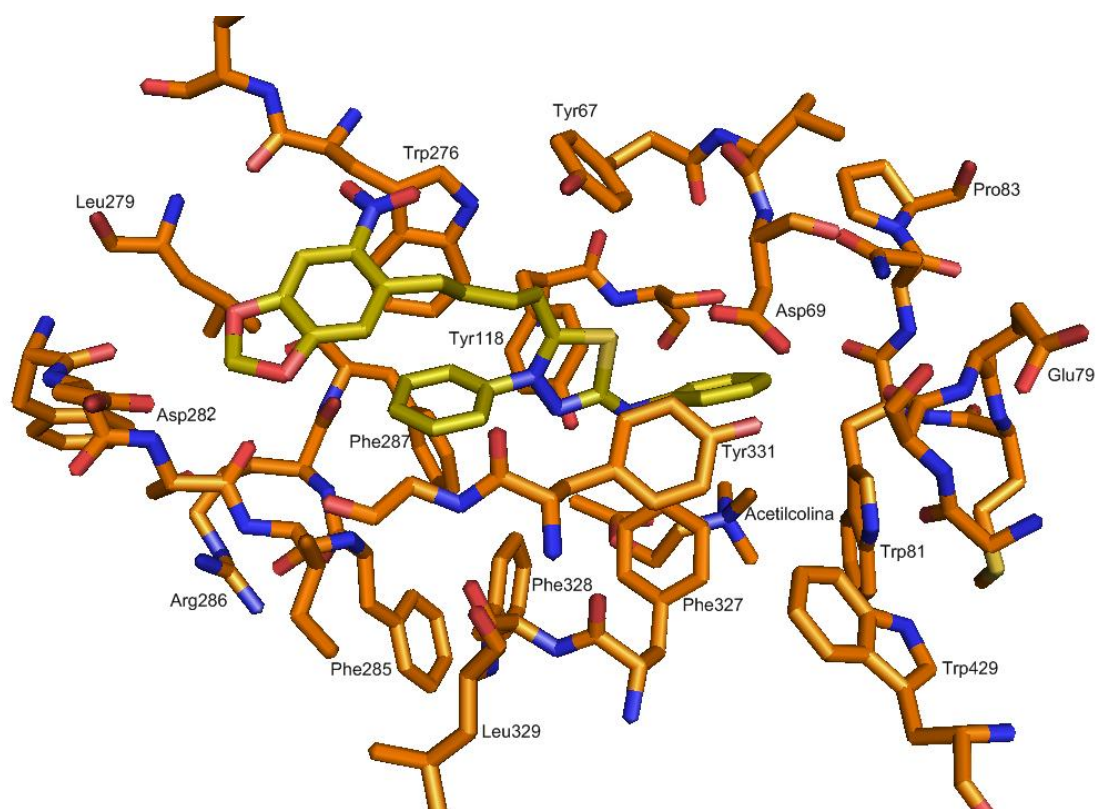


Figura 11. Exemplo de um recorte da estrutura selecionada da AChE de *T. californica* (código 2CMF do PDB) com os aminoácidos localizados a 5 Å da estrutura **18f**, para os cálculos semi-empíricos.

Em seguida, as estruturas finais, com as ligações peptídicas fixas, foram otimizadas com os métodos semi-empíricos PM6 (STEWART, 2007) e RM1 (ROCHA *et al.*, 2006), disponíveis no programa Mopac2009, sendo a entalpia de interação (ΔH_{int}) calculada pela Equação 22.

$$\Delta H_{\text{int}} = \Delta H_{\text{f}}(\text{complexo proteína/ligante}) - [\Delta H_{\text{f}}(\text{proteína}) + \Delta H_{\text{f}}(\text{ligante})] \quad (\text{Eq. 22})$$

Para a construção dos modelos de previsão, também foram consideradas as energias livres de solvatação pelo método SM5.4 (CRAMER & TRUHLAR, 1996) e as entalpias de solvatação dos ligantes, pelo método COSMO (KLAMT & SCHUUMANN, 1993), esta última calculada segundo a Equação 13.

3.2.2. Modelo de Inibição da AChE de *Aedes aegypti*

Diferentemente da AChE de *T. californica*, não estão disponíveis dados experimentais da inibição da AChE de *Ae. aegypti* pelos compostos das séries descritas. Para a proposição de um modelo de inibição da enzima AChE de *Ae. Aegypti* pelos compostos em estudo, foi necessário construir um modelo teórico de previsão de atividade eficiente. Foi desenvolvido um estudo baseado nos dados experimentais obtidos por Rook e colaboradores (2010), que descreve compostos da classe das β -carbolinas bivalentes sintetizados e testados em relação à atividade inibitória frente à AChE de *Ae. aegypti* (Tabela 3). Foram escolhidos 20 compostos para a construção do modelo, buscando-se uma boa variabilidade estrutural e de atividade (Figura 12).

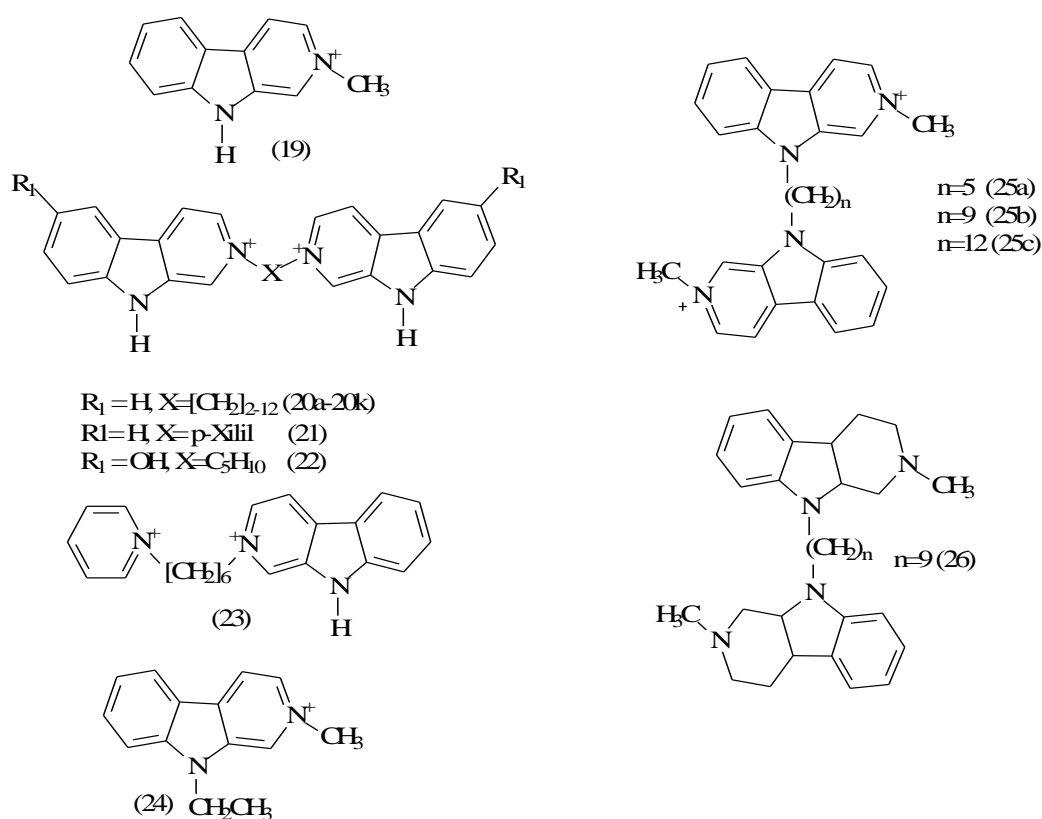


Figura 12. Estruturas das β -carbolinas bivalentes selecionadas (ROOK *et al.*, 2010).

Tabela 3. Valores de atividade de inibição da enzima AChE de *A. aegypti* (IC_{50} e pIC_{50}) das β -carbolinas bivalentes escolhidas para a construção do modelo de inibição (ROOK *et al.*, 2010).

Composto	IC_{50} (nM)	pIC_{50}	Composto	IC_{50} (nM)	pIC_{50}
19	845	6,073	20j	92	7,035
20a	430	6,367	20k	86	7,064
20b	7661	5,116	21	147	6,834
20c	278	6,556	22	4261	5,371
20d	595	6,225	23	564	6,249
20e	248	6,605	24	2567	5,591
20f	81	7,091	25a	280	6,553
20g	113	6,947	25b	0,5	9,308
20h	125	6,903	25c	1,2	8,91
20i	63	7,201	26	27	7,569

As β -carbolinas bivalentes foram construídas e otimizadas com o campo de força MMFF no programa Spartan'08 (Wavefunction, Inc.). Os compostos foram, então, docados na enzima usando o programa GOLD 5.1 (CCDC Ltd.). Para efetuar esse cálculo, foi preciso identificar um átomo próximo ao sítio ativo para definição do raio máximo no qual o ligante iria interagir com a proteína. Na AChE de *Ae. Aegypti*, foi escolhido o átomo de oxigênio da cadeia lateral do resíduo do sítio catalítico, Ser237 e o valor do raio do sítio de interação empregado foi de 15 Å. Após a docagem, foram selecionadas, dentre as diversas poses, aquelas com os melhores valores de pontuação. Como antes, a função de pontuação escolhida foi *ChemScore* (ELDRIDE *et al.*, 1997), por ser a função que melhor reproduziu a interação do ligante (pentileno-bis-tacrina) em seu próprio sítio de ligação na proteína.

Após ter sido identificada a melhor pose entre cada ligante e a proteína, foi efetuado o recorte da estrutura, utilizando o programa Rasmol 2.6 (SAYLE, 1995). O recorte foi feito utilizando-se um raio de 5 Å, tendo como centro o ligante. O modelo de trabalho inicial foi constituído dos resíduos Ile66, Val67, Asp68, Thr69, Val70, Phe71, Gly76, Ala77, Trp80, Asn81, Phe112, Gly113, Gly114, Gly115, Tyr117, Ser118, Gly119, Tyr126, Glu194, Ser195, Ala196, Asp273, Trp276, Gly277, Leu279, Gly280, Ile281, Glu284, Tyr324, Ile327, Tyr328, Tyr329, Trp427, Met434, His435, Gly436, Ile439 (Figura 13).

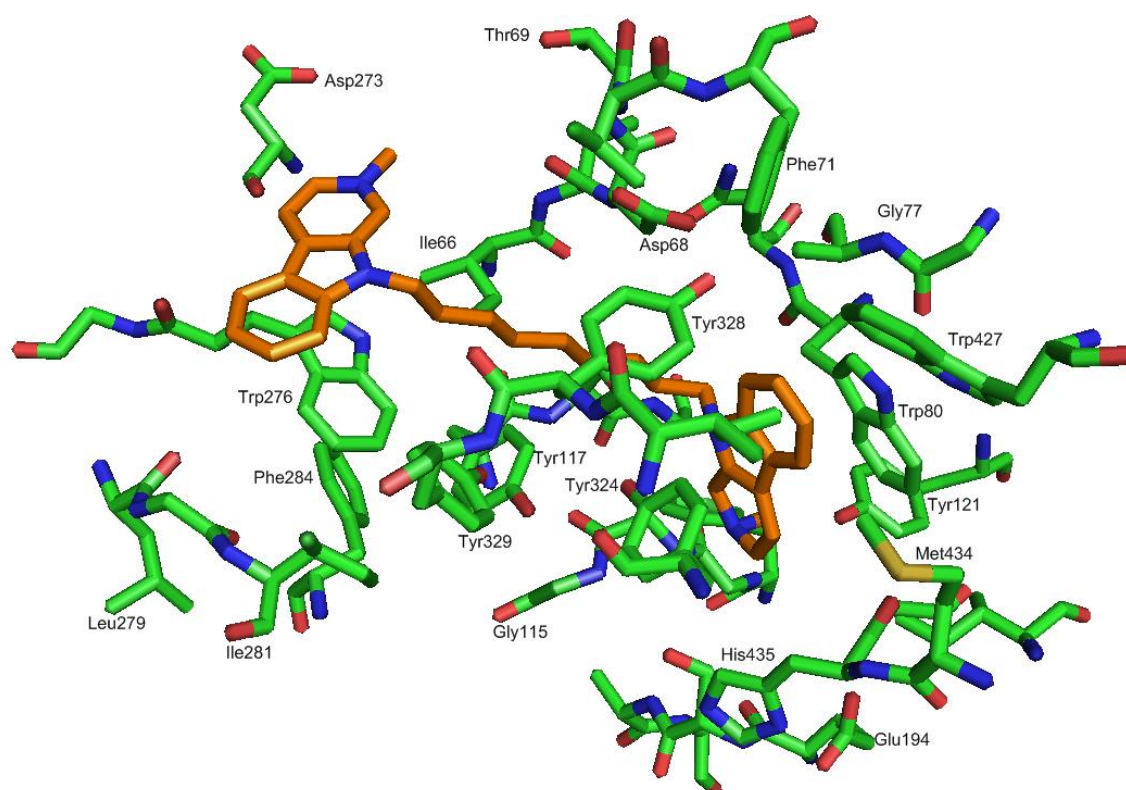


Figura 13. Exemplo de um recorte da estrutura do modelo para cálculos semi-empíricos da AChE de *Ae. aegypti* com os aminoácidos localizados a 5 Å da molécula **26**.

Em seguida, as estruturas finais com as ligações peptídicas fixas foram otimizadas com os métodos semi-empíricos PM6 e RM1 e as entalpias de interação (ΔH_{int}) calculadas conforme descrito na Eq. 22.

3.3. Validação do Protocolo de Docagem por Redocagem

Para avaliar a qualidade das poses resultantes da docagem feita no programa GOLD (CCDC Ltd.), foi realizado a docagem da estrutura do ligante co-cristalizada (pentileno-bis-tacrina) em seu próprio sítio de interação, procedimento denominado redocagem.

A partir da estrutura cristalográfica da AChE de *T. californica* 2CMF (RYDBERG *et al.*, 2006), foi selecionado o sítio de interação para a docagem da pentileno-bis-tacrina a partir de 20 Å das coordenadas cartesianas do átomo de carbono 627 do aminoácido Trp84. O procedimento foi feito com as quatro funções de pontuação: ChemPLP (EXNER *et al.*, 2009), ASP (BONET *et al.*, 1997), ChemScore (ELDRIDE *et al.*, 1997) e GoldScore (VERDONK *et al.*, 2003), disponibilizadas pelo programa GOLD (CCDC Ltd). A função ChemScore foi a que melhor reproduziu a estrutura co-cristalizada do ligante no sítio ativo da enzima.

3.4. Modelo Empírico de Energia Livre

Em um estudo de ésteres de forbol como inibidores da proteína quinase C, Wang e colaboradores combinaram cálculos de entalpia de interação, solubilidade e considerações de entropia em um ciclo termodinâmico, que permitiu a predição de energia livre de ligação que se correlacionou muito bem com medidas de constantes de inibição (WANG *et al.*, 1994). Com base em um ciclo semelhante, foi desenvolvido por Oliveira e colaboradores um modelo de energia livre aplicado a inibidores da enzima fosfodiesterase 4 (OLIVEIRA *et al.*, 2006). A expressão geral é dada pela Eq. 23.

$$RT\ln IC_{50} = C_1(\Delta G_{\text{solv}} + C_2)^n + C_3\Delta H_{\text{int}} + C_4N_{\text{LR}} + C_5 \quad (\text{Eq. 23})$$

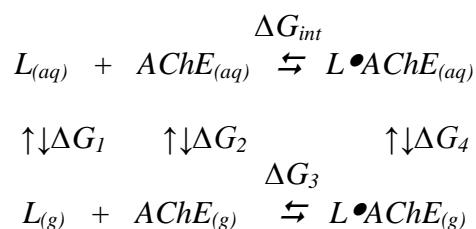
Os termos de energia de solvatação ΔG_{solv} foram determinados dois métodos no presente trabalho: SM5.4 (CRAMER & TRUHLAR, 1996) e COSMO (KLAMT & SCHUUMANN, 1993). O erro médio na energia de solvatação para 215 moléculas neutras calculadas pelo método SM5.4 foi de 0,44 kcal/mol e de 4,3 kcal/mol para 34 espécies carregadas (CHAMBERS *et al.*, 1996). Os termos de ΔH_{int} foram calculados pelos métodos semiempíricos PM6 e RM1, como discutido anteriormente (Eq. 22). Neste trabalho, como proposto anteriormente, o termo N_{LR} é o número de ligações rotacionáveis que tem a rotação restringida devido as interações com os átomos do sítio ativo. Ao aplicar um procedimento de regressão múltipla para desenvolver o melhor modelo possível, foram obtidos os coeficientes C1-C5 por ajuste da Eq. 23 aos valores experimentais de atividade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Modelos de Inibição da AChE de *Torpedo californica*

O sítio ativo da AChE de *T. californica*, obtido à partir dos dados cristalográficos da enzima 2CMF (Rydberg *et al.*, 2006), foi usado nesta etapa. As estruturas e os complexos melhor classificados pelo programa de *docking* molecular foram submetidos a otimizações de geometria com métodos semi-empíricos para avaliar os termos que influenciam a atividade de inibidores enzimáticos, de acordo com o modelo empírico proposto por Wang e colaboradores (WANG *et al.*, 1994) e adaptado por Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA *et al.*, 2006), conforme discutido no item 3.4.

O modelo proposto por Wang e colaboradores para o estudo de inibidores da proteína cinase C levou em consideração o efeito da partição dos ligantes entre a fase aquosa e a fase lipídica, porque a proteína cinase C é uma enzima de membrana, sendo necessária a passagem dos ligantes do meio aquoso para a membrana antes dos ligantes interagirem com a proteína (WANG *et al.*, 1994). No nosso caso, os dados de atividade foram obtidos com a AChE solúvel e o modelo precisa ser adaptado. Assumindo o ciclo termodinâmico:



onde L é um ligante e $L \bullet AChE$ é um complexo entre o ligante L e a $AChE$, podemos escrever para dois ligantes A e B :

$$\Delta G_{int}^A = \Delta G_1^A + \Delta G_2^A + \Delta G_3^A + \Delta G_4^A$$

$$\Delta G_{int}^B = \Delta G_1^B + \Delta G_2^B + \Delta G_3^B + \Delta G_4^B$$

$$\Delta G_{int}^A - \Delta G_{int}^B = (\Delta G_1^A - \Delta G_1^B) + (\Delta G_2^A - \Delta G_2^B) + (\Delta G_3^A - \Delta G_3^B) + (\Delta G_4^A - \Delta G_4^B)$$

Como os termos ΔG_2 só dependem da enzima e os termos ΔG_4 são muito dependentes da enzima, visto que o ligante no complexo estará dentro da enzima, podemos resumir que:

$$\Delta G_2^A = \Delta G_2^B$$

$$\Delta G_4^A \cong \Delta G_4^B$$

Assim, temos:

$$\Delta G_{int}^A - \Delta G_{int}^B = (\Delta G_1^A - \Delta G_1^B) + (\Delta G_3^A - \Delta G_3^B)$$

Se ΔG_{int} for conhecido para um composto de referência, por exemplo o ligante *B*:

$$\Delta G_{int}^A = (\Delta G_1^A + \Delta G_3^A) + (\Delta G_{int}^B - \Delta G_1^B - \Delta G_3^B) \quad (\text{Eq. 24})$$

ou

$$2,303RT \log K_i^A = (\Delta G_1^A + \Delta G_3^A) + (2,303RT \log K_i^B - \Delta G_1^B - \Delta G_3^B) \quad (\text{Eq. 25})$$

Para uma série de ligantes tendo o ligante *B* como referência, o segundo termo da equação (25) é uma constante. Se todos os termos de energia livre da equação (25) pudessem ser determinados teoricamente de forma precisa para o ligante *A*, seria possível usar a equação diretamente para prever o K_i do ligante *A* (conhecido o K_i do ligante *B*). Como há incertezas na determinação dos termos de energia por métodos teóricos e na própria determinação experimental de K_i , para maximizar a capacidade preditiva da equação é preciso calibrá-la por coeficientes determinados por ajuste da equação a dados experimentais disponíveis de atividade. Em nosso caso, não estão disponíveis dados de K_i , mas sim de IC_{50} . No entanto, como K_i e IC_{50} estão relacionados linearmente (equação de Cheng-Prusoff), uma equação semelhante se aplica para a predição de IC_{50} , com mudanças apenas nos valores dos coeficientes de ajuste.

A questão agora é como determinar ΔG_1 e ΔG_3 para os ligantes. O termo ΔG_3 pode ser separado em um termo ΔH_3 e um termo $-T\Delta S_3$. Nesse trabalho, o termo ΔH_3 corresponde ao termo ΔH_{int} da Equação 22 e foi calculado pelos métodos semiempíricos PM6 e RM1, conforme apresentado na Metodologia. De acordo com o discutido por Wang e colaboradores (1994), nesta equação, a perda entrópica do processo de interação entre um ligante e uma enzima pode ser resumida à perda entrópica associada às

ligações rotacionáveis que tem a rotação restringida devido às interações com átomos do sítio ativo. Assim, $-T\Delta S_3$ pode ser substituído pelo produto do número destas ligações rotacionáveis “congeladas”, N_{LR} , por um número que representa a perda entrópica por ligação.

O termo ΔG_I é de avaliação mais difícil e Wang e colaboradores (1994) sugeriram uma função quadrática de $\log(WS)$ para representá-la, onde WS é a solubilidade aquosa dos ligantes. Neste trabalho, optamos por avaliar ΔG_I mais diretamente, pelo cálculo da energia de solvatação ΔG_{solv} com o modelo de SM5.4 do programa PC Spartan Pro (Wavefunction, Inc.). O uso de uma função quadrática pode ser explicado porque a enzima estudada por Wang e colaboradores foi a proteína quinase C, uma enzima de membrana. Assim, nesse caso, os compostos para serem ativos deveriam apresentar solubilidade tanto na fase aquosa quanto na fase lipídica, ou seja, deveriam ter uma solubilidade intermediária. Compostos muito solúveis em água devem ser pouco solúveis na fase lipídica e vice-versa, o que seria prejudicial para a atividade. Assim, considerando a atividade como função da solubilidade, ela deve alcançar um máximo em valores intermediários, o que é bem reproduzido por uma função quadrática.

No caso do ensaio *in vitro* com a AChE, que é uma enzima solúvel, os compostos deveriam apenas apresentar uma boa solubilidade aquosa para terem boa atividade, sendo a dependência da atividade com a solubilidade possivelmente bem descrita nesse caso por uma simples função linear. No entanto, o canal que conduz ao sítio ativo da AChE e o sítio periférico tem um forte caráter aromático e compostos mais hidrofóbicos podem ter alguma vantagem em interagir com a AChE, ao menos nessas regiões. Desse modo, optamos por avaliar tanto a dependência linear quanto a quadrática para o termo ΔG_{solv} na equação final, Eq. 26.

$$2,303RT\log IC_{50} = c_1(\Delta G_{solv} + c_2)^n + c_3\Delta H_{int} + c_4N_{LR} + c_5 \quad (\text{Eq. 26})$$

Na Eq. 26, n pode ser 1 ou 2 e os coeficientes c_1 - c_5 foram obtidos por ajuste da Eq. 26 ao se aplicar uma regressão múltipla aos valores experimentais de atividades (IC_{50}). O termo independente c_5 representa o segundo termo Eq. 25.

