UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**MODELAGEM MOLECULAR DE DERIVADOS
ANFETAMÍNICOS E SUA ATIVIDADE
ANTIDEPRESSIVA**

Maíra de Almeida Carvalho Fresqui

Tese apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de doutor
em Ciências (Físico-Química).

Orientador: Prof. Dr. Milan Trsic

São Carlos

2010

Ao meu marido, Cesar, com amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que acreditaram e torceram por mim! A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desta tese, seja pela amizade irrestrita nos bons e maus momentos, seja pela ajuda científica, durante todos esses anos de formação.

Ao meu marido, Cesar, por tudo. Por estar ao meu lado desde o início deste trabalho, por acreditar e confiar em mim. Por me incentivar a ir em frente. Pelo seu amor. Pelas longas horas de conversa, pelas aventuras e desafios que passamos. Por me acompanhar durante o doutorado sanduíche na Inglaterra e me dar todo apoio que necessitei naquele país para continuar em frente. Pelos *scripts* e pela paciência. Agradeço a ele por ser meu marido.

Agradeço a minha família, aos meus pais, Melania e Eduardo por todo amor e carinho, pelas horas de conversa, amizade, compreensão e sobre tudo pela confiança. Também pelo apoio no trajeto de um novo e longo caminho cheio de emoções e desafios. A Norma, amiga que confiou em mim e me ajudou a trilhar esse caminho ao longo dos anos. A Evando, meu padrasto e amigo, também pela sua confiança e amizade. Aos meus irmãos, Joca, Luiz e Bruno e as minhas irmãs Clarisse e Rita pela amizade e confiança. Agradeço especialmente a Clarisse pelo apoio que me deu nesses anos de São Paulo, tornando a saudade de casa menor. Ao meu cunhado Andre e cunhada Suca pela confiança.

Ao Prof. Milan Trsic pela orientação e amizade todos esses anos, o qual me recebeu em seu grupo de braços abertos, depositando em mim muita confiança, ensinando-me não apenas química, mas como ser uma pessoa digna e confiante. Por acreditar em mim e abrir as portas do mundo científico de maneira prazerosa.

Ao Prof. Phil Biggin, orientador do meu doutorado sanduíche na University of Oxford, pela confiança e orientação. Por me mostrar que podemos fazer amizades verdadeiras, mesmo do outro lado do mundo.

Agradeço as secretárias da pós graduação Silvia e Andréia por tudo! Pela paciência e amizade nesses anos de doutorado. Agradeço também a todos os professores do IQSC.

Desde já peço desculpa por esquecer de citar alguns amigos, pois com certeza isso vai ocorrer, mas não pensem que são menos importantes para mim, se seu nome não estiver abaixo foi apenas porque esqueci de escrever.

Agradeço a todos os meus amigos, aqueles que me acompanharam de longe, e os que me acompanharam mais de perto. Agradeço principalmente a alguns deles, os quais tive a oportunidade de conviver mais, e lamento não ter tido a chance de conhecer melhor a outros. Agradeço especialmente a Kátia, grande amiga, a qual chamo de minha irmã loira, que desde o primeiro dia em São Carlos esteve ao meu lado, descobrindo a realidade do mundo, tanto científico quanto particular. Por ter me emprestado uma família quando a minha estava tão longe. Agradeço a ela por ser minha amiga irmã loira. Também agradeço a Olivia péssima, amiga de boas risadas e trabalho. A Luciana Cappelini, pela amizade. A Eliane, outra grande amiga que fiz em São Carlos, que quebrou tantos galhos para mim. A Sandra, que infelizmente nos deixou em outubro, pelas boas horas que passamos juntas. Agradeço a Luciana Carvalho por mostrar que podemos construir uma grande amizade à distância, por ser um doce de pessoa e pelos bons passeios pela Inglaterra e Helsinki. Agradeço a Poli, amiga que “roubei” do meu marido, por me acompanhar nessa trajetória. Agradeço a outros amigos de São Carlos, ao Duzaum e ao Ivan, amigos que me apresentaram seu amigo Cesaum, com quem casei. Ao Wendel, Luigi, Gui e todos da república “Campo minado” pelos bons momentos. Agradeço a outros amigos, Rodrigo Veronezzi, a Amanda, Erivelton, e ao Vitão pela oportunidade de tê-los como amigos!!!!

Agradeço também as minhas amigas de Recife, Zinha, Babie, Amanda, Elisa, Iris, Fharid e Karina que confiaram em mim e me incentivaram a vir para São Carlos para a realização deste objetivo de vida. Agradeço a elas por não deixarem o tempo e a distância acabarem com a nossa amizade.

Agradeço as minhas primas Ana e Nina por tudo. Por serem muito mais que primas, serem amigas e companheiras.

Agradeço aos meus amigos do grupo de química quântica Edson, Marcello, Jeniffer e Ana Claudia pelo excelente ambiente de trabalho, pelas horas de discussão científica e pela amizade.

Agradeço aos meus amigos de Oxford, em particular ao Kia e a Michelle por me ajudarem na parte científica, e a todos do SBCB pelo excelente ambiente de trabalho.

Agradeço em particular àqueles que tive a oportunidade de conviver mais, Miguel, Oli, Kaihsu e Kia, pelas boas horas durante o almoço, tão raro entre os ingleses e por me ajudarem na adaptação em um país com cultura tão diferente. Em particular ao Miguel, que me deu um pouco de calor humano onde as pessoas têm pouco contato físico, dando sempre bom dia pela manhã e tchau na hora de ir embora, cumprimentos tão simples que fizeram do SBCB um lugar mais amistoso. A todo o pessoal do grupo, Phil B., Michelle, Phil S, Craig, Rob, Jayne, Beatrice, Prof. Mark Sanson e aos outros membros que tive menos oportunidade de conversar.

Agradeço também aos ótimos amigos oxfordianos/albaneses Eddie e Tosi pelo excelente lar que compartilhamos. Aos amigos Tarzan e Mathias, importados do Brasil, por levar um pouco do nosso país para tão distante. A amiga Ana Malhado, também brasileira em Oxford, por me mostrar as maravilhas inglesas!

Agradeço a todos aqueles que acreditaram e confiaram em mim, tornando possível esse trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado e pela bolsa de doutorado sanduíche.

RESUMO

As anfetaminas, grupo de moléculas derivadas da anfetamina, são fármacos estimulantes do sistema nervoso central, e possuem, entre outras, atividade antidepressiva sendo sua ação baseada na inativação da enzima monoamina oxidase (MAO) a qual catalisa a desaminação oxidativa de neurotransmissores, como por exemplo, a serotonina e a noradrenalina. Esta enzima pode ser encontrada em duas diferentes isoformas, a MAO A e MAO B.

Este trabalho teve como objetivo o estudo de uma série de derivados anfetamínicos os quais apresentam diferente seletividade e diferentes valores de IC_{50} , variando desde moléculas muito potentes, pouco potentes, até inativas, através da aplicação de técnicas de química-quântica no cálculo de descritores moleculares, bem como a aplicação da mecânica clássica na descrição das interações ligante-receptor a partir de estudos de *docking* e simulações de dinâmica molecular.

Inicialmente, foram aplicados os métodos de química-quântica AM1, HF, DFT (com os funcionais B3LYP e BP86) e MP2 para a determinação do nível de teoria mais apropriado para a otimização da geometria desta série de compostos a partir da comparação entre os resultados teóricos e de raios-X obtidos para a molécula MDMA. O método HF/6-31G(d,p) mostrou os melhores resultados. Desta forma, este método foi utilizado na obtenção das geometrias de mínimo das demais moléculas em estudo.

Posteriormente, estes métodos foram utilizados no cálculo das propriedades estruturais, eletrônicas e físico-químicas, distribuição de cargas derivadas do potencial eletrostático, momento dipolar, energia total, energia dos orbitais de fronteira, GAP de energia entre o orbital ocupado de mais alta energia (HOMO) e o orbital desocupado de mais baixa energia (LUMO), dureza, potencial químico, eletronegatividade, eletronegatividade

absoluta e eletrofilicidade. Assim, foram verificadas possíveis relações entre os descritores calculados e a atividade biológica determinada por Scorza *et al*, Hurtado-Guzmán *et al* and Sterling *et al*.esta para esta série de compostos. A análise destes resultados foi feita através da aplicação da técnica quimiométrica de análise de componentes principais para, desta forma, verificar-se o agrupamento dos compostos segundo a presença ou ausência de atividade biológica na série estudada. Entretanto, não foi possível se identificar um padrão de agrupamento para as moléculas ativas e inativas, sugerindo assim, que estes descritores não são os mais adequados para a descrição da atividade antidepressiva destes compostos.

Em uma segunda etapa, foram feitos estudos de *docking* para seis diferentes estruturas da MAO B (1OJA, 1OJ9, 2BK3, 2V5Z, 2V60 e 2V61) e cinco da MAO A (2BXR, 2BXS, 2Z5X e 2Z5Y) todas disponíveis no banco de dados de proteína, PDB, no qual se avaliou o modo de interação do ligante no sítio ativo da proteína. Os resultados de *docking* para a MAO B mostraram que o tamanho do inibidor é importante para uma correta interação no sítio ativo da enzima, tendo-se em vista que o tamanho da cavidade catalítica é dependente da conformação do aminoácido isoleucina 199 e, que a conformação deste aminoácido está relacionada com o tamanho do ligante. Desta forma, a escolha correta da estrutura da proteína torna-se importante para uma correta descrição do sistema. Os resultados sugerem ainda que o átomo do ligante, no qual ocorre a reação com o receptor, deve estar a uma distância média de 3,5 Å do sítio reativo.

Os resultados de MD mostraram que este aminoácido é flexível na ausência de um inibidor, onde sua conformação varia entre as chamadas formas aberta e fechada ao longo do tempo, porém, quando o estudo é feito na presença de um ligante, sua conformação permanece, de modo geral, constante.

ABSTRACT

The amphetamine family of drugs is central nervous system stimulant drugs. Amphetamine inhibits the monoamine oxidase enzyme (MAO, isoforms A and B) which catalyzes the oxidative deamination of the neurotransmitter, *e.g.*, serotonin and noradrenalin.

In the present study, the aim was to understand the main features of a series of amphetamines derivatives, which have different substrate selectivity and a good range of activity varying from very potent to low potent compounds, even inactive molecules by the application of quantum chemistry techniques to calculate the molecular descriptors, as well as the application of a classical mechanics to describe the ligand-receptor interactions from docking studies and molecular dynamics (MD) simulation.

First of all, was applied the AM1, HF, DFT (B3LYP and BP86 functionals) and MP2 quantum chemical methods to analyze which theoretical level is more appropriated for the molecular geometry optimization of this series of compounds from a comparison between the theoretical results for MDMA molecule and its X-ray data. The HF/6-31G** calculations produced results in close agreement with X-ray crystallography. Thus, was employed the same method for the molecular optimization of the other compounds in the series under investigation.

Furthermore, the same method was applied to calculate quantum-chemical parameters (atomic charges, total energy, highest occupied molecular orbital -HOMO- lowest unoccupied molecular orbital -LUMO- dipole moments, hardness, electronegativity, chemical potential, absolute electronegativity and electrophilicity). It was examined possible correlations between the theoretical parameters as calculated by us with the biological activity results as reported by Scorza *et al*, Hurtado-Guzmán *et al* and Sterling *et al*. The chemometric technique of Principal Component Analysis for the quantum chemical parameters of these compounds was

employed in order to identify some pattern of grouping between the active and inactive molecules. However, it was not possible to identify a pattern between active and inactive compounds suggesting that these above-mentioned parameters are not the best descriptors to evaluate the antidepressant activity for this group of molecules.

Later, a docking study was performed for six different PDB structure of MAO B (1OJA, 1OJ9, 2BK3, 2V5Z, 2V60 e 2V61) and five different structure of MAO A (2BXR, 2BXS, 2Z5X e 2Z5Y). It was possible to analyze the ligand-receptor interaction and, according to the bind site size, the activity molecules showed a 3.5Å distance between the reactive atoms of the inhibitor and of the protein. Because the conformation of the isoleucine 199 (Ile 199) amino acid can change, the chosen of the correct PDB structure is important for a write description of that interaction.

