

Desenhos de Novos Compostos com Potencial Atividade Biológica

Ricardo Gargano, Alexandre A. N. Paula, Luiz A. S. Romeiro, Érica C. M. Nascimento, Alessandra S. Kiametis, Maria L. Santos, Newton G. Castro, Luciana C. Nascente & João B. L. Martins

Neste trabalho apresentamos um estudo sobre novos candidatos a inibidores da enzima acetilcolinesterase obtidos a partir dos lipídeos fenólicos não-isoprenóides do líquido da casca da castanha de caju (*Anacardium occidentale*). Foram investigados, através do cálculo de estrutura eletrônica, Padrões de Estruturas Moleculares (PEM) composto por 15 moléculas derivadas do cardanol (PEM2) com os grupos substituintes O-metila, O-acetila, O-(N,N-dimetilcarbamoya), N,N-dimetilamina, N,N-dietylamina, pirrolidina, piperidina e N-benzilamina em seu carbono benzílico. As propriedades eletrônicas, tais como energias (HOMO, LUMO, HOMO-1, LUMO+1 e derivados), distribuições de cargas (anel benzênico, oxigênio 56, carbono 11, nitrogênio das aminas secundárias, entre outras), foram obtidas usando os níveis de cálculos RHF e B3LYP com os conjuntos de funções de base 6-31G, 6-31G(d), 6-31+G(d), 6-311G(d,p) 6-311G(2d,p) e 6-311+G(2d,p). Os resultados obtidos revelam que os derivados do PEM2, formadas com as substituições acetila, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilamina e pirrolidina, são as estruturas que mais se correlacionam com o fármaco amplamente utilizado como inibidor da acetilcolinesterase contra a doença de Alzheimer (rivastigmina).

Palavras-chave: *Inibidores da Acetilcolinesterase, Analise de Componentes Principais, Doença de Alzheimer, Cardanol.*

In this work, we have studied new potential candidates of acetylcholinesterase (AChE) inhibitors designed from cardanol, a non-isoprenoid phenolic lipid of cashew *Anacardium occidentale* nutshell liquid. From electronic structure calculations, we investigated fifteen molecules derivative from cardanol (PEM2) with the methyl, acetyl, O-(N,N-dimethylcarbamoyl), N,N-dimethylamine, N,N-diethylamine, piperidine, pyrrolidine, and N,N-methylbenzylamine substitute groups. Electronic properties such as energies (HOMO, LUMO, HOMO-1, LUMO+1 and derivatives) and charge distributions (charge of aromatic ring, charge of C₁₁, charge of O₅₆, and charge of nitrogen), were performed using both Restricted-Hartree-Fock and B3LYP methods with the following basis sets: 6-31G, 6-31G(d), 6-31+G(d), 6-311G(d,p) 6-311G(2d,p) and 6-311+G(2d,p). The obtained results show that PEM2 derivatives (formed with acetyl, O-(N,N-dimethylcarbamoyl), N,N-dimethylamine and pyrrolidine groups) are the structures that were better correlated to and represent possible AChE inhibitors against Alzheimer disease.

Palavras-chave: *Acetylcholinesterase Inhibitors, Principal Component Analysis, Alzheimer Disease, Cardanol.*

Introdução

O aumento da expectativa de vida da população brasileira nas últimas décadas tem contribuído para maior prevalência no diagnóstico de casos da doença de Alzheimer (DA), considerada a principal causa de demência entre pessoas de faixa etária acima dos 65 anos de idade (com faixas de 50% a 60% dos casos)¹ (forma esporádica) e até mesmo em pessoas mais jovens, de forma precoce de 40 anos. Sua natureza crônica e progressiva e compromete gravemente a qualidade de vida dos portadores. Com a evolução da doença, há um declínio cognitivo contínuo, instalando-se múltiplas perturbações, incluindo memória, atenção, aprendizado, pensamento, orientação, compreensão, cálculo, linguagem e julgamento. O comprometimento dessas funções vem normalmente acompanhado, e ocasionalmente precedido, por deterioração do controle emocional e comportamento social.

A demência interfere nas atividades do dia-a-dia do paciente, tais como: atividades fisiológicas, vestimenta, alimentação e higiene pessoal entre outras. A DA também compromete gravemente a relação do paciente com a família, pois muitas vezes o paciente não reconhece seus familiares, que acaba por ser uma das causas de abandono e transferência destes pacientes para asilos de idosos. Segundo dados de projeção do IBGE para o período de 1980-2050², o Brasil possuirá cerca de 18,6 milhões de pessoas em 2009 com mais de 60 anos de idade. Estimativas de 2001³ mostram que 4,6% da população com mais de 60 anos de idade da América Latina apresentam casos de demência onde particularmente a partir dos 75 anos, taxas bastante expressivas de até 36,7% tem sido encontradas³. Estima-se que 2% a 4% da população com mais de 65 anos apresentem DA, aumentando drasticamente com a idade a partir dos 75 anos^{1,3,4}.

Do ponto de vista histopatológico, a DA consiste em um distúrbio neurodegenerativo caracterizado pela presença de placas senis, acúmulos esféricos da proteína beta amilóide⁵, apresentando atrofia e degeneração dos neurônios colinérgicos subcorticais, principalmente aqueles na parte basal do prosencéfalo (núcleo basal de Meynert), que conferem ineração colinérgica a todo córtex cerebral⁵⁻⁸.

Bioquimicamente, a DA é uma patologia decorrente da redução dos níveis de acetilcolina (ACh) no processo

sináptico, diminuição da neurotransmissão colinérgica cortical e, em menor extensão, a diminuição de outros neurotransmissores como noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato e substância P^{9,10}. A hipótese colinérgica¹¹⁻¹³ é a teoria bioquímica mais aceita mundialmente e a primeira forma racional de tratamento, para esta neuropatologia. Ela consiste na restauração do nível do neurotransmissor ACh encontrado em baixas concentrações no cérebro de pacientes portadores da DA. Esta restauração pode ser feita através da inibição reversível das colinesterase, acetilcolinesterase (AChE) e butilcolinesterase (BChE), enzimas que naturalmente catabolizam a acetilcolina liberada no processo de neurotransmissão^{12,13}.

Entre os agentes químicos com perfil anti-colinesterásico que apresentaram resultados promissores para o tratamento da DA encontram-se os inibidores da acetilcolinesterase (AChEI), a exemplo da tacrina (Cognex), donepezil (Aricept), fisostigmina e o produto natural galantamina (Reminyl), recentemente aprovado pelo FDA (do inglês “Food and Drug Administration”) (Fig. 1). A tacrina foi o primeiro fármaco sintético aprovado pelo FDA, entretanto, devido aos sérios efeitos colaterais provocados, sua utilização está sendo bastante limitada⁵.

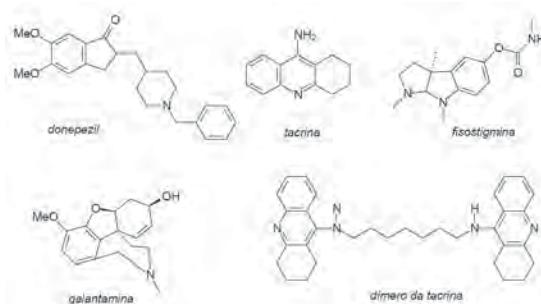


Figura 1. Inibidores da acetilcolinesterase (AChE).

A busca por novas entidades químicas úteis tratamento DA tem recebido grande atenção da Física e Química Medicinal. Entretanto, poucas entidades superaram as etapas de ensaios pré-clínicos e clínicos. As estratégias de modificação estrutural de protótipos naturais e/ou hibridização molecular tem sido muito exploradas e já lograram alguns protótipos mais eficientes (mais seletivos e menos tóxicos) que os fármacos comerciais¹⁴⁻²⁰.

No âmbito de uma linha de pesquisa que visa o

emprego dos lipídeos fenólicos não isoprenóides do cajueiro (*Anacardium occidentale*), como matéria-prima na preparação de compostos com maior valor agregado, o presente estudo objetiva a utilização destes lipídeos fenólicos não isoprenóides do líquido da casca da castanha (LCC), na obtenção racional de novos agentes terapêuticos inibidores da enzima AChE, candidatos úteis ao tratamento da DA.

O cajueiro, única espécie cultivada e de maior dispersão do gênero, pode ser em diversos ecossistemas do nordeste brasileiro, principalmente nas zonas costeiras, fazendo parte da vegetação de praias e dunas e nas formações de restinga. Apesar de cultivada em mais de vinte países, em termos de importância sua exploração restringe-se ao Brasil, Índia, Vietnã, Tanzânia, Indonésia, Moçambique e Guiné-Bissau, sendo a produção brasileira cerca de 19% em relação à mundial. O principal centro de diversidade do gênero *Anacardium* é a região amazônica (florestas úmidas, matas de galeria e cerrado), com um centro secundário de diversidade nos cerrados (Planalto Central)²¹. O cultivo do cajueiro representa para o Nordeste uma atividade de elevada importância econômica e social, com uma área plantada estimada em 680 mil hectares e uma produção de 150 mil toneladas de castanha de caju que proporciona uma exportação da ordem de 30 mil toneladas de amêndoas, gerando divisas de 140 milhões de dólares, tendo os estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte como os mais representativos em termos de produção.