A equação proposta (Equação 26) foi aplicada, primeiramente, aos resultados de inibição da AChE de *T. californica* por dois conjuntos de compostos obtidos por grupos da UFRRJ: harmana e derivados e compostos mesoiônicos. A equação também foi aplicada em resultados da inibição da AChE por β -carbolinas, obtidos da literatura.

4.1.1 Modelo de Inibição da AChE de *T. Californica* pela harmana e derivados

O produto natural harmana, isolado pelo aluno de doutorado Marcelo Araújo, e os derivados da harmana, sintetizados por Torres e colaboradores, (Torres *et al.*, 2011) apresentam semelhança estrutural com um inibidor da AChE, tacrina (figura 2), sugerindo a possibilidade dela e de seus derivados atuarem como inibidores da AChE. Sua utilização foi avaliada quanto à cinética de inibição da enzima AChE de *T. californica*. Os resultados da avaliação teórica dos termos que determinam a atividade estão na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de entalpias de interação calculadas pelos métodos PM6 (ΔH_{int}^{PM6}) e RM1 (ΔH_{int}^{RM1}), número de ligações rotacionáveis (N_{LR}) “congeladas”, entalpias de solvatação (ΔH_{solv}) e energias livres de solvatação (ΔG_{solv}) dos derivados da harmana.

Estrutura	ΔH^{PM6} ^a	ΔH^{RM1} ^a	ΔH_{solv} ^b	ΔG_{solv} ^c	N_{LR} ^d	$logIC_{50}$ ^e
17	-3	11	-7,89	-8,008	1	2,58
17a	-101	-111	-62,11	-42,715	1	0,73
17b	-64	-66	-43,87	-41,230	2	0,80
17c	-137	-155	-43,11	-40,245	3	0,85
17d	-85	-71	-42,83	-39,935	4	0,62
17e	-175	-130	-43,02	-39,614	3	0,98
17f	-137	-87	-49,80	-39,761	5	0,76
17g	-78	-112	-42,38	-40,155	2	0,24

^a $\Delta H_{int} = \Delta H_{EI} - (\Delta H_E + \Delta H_I)$ (kcal/mol).

^b Entalpia de solvatação calculada pelo método COSMO (kcal/mol).

^c Energia livre de solvatação determinada com o método SM5.4 (em kcal/mol).

^d Determinado pela análise da estrutura otimizada.

^e Atividade determinada na AChE de *T. californica* por Torres *et al.*, 2011.

As equações foram buscadas utilizando-se todos os inibidores e seus dados da tabela 4. A equação obtida com os melhores parâmetros estatísticos é representada abaixo.

$$\log IC_{50} = 0,028\Delta H_{solv} + 0,003\Delta H_{int}^{RM1} - 0,076N_{LR} + 2,632 \quad (\text{Eq. 27})$$
$$(r^2=0,76; Dp=0,57)$$

As equações obtidas com ΔG_{solv} e ΔH_{int}^{PM6} apresentaram piores parâmetros estatísticos ou coeficiente de regressão múltipla inadequados. Uma dependência linear ($n = 1$) de $\log IC_{50}$ em ΔH_{solv} foi suficiente para uma boa correlação, o que sugere que nesse caso as interações com regiões hidrofóbicas são pouco importantes para o processo de inibição da enzima.

Análise das contribuições dos parâmetros da equação 27 demonstrou que ΔH_{int} é o termo que apresenta a maior influência na atividade biológica dos compostos, sendo este um termo que contribui para reduzir o valor de $\log IC_{50}$, ou seja, para elevar a atividade (Tabela 4). A segunda maior contribuição é do termo entrópico (N_{LR}), seguido da entalpia de solvatação (ΔH_{solv}).

Tabela 5. Valores de contribuição de cada termo da Equação 27.

Compostos	$0,028\Delta H_{solv}$	$0,003\Delta H_{int}^{RM1}$	$-0,076 N_{LR}$
17	-0,221	0,033	-0,076
17a	-1,739	-0,333	-0,076
17b	-1,228	-0,198	-0,152
17c	-1,207	-0,465	-0,228
17d	-1,199	-0,213	-0,304
17e	-1,205	-0,390	-0,228
17f	-1,394	-0,261	-0,380
17g	-1,187	-0,336	-0,152

Apesar do termo N_{LR} apresentar uma influência significativa na atividade, ele tem pouca influência na discriminação na atividade dos compostos, visto que a sua variação entre um inibidor e outro é limitada. Mesmo ao se eliminar este termo, ainda foi obtido um modelo de predição com uma correlação semelhante à anterior ($r^2=0,74$; $Dp=0,42$).

$$\log IC_{50} = 0,003\Delta H_{solv} + 2,509\Delta H_{int}^{RM1} + 0,029 \quad (\text{Eq. 28})$$

Na Tabela 6 estão os dados de $\log IC_{50}$ teóricos obtidos com o melhor modelo, existindo variação entre 0,18 e 0,67 em comparação aos dados experimentais.

Tabela 6. Comparação dos valores de $\log IC_{50}$ medidos experimentalmente e $\log IC_{50}$ teóricos calculados pela Equação 27.

Estrutura	$\log IC_{50 \text{ exp}}$	$\log IC_{50 \text{ calc}}$	$\Delta \log IC_{50}$
17	2,58	2,36	0,22
17a	0,73	0,42	0,31
17b	0,80	1,01	0,21
17c	0,85	0,67	0,18
17d	0,62	0,87	0,25
17e	0,98	0,75	0,23
17f	0,76	0,55	0,21
17g	0,24	0,91	0,67

A correlação linear feita a partir dos dados teóricos e experimentais de $\log IC_{50}$ teve os valores $R = 0,86$ e $Dp=0,37$. O gráfico da Figura 14 mostra o resultado da correlação linear. Esses resultados indicam que o modelo é adequado para prever a atividade de inibição da enzima AChE de *T. californica* pelos derivados da harmana.

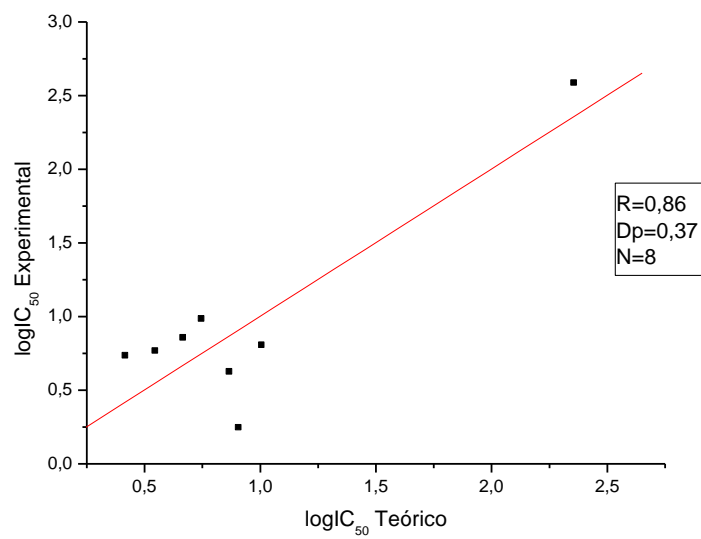


Figura 14. Representação da correlação linear entre os dados experimentais e teóricos para a inibição da AChE pela harmana e seus derivados. R é o coeficiente de correlação linear, Dp representa desvio padrão e N é o número de compostos.

4.1.2 Modelo de Inibição da AChE de *T. californica* compostos mesoiônicos

Os mesmos procedimentos foram feitos para os compostos mesoiônicos, em relação ao sítio da enzima AChE de *T. californica*. Todos os cálculos semi-empíricos foram realizados com os compostos na forma neutra (com o *N* exocíclico não protonado). Os dados utilizados estão na Tabela 7:

Tabela 7. Valores de $\log IC_{50}$ medidos experimentalmente, entalpia de interação calculada pelos métodos PM6 (ΔH^{PM6}), número de ligações rotacionáveis (N_{LR}) “congeladas” durante a ligação e entalpia de solvatação (ΔH_{solv}) dos compostos mesoiônicos, utilizados neste trabalho na forma neutra.

Estrutura	$\log IC_{50}$ ^a	ΔH^{PM6} ^b	ΔH_{solv} ^c	N_{LR} ^d
18a	1,93	6,47	-20,93	6
18b	1,04	1,04	-19,74	5
18c	1,41	2,02	-18,75	4
18d	1,76	-6,98	-20,03	6
18e	1,61	29,40	-20,53	4
18f	1,31	9,24	-25,31	8
18g	2,29	7,41	-21,82	6
18h	0,01	1,97	-22,80	5

^a Atividade determinada na AChE de *T. californica* por Linhares (2012, dados não publicados).

$$\supset \Delta H_{\text{int}} = \Delta H_{\text{EI}} - (\Delta H_{\text{E}} + \Delta H_{\text{I}}).$$

^c Entalpia de solvatação calculada pelo método COSMO (kcal/mol).

^d Determinado pela análise da estrutura otimizada.

Os melhores modelos encontrados foram:

$$\log IC_{50} = -0,028\Delta H_{solv}^2 - 0,723\Delta H_{solv} + 0,048\Delta H_{int}^{PM6} + 0,819N_{LR} - 6,032 \quad (\text{Eq. 29})$$
$$(r^2=0,78; Dp=0,48)$$

$$\log IC_{50} = -0,024\Delta H_{solv}^2 - 0,518\Delta H_{solv} + 0,046\Delta H_{int}^{PM6} + 0,825N_{LR} - 3,421 \quad (\text{Eq. 30})$$
$$(r^2=0,85; Dp=0,47)$$

As melhores equações encontradas por regressão múltipla apresentam um termo quadrático do ΔH_{solv} , como proposto por Wang e colaboradores (WANG *et al.*, 1994) (Equação 26), sugerindo que, para essa série, as melhores atividades são alcançadas por compostos que apresentam valores de solubilidade intermediário, ou seja, que não são nem muito hidrofílicos nem muito hidrofóbicos. Foram obtidas duas equações com boa correlação com os valores experimentais de $\log IC_{50}$, gerando bons parâmetros estatísticos. No entanto, a Equação 30 foi obtida eliminando-se uma estrutura, **18b**, buscando-se uma melhor correlação. A Equação 29 foi obtida sem eliminar nenhum composto. A estrutura **18b** apresenta como espaçador o grupo $-\text{CH}=\text{C}-$, que foi modelado com a configuração mais estável *E*; uma razão para a necessidade de retirada deste composto é que a estrutura avaliada na inibição enzimática poderia ser, na verdade, uma mistura dos diastereoisômeros *E* e *Z*, diferente do que foi considerado no modelo teórico. Ao se descartar a contribuição desse composto, foi obtida a Equação 30 mostrada acima.

A análise das contribuições dos parâmetros utilizados neste modelo demonstrou que a entropia das ligações congeladas, a entalpia de solvatação e a entalpia de interação são os termos que apresentam, nesta ordem, as maiores influências na atividade biológica dos compostos utilizados. Todos estes termos juntos contribuem para reduzir o valor de $\log IC_{50}$, ou seja, para elevar a atividade (Tabela 7).

Tabela 8. Valores de contribuição variável de cada termo da Equação 29.

Compostos	$(-0,028\Delta H_{solv}^2 - 0,723\Delta H_{solv})$	$0,048 \Delta H_{int}^{PM6}$	$0,819 N_{LR}$
18a	2,887	0,312	4,914
18b	3,381	0,050	4,095
18c	3,730	0,097	3,276
18d	3,268	-0,337	4,914
18e	3,062	1,417	3,276
18f	0,391	0,445	6,552
18g	2,467	0,357	4,914
18h	1,956	0,095	4,095

Na Tabela 9 estão os valores $logIC_{50}$ teóricos obtidos com o melhor modelo para os compostos neutros, existindo variação entre 0,02 e 0,58 em comparação aos dados experimentais. A correlação linear feita a partir dos dados teóricos e experimentais de $logIC_{50}$ teve os valores $R=0,88$ e $Dp=0,34$. O gráfico da Figura 15 mostra o resultado da correlação linear. A boa correlação encontrada entre os dados de atividade calculada e experimental sugere que o modelo teórico desenvolvido é adequado para a determinação da atividade inibitória dos compostos mesoiônicos.

Tabela 9. Valores de $\log IC_{50}$ medidos experimentalmente e $\log IC_{50}$ teórico calculados pela Equação 29.

Estrutura	$\log IC_{50}$ exp	$\log IC_{50}$ calc	$\Delta \log IC_{50}$
18a	1,93	2,08	0,15
18b	1,04	1,49	0,45
18c	1,41	1,07	0,34
18d	1,76	1,81	0,1
18e	1,61	1,72	0,11
18f	1,31	1,36	0,05
18g	2,29	1,71	0,58
18h	0,01	0,12	0,02

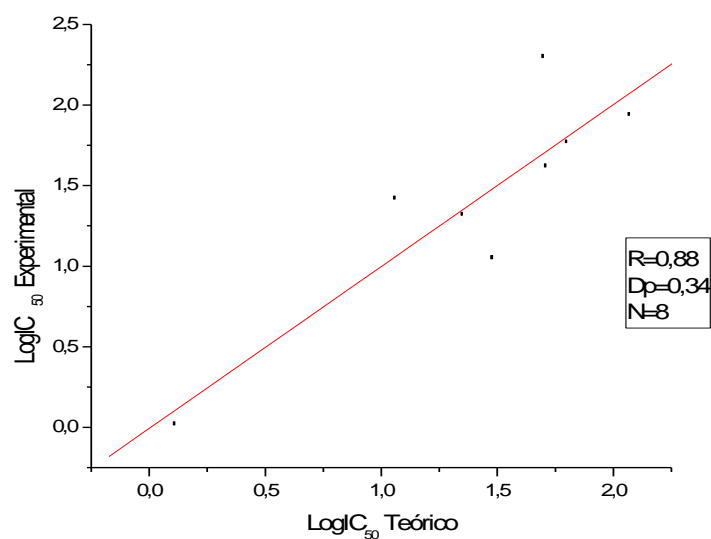


Figura 15. Representação da correlação linear entre os dados experimentais e teóricos para a inibição da AChE pelos compostos mesoiônicos. R é o coeficiente de correlação linear, Dp representa desvio padrão.

4.1.3 Modelo de inibição das β -carbolinas bivalentes

Para este estudo, usamos os dados experimentais obtidos por Rook e colaboradores, que conectaram duas unidades de β -carbolinas (pirido[3,4-*b*]indóis) com espaçadores de comprimento variável (Fig. 12) e determinaram o perfil de inibição desta série sobre a enzima AChE de *T. californica* (ROOK *et al.*, 2010). A avaliação teórica dos termos que determinam a atividade está na tabela 10.

Tabela 10. Valores de pIC_{50} medidos experimentalmente, entalpia de interação calculada pelos métodos PM6 e RM1 (ΔH^{PM6} e ΔH^{RM1} , em kcal/mol), número de ligações rotacionáveis (N_{LR}) “congeladas” durante a ligação e a energia livre de solvatação (ΔG_{solv} , kcal/mol) e entalpia de solvatação (ΔH_{solv} , kcal/mol) das β -carbolinas bivalentes na enzima TcAChE.

Estrutura	pIC_{50} ^a	ΔH^{PM6} ^b	ΔH^{RM1} ^b	ΔG_{solv} ^c	ΔH_{solv} ^d	N_{LR} ^e
19	6,07	-94,81	-83,09	-42,26	78,19	2
20a	6,37	-89,38	-79,41	-138,61	124,70	3
20b	5,12	-163,13	-160,44	-133,92	204,54	4
20c	6,56	-91,87	-84,36	-127,86	-8,58	5
20d	6,23	-140,72	-127,52	-122,64	183,36	6
20e	6,61	-85,13	-75,67	-120,35	66,54	7
20f	7,09	-144,22	-128,60	-116,61	202,34	8
20g	6,95	-163,46	-163,14	-113,69	81,98	9
20h	6,90	-124,42	-98,88	-110,31	65,45	10
20i	7,20	-168,72	-160,31	-108,37	214,84	11
20j	7,04	-134,45	-104,50	-107,04	185,74	12
20k	7,06	-143,85	-100,30	-104,74	202,17	13

21	6,83	-186,28	-169,54	-121,85	232,04	4
22	5,37	-349,28	-287,46	-133,34	72,28	6
23	6,25	-89,24	-82,76	-124,61	-11,96	7
24	5,59	-95,82	-85,02	-40,95	133,55	1
25a	6,55	-159,05	-159,96	-112,15	210,46	6
25b	9,31	-125,63	-101,67	-101,88	169,94	10
25c	8,91	-110,49	-109,90	-97,21	20,34	13
26	7,57	-271,17	-218,46	-11,58	154,70	10

^a Atividade determinada em *AChE* de *T. californica* (Rook *et al.*, 2010).

$$^b \Delta H_{\text{int}} = \Delta H_{\text{EI}} - (\Delta H_{\text{E}^+} + \Delta H_{\text{I}}).$$

^c Energia livre de solvatação (método SM5.4).

^d Entalpia de solvatação (método COSMO).

^e Determinado pela análise da estrutura otimizada.

As equações foram obtidas por regressão múltipla, mas em nenhuma delas foi necessária a inclusão do termo quadrático do ΔH_{solv} e ΔG_{solv} , como no caso dos derivados da harmana. É interessante observar que tanto os derivados da harmana quanto as β -carbolinas apresentam-se em geral como cátions, diferentemente dos compostos mesoiônicos.

Obtiveram-se duas equações com boa correlação com os valores experimentais de pIC_{50} , com parâmetros estatísticos satisfatórios. Para se chegar a estas equações, foi necessária a eliminação de quatro estruturas buscando-se uma melhor correlação, as estruturas **20b**, **22**, **25b** e **25c**. Ao se descartar a contribuição desses compostos, foram obtidas as equações abaixo:

$$pIC_{50} = -3,749 \times 10^{-4} \Delta H_{\text{solv}} - 0,005 \Delta H_{\text{int}}^{PM6} + 0,085 N_{LR} + 5,442 \quad (\text{Eq. 31})$$

$$(r^2=0,82; Dp=0,23)$$

$$pIC_{50} = -9,067 \times 10^{-4} \Delta G_{\text{solv}} - 0,005 \Delta H_{\text{int}}^{RMI} + 0,092 N_{LR} + 5,309 \quad (\text{Eq. 32})$$

$$(r^2=0,81; Dp=0,24)$$

Neste caso, não é muito clara a razão da eliminação destes compostos. A maior parte dos compostos desta série tem como espaçadores cadeias polimetilênicas, muito flexíveis, o que aumenta o número de possibilidades conformacionais e, em consequência, as chances do programa de *docagem* produzir um falso positivo. Devido à natureza aleatória da geração das poses iniciais pelo programa de *docking*, isso pode ter acontecido para algumas estruturas e outras não.

A melhor correlação foi obtida com a equação 31. A análise das contribuições dos parâmetros utilizados no modelo 31 demonstrou que a entropia das ligações congeladas representadas pelas variações do N_{LR} é o termo que apresenta a maior influência na atividade biológica dos compostos utilizados, sendo este termo que contribui para elevar o valor de pIC_{50} , ou seja, para elevar a atividade (tabela 10). O segundo é a entalpia de interação (ΔH_{int}) e o terceiro em contribuição é a entalpia de solvatação (ΔH_{solv}).

Tabela 11. Valores de contribuição de cada termo da Equação 31

Compostos	$3,749 \times 10^{-4} \Delta H_{solv}$	$-0,005 \Delta H_{int}^{PMc}$	$-0,085 N_{LR}$
19	0,046	-0,415	-0,170
20a	0,049	-0,396	-0,255
20b*	0,077	-0,801	-0,340
20c	0,045	-0,421	-0,425
20d	0,065	-0,636	-0,510
20e	0,045	-0,378	-0,595
20f	0,073	-0,642	-0,680
20g	0,082	-0,814	-0,754
20h	0,064	-0,493	-0,849
20i	0,071	-0,800	-0,934

20j	0,052	-0,521	-1,019
20k	0,059	-0,501	-1,104
21	0,079	-0,846	-0,340
22*	0,028	-1,434	-0,510
23	0,050	-0,413	-0,595
24	0,038	-0,424	-0,085
25a	0,092	-0,798	-0,510
25b*	0,077	-0,507	-0,849
25c*	0,055	-0,548	-1,104
26	0,066	-1,090	-0,849

* Estruturas eliminadas para a obtenção da Equação 32.

Na Tabela 12 estão os pIC_{50} teóricos obtidos com o melhor modelo, existindo variação entre 0,01 e 2,59 em comparação aos dados experimentais. A correlação linear feita a partir dos dados teóricos e experimentais de pIC_{50} teve os valores $R = 0,90$ e $Dp=0,22$. O gráfico da Figura 16 mostra o resultado da correlação linear.

Tabela 12. Valores de pIC_{50} medidos experimentalmente e pIC_{50} teórico calculados pela equação 31.

Estrutura	$pIC_{50\ cal}$	$pIC_{50\ exp}$	ΔpIC_{50}^{**}
19	5,98	6,07	0,09
20a	6,04	6,37	0,33
20b*	6,51	5,12	1,39
20c	6,24	6,56	0,32
20d	6,52	6,23	0,29

20e	6,37	6,61	0,24
20f	6,69	7,09	0,40
20g	6,94	6,95	0,01
20h	6,72	6,90	0,18
20i	7,11	7,20	0,09
20j	6,93	7,04	0,11
20k	6,99	7,06	0,07
21	6,55	6,83	0,28
22*	7,36	5,37	1,99
23	6,40	6,25	0,15
24	5,91	5,59	0,32
25a	6,66	6,55	0,11
25b*	6,72	9,31	2,59
25c*	7,04	8,91	1,87
26	7,32	7,57	0,25

*Estruturas eliminadas para a obtenção da equação 31.

**Em módulo.

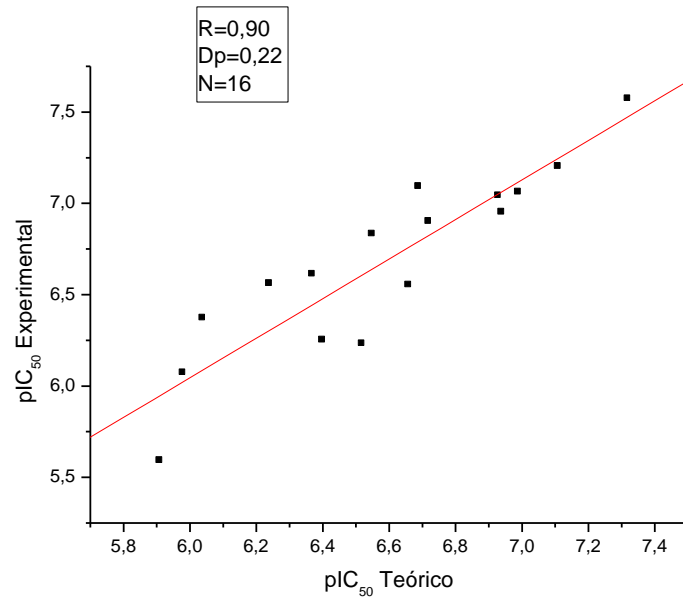


Figura 16. Representação da correlação linear entre os dados experimentais e teóricos para a inibição da AChE de *T. californica* pelas β -carbolinas. R é o coeficiente de correlação linear, Dp representa desvio padrão.