The MD results for the 1OJA structure showed that the Ile199 is flexible in the absence of an inhibitor, where its conformation varies between so-called closed and open forms over the simulation time. However, when the study was done in the presence of a ligand, its conformation remains by generally constant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Estrutura da anfetamina.....	21
Figura 2.2 – Representação esquemática do mecanismo de reação da MAO (a) com seu substrato natural e (b) com aminas proposta por Romeiro e colaboradores ¹⁴	23
Figura 2.3 – Sítio de reação entre o inibidor e a MAO (a) N-(2-aminoetil)- <i>p</i> -clorobenzamida e (b) <i>trans</i> -2- fenilciclopropilamina.....	24
Figura 2.4 – Estruturas cristalográficas da (a) MAO A em amarelo e (b) MAO B, cadeia A em azul e cadeia B em vermelho. O FAD encontra-se representado na forma palito no interior de ambas enzimas.....	26
Figura 2.5 – Diagrama da estrutura monomérica da (a) MAO A e (b) MAO B. O FAD está representado em amarelo, o domínio da ligação do FAD em azul e do substrato em vermelho. O domínio de ligação com a membrana está em verde. As cavidades de entrada e do substrato em ciano.....	27
Figura 2.6 – Comparação do sitio ativo da (a) hMAO A e (b) hMAO B, com seus respectivos inibidores, clorgilina e deprenil. Ambos formam uma ligação covalente com através N do FAD. O loop está representado em vermelho na hMAO A e em verde na MAO B.....	29
Figura 4.1 – Representação esquemática e numeração dos átomos da anfetamina envolvidos na análise conformacional do nitrogênio para determinação da conformação mais estável.....	48
Figura 4.2 – Possíveis modos de interações entre orbitais moleculares de nucleófilos e eletrófilos segundo o conceito de FERMO.....	50
Figura 4.3 – Fluxograma dos passos de uma simulação de dinâmica molecular.....	56
Figura 4.4 – a) Esquema hierárquico de variáveis e b) projeção dos objetos sobre as PC's.....	60
Figura 5.1 – Gráfico do RMS da estrutura cristalográfica e da estrutura obtida por diferentes métodos para a molécula MDMA.....	64
Figura 5.2 – (a) Gráfico do <i>scan</i> da posição do átomo de N da molécula anfetamina com um passo de 10°, de 0° a 360° com o método AM1 e (b) geometria AM1 de menor energia da anfetamina.....	66
Figura 5.3 – Gráfico da comparação entre as propriedades químico-quânticas obtidas com as conformações R e a otimizada por MM da (a) energia total, (b) momento de dipolo, energias do (c) HOMO, (d) LUMO, (e) GAP, cargas do (f) C8, (g) N9 e (h) H18.....	68
Figura 5.4 - Gráfico da propriedade calculada <i>versus</i> IC ₅₀ da (a) energia total, (b) momento de dipolo, energias do (c) HOMO (d) LUMO, (e) GAP, cargas do (f) C8, (g) N9 e (h) H18.....	70

Figura 5.5 – Representação esquemática do orbital molecular FERMO.....	73
Figura 5.6 – Comparação da energia do HOMO e do FERMO para as moléculas do (a) Grupo 1 e (b) Grupo 2.....	74
Figura 5.7 – Gráfico (a) dos escores de PC1 versus PC2 e (b) dos pesos, para os compostos do Grupo 1 utilizando a energia do HOMO.....	76
Figura 5.8 – Gráfico dos escores de PC1 versus PC2 dos compostos do Grupo 1 utilizando o conceito de FERMO para (a) todos os compostos do grupo, (b) excluindo-se os compostos com átomos de enxofre (c) gráfico dos pesos de PC1 versus PC2 dos compostos do Grupo 1.....	78
Figura 5.9 – Gráfico dos escores de PC1 versus PC2 das moléculas do Grupo 2 utilizando a energia do HOMO para (a) todas as moléculas do grupo e, excluindo as moléculas (b) 55n, 55o, 55p e 55q e (c) 55n, 55o, 55p, 55q e selegilina.....	79
Figura 5.10 – Gráfico de PC1 versus PC2 dos pesos para as moléculas do Grupo 2 utilizando-se a energia do HOMO.....	80
Figura 5.11 – Gráfico dos escores de PC1 versus PC2 para (a) todas as moléculas do Grupo 2, (b) moléculas do Grupo 2 excluindo-se os compostos 55n, 55o, 55p e 55q e (c) moléculas do Grupo 2 excluindo-se os compostos 55n, 55o, 55p, 55q e selegilina.....	81
Figura 5.12 – Gráfico dos pesos de PC1 versus PC2 para todas as estruturas do Grupo 2.....	82
Figura 5.13 – Gráfico dos escores de PC1 versus PC2 para as moléculas do (a) Grupo 1 e (b) Grupo 2.....	83
Figura 5.14 – Comparação entre a melhor conformação do ligante obtida no estudo de <i>docking</i> , isto é, conformação com maior valor de score (ciano) das moléculas (a) ISN, (b) FOH, (c) 1PB, (d) C17, (e) C18 e (f) SAG, com seu dado de cristalografia (amarelo), para a estrutura PDB 1OJA. As moléculas de água cristalográficas encontram-se representadas na forma bola.....	87
Figura 5.15 – Comparação entre a melhor conformação do ligante obtida no estudo de <i>docking</i> , isto é, conformação com maior valor de score (ciano) das moléculas (a) ISN, (b) FOH, (c) 1PB, (d) C17, (e) C18 e (f) SAG, com seu dado de cristalografia (amarelo), para a estrutura PDB 2BK3. As moléculas de água cristalográficas encontram-se representadas na forma bola.....	88
Figura 5.16 – Representação simplificada da estrutura 1OJA da MAO B (amarelo) com o FAD (estrutura bola-palito) da (a) estrutura cristalográfica e, para os melhores resultados de <i>dockingback</i> para o ligante ISN (forma palito), (b) com moléculas de águas cristalográficas e (c) sem moléculas de águas cristalográficas.....	89
Figura 5.17 – Gráfico da melhor função de escore obtida no GOLD (GOLD score) para os 63 ligantes anfetamínicos estudados para (a) MAO A e (b) MAO B.....	91
Figura 5.18 – Representação esquemática dos compostos com o menor valor do GOLDScore com a proteína (cinza) o FAD (forma palito-bola) e águas cristalográficas (forma bola) do ligante (forma palito), (a) 53d para a estrutura 2Z5X e (b) 53e na estrutura 2Z5Y.....	92

Figura 5.19 – Gráfico das moléculas ativas da série de 63 derivados anfetamínicos em estudo versus a função de escore (Gold Score) para as estruturas (a) 2Z5X, 2Z5Y, 2BXR, 2BXS e 1O5W da MAO A, (b) 2BXR, 2BXS e 1O5W da MAO A, (c) 1OJA, 1OJ9, 2BK3, 2V5Z, 2V60 E 2V61 da MAO B e (d) 1OJ9, 2BK3, 2V5Z, 2V60 E 2V61 da MAO B.....94

Figura 5.20 – (a) Gráfico do raio da cavidade do sitio ativo das estruturas 1OJA e 2BK3 em função do eixo Z e, representação esquemática da cavidade calculada (branco) para as estruturas (b) 1OJA e (c) 2BK3.....95

Figura 5.21 – Representação esquemática da conformação do aminoácido ILE 199 (bola) nas estruturas (a) 1OJA e (b) 2BK3. Moléculas do ligante, ISN e do cofator, FAD, estão representadas na forma palito, águas cristalográficas na forma bola e proteína em amarelo.....96

Figura 5.22 – Comparação das estruturas 1OJA (ciano) e 2BK3 (laranja) e das suas moléculas de água cristalográficas em vermelho e amarelo para as duas estruturas, respectivamente.....97

Figura 5.23 – Gráfico da variação do tamanho da cavidade do sitio ativo da estrutura cristalográfica em relação ao eixo Z dos seis diferentes rotâmetros do aminoácido Ile 199 para as estruturas (a) 1OJA e (b) 2BK3.....97

Figura 5.24 – Representação esquemática da posição de docagem do ISN, FOH e Selegilina (forma palito) na estrutura 1OJA da MAO B para (a) a estrutura cristalográfica e rotâmetro 4 e (b) para o rotâmetro 1. O ILE 199 está representado na forma bola.....99

Figura 5.25 – Gráfico do tamanho do sitio ativo das estruturas (a) 1OJA para os ligantes ativos, (b) 1OJA para os ligantes inativos, (c) 2BK3 para os ligantes ativos e (d) 2BK3 para os ligantes inativos.....100

Figura 5.26 – Representação esquemática dos resultados com maior valor de GoldScore para as moléculas (a) selegilina, (b) ETA e (c) 52a na estrutura 1OJA (amarelo) e (d) selegilina, (e) ETA e (f) 52a para a estrutura 2BK3 (verde). Ile 199 representado em azul e as águas cristalográficas em azul.....101

Figura 5.27 – Gráfico do GoldScore para o ISN nas trajetórias MD da estrutura 1OJA.....103

Figura 5.28 – Snapshot das trajetórias MD da estrutura 1OJA com as melhores posições de docagem do ISN nas trajetórias (a) 1, (b) 7, (c) 9, (d) 14, (e) 33 e (f) 66. Ile 199 na forma está representado na forma bola.....104

Figura 5.29 – Estrutura molecular do aminoácido isoleucina.....105

Figura 5.30 – MAO B presa a bicamada lipídica, o aminoácido Ile 199 (vermelho) nas cadeias A (azul) e B(amarelo) e a molécula do FAD.....107

Figura 5.31 – Representação esquemática da estrutura 2BXS (cinza) com a molécula de FAD e o ligante (estruturas palito) após o docking dos compostos (a) ETA, (b) 2,4-DMA, (c) Anfetamina, (d) 2Br-4,5-MDA, (e) 45b e (f) 2NO₂-4,5-MDA.....109

Figura 5.32 – Representação esquemática da molécula de FAD, o ligante (estruturas palito) e do ILE 199 (azul) após o docking dos compostos (a) selegilina, (b) 53b, (c) ETA, (d) 2Cl-4,5-MDA, (e) 2,4-DMA e (f) 2NO₂-4,5-MDA, no sitio ativo da estrutura 2BK3 (verde).....110

Figura 5.33 – Representação esquemática do sistema utilizado na simulação MD com as águas cristalográficas e do solvente em vermelho, bicamada lipídica em azul e proteína no centro, levemente azulada.....112

Figura 5.34 – Gráfico da distribuição do ângulo diédrico C2C5C6C8 na simulação MD da estrutura 1OJA para (a) cadeia A e (b) cadeia B.....114

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Resíduos de aminoácido do sítio ativo das enzimas hMAO A e hMAO B.....	28
Tabela 2.2 – Compostos e atividade biológica do Grupo 1 de derivados anfetamínicos com sete posições de substituição.....	32
Tabela 2.3 – Compostos e atividade biológica do Grupo 1 de derivados anfetamínicos com três posições de substituição.....	35
Tabela 2.4 – Tabela 2.4 – Estrutura molecular da selegina e IC ₅₀	36
Tabela 2.5 – Compostos e atividade biológica do Grupo 2 de derivados anfetamínicos.....	36
Tabela 2.6 – Compostos e atividade biológica do Grupo 2 de derivados anfetamínicos com três posições de substituição.....	37
Tabela 5.1 – Energia total das anfetaminas calculadas com os métodos AM1 e HF/6-31G(d,p).....	67
Tabela 5.2 – Estruturas PDB referentes às enzimas MAO A e MAO B, ligante complexado e esta estrutura e sua abreviação.....	86
Tabela 5.3 – Valores do ângulo diédrico C2C5C6C8 do ILE 199 obtidos durante a dinâmica molecular da estrutura 1OJA sem ligante.....	105
Tabela A.1 – Nomenclatura e sigla dos aminoácidos.....	132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

QC	Química computacional
QQ	Química quântica
AM1	<i>Austin Model 1</i>
HF	Método de Hartree-Fock
MP2	Moller-Plesset em Segunda Ordem
DFT	Teoria do Funcional da Densidade
MM	Mecânica molecular
PCA	Análise de componentes principais
MD	Dinâmica molecular
OM	Orbital molecular
HOMO	Orbital molecular ocupado de mais alta energia
LUMO	Orbital molecular desocupado de mais baixa energia
FERMO	Orbital Molecular de Fronteira Efetivo de Reação
CHELPG	<i>Charge from Eletrostatic Potencial Grid based</i>
MAO	Monoamina oxidase
MAO A	Monoamina oxidase, isoforma A
MAO B	Monoamina oxidase, isoforma B
hMAO	Monoamina oxidase humana
rMAO	Monoamina oxidase de rato
IMAO	Inibidores da enzima monoamina oxidase
5-HT	Serotonina
DA	Dopamina
NE	Noradrenalina
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
SE	Sem efeito

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
MDMA	3,4-metilenodioximetanfetamina, ecstasy
RMS	<i>Root Mean Square</i>
IC ₅₀	Concentração necessária para inibição de 50% da população

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 DEPRESSÃO E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	20
2.1 Depressão.....	20
2.2 Anfetamina.....	21
2.3 Monoamina oxidase.....	23
2.3.1 Diferenças entre a MAO A e MAO B.....	26
2.4 Inibidores da MAO.....	29
2.5 Os compostos de interesse.....	30
3 OBJETIVOS.....	38
3.1 Objetivo geral.....	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
4 METODOLOGIA.....	40
4.1 Cálculos de química quântica.....	41
4.2 Otimização da geometria molecular.....	45
4.2.1 Determinação do nível de cálculo.....	46
4.2.2 Otimização da geometria molecular das anfetaminas.....	46
4.2.3 Estudo configuracional e conformacional.....	47
4.3 Escolha e determinação dos descritores moleculares.....	48
4.4 Escolha e preparação da estrutura, estudos de <i>docking</i> e dinâmica molecular.....	51
4.4.1 <i>Docking</i> molecular.....	52
4.4.2 Simulação de dinâmica molecular.....	55
4.4.3 Campos de força.....	58
4.5 Análise de componentes principais.....	59
4.6 Infra-estrutura.....	61

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1 Estudos de química quântica.....	62
5.1.1 Determinação da metodologia de cálculo.....	62
5.1.2 Otimização da geometria molecular.....	65
5.1.3 Estudo configuracional e conformacional.....	65
5.2 Determinação do FERMO.....	72
5.3 Relação entre as propriedades calculadas e o IC ₅₀ das anfetaminas.....	75
5.3.1 PCA Grupo 1.....	75
5.3.2 PCA Grupo 2.....	79
5.4 <i>Docking</i> molecular.....	84
5.4.1 <i>Dockingback</i> e crossdocking.....	85
5.4.2 <i>Docking</i> das moléculas do Grupo 1 e do Grupo 2.....	90
5.4.3 Diferenças entre as seis estruturas PDB da MAO B em estudo.....	95
5.4.4 Estudo de <i>dockingback</i> da ISN nas trajetórias MD da 1OJA.....	102
5.4.5 Estudo de <i>docking</i> para a MAO A e MAO B.....	108
5.5 Dinâmica molecular.....	111
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	116
REFERÊNCIAS.....	118
ANEXO A.....	132

1 INTRODUÇÃO

A química computacional (QC) tem se tornado cada vez mais importante no planejamento e descoberta de novas moléculas bioativas (fármacos) através do cálculo de propriedades moleculares e aplicações de ferramentas estatísticas. Este avanço na QC foi impulsionado pelo grande e rápido desenvolvimento dos recursos computacionais, os quais diminuíram o tempo de processamento de dados, isto é, o tempo de cálculo, bem como o avanço nos programas disponíveis para cálculos dos parâmetros¹.