No processo de industrialização da castanha de caju para obtenção da amêndoas, fonte rica de proteínas e componentes graxos, isola-se o LCC, um material de grande interesse como matéria-prima na fabricação de inseticidas, germicidas, antioxidantes, isolantes térmicos, material de atrito, plastificantes, tensioativos, tintas, vernizes entre outros²²⁻²⁴. Recentemente, o LCC tem sido utilizado como aditivo para combustíveis e lubrificantes²⁵. Em função da excelência de mercado para a amêndoas, esse subproduto do processamento industrial da castanha de caju é um importante produto da pauta de exportação do Brasil. Entretanto, devido os preços irrisórios praticados pelo mercado de exportação por vezes torna-se rejeito da cajucultura²¹. O LCC é um óleo viscoso e acre que compreende 25% do peso do fruto *in natura*, sendo uma das fontes mais ricas de lipídeos fenólicos não isoprenóides, tais como ácidos anacárdicos,

cardóis, cardanóis e metilcardóis²⁶. Do ponto de vista químico, os lipídeos fenólicos do LCC configuram-se como uma matéria-prima versátil para uma série de transformações químicas, devido à natureza dualística - caráter aromático e acílico -, aliado à existência de diversos grupos funcionais no anel aromático e múltiplas instalações na cadeia alifática em C-8 (Fig. 2).

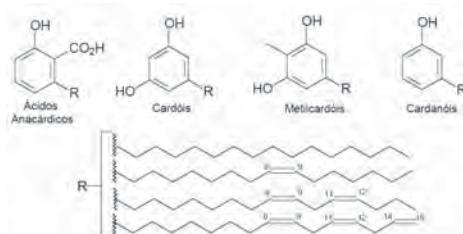


Figura 2. Lipídeos fenólicos não isoprenóides constituintes do LCC.

Os derivados fenólicos do LCC constituem um sistema biofórico natural compreendendo características eletrônicas e hidrofóbicas, as quais são requisitos estruturais relevantes ao reconhecimento molecular pela enzima acetilcolinesterase (AChE). Em adição, esses lipídeos fenólicos são susceptíveis a uma série de transformações químicas.

A importância industrial do LCC é refletida em centenas de patentes internacionais e trabalhos publicados, envolvendo a sua caracterização e utilização. Essa versátil matéria-prima vem sendo empregada em diversos projetos de pesquisa com resultados promissores²⁷⁻³⁴. Recentemente, foram solicitados pedidos de patente nacional e internacional para derivados úteis como absorvedores de radiação ultravioleta a partir do LCC, cuja titularidade da propriedade intelectual é compartilhada entre a UCB, a UnB e a UFRJ^{35, 36}.

Os compostos-alvo foram planejados a partir da estratégia de hibridação molecular de inibidores da enzima AChE de forma a gerar um novo padrão molecular pertencente a essa classe terapêutica.

O PADRÃO MOLECULAR 2

O padrão molecular 2 (PM2) envolve a hibridação molecular entre a subunidade farmacofórica primária da rivastigmina (a) e a subunidade farmacofórica secundária que compreende a cadeira alquólica lateral do acetato de espectralina (b) (Fig. 3).

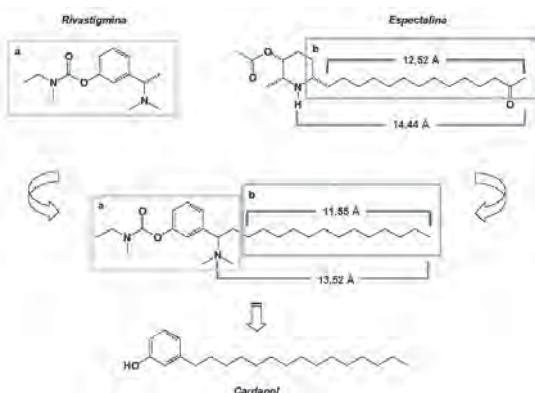


Figura 3. Planejamento estrutural de novos candidatos a AChEI do tipo PM2.

De modo a avaliar o perfil de reconhecimento molecular dos novos derivados foram planejadas algumas séries variando-se o padrão de substituição do grupo R para a hidroxila fenólica do cardanol bem como variação das aminas secundárias que compreende o reconhecimento molecular pelo resíduo Trp84. Quanto aos substituintes do grupo fenólico foram planejadas três séries com: metila, acetila e N,N-dimetilcarbamóila. Considerando as aminas secundárias foram selecionadas aminas alicíclicas e heterocíclicas tais como N,N-dimetilamina, N,N-dietilamina, pirrolidina e piperidina, visando estudar a liberdade conformacional destes compostos e aminas aromáticas como a N-metilbenzilamina, a qual apresenta um grupo aromático que pode interagir com o resíduo Trp84 (W84) ou Phe330 (F330) (Fig. 4) através de interações T ou empilhamento³⁷.

A partir dessas variantes planejadas do cardanol será feito um estudo de caracterização de padrões em relação à rivastigmina, um inibidor potencialmente ativo da AChE, para uma caracterização das possíveis estruturas no tratamento de DA. Este estudo se baseia no cálculo das propriedades eletrônicas, tais como HOMO, LUMO, GAP(HOMO-LUMO), carga, calor de formação entre outras dos derivados do cardanol e da rivastigmina usando o nível de cálculo Hartree-Fock-Restrito³⁸ e várias bases diferentes, a partir de estruturas otimizadas com método semi-empírico PM3³⁹ provenientes da aproximação NDDO. A partir da comparação dos resultados obtidos dos derivados do cardanol com os da rivastigmina será possível: identificar quais grupos substituintes mais contribuirão para tornar análogos

do cardanol inibidores potencialmente ativos para o reconhecimento molecular pela AChE, minimizando os possíveis efeitos indesejáveis.

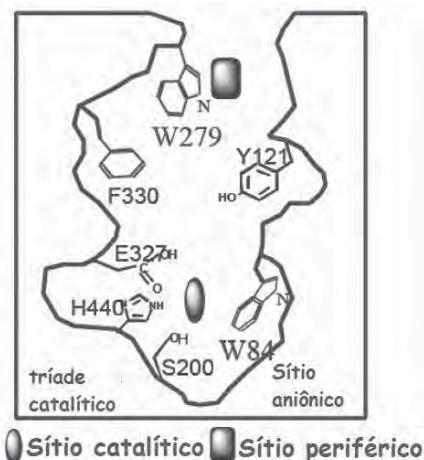


Figura 4. Esquema da AChE mostrando a triade catalítica.

O Problema Molecular

Para descrever quanticamente um sistema molecular constituído por N elétrons e M núcleos, via equação de Schrödinger estacionária e sem correções relativísticas, podemos recorrer ao hamiltoniano (em unidades atômicas):

$$\hat{H} = - \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}}, \quad (1)$$

$$+ \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^{M-1} \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}},$$

onde os índices i e j referem-se aos elétrons, e os índices A e B , aos núcleos. As massas dos elétrons são indicadas por m_e , e as massas dos núcleos, por M_A . As distâncias entre dois núcleos, entre um núcleo e um elétron, e entre dois elétrons são, respectivamente, indicadas por R_{AB} , r_{Ai} e r_{ij} .

Infelizmente, a interação elétron-núcleo é forte, e por isso não pode ser desprezada. Desta forma, o termo $\sum_{A=1}^M \sum_{i=1}^N \frac{Z_A}{r_{iA}}$, na expressão (1) não nos permite separar o hamiltoniano em uma parte eletrônica e outra nuclear, o que tornaria possível escrever a função de onda da molécula como um produto de duas funções de onda: uma nuclear e uma eletrônica.

A equação de Schrödinger molecular, com a hamiltoniana (1), é praticamente impossível de ser

resolvida sem aproximações, mesmo utilizando métodos numéricos. Entretanto, sabemos que os núcleos são muito mais massivos que os elétrons, e por isso, estes últimos movem se muito mais rápido que os primeiros. Assim, podemos tornar paramétrica a dependência em \vec{R} do termo $\sum_{A=1}^M \sum_{i=1}^N \frac{Z_A}{r_{iA}}$, na expressão (1) e, então, propor a seguinte aproximação para a função de onda completa:

$$\Psi(\vec{r}, \vec{R}) = \phi(\vec{r}; \vec{R})\xi(\vec{R}), \quad (2)$$

onde $\phi(\vec{r}; \vec{R})$ representa a função de onda eletrônica, dependente apenas parametricamente das coordenadas nucleares, e $\xi(\vec{R})$ representa a função de onda nuclear. A equação (2) é conhecida como expansão adiabática.

Substituindo a expressão (2) na equação (1) e considerando que $\nabla_A \phi(\vec{r}, \vec{R})$ e $\nabla_A^2 \phi$ sejam iguais a zero, podemos desacoplar a equação de Schrödinger, com a hamiltoniana (1), em duas outras: uma eletrônica, e outra nuclear. Este desacoplamento é conhecido como Aproximação de Born-Oppenheimer (A.B.O.). Dentro da A.B.O. a equação eletrônica é dada por:

$$\left[\sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \sum_{i=1}^N \frac{Z_A}{r_{Ai}} + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} \right] \phi(\vec{r}; \vec{R}_a) = \epsilon(\vec{R}_a) \phi(\vec{r}; \vec{R}_a), \quad (3)$$

onde $\phi(\vec{r}; \vec{R}_a)$ e $\epsilon(\vec{R}_a)$ são, respectivamente, a função de onda eletrônica e sua correspondente energia eletrônica, para uma molécula cujos núcleos encontram-se numa determinada configuração \vec{R}_a .

A expressão (3) é a equação de Schrödinger eletrônica independente do tempo, que deve ser resolvida para cada configuração nuclear, fornecendo-nos um conjunto de funções de onda eletrônicas e suas respectivas energias eletrônicas.

A equação nuclear é dada por:

$$\left[\sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 + V(\vec{R}) \right] \xi(\vec{R}) = E \xi(\vec{R}), \quad (4)$$

onde

$$V(\vec{R}) = \sum_{A=1}^{M-1} \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} + \epsilon(\vec{R}), \quad (5)$$

constitui a superfície de energia potencial (SEP), que é obtida a partir de um ajuste das energias eletrônicas para uma forma analítica.

A expressão (4) é a equação de Schrödinger nuclear independente do tempo. Suas soluções $\xi(\vec{R})$ descrevem a

vibração, a rotação e a translação de uma molécula.