4.1.4 Avaliação da construção do modelo do sítio ativo da AChE de *Aedes aegypti*

O alinhamento das sequências primárias do modelo e da proteína molde foi feito no programa NCBI BLASTP 2.2.17 [ALTSCHUL *et al.*, 1997]. Estas sequências apresentam 48% de identidade e 63% de similaridade. O alinhamento entre as sequências da AChE de *Ae. aegypti* e da AChE de *T. californica* é apresentado na figura 17.

AChE AA 133	LLITTDKGVKRLTLEAPSGKKVDAWLGIPYAQPPLGPLRFRHPRPVEKWTGVLNATTPP	192
AChE TC 3	LLVNTKSGKVMGTRVPVLS-SHISAF LGIPFAEPPVGNMRFRRPEPKKPWSGVWNASTYP	61
AChE AA 193	NSCVQIVDTVF GDFPGATMWNPNTP LSEDCLYINVVPHPRPKNSAVMLWIFGGGFYSGT	252
AChE TC 62	NNCQQYVDEQFPGFSGSEMWNPNREMS EDCLYLNIWVPSPRPKSTTVMVWIYGGGFYSGS	121
AChE AA 253	ATLDVYDHRTLA SEENVIVVSLQYRVASLGFLFL-GTPEAPGNAGLFDQNLALRWVRDNI	311
AChE TC 122	STLDVYNGKYLAYTEEVVLVSLSYRVGAFGFLALHGSQEAPGNVGLLDQRMALQVWHDNI	181
AChE AA 312	HKFGGDP SRVTILFGESAGAVSVSLHLLSALS RDLFQRRAILQSGSPTAPWALVSREEATLR	371
AChE TC 182	QFFGGDPKTVTIFGESAGGASVGMHILSPGSRDLFRRAILQSGSPNC PWASVSVAEGRRR	241
AChE AA 372	ALRLAEAVNCPHDATKLTDTVECLRTKDPNV LVDNEWGTL---GICEFPFVPPVVDGAFLD	428
AChE TC 242	AVELGRNLNCLNSDE--ELIHCLEKRPQELIDVEWNVLPFDSIFRFSFVPPVIDGEFFP	299
AChE AA 429	ETPQRS LASGRFKKTDILTGSNTEEGYFIIYYLTELLRKEEGVTVSREEFLQAVRELNP	488
AChE TC 300	TSLESMLNSGNFKKTIQLLGVNKDEGSFFLLYGAPGFSKDSESKISREDFMSGVKLSVP	358
AChE AA 489	YVNGAARQAI VFEYTDWTEPENPNSNRDALDKMVG DYHFTCNVNEFAQRYAEEGNVYMY	548
AChE TC 359	HANDLGLDAVTLQYTDWMDNNGIKNRDGLDDIVGDHNVICPLMHFVNKYTKFNGTYLY	418
AChE AA 549	LYTHRSGKNPWRWTGVMHGDEIN YVFGEP LNSDLGYMEDEKDFSRKIMRYWSNFAKTGN	608
AChE TC 419	FFNHRASNLVWPEWGMVHG YEIEFVFGELPLVKELNYTAE EALSRIMHYWATFAKTGN	478
AChE AA 609	PN-PSPPNSDFPEWPKHTAHGRHYLELGLN TTYVGRGPRLRQCAFWK KYLPQLVAAT	664
AChE TC 479	PNEPS-----KWPLFTTKEQKFIDLNTEPMKVHQRLRVQMCVFWNQFLPKLLNAT	528

Figura 17. Alinhamento das estruturas primárias da AChE de *Aedes Aegypti* (Q6A2E2) e da AChE de *T. californica* (2CMF). Os aminoácidos conservados estão destacados em amarelo e; os que apresentam características semelhantes, em cinza.

Para este estudo, foi construído inicialmente um modelo 3D da AChE de *Ae. aegypti* (AeAChE). O modelo 3D da sequência de aminoácidos Q6A2E2 (Mori *et al.*, 2007) (Figura 17) foi obtido por modelagem comparativa com a estrutura cristalográfica da AChE de *T. californica* com o código 2CMF (Rydberg *et al.*, 2006), (Figura 18).

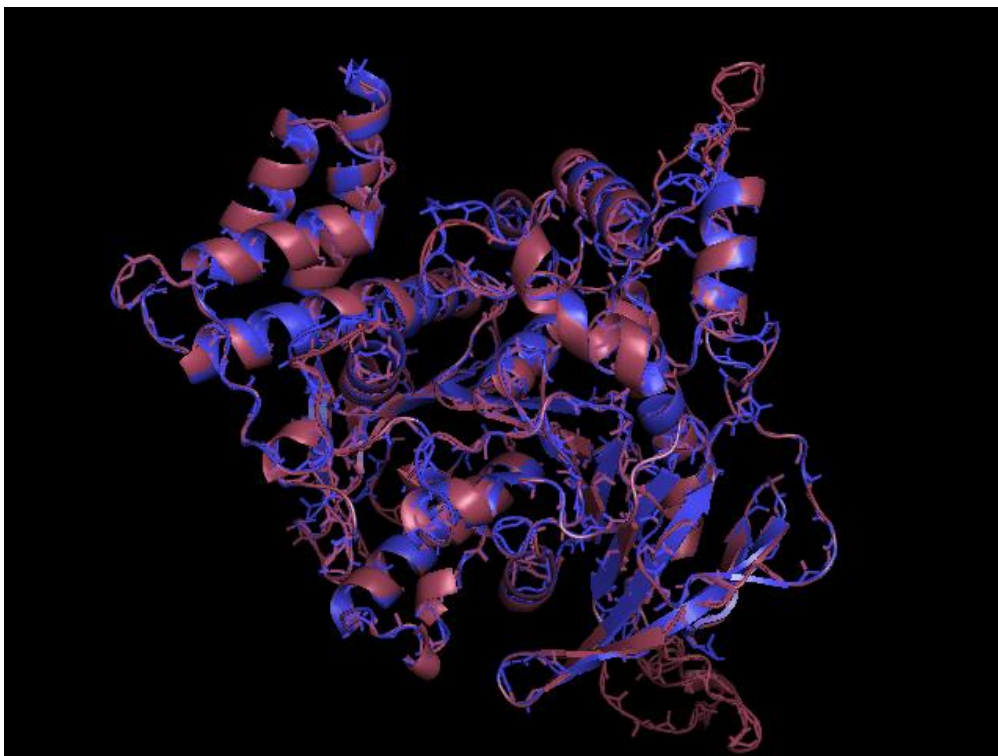


Figura 18. Sobreposição das estruturas: modelo da AChE de *Ae. aegypti* (vinho) e AChE de *T. californica* 2CMF (em azul).

A sobreposição do modelo com o molde (2CMF) mostrou que há algumas diferenças no canal e no sítio periférico, onde seis aminoácidos são trocados: no sítio periférico, Glu97 por Tyr70 e Tyr101 por Gln74; no canal, Tyr390 por Phe330, Tyr99 por Asp72, Glu108 por Ser81 e Met176 por Tyr121 (Figura 19). O sítio catalítico é totalmente conservado entre as duas espécies (Figura 20).

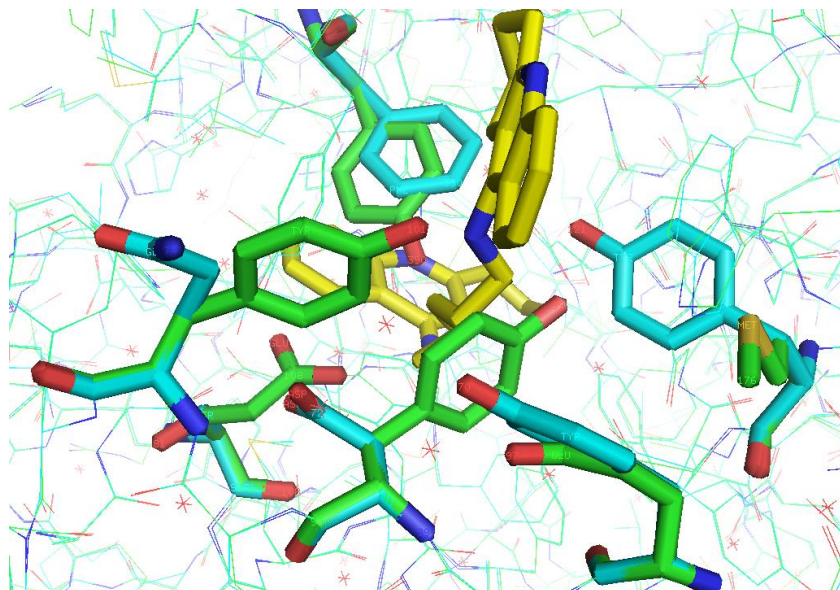


Figura 19. Sobreposição das estruturas do molde e do modelo da AChE de *Ae. aegypti*, na região do sítio periférico e do canal do sítio ativo. O ligante pentileno bis-tacrina está com carbonos em amarelo, em ciano, a enzima de *T. californica* (2CMF) e, em verde, o modelo de *Ae. aegypti*. Em destaque, os aminoácidos diferentes entre as estruturas nesta região.

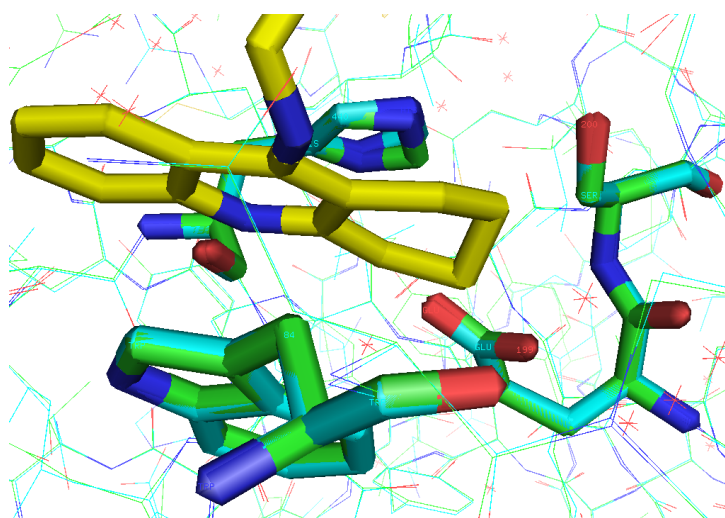


Figura 20. Sobreposição das estruturas do molde e do modelo da AChE de *Ae. aegypti*, na região do sítio catalítico “aniônico”. O ligante pentileno bis-tacrina está com carbonos em amarelo, em ciano, a enzima de *T. californica* (2CMF) e, em verde, o modelo de *Ae. aegypti*. Em destaque, os aminoácidos iguais Glu199, Ser200 e His440 entre as estruturas nesta região.

4.1.5 Estimativa da Qualidade do Modelo

Os gráficos de Ramachandran (com glicinas e prolinas) podem ser observados na Figura 21. O número de aminoácidos na estrutura gerada pelo *Swiss Model* que se encontram fora da região mais provável é baixo, sete aminoácidos, um percentual de 0,99%, indicando a boa qualidade dos modelos. Deve ser destacado que a estrutura cristalográfica utilizada para o alinhamento dos aminoácidos já possuía um pequeno número de aminoácidos fora da região mais provável. Os aminoácidos que estão fora da região mais provável no gráfico 2CMF são: Asp361 e Asp380. Os aminoácidos que estão fora da região mais provável no modelo são: Lys153, Cys414, Glu470, Pro506, Glu507 e Asn544. Entre todos os aminoácidos, nenhum desses faz parte do sítio de interação da enzima 2CMF e do modelo.

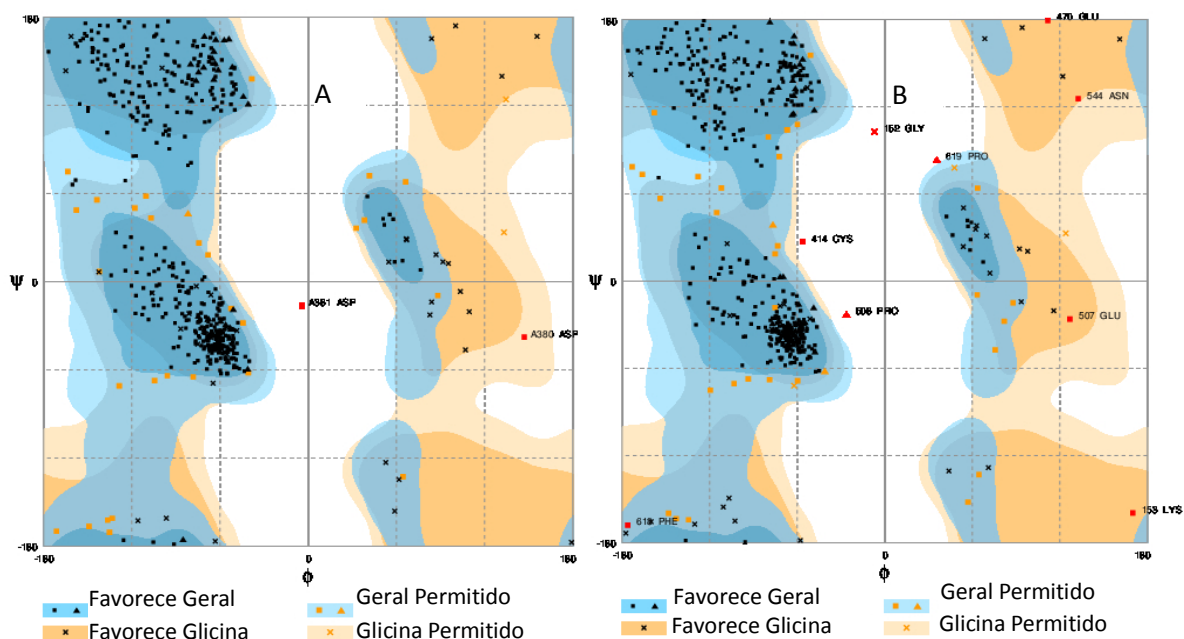


Figura 21. Gráficos de Ramachandran: A) estrutura cristalográfica 2CMF depositada no PDB; B) estrutura modelada no servidor *Swiss Model* para a sequência Q6A2E2 de *Ae. aegypti*. Figuras geradas com o programa Rampage (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>).

O método escolhido para a estimativa de qualidade absoluta do modelo da estrutura da proteína é independente do tamanho da proteína e pode ser utilizado tanto para avaliar cadeias isoladas, bem como conjuntos oligoméricos inteiros. A qualidade absoluta é calculada relacionando-se as características estruturais do modelo com

estruturas experimentais de tamanho semelhante. Com base na função de pontuação composta QMEAN (do inglês “Qualitative Model Energy ANalysis”, Análise Qualitativa da Energia do Modelo, Benkert *et al.*, 2009), foram analisados diferentes aspectos geométricos das proteínas. Para a normalização, a pontuação QMEAN de um modelo é comparada com distribuições obtidas a partir de estruturas cristalograficas de alta resolução resolvidas por difração de raios-X. As estruturas de referência partilham menos de 30% de identidade sequencial e foram resolvidas até uma resolução menor do que 2 Å. O QMEAN Z-escore resultante fornece uma estimativa do "grau nativo" das características estruturais observadas num modelo e indica se o modelo é de qualidade comparável à estrutura experimental. Os Z-escores dos termos individuais da função de pontuação indicam que características estruturais de um modelo apresentam desvios significativos do esperado comportamento "nativo", por exemplo, acessibilidade inesperada do solvente, geometria da cadeia principal, arranjo inter-atômico.

A pontuação global QMEAN4 é um valor composto constituído de uma combinação linear de quatro termos estatísticos potenciais (confiabilidade do modelo estimada entre 0 e 1) (Benkert *et al.*, 2011). Os termos de pseudo-energias que contribuem são dados a seguir (Tabela 13 e Figuras 22 e 23), juntamente com suas pontuações Z (*Z-scores*) em relação à pontuação obtida em estruturas experimentais de tamanho similar resolvido por difração de raios-X de alta resolução.

Tabela 13: Termos da função de escore QMEAN4 para o modelo da AChE de *Ae. aegypti*

Termos da função de escores	Escore bruto	Z-escore
Energia de interação de C beta	-98.32	-1.21
Energia de pares para todos os átomos	-10094.09	-1.31
Energia de solvatação	-43.24	-0.36
Energia dos ângulos de torção	-107.70	-1.25
Pontuação de QMEAN4	0.659	-1.60

O cálculo do QMEAN Z-score foi realizado no Servidor QMEAN (<http://swissmodel.expasy.org/qmean>) (Benkert *et al.*, 2009), com as ferramentas disponíveis no espaço de trabalho do servidor SWISSMODEL (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>) (Arnold *et al.*, 2006, Schwede *et al.*, 2003).

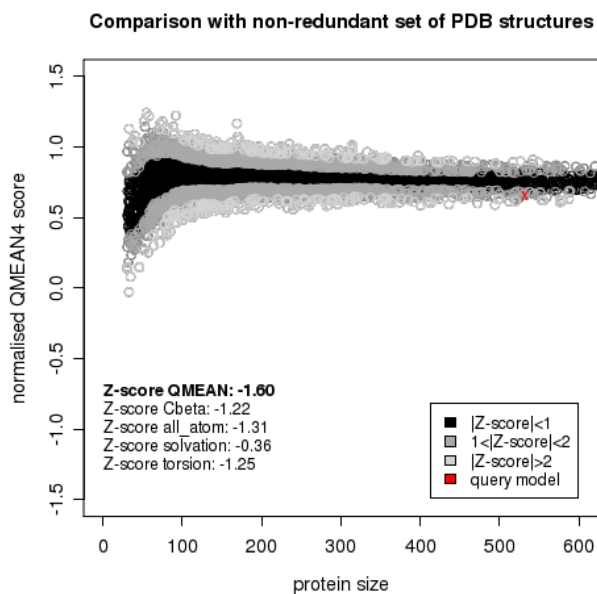


Figura 22. Gráfico do QMEAN Z-score do modelo de AChE de *Ae. aegypti*, em comparação com um conjunto de estruturas do PDB.

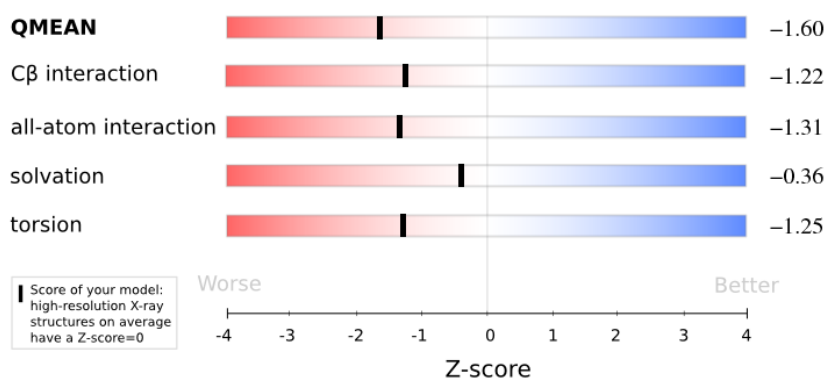


Figura 23. Z-score do modelo da AChE de *Ae. aegypti*.

As ferramentas disponíveis no SwissPDB Viewer, como Anolea / QMEAN, também podem ser utilizadas para avaliação da qualidade do modelo. O programa usa potenciais de força média para cálculos da energia de cada um dos resíduos do modelo e exhibe os resultados sob a forma de um gráfico. O gráfico exhibe uma curva que mostra a energia de cada resíduo (interações com os átomos circundantes). Se não houver contatos ruins, a energia está em torno ou abaixo de zero, enquanto maus contatos terão alta energia, acima da linha zero (regiões vermelhas) (MICHIELIN *et al.*, 2008)

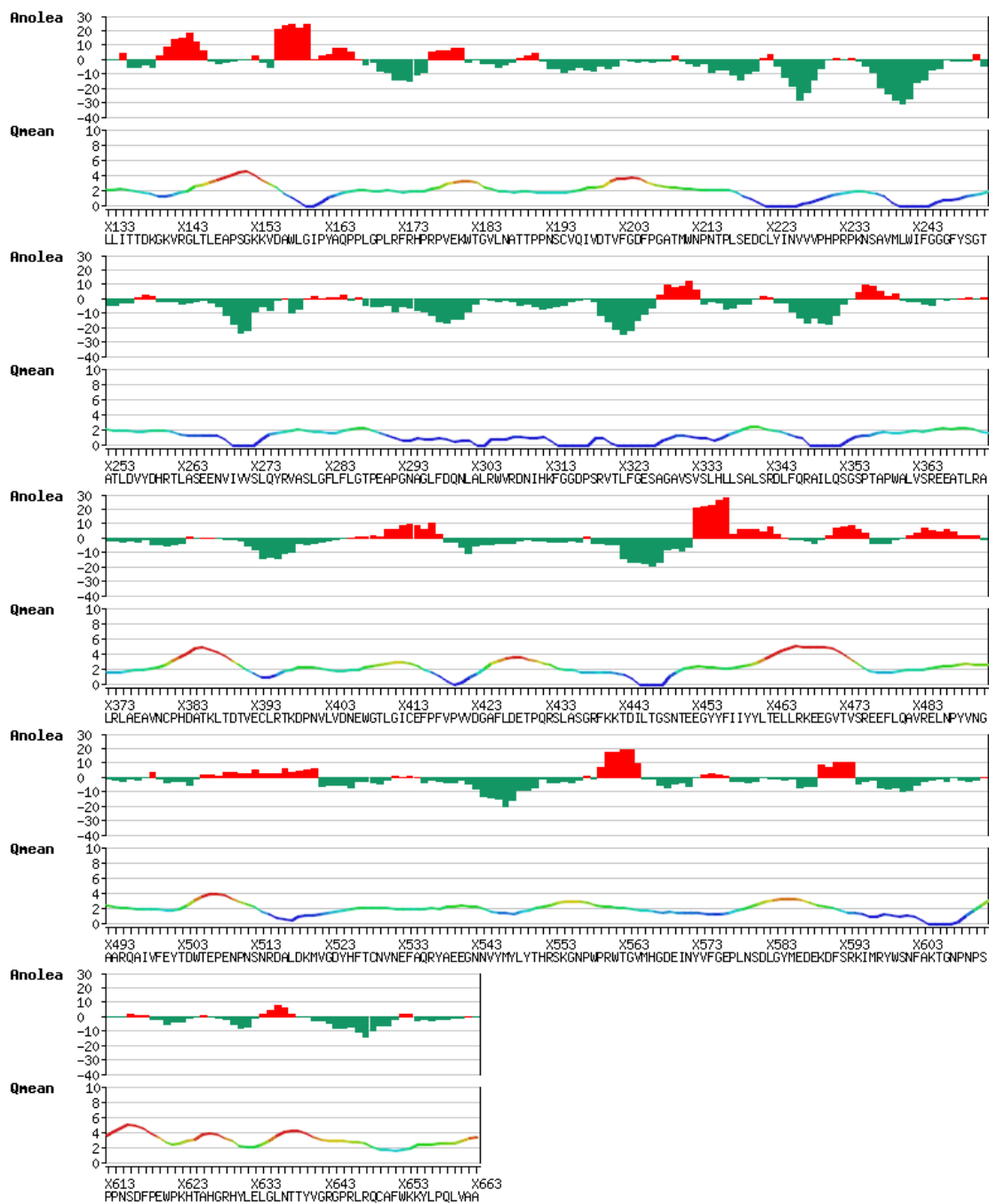


Figura 24. Gráfico Anolea / QMAEN modelo da AChE de *Ae. aegypti*.