Neste sentido, a mecânica clássica e a química quântica (QQ) têm auxiliado de modo significativo no estudo de moléculas com atividade biológica. Em particular, a anteriormente chamada farmacologia quântica, hoje, bioinformática, vem sendo utilizada no cálculo da estrutura eletrônica de compostos no qual, juntamente com a termodinâmica estatística, com a integração da linguagem e de conceitos químicos, permitem a interpretação e a racionalização de propriedades macroscópicas com fundamentos em nível atômico-molecular².

Neste trabalho, utilizou-se diferentes técnicas computacionais, tanto de química quântica, como a mecânica clássica, para se avaliar uma série de compostos anfetamínicos, conhecida classe de moléculas utilizadas no tratamento da depressão.

2 DEPRESSÃO E SUAS CARACTERÍSTICAS

2.1 Depressão

A depressão é uma doença mental, também conhecida como distúrbio de humor, que afeta diversas funções do organismo humano, como por exemplo, as funções cognitivas (atenção, concentração, memória, motivação, auto-estima) vegetativas (sono, apetite) somáticas (dores estomacais, cefaléia) entre outras. Altera o humor e o pensamento, a forma como a pessoa se sente e como pensa, ocasionado por uma alteração da ação dos neurotransmissores no cérebro³. O custo econômico da depressão, considerando-se a perda de produtividade e as consequências sociais, é muito elevado e o custo em sofrimento humano é incalculável. Estima-se que 15% das pessoas com depressão grave tentam suicídio e mais de 60% dos suicídios são atribuíveis a depressão⁴.

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que cerca de 121 milhões de pessoas no mundo sofrem de depressão, sendo 24 milhões só na América Latina e Caribe⁵. Ainda segundo a OMS, os tratamentos hoje disponíveis são eficazes em apenas 60% a 80% dos casos diagnosticados. Entretanto, devido a fatores de ordem social, como a falta de informação, preconceitos e estigmas relacionados a distúrbios mentais, menos de 25% dos pacientes recebem o tratamento adequado⁵.

Tendo-se em vista que a depressão envolve distúrbios emocionais, torna-se difícil modelar a depressão em animais. Sendo assim, uma maneira alternativa de estudo é feita através da avaliação do efeito antidepressivo dos medicamentos em humanos⁶. Na década de 50, observou-se que pacientes com tuberculose submetidos a tratamento com iproniazide, apresentaram como efeito colateral, uma melhora na energia e de humor^{7,8}. Simultaneamente,

o medicamento anti-histamínico, imipramina, também apresentou efeitos antidepressivos. Posteriormente, percebeu-se que pacientes com depressão apresentavam concentrações desbalanceadas dos neurotransmissores noradrenalina (NE)^{9,10} e serotonina (5-HT)¹¹ no cérebro e que fármacos antidepressivos aumentavam a concentração extracelular destes neurotransmissores através da inibição de seu catabolismo ou da sua recaptação pelas terminações nervosas⁶. Essa deficiência no balanceamento das concentrações da 5-HT e da NE é conhecida como hipótese monoaminérgica¹².

Assim, com o avanço das pesquisas científicas, foram propostos diferentes mecanismos para o tratamento contra a depressão⁶. Neste trabalho, utilizou-se a hipótese monoaminérgica para o estudo de uma série de anfetaminas substituídas, as quais atuam no bloqueio da enzima monoamino oxidase (MAO)^{13,14} responsável pela degradação dos neurotransmissores.

2.2 Anfetamina

A anfetamina ((±)-1-fenilpropan-2-amina, Figura 2.1) e seus derivados são o grupo mais comum de fármacos psicoestimulantes, causadores de euforia. Seu efeito está relacionado com o aumento em nível sináptico de aminas biogênicas, como a dopamina (DA), norepinefrina (noradrenalina) e 5-hidroxitriptamina (serotonina)^{15,16,17}.

Figura 2.1 – Estrutura da anfetamina

A anfetamina foi sintetizada pela primeira vez em 1887 por Lazar Edeleano¹⁸ e seu efeito simpaticomimético (substâncias que imitam os efeitos do hormônio epinefrina (adrenalina) e do hormônio/neurotransmissor NE) foi descrito em 1933^{19,20,21}. Seu efeito psicoestimulante foi descrito em 1935 no tratamento clínico de narcolepsia²². Em 1936 iniciou-se o uso de benzedrina (mistura ramêmica da anfetamina) no tratamento contra obesidade, déficit de atenção e mal de Parkinson²³. Foi também utilizado para fins variados como, por exemplo, durante a guerra civil espanhola e na segunda guerra mundial (pelas tropas americanas, alemãs, britânicas e japonesas) para inibir a fadiga dos combatentes, contra a depressão e obesidade, entre outras funções²⁴.

Atualmente, a anfetamina é proibida em vários países. Em alguns países da Europa a substância foi totalmente proibida, sendo encontrada somente de forma clandestina, vinda de outros locais. No Brasil a substância é comercializada em forma de remédios para tratamento de obesidade e de pessoas que sofrem de distúrbios psicológicos, sendo encontrada, portanto, em medicamentos controlados que exigem receita médica.

Os compostos semelhantes à anfetamina são classificados como agonistas de ação indireta das sinapses noradrenérgicas, dopaminérgicas e serotoninérgicas, tendo ações que resultam na inibição da recaptação dos neurotransmissores bem como na inibição da MAO (hipótese monoaminérgica). Entende-se por agonista os compostos que quando em contato com seu receptor, iniciam sua resposta fisiológica ou farmacológica através do aumento ou diminuição da função celular.

As anfetaminas (denominação utilizada para a classe de compostos derivados da anfetamina) são inibidores competitivos da enzima monoamina oxidase (MAO) a qual catalisa a desaminação oxidativa de uma série de monoaminas como, por exemplo, dos neurotransmissores catecolamina e serotonina. O processo oxidativo desta enzima está descrito no item 2.3 a seguir.

2.3 Monoamina oxidase

A monoamina oxidase é uma enzima monotópica²⁵, portadora de flavina, localizada na membrana externa das mitocôndrias e encontrada nos terminais nervosos, no fígado e em outros órgãos. Esta enzima oxidativa inativa as aminas biogênicas, tais como NE, DA, 5-HT, triptamina e tiramina, convertendo-as aos aldeídos correspondentes¹⁴, como pode ser visto na representação esquemática da Figura 2.2.

(a)

(b)

Figura 2.2 – Representação esquemática do mecanismo de reação da MAO (a) com seu substrato natural e (b) com aminas proposta por Romeiro e colaboradores¹⁴.

O mecanismo de inibição da MAO está baseado na desaminação oxidativa dos neurotransmissores, onde há a formação do intermediário, uma imina, e a redução do cofator, uma molécula de flavina adenina dinucleotídeo, FAD, o qual é reoxidado por moléculas de O_2 (aceptor de elétrons) sendo convertido a H_2O_2 . O intermediário imina é hidrolisado através de um processo não enzimático, produzindo amônia e o aldeído correspondente.

Este mecanismo pode, ainda, ser dividido em dois diferentes mecanismos de acordo com o inibidor, conforme pode ser visto na Figura 2.3 abaixo, onde ligantes com duplas e triplas ligações, como por exemplo, o *N*-propargilsubstituído, reage, preferencialmente com o átomo de nitrogênio (N5) do FAD (Figura 2.3a) enquanto que algumas aminas saturadas reagem, preferencialmente, com o átomo de carbono (C4) do FAD²⁶ (Figura 2.3b). Estas diferenças no mecanismo de reação são resultados das interações dos anéis aromáticos do inibidor e do cofator.

Figura 2.3 – Sítio de reação entre o inibidor e a MAO (a) *N*-(2-aminoetil)-*p*-clorobenzamida e (b) *trans*-2-fenilciclopropilamina.

A enzima MAO existe em duas isoformas diferentes denominadas MAO A e MAO B, com 70% de identidade, as quais possuem a sequência pentapeptídica Ser-Gli-Gli-Cis-Tir*, que se ligam ao FAD através de uma ligação covalente com o residuo cisteína 397 por uma ligação 8 α -tioéter²⁷. Entretanto, as duas isoformas apresentam diferentes seletividade ao substrato, sensibilidade do inibitor e sequência de aminoácidos,^{27,28,29} onde os aminoácidos 152 e 366 são os responsáveis por essas diferenças^{30,31}. Do ponto de vista da ação enzimática as duas isoenzima são semelhantes, entretanto, a MAO A possui uma maior afinidade pela NE e 5-HT enquanto que a MAO B apresenta maior afinidade pela β -feniletilamina (PEA). Já o metabolismo da DA e das demais monoaminas, como, por exemplo, a triptamina e tiramina não apresentam seletividade por nenhuma das duas isoformas. Independentemente de onde são encontradas, as duas isoenzimas são melhor distinguidas com base em critérios farmacológicos onde a MAO A é inibida seletivamente e por baixas doses de clorgilina²⁹ (N-[3-(2,4-diclorofenoxi)propil]-N-metil-prop-2-in-1-amina) ao passo que a MAO-B é bloqueada seletivamente por baixas doses de selegilina ((R)-N-metil-N-(1-fenilpropan-2-il)prop-2-il-1-amina, também chamada, L-deprenil)^{32,33}.

A MAO B teve sua estrutura cristalográfica determinada por técnicas de raios-X em 2002^{26,34} onde determinou-se que se trata de um dímero, enquanto que a MAO A teve sua estrutura cristalográfica determinada em 2004, obtida na forma monomérica.^{35,36} Essas estruturas cristalográficas estão apresentadas de maneira esquemática na Figura 2.4 abaixo.

* A nomenclatura dos aminoácidos pode ser vista na Tabela A.1 do anexo.

Figura 2.4 – Estruturas cristalográficas da (a) MAO A em amarelo e (b) MAO B, cadeia A em azul e cadeia B em vermelho. O FAD encontra-se representado na forma palito no interior de ambas enzimas.

O avanço na elucidação da estrutura das enzimas levou a um melhor entendimento nas diferenças e especificidade dos substratos e inibidores útil no desenvolvimento de novas moléculas bioativas, detalhadas a seguir.

2.3.1 Diferenças entre a MAO A e MAO B

Um melhor entendimento das diferenças estruturais entre as isoformas A e B da MAO pode auxiliar na construção de um modelo molecular com alta seletividade dos inibidores para cada enzima. Desta forma, analisou-se as duas enzimas humanas da MAO, além da MAO A de ratos (rMAO A) explicados abaixo.

Uma comparação entre estruturas MAO A humana (hMAO A) e MAO B humana (hMAO B) pode ser vista na Figura 2.5. Percebe-se que o sitio ativo da hMAO B (Figura 2.5b) está dividido em duas diferentes cavidades: i) a cavidade de entrada, com um volume de $290\text{\AA}^3$ e ii) a cavidade do substrato, com um volume de $430\text{\AA}^3$. Entretanto, essas duas

cavidades podem ser fundidas em uma única cavidade quando o aminoácido Ile 199 está no que se denominou sua conformação aberta, apresentando um volume total de $700 \text{ \AA}^3$.³⁷ Já a hMAO A (Figura 2.5a) apresenta uma cavidade única para o sitio ativo com um volume total de $550 \text{ \AA}^3$, sendo ambas as cavidades preferencialmente hidrofóbicas com um bolsão aromático definido pelo FAD e pelos resíduos Tir 407 e Tir 444 para a MAO A e Tir-398 e Tir-435 para a MAO B²⁶.

Figura 2.5 – Diagrama da estrutura monomérica da (a) MAO A e (b) MAO B. O FAD está representado em amarelo, o domínio da ligação do FAD em azul e do substrato em vermelho. O domínio de ligação com a membrana está em verde. As cavidades de entrada e do substrato em ciano.

Entretanto, as duas isoformas não diferem apenas no volume de suas cavidades catalíticas, mas também quanto à sequência de aminoácido do sitio ativo, conforme pode ser visto na Tabela 2.1 abaixo.

A maior diferença na sequência de aminoácidos do sitio ativo destas enzimas está na troca dos resíduos Phe 208 da hMAO A pela Ile 199 da hMAO B e do Ile 335 da hMAO A pela Tyr 326 da hMAO B, sendo estes aminoácidos responsáveis pela seletividade do substrato³⁶.

Tabela 2.1 – Resíduos de aminoácido do sítio ativo das enzimas hMAO A e hMAO B.

hMAO A	hMAO b
Tir 69	Tir 60
Gln 74	Gln 65
Val 91	Val 82
Val 93	Glu 84
Leu 97	Leu 88
Ile 180	Leu 171
Asn 181	Cis 172
Ile 207	Ile 198
Phe 208	Ile 199
Ser 209	Ser 200
Val 210	Thr 201
Glu 216	Glu 207
Cis 323	Thr 314
Ile 325	Ile 316
Ile 335	Tyr 326
Leu 337	Leu 328
Met 350	Met 341
Phe 352	Phe 343
Tir 407	Tir 398
Tir 444	Tir 435

Além da diferença na sequência de aminoácido do sítio ativo, provavelmente, a segunda maior diferença entre as duas estruturas está na conformação do loop (resíduos 210 a 216 na MAO A). A conformação deste loop tem efeito significativo na forma e no volume da cavidade do substrato e provavelmente contribui para a diferença na especificidade das duas enzimas³⁸ conforme pode ser visto na Figura 2.6 a seguir.

Figura 2.6 – Comparação do sítio ativo da (a) hMAO A e (b) hMAO B, com seus respectivos inibidores, clorgilina e deprenil. Ambos formam uma ligação covalente com através N do FAD. O loop está representado em vermelho na hMAO A e em verde na MAO B.

A elucidação destas diferenças levou a renovação do interesse no planejamento racional de inibidores mais potentes e seletivos com maior potencial terapêutico e menos efeitos colaterais³⁹.

2.4 Inibidores da MAO

Os inibidores da MAO (IMAO) são a primeira classe de compostos antidepressivos e, iniciou-se com a descoberta ocasional dos efeitos na melhora de humor dos pacientes de tuberculose tratados com iproniazida^{7,8} (N'-isopropilisonicotinohidrazida).