Assim, o movimento dos núcleos de uma molécula é regido pela SEP. Esta traz informações sobre o potencial de interação entre os núcleos e sobre a energia eletrônica. Na seção seguinte, serão descritos de forma resumida as duas metodologias utilizadas para resolver a equação de Schrödinger eletrônica para os derivados do cardanol e a rivastigmina.

SOLUÇÃO DA EQUAÇÃO DE SCHRÖDINGER ELETRÔNICA

Existem na literatura vários métodos para resolver a equação de Schrödinger eletrônica³⁸. Nesta seção, descreveremos de forma sucinta somente dois principais métodos que utilizamos neste trabalho: Hartree-Fock-Restrito e B3LYP. A equação de Hartree-Fock (6) é uma equação não-linear, visto que o operador de Fock depende de suas autofunções (deve ser resolvida de forma iterativa) e é dada por

$$f(\vec{r}_1) \phi_i(\vec{r}_1) = \epsilon_i \phi_i(\vec{r}_1). \quad (6)$$

Introduzindo um conjunto de K conhecidas funções de base $\{\psi_\mu(\vec{r}) \mid \mu = 1, 2, \dots, K\}$ e expandindo os desconhecidos orbitais moleculares numa expansão linear, obtemos a seguinte equação de Hartree-Fock-Roothaan⁴⁰

$$\phi_i = \sum_{\mu=1}^K C_{\mu i} \psi_\mu \quad i = 1, 2, \dots, K \quad (7)$$

em que, $C_{\mu i}$ são os coeficientes das K funções de bases a serem determinadas.

Se o conjunto $\{\psi_\mu\}$ fosse completo, esta seria uma expansão exata, e qualquer conjunto completo $\{\psi_\mu\}$ poderia ser utilizado. Infelizmente, este é sempre restrito, por razões práticas computacionais, as K funções de base são um conjunto finito. Como tal, é importante escolher uma base que irá proporcionar, tanto quanto for possível, uma expansão suficientemente “exata” para orbitais moleculares $\{\phi_i\}$, particularmente, para os orbitais moleculares $\{\phi_i\}$ que estão ocupados em $|\Phi\rangle$ e determinar o estado fundamental da energia E_0 . As funções mais utilizadas para estudos de sistemas moleculares são as funções do tipo gaussianas, que são definidas pela equação 8, como:

$$\psi(x, y, z)_\mu = N x^l y^m z^n e^{-\alpha r^2} \quad (8)$$

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

Nosso problema do cálculo orbitais moleculares de Hartree-Fock se reduz ao cálculo dos coeficientes de expansão $C_{\mu i}$. Podemos obter uma matriz $C_{\mu i}$ que substitui a expansão linear da Eq. (7) na equação Hartree-Fock (6) temos

$$f(1) \sum_{\mu}^K C_{\mu i} \psi_{\mu}(1) = \epsilon_i \sum_{\mu}^K C_{\mu i} \psi_{\mu}(1), \quad (9)$$

Multiplicando $\psi^*(1)$ pelo lado esquerdo e integrando, nos transformamos a equação diferencial numa equação matricial

$$\sum_{\mu}^K C_{\mu i} \int d\vec{r}_1 \psi_{\mu}^*(1) f(1) \psi_{\mu}(1) = \epsilon_i \sum_{\mu}^K C_{\mu i} \int d\vec{r}_1 \psi_{\mu}^*(1) \psi_{\mu}(1), \quad (10)$$

tomando $S_{\nu \mu} = \int d\vec{r}_1 \psi_{\nu}^*(1) \psi_{\mu}(1)$, uma matriz hermitiana (assumimos as funções de bases $\{\psi_{\mu}\}$ ortogonais), e a matriz $F_{\nu \mu} = \int d\vec{r}_1 \psi_{\nu}^*(1) f(1) \psi_{\mu}(1)$, também Hermitiana.

Reescrevendo a equação de Hartree-Fock na forma matricial, temos:

$$\sum_{\mu}^K F_{\nu \mu} C_{\mu i} = \epsilon_i \sum_{\mu}^K S_{\nu \mu} C_{\mu i} \quad i = 1, 2, \dots, K \quad (11)$$

ou de forma mais compacta como

$$FC = \epsilon SC. \quad (12)$$

O método utilizado na resolução da equação (12) é o chamado método do Campo Auto-Consistente³⁸. Esse método consiste em calcular, a partir de uma escolha inicial arbitrária de um conjunto de orbitais de *spin* moleculares χ_i , o potencial Hartree-Fock v^{HF} visto por cada elétron e então resolver a equação (6). Com esse novo conjunto de orbitais de *spin* moleculares repete-se o procedimento, de forma interativa, até que seja encontrado um valor que converja a densidade de eletrônica e/ou a energia do sistema³⁸.

A essência da aproximação de Hartree-Fock está no fato de considerarmos que cada elétron de um átomo, ou de uma molécula, interage com os outros por meio de um campo médio. Utilizando esta aproximação é possível obter até 99% da energia do estado fundamental no cálculo de estrutura eletrônica molecular. Para a obtenção

do restante dessa energia, de extrema importância no estudo de muitas propriedades químicas das moléculas, é necessária a utilização de métodos mais precisos, que incluem os efeitos da correlação eletrônica. Entretanto, a importância da aproximação de Hartree-Fock não se reduz, já que a maioria dos métodos utilizados na busca dessa energia restante tem a método Hartree-Fock como ponto de partida (métodos pós Hartree-Fock).

Além do método Hartree-Fock, utilizamos o método do funcional de densidade na aproximação B3LYP. Este funcional densidade na aproximação B3LYP⁴¹⁻⁴³ é um método híbrido que utiliza a aproximação de Hartree-Fock para expressar a troca e fórmulas da teoria do funcional densidade para a correlação de troca. Esse funcional é composto pelo funcional de Becke, composto por três parâmetros de Becke⁴², que tem termos para a troca e correlação oriundos de outros funcionais e da teoria de Hartree-Fock, juntamente com o funcional de correlação de LYP (Lee, Yang e Parr)⁴³, que é a correlação não-local do funcional, incluindo termos de correlação local e não local.

Análise de Componentes Principais

O problema de muitos dados é comum em diversas áreas da ciência e tecnologia, onde encontramos sistemas com muitas variáveis, em que todas precisam ser analisadas. O homem possui capacidade de realizar este tipo de análise, uma vez que toda nossa aprendizagem está relacionada com a capacidade cerebral de identificar, isolar, associar objetos concretos e conceitos de forma a definir padrões. Essa capacidade humana é tema de pesquisas em várias áreas da ciências. Bons exemplos são redes neurais⁴⁴⁻⁴⁸ e a inteligência artificial⁴⁹.

Para um estudo de dados multivariados, existem inúmeras técnicas disponíveis na literatura⁵⁰, desta forma é necessária uma escolha cautelosa, pois cada método tem suas peculiaridades que podem trazer dificuldades na análise final dos dados. Existe uma diferença marcante entre os métodos, que podem ser classificados em dois grupos: os das “variável-dirigidas” onde o relevante, durante a análise, é a relação entre as variáveis, e os “indivíduo-dirigidas” que aborda principalmente as relações entre os indivíduos.

O papel principal da análise multivariada é reduzir

a grande quantidade de dados para um número menor de parâmetros significativos, para fornecer uma visão estatisticamente privilegiada do conjunto de dados. Por exemplo, em um composto orgânico, são necessários diferentes tipos de dados para determinação de algum processo de atividade biológica, como as energias dos orbitais LUMO e HOMO, a densidade de estados, o calor de formação, etc. Então, para realizar uma análise, nos perguntamos: quais desses dados são, ou não, relevantes para o processo? Para isso, escolhemos um método estatístico de análise multivariada, como a análise de componentes principais (PCA do inglês “*Principal Component Analysis*”)^{50,51}.

Para examinar as relações entre um conjunto de variáveis correlacionadas, transformamos o conjunto de variáveis originais para um conjunto de variáveis não correlacionadas, chamadas componentes principais (PC do inglês “*principal components*”). A técnica para obter as componentes principais é chamada PCA. As componentes principais são obtidas em ordem decrescente de importância, pois a primeira componente é a combinação linear das variáveis com maior variância nos dados originais.

A PCA foi desenvolvida por Karl Pearson início do século XX⁵², e aperfeiçoada em 1930 por Harold Hotelling e colaboradores⁵³. Em resumo, o objetivo desta técnica é verificar se algumas poucas componentes principais respondem pela maior parte das variáveis originais. Se isso ocorre, a dimensionalidade efetiva do problema é drasticamente reduzida se comparada com a dimensionalidade original. Em outras palavras, muitas das variáveis originais estavam correlacionadas. Assim poucas componentes são realmente significativas, podendo ajudar-nos na melhor compreensão dos dados que serão úteis nas análises subsequentes, uma vez que trabalharemos com um número muito menor de dados.

CÁLCULO DAS COMPONENTES PRINCIPAIS E SUAS RESPECTIVAS VARIÂNCIAS

Vamos descrever o nosso conjunto de dados constituído por N indivíduos (estruturas) caracterizados por M variáveis (propriedades das estruturas) do tipo medidas quantitativas. Este grupo de dados conduz a um quadro de partida dissimétrico X cujo termo geral x_{nm} representa o valor tomado pela m -ésima variável no indivíduo n .

Tabela 1. Matriz do conjunto de dados iniciais. As linhas representam os indivíduos (*indivíduos n*) e as colunas as variáveis (*variáveis m*).

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

Frequentemente é necessária uma modificação do quadro de partida, quando a dispersão das variáveis é muito diferente ou quando as variáveis diferem quanto à sua natureza sendo expressas em unidades de medida não comparáveis. Para ultrapassar este problema vamos fazer um tratamento dos dados iniciais, reduzindo as variáveis, ou seja, tornando elas adimensionais com média nula e variância unitária.