4.1.6 Modelo de Inibição da AChE de *Aedes aegypti*

A criação de um modelo de predição das atividades de inibidores da AChE de *Ae. aegypti* tem como maior dificuldade a ausência de dados experimentais de inibição desta enzima. Conforme descrito no item anterior, os mesmos resíduos ocupam o sítio catalítico para a enzima das espécies *Ae. aegypti* e *T. californica*, mas há seis diferenças na região do canal e do sítio periférico. Assumindo que essas diferenças influenciariam de modo semelhante cada ligante da AChE de *T. californica* quando transportado para a enzima de *Ae. aegypti*, os valores de IC_{50} nesta última enzima equivaleriam aproximadamente aos valores de IC_{50} na primeira, apenas multiplicados por algum fator de ajuste.

Assim, para este estudo, também foram usados os dados experimentais obtidos por Rook e colaboradores, que determinaram o perfil de inibição desta série de β -carbolinas contra a enzima AChE de *T. californica* (Rook *et al.*, 2010). De acordo com o raciocínio acima, a partir desses dados experimentais foi construído um modelo de inibição para a AChE de *Ae. aegypti*. A avaliação teórica dos termos que determinam a atividade está na Tabela 14.

Tabela 14. Valores de pIC_{50} medidos experimentalmente em AChE de *T. californica*, entalpia de interação calculada pelos métodos RM1 e PM6 (ΔH , kcal/mol), número de ligações rotacionáveis (N_{LR}) “congeladas” durante a ligação e a entalpia de solvatação (ΔH_{solv}) das β -carbolinas bivalentes na AChE de *Ae. aegypti*.

Estrutura	pIC_{50} ^a	ΔH^{RM1} ^b	ΔH^{PM6} ^b	ΔH_{solv} ^c	N_{LR} ^d
19	6,07	-88,92	-101,26	124,29	2
20a	6,37	-178,28	-182,13	245,11	3
20b	5,12	-160,93	-182,34	199,64	4
20c	6,56	-166,57	-164,28	238,80	5
20d	6,23	-161,99	-176,76	206,67	6
20e	6,61	-118,33	-112,88	148,52	7

20f	7,09	-155,56	-176,46	131,427	8
20g	6,95	-154,99	-176,74	197,428	9
20h	6,90	-158,55	-184,60	215,50	10
20i	7,20	-207,24	-228,74	292,24	11
20j	7,04	-192,66	-99,46	-19,77	12
20k	7,06	-212,78	-190,20	263,73	13
21	6,83	-109,74	-69,05	143,21	4
22	5,37	-181,60	-202,90	233,34	6
23	6,25	-171,36	-190,09	215,58	7
24	5,59	-110,35	-109,14	155,56	1
25a	6,55	-183,98	-188,26	238,26	6
25b	9,31	-218,12	-213,25	175,77	10
25c	8,91	-243,15	-245,90	279,64	13
26	7,57	-186,29	-210,27	223,60	10

^a Atividade determinada em AChE de *T. californica* (Rook *et al.*, 2010).

$$^b \Delta H_{\text{int}} = \Delta H_{\text{E}} - (\Delta H_{\text{E}} + \Delta H_{\text{I}}).$$

^c Energia livre de solvatação calculada pelo método SM5.4.

^d Determinado pela análise da estrutura otimizada.

A análise por regressão múltipla dos termos calculados nos conduziu a uma equação com uma correlação apenas regular com os valores de pIC_{50} experimentais ($r^2=0,50$; $Dp=0,39$). Mesmo considerando a inclusão de um termo quadrático da ΔH_{solv} , como proposto por Wang e colaboradores (WANG *et al.*, 1994) (Equação 26), houve somente uma pequena melhora na correlação entre os termos calculados e experimentais ($r^2=0,58$; $Dp=0,48$). Após uma análise sistemática da atividade prevista por esta correlação para cada composto, decidiu-se pela eliminação de algumas estruturas na

busca de uma melhor correlação. Para obter a Equação 34, descartou-se a contribuição dos compostos **20b**, **20d** e **23**. O composto **20b** havia sido também eliminado para a obtenção das equações 31 e 32. Em relação ao composto **20d** e **23**, não é clara a razão da necessidade de eliminação, mas em razão do uso de dados de inibição da AChE de uma outra espécie para a construção do modelo de inibição da AChE de *Ae. aegypti*, era esperado que alguns valores precisassem ser descartados. Ao se descartar a contribuição desse composto, foi obtida a Equação 33, com uma boa correlação:

$$pIC_{50} = -7,472 \times 10^{-5} \Delta H_{solv}^2 + 0,018 \Delta H_{solv} - 0,0204 \Delta H_{int}^{RM1} + 0,103 N_{LR} + 2,485 \quad (\text{Eq.33})$$

$$(r^2=0,75; Dp=0,53)$$

Aqui foi necessária a inclusão do termo quadrático de ΔH_{solv} , o que pode ter sido causado por uma mudança do caráter hidrofóbico do canal e do sítio periférico, resultante das mudanças dos seis aminoácidos, identificados anteriormente.

Analisando-se as contribuições dos parâmetros utilizados na equação 33, observou-se que a entropia das ligações congeladas representadas pelas variações do N_{LR} é o termo que apresenta a maior influência na atividade biológica dos compostos utilizados, sendo este termo que contribui para aumentar o valor de pIC_{50} , ou seja, para elevar a atividade (tabela 14). A segunda maior contribuição dos compostos é dada pela entalpia de interação (ΔH_{int}), e a terceira, pela energia livre de solvatação (ΔH_{solv}).

Tabela 15. Valores de contribuição variável de cada termo da Equação 33.

Compostos	$-7,472 \times 10^{-5} \Delta H_{solv}^2 + 0,018 \Delta H_{solv}$	$0,0204 \Delta H_{int}^{RM1}$	$0,103 N_{LR}$
19	3,42	1,81	0,21
20a	8,96	3,64	0,31
20b*	6,62	3,28	0,41
20c	8,61	3,40	0,52
20d*	6,96	3,30	0,62
20e	4,35	2,41	0,72

20f	3,69	2,36	0,83
20g	6,51	3,16	0,93
20h	7,40	3,23	1,03
20i	11,71	4,23	1,14
20j	-0,33	3,93	1,24
20k	10,00	4,34	1,34
21	4,14	2,24	0,41
22*	8,32	3,70	0,62
23	7,40	3,49	0,72
24	4,64	2,25	0,10
25a	8,58	3,75	0,62
25b	5,51	4,45	1,03
25c	10,94	4,96	1,34
26	7,81	3,80	1,30

* Estruturas eliminadas para obtenção da equação 33.

Apesar do termo N_{LR} apresentar uma maior influência na atividade do que o ΔH_{solv} , ele influencia bastante na discriminação dos compostos quanto à atividade, visto que há uma variação de doze átomos de carbonos entre o primeiro e o vigésimo inibidor. Por esta razão, mesmo ao se eliminar o ΔH_{solv} , foi obtido um modelo de predição regular da correlação ($r^2=0,55$; $Dp=0,66$).

Na Tabela 16 estão os valores de pIC_{50} teóricos obtidos com a equação 33, existindo variação entre 0,04 e 1,62 em comparação com os dados experimentais.

Tabela 16. Valores de pIC_{50} medidos experimentalmente e de pIC_{50} teóricos calculados pela Equação 33.

Estrutura	$pIC_{50\ cal}$	$pIC_{50\ exp}$	ΔpIC_{50}^{**}
19	5,62	6,07	0,45
20a	6,41	6,37	0,04
20b*	6,84	5,12	1,72
20c	6,49	6,56	0,07
20d*	6,98	6,23	0,75
20e	6,68	6,61	0,07
20f	6,77	7,09	0,32
20g	7,26	6,95	0,31
20h	7,21	6,90	0,31
20i	6,79	7,20	0,41
20j	7,26	7,04	0,22
20k	7,78	7,06	0,72
21	6,21	6,83	0,62
22	6,99	5,37	1,62
23*	7,16	6,25	0,91
24	5,87	5,59	0,28
25a	6,96	6,55	0,41
25b	8,86	9,31	0,45
25c	8,04	8,91	0,87
26	7,66	7,57	0,09

*Estruturas eliminadas para obtenção da equação 33.

**Valores expressos em módulo.

A correlação linear feita a partir dos dados teóricos e experimentais de pIC_{50} teve os valores $R = 0,86$ e $Dp=0,47$. O gráfico da Figura 25 mostra o resultado da correlação linear. Esses resultados indicam que o modelo é adequado para prever a atividade de inibição da enzima AChE de *Ae. aegypti*.

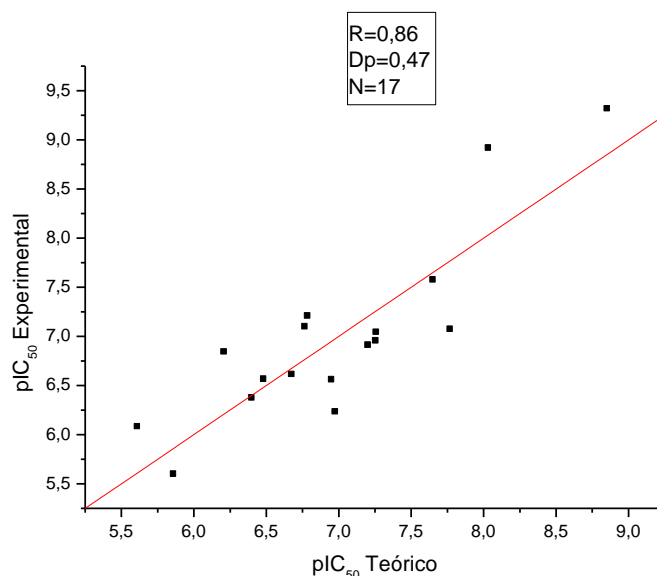


Figura 25. Representação da correlação linear entre os dados experimentais (AChE de *T. californica*) e teóricos para a inibição (AChE de *Ae. aegypti*) pelas β -carbolicinas. R é o coeficiente de correlação linear, Dp representa desvio padrão.

4.2 Análise de Interações dos Modelos

4.2.1 Interações dos derivados da harmana com a AChE de *Torpedo californica*

Os resultados de *docking* molecular mostraram que todos os derivados da harmana ocupam posições semelhantes nos sítios ativo da enzima. As estruturas, planares, estão envolvidas em interações de empilhamento π com resíduos aromáticos do subsítio periférico (Trp276 e Tyr67). Os mesmos resíduos estabelecerem interações muito semelhantes com fragmentos de um dímero da tacrina em seu co-cristal (Rydberg *et al.*, 2006). Isso sugere que a geometria da interação predita pela função *Chemscore* para o complexo harmana-TcAChE está correta.

Uma vez que os dados cinéticos são indicativos de uma inibição não-competitiva, na qual a ligação do inibidor à enzima reduz a atividade, mas não afeta a ligação do substrato, foram investigados complexos ternários contendo também a molécula de substrato.

Os melhores complexos acetilcolina/enzima da TcAChE foram selecionados para o *docking* com os derivados da harmana. A análise das estruturas obtidas mostrou que o processo de *docking* foi capaz de acomodar os derivados da harmana dentro da enzima juntamente com a molécula de substrato, resultando em complexos ternários estáveis.

Análise das estruturas resultantes do *docking* mostrou que os ligantes se apresentaram dentro da TcAChE na mesma região e de forma semelhante ao *docking* feito anteriormente. As descrições das estruturas estão representadas na Figura 26.

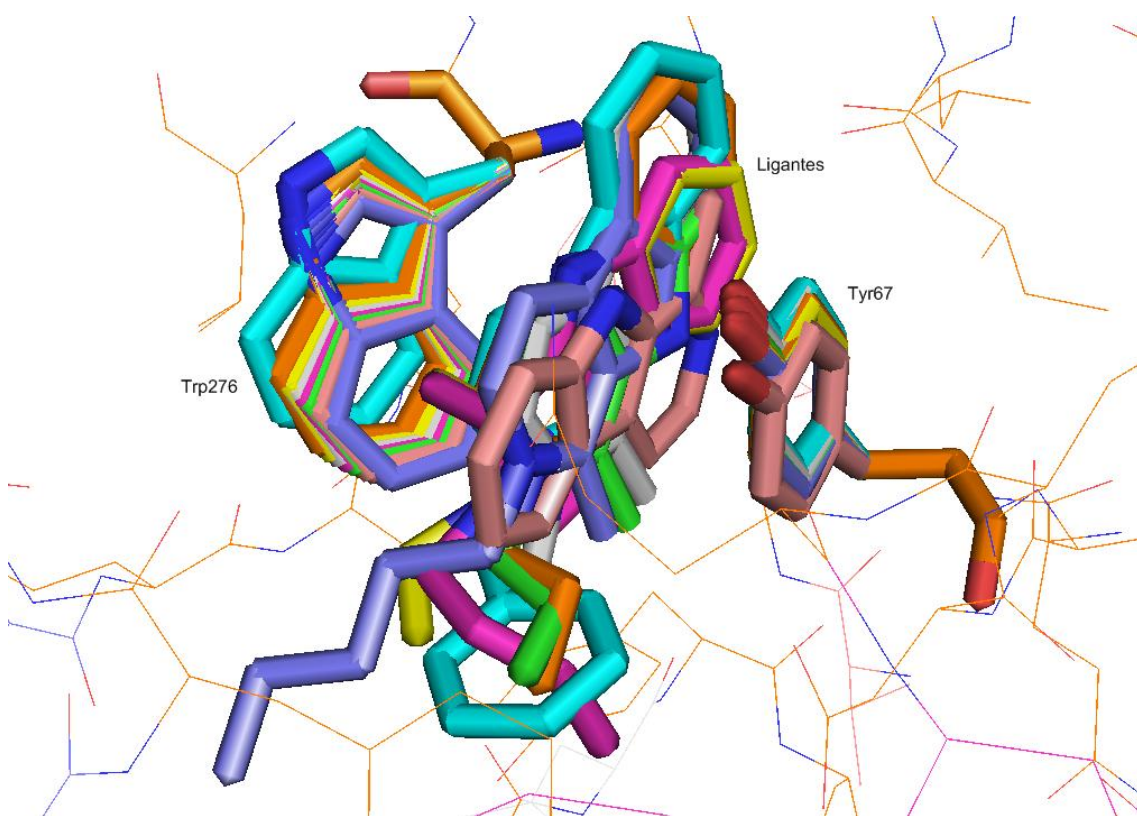


Figura 26. Derivado da harmana no sítio periférico da TcAChE, fazendo interações de empilhamento π com a Tyr67 e Trp276. Carbonos em verde, derivado **17e**, em ciano, **17g**, em magenta, **17d**, em amarelo, **17b**, rosa claro, **17**, em cinza, **17a**, em azul, **17f**, em laranja, **17c**.

Átomos de N em azul e átomos de O em vermelho; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.

Conforme descrito, as geometrias de interação obtidas por *docking* molecular foram reotimizadas com o método de orbital molecular semi-empírico a fim de se obterem as entalpias de interação. Durante este procedimento, como os átomos das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos e dos ligantes foram deixados livres, ocorreram acomodações que otimizaram as geometrias de interação. Todas as estruturas dos complexos ternários foram submetidas a otimizações de geometria com os métodos semi-empíricos PM6 (ΔH^{PM6}) e RM1 (ΔH^{RM1}) para a determinação das entalpias de interação (apresentadas na Tabela 4). Pode ser observado nos resultados semi-empíricos que a enzima é prevista interagir muito mais favoravelmente com os derivados catiônicos *N*-alquilados do que com a molécula da harmana, em concordância com os resultados cinéticos (Torres *et al.*, 2011).

Análise dos resultados obtidos pelo método semi-empírico que levou ao melhor modelo de previsão de $\log IC_{50}$ (eq. 27), RM1, mostra diferenças significativas entre os modos de interação da estrutura **17** e dos derivados com melhores valores de ΔH_{int} , **17e** e **17c**, no complexo TcAChE/acetiltiocolina. Os derivados **17c** e **17e** estão com os dois átomos de nitrogênio heterocíclicos apontados para a parte interna da enzima, com a estrutura do **17e** mais deslocada para fora do sítio periférico. O nitrogênio piridínico de **17c** está fazendo interação cátion- π com os aminoácidos Trp276, Tyr118 e Tyr67, enquanto a estrutura **17e** não está realizando essas interações com esses aminoácidos por estar mais distante; o outro nitrogênio de **17c** está fazendo uma ligação hidrogênio com o Glu275, enquanto **17e** está fazendo esta interação com o aminoácido Asp273. Já a estrutura **17** está com um dos seus nitrogênios heterocíclicos apontado para fora do sítio periférico e o outro próximo ao aminoácido Glu275, fazendo uma ligação hidrogênio. Essa molécula difere das outras duas por sofrer um giro de 180°, como pode ser observado na Figura 27.

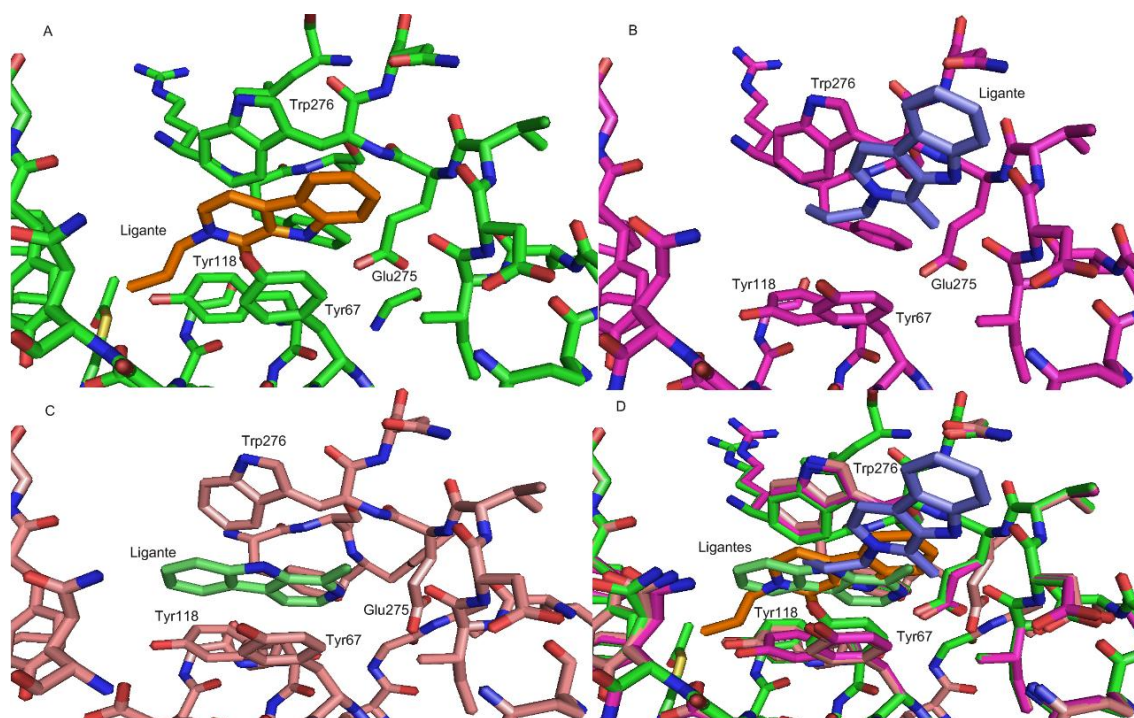


Figura 27. (A) carbonos da AChE em verde e carbonos da estrutura **17c** em laranja; (B) carbonos da AChE em magenta e carbonos da estrutura **17e** em azul claro; (C) carbonos da AChE em rosa claro e carbonos da estrutura **17** em verde; (D) sobreposição dos três complexos. Átomos de N em azul e átomos de O em vermelho; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.

Os resultados da Tabela 4 mostram que a interação é entalpicamente favorável para todas as estruturas, exceto para a estrutura **17**. Isso é resultado de diferentes tipos de interações, como se pode observar na Tabela 17. Sobrepondo o sítio vazio com o sítio otimizado contendo a estrutura **17**, observaram-se apenas pequenos deslocamentos das cadeias laterais dos resíduos Tyr67, Tyr118, Glu273 e Trp276. No entanto, as outras estruturas causaram modificações nas posições das cadeias laterais de mais resíduos de aminoácidos: Gln66, Tyr67, Glu70, Gln71, Tyr118, Ser119, Glu270, Trp276, Asn277, Leu279, Arg286, Phe327, Phe328 e no próprio substrato, após a otimização. Os deslocamentos estão exemplificados na Figura 28 para a estrutura **17c**.