A primeira geração de inibidores da MAO liga-se de forma irreversível e não seletiva tanto na MAO A quanto na MAO B. Porém, a elucidação das duas isoformas da enzima e, conseqüentemente, das suas diferenças estruturais descritas anteriormente, levou ao desenvolvimento de uma nova geração de inibidores da MAO, considerando-se a reversibilidade e a seletividade dos compostos, como, por exemplo, a clorgilina e a selegilina inibidores seletivos da MAO A e MAO B, respectivamente. A terceira geração de inibidores

da MAO são fármacos de ação reversível e seletiva, de curta duração, como, por exemplo, a meclobemida (4-fluor-*N*-(2-morfolin-4-iletil)benzamida) útil no tratamento da doença de Parkinson¹⁴.

Diferentes classes de compostos vêm sendo estudados para o tratamento da depressão com base em sua ação frente a MAO⁴⁰, como, por exemplo, anfetaminas⁴¹, cumarinas⁴², derivados do pirrol⁴³ e do indol⁴⁴ entre outros.

Os IMAO continuam sendo a primeira opção no tratamento contra a depressão, entretanto, sua ação demorada, com surgimento dos primeiros efeitos tardiamente, ainda faz com que novos agentes mais efetivos sejam pesquisados⁴⁵. Desta forma, e devido à alta versatilidade dos derivados anfetamínicos, os quais podem agir de diversas maneiras, com diferença na potência e na duração dos efeitos, atuando, principalmente, no aumento da liberação de neurotransmissores e, inibindo de maneira seletiva tanto a MAO A quanto a MAO B, decidiu-se por utilizar esta classe de compostos neste trabalho.

2.5 Os compostos de interesse

No processo de modelagem molecular, a atividade biológica é geralmente determinada para um conjunto de compostos com estruturas homólogas. Este conceito consiste no fato que a similaridade química é também refletida na atividade biológica, ou seja, compostos quimicamente parecidos ou análogos podem ser relacionados no modo de ação.

Desta forma, os compostos utilizados no desenvolvimento deste projeto é uma série de 63 derivados anfetamínicos disponíveis na literatura, os quais foram sintetizados e testados (frente a MAO A e MAO B) por Scorza e colaboradores⁴¹, Hurtado-Guzmán e colaboradores⁴⁶ e Sterling e colaboradores⁴⁷. Estes compostos foram divididos para a

realização deste projeto de acordo o tipo de reação do inibidor (ligante) com a enzima, conforme explicado no item 2.3, página 21.

Os procedimentos dos testes de atividade frente a MAO A e MAO B, para determinação do IC_{50} destes compostos foram obtidos por estudos *in vitro* e encontram-se descritos em detalhes nos artigos originais de Scorza e colaboradores⁴¹, Hurtado-Guzmán⁴⁶ e colaboradores e Sterling e colaboradores⁴⁷. Vale a pena ressaltar que, de acordo com o *Food and Drug Administration* (FDA) IC_{50} é a concentração necessária para inibição de 50% da população, neste caso a enzima MAO, *in vitro*.

As Tabelas 2.2 e 2.3 mostram os compostos do chamado Grupo 1, o qual é formado por anfetaminas substituídas saturadas. As substâncias com triplas ligações encontram-se nas tabelas 2.4 a 2.6. Vale a pena ressaltar que as moléculas foram divididos em diferentes tabelas a fim de se identificar, de maneira mais simples, as posições de substituição.

Neste trabalho, considerou-se como inativos os compostos que apresentaram um valor de IC_{50} acima de 100 μ M de seguindo o mesmo protocolo dos pesquisadores os quais realizaram as sínteses desses compostos^{41,46,47}.

Tabela 2.2 – Compostos e atividade biológica do Grupo 1 de derivados anfetamínicos com sete posições de substituição (continua).

Composto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	IC ₅₀ MAO A (μM)	IC ₅₀ MAO B (μM)
Anfetamina ⁴¹	H	H	H	H	CH ₃	H	H	11	NE*
PCA ⁴¹	H	H	Cl	H	CH ₃	H	H	4,0	NE
MTA ⁴¹	H	H	SCH ₃	H	CH ₃	H	H	0,25	NE
(±)NMMTA ⁴⁶	H	H	SCH ₃	H	CH ₃	H	CH ₃	0,89	NE
(±)DMMTA ⁴⁶	H	H	SCH ₃	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	2,1	NE
(±)NEMTA ⁴⁶	H	H	SCH ₃	H	CH ₃	H	CH ₂ CH ₃	1,8	NE
(±)DEMTA ⁴⁶	H	H	SCH ₃	H	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	6,45	NE
(±)NPMTA ⁴⁶	H	H	SCH ₃	H	CH ₃	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃	2,41	>10
(±)DPMTA ⁴⁶	H	H	SCH ₃	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	>10	NE
(±)NAMTA ⁴⁶	H	H	SCH ₃	H	CH ₃	H	CH ₂ CHCH ₂	3,5	>10
(±)DAMTA ⁴⁶	H	H	SCH ₃	H	CH ₃	CH ₂ CHCH ₂	CH ₂ CHCH ₂	>10	NE
(±)MTAB ⁴⁶	H	H	SCH ₃	H	CH ₂ CH ₃	H	H	0,84	NE
ETA ⁴¹	H	H	SCH ₂ CH ₃	H	CH ₃	H	H	0,1	29
ITA ⁴¹	H	H	SCH(CH ₃) ₂	H	CH ₃	H	H	0,4	8,1

Tabela 2.2 – Compostos e atividade biológica do Grupo 1 de derivados anfetamínicos (continuação).

Composto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	IC ₅₀ MAO A (μM)	IC ₅₀ MAO B (μM)
4-EtOA ⁴¹	H	H	OCH ₂ CH ₃	H	CH ₃	H	H	0,2	SE
4-MetOA ⁴¹	H	H	OCH ₃	H	CH ₃	H	H	0,3	SE
3,4-DMA ⁴¹	H	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃	H	H	20	SE
TMA ⁴¹	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃	H	H	SE	SE
Amiflamina ⁴¹	CH ₃	H	N-(CH ₃) ₂	H	CH ₃	H	H	2,0	SE
2Br-4,5-DMA ⁴¹	Br	H	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃	H	H	9,3	SE
5Br-2,4-DMA ⁴¹	OCH ₃	H	OCH ₃	Br	CH ₃	H	H	13	SE
2NO ₂ -4,5-DMA ⁴¹	NO ₂	H	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃	H	H	SE	SE
2,5-DMA ⁴¹	OCH ₃	H	H	OCH ₃	CH ₃	H	H	SE	SE
2,4-DMA ⁴¹	OCH ₃	H	OCH ₃	H	CH ₃	H	H	0,6	SE
ALEPH-2 ⁴¹	OCH ₃	H	SCH ₂ CH ₃	OCH ₃	CH ₃	H	H	3,2	SE
ALEPH ⁴¹	OCH ₃	H	SCH ₃	OCH ₃	CH ₃	H	H	5,1	SE
DOTFM ⁴¹	OCH ₃	H	CF ₃	OCH ₃	CH ₃	H	H	SE	SE

Tabela 2.2 – Compostos e atividade biológica do Grupo 1 de derivados anfetamínicos (continuação).

Composto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	IC ₅₀ MAO A (μM)	IC ₅₀ MAO B (μM)
FLA 527 ⁴¹	OCH ₃	H	N(CH ₃) ₂	OCH ₃	CH ₃	H	H	SE	SE
TMA-2 ⁴¹	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃	H	H	SE	SE
DOB ⁴¹	OCH ₃	H	BR	OCH ₃	CH ₃	H	H	100	SE
DOM ⁴¹	OCH ₃	H	CH ₃	OCH ₃	CH ₃	H	H	24	SE
DON ⁴¹	OCH ₃	H	NO ₂	OCH ₃	CH ₃	H	H	SE	SE
DOA ⁴¹	OCH ₃	H	NH ₂	OCH ₃	CH ₃	H	H	SE	SE
2Br-4,5-MDA ⁴¹	BR	H	-OCH ₂ O-		CH ₃	H	H	13	64
2NO ₂ -4,5-MDA ⁴¹	NO ₂	H	-OCH ₂ O-		CH ₃	H	H	SE	78
2Cl-4,5-MDA ⁴¹	Cl	H	-OCH ₂ O-		CH ₃	H	H	6,3	38
MDA ⁴¹	H	-OCH ₂ O-		H	CH ₃	H	H	9,3	SE
MDMA ⁴¹	H	-OCH ₂ O-		H	CH ₃	H	CH ₃	30	SE

* SE = Inativos.

Tabela 2.3 – Compostos e atividade biológica do Grupo 1 de derivados anfetamínicos com três posições de substituição.

	R₁	R₂	R₃	IC₅₀ MAO A (μM)	IC₅₀ MAO B (μM)
45a ⁴⁷	CH ₃	H	H	95	SE*
45b ⁴⁷	CH ₂ CH ₃	H	H	180	SE
45c ⁴⁷	CH ₃ CH ₂ CH ₃	H	H	240	SE
46a ⁴⁷	CH ₃	H	CH ₃	22	SE
46b ⁴⁷	CH ₂ CH ₃	H	CH ₃	20	SE
48a ⁴⁷	CH ₃	CH ₃	CH ₃	51	SE

* SE = Inativos.

As Tabelas 2.4 a 2.6 mostram os ligantes que reagem com a MAO através da sua tripla ligação com o N5 do FAD (Figura 2.3) o qual foi chamado de Grupo 2.

Tabela 2.4 – Estrutura molecular da selegina e IC_{50} .

Composto		IC_{50} MAO A (μ M)	IC_{50} MAO B (μ M)
Selegilina ⁴¹		50	0,007

Tabela 2.5 – Compostos e atividade biológica do Grupo 2 de derivados anfetamínicos.

Composto	R1	R2	R3	R4	R6	IC_{50} MAO A (μ M)	IC_{50} MAO B (μ M)	
50a ⁴⁷	H	CH ₂ CCH	CH ₃	CH ₃	H	2,7	24	
50b ⁴⁷	H	CH ₂ CCH	CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	2,6	7,8	
50c ⁴⁷	H	CH ₂ CCH	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	H	1,8	0,29	
51a ⁴⁷	CH ₃	CH ₂ CCH	CH ₃	CH ₃	H	0,3	2,8	
51b ⁴⁷	CH ₃	CH ₂ CCH	CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	0,8	0,8	
52a ⁴⁷	H	CH ₂ CCH	CH ₃	CH ₃	CH ₃	6,9	5,7	
52b ⁴⁷	H	CH ₂ CCH	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₃	2,1	12,8	
52c ⁴⁷	H	CH ₂ CCH	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₃	14,6	0,17	
52e ⁴⁷	H	CH ₂ CCH	CH ₃	Ciclohexil	CH ₃	18	0,23	
52i ⁴⁷	H	CH ₂ CCH	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₃	15	0,4	
53a ⁴⁷	CH ₃	CH ₂ CCH	CH ₃	CH ₃	CH ₃	0,12	0,8	
53b ⁴⁷	CH ₃	CH ₂ CCH	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₃	0,12	0,1	
53d ⁴⁷	CH ₃	CH ₂ CCH	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₃	20	1,5	
53e ⁴⁷	CH ₃	CH ₂ CCH	CH ₃	Ciclohexil	CH ₃	1,7	0,24	

Tabela 2.6 – Compostos e atividade biológica do Grupo 2 de derivados anfetamínicos com três posições de substituição.

Composto	R1	R2	R6	IC ₅₀ MAO A (μM)	IC ₅₀ MAO B (μM)	
55n ⁴⁷	H	CH ₂ CCH	H	67	107	
55o ⁴⁷	CH ₃	CH ₂ CCH	H	1,3	6,4	
55p ⁴⁷	H	CH ₂ CCH	CH ₃	830	230	
55q ⁴⁷	CH ₃	CH ₂ CCH	CH ₃	8,9	4,8	

Após a determinação dos dois grupos de moléculas, foi realizada a modelagem molecular destes compostos, a partir da estrutura química dos ligantes, através de cálculos de química quântica para se avaliar propriedades estruturais e eletrônicas destes compostos, bem como, aplicação da mecânica clássica em estudos de *docking* e dinâmica molecular (MD) utilizando-se as estruturas cristalográficas da MAO. A metodologia utilizada e os resultados obtidos estão apresentados a seguir, nos itens 4 e 5, respectivamente.

3 OBJETIVOS

3.1 Obetivo geral

O crescente interesse por parte da comunidade científica no entendimento do mecanismo de ação de inibidores da MAO motivou a execução deste trabalho que tem como proposta analisar as características estruturais e eletrônicas de derivados anfetamínicos com atividade biológica frente a MAO. Desta forma, tem-se como objetivo propor-se um modelo teórico para a predição de novos derivados anfetamínicos, se possível, mais potentes e seletivos, por meio dos objetivos específicos apresentados a seguir.

3.2. Objetivos específicos

A modelagem molecular de novos ligantes mais potentes e seletivos requiere uma série de etapas na estruturação do seu modelo. Desta forma, neste estudo, tem-se como propostas específicas os seguintes itens:

- I. avaliação do método de cálculo com melhor concordância com resultados experimentais para o estudo dessa classe de compostos,
- II. estudo conformacional e configuracional da estrutura padrão dessa classe de moléculas,
- III. otimização da geometria molecular e cálculo químico-quântico de propriedades eletrônicas energia do HOMO, energia do LUMO, carga atômica, energia total e

momento de dipolo, potencial químico, eletronegatividade, dureza, potencial de ionização e afinidade eletrônica, com o método determinado anteriormente,

- IV. aplicação de técnicas multivariadas para avaliação de possíveis padrões entre as propriedades químico-quânticas calculadas e a atividade biológica dos derivados anfetamínicos em estudo,
- V. aplicação de técnicas de *docking* molecular para classificação e ranqueamento dos ligantes segundo sua energia de interação com a enzima.
- VI. estudo de dinâmica molecular da estrutura PDB 1OJA da MAO B para avaliação da interação ligante-receptor.