O termo geral do conjunto de dados modificado, é dado por:

$$y_{nm} = \frac{x_{nm} - \bar{x}_m}{\sigma_m} \quad (13)$$

Onde \bar{x}_m é a média aritmética dos valores tomados pela variável m e σ_m é o desvio padrão da variável m .

$$\bar{x}_m = \frac{\sum_{n=1}^N x_{nm}}{N}, \quad (14)$$

$$\sigma_m = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^N (x_{nm} - \bar{x}_m)^2}{N-1}}, \quad (15)$$

A partir deste tratamento inicial dos dados podemos chegar a matriz de covariância $C(Y)$, encontrada a partir do produto da matriz transposta Y^T pela matriz Y , formando uma matriz simétrica com ordem $M \times M$.

$$C(Y)_{M \times M} = Y_{M \times N}^T Y_{N \times M}, \quad (16)$$

assim temos,

$$C(Y) = Y^T Y \quad (17)$$

$$C(Y) = \begin{vmatrix} c_{11} & c_{12} & \cdots & c_{1M} \\ c_{21} & c_{22} & \cdots & c_{2M} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ c_{M1} & c_{M2} & \cdots & c_{MM} \end{vmatrix} \quad (18)$$

O termo geral da matriz de covariância fica:

$$c_{mm'} = \sum_{n=1}^N \left(\frac{x_{nm} - \bar{x}_m}{\sigma_m} \right) \left(\frac{x_{nm'} - \bar{x}_{m'}}{\sigma_{m'}} \right), \quad (19)$$

onde $c_{mm'}$, para $m \neq m'$, representa a covariância da variável m com a variável m' para $m = m'$ representa a variância da variável m .

A matriz $C(Y)$ capta as correlações entre todos os pares de variáveis possíveis. Os termos da diagonal principal de $C(Y)$ são a variância de um tipo particular de variável. Quanto maior os valores da diagonal principal maior será a nossa variância, que é uma medida da sua dispersão estatística, indicando quão longe em geral os seus valores se encontram do valor esperado. Os termos de fora diagonal de $C(Y)$ são os termos da covariância (covariância é definida como uma medida de como duas variáveis variam conjuntamente) entre os termos da medição. Quanto menor o valor de um termo de fora da diagonal principal menor será a correlação entre duas variáveis. Então temos que maximizar os termos da diagonal principal e minimizar os de fora dela, como as covariâncias não podem ser negativas, então o ótimo dessa situação é diagonalizar esta matriz. Para fazer isto de maneira mais fácil, o método escolhido por PCA é considerar que a matriz P (matriz formada pelas componentes principais) é formada por vetores de base ortogonais. Ou seja, a matriz P é uma matriz ortogonal. Para encontrarmos P , basta calcularmos os autovetores da matriz $C(Y)$ onde cada autovetor são os coeficientes de uma PC relacionada a um autovalor que é a variância desta componente principal. Então para termos a componente de maior relevância basta encontrar o autovetor do maior autovalor. Numa visão mais simples, funciona como uma rotação generalizada para alinhar a base com a máxima variância do eixo.

$$CP = VP, \quad (20)$$

A matriz P , de dimensão $M \times M$, contém M vetores dispostos em colunas, cada um com comprimento M , que representam os M autovetores da matriz de covariância C . Os autovalores e autovetores estão ordenados e pareados. O m -ésimo autovalor corresponde ao m -ésimo autovetor. Vamos reordenar os autovalores e autovetores mantendo a mesma relação entre eles. Colocando a matriz V , dos autovalores, em ordem decrescente de autovalor. Assim teremos,

$$V = \begin{vmatrix} \text{Variância da PC1} & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & \text{Variância da PC2} & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & \text{Variância da PCM} \end{vmatrix} \quad (21)$$

onde $\text{Variância da PC1} \geq \text{Variância da PC2} \geq \dots \geq \text{Variância da PCM}$. Mantendo a mesma relação para a matriz P , teremos,

$$P = \begin{vmatrix} p_{11} & p_{12} & \cdots & p_{1M} \\ p_{21} & p_{22} & \cdots & p_{2M} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ p_{M1} & p_{M2} & \cdots & p_{MM} \end{vmatrix} \quad (22)$$

onde os elementos de cada vetor coluna da matriz P são os coeficientes de uma PC. Assim temos,

$$\begin{array}{c|cccc} & \text{PC1} & \text{PC2} & \cdots & \text{PCM} \\ \hline \text{Peso da variável 1} & p_{11} & p_{12} & \cdots & p_{1M} \\ \text{Peso da variável 2} & p_{21} & p_{22} & \cdots & p_{2M} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \text{Peso da variável M} & p_{M1} & p_{M2} & \cdots & p_{MM} \end{array} \quad (23)$$

então o termo geral de uma PC é construído a partir dos autovetores,

$$PCm' = \sum_{m=1}^M y_{mm'} * p_{mm'}. \quad (24)$$

Resultados e Discussões

Nesta seção, descrevemos os primeiros resultados teóricos, via cálculos de estrutura eletrônica, de candidatos a inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) planejados a partir dos lipídeos fenólicos não isoprenóides do cajueiro (*anacardium occidentale*). Para tanto, otimizamos as geometrias, via métodos semi-empíricos PM3 e AM1 (do inglês “Austin Model 1”)⁵⁴, incluindo a análise conformacional para determinar as geometrias de menor energia, das séries obtidas variando-se o padrão de proteção da hidroxila fenólica do cardanol (substituinte “R” da figura 5) com grupos metila (1), acetila (2) e N,N-dimetilcarbomofila (3), bem como as variações contendo aminas secundárias como substituintes no carbono benzílico da cadeia lateral (substituinte “W” da figura 5). Nesta seção, consideramos 5 aminas secundárias: N,N-dimetilamina (1), N,N-dietylamina (2), pirrolidina (3), piperidina (4) e N-benzilamina (5), como demonstrado na figura 5.

O grupo aromático presente nesta última variação poderá desempenhar importante papel no reconhecimento molecular pelo resíduo Trp84 ou Phe 330 da enzima. As estruturas foram construídas, pré-otimizadas e submetidas a uma análise conformacional utilizando o programa CaChe⁵⁵, que fornece um mapeamento

da SEP das estruturas estudadas. A Figura 6 mostra o mapeamento da estrutura formada colocando no radical “R” N,Ndimetilcarbomoila e em “W” a pirrolidina. A estrutura obtida é a seguinte:

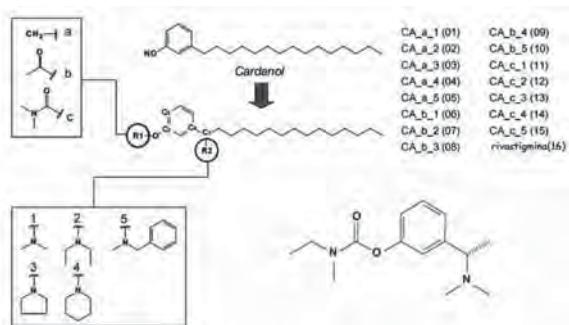


Figura 5. Representação esquemática dos possíveis candidatos a inibidores da enzima AchE, obtidos a partir dos lipídios fenólicos não isoprenóicos do cajueiro.

A partir deste mapeamento, selecionamos as geometrias de menor energia para as 15 estruturas representadas na Figura 5. Em seguida, estas geometrias foram reotimizadas (partindo das mesmas conformações de mínimo obtido via CaChe⁵⁵) utilizando o método HartreeFock-Restrito e as funções de base 6-31G, 6-31G(d), 6-31+G(d) e 6-311G(d,p). Todos estes cálculos foram realizados via pacote computacional Gaussian98⁵⁶. Utilizando estas novas conformações determinamos, também via Gaussian98, as propriedades eletrônicas tais como HOMO-1 (penúltimo orbital com energia mais alto ocupado), HOMO (orbital com energia mais alto ocupado), LUMO (orbital com energia mais baixa desocupado), LUMO+1 (segundo orbital com energia mais baixa desocupado), as cargas dos nitrogênios contidas nos radicais “R” e “W” (fig. 5) dos derivados do cardanol, além do calor de formação (via método semi-empírico) destas séries. A partir destas propriedades calculamos outras propriedades como: GAP (LUMO - HOMO), L1-H1 (LUMO+1 - HOMO-1), H-H1 (HOMO - HOMO-1) e L1-L (LUMO+1 - LUMO). Os resultados obtidos para estas propriedades foram comparados com os resultados que obtivemos isoladamente para o padrão rivastigmina, um inibidor ativo, a procura de correlações que nos permitam encontrar um padrão para a classificação dessas drogas quanto as suas atividades. Neste processo comparativo, verificamos que os resultados da classificação são muito similares. No

entanto, a base 6-311G(d,p) será usada na distinção dos inibidores, pois foi a que forneceu a menor energia para todas as estruturas.

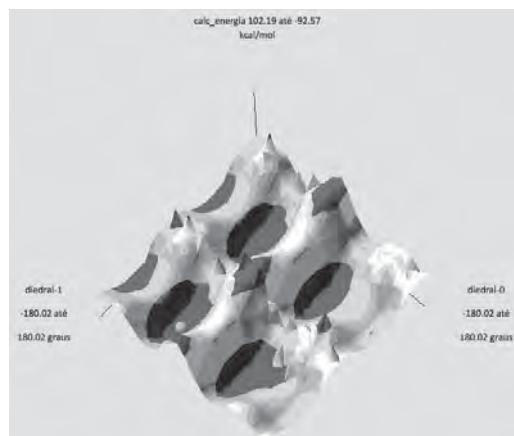


Figura 6. Mapeamento da SEP da estrutura formada colocando no radical “R” N,Ndimetilcarbomoila e em “W” a pirrolidina, utilizando o pacote computacional Cache.