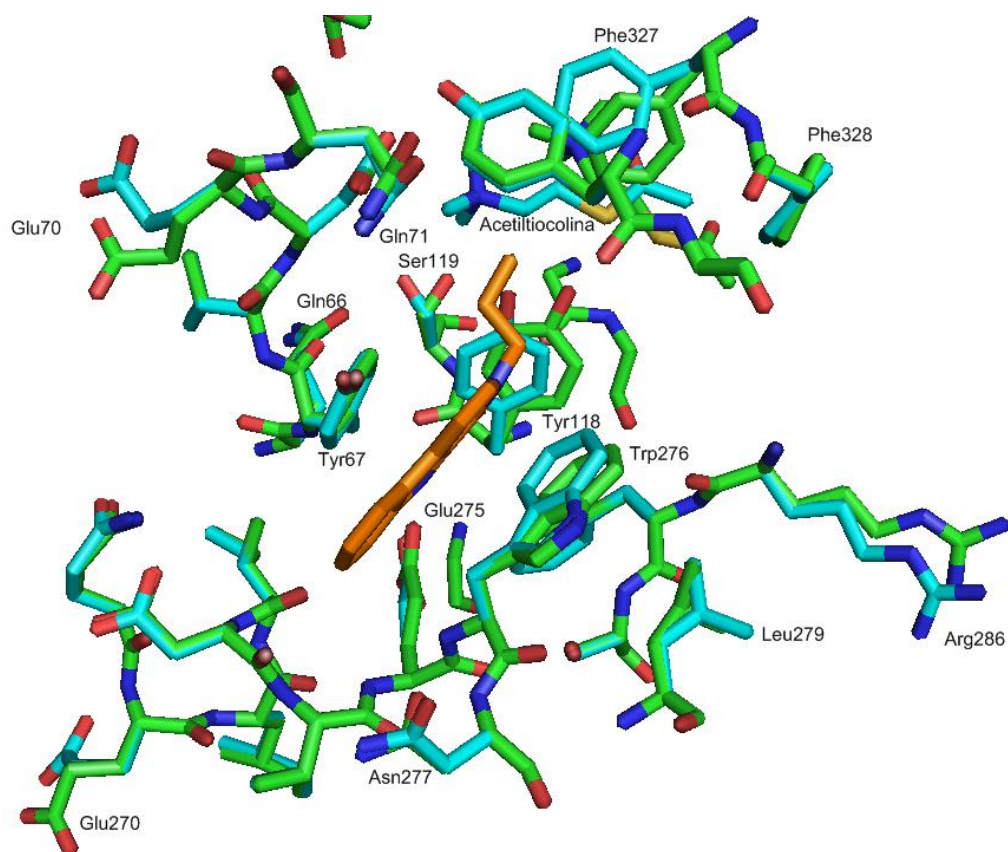
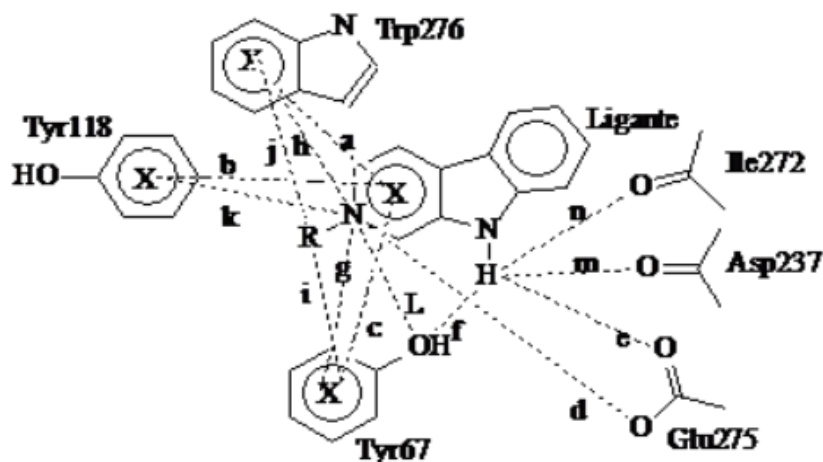


Figura 28. Complexo da estrutura **17c** (carbonos em laranja) no sítio periférico após otimização (carbonos em verde) sobreposta com o sítio vazio (carbonos em ciano). Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho e átomo de S em amarelo; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.

A Tabela 17 mostra interações de empilhamento π da estrutura **17c** com os aminoácidos Tyr118 e Trp276 e interação de empilhamento T com o aminoácido Tyr118; como o anel piridínico também está positivamente carregado, também há uma parcela de interações cátion- π com os mesmos aminoácidos (a estrutura **17e** não possui essas interações e a estrutura **17** possui somente empilhamento π com os aminoácidos Tyr67 e Trp276) e ligação hidrogênio com o aminoácido Glu275. Já a estrutura **17e** faz ligações hidrogênio com os aminoácidos Tyr67, Ile272 e Asp237 e interação π do grupo alila com o aminoácido Trp276 (estrutura **17** não possui essas interações), essa interação hidrofílica está contribuindo para um ΔH_{int} mais negativo, tendo maior importância que as interações hidrofóbicas da estrutura **17**. Por apresentarem interações mais efetivas, as estruturas **17c** e **17e** possuem um Δ_{int} mais negativo, sendo o ligante **17c** o mais efetivo, devido ao maior número de interações da estrutura com o sítio e interações mais

efetivas e com menores distâncias entre os aminoácidos e o ligante, conforme descrito na Tabela 17.

Tabela 17. Distâncias de interações observadas entre a AChE e a harmana e alguns de seus derivados selecionados, após otimização estrutural.



Estrutura	Distâncias (em Å)													
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	L	m	n
17	4,14	3,90	3,30	4,53	-	3,64	-	-	-	-	-	-	-	-
17c	3,34	4,48	2,89	-	2,40	-	3,79	3,48	-	-	4,89	-	-	-
17e	-	-	-	-	-	-	-	-	4,30	3,69	-	4,23	2,45	4,63

4.2.2 Interações dos compostos mesoiônicos com a AChE de *Torpedo californica*

Os mesmos procedimentos foram feitos para os compostos mesoiônicos, em relação ao sítio da enzima TcAChE.

O melhor complexo ACh/TcAChE foi selecionado para o *docking* com os compostos mesoiônicos. A análise das estruturas obtidas mostrou que o processo de *docking* foi capaz de acomodar todos os compostos mesoiônicos dentro da enzima juntamente com a molécula de substrato, resultando em complexos ternários estáveis.

A análise das estruturas obtidas pelo *docking* mostrou que os ligantes se apresentaram dentro da TcAChE na mesma região do sítio periférico. Todas as

moléculas estão com o grupo benzodioxola paralelo ao resíduo Trp276, algumas estruturas mais próximas e outras mais distantes, devido à variação na quantidade de carbonos do grupo R₁ e a saturação dos mesmos; com isso, as moléculas possuem interações diferenciadas umas das outras. O grupo fenilamino está no canal da enzima, como pode ser observado na Figura 29.

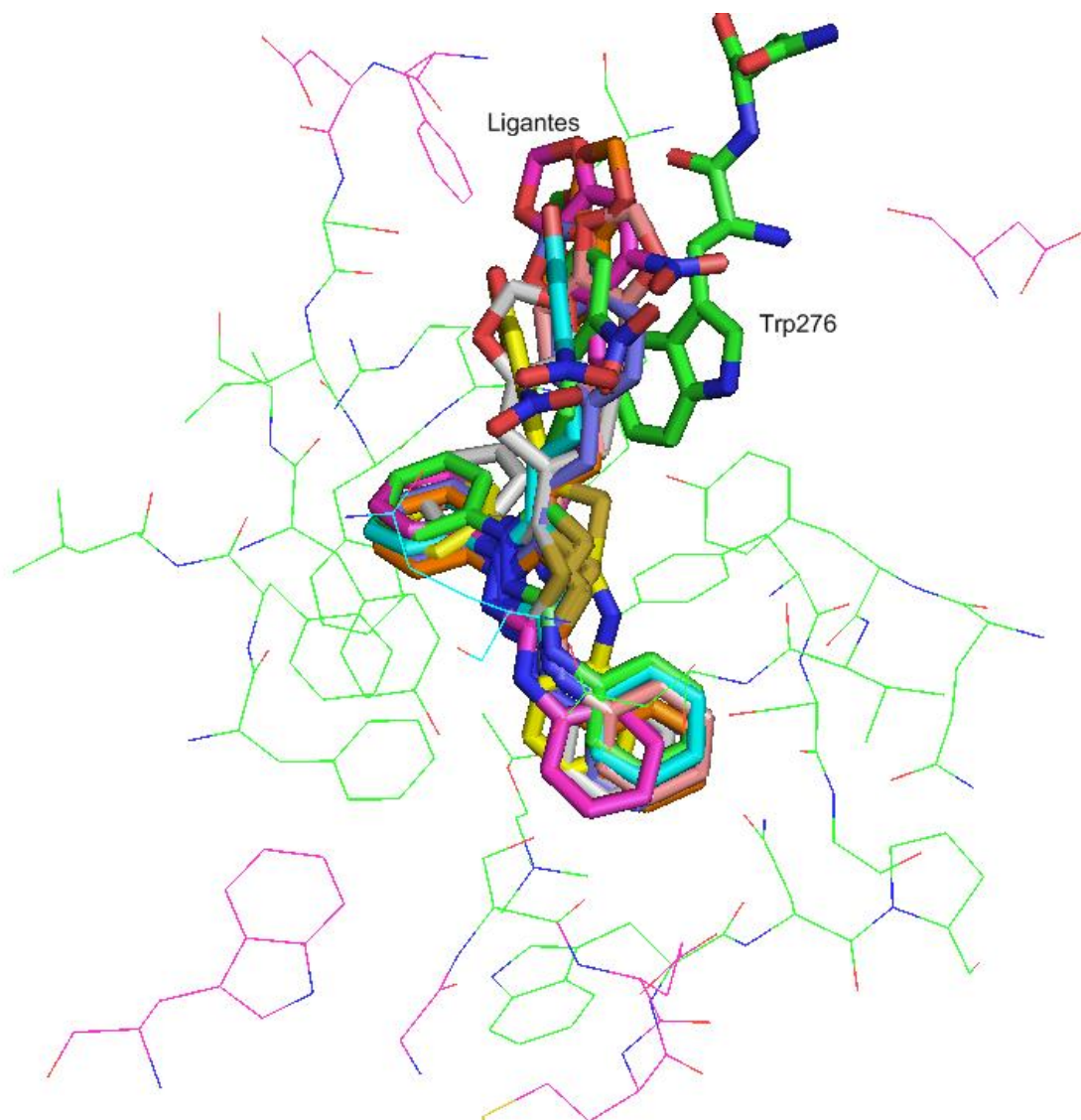


Figura 29. Compostos mesoiônicos no sítio periférico da TcAChE. Carbonos em laranja, **18a**, em azul, **18b**, em branco, **18c**, em rosa claro, **18d**, em amarelo, **18e**, em magenta, **18f**, em ciano, **18g** e, em verde, **18h**. Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho e átomo de S em amarelo; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.

Conforme descrito para os derivados da harmana, as geometrias de interação obtidas por *docking* molecular para os compostos mesoiônicos foram reotimizadas com

o método de orbital molecular semi-empírico a fim de se obterem as entalpias de interação (ΔH_{int}). Durante este procedimento, como os átomos das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos e dos ligantes foram deixados livres, ocorreram acomodações nas geometrias que otimizaram a energia de interação. Todas as estruturas dos complexos foram submetidas a otimizações de geometria com o método semi-empírico PM6 (ΔH^{PM6}) para a determinação da entalpia de interação (tabela 7).

Análise dos resultados obtidos pelo método semi-empírico que levou ao melhor modelo de previsão de $\log IC_{50}$ (eq. 29), PM6, mostra diferenças significativas entre os modos de interação da estrutura **18e** e dos derivados com melhores valores de ΔH_{int} , **18b** e **18d** no complexo TcAChE/acetilcolina (figura 30). Os derivados **18b** e **18d** possuem estruturas com tamanhos parecidos e seus grupos metilenodioxílicos estão mais para fora do sítio periférico, fazendo interações muito semelhantes com os aminoácidos do canal e do sítio periférico, como ligações hidrogênio com o resíduo de aminoácido Tyr118 e interação cátion- π com o grupo amônio quaternário da acetilcolina, além de uma interação carga-carga entre o átomo de N positivo da acetilcolina e o N exocíclico negativo dos ligantes; Além disso, a estrutura parece encaixada entre as nuvens π do grupo carboxilato do resíduo Asp69 e do anel aromático de Tyr331, formando interações que podem ser classificadas como dipolo-dipolo induzido. O derivado **18e** possui dois carbonos metilênicos a menos diminuindo o tamanho da estrutura e um grupo nitro ligado em *orto* ao anel benzodioxola, o qual não participa de nenhuma interação direta. O derivado **18e** faz algumas interações semelhantes aos compostos **18b** e **18d**, como ligações hidrogênio com o resíduo Tyr118 e interação cátion- π com o grupo amônio quaternário da acetilcolina, e interações diferentes, como interação com o resíduo Tyr67 e ligação hidrogênio com o resíduo Gln71; no entanto, não há a interação carga-carga. Todas as interações discutidas podem ser visualizadas na Figura 29 e estão detalhadas na Tabela 18.

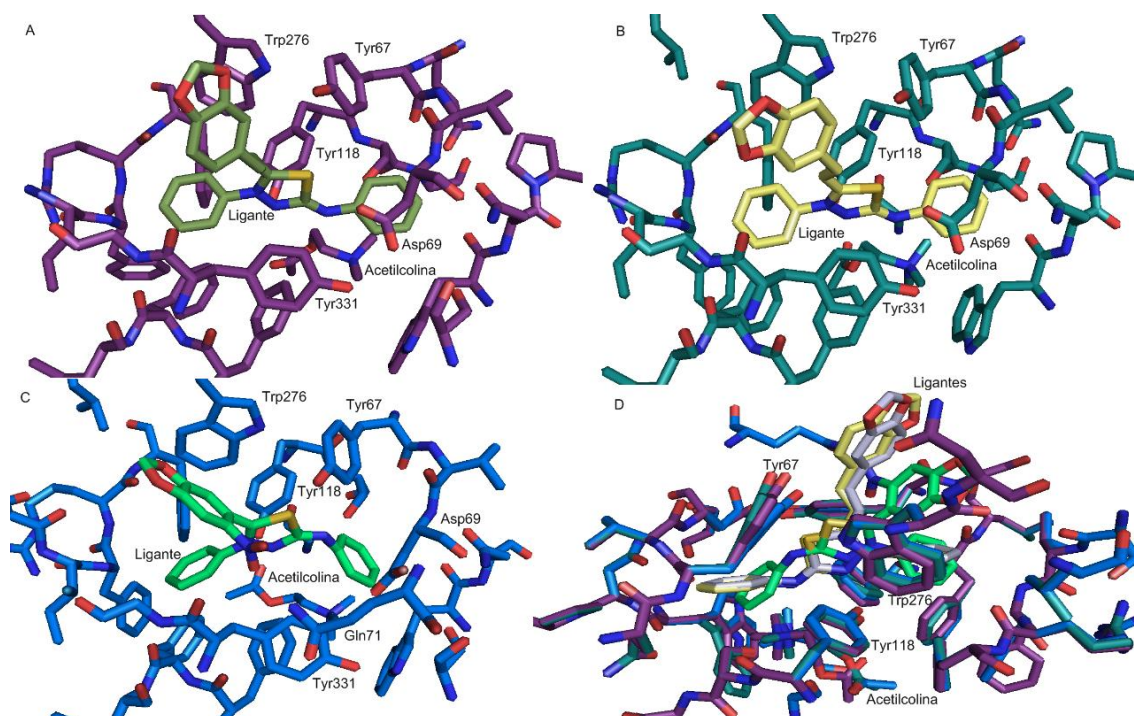
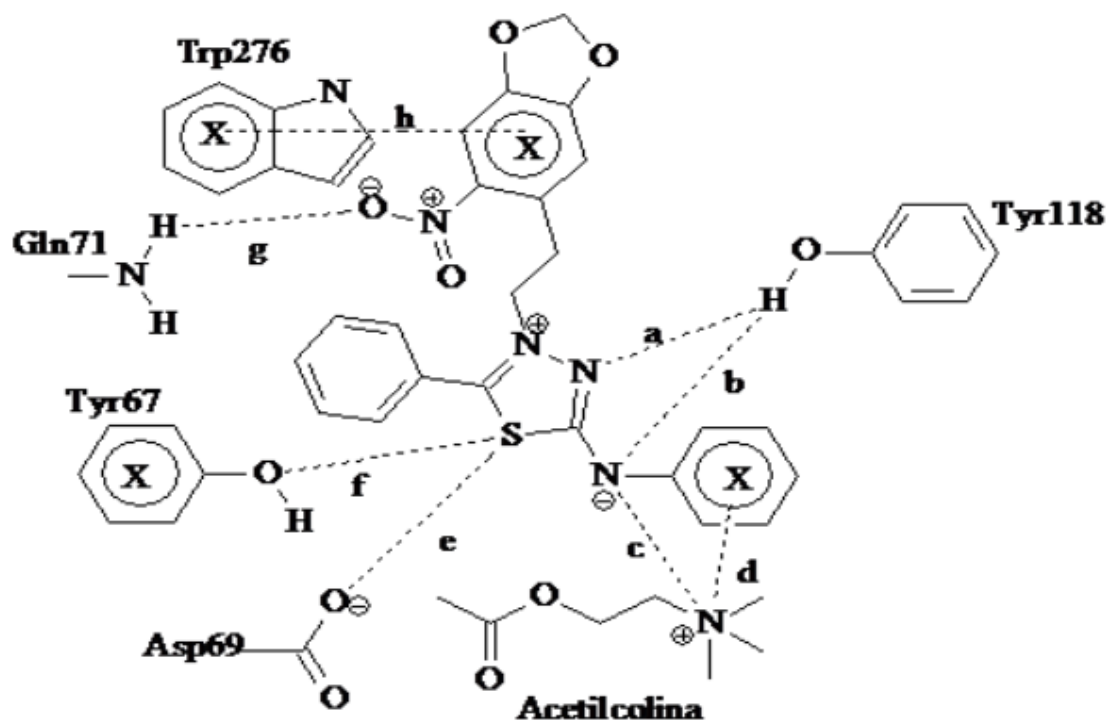


Figura 30. (A) complexo da estrutura **18b** (carbonos em verde oliva) com a AChE (carbonos em violeta); (B) complexo da estrutura **18d** (carbonos em amarelo claro) com a AChE (carbonos em ciano escuro); (C) complexo da estrutura **18e** (carbonos em verde claro) com a AChE (carbonos em azul claro); (D) três complexos sobrepostos juntos. Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho e átomo de S em amarelo; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.

Tabela 18. Distâncias de interações com a AChE observadas para os derivados compostos mesoiônicos com melhores entalpias de interação.



Estrutura	Distâncias (em Å)								
	a	b	c	d	e	f	g	h	
18b	1,98	3,01	3,77	4,04	3,25	-	-	-	
18d	2,07	2,84	4,02	3,79	3,67	-	-	-	
18e	2,11	3,35	6,66	3,98	-	2,41	2,45	3,80	

Os resultados da Tabela 7 mostram que a reação é entalpicamente desfavorável (ΔH_r positivo) para praticamente todas as estruturas. Ao contrário dos derivados da harmana, os compostos mesoiônicos são moléculas com carga total nula, o que sugere que os valores de ΔH_r bastante negativos obtidos para os derivados da harmana são resultado em grande parte de polarizações das nuvens eletrônicas dos resíduos de aminoácidos na direção dos ligantes, o que os estabiliza por efeito de campo. É importante lembrar que, de acordo com o ciclo termodinâmico proposto por Wang e

colaboradores (apresentado no Item 4.1), o termo ΔH_r é medido para uma reação em fase gasosa, o que torna muito mais importante o efeito de campo na estabilização de espécies carregadas. Esta participação de efeitos de campo na estabilização de ligantes carregados positivamente não é inesperada, visto que o próprio substrato enzimático tem carga positiva. Desde o sítio periférico até o sítio catalítico há uma grande quantidade de resíduos aromáticos, que têm nuvens π facilmente polarizáveis e capazes de atuar de modo muito efetivo no estabelecimento do efeito de campo.

Sobrepondo-se os sítios vazios com os sítios dos compostos mesoiônicos otimizados, observou-se apenas pequenos deslocamentos das cadeias laterais dos resíduos Tyr67, Asp69, Ser78, Trp81, Trp276, Leu279, Phe285, Phe287, Phe327, Phe328, Tyr331, Trp429 e do substrato acetilcolina. Todas as estruturas movimentaram praticamente os mesmos aminoácidos, como está exemplificado na figura 31 para a estrutura **18d**.

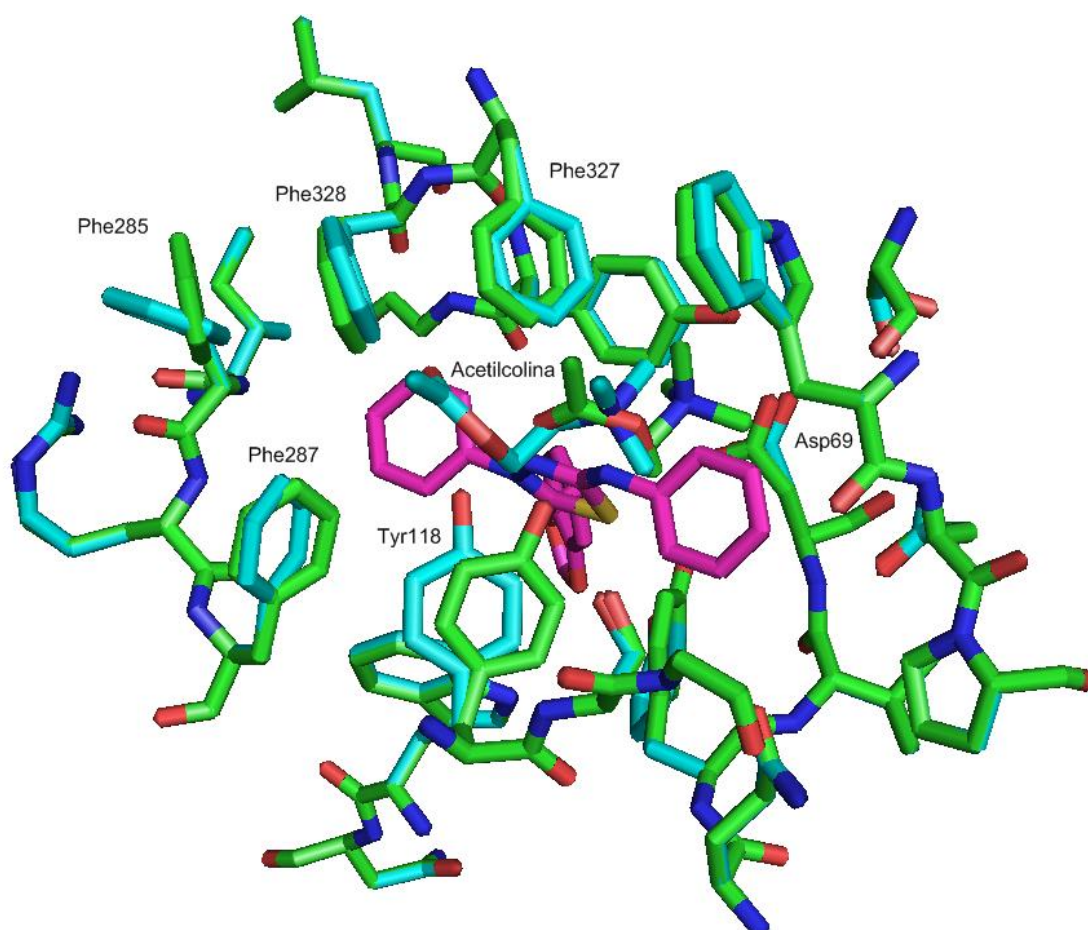


Figura 31. Estrutura **18d** (carbonos em magenta) no sítio periférico após otimização (carbonos em ciano) sobreposta com o sítio vazio (carbonos em verde). Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.