4 METODOLOGIA

A química computacional, que compreende a modelagem teórica ou estrutural, conhecida como modelagem molecular e a modelagem de processo ou experimentos, conhecida como simulação computacional, é uma área que vem crescendo de modo significativo nas últimas décadas e tem como foco a simulação de biomoléculas, polímeros, fármacos, compostos orgânicos e inorgânicos entre outros. Como dito anteriormente, seu avanço está relacionado com a evolução dos computadores e programas, através da utilização de computadores em paralelo ou em série e de mais rápidos e eficientes algoritmos numéricos utilizados nos programas. A utilização das técnicas de QC pode reduzir o tempo e o custo das pesquisas⁴⁸.

Uma aplicação muito utilizada de QC é a simulação de biomoléculas, a qual é a chave para o entendimento e estudo de processos biológicos a nível microscópico, nem sempre acessível experimentalmente⁴⁹. Este estudo pode ser feito de duas maneiras distintas: i) levando-se em consideração apenas a estrutura dos ligantes e ii) considerando-se a estrutura do ligante e do receptor (alvo biológico ou biomacromolécula). No segundo caso é necessário que a estrutura cristalográfica da biomacromolécula tenha sido determinada.

Podem-se encontrar diversas estruturas cristalográficas de proteínas no banco de dados *Protein Data Bank*, PDB⁵⁰, as quais, muitas vezes, estão complexadas com diferentes ligantes, permitindo que os modelos computacionais sejam baseados em dados experimentais bem fundamentados. Sendo assim, estruturas experimentais obtidas por técnicas de raios-X podem ser encontradas para a MAO A^{36,51,52} e para a MAO B^{26,34}, proteínas de interesse neste estudo.

Este trabalho pode ser dividido em duas etapas onde a primeira constituiu-se na utilização de técnicas de química quântica para determinação das estruturas de mínimo de

energia de uma série de moléculas derivada da anfetamina^{41,46,47} bem como no cálculo das propriedades eletrônicas destes compostos para avaliação de uma possível relação com sua atividade biológica. A segunda etapa deste trabalho constitui-se na avaliação das interações destes ligantes no seu alvo biológico, isto é, as enzimas MAO A e B, através da utilização de técnicas de *docking* e dinâmica molecular.

4.1 Cálculos de química quântica

Os métodos de química quântica são, atualmente, amplamente utilizados na compreensão e na previsão do comportamento de propriedades moleculares. Eles estão baseados na resolução da equação de Schrödinger independente do tempo, dada pela equação 4.1.

$$H\Psi = E\Psi \quad \text{Equação 4.1}$$

onde H é o operador hamiltoniano não relativístico, E é a energia total e Ψ é a função de onda dependente das coordenadas cartesianas e de spin de todas as partículas.

Entretanto, tendo-se em vista que esta equação não pode ser resolvida de maneira exata para sistemas multieletrônicos, algumas aproximações são utilizadas para viabilizar o estudo desses sistemas: i) a aproximação Born-Oppenheimer e a ii) a aproximação da partícula independente, que define as bases do método Hartree-Fock (HF)^{53,54,55}. Nesta última aproximação, a equação de Schrödinger independente do tempo assume que a interação entre os elétrons do sistema pode ser substituída por um potencial médio de interação onde um elétron interage com uma distribuição de carga gerada pelos elétrons restantes, e a função de

onda do sistema pode ser representada como um produto de funções de um elétron antissimetrizada representada por um determinante de Slater.

A aplicação do método HF para moléculas ganhou um grande impulso quando, em 1951 Roothaan propôs a representação dos orbitais em termos de uma expansão em funções de base, originando o chamado método de Hartree-Fock-Roothaan. O objetivo deste método é obter, a partir de um conjunto de orbitais de um elétron, os orbitais moleculares (OM) do sistema minimizando a energia de uma dada configuração eletrônica sujeita, normalmente, a condições de ortonormalidade entre os orbitais.

A resolução desta equação é feita de maneira iterativa até que os autovalores e autovetores tenham atingido a auto-consistência, ou seja, quando os orbitais gerados forem idênticos aos utilizados para formar o hamiltoniano que os gerou.

Contudo, a função de onda HF não é uma representação completa da estrutura eletrônica de uma molécula, devido ao fato da interação, ou correlação efetiva, entre elétrons não acontecer por meio de um potencial médio. Este fato impõe um limite máximo de aprimoramento no valor da energia mesmo que se utilize a melhor função de onda HF. A diferença entre a energia exata e a energia HF é conhecida como a energia de correlação, ou correlação eletrônica. Apesar de pequena, a inclusão da mesma é de fundamental importância para descrever adequadamente diversas propriedades moleculares.

Desta forma, outros métodos de QQ foram desenvolvidos de forma a contemplar essa energia, os chamados métodos pós-Hartree-Fock. Entre estes métodos, pode-se citar a Teoria do Funcional da Densidade (DFT)^{56,57}, a Teoria de Perturbação de Muitos Corpos de Moller-Plesset em Segunda Ordem (MP2)⁵⁸, *Coupled Cluster* (CC)^{59,60,61}, o método do campo auto-consistente multiconfiguracional (MCSCF, do inglês, *Multi-Configuration Self-Consistent Field*, ou *CASSCF*, do inglês, *Complete Active Space Self-Consistent Field*) o método de Interação de Configurações (CI) entre outros. Entretanto, a utilização destes métodos requer

um elevado custo computacional, tendo assim, o tamanho do sistema como fator limitante para a sua utilização.

A vantagem do método MP2 está no fato deste recuperar cerca de 75% da energia de correlação^{62,63}, porém, possui uma demanda computacional que cresce com N^5 , onde N é o número de funções de base, sendo, desta forma, um método com alto custo computacional. Por sua vez, o método DFT exige uma menor demanda computacional, a qual aumenta, em geral, na ordem de $N^3 - N^4$, portanto, bem próximo do método HF que apresenta uma dependência com N^4 .

Os resultados de estruturas moleculares obtidos com a utilização da DFT podem ser mais precisos do que aqueles obtidos pelo método HF, uma vez que este método consiste na modelagem da energia e efeitos de troca e de correlação eletrônica por meio de funcionais da densidade eletrônica. Entre os funcionais hoje disponíveis, um dos mais utilizados é o funcional B3LYP, o qual particiona a energia em termos cinético e potencial, incluindo o termo de troca e correlação da densidade eletrônica, que leva em consideração a energia de troca proveniente da antissimetria da função de onda eletrônica e da correlação eletrônica

Outro aspecto importante que deve ser avaliado nos estudos de química quântica é a escolha das funções de onda (funções de base) que serão utilizadas. As funções de base empregadas neste estudo foram as funções tipo gaussianas, que descrevem, de maneira satisfatória, as propriedades atômicas, perto ou longe do núcleo.

O conjunto de base pode ser dividido em três tipos: i) bases mínimas, que são aquelas que incluem um número mínimo de funções de base requerido para acomodar os elétrons do sistema, ii) duplo-zeta, que são aquelas cujo número de funções é o dobro das utilizadas na base mínima e, iii) estendidos, que são todos com mais do que o dobro das funções de base mínima. Estas últimas funções são, em geral, essenciais para a descrição das propriedades eletrônicas moleculares.

Além destas, funções difusas e de polarização podem ser utilizadas para uma correta descrição das propriedades moleculares.

Em particular, utilizou-se o conjunto de funções de base de Pople, presentes no programa Gaussian 03 (G03)⁶⁴ onde as regiões de caroço e de valência são descritas por um conjunto formado por um número diferente de funções gaussianas contraídas, cujos valores dos coeficientes foram previamente otimizados para minimizar as energias atômicas HF.

Diferentemente dos métodos *ab initio*, os chamados métodos semi-empíricos são bastante rápidos e não requerem uma demanda computacional elevada. Entre estes, pode-se citar o método Austin Model 1 (AM1)⁶⁵, Parameterized Model number 3 (PM3)⁶⁶ e mais recentemente Recife Model 1 (RM1)⁶⁷ entre outros, muito útil no estudo e na compreensão de moléculas grandes, muitas vezes inviáveis de serem estudadas por métodos *ab initio*. Os métodos semi-empíricos também estão baseados na resolução da equação de Schrodinger, porém, algumas integrais são substituídas por valores parametrizados a partir de dados experimentais. Em particular, os métodos AM1 e PM3 são baseados na aproximação NDDO (*Neglected of Diatomic Differential Overlap*) a qual ignora as integrais de recobrimento diatômico diferencial quando os orbitais atômicos estão centrados em átomos diferentes.

A introdução da parametrização permite a inclusão, ainda que de maneira pouco significativa, da correlação eletrônica, importante para a correta descrição do sistema, como explicado anteriormente. Entretanto, os resultados obtidos por esses métodos, podem, muitas vezes, serem bastante diferentes daquele observado experimentalmente caso a molécula estuda seja muito diferente do conjunto de moléculas utilizado na sua parametrização.

Neste trabalho, foram utilizados os métodos *ab initio* HF, DFT, MP2 e o método semi-empírico AM1 no cálculo de otimização da geometria da molécula MDMA para determinação do nível de cálculo de QQ que melhor descreve esta molécula, quando comparada com sua estrutura cristalográfica como explicado a seguir no item 4.2.1. Posteriormente, aplicou-se

este método no cálculo dos parâmetros energéticos, geométricos e eletrônicos do sistema investigado.

4.2 Otimização da geometria molecular

O uso mais comum e de maior sucesso da mecânica quântica em sistemas moleculares é a reprodução e a previsão da estrutura de moléculas⁶⁸, particularmente dos estados estacionários. Em muitos casos, cálculos teóricos de otimização de geometria molecular conseguem reproduzir dados de cristalografia com grande exatidão, onde os comprimentos de ligação e ângulos de torção podem, eventualmente, apresentar erros inferiores a 0,01 Å e 1,0°, respectivamente, apesar das diferenças entre a fase condensada e aquela na qual os cálculos teóricos são realizados, o vácuo. Desta forma, a escolha adequada do conjunto de bases (em geral um conjunto de bases grande, especialmente aqueles estendidos e com funções de polarização) e com a inclusão de correlação eletrônica nos cálculos de otimização de geometria é de fundamental importância para reprodução dos dados experimentais.

Neste trabalho, os cálculos de otimização da geometria molecular foram feitos com o programa G03 utilizando-se os quatro critérios de convergência internos do programa e podem ser divididos em duas etapas:

- i. otimização da geometria da molécula MDMA com os métodos HF, DFT, com as funções de base 6-31G, 6-31G(d), 6-31G(d,p), 6-31+G(d,p), 6-31++G(d,p), com o método MP2/6-31G e com o AM1, a partir da sua estrutura de cristalografia⁶⁹,
- ii. otimização das geometrias moleculares da anfetamina, 2NO₂-4,5-MDA, ETA e selegilina por mecânica molecular (MM) e posterior otimização de todas as moléculas da série estudada com o método determinado/selecionado na etapa anterior.

4.2.1 Determinação do nível de cálculo

Para a determinação do nível de cálculo de QQ mais adequado para o estudo da anfetamina e seus derivados, do ponto de vista de otimização da geometria, foi feito um estudo com a molécula MDMA uma vez que esta molécula possui estrutura tridimensional determinada por técnicas de raios-X⁶⁹.

Neste processo, utilizou-se a estrutura cristalográfica como geometria inicial e, então, foi feita a otimização da sua geometria molecular com os métodos HF e DFT com os funcionais B3LYP, em ambos os casos com as funções de base 6-31G, 6-31G(d), 6-31G(d,p), 6-31+G(d,p), 6-31++G(d,p). Utilizou-se também o método MP2 e função de base 6-31G, e o método semi-empírico AM1, todos implementados no programa G03.

Após a obtenção das estruturas de menor energia para o MDMA com os métodos acima, foi calculado o desvio padrão médio de cada estrutura obtida com os métodos acima citados em relação à estrutura de raios-X. Desta forma, foi possível se determinar um método de química quântica, capaz de descrever os compostos em estudo de forma satisfatória. Este resultado encontra-se apresentado no item 5.1.1.

4.2.2 Otimização da geometria molecular das anfetaminas

Inicialmente, utilizou a mecânica molecular para a otimização da geometria molecular da anfetamina (estrutura base da classe das anfetaminas), 2NO₂-4,5-MDA, ETA e selegilina, tendo em vista que essas moléculas possuem diferentes potências para sua atividade biológica e correspondem a diferentes esqueletos químicos, os quais podem ser responsáveis por essas diferenças. Posteriormente, foi feito um estudo configuracional dos isômeros R e S destes

compostos, com os métodos AM1 e HF, para se verificar a possível existência de diferenças nas propriedades químico-quânticas calculadas de acordo com a configuração das moléculas.

Após a escolha do método de química-quântica mais apropriado para otimização da geometria molecular dessa série de compostos, a partir da avaliação do MDMA, obteve-se a geometria de equilíbrio e calcularam-se os descritores químicos para todas as moléculas estudadas, tendo-se como estruturas iniciais aquelas obtidas por mecânica molecular. Esses resultados foram analisados através da aplicação da técnica multivariada de Análise de Componentes Principais (PCA), descrita no item 4.5.

4.2.3 Estudo configuracional e conformacional

Inicialmente, foi feito um estudo das configurações R e S para as moléculas anfetamina, 2NO₂-4,5-MDA, ETA e selegilina (chamadas de grupo teste) com os métodos AM1 e HF a fim de se determinar qual configuração apresenta menor energia para estes compostos, como explicado anteriormente. Nesta etapa, as moléculas foram desenhadas de modo a garantir a conformação desejada e, posteriormente, foram otimizadas no programa G03.

Paralelamente foi feita uma análise conformacional dos ângulos diédricos H19N9C8C7 e N9C8C7C1 da anfetamina (Figura 4.1) com o método semi-empírico AM1, através de um *scan*, isto é, de uma varredura no espaço angular (passo 10°, de 0° a 360°) com o program G03.

Figura 4.1 – Representação esquemática e numeração dos átomos da anfetamina envolvidos na análise conformacional do nitrogênio para determinação da conformação mais estável.