Com o objetivo de facilitar a identificação das 15 moléculas propostas, utilizamos uma notação para estas moléculas (CA_R_W), baseada nos radicais ligados, nas posições “R” e “W” do núcleo central (fig. 5) formado pelo cardanol. Desta forma, pegando como exemplo o símbolo CA_1_1 que indica a molécula obtida ligando os radicais metila e N,N-dimetila nos radicais “R” e “W”, respectivamente, no núcleo central do cardanol. A Tabela 2 mostra as 15 notações das moléculas estudadas.

Primeiramente, tentamos realizar uma análise binária das propriedades eletrônicas sem uso direto do método PCA. Algumas moléculas se agrupam com a rivastigmina, em relação a certas propriedades eletrônicas. Antes de discutirmos essas análises observemos as relações entre os orbitais, a primeira, Figura 7, apresenta a contribuição para a diferença LUMO+1 - HOMO-1 contra LUMO+1. Notamos, a partir deste gráfico, que as duas propriedades agrupam as estruturas (6), (8), (11) e (13) à (16), separando elas das restantes. Indicando que as propriedades dos eixos do gráfico funcionem como fator de distinção entre os inibidores ativos e inativos da AChE.

A Figura 8 representa as energias da diferença LUMO+1 - LUMO contra a do HOMO. Neste gráfico, podemos novamente notar que as estruturas (6), (8) e (13) se localizam próximo à (16), mostrando também que

as propriedades dos eixos auxiliam na distinção. Também observamos que a molécula (11) se encontra um pouco distante do aglomerado próximo à rivastigmina, mas do lado inverso de onde se encontram as outras estruturas que estão fora do aglomerado.

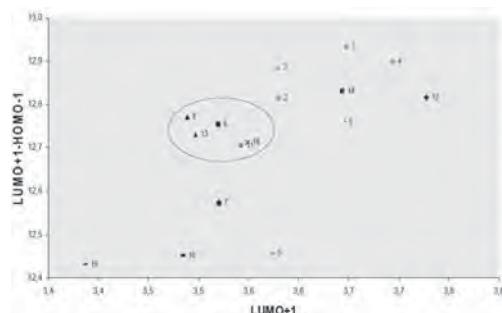


Figura 7. Contribuição para a diferença LUMO+1 -HOMO-1 vs LUMO+1, para os derivados do cardanol e rivastigmina.

Ao utilizarmos o método de reconhecimento de padrões PCA, reduzirmos o número de propriedades que são mais relevantes à seleção das moléculas, ou seja, as que mais se correlacionam com a da rivastigmina. Além disto, este método auxilia na classificação através da separação das estruturas em um conjunto de variáveis não correlacionadas (PC) que são formadas pelas propriedades eletrônicas originais. As PCs são obtidas em ordem decrescente de importância, pois a primeira componente é a combinação linear das propriedades eletrônicas com maior variância.

A partir das 7 propriedades eletrônicas inicialmente determinadas, fizemos estudos sistemáticos, considerando a variância e o peso das mesmas e concluímos que as PCs podem ser escritas em termos de 4 propriedades eletrônicas descritas na tabela 3.

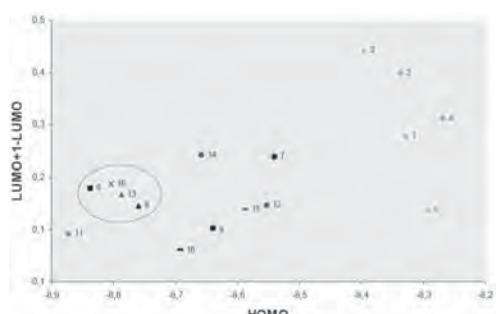


Figura 8. Contribuição para a diferença LUMO+1 -LUMO vs HOMO, para os derivados do cardanol e rivastigmina.

A análise de como a variância dos dados se distribui sobre as PCs pode ser vista na Figura 9. Desta figura podemos notar que as duas principais componentes, PC1 e PC2 são responsáveis, respectivamente, por 78,34% e 16,23% dos dados, totalizando 94,57%. Este fato, que se faz necessário para que se tenha uma boa confiabilidade nos dados sobre PCA.

Tabela 2. Nomeclatura das 15 estruturas derivadas do padrão molecular 2. Notação utilizada para a substituição do hidrogênio a partir do grupo de fenólicos cardanol (R1 na 5) e carbono da cadeia lateral (R2 na Figura 5). CA representa cardanol.

Notação	Estrutura	Nomenclatura	Estrutura
01	CA_a_1	09	CA_b_4
02	CA_a_2	10	CA_b_5
03	CA_a_3	11	CA_c_1
04	CA_a_4	12	CA_c_2
05	CA_a_5	13	CA_c_3
06	CA_b_1	14	CA_c_4
07	CA_b_2	15	CA_c_5
08	CA_b_3	16	rivastigmina

Nesta primeira parte dos resultados, compararmos as propriedades eletrônicas (energias dos HOMO, LUMO, HOMO-1, LUMO-1 e seus derivados) dos lipídeos fenólicos modificados contra a rivastigmina, usando métodos semi-empíricos e RHF. Em seguida novas propriedades foram incluídas, como por exemplo a carga do anel aromático, carga do oxigênio 56, do carbono 11 e do nitrogênio pertencente ao radical R2, usando o nível de cálculo B3LYP com as funções de bases 6-31G, 6-31G(d) e 6-311+G(2d,p).

Tabela 3. Peso das propriedades eletrônicas que formam as PCs.

	PC1	PC2	PC3
HOMO-1	0,5526519	-0,1651031	-0,181517
LUMO+1	0,426917	0,7834858	-0,3924858
GAP	-0,4860612	0,5929316	0,3480295
H - H-1	0,5254161	0,8557445	0,8317944

Estas propriedades, tendo em conta efeitos de correlação, foram utilizadas na PCA. A fim de melhorar esta análise, os PCs foram obtidos em um modelo tridimensional PCA. Portanto, estes resultados B3LYP complementam nosso estudo discutido anteriormente. Além disso, estes resultados podem melhorar o conhecimento das propriedades importantes para a inibição da AChE.

Desta forma, foi proposto um conjunto de moléculas AChEI com base em uma substituição do hidrogênio a partir do grupo de fenólicos cardanol (R1 na Figura 5), por grupos, tais como (a) metil, (b) acetil, e (c) N, N-dimetilcarbamona, bem como as substituições no benzílicos carbono da cadeia lateral (R2 na Figura 5) por aminas secundárias, (1) N,N-dimetilamina (2), N,N-dietilamina (3) pirrolidina, (4) piperidina, e (5) N,N-metilbenzilamina. As variações obtidas a partir das substituições rendeu quinze estruturas de cardanol derivados. A tabela 2 mostra a notação usada para os compostos derivados do cardanol utilizados neste trabalho.

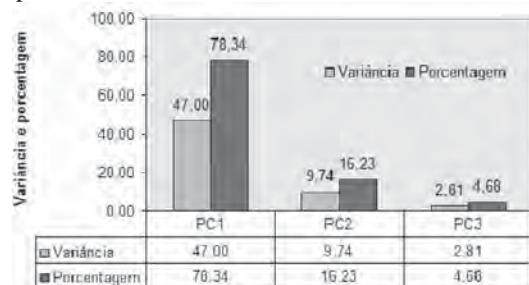


Figura 9. Distribuição da variância e porcentagem da variância nas PCs.

Geometrias destas quinze estruturas, bem como rivastigmina foram tomadas a partir do resultado otimizado da seção anterior⁵⁷ usando os métodos semi-empíricos AM1 e PM3. Análise conformacional da energia mínima foi feita utilizando-se o mapas da superfície de energia potencial (Fig. 6). Estas estruturas mínimas foram totalmente otimizadas e os procedimentos para este estudo utilizou as seguinte etapas:

- Cálculos single point das propriedades eletrônicas, ou seja, cálculos das duas energias de orbitais moleculares mais altos ocupados E(HOMO) e E(HOMO-1), as duas energias de orbitais moleculares mais baixos desocupados E(LUMO) e E(LUMO+1), carga dos anéis aromáticos, carga do C 11 (C-C11), carga do O56 (C-O56) e carga do nitrogênio pertencente ao grupo R2 (C-NR2) (ver Figura 5 para a notação). Estes cálculos foram realizados utilizando método B3LYP com grupo de funções de base: 6-31G, 6-31G (d) e 6-311+G(2d,p).
- A partir destes dados das propriedades eletrônicas derivamos outras propriedades GAP [E(LUMO) – E(HOMO)], GAP+1 [E(LUMO+1) – E(HOMO-1)], $\Delta H-1$ [E(HOMO) – E(HOMO-1)] and $\Delta L+1$ [E(LUMO+1) – E(LUMO)].

Todos estes cálculos foram também realizados utilizando o programa computacional Gaussian03⁵⁸. Para comparar as propriedades eletrônicas obtidas a partir dos quinze derivados do cardanol com a rivastigmina, utilizamos novamente o método PCA. Este método, como já mencionado, reduz o número inicial de parâmetros estabelecidos (propriedades eletrônicas) para os mais relevantes no que diz respeito a capacidade de selecionar compostos que são mais semelhantes com a rivastigmina. O dados do PCA foram redirecionadas, tornando elas adimensionais com média nula e variância unitária. Este procedimento foi utilizado a fim de eliminar efeitos artificiais, onde algumas propriedades eletrônicas com um grande valor poderia dominar a análise.

O próximo passo foi analisar cada propriedade dos quinze derivados com o objetivo de selecionar os compostos que mais se correlacionam com a rivastigmina. Também analisamos as relações entre pares de propriedade dos quinze compostos. Esta última análise foi importante para produzir as mais relevantes variáveis em relação à rivastigmina. Por exemplo, a Figura 10 mostra a contribuição de E(LUMO-1) versus C-N_{R2} para os derivados do cardanol e rivastigmina.