4.2.3 Interações das β -carbolinas com a AChE de *Torpedo californica*

Os mesmos procedimentos foram feitos para as β -carbolinas, em relação ao sítio da enzima TcAChE. Análise dos resultados *docking* molecular mostrou que todos as vinte β -carbolinas ocupam posições semelhantes na enzima. As estruturas planares estão envolvidos em interações π com resíduos aromáticos do subsítio catalítico (Trp81 e Phe327) e com um resíduo aromático do subsítio periférico (Trp276). Os mesmos resíduos estabelecerem interações muito semelhantes com a tacrina no seu co-cristal com TcAChE (Harel *et al.*, 1993) e também com um dos fragmentos de tacrina de um dímero da tacrina em outro co-cristal (Rydberg *et al.*, 2006). Isso sugere que a geometria da interação predita pela função *Chemscore* para os complexos entre as β -carbolinas e a TcAChE está correta. As descrições das estruturas **20i**, **22** e **26** estão representadas na Figura 32.

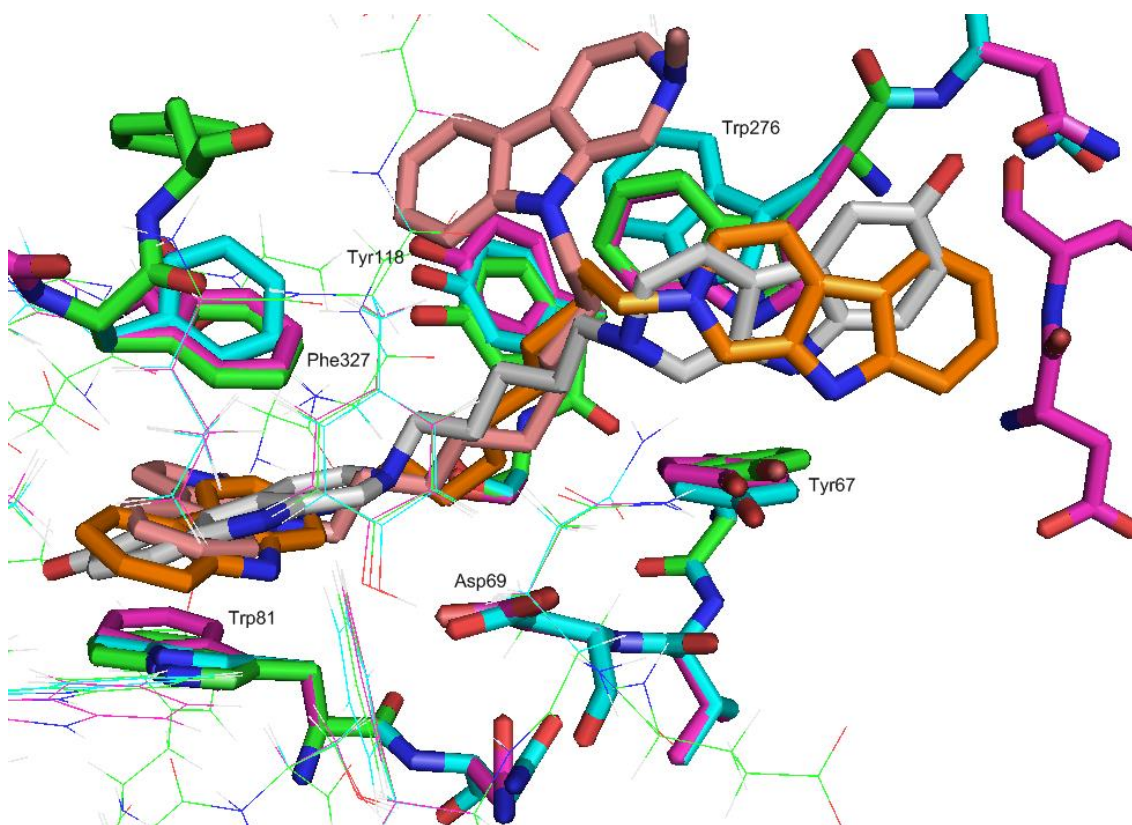


Figura 32. Exemplos de interações de β -carbolinas nos sítios catalítico e periférico da TcAChE após *docking* com a função *Chemscore*. Carbonos em magenta, **20i** (ligante em abobora), carbonos em ciano **22** (ligante em branco gelo), carbonos em verde **26**

(ligante em rosa). Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.

Todas as estruturas dos complexos foram submetidas a otimizações de geometria com os métodos semi-empíricos PM6 (ΔH^{PM6}) e RM1 (ΔH^{RM1}) para a determinação da entalpia de interação (Tabela 10). Como ocorreu com a série dos derivados da harmana, as β -carbolinas, que são espécies catiônicas, são previstas interagir muito favoravelmente com a AChE pelos métodos semi-empíricos, de acordo com os cálculos das entalpias de interação em fase gasosa.

Os resultados do melhor modelo, obtido com o método semi-empírico PM6, mostram diferenças significativas entre os valores de ΔH_{int} das estruturas. Selecionamos para análise mais detalhada as estruturas dos complexos de **20e**, **20i**, **22** e **26** com a TcAChE (Figura 33). As estruturas têm variação na quantidade de carbonos no espaçador que liga as duas carbolinas, fazendo as moléculas variarem no tamanho e no modo de interação.

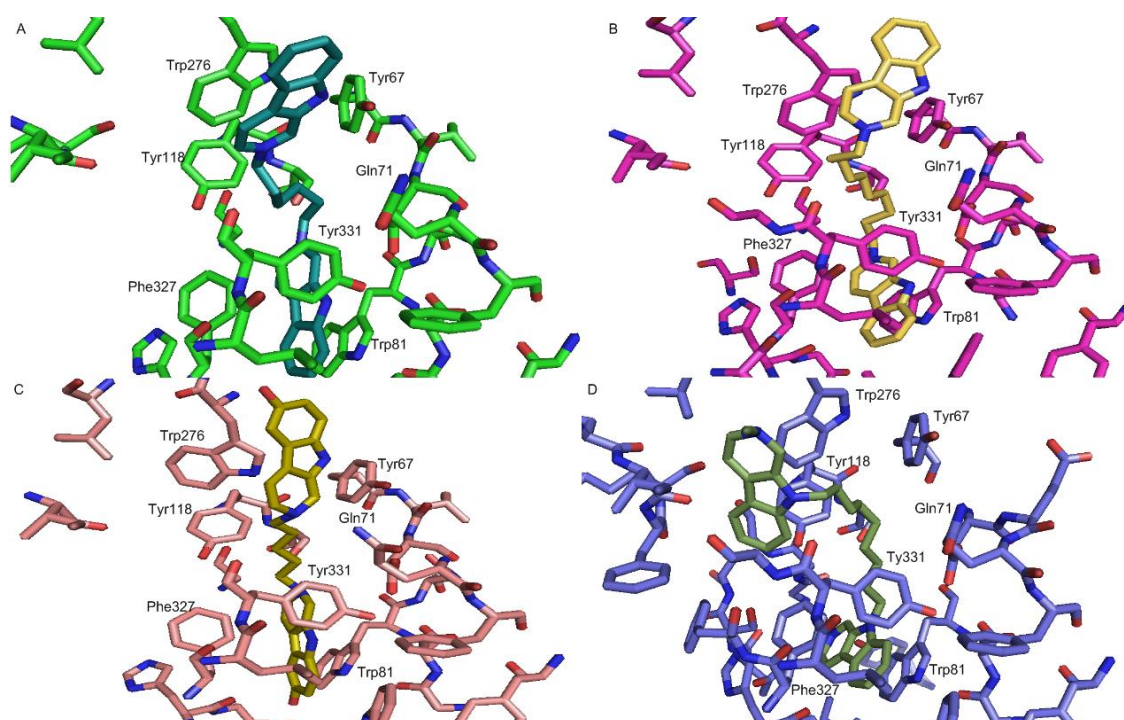
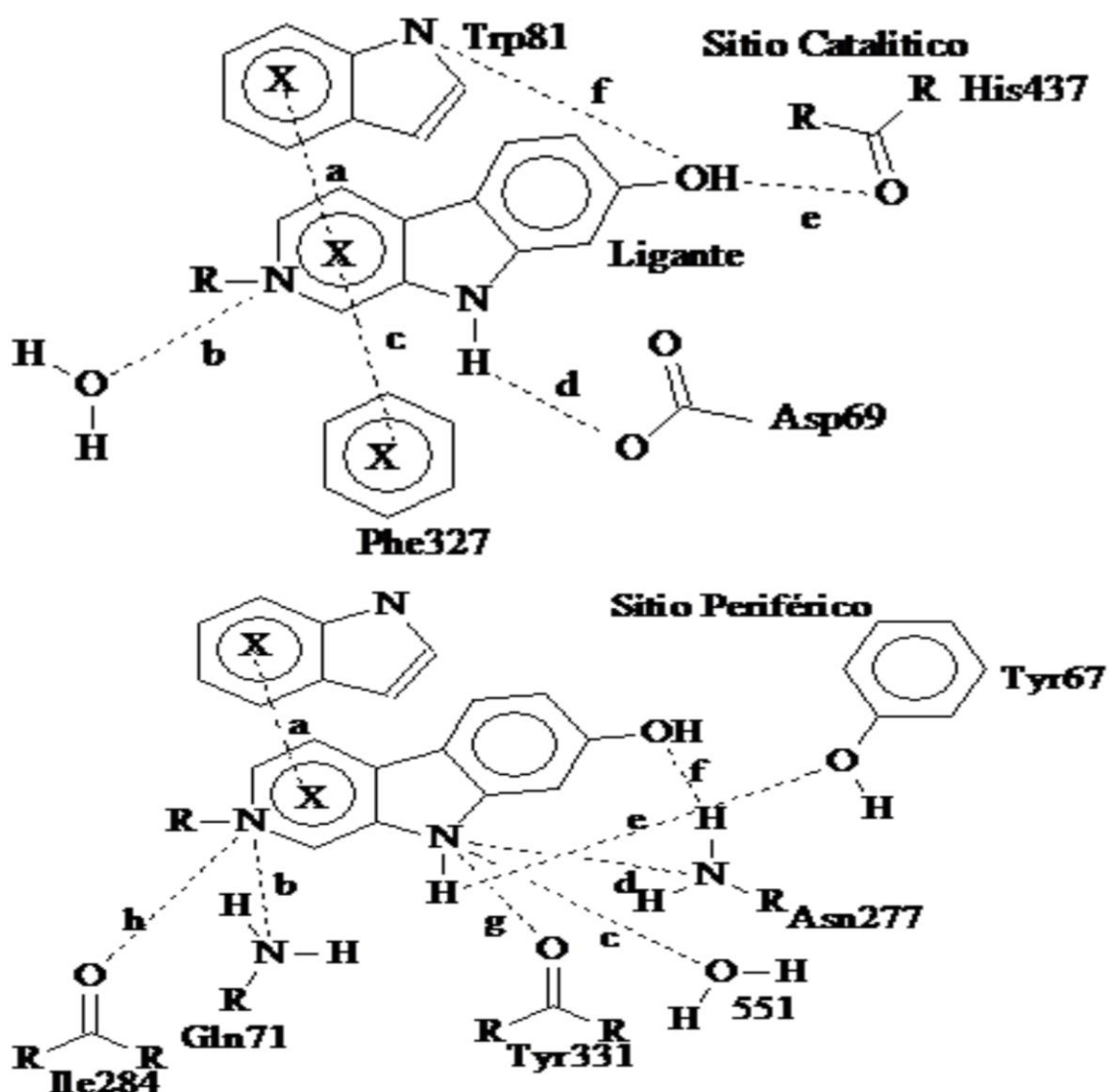


Figura 33. (A) complexo da estrutura **20e** (carbonos em ciano) com a AChE (carbonos em verde); (B) complexo da estrutura **20i** (carbonos em amarelo) com a AChE

(carbonos em magenta); (C) complexo da estrutura **22** (carbonos em amarelo) com a AChE (carbonos em rosa claro); (D) complexo da estrutura **26** (carbonos em verde oliva) com a AChE (carbonos em azul claro). Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho e átomo de S em amarelo; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.

Tabela 19. Distâncias de interações observadas no sítio catalítico e no sítio periférico nos complexos selecionados das β -carbolicinas com a AChE de *Torpedo californica*.



Estruturas	Distâncias (em Å)							
	a	b	c	d	e	f		
Sítio catalítico								
20e	3,95	2,69	4,03	3,20	-	-	-	-
20i	3,85	2,48	3,73	3,11	-	-	-	-
22	3,62	3,50	3,67	4,13	2,41	2,65	-	-
26	3,67	3,70	3,67	-	-	-	-	-
Sítio periférico	a	b	c	d	e	f	g	h
20e	4,26	-	3,03	-	1,80	-	-	-
20i	4,32	-	2,53	-	2,37	-	-	-
22	-	3,66	3,57	-	2,58	2,50	-	-
26	-	-	-	-	-	-	3,68	4,67

Análise das estruturas mostra que os quatro ligantes estão localizados da forma semelhante no sítio catalítico da enzima, fazendo interação de empilhamento π com o resíduo aromático Trp81 e de empilhamento T com o resíduo aromático Phe327. Como o nitrogênio piridínico é positivamente carregado, a interação com Trp81 também pode ser classificada como cátion- π . Os nitrogênios piridínico e pirrólico estão fazendo interações com os aminoácidos Asp69, Trp81, Tyr331, His437 e também com H₂O554. Observa-se que a estrutura **22**, a que apresenta ΔH_{int} mais favorável, faz duas interações no sítio catalítico, ausentes nas demais estruturas, uma com o resíduo Trp81 (carga-dipolo) e outra com o resíduo His437 (ligação hidrogênio); no sítio periférico há outras duas interações ausentes nas demais, uma com o resíduo Gln71 (carga-dipolo) e outra com o resíduo Asn77 (ligação hidrogênio). Já a estrutura **20i**, com o segundo ΔH_{int} mais favorável, possui maior efetividade nas suas interações com os aminoácidos Asp69, Trp81, Phe 327 e H₂O no sítio catalítico (em comparação a estrutura **20e**, e possui uma interação diferenciada com o aminoácido Asp69 que a estrutura **26** não possui).

Sobrepondo-se o sítio vazio com o sítio com a β -carbolina bivalente otimizada **20e**, observou-se apenas pequenos deslocamentos das cadeias laterais dos resíduos de

aminoácidos. No entanto, as outras estruturas causaram maiores modificações nas posições das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos Tyr67, Asp69, Gln71, Phe72, Phe75, Trp81, Asn82, Tyr118, Tyr127, Glu196, Asn277, Trp276, Arg286, Phe327, Phe328, His437 e Tyr439 após a otimização. Os deslocamentos estão exemplificados na Figura 34 para a estrutura **22**.

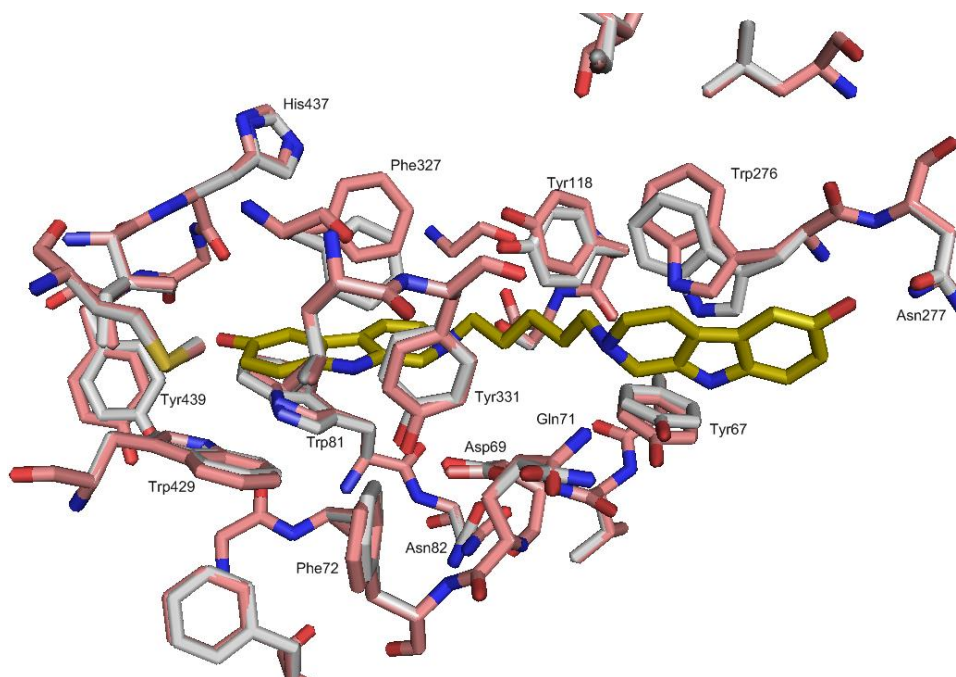


Figura 34. Estruturas otimizadas dos sítios catalítico e periférico da TcAChE: carbonos em branco, o sítio vazio e, em rosa claro, o complexo TcAChE-**22**. Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.

4.2.4 Interações das β -carbolinas com a AChE de *Aedes aegypti*

Os mesmos procedimentos foram feitos para as β -carbolinas em relação ao sítio da enzima AaAChE. Analisando-se os resultados de *docking* molecular observa-se que todas as β -carbolinas ocupam posições semelhantes nos sítios da enzima. As estruturas planares estão envolvidas em interações de empilhamento π com resíduos aromáticos do subsítio catalítico "aniônico" (Trp80 e Tyr324) e interações de empilhamento π e T com um resíduo aromático do sítio periférico (Trp276). Conforme dito antes, os resíduos equivalentes em TcAChE estabelecem interações muito semelhantes com a tacrina (Harel *et al.*, 1993) e também com um dos fragmentos de tacrina de um dímero da tacrina (Rydberg *et al.*, 2006). Isso sugere que as geometrias da interação previstas pela função *ChemScore* para os complexos β -carbolinas-AaAChE estão corretas. As

descrições das estruturas para alguns ligantes selecionados estão representadas na Figura 35.

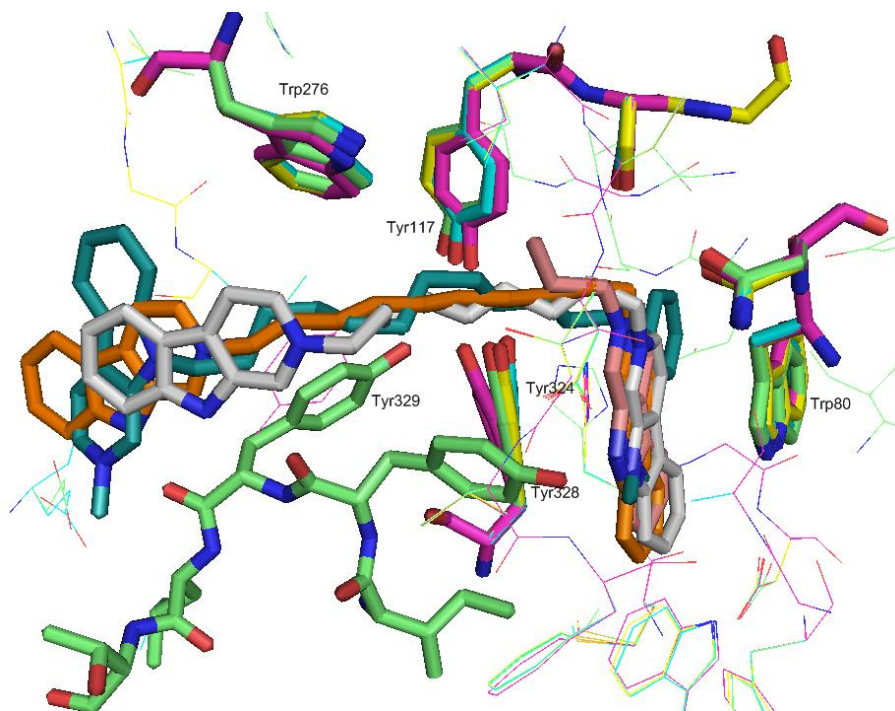


Figura 35. β -carbólinas nos sítios catalítico e periférico de AaAChE, após *docking* com a função *ChemScore*. Carbonos em magenta, **19** (ligante em salmão), carbonos em ciano, **20i** (ligante em laranja), carbonos em amarelo, **20h** (ligante em branco gelo), e, carbonos em verde claro, **25c** (ligante em azul claro). Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.

Todas as estruturas dos complexos foram submetidas a otimizações de geometria com o método semi-empírico RM1 (ΔH^{RM1}) para a determinação da entalpia de interação (Tabela 13). Pode ser observado nos resultados semi-empíricos que a enzima é prevista interagir favoravelmente com todas as β -carbólinas catiônicas, em concordância com o observado para os derivados da harmana neutras e para as β -carbólinas catiônicas na TcAChE.

Os resultados mostram diferenças significativas entre os valores de ΔH_{int} das estruturas. Selecionamos para análise mais detalhada as estruturas dos complexos com os compostos **19**, **20h**, **20i** e **25c** com a AaAChE, representados na Figura 36 e descritos na Tabela 19.