Com esta análise foi possível se determinar a configuração e a conformação de menor energia desta molécula e a posição dos átomos de hidrogênio ligados ao átomo de nitrogênio. Este resultado foi extrapolado para as demais moléculas analisadas, exceto para a molécula MDMA uma vez que esta possui estrutura obtida por raios-X.

4.3 Escolha e determinação dos descritores moleculares

Muitas metodologias de planejamento de fármacos começam com uma descrição das entidades moleculares envolvidas, isto é, dos ligantes e receptores. Isto pode ser feito de diversas maneiras, entre elas, através do cálculo de descritores químicos, capazes de mimetizar interações entre o ligante e o biorreceptor. Entretanto, vale a pena ressaltar que as estruturas químicas não possuem informação sobre a sua possível atividade biológica de maneira explícita e esta deve ser obtida através dos chamados descritores moleculares.

Estes descritores podem ser obtidos através de cálculos teóricos de propriedades físico-químicas, de parâmetros eletrônicos ou químico-quânticos, bem como das características geométricas e topológicas dos ligantes, entre outros. Desta forma, optou-se por analisar, inicialmente, parâmetros de estrutura eletrônica como as cargas atômicas

CHELPG⁷⁰, as energias dos orbitais de fronteira, a energia total do sistema e alguns descritores capazes de descrever a reatividade das moléculas, como, por exemplo, a dureza, o potencial de ionização e afinidade eletrônica, para então, relacioná-los com a presença ou ausência de atividade biológica destes compostos.

Vale a pena ressaltar que, tendo-se em vista que as cargas atômicas mostram-se bastante sensíveis ao nível de teoria empregado no seu cálculo como, por exemplo, o conjunto de base utilizado e a introdução de correlação eletrônica⁷¹, bem como surgem diferenças em seu valor de acordo com a partição utilizada, neste trabalho foram utilizadas as cargas CHELPG, por ser uma carga derivada do potencial eletrostático.

Já os orbitais moleculares de fronteira e suas propriedades, bastante úteis do ponto de vista químico, são utilizados como descritores químicos desde que o prêmio Nobel Fukui e colaboradores^{72,73} utilizaram a densidade eletrônica dos orbitais de fronteira na predição do sítio reativo em sistemas com elétrons π . Woodward e Hoffmann⁷⁴⁻⁷⁸ também utilizaram a simetria do orbital para explicar diversos tipos de reação de sistemas conjugados impulsionando a utilização dos OM de fronteira na descrição de reações químicas. Desta forma, a diferença de energia entre os orbitais de fronteira, GAP, isto é, a diferença de energia do orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO) e do orbital molecular desocupado de mais baixa energia (LUMO) vem sendo utilizados para explicar diversos fenômenos químicos⁷⁹⁻⁸². Entretanto, trabalhos recentes mostram que a utilização das energias HOMO-LUMO pode não ser a mais adequada para descrever a reatividade de alguns sistemas^{82,83}.

A partir das análises das energias HOMO e LUMO surgiu o conceito de dureza e moleza⁸⁴⁻⁸⁷ onde as moléculas com um grande valor para o GAP são chamadas de duras e, as moléculas com um valor pequeno para o GAP são chamadas de moles. Essa metodologia é

bastante útil para aqueles compostos que possuem mais de um sítio de reação⁸⁴⁻⁹⁰ no qual a teoria HOMO-LUMO não descreve corretamente estes dois sítios de reação.

Desta forma, surgiu também o conceito de Orbital Molecular de Fronteira Efetivo de Reação, FERMO⁸³ o qual considera não apenas a energia do orbital, mas a sua forma e sua composição, isto é, a contribuição dos orbitais moleculares do átomo ou dos átomos envolvidos na reação química. Este conceito foi desenvolvido no Brasil por da Silva e colaboradores⁸³ e, apesar de sua grande aplicabilidade, ainda é pouco utilizado, sendo os trabalhos desenvolvidos no grupo do professor Milan Trsic os primeiros trabalhos a considerarem essa metodologia. Vale a pena ressaltar que o FERMO pode ser qualquer orbital molecular ocupado abaixo do HOMO ou o próprio HOMO, como representado esquematicamente na Figura 4.2, bem como uma dada molécula pode possuir um ou mais FERMOS, dependendo da quantidade de sítios reativos que a molécula possui^{83,91}.

Figura 4.2 – Possíveis modos de interações entre orbitais moleculares de nucleófilos e eletrófilos segundo o conceito de FERMO.

Após o cálculo destes descritores químicos para todas as moléculas dos Grupos 1 e 2, aplicou-se a técnica multivariada de PCA para análise destes parâmetros a fim de se visualizar um possível agrupamento destes composto e relacioná-los com sua atividade biológica. Esses resultados encontram-se apresentados na seção 5.2.

Ainda no intuito de se entender a presença ou ausência de atividade biológica neste grupo de anfetaminas, foram realizados estudos dos ligantes no sítio ativo da enzima (MAO A e MAO B) através da aplicação de técnicas de *docking* e dinâmica molecular, descritos a seguir.

4.4 Escolha e preparação da estrutura, estudos de *docking* e dinâmica molecular

Uma estrutura tridimensional de alta qualidade é o primeiro requisito na busca por conformações dos ligantes, tanto para estudos de estrutura eletrônica como para a avaliação das suas interações no sítio ativo da enzima, obtidas através de processo de *docking* e de dinâmica molecular. Complexos enzima-ligante são, geralmente, difíceis de serem determinados experimentalmente, pois, essas reações ocorrem muito rapidamente. Entretanto existem técnicas capazes de estudar esses efeitos⁹², como por exemplo, a utilização de estruturas de alta resolução, obtidas por cristalografia de raios-X e a aplicação de metodologias teóricas.

Neste trabalho, utilizaram-se duas abordagens para a determinação das estruturas, sendo uma para a determinação das estruturas tri-dimensionais dos ligantes, e outra para as proteínas. No caso dos ligantes, verificou-se na literatura a disponibilidade de dados de cristalografia de todos os compostos utilizados, entretanto apenas uma das entidades estudadas, a molécula MDMA, possui dados de raios-X. Assim, este composto foi utilizado na determinação do nível de cálculo para obtenção das estruturas de menor energia, através da comparação dos resultados de otimização de geometria feitos com diferentes métodos, como explicado anteriormente (item 4.2.1) com os dados experimentais. Já para a proteína, diferentes estruturas estão disponíveis no banco de dados de proteína, PDB, para a MAO.

Neste trabalho utilizaram-se as estruturas 2BXR, 2BXS³⁶, 2Z5X e 2Z5Y⁵² como modelos da hMAO A e as estruturas 1OJA, 1OJ9²⁶, 2BK3³⁷, 2V5Z, 2V60 e 2V61⁹³ como modelos do receptor biológico hMAO B. É importante notar que todas essas estruturas possuem ligantes complexados experimentalmente, conforme mostrado na Tabela 5.2.

Fez-se, ainda, um breve estudo para a estrutura 1O5W³⁵, uma enzima de rato (rMAO A) tendo-se em vista que os resultados da literatura mostram que esta estrutura apresenta maior semelhança com a estrutura MAO B humana do que a hMAO A quando da afinidade por ligantes. Vale a pena ressaltar que apesar de terem 92% de identidade, da sequência de aminoácidos do sítio ativo serem idênticas para a hMAO A e rMAO A, a estrutura do loop do sítio ativo da rMAO A é idêntica ao da hMAO B. Isto indica que a estrutura desse loop seja rejeita pela formação do dímero, uma vez que ambas estruturas foram cristalizadas nesta forma, enquanto que a hMAO A encontra-se na forma monomérica³⁵.

Desta forma, utilizou-se essas estruturas cristalográficas da MAO no estudo de *docking* molecular com o programa GOLD^{94,95} e, apenas a estrutura 1OJA para o estudo de dinâmica molecular, com o programa GROMACS^{96,97,98}, tendo em vista que esta estrutura foi obtida com a maior resolução (1,7Å) até a data deste estudo.

4.4.1 *Docking* molecular

A compreensão dos mecanismos de reconhecimento molecular ligante-receptor vem sendo cada vez mais utilizada no planejamento racional de fármacos baseado na estrutura do receptor com a redução do tempo e do custo envolvidos no processo de desenvolvimentos de novos medicamentos.

Dentre as várias técnicas computacionais disponíveis para o planejamento de fármacos, é interessante utilizar-se a estrutura do receptor biológico quando esta encontra-se disponível, modelando a estrutura química do ligante e relacionando-a com a atividade biológica. Neste caso, o *docking* é uma das técnicas mais utilizadas atualmente tanto nas universidades como nas indústrias farmacêuticas⁹⁹, a qual consiste na utilização da estrutura do receptor como molde para o desenvolvimento de novos ligantes, dissimilares daqueles já conhecidos, através de uma estratégia de busca (conformação e orientação) e uma função de escore, no sítio ativo da enzima, estimando-se a afinidade de ligação entre ligante e receptor¹⁰⁰.

Embora a introdução de flexibilidade do receptor seja desejável para uma representação mais realista do sistema, a maioria dos programas hoje disponíveis para estudos de *docking* consideram a estrutura do receptor como sendo rígida e apenas o espaço conformacional do ligante como flexível¹⁰¹.

Neste trabalho, utilizou-se o programa GOLD, para o estudo de *docking* molecular, o qual utiliza o Algoritmo Genético (GA) na determinação da melhor conformação do ligante no sítio ativo da enzima⁹⁵. Neste programa, o ligante é totalmente flexível, enquanto que na biomacromolécula, isto é, na proteína, apenas as cadeias laterais são flexíveis. Resultados de *docking* disponíveis na literatura obtidos por esse programa reproduziram, de maneira satisfatória, a afinidade experimental para 68% das moléculas estudadas¹⁰², mostrando-se útil e confiável na avaliação de novas moléculas no sítio ativo de seus receptores biológicos. Esta predição é obtida através da utilização das funções de escore as quais são baseadas em campos de força e incluem termos de ligação de hidrogênio, potencial de dispersão intermolecular 4-8 e um potencial intermolecular 8-12 para a energia interna do ligante¹⁰³.

Neste trabalho, foi feito, inicialmente, um estudo do poder de reprodução dos resultados experimentais das estruturas da MAO B utilizadas neste trabalho, através do

chamado *dockingback*, isto é, do *docking* do ligante complexado experimentalmente a enzima, na sua própria estrutura PDB. Posteriormente, ainda no intuito de se avaliar o poder de reprodução de resultados experimentais pelo programa GOLD, foi feita o *docking* dos ligantes complexados experimentalmente nas outras estruturas PDB além da sua, denominado, *crossdocking*. Estes resultados encontram-se descritos na seção 5.3.

Em uma segunda etapa, foi feito um estudo com a estrutura 1OJA para se avaliar o efeito da inclusão das chamadas águas cristalográficas nos estudos de *docking*.

A importância da inclusão das águas cristalográficas no sítio ativo da enzima em modelos computacionais já é conhecido e, sabe-se que essas moléculas podem estabilizar o complexo proteína-ligante através de ligações de hidrogênio. Entretanto, em alguns casos, essas moléculas podem ser deslocadas pelo ligante, levando a uma maior afinidade ou ganho entrópico¹⁰⁴ sendo, então, importante e interessante se avaliar o modelo com e sem essas águas. Provavelmente, um dos maiores problemas relacionados às águas está na sua determinação, isto é, saber-se qual ou quais moléculas de água são importantes para maior estabilização do complexo, bem como quais podem ser deslocadas¹⁰⁵.

Diferentes estratégias podem ser utilizadas para avaliação destas moléculas, como por exemplo, o estudo de *docking* com essas moléculas de água na posição determinada experimentalmente ou ainda excluindo-se essas moléculas¹⁰⁴, ambas utilizadas neste trabalho para a estrutura 1OJA.

Após este estudo, foram utilizadas as diferentes estruturas de raios-X da enzima MAO, disponíveis no PDB, citadas anteriormente, isto é, as estruturas PDB 1O5W, 2BXR, 2BXS, 2Z5X e 2Z5Y para a MAO A e as estruturas PDB 1OJA, 1OJ9, 2BK3, 2V5Z, 2V60 e 2V61 para a MAO B, para se modelar, no sítio ativo da enzima, a série de ligantes anfetamínicos de interesse (item 2.5, página 28). Estes resultados encontram-se apresentados no item 5.4.2.

4.4.2 Simulação de dinâmica molecular

Diferentes orientações espaciais de enzimas e possíveis conformações e orientações de um ligante podem ser calculados através de técnicas de simulação, como, por exemplo, *docking*, explicado anteriormente, e dinâmica molecular. A dinâmica molecular é baseada no campo de força da mecânica molecular e é extremamente poderosa e largamente utilizada, tendo aplicações em várias áreas da biofísica, como dinâmica de proteínas, interações proteína-proteína e proteína-ligante e em cálculos de afinidade de ligação¹⁰⁶. Esta técnica incorpora flexibilidade de ambos, ligante e receptor, melhorando suas interações e reforçando a complementaridade entre eles. Além disso, a habilidade de incorporar moléculas de solvente nas simulações de sistemas receptor-ligante é muito importante para o entendimento do papel da água e seus efeitos sobre a estabilidade de complexos proteína-inibidor¹⁰⁷.

As primeiras simulações por dinâmica molecular foram realizadas no final da década de 50¹⁰⁸ e, apenas após a década de 70 foi possível simular água¹⁰⁹ e biomoléculas¹¹⁰.

Os métodos clássicos de simulação estão baseados em campos de força para o cálculo das interações e na avaliação da energia potencial do sistema. Um campo de força consiste tanto no conjunto de equações usado no cálculo da energia potencial e das forças da partícula numa dada coordenada, como no conjunto dos parâmetros utilizados nas suas equações, explicado abaixo, no item 4.4.3.

Apesar de mais rápida que cálculos de química quântica, a MD clássica, que está fundamentada na resolução das equações de Newton, não reproduz efeitos quânticos, como quebra e formação de ligação⁴⁹ embora já existam métodos capazes de realizar este tipo de cálculo, como os métodos *ab initio* MD ou Car-Parrinello, e Path Integral MD, que empregam dinâmica quântica ao invés das equações de Newton¹¹¹.