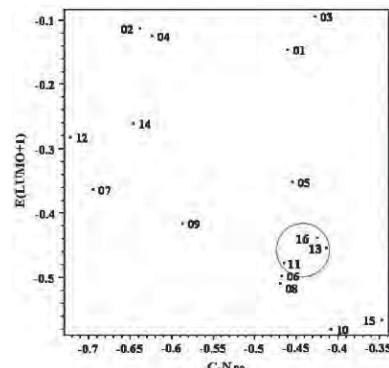


Figura 10. Contribuição da E(LUMO-1) versus C-N_{R2} para os derivados do cardanol e rivastigmina. Propriedades calculadas utilizando o método B3LYP com a função de base 6-311+G(2d,p) dos derivados do padrão molecular 2

A partir destes dados preliminares, as variáveis eletrônicas utilizadas para o cálculo de PCA foram refinadas e, em seguida, classificadas em componentes principais (PCs) em ordem de importância. A primeira componente é uma combinação linear das propriedades eletrônicas com a maior variância dos dados em relação às

outras. Os valores para as propriedades estudadas retirado das quinze estruturas foram muito próximos para todos os conjuntos de base considerados. Consequentemente, apresentamos os resultados apenas do conjunto da função de base mais extensa 6-311+G(2d,p), a fim de representar melhor os resultados finais.

O orbital HOMO-1 da rivastigmina em B3LYP/6-311+G(2d,p), utilizando geometria otimizada AM1 (Figura 11) mostra a principal contribuição dos orbitais π dos anéis aromáticos. A mesma contribuição do orbital HOMO-1 foi encontrada para todas as estruturas calculadas, ou seja, as contribuições estão centradas principalmente no fragmento análogo a rivastigmina para todos os compostos.

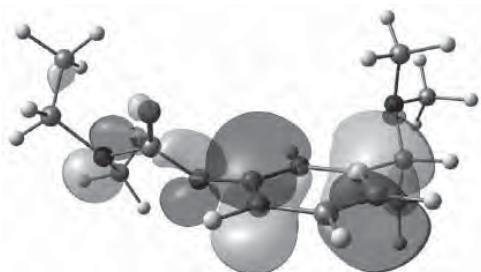


Figura 11. Geometria otimizada da rivastigmina. O orbital HOMO-1 da rivastigmina para o nível B3LYP/6-311+G(2d,p).

A Tabela 4 apresenta os resultados das energias HOMO-1, HOMO, LUMO e LUMO+1, e também das cargas do anel benzênico, C_{11} , O_{56} , e N_{R2} dos derivados do cardanol e rivastigmina. Um estudo sistemático de todas as propriedades foi realizado considerando a análise binária, PCs e peso da variância calculada dos dados. A Figura 10 mostra os derivados do cardanol (tabela 2) CA_c_1 e CA_c_3 como os que mais se assemelham à rivastigmina para E(LUMO-1) contra $C-N_{R2}$.

Inicialmente, usamos todas as propriedades de todas as estruturas na análise de PCA. Então excluímos algumas destas propriedades a partir desta análise tentando encontrar as mais relevantes. Isto permitiu-nos encontrar as três propriedades mais importantes divididas em três casos, chamado caso I, II e III (Figura 12). Identificamos que os descriptores E(HOMO-1), E(LUMO+1) e $C-O56$ são comuns aos três casos. Elas parecem ser as principais propriedades

para uma boa agregação entre as estruturas melhores correlacionadas com a rivastigmina. Além dessas propriedades também identificamos $C-NR2$, usado nos casos I e III, LUMO, usado nos casos II e III, e $\Delta L+1$, usado no caso II, como descriptores aptos. A Tabela 5 apresenta a variação de cada componente (PC1, PC2 e PC3), com seu respectivo percentual. No caso II, tivemos o maior valor em porcento para PC1 e tivemos o melhor percentual acumulado de variância, quase 97,5%, para as três primeiras PCs nos casos I e II. A Tabela 6 mostra os pesos das propriedades mais importantes para as três primeiras componentes.

Tabela 4. Valores da estrutura eletrônica E(HOMO-1), E(HOMO), E(LUMO), E(LUMO+1), carga do anel, $C-C11$, $C-O_{56}$ e $C-NR2$ dos 15 compostos derivados do cardanol e rivastigmina (16).

	energia dos orbitais (eV)				carga			
	HOMO-1	HOMO	LUMO	LUMO+1	anel	C_{11}	O_{56}	N_{R2}
01	-6,13	-5,74	-0,37	-0,15	0,20	0,35	-0,38	-0,46
02	-6,16	-5,45	-0,38	-0,11	0,22	0,15	-0,36	-0,64
03	-6,18	-5,43	-0,40	-0,09	0,29	-0,08	-0,35	-0,43
04	-6,11	-5,50	-0,35	-0,12	0,21	0,31	-0,38	-0,62
05	-6,11	-5,77	-0,49	-0,35	0,04	0,40	-0,35	-0,45
06	-6,77	-5,81	-0,55	-0,50	0,28	0,41	-0,54	-0,47
07	-6,50	-5,81	-0,78	-0,36	0,27	0,33	-0,52	-0,70
08	-6,83	-5,53	-0,56	-0,51	0,35	0,15	-0,54	-0,47
09	-6,67	-5,54	-0,50	-0,42	0,29	0,35	-0,54	-0,59
10	-6,80	-5,87	-0,59	-0,58	0,34	0,31	-0,54	-0,41
11	-6,76	-5,80	-0,49	-0,48	0,21	0,48	-0,43	-0,46
12	-6,62	-5,56	-0,34	-0,28	0,19	0,46	-0,45	-0,73
13	-6,78	-5,45	-0,51	-0,45	0,34	-0,10	-0,44	-0,42
14	-6,59	-5,50	-0,39	-0,26	0,21	0,26	-0,44	-0,65
15	-6,67	-5,69	-0,61	-0,57	0,33	0,05	-0,43	-0,35
16	-6,64	-5,99	-0,49	-0,44	0,19	0,33	-0,39	-0,42

Encontramos a partir da análise PCA (Figura 12), as estruturas que melhor se correlacionam com rivastigmina são os dimetilcarbamatos 11 (CA_C_1) e 13 (CA_C_3) para todos os três casos estudados. Estes resultados indicaram quais substituintes mais prováveis para os potenciais candidatos para o desenvolvimento de inibidores da AChE para o tratamento da DA apartir do cardanol.

As previsões da análise foram então avaliados experimentalmente para a série de dimetilcarbamatos 11-15. Os compostos foram sintetizados a partir do cardanol como hidrocloreto, utilizando métodos padrões. A inibição da enzima foi testada como descrito anteriormente, exceto que o purificado da AChE a partir do *E. electricus* foi usado em vez de tecido homogeneizados. Os compostos 11-13 inibiram

a AChE como descrito na concentração-dependente (Figura 13), ao passo 14 e 15 mostraram pouca atividade, inibindo a enzima pelo menos 25% a 100% μM . O dimetilamino 11 foi o mais potente, com uma IC₅₀ de 50,0 μM , seguido de perto pelo pirrolidina 13 (84,3 μM) e do dietilamino 12 (251,1 μM). Assim, o procedimento PCA selecionou corretamente os dois compostos mais potentes da série.

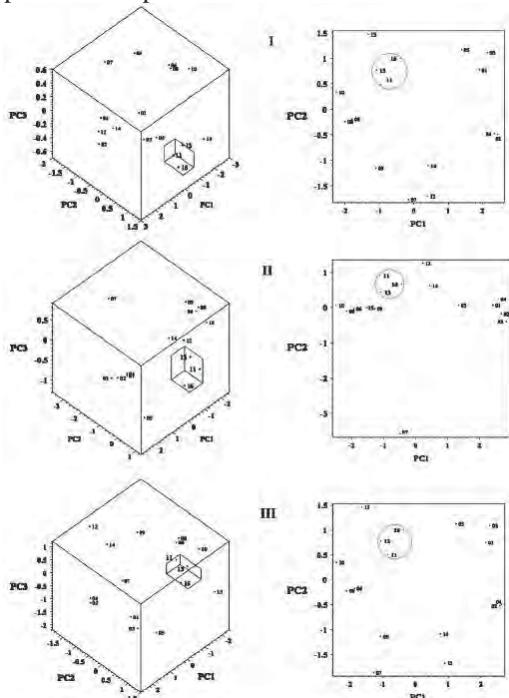


Figura 12. Gráficos dos casos I, II e III da separação das estruturas derivadas do cardanol e rivastigmina com as duas ou três PCs mais relevantes.

Tabela 5. Variância, porcentagem e acumulado da porcentagem nos casos I, II and III das PC1, PC2 e PC3 obtidos com PCA.

CASO I			
	Variância	Porcentagem	Acumulativo
PC1	39,35	65,59	65,59
PC2	16,48	27,47	93,06
PC3	2,65	4,41	97,47

CASO II			
	Variância	Porcentagem	Acumulativo
PC1	51,00	68,00	68,00
PC2	16,46	21,95	89,95
PC3	5,87	7,82	97,77

CASO III			
	Variância	Porcentagem	Acumulativo
PC1	47,01	62,68	62,68
PC2	16,50	22,00	84,68
PC3	8,13	10,84	95,52

Segundo a literatura⁶⁰⁻⁶² a rivastigmina atinge o fundo do sítio ativo do gorge, onde ela interage com o resíduo da Ser200 da tríade catalítica Ser200-His440-Glu327 através do seu agrupamento carbamoila, enquanto os aromáticos e os grupos de amônio dirigem-se para interagir com a conservação de resíduos Trp84 (adjacente à tríade catalítica) e um segundo resíduo aromático (Phe330), que parecem estar envolvidos com aromáticos de cátion- π ou interação hidrofóbica. Através de um mecanismo comum de inibição, o grupo carbamoila é reversivelmente ligado ao sítio ativo da serina, enquanto o grupo livre ((-)-S3-[1-(dimetilamino)-etil]fenol (NAP)) que é um competitivo inibidor da AChE permanece ativo no gorge. Bar-On e colaboradores demonstraram que o grupo de fenol da NAP está distante da ligação de hidrogênio para interagir com a espinha dorsal do resíduo Gly118, enquanto grupos aromáticos e metil tornam-se aromáticos-hidrológicos e as interações π - π com Trp84 e Phe330⁶⁰.