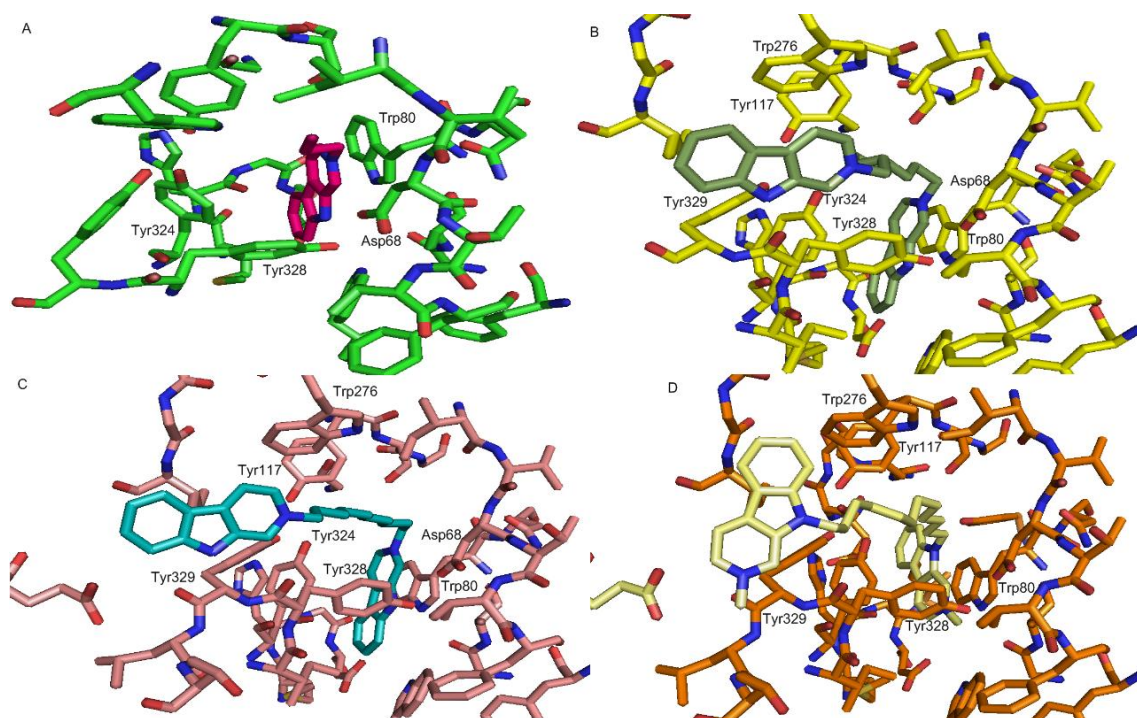
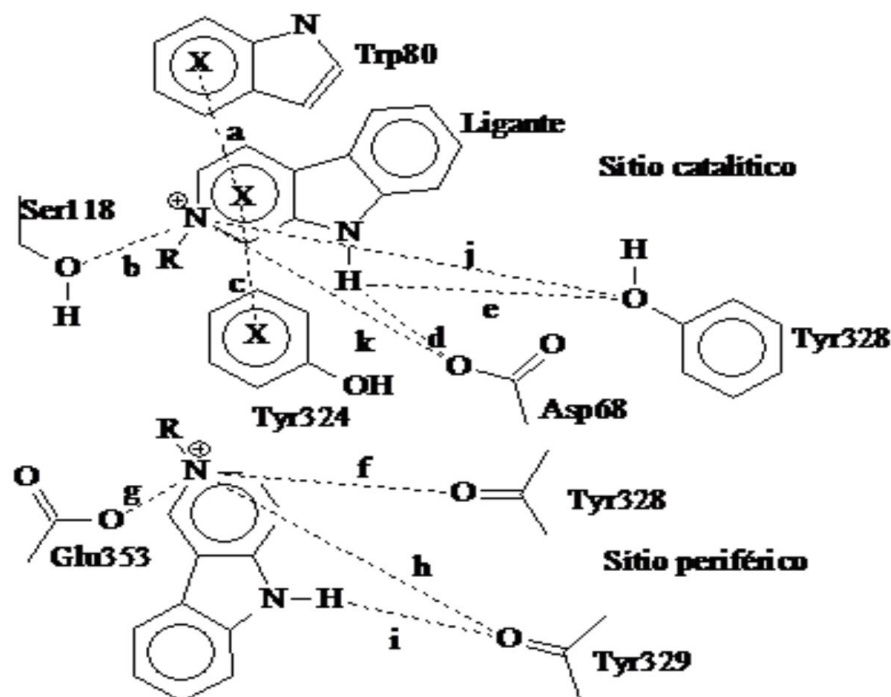


Figura 36. (A) Complexo da estrutura **19** (carbonos em magenta) com a AChE (carbonos em verde); (B) complexo da estrutura **20h** (carbonos em verde oliva) com a AChE (carbonos em amarelo); (C) complexo da estrutura **20i** (carbonos em ciano) com a AChE (carbonos em rosa claro); (D) complexo da estrutura **25c** (carbonos em amarelo claro) com a AChE (carbonos em laranja). Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho e átomo de S em amarelo; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.

Tabela 20. Distâncias de interações observadas no sítio catalítico (SC) e no sítio periférico (SP) nos complexos de algumas β -carbolinas com a AChE de *Aedes aegypti* após otimização com o método RM1.



Estruturas	Distâncias (em Å)										
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k
SC											
19	3,61	4,48	4,43	1,68	1,71	-	-	-	-	-	3,78
20h	3,43	4,87	4,15	4,01	2,53	-	-	-	-	-	4,43
20i	3,62	4,62	4,15	3,10	1,67	-	-	-	-	-	4,60
25c	3,90	-	4,13	-	-	-	-	-	-	3,98	4,85
SP											
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20h	-	-	-	-	-	2,43	-	-	-	-	-
20i	-	-	-	-	-	4,25	-	-	2,43	-	-
25c	-	-	-	-	-	-	3,61	2,79	-	-	-

As quatro estruturas possuem interações do tipo empilhamento no sítio catalítico semelhantes, enquanto as interações no sítio periférico são bastante diferentes. Apesar da diferença de tamanho, as β -carbolinas **19**, **20h**, **20i** e **25c** têm duas interações em comum: empilhamento π com o resíduo aromático Trp80 e empilhamento T com o

resíduo aromático Tyr324. Como o nitrogênio piridínico é positivamente carregado, a interação com Trp80 também pode ser classificada como cátion- π . Os nitrogênios piridínico e pirrólico da unidade β -carbolínica inserida no sítio catalítico estão fazendo outras interações com os resíduos de aminoácidos do canal Asp68, Ser118, Tyr324 e Tyr328, enquanto os da unidade β -carbolínica, inserida no sítio periférico interagem com Tyr328 (cadeia polipeptídica), Tyr329 e Glu353.

A estrutura **19** não possui interação no sítio periférico por não ter as duas unidades β -carbolínicas, enquanto as outras três estruturas possuem interações diversificadas neste sítio, como pode ser observado na Tabela 19 (distâncias f, g, h, i). A estrutura que apresenta ΔH_{int} mais favorável, **25c**, possui duas interações importantes no sítio periférico: uma carga-carga com o aminoácido Glu353 e uma carga-dipolo com o aminoácido Tyr329; no sítio catalítico, possui outra interação carga-dipolo com o aminoácido Tyr328, outras estruturas (**19**, **20h** e **20i**) não possuem essas interações. Estrutura **20i** possui uma interação diferente em relação às demais, uma ligação hidrogênio com o aminoácido Tyr329.

Sobrepondo-se o sítio vazio com o sítio contendo a β -carbolina **19**, observou-se apenas pequenos deslocamentos das cadeias laterais dos resíduos Asp68, Trp80, Asn81, Tyr324, Tyr329, Trp427 e Met434. No entanto, as outras estruturas causaram maiores modificações nas posições das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos Ile66, Asp68, Phe 71, Phe72, Trp80, Asn81, Tyr117, Ser118, Glu194, Leu279, Tyr324, Tyr329, Leu 330, Glu353, Trp427, Met434, His435 e Asp437 após a otimização. Os deslocamentos estão exemplificados na Figura 37 para a estrutura **20i**.

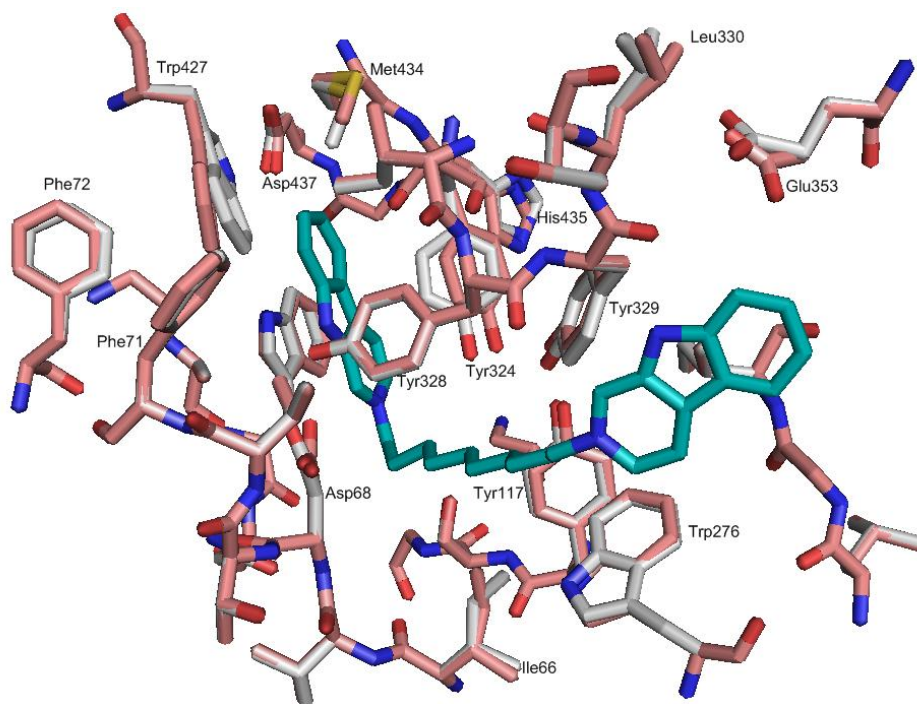


Figura 37. Estruturas otimizadas dos sítios catalítico e periférico da TcAChE: carbonos em branco, sítio vazio e, em rosa claro, o complexo AaAChE-**20i**. Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.

4.3 Planejamento Racional de Novas Estruturas Buscando Melhorias na Atividade

Propomos duas estruturas inéditas, depois da análise dos resultados obtidos com as estruturas sintetizadas pelo grupo do Prof. Marco Edilson F. Lima (UFRRJ). Foram propostas possíveis substituições nas estruturas para uma melhor interação entre o ligante e a enzima, buscando melhorar a atividade biológica prevista. Na Figura 38 estão as moléculas modificadas.

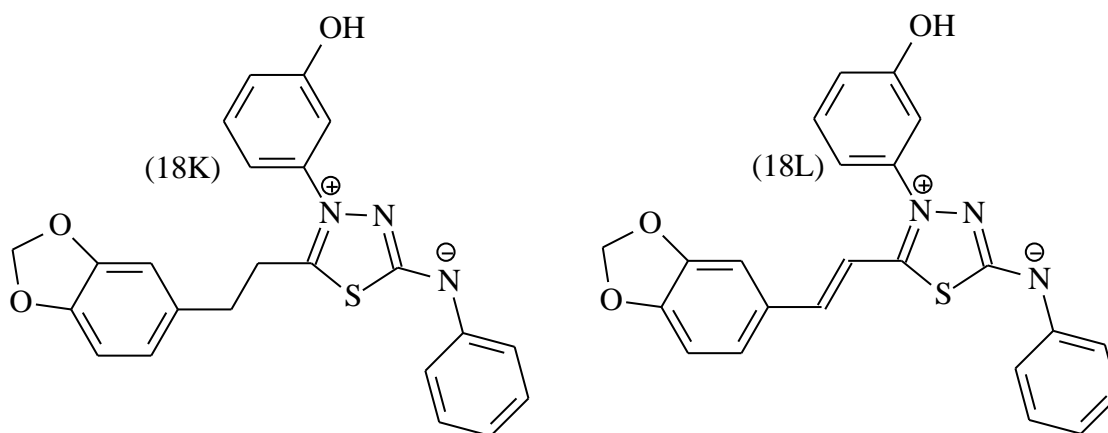


Figura 38. Estruturas dos derivados mesoiônicos propostos **18K** e **18L**.

As estruturas estudadas anteriormente dos complexos entre a AChE e inibidores foram editadas para se fazer as modificações necessárias, sendo, em seguida, reotimizadas com o método semi-empírico PM6. Na tabela 21 abaixo estão os resultados de entalpia de interação (ΔH_{int}), número de ligações rotacioáveis (N_{LR}) e entalpia de solvatação (ΔH_{solv}).

Tabela 21. Valores de entalpia de interação pelos métodos PM6 (kcal/mol), número de ligações rotacionáveis (N_{LR}) e entalpia de solvatação (ΔH_{solv} , kcal/mol).

Estrutura	ΔH^{PM6} ^a	N_{LR} ^b	ΔH_{solv} ^c
18K	-15,65	6	-25,00
18L	7,81	5	-23,00

$$^a \Delta H_{int} = \Delta H_{EI} - (\Delta H_E + \Delta H_I).$$

^b Determinado pela análise da estrutura otimizada.

^c Entalpia de solvatação pelo método COSMO.

Os resultados da tabela 21 foram aplicados na equação 29, devido aos ligantes serem de uma única classe. Os resultados de entalpia de interação, números de ligações rotacionáveis e entalpia de solvatação dos derivados modificados dos mesoiônicos **18K** e **18L** foram adicionados à Equação 29 para calcular o $\log IC_{50}$ na inibição de TcAChE. Os resultados obtidos pela equação estão na tabela 22.

Tabela 22. Valores de $\log IC_{50}$ teóricos calculados pelas equações 29.

Estrutura	$\log IC_{50}^a$	$\log IC_{50}^b$
18K	-1,27	1,76
18L	0,28	1,04

^a $\log IC_{50}$ calculado para moléculas modificadas (eq. 29); IC_{50} correspondente em μM .

^b $\log IC_{50}$ experimental para moléculas que serviram de base para fazer as modificações (**18d** e **18b**, respectivamente).

4.3.1 Resultados dos mesoiônicos propostos

A análise dos resultados dos mesoiônicos modificados **18K** e **18L** mostra que houve uma redução de $\log IC_{50}$, em comparação com o $\log IC_{50}$ das estruturas que serviram de base para os novos compostos modificados, **18b** e **18d**, possuindo assim uma maior atividade prevista.

O melhor modelo de previsão de $\log IC_{50}$ dos mesoiônicos (eq. 29), baseado no método PM6, indica pequenas diferenças entre os modos de inibição das estruturas **18K** e **18L**, no complexo TcAChE/acetilcolina. As estruturas **18K** e **18L** possuem uma hidroxila na posição *meta* no grupo fenila ligado ao nitrogênio do anel central. A estrutura **18L** possui dois carbonos sp^2 no espaçador, dando menor flexibilidade à estrutura. Essas mudanças fazem importantes diferenças na intensidade das interações com os aminoácidos Tyr118, Asp69, Asn82 e com a ACh, como está demonstrado através dos valores de ΔH_{int} na tabela 20. Na figura 39 estão as estruturas dos complexos com os novos mesoiônicos otimizados e na tabela 23 as distâncias das principais interações.

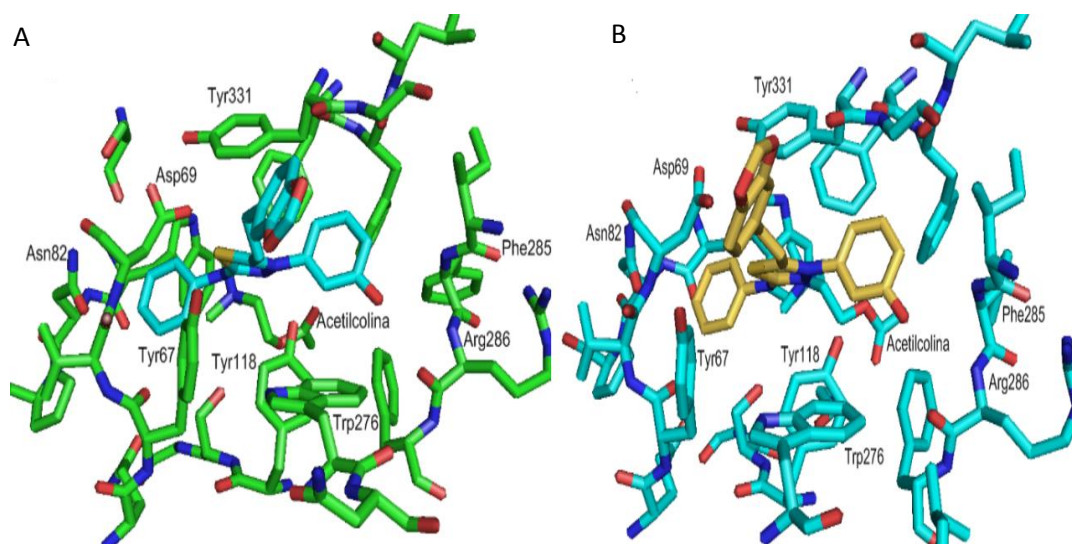
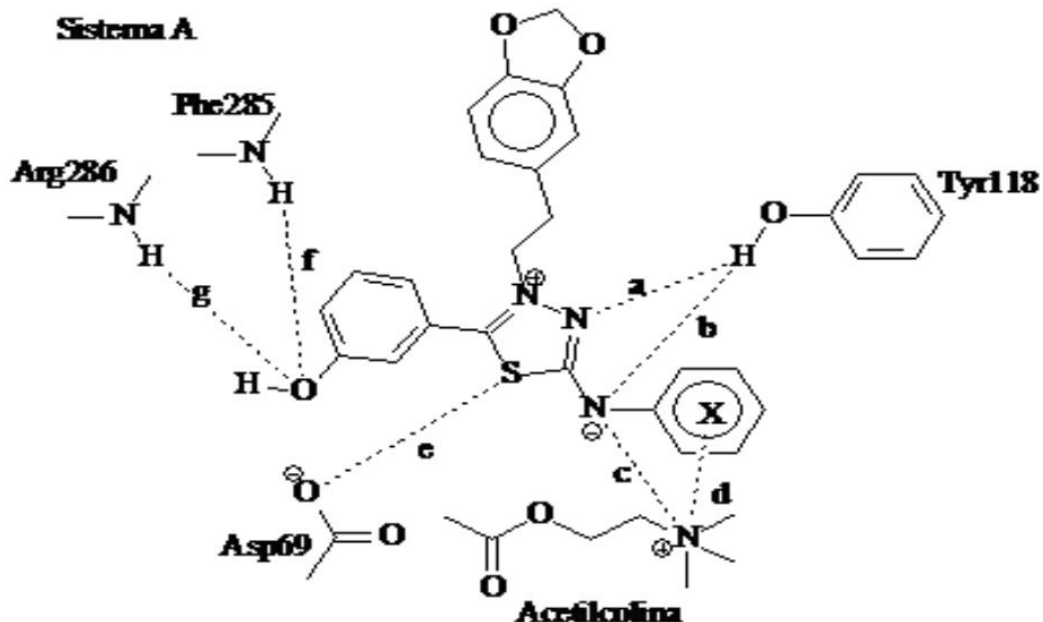


Figura 39. (A) complexo da estrutura **18K** (carbonos em azul) com a AChE (carbonos em verde claro); (B) complexo da estrutura **18L** (carbonos em amarelo) com a AChE (carbonos em azul). Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho e átomo de S em amarelo; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.

Tabela 23. Distâncias de interações observadas para os mesoiônicos **18K** e **18L**.



Estrutura	Distâncias (em Å)						
	a	b	c	d	e	f	g
18L	1,92	3,09	3,74	3,94	3,25	3,28	2,98
18K	1,85	3,01	3,71	3,88	2,13	2,63	2,70

A Tabela 21 mostra que a estrutura **18K** possui o valor de ΔH_{int} mais favorável do que seu análogo com o espaçador rígido **18L**, respectivamente, o que indica que a maior flexibilidade da primeira permite que as interações com os resíduos de aminoácidos se estabeleçam de modo mais efetivo, conforme confirmado pelos valores na tabela 23. As interações em geral são mais efetivas para a estrutura **18K**, inclusive interação de um dos nitrogênios do anel heterocíclico central e do nitrogênio exocíclico negativo com Tyr118 parecem mais efetivas (mais curtas) com a estrutura **18K**, assim como a interação carga-carga entre o nitrogênio exocíclico (negativo) e o grupo amônio quaternário do substrato.

Sobrepondo os complexos otimizados contendo as estruturas propostas e as estruturas originais a partir do qual se originaram as propostas, observam-se somente pequenos deslocamentos entre os ligantes e alguns aminoácidos, mostrando que a melhora nos valores de ΔH_{int} se deve a um acréscimo de interações com os aminoácidos. Essas pequenas diferenças podem ser observadas na figura 40.

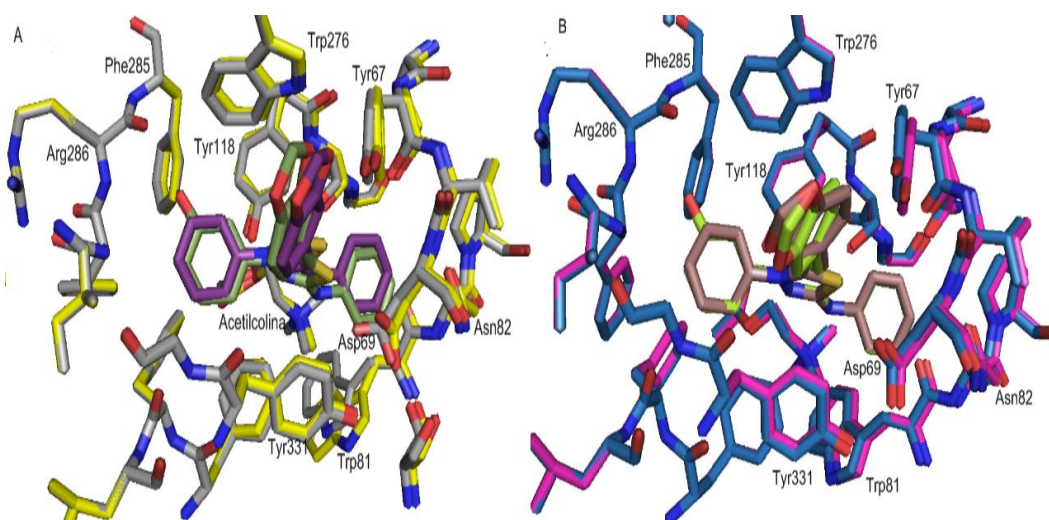


Figura 40. (A) complexo entre a estrutura **18d** (carbonos em violeta) com a AChE (carbonos em amarelo) sobreposto com o complexo entre a estrutura **18K** (carbonos em

verde oliva) com a AChE (carbonos em cinza); (B) complexo entre a estrutura **18b** (carbonos em marrom) com a AChE (carbonos em magenta) sobreposto com o complexo entre a estrutura **18L** (carbonos em verde claro) com a AChE (carbonos em azul). Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho e átomo de S em amarelo; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.

Analisando os resultados das interações através dos dados de entalpia de interação e da entalpia de solvatação, observa-se que as trocas dos hidrogênios por hidroxilas na posição *meta* nos anéis aromáticos (compostos **18K** e **18L**) tiveram o efeito esperado, criando novas interações, tornando-as mais efetivas com os aminoácidos e também deixando as moléculas mais solúveis em ambiente aquoso. Esses termos contribuíram para reduzir o valor de $\log IC_{50}$, ou seja, para elevar a atividade. Dos mesoiônicos propostos, a estrutura **18K** é prevista como o inibidor de AChE mais promissor.

5. CONCLUSÕES

5.1 Em relação a enzima AChE de *Torpedo californica*

Na primeira parte do trabalho foi feito estudo com a enzima TcAChE, realizado pelo *docking* com o método Chemscore seguido de cálculos com os métodos semi-empíricos PM6 e RM1, que demonstraram serem ferramentas adequadas para a otimização dos complexos TcChE-inibidor, levando a uma boa descrição dos aspectos estéreo-eletrônicos envolvidos na interação dos complexos formados contendo diferentes classes de ligantes: β -carbolinas bivalentes, mesoiônicos e derivados da harmana.

O estudo mostrou que a entalpia de interação não é o única ferramenta importante a se considerar no planejamento de novos inibidores da TcAChE. A energia livre de solvatação e as perdas entrópicas devidas às restrições conformacionais dos inibidores também são importantes fatores associados com o processo de inibição, uma vez que, quando estes parâmetros foram considerados em uma única equação, foi possível obter modelos que correlacionaram bem os dados de atividades experimentais

com aqueles que foram calculados, o que pode funcionar para orientar a síntese de novos inibidores.