As simulações MD permitem que átomos e moléculas interajam por um determinado período de tempo, fornecendo uma visão do movimento das partículas. A MD fornece informações sobre o comportamento dinâmico microscópico, dependente do tempo, de cada átomo que compõem o sistema. Para se obter as propriedades macroscópicas de interesse a aplicação da mecânica estatística é requerida, a qual tem a função de calcular propriedades observáveis macroscópicas (pressão, energia interna, volume, temperatura, entropia, energia livre, etc) a partir de outras microscópicas.

Na dinâmica molecular determina-se o movimento das partículas de um dado sistema, desde que se conheçam o potencial de interação entre suas partículas e as equações que regem seus movimentos, permitindo o estudo temporal das configurações do sistema e, a partir das posições geradas, determinarem-se as propriedades macroscópicas do sistema que podem ser resumida no fluxograma da Figura 4.3 abaixo:

Figura 4.3 – Fluxograma dos passos de uma simulação de dinâmica molecular.

Neste trabalho, utilizou-se o programa GROMACS no estudo de MD para se avaliar algumas propriedades da interação do ligante, previamente estudado por técnicas de *docking* molecular, e seu receptor biológico, a enzima MAO B.

Nesta etapa utilizou-se como sistema:

1. Estrutura cristalográfica 1OJA da enzima MAO B,
2. Moléculas de águas cristalográficas,
3. Moléculas de água como solvente,
4. Cofator,
5. Bicamada lipídica,
6. Contra íon.

O campo de força utilizado foi o GROMOS, com um passo de 0,002 ps e um total de 100000 passos. As moléculas de água foram tratadas com o modelo de solvatação SPC, em trajetórias de 10 ns de simulação. Neste caso a enzima utilizada é um dímero, onde cada monômero apresenta 518 resíduos, com um total de 374 047 átomos. Foram usadas condições periódicas de contorno nos cálculo MD.

O número de moléculas utilizadas foi:

1. Proteína: MAO B = 1,
2. Lipídios: POPC = 654 e POPE = 478,
3. Moléculas de água cristalográficas: HOH = 660,
4. Moléculas de água como solvente: SOL = 100860,
5. Íons: Cl = 4,
6. Cofator: FAD = 2,
7. Ligante: ISN = 2.

Tendo-se em vista que a adição ou quebra de ligações hidrogênio nas moléculas de água podem levar a forças altas e a distorções na estrutura, inicialmente foi feita a minimização da energia potencial do sistema, através de uma pequena simulação, chamada de, *energy minimization*, para, desta forma, eliminar maus contatos entre os átomos, para então, ser realizada a simulação de MD descrita acima.

4.4.3 Campos de força

Um dos maiores desafios da MD é a parametrização dos campos de força. Em geral, os parâmetros do potencial efetivo clássico são ajustados de forma a reproduzir propriedades estruturais ou termodinâmicas. A qualidade do campo de força depende da complexidade do sistema estudado e, desta forma, a qualidade dos resultados obtidos também depende desta tendência. A escolha dos potenciais de interação intra e intermoleculares constitui uma etapa essencial para a descrição correta do sistema em estudo, uma vez que esses potenciais determinam as forças que atuam em cada partícula e, conseqüentemente, na evolução do sistema com o tempo e, assim, na geração das trajetórias⁴⁹. Dentre os campos de força desenvolvidos para simulação de proteínas, pode-se citar o *Optimized Potentials for Liquid Simulation* (OPLS)¹¹², o AMBER¹¹³, CHARMM¹¹⁴ e GROMOS¹¹⁵.

Os campos de força permitem que a energia potencial total do sistema, $V(r)$, seja calculada a partir da sua estrutura tridimensional (3D). Esta energia potencial pode ser dividida em duas classes: i) interações ligadas que descrevem o estiramento das ligações covalentes, os ângulos e o potencial de torção e ângulos impróprios e ii) as interações não ligadas de van der Waals e eletrostáticas, que consistem na repulsão e na dispersão de Lennard-Jones, bem como as interações eletrostática de Coulomb.

Desta forma, e como dito anteriormente, utilizou-se o campo de força GROMOS na simulação MD realizada neste trabalho. Estes resultados podem ser vistos no item 5.5.

4.5 Análise de componentes principais

A técnica quimiométrica Análise de Componentes Principais^{116,117,118} (PCA) é um dos tipos de análise multivariada mais utilizados uma vez que permite a redução dimensional do conjunto de dados com a perda mínima de informação, permitindo, em muitos casos, a observação de possíveis agrupamentos dos objetos que definem a estrutura do conjunto de dados.

O objetivo principal da PCA é a obtenção de um número pequeno de novos eixos, as Componentes Principais (PC) que na verdade são combinações lineares dos eixos originais e que, espera-se, retenham o máximo possível da informação original. Desta forma, um pequeno número de componentes pode ser usado em lugar das variáveis originais e, assim, espera-se que eventuais padrões nos dados possam ser melhores visualizados.

Vale a pena ressaltar que a PCA nem sempre reduz um grande número de variáveis originais a um pequeno número de variáveis transformadas. De fato, se as variáveis originais não são correlacionadas, a PCA não produz o efeito desejado. Os melhores resultados são obtidos quando as variáveis originais são positiva ou negativamente correlacionadas. Nesse caso, por exemplo, as variáveis originais podem ser representadas adequadamente por poucas componentes principais, deixando clara a existência de grande redundância nas variáveis originais.

A Figura 4.4a mostra que para um conjunto de dados definido num espaço de mais de uma variável, em geral, existe uma hierarquia de direções nas quais os pontos estão mais

espalhados (a variável var 1). Então, os novos eixos (PC's) podem ser formados a partir da combinação linear dos eixos originais, de forma a preservar a maior quantidade de informação original (Figura 4.4b).

Figura 4.4 – a) Esquema hierárquico de variáveis e b) projeção dos objetos sobre as PC's.

A primeira componente principal (PC1) será a componente com maior variância, ou seja, com a maior parte da informação. As variâncias das demais PC's serão sempre menores que a variância das PC's anteriores e todas elas serão ortogonais entre si. O peso, ou contribuição, com que cada variável entra para a formação dos novos eixos pode ser vista no gráfico dos *loadings* ou pesos. Já o gráfico dos escores mostra as coordenadas que cada objeto possui ao longo de cada componente principal. Este processo é descrito pela equação 4.2.

$$t_i = X_a l_i \quad \text{equação 4.2}$$

onde t_i são os escores para i -ésima componente principal, X_a é a matriz obtida após o pré-processamento dos dados e l_i são os pesos de cada variável em relação à i -ésima componente principal.

O estudo multivariado de PCA dos dois grupos de anfetaminas foi feito com os dados autoescalados (técnica de pré-processamento dos dados) a fim de se eliminar efeitos provenientes da grandeza de cada descritor, uma vez que estes possuem unidades diferentes.

4.6 Infra-estrutura

Para este trabalho, foram utilizadas as infra-estruturas do laboratório de química quântica da instituto de química de São Carlos (IQSC) e do *Structural Bioinformatics and Computational Biochemistry Unit* (SBCB) do departamento de bioquímica da University of Oxford.

Os cálculos realizados no SBCB contaram com a disponibilidade de quatro *clusters* Beowulf com 400 núcleos de processamento e 35TB de espaço em disco para armazenamento e *backup*, bem como microcomputador pessoal Pentium 4.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudos de química quântica

A determinação de uma relação entre a estrutura eletrônica de uma série de compostos e sua atividade biológica requer previamente várias etapas, como, por exemplo, a escolha dos parâmetros a serem analisados, os programas que serão utilizados e a metodologia que será empregada nos cálculos das variáveis, entre outras. Então, devido ao interesse de se analisar a estrutura eletrônica e, se possível, estabelecer-se um modelo entre as variáveis químico-quânticas e a atividade biológica de uma série de anfetaminas, buscou-se, inicialmente, avaliar qual metodologia de cálculo será utilizada neste trabalho. Os resultados obtidos estão apresentados a seguir.

5.1.1 Determinação da metodologia de cálculo

Inicialmente foi realizado um estudo do método de cálculo a partir da determinação da geometria de equilíbrio da molécula MDMA tendo em vista que este composto possui estrutura cristalográfica disponível na literatura⁶⁹.

A otimização da geometria deste composto foi feita a partir de sua estrutura cristalográfica com o método semi-empírico AM1 e os métodos HF e DFT (funcional B3LYP) ambos com as funções de base 6-31G, 6-31G(d), 6-31G(d,p), 6-31+G(d,p) e 6-31++G(d,p). Foi utilizado ainda, o método MP2/6-31G. Devido a alta demanda

computacional requerida pelo método MP2, não foi possível a sua utilização com outras funções de base como explicado no item 4.1 da metodologia, página 39.

Os resultados obtidos para a geometria de mínimo de energia mostraram que as geometrias de equilíbrio para cada um dos métodos utilizados são diferentes daquela determinada experimentalmente, bem como, diferentes entre si. Tendo-se em vista que os cálculos são feitos no vácuo e a estrutura experimental, uma vez que está no estado sólido, sofre o fenômeno de empacotamento, era esperado algumas diferenças na sua estrutura. Entretanto, é possível se estabelecer uma boa relação entre elas. Desta forma, utilizou-se a análise do desvio padrão médio (do inglês, root mean square, RMS) no procedimento para escolha do método químico-quântico a fim de se avaliar aquele que apresenta os resultados em melhor concordância com a geometria experimental, conforme explicado no item 4.2 da metodologia, página 43.

O resultado do desvio padrão médio das geometrias obtidas por cálculos de química quântica em relação à estrutura obtida por técnicas de raios-X, pode ser visto no gráfico da Figura 5.1.

Os resultados obtidos na determinação do RMS (Figura 5.1) mostram que método AM1 apresenta o maior desvio padrão, logo, a geometria de menor energia obtida por esse método é, como um todo, a mais diferente daquela obtida experimentalmente, como era esperado, uma vez que este método foi parametrizado para moléculas mais simples do que o MDMA. Dentre os métodos HF, o melhor resultado obtido é aquele no qual se utilizou a função de base 6-31+G(d,p). Já os resultados obtidos com o método DFT mostraram que a geometria de menor energia do MDMA são mais distintas quando comparadas com a estrutura cristalográfica do que aquelas obtidas com o método HF, ao contrário do que se esperava, uma vez que este método inclui efeitos de correlação eletrônica, importantes para uma correta descrição do sistema.

Figura 5.1 – Gráfico do RMS da estrutura cristalográfica e da estrutura obtida por diferentes métodos para a molécula MDMA.

Tendo-se em vista o erro associado a cada método utilizado na obtenção da geometria de equilíbrio, essas estruturas podem ser consideradas equivalentes. Desta forma, decidiu-se utilizar o método HF, por sua menor demanda computacional e a função de base 6-31G(d,p) na otimização da geometria molecular e no cálculo das propriedades químico-quânticas de todas as moléculas estudadas, por introduzir funções de polarização, desejáveis na descrição de sistemas com anel aromático. Devido a importância da introdução de correlação eletrônica nos cálculos de biomoléculas, como explicado no item 4.1 da metodologia, página 39, também se utilizou o método DFT, com o funcional B3LYP e a mesma função de base anterior, no processo de otimização de geometria e cálculo dos parâmetros quânticos que serão analisados. Estes resultados encontram-se apresentados no item 5.3, página 73.

5.1.2 Otimização da geometria molecular

Inicialmente, otimizou-se as estruturas do chamado grupo teste, isto é, da anfetamina, 2NO₂-4,5-MDA, ETA e selegilina por mecânica molecular, com o programa HyperChem devido ao seu baixo custo computacional e seus resultados satisfatórios. Nesta análise percebeu-se que a posição do átomo de nitrogênio varia nos compostos analisados, sugerindo que sua posição é dependente dos demais substituintes da molécula.

Devido a estas diferenças, não foi possível se determinar uma geometria padrão, isto é, uma posição geral para o átomo de nitrogênio, neste grupo de moléculas, para, então, estender esses resultados para as demais moléculas estudadas, derivadas da anfetamina. Utilizou-se as geometrias moleculares obtidas por MM como geometria inicial na etapa de otimização de geometria molecular com o método de química quântica determinado anteriormente para a molécula MDMA, os métodos HF/6-31(d,p) e B3LYP/6-31G(d,p) com o programa G03 . Realizou-se também um estudo configuracional para se avaliar qual isômero (R ou S) possui relação com a atividade biológica.

5.1.3 Estudo configuracional e conformacional

Anteriormente a etapa de otimização da geometria das moléculas estudadas, avaliou-se a conformação do átomo de nitrogênio bem como os hidrogênios a ele ligados (diedros H19N9C8C7 e N9C8C7C1, Figura 5.2) através de um *scan*, da anfetamina com o método AM1 como explicado no item 4.2.3 da metodologia, página 45, tendo-se em vista o seu menor custo computacional. É importante notar que se avaliou apenas a conformação deste diedro tendo-se em vista que a reação entre a enzima e o ligante ocorre, preferencialmente nesta no átomo de N ou em substituintes a ele ligados, conforme explicado no item 2.3.

Figura 5.2 – (a) Gráfico do *scan* da posição do átomo de N da molécula amfetamina com um passo de 10°, de 0° a 360° com o método AM1 e (b) geometria AM1 de menor energia da amfetamina.

Pode-se perceber no gráfico da Figura 5.2 que a geometria de menor energia apresenta o diédro H20N9C8C7 igual a 290° e o diédro N9C8C7C1 igual a 300°, diferentemente daquele obtido por MM. Assim, ainda no intuito de se determinar a conformação de menor energia destes compostos, posteriormente ao estudo *scan* comparou-se as geometrias das moléculas do grupo teste obtidas por MM com aquelas obtidas com os métodos AM1 e HF/6-31(d,p) bem como suas propriedades físico-químicas calculadas, para então, se determinar a conformação que será utilizada para os demais compostos da série.