Tabela 6. Peso das propriedades eletrônicas E(HOMO-1), E(LUMO+1), C-O₅₆, C-N_{R2}, E(LUMO) e $\Delta L+1$ das PC1, PC2 e PC3 dos casos I, II and III, obtidos com PCA.

	CASO I			CASO II			CASO III		
	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3
E(HOMO-1)	0,58	0,12	0,61	0,51	-0,15	-0,22	0,50	0,10	-0,52
E(LUMO+1)	0,59	-0,17	0,13	0,52	-0,04	0,44	0,54	-0,18	-0,10
C-O ₅₆	0,51	0,44	-0,72	0,46	0,23	-0,74	0,47	0,43	-0,09
C-N _{R2}	-0,23	0,87	0,30				-0,20	0,88	0,05
E(LUMO)				0,36	0,66	0,43	0,44	0,03	0,84
$\Delta L+1$				0,36	-0,69	0,18			

Considerando a possibilidade de que os derivados do cardanol são capazes de penetrar profundamente até chegar ao fundo do sítio ativo do gorge, da mesma forma que a rivastigmina, e tendo em conta os resultados descritos por Sterling e colaboradores⁶³ (que mostrou que a atividade da AChEI é 30 vezes maior que da N,N-dimetilcarbamoya - análogo da rivastigmina em comparação com o agrupamento N,N-etilmetilcarbamoya), esperamos que haja um melhor acesso dos resíduos da Ser200 para os agrupamentos N,N-dimetilcarbamoya CA_c_1 (11) e CA_C_3 (13).

A fim de avaliar a influência dos sítios hidrofóbicos, bem como a liberdade de conformação do agrupamento de amônio, a dimetilamina (11) e a conformação bis-homóloga da pirrolidina (13) destes grupos foram

selecionados. Neste caso, o aumento de uma região hidrofóbica na pirrolidina é esperado para interagir os resíduos Trp84 e Phe330 melhor com dimetilamina, salvo se houver uma restrição estérico na região adjacente ao tríade catalítica e que delimita o volume acessível ao grupo pirrolidino. No que diz respeito aos alifáticos ao longo cadeia lateral, era esperado que ficasse ao longo do gorje, onde são possíveis interações complementares hidrofóbicas/aromáticos dos resíduos aminoácidos.

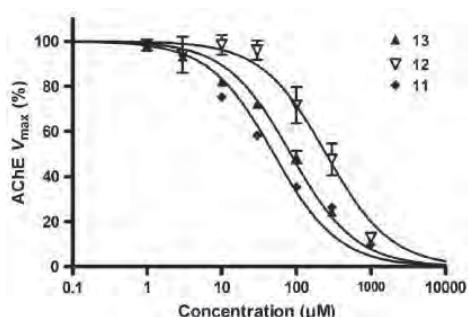


Figura 13. Curvas de inibição da acetilcolinesterase para selecionados derivados do cardanol. Símbolos são meios $\pm SD(n=3)$ de *E. electricus* da velocidade máxima (V_{max}) de reação da AChE em relação ao controle (sem inibidor). O solvente teve efeitos negligenciáveis nas concentrações testadas. As linhas mostram a função regressão para o padrão sótio único completo do modelo de inibição. Figura do artigo produzido pelo grupo⁵⁹

Por outro lado, Castro e colaboradores⁶⁴ utilizando um acoplamento flexível nos experimentos salientou que derivados do natural alcalóide piperidina (-)-espectralina não eram susceptíveis de interagir com o sótio ativo da tríade, possivelmente devido ao volume longo da cadeia lateral de alifáticos. De modo semelhante, se os volumes da longa cadeia lateral dos alifáticos de CA_c_1 (11) e CA_c_3 (13) não permitirem os derivados de alcançar o fundo do sótio ativo, elas podem ser capazes de interagir de forma similar ao espectralina ou mesmo donepezil⁶⁵ por interações aromáticas cátion- π e π - π dos grupos de amônio e os agrupamentos aromáticos com os resíduos aromáticos do meio Phe330, Trp84 até a garganta Trp279 do sótio ativo ou no sótio aniónico periférico (SAP), enquanto são esperadas as ligações de hidrogênio de ocorrer com espinha dorsal dos grupos carbamato e amônio dos aromáticos e hidrofóbicas e ligações de hidrogênio doadores dos resíduos do SAP, por exemplo, Tyr70, Tyr121 e Trp279, e Phe288, Phe290, Phe331, Arg289 e Ser286

acima da SAP, na parte superior do gorje, bem como moléculas de água⁶⁵. Uma vez que as paredes do gorje são forradas predominantemente por cadeias laterais resíduos aromáticos, interações hidrofóbicas a partir da longa cadeia alifática destes derivados cardanol, espera-se que sejam uma contribuição significativa para a identificação pela AChE e modulação das suas atividades.

Conclusões

Neste trabalho apresentamos, cálculos de estrutura eletrônica envolvendo 15 moléculas derivadas do cardanol, e da rivastigmina com o objetivo principal de utilizar os lipídeos fenólicos não isoprenóides do cajueiro como matéria prima para obtenção racional de novos candidatos a inibidores da enzima AChE. Para tanto foram utilizados os métodos HartreeFock-Restricto e B3LYP e as funções de base 6-31G, 6-31G(d), 6-31+G(d), 6-311G(d,p), 6-311G(2d,p) e 6-311+G(2d,p).

A partir das estruturas propostas fizemos uma análise binária das propriedades eletrônicas e verificamos uma maior correlação das estruturas (6), (8), (11) e (13) com a rivastigmina. Esta indicação de correlação destas estruturas ocorre para maioria das propriedades quando analisadas duas a duas. Além da análise binária foi feito um estudo de PCA, onde foi possível diminuir o número de propriedades eletrônicas iniciais para as propriedades mais relevantes, que foram HOMO-1, LUMO+1, GAP e a diferença HOMO - HOMO-1, a partir destas propriedades construímos as PCs e conseguimos selecionar as estruturas que mais se correlacionavam com a rivastigmina, que novamente foram as estruturas (6), (11) e (13), além da estrutura (8). Assim sendo, das duas análises podemos concluir que as estruturas (6), (8), (11) e (13) foram as que mais se correlacionam com a rivastigmina.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos órgãos financiadores FINATEC, CAPES e CNPq.

Referências Bibliográficas

- Francis, P. T. e Palmer, A. M. e Snape, M. e Wilcock, G. K., J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 66, 1999, 137-147.