As equações de predição propostas neste trabalho podem ser bastante úteis para quantificar a atividade de compostos que apresentam semelhanças estruturais. Para compostos com diferenças estruturais maiores, ela pode fornecer uma previsão relativa entre quais compostos serão mais ou menos ativos.

Em relação à TcAChE, foi possível encontrar três boas equações com também boas correlações uma para cada classe de compostos, que pudessem de forma adequada determinar a inibição, através dos descritores de energia. Para os derivados da harmana a equação 27, para os mesoiônicos a equação 29 e para as β -carbolinas bivalentes a equação 31.

A partir da análise das estruturas dos complexos obtidos com os mesoiônicos e das equações de previsão de atividade correspondentes, foram propostos dois protótipos neste trabalho, estruturas **18K** e **18L**, e suas atividades foram previstas. As duas moléculas **18K** e **18L** foram previstas como mais ativas que as moléculas anteriores (que deram origem aos protótipos), indicando que as modificações foram adequadas.

5.2 Em relação a enzima AChE de *Aedes aegypti*

Na segunda parte do trabalho foi feito estudo com a enzima AaAChE, onde foi criado um modelo para esta enzima, que apresentou boa qualidade, sendo a estrutura adequada para estudo de desenvolvimento de novos ligantes. Os mesmos procedimentos foram utilizados anteriormente para os cálculos dos termos de energia foram aplicados com sucesso para as β -carbolinas bivalentes.

Também para esta enzima foi possível encontrar uma equação com uma boa correlação com as atividades de β -carbolinas bivalentes, que pode de forma adequada determinar a inibição através dos descritores de energia (equação 33).

6. BIBLIOGRAFIA

AJAY; MURCKO, M. A. Computational Methods to Predict Binding Free Energy in Ligand-Receptor Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 38, pp.4953-4967, 1995.

ATKINS, P. W. & PAULA, J. Físico-Química. 7ªed, Vol. 2. Rio de Janeiro: editor, LTC 2004, 620p.

ARNOLD, K. The Swiss-model workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Struct. Bioinf.*, v.22, pp.195-201, 2006.

BARON, R.L. Carbamate Insecticides. In: Hayes, W.R., Laws, E.R.. *Handbook of Pesticide Toxicology*. San Diego, California, USA. Academic Press, Inc. v. 3, pp.1125-1190, 1991.

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDER, T. "Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics.*, v. 27, pp. 343-350, 2011.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYVER, L. *Bioquímica*. 6º Edição. Guanabara Koogan, 2008. ISBN: 8527713691.

BIRKS, J.; HARVEY, R. J. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. v. 1, pp. 1190, 2006.

BORDOLI, L. Protein structure homology modeling using Swiss-model workspace. *Nat. Protoc.* v. 4, pp.1-13, 2009.

BROOIJMENS N. & KUNTZ I. D. Molecular recognition and docking algorithms. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, v. 32, pp.335-373, 2003.

BROOKS, C. L. *et al.* A theoretical perspective of dynamics, structure, and thermodynamics. *Advances in chemical physics*; John Wiley: New York, 1988; v. LXXI.

CACABELOS, R.; TAKEDA, M.; WINBLAD, B. The glutamatergic system and neurodegeneration in dementia: preventive strategies in Alzheimers disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. v. 14, pp. 3-47, 1999.

CAMPOS, L.S. *Entender a Bioquímica*. 2º Edição. Lisboa: Escolar Editora, 1999. ISBN: 972-592-108-9.

- CARAMELLI, P.; CHAVES, M. L. F.; Engelhardt E, *et al.* Effects of galantamine on attention and memory in Alzheimers disease measured by computerized neuropsychological tests: results of the Brazilian Multi-Center galantamine study (GALBRA-01). *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. v. 62, pp. 379-384, 2004.
- CARLIER, P. R.; HAN, Y. F.; CHOW, E. S.; LI, C. P.; WANG, H.; LIEU, T. X.; WONG, H. S.; PANG, Y. P. Evaluation of short-tether bis-THA AChE inhibitors. A further test of the dual binding site hypothesis. *Bioorg. Med. Chem.* v. 7, pp. 351-357, 1999.
- CARLSON, H. A. Protein flexibility and drug desing: how to hit a moving target. *Corrent Opinion in Chemical Biology*. vol. 6. pp. 447-452, 2002.
- CARLSON, H. A. & McCAMMON, J. A. Accommodating protein flexibility in computacional drug desing. *Molecular Pharmacology*. v. 57. pp. 213-218, 2000.
- CASIDA, J. E. e QUISTAD, G. B. Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants. *Chemico-Biological Interactions, U.S.A*, v. 157–158, pp. 277–283, 2005.
- CASTRO, A. T. Estudo por modelagem molecular da reativação da acetilcolinesterase inibida por agentes químicos neurológicos. 121 f. Dissertação (mestrado em área envolvida) – IME, Rio de Janeiro, 2002.
- CHOTIA, C. & LESK, A. M. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *The EMBO Journal*. v. 5, pp. 823-826, 1986.
- COSTA FILHO, P. A. da & POPPI, R. J. Algoritmo genético em química. *Química Nova*. v. 3, pp. 405-411, 1999.
- CYGLER, M.; SCHRAG, I.D.; SUSSMAN, J.L.; HAREL, M., SILMAN, I.; GENTRY, M.K.; DOSTOR, B.P. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Science*. v. 2, pp. 366-382, 1993.
- Dewar, M. J. S.; Thiel, W. Ground state of molecules. 38. The MNDO Method. Approximations and Parameters. *J. Am. Chemical Soc.* v. 99, pp. 4899-4907, 1997-a.
- Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. AM1: A new general purpose quantum mechanical model. *J. Am Chem Soc.* v. 107, pp. 3902 – 3909, 1985.
- DEWAR, M. J. S.; JIE, C. & YU, J. SAM1; The first of a new series of general purpose quantum mechanical molecular models. *Tetrahedron*. v. 49, pp. 5003-5038, 1993.
- DOWNEY, D. Pharmacologic management of Alzheimer Diseases. *Journal of Neuroscience Nursing*. v. 40, n.1, pp. 55-59, 2008.
- ELDRIDGE, M. D.; MURRAY, C. W. J.; AUTON, T. R.; PAOLINI, G.V. & MEL, R. P. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function

to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexos. *Journal of computer-aided molecular design*. v. 11, pp. 425-445, 1997.

ELHANANY, E.; ORDENTLICH, A.; DGANY, O.; KAPLAN, D.; SEGALL, Y.; BARAK, R.; VELLAN, B.; SHAFFERMAN, A. Resolving pathways of interaction of covalent inhibitors with the active site of acetylcholinesterases: MALDI-TOF/MS analysis of various nerve agent phosphyl adducts. *Chemical Research in Toxicology*. v. 14, pp. 912-918, 2001.

FAN, P.; HAY, A.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K., Acetylcholinesterase-Inhibitory Activity of Linarin from *Buddleja davidii*, Structure-Activity Relationships of Related Flavonoids, and Chemical Investigation of *Buddleja nitida*. *Pharmaceutical Biology*. v. 46, pp. 596-601, 2008.

FARLOW, M. R. Effective pharmacologic management of Alzheimer's disease. *American Journal of Medicine*. v. 120, pp. 388-397, 2007.

FORD, M. Insecticides and Pesticides. In Viccellio, P. Handbook of Medical Toxicology, 1a ed. USA. Little, Brown and Company. p. 303-314, 1993.

FORLENZA, O.V. Tratamento farmacológico da doença de alzheimer. *Rev. Psiq. Clin.* v. 32, pp. 137-148, 2005.

GIACOBINE, E. In: Giacobin, E. (ed.), Cholinesterases and cholinesterase inhibitors. pp. 181-226, 2000.

GOHLKE, H.; & KEBLE, G. Approaches to description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angewandte chemie International edition*. v. 41, pp. 2644-2676, 2002.

GOODFORD, P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *Journal of medicinal chemistry*. v. 28, pp. 849-847, 1985.

GOODMAN, J. L.; PAGEL, M. D. & STONE, M. J. Relationships between favorable protein structure and dynamis from a database of NMR-derived backbone order parameters. *Journal of molecular biology*. v. 265, pp. 963-978, 2000.

GREIG, N. H.; UTSUKI, T.; INGRAM, D. K. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer beta-amyloid peptide in rodent. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America*. v. 102, pp. 17413-17418, 2005.

GROOT, B. L.; GRUBMULLER, H. Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GLPF. *Science*. v. 294, pp. 2353-2357, 2001.

VAN GUNSTEREN, W.; BILLETER, S.; EISING, A.; HUNENBERG, P.; KRUGER, P.; MARK, A.; SCOTT, W.; TIRONI, I. Biomolecular simulayions: the cromos manual and user guide. VDF Hochschulverlag ETH, Zurich, 1994.

- HAASS, C.; SCHLOSSMACHER, M. G.; HUNG, A. Y.; VIGO, C. P.; MELLON, A.; Ostaszewski, B. L.; Lieberburg, I.; Koo, E. H.; Schenk, D.; Teplow, D. B.; Selkoe, D. J. Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*. v. 359, pp. 322-325, 1992.
- HANSSON, T.; MARELIUS, J. & ÅQVIST, J. Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. v. 12, pp. 27–35, 1998.
- HALPERIN, I.; MA, B.; WOLISON, H.; NUSSINOV, R. Principles of docking: an overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Protein: Structure, function and genetics*. v. 47, pp. 409-443, 2002.
- HARDY, J.; ALLSOP, D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. v. 12, pp. 383-388, 1991.
- HAREL, M.; SCHALK, I.; EHRET-SABATIER, L.; BOUET, F.; GOELDNER, M.; HIRTH, C.; AXELSEN, P.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* v. 90, p. 9031-9035, 1993.
- HARTMANN, J.; KIEWERT, C.; DUYSSEN, E. G. Excessive hippocampal acetylcholine levels in acetylcholinesterase-deficient mice are moderated by butyrylcholinesterase activity. *Journal of Neurochemistry*. v. 100, pp. 1421-1429, 2007.
- HEHRE, W.J.; JIANGUO, Y.; KLUNZINGER, P.E.; LIANG, L. A brief guide to molecular mechanism and quantum chemical calculations. Wavefunction, Inc Editor, LTC, 1998.
- JEYARATNAM, J.; MARONI, M. Organophosphorous Compounds. *Toxicology*. v. 91, pp. 15-27, 1994.
- JENSEN, F. Introduction to computational chemistry. Chichester: John Wiley & Sons, pp. 429, 1999.
- Jones, G., Willett, P.; Glen, R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J. Mol. Biol.* v. 254, pp. 43-53, 1995.
- Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., Taylor R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *J. Mol. Biol.* v. 267, pp. 727-748, 1997.
- JUNOR, C. V.; BOLZONI, V. S.; FUREAN, M.; FRANCO, C. A. M.; BARRETO, E. J. *Química nova*. v. 27, pp. 655-660, 2004.
- KATALINIC, M.; KUSAK, G.; DOMACINOVIC, J.; SINKO, G.; JELIC, D.; ANTOLOVIC, R.; DOVARIK, Z. Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 45, pp. 186-192, 2010.
- KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews in drug discovery*. v. 3, pp. 935-949, 2004.

- KOLLMAN, P. Free Energy Calculations: Applications to Chemical and Biochemical Phenomena. *American Chemical Society*. v. 93, pp. 2395-2417, 1993.
- KUNTZ, I. D.; BLANEY, J. M.; OATLEY, S. J.; LANGRIDGE, R.; FERRIN, T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *Journal of Molecular biology*. v. 161, pp. 269-288, 1982.
- LEACH, A. R. Molecular Modeling Principles and Applications. 2. ed. Pearson Education, England, 2001.
- LEVIN, E. D., SIMON, B. B. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology*. v. 138, pp. 217-230, 1998.
- LIMA, J.S.; PEREIRA, R.H.B. Intoxicação por organofosforados: Análise crítica e considerações especiais. *Rev. Bras. de Ter. Int.* v. 8, pp. 100-101, 1996.
- MACHEMER, L. H.; PICKEL, M. Carbamates insecticides. *Toxicology*. v. 91, pp. 29-36, 1994.
- MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTE, L.; BON, S.; KREJCI, S.; VALLETTE, F. M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*. v. 41, pp. 31-91, 1993.
- MESULAM, M.M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*. v. 110, pp. 627-639, 2002.
- McCONKEY, B. J.; SOBOLEV, V.; EDELMAN, M. The performance of current methods in ligand-protein docking. *Current science*. v. 83, pp. 845-856, 2002.
- MIDIO, A. F.; SILVA, E.S. Inseticidas-Acaricidas – Organofosforados e Carbamatos. São Paulo, Ed. Roca Ltda, 1995.
- MILLARD, C. B. and BROOMFIELD, C. A. A Computer Model of Glycosylated Human Butyrylcholinesterase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 189, pp. 1280-1286, 1992.
- MUDHER, A.; LOVESTONE, S. Alzheimer's disease – do tauists and baptists finally shake hands? *Trends in Neurosciences*. v. 25, pp. 22-25, 2002.
- NACHMANSOHN, D.; ROTHENBERG, M. A. Studies on cholinesterase .1. On the specificity of the enzyme in nerve tissue. *Journal of Biological Chemistry*. v. 158, pp. 653-666, 1945.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. ; Lehninger Princípios de Bioquímica. 3º Edição. Editora Ltda, Brasil. 2002.
- NOREL, R. WOLFSON, H.; NUSSINOV, R. Small molecular recognition: Solid angles surface representation and shape complementarity combinatorial chemistry and high throughput screening. *Bioorg. Med. Chem*. v. 2, pp. 177-191, 1999.

OLIVEIRA, F. G. Molecular docking study and development of an empirical binding free energy model for phosphodiesterase 4 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* v.14, pp.6001-6011, 2006.

OLIVEIRA, F. G. Estudo do perfil de interação de fosfodiesterase 4 com seus inibidores. Dissertação de mestrado, IQ/UFRJ, 2005.

ORHAN, I.; KARTAL, M.; TOSUN, F.; SENER, B. Screening of Various Phenolic Acids and Flavonoid Derivatives for Their Anticholinesterase Potential. *Zeitschrift für Naturforschung.* v. 62, pp. 829-832, 2007.

PANG, Y.-P.; KOZIKOWSKI, A. Prediction of the binding sites of huperzine A in acetylcholinesterase by docking studies. *J. Computaied Mol. Des.* v. 8, pp. 669-681, 1994.

PANG, Y.-P.; QUIRAM, P.; JELACIC, T.; HONG, F.; BRIMIJOIN, S. Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* v. 271, pp. 23646-23649, 1996.

PANG, Y. P.; KOLLMEYER, T. M. ; HONG, F. ; LEE, J-C.; MAMMOND, P. I.; HAUGALO, K. S.; BRIMIJOIN, S. Rational design of alkylene-linked bispyridiniumalidoximes as improved acetylcholinesterase reactivators. *Chemistry & Biology.* v.10, pp. 491-502, 2003.

PENG, L. F. Acetylcholinesterase inhibition by territrem B derivatives. *Journal Natural Products.* v. 58, pp. 857-862, 1995.

PEOPLE, J. A.; SANTRY, D. P.; SEGAL, G. A. Approximate self-consistent molecular orbital theory. I. Invariant procedures. *Journal of chemical physics.* v. 43, pp. 129- 135, 1965.

PEOPLE, J. A.; SEGAL, G. A. Approximate self-consistent molecular orbital theory. II. Calculations with complete neglect of differential overlap. *Journal of chemical physics.* v. 43, pp. 136- 149, 1965.

PIAZZI, L.; CAVALLI, A.; BELLUTI, F.; BISI, A.; GOBBI, S.; BARTOLINI, M.; ANDRISANO, V.; RACANATINI, M.; RAMPA, A. Extensive SAR and computational Studies of 3-{4-[(Benzylmethylamino)methyl]phenyl}-6,7-dimethoxy-2H-2-hromenone (AP2238) Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry.* v. 50, pp. 4250-4254, 2007.

Pontes, R. J. S.; Regazzi, A. C.F.; Lima, J.W.O.; Kerr-Pontes, L.R.S. Efeito residual de apresentações comerciais dos larvicidas temefos e *Bacillus thuringiensis israelensis* sobre larvas de *Aedes aegypti* em recipientes com renovação de água. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* v. 38, pp. 316-321, 2005.

Ramachandran, G. N.; Sasisheharan, V.. Conformation of polypeptides and proteins. *Advances in Protein Chemistry.* v. 23, pp. 283-256, 1968.

RAUX, B. In computational biochemistry and biophysics. Eds. Becker. New York, 2001.

ROCHA, G. B. RM1: A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. *J. Compt. Chem.* v.27, pp.1101-1111, 2006.

ROGERS, S. L.; DOODY, R. S.; MOHS, R. C. Friedhoff LT and the Donepezil Study Group. Donepezil improves cognition and global function in Alzheimer disease: a 15-week, doubleblind doubleblind, placebo-controlled study. *Archives of Internal Medicine*. v. 158, pp. 1021-1031, 1998.

ROGERS, S.L.; Farlow M. R.; Mohs, R. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Neurology*. v. 50, pp.136-145, 1998.

ROOK, Y.; WINKELER, T.; SCHMIDTKE, K.; GAUBE, F.; SCHEPMANN, F.; WUNSCH, B.; HEILMANN, J.; LEHMANN, J. Bivalent β -carboline as potencial multitarget Anti-Alzheimer agents. *J. medicinal chemistry*. v. 53, pp. 3611-3617, 2010.

ROST, B. Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein engineering*. v. 12, pp. 85- 94, 1999.

Rydberg, E.H.; Brummstein, B.; Greenblatt, H.M.; Wong, D.M.; Shaya, D.; Williams, L.D.; Carlier, P.R.; Pang, Y-P.; Silman, I.; Sussman, J.L. Complexes of Alkylene-Linked Tacrine Dimers with *Torpedo californica* Acetylcholinesterase: Binding of Bis(5)-tacrine Produces a Dramatic Rearrangement in the Active-Site Gorge. *Journal of medicinal Chemistry*. v. 49 pp. 5491-5500, 2006.

SANTOS FILHO, O. A. & ALENCASTRO, R. B. Modelagem de Proteínas por Homologia. *Quim. Nova*. v. 26, pp. 253-259, 2003.

SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; DACOSTA, J.B.N.; CAXEIRO, J.M.R. Compostos Oroganofosforados Pentavalentes: Histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Quím. Nova*. v.30, pp. 159-179, 2007.

SAYLE, R. A.; Milner-White, E. J.. Rasmol: biomolecular graphics for all. *Trends in biochemical sciences*. v. 20, pp. 374-376, 1995.

SCHWEDE, T. Swiss-model: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*. v.31, pp.3381-3385, 2003.

SEARLE, M. S. Partitioning of free energy contributions in the estimations of binding constants: residual motions and consequence for amide-amide hydrogen bond strengths. *J. Am. Chem. Soc.* v.114, pp.10697-10704, 1992.

SEARLE, M. S. WILLIAMS D. H. The cost of conformational order: entropy changes in molecular associations. *J. Am. Chem. Soc.* v.114, pp.10690-10697, 1992.

SHIMIZU, K. Estudo do método de equalização da eletronegatividade no cálculo de energias livres de solvatação – GBEEM – ELR. 2005. Tese de doutorado – USP, São Paulo, 2005.

SILVA, G. R. Estudo da reativação da acetilcolinesterase inibida por organofosforados: análise conformacional da molécula de HI-6 e simulação da reação de desfosforilação. 2005. Dissertação (mestrado em área envolvida) – IME, Rio de Janeiro, 2005.

SOREQ, H.; BEN-AZIZ, R.; PRODY, C.A.; SEIDMAN, S.; GNATT, A.; NEVILLE, L.; LIEMAN-HURWITZ, J.; LEV-LEHMAN, E.; GINZBERG, D.; LIPIDOT-LIFSON,

Y. Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G + C-rich attenuating structure. *Proceedings of the Nacional Academy of Science*. v. 87, pp. 9688-9692, 1990.

SRINIVASAN, J. Continuum solvent studies of the stability of DNA, RNA, and hosphoramidate—DNAhelices. *J. Am. Chem. Soc.* v.120, pp.9401-9409, 1998.

Stewart, J.J.P. Optimisation of parameters for semi-empirical methodsI. method. *J Comput. Chem.* v. 10, pp. 209-220, 1989-a.

Stewart, J.J.P. Optimisation of parameters for semi-empirical methods II. Applications. *J Comput. Chem.* v. 10, pp. 221-264, 1989-b.

Stewart, J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Model.* v. 13, pp.1173–1213, 2007.

SCHUMACHER, M.; CAMP, S.; MAULET, Y.; NEWTON, M.; MACPHEEQUIGLEY, K.; TAYLOR, S.S.; FRIEDMAN, T.; TAYLOR, P. Primary structures of *Torpedo-californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature*. Vol. 319, p. 407-409, 1986.

Thiel, W.; Voityuk, A.A. Extension of MNDO to d orbitals: Parameters and results for Silicon. *J Molecular Structure (Theochem)*. v. 313, pp. 141-154,1994.

TOMASI, J.; MENNUCCI, B. & CAMMI, R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chemical reviews*. v 105, pp. 2999-3094, 2005.

TORRES, J. M.; LIRA, A. F.; SILVA, D. R.; GUSSO, L. M.; SANT'ANNA, C. M. R.; KUMMERLE, A. E.; RUMJANEK, V. M. Structure insights into cholinesterases inhibition by harmane beta-carbolinium derivatives: A kinetics molecular modeling approach. *Phytochemistry*. v. 81, pp. 24-30, 2012.

TORRES, J. M. Estudo cinético da atividade anticolinesterásica de derivados β -carbonílicos do produto natural harmana. Dissertação de mestrado UFRRJ, 2011.

RUHLAR, D. G.; STORER, J. W.; GIESEN, D. J.; CRAMER, C. J. *J. comput. Aided mol. Des.* v. 9, pp. 87-110, 1995.

VIEGAS, C. J.; DA SILVA, V. B.; FURLAN, M.; ALBERTO, C. M. F.; BARREIRO, E. J. Produtos Naturais como candidados a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. *Química Nova*. v. 27, p. 655-660, 2004.

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHOM, M. J.; MURRAY, C. W. & TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Protein*. v. 52, pp. 609-623, 2003.

WALDEMAR, G.; DUBOIS, B.; EMER, M. The Category Cued Recall test in very mild Alzheimer's disease: discriminative validity and correlation with semantic memory functions. *European Journal of Neurology*. v. 14, pp. 102-108, 2007.

WANG, S.; MILNE, G. W. A.; NICKLAUS, M. C.; MARQUEZ, V. E.; LEE, J.; BLUMBERG, P. M. Protein kinase C modeling of the binding site and prediction of binding constants. *Journal of medicinal chemistry*. v. 37, pp. 1326-1338, 1994.

WILLIAMS, D. H. WESTWELL, M. S. Aspects of weak interactions. *Chemical Society Reviews*. v. 27, pp. 57-63, 1998.