Tendo-se em vista que o *scan* foi realizado com o método AM1 e este método mostrou-se pouco satisfatório na obtenção da geometria da molécula MDMA, conforme explicado anteriormente, fez-se uma comparação das geometrias dos compostos do grupo teste otimizados com o método semi-empírico e o método HF/6-31G(d,p) afim de se avaliar a confiabilidade deste resultado. Os resultados obtidos mostraram que de forma geral, as moléculas apresentaram uma geometria de equilíbrio similar para ambos os métodos, confirmando, assim, a confiabilidade do resultado obtido na varredura. Entretanto, o valor da energia total (uma das propriedades analisadas) varia de modo significativo, conforme pode ser visto na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Energia total das anfetaminas calculadas com os métodos AM1 e HF/6-31G(d,p).

Molécula	Energia (kcal)	
	AM1	HF/6-31G(d,p)
anfetamina	6,30	-252795,62
Selegilina	76,63008	-349256,71
ETA	-0,88604	-551230,15
2NO₂-4,5-MDA	-46,07	-498171,79
MDMA	-46,68002	-252795,62

Desta forma, e ainda no intuito de se determinar a configuração de menor energia, comparou-se as configurações R e S das moléculas do grupo teste obtidas com o método HF. A Figura 5.3 mostra a variação das propriedades eletrônicas para cada uma das configurações.

Figura 5.3 – Gráfico da comparação entre as propriedades químico-quânticas obtidas com as conformações R e a otimizada por MM da (a) energia total, (b) momento de dipolo, energias do (c) HOMO, (d) LUMO, (e) GAP, cargas do (f) C8, (g) N9 e (h) H18.

Os resultados dos cálculos das propriedades eletrônicas para esse grupo teste, isto é, para as moléculas anfetamina, MDMA, 2NO₂-4,5-MDA, ETA e Selegilina, apresentados nos gráficos da Figura 5.3, mostraram que algumas dessas propriedades independem da configuração molecular, como, por exemplo, a o momento de dipolo, bastante próximos nas duas configurações. Contudo, as cargas atômicas calculadas com a partição CHELPG, mostraram-se bastante sensíveis quanto a configuração do composto. Já a energia total são iguais como era esperado uma vez que esta propriedade independe da configuração da molécula. Desta forma, foi verificada uma possível relação entre esses parâmetros e atividade biológica destes compostos, para se avaliar se ambas as configurações, ou apenas uma delas, tem relação com a atividade antidepressiva, conforme apresentado nos gráficos da Figura 5.4.

A análise dos parâmetros calculados e a atividade biológica destes compostos frente a MAO B mostrou que a configuração S (obtidas com o método HF) apresenta um relação direta entre eles, conforme pode ser visto nos gráficos da Figura 5.4. Os resultados para a configuração R (não apresentados) não foram satisfatórios uma vez que não foi possível se estabelecer uma relação entre os parâmetros calculados e atividade biológica dos compostos, sugerindo a existência de uma forte relação entre a estereoquímica dessas moléculas e sua atividade biológica.

A análise destes resultados para a MAO A também não mostrou nenhuma relação entre a atividade biológica e a configuração dos compostos da série teste. Desta forma, utilizou-se apenas os resultados obtidos para a MAO B para determinação da configuração desta série de moléculas.

Os parâmetros de reatividade não foram comparados com a atividade biológica das anfetaminas em estudo uma vez que esses descritores são obtidos a partir da energia do OM sendo, então, proporcional a estes.

Figura 5.4 - Gráfico da propriedade calculada *versus* IC_{50} da (a) energia total, (b) momento de dipolo, energias do (c) HOMO (d) LUMO, (e) GAP, cargas do (f) C8, (g) N9 e (h) H18.

Pode-se perceber na análise dos gráficos da Figura 5.4 que apenas os parâmetros energia total e carga do hidrogênio 18 não apresentam em relação direta com o IC₅₀ (MAO B) desses compostos, e por esta razão podem ser desprezados nas análises dos demais compostos da série. Os parâmetros momento de dipolo, energia do HOMO, energia do LUMO, GAP de energia e carga do C8 apresentam uma relação direta e linear com o valor de IC₅₀ apresentando um valor alto de r^2 , sendo este sempre superior a 0,97, indicando uma forte relação entre a potência biológica e o parâmetro calculado. Já a carga do N9 apresenta um ajuste não linear, no qual a carga atômica possui um decaimento exponencial com a potência biológica, sendo, então, bastante significativo. De forma geral, observa-se que as moléculas mais potentes possuem valores maiores para as cargas atômicas do C8 e do átomo N9, para as energias do HOMO, LUMO e do GAP e um valor pequeno para o momento de dipolo. Vale à pena ressaltar que a interpretação destes resultados com apenas três moléculas tem pouca validade estatística, e não devem ser tomados como resultados finais, porém, foram utilizados como guia para determinação dos parâmetros eletrônicos a serem estudados para as demais moléculas analisadas.

Após a determinação dos parâmetros de estrutura eletrônica mais apropriados para descrição da atividade biológica dessa classe de compostos, ampliou-se o conjunto de dados para 63 moléculas, disponíveis na literatura^{41,46,47}, as quais foram divididas em dois diferentes grupos. Essa divisão foi feita de acordo com a presença ou ausência do grupo propargil, conforme explicado nas seções 2.3 e 2.5.

5.2 Determinação do FERMO

Um novo conceito de orbital de fronteira para reação foi proposto por da Silva e colaboradores⁸³ e, porém ainda pouco utilizado por outros grupos de pesquisa tanto no Brasil como no exterior, onde, sabe-se ser o grupo do Professor Milan Trsic um dos poucos a utilizar esse conceito, pode fornecer um melhor resultado quando se utiliza a energia deste orbital, conforme explicado no item 4.3, página 46.

Assim, tendo-se em vista o conceito de FERMO, comparou-se as energias do HOMO e do FERMO, isto é, o orbital no qual a reação ocorre, para os derivados anfetamínicos estudados. A escolha do FERMO foi realizada calculando-se a contribuição do átomo de reação para a formação do orbital molecular, de forma que o OM ocupado de maior energia e com maior contribuição deste orbital par sua formação foi selecionado como o FERMO.

Pode-se perceber na representação esquemática da Figura 5.5, que para alguns compostos de ambos os grupos de anfetaminas estudadas, que o FERMO é diferente do HOMO, onde os compostos sem átomos de enxofre e sem o grupo propargil apresentam o FERMO no HOMO-2, exceto para a molécula FLA 527, o qual apresenta um átomo de nitrogênio na posição R₃ e o FERMO no HOMO-3, semelhante àqueles compostos com átomo de enxofre na mesma posição. Já os compostos com átomos de enxofre apresentam, o FERMO no HOMO-3, exceto para o composto DPMTA que apresenta o FERMO no HOMO-2. Os compostos com o grupo propargil apresentam o FERMO no HOMO-4, exceto para as moléculas selegilina, 55n, 55o, 55p e 55q os quais apresentam o FERMO no HOMO-3.

Figura 5.5 – Representação esquemática do orbital molecular FERMO.

Os gráficos da Figura 5.6 mostram a comparação das energias do HOMO e FERMO para o Grupo 1 e para o Grupo 2, no qual pode-se perceber que a energia destes orbitais não varia de maneira constante para as moléculas do Grupo 1, entretanto, esta pode ser considerada constante para as moléculas do Grupo 2.

(a)

(b)

Figura 5.6 – Comparação da energia do HOMO e do FERMO para as moléculas do (a) Grupo 1 e (b) Grupo 2.

Desta forma, decidiu-se utilizar o HOMO e FERMO nas análises de componentes principais e na predição de um modelo, se possível, capaz de relacionar a atividade biológica com as propriedades químico-quânticas destes compostos. Estes resultados encontram-se apresentados na seção 5.3 a seguir.

5.3 Relação entre as propriedades calculadas e o IC₅₀ das anfetaminas

Após a determinação da metodologia de cálculo e dos parâmetros que devem ser utilizados, bem como da configuração mais adequada, fez-se a análise entre as propriedades calculadas e atividade biológica dos compostos estudados, apresentados a seguir, através da análise de componentes principais.

5.3.1 PCA Grupo 1

Os resultados da análise de componentes principais mostram possíveis agrupamentos das moléculas estudadas de acordo com as propriedades calculadas, as quais foram relacionadas com a sua atividade biológica frente as enzimas MAO A e B. Os gráficos dos escores utilizando-se a energia HOMO, bem como, os resultados utilizando-se o conceito de FERMO (seção 4.3, página 46) podem ser vistos nas Figuras 5.7 e 5.8, respectivamente, mostrados a seguir.

Pode-se perceber no gráfico dos escores de PC1 versus PC2 da Figura 5.7a, o qual apresenta aproximadamente 100% da variância original, que não existe um agrupamento significativo das moléculas. Entretanto, percebe-se uma tendência onde os compostos que possuem átomos de enxofre na posição R₃ (seção 2.5, página 28) encontram-se em valores negativos de PC1. Este agrupamento pode ser melhor explicado quando se analisa o gráfico dos pesos, Figura 5.7b, no qual pode-se perceber que valores mais positivos da energia levam as moléculas para valores maiores de PC1, bem como valores mais positivos do potencial químico. Já os valores do momento de dipolo, dureza, eletronegatividade, eletronegatividade absoluta, eletrofilicidade e a energia do LUMO, quanto mais positivos, menor o valor de PC1.

Assim, as moléculas com átomos de enxofre, por apresentarem um momento de dipolo em média três vezes menor que os das demais moléculas, tendem a estar em valores mais negativos de PC1.

Figura 5.7 – Gráfico (a) dos escores de PC1 versus PC2 e (b) dos pesos, para os compostos do Grupo 1 utilizando a energia do HOMO.

Porém, este resultado não agrupa os compostos segundo a presença ou ausência de atividade biológica frente ambas as enzimas MAO, onde compostos muito ativos frente a MAO A, como por exemplo o ETA, 4-EtOA, 2,4-DMA, MTA, NMMTA e amiflamine encontram-se em valores muito distintos de PC1, e próximos de substâncias pouco ativas ou

inativas. Também para a MAO B, os compostos ativos ITA, ETA, 2Cl-4,5-MDA, 2Br, 4,5-MDA e 2NO₂-4,5-MDA encontram-se em valores negativos de PC1, entretanto sem ordem ou relação com a potência biológica e ainda, estão misturados aos substâncias inativas.

Tendo-se em vista que os resultados apresentados nos gráficos da Figura 5.7 não mostraram nenhuma relação com a atividade biológica da MAO, utilizou-se o conceito de FERMO na PCA na tentativa de se encontrar um padrão nesses compostos, conforme pode ser visto nos gráficos da Figura 5.8 a seguir. Os resultados obtidos, com aproximadamente 100% de variância, mostram um melhor agrupamento dos compostos do Grupo 1 na segunda componente principal. Porém, novamente aqui, percebe-se que o agrupamento de moléculas com átomos de enxofre na posição R₃, não tendo relação com a presença ou ausência de atividade biológica para as isoformas A e B da MAO, como explicado anteriormente para a Figura 5.7. Tendo-se em vista que este agrupamento deu-se devido a presença de um átomo de enxofre, decidiu-se excluir essas moléculas e realizar, novamente, a análise de componentes principais para os compostos desse grupo. Esse resultado encontra-se apresentado no gráfico da Figura 5.8b.

Pode-se perceber no gráfico da Figura 5.8b que o padrão de agrupamento das moléculas, mesmo excluindo-se aquelas com átomos de enxofre, é semelhante aquele apresentado para o conjunto completo de compostos (Figura 5.8a) e ainda, torna-se bastante semelhante aquele obtido quando se utiliza a energia do HOMO como descritor. Já na Figura 5.8c pode-se ver o gráfico dos pesos de PC1 versus PC2 para as moléculas do Grupo 1 utilizando o conceito de FERMO. Desta forma, percebe-se que a separação ao longo de PC1 é dada, principalmente, pela energia total da molécula, onde quanto menor a energia, mais positivo será o valor da componente. O mesmo vale para os demais parâmetros. Entretanto, como o gráfico dos escores não agrupa os compostos segundo a atividade biológica, não há como relacionar esses descritores com seu peso.

(a)

(b)

(c)

Figura 5.8 – Gráfico dos escores de PC1 versus PC2 dos compostos do Grupo 1 utilizando o conceito de FERMO para (a) todos os compostos do grupo, (b) excluindo-se os compostos com átomos de enxofre (c) gráfico dos pesos de PC1 versus PC2 dos compostos do Grupo 1.

Assim, mesmo utilizando-se o conceito de FERMO não foi possível se determinar um agrupamento das moléculas e uma relação com sua atividade biológica para os compostos do Grupo 1, frente a enzima MAO.

A mesma análise foi realizada para as moléculas do Grupo 2 a fim de se tentar identificar, para este grupo de moléculas, a existência de uma relação entre as propriedades calculadas e a atividade biológica dos compostos, conforme pode ser visto na seção 5.3.2 a seguir.

5.3.2 PCA Grupo 2

A análise de componentes principais do Grupo 2 foi feita da mesma forma descrita anteriormente no item 5.3.1 para o Grupo 1, isto é, inicialmente fez-se uma PCA utilizando o HOMO e posteriormente utilizando-se o FERMO. Estes resultados estão apresentados nos gráficos das Figuras 5.9 e 5.11, respectivamente, apresentados a seguir.

Figura 5.9 – Gráfico dos escores de PC1 versus PC2 das moléculas do Grupo 2 utilizando a energia do HOMO para (a) todas as moléculas do grupo e, excluindo as moléculas (b) 55n, 55o, 55p e 55q e (c) 55n, 55o, 55p, 55q e selegilina.

Pode-se perceber no gráfico dos escores de PC1 versus PC2, com aproximadamente 100% da variância (Figura 5.9a) que existe um padrão de agrupamento quando se relaciona com a potencia biológica dos compostos frente a MAO A, onde as moléculas mais potentes

encontram-se em valores de PC1 próximos a zero e PC2 positivo, já as moléculas menos potentes encontram-se em valores positivos de PC1 e PC2.

Entretanto, o gráfico da Figura 5.9a não apresenta um padrão de agrupamento quando se