2. IBGE/Diretoria de Pesquisas. Coordenação de População e Indicadores Sociais. Gerência de Estudos e Análises da Dinâmica Demográfica., Projeção da População do Brasil por Sexo e Idade para o Período 1980-2050, Revisão 2008, www.ibge.gov.br/.
3. Global prevalence of dementia a Delphi consensus study Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H., Fratiglioni L., Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Scazufca M, for Alzheimer's Disease International, *The Lancet*, 366, 17 de dezembro de **2005**, 2112-2117.
4. Acessado em 22/11/2006, www.psiqweb.med.br/dsm/demencia.html#alzheimer.
5. Boyle, N. A. J., Talesa, V., Giovannini, E., Rosi, G. e Norton, S. J., *J. Med. Chem.*, 40, **1997**, 3009-3013.
6. Tanzi, R. E., GEORGE-HYSLOP, P. H., Haines, J. L., Polinsky, R. J., Nee, L., Foncin, J. F., Neve, R. L., McClatchey, A. I., Conneally, P. M. e Gusella, J. F., *Nature*, 329, **1987**, 156-157.
7. Joachim, C. L., Mori, H. e Selkoe, D. J., *Nature*, 341, **1989**, 226-229.
8. Schenk, D. B., Rydel, R. E., May, P., Little, S., Panetta, J., Lieberburg e Sinha, S., *J. Med. Chem.*, 38, **1995**, 4141-4154.
9. Hufani, M., Filocamo, L., Lappa, S. e Maggi, A., Drugs in the future, 22, **1997**, 397-410.
10. Coyle, J. T., Price, D. L., e Delong, M. R., *Science*, 219, **1983**, 1184-1190.
11. Bartus, R. T., Dean III, R. L., Beer, B. e Lippa, A. S., *Science*, 217, **1982**, 408-419.
12. Benzi, G. e Moretti, A., *Eur. J. Pharmacol.*, 346, **1998**, 1-13.
13. Giacobine, E. e Becker, R., In: Alzheimer's disease: Molecular biology to therapy, **1997**, 188-204.
14. Sugimoto, H., Iimura, Y., Yamanishi, Y. e Yamatsu, K., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2, **1992**, 871-876.
15. Villalobos, A., Blake, J.F., Biggers, C. K., Butler, T. W., Chapin, D. S., Chen, Y. L., Ives, J. L., Jones, S. B., Liston, D. R., Nagel, A. A., Nason, D. M., Nielsen, J. A., Shalaby, I. A. e White, W. F., *Journal of Medicinal Chemistry*, 37, **1994**, 2721-2734.
16. Kawakami, Y., Inoue, A., Kawai, T., Wakita, M., Sugimoto, H. e Hopfinger, A. J., *al Chemistry Letters*, 4, **1996**, 1429-1446.
17. Yuan-Ping, P., Hong, F., Quiram, P., Jelacic, T. e Brimijoin, S., ciety, *Perkin Transactions* 1, 2, **1997**, 171-176.
18. Tabarrini, O., Cecchetti, V., Temperini, A., Filipponi, E., Lamperti, M. G. e Fravolini, A., *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 9, **2001**, 2921-2928.
19. Barreiro, E. J., Camara, C. A., Verli, H., Brazil-más, L., Castro, N. G., Cintra, W. M., Aracava, Y., Rodrigues, C. R. e Fraga, C. A. M., *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, **2003**, 1144-1152.
20. Colombres, M., Inestrosa, N. C. e Sagal, J. P., *Current Pharmaceutical Design*, 10, **2004**, 3121-3130.
21. Cavalcanti, J. J. V., Projeto Revitaliza do Caju: Programa de Reuperação e Desenvolvimento da Cajucultura, Secretaria da Agricultura e Pecuária, Governo do Rio Grande do Norte, 2000, Apoio: Fundo Brasileiro para a Biodiversidade/FUNBIO, EMBRAPA, São Paulo, 1998, Disponível em www5.prosigar.br/caju/estudos/projetocaju.pdf. Acesso em 10 de setembro 2005.
22. Aggarwal, J. S., *Journal of the Colour Society*, **1975**, 1-9.
23. Ramaiah, M. S., *Fette-Seifen-Anstrichmittel*, 78, **1976**, 472-477.
24. Attanasi, O., Serra-zanetti, F., Perdomi, F., Scagliarini, A., *La Chimica & L'Industria*, 61, **1979**, 718-725.
25. Pesquisas FUNCAP -Revista de Ciência e Tecnologia, 2, **1999**, 14-18.
26. Tyman, J. H. P., Elsevier: Amsterdam, 9, **1991**, 313-381.
27. Santos, M. L. Dos, Universidade de Brasília -UnB, **1997**, Tese de Doutorado.
28. logrado, L. P. L., Universidade de Brasília -UnB, **2004**, Dissertação de Mestrado.
29. Santos, M. L. DOS e Magalhães, Gouvan C. De, *J. Braz. Chem. Soc.*, 10, **1999**, 13-20.
30. Resck, I. S., Santos, M. L. dos e Romeiro, L. A. S., *Heterocycles*, 65, **2005**, 311-318.
31. Logrado, L. P. L., Santos, M. L. dos, Silveira, D., Romeiro L. A. S., Moraes, M. O., Cavalcanti, B. C., Lotufo, L. V. e Pessoa, C. do ó, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16, **2005**, 1217-1225.
32. Santos, M. L., Magalhães, G. C. de e Brazfilho, R., *Journal of Organometallic Chemistry*, 526, **1996**, C15-C19.
33. Santos, M. L. e Magalhães, G. C. de, *Química Nova*, 16, **1993**, 534-536.
34. Carvalho, M. G. and Brazfilho, R., Santos, M. L. e Magalhães, G. C. de, *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, 4, **1993**, 158-164.
35. Romeiro, L. A. S., Silva, V. C., Murta, M. M., Magalhães, G. C., Logrado, L. P. L., Santos, M. L., Resck, I. S., Araujo, E. M. De, Garcia, S. e Ortiz, G. M. D., Pedido de Patente no INPI -PI 0304630-3, 2003 e PI 0406040-7, **2004**.
36. Romeiro, L. A. S., Silva, V. C., Murta, M. M., Magalhães, G. C., Logrado, L. P. L., Santos, M. L., Resck, I. S., Araujo, E. M. De, Garcia, S., Ortiz, G. M. D., Leitão, A. A. C., Silva, C. S. da, Freitas, Z. M. F de, e Santos, E. P., PCT WO **2006/042391 A2**.
37. Greenblatt H.M., Dvir H., Silman I. e Sussman J.L., *J Mol Neurosci*, 20, **2003**, 369-383.
38. Attila Szabo and Neil S. Ostlund, A. Modern Quantum Chemistry -Introduction to advanced Eletronic Structure Treory, Dover Publicações, **1996**.
39. Stewart, J. J. P., *J. Comp. Chem.*, 10, **1989**, 209-220.
40. Roothan C. C. J., *Rev. Mod. Phys.*, 23, **1951**, 69.
41. Becke, A. D., *Phys. Rev. A*, 38, **1988**, 3098.
42. Axel D. Becke, *The Journal of Chemical Physics*, 98, **1993**, 5648-5652.

43. Lee C. e Yang W. and Parr R. G., *Phys Rev. B*, 37, **1988**, 785.
44. De Paula, A. A. N., Universidade Federal de Juiz de Fora -UFJF, Dissertação de Mestrado, Departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora.
45. Kovács, Zsolt László, Redes Neurais Artificiais: Fundamentos e Aplicações, Editora Livraria da Física, 3, **2002**, São Paulo.
46. Sato, F., Universidade Estadual de Campinas -UNICAMP, Tese de Doutorado, Departamento de Física Aplicada -DFA, Instituto de Física Gleb Wataghin (IFGW).
47. Abreu, J. F. F., Universidade Federal de Juiz de Fora -UFJF, **2000**, Monografia de Bacharelado, Departamento de Física -Juiz de Fora-MG.
48. Beale, R., Jackson, e T., Bristol and Philadelphia, Neural Computing: An Introduction, Institute of Physics Publishing, **1992**.
49. Alferes J. J., Damásio C. V. e Pereira, L. M., Principles and Practice of Semantic Web Reasoning, **2003**, 16-32.
50. Chatfield, C. e Collins, A. J., Introduction to Multivariate Analysis, Champman & Hall, **1980**, Cambrigde University press.
51. Rezende, L. A., Universidade Federal de Juiz de Fora -UFJF, **2002**, Dissertação de Mestrado, Departamento de Física -Juiz de Fora-MG.
52. K. Pearson, The London, Edinburgh and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, 2, **1901**, 559-572.
53. Hotlling, H, *Journal of Psychology*, 24, **1933**, 417-441 and 498-520.
54. Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G. e Healy, E. F., *J. Am. Chem. Soc.*, 107, **1985**, 3902-3909.
55. Chiba 2618588, Cache 5.0, fujitsu Limited, Chiba City, japan.
56. Frisch, M. J. e et al, Gaussian98, Technical Report, **1998**, Pittsburgh, PA, Revision A.9.
57. De Paula A. A. N., Martins J. B. L., Gargano R., Dos Santos M. L. e Romeiro L. A. S., *Chem. Phys. Lett.*, 446, **2007**, 304-308.
58. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. RobbJ., R. Cheeseman, J. A. Montgomery, T. V. Jr., K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, T. N. M. Ishida, Y. Honda, O. Kitao, M. K. H. Nakai, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. A. V. Bakken, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, A. J. A. O. Yazyev, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, K. M. P. Y. Ayala, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. D. V. G. Zakrzewski, A. D. Daniels, M. C. Strain, D. K. M. O. Farkas, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. V. O. J. B. Foresman, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, B. B. S. J. Cioslowski, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, R. L. M. I. Komaromi, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, , A. N. C. Y. Peng, M. Challacombe, P. M. W. Gill, W. C. B. Johnson, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, Gaussian03, **2004**.
59. De Paula A. A. N., Martins J. B. L., Dos Santos M. L., Nascente L. de C., Romeiro L. A. S., Areas T. F. M. A. Vieira K. S. T., Gambo N. F., Castro N. G. e Gargano R., *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, **2009**.
60. Bar-On P., Millard C. B., Harel M. and Dvir H., Enz A., Sussman J. L. e Silman I., *Biochem.*, 41, **2002**, 3555-3564.
61. Bartolucci C., Siotto M., Ghidini E., Amari G., Bolzoni P. T., M. Racchi, Villetti G., Delcanale M. e Lamba D., *J. Med. Chem.*, 49, **2006**, 5051-5058.
62. Darvesh S., Darvesh K. V., McDonald R. S., Mataija D., Walsh R., Mothana S., Lockridge O. e Martin E., *J. Med. Chem.*, 51, **2008**, 4200-4212.
63. Sterling J., Herzog y., Goren T., Finkelstein N., Lerner D., Goldenberg W., Miskolczi I., Molnar S., Rantal F., Tamas T., Toth G., Zagyva A., Zekany A., Lavian G., Gross A., Friedman R., Razin M., Huang W., Krais B., Chorev M., Youdim M. B. e Weinstock M., 1463 *J. Med. Chem.*, 45, **2002**, 5260-5279.
64. Castro N. G., Costa R. S., Pimentel L. S. B., Danuello A., Romeiro N. C., Jr C. V., Barreiro E. J., Fraga C. A. M., Bolzani V. S. e Rocha M. S., 1438 *Eur. J. Pharm.*, 508, **2008**, 339-349.
65. Niu C. Y., Xu C. Y., Xu Y., Luo X. M., Duan W. H., Silman I., Sussman J. L., Zhu W. L., Chen K. X., Shen J. H. e Jiang H. L., *J. Phys. Chem. B*, 109, **2005**, 23730-23738.

Ricardo Gargano^{1*}, Alexandre A. N. Paula¹, Luiz A. S. Romeiro², Érica C. M. Nascimento³, Alessandra S. Kiametis¹, Maria L. Santos³, Newton G. Castro⁴, Luciana C. Nascente⁵ e João B. L. Martins³

¹Instituto de Física, Universidade de Brasília, CP 4455, Brasília.

²Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Brasília, Brasília.

³Instituto de Química, Universidade Brasília, CP 4478, Brasília.

⁴Instituto de Ciências Biomedicas, Universidade, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

⁵Universidade Católica de Brasília, Brasília.

*e-mail: gargano@fis.unb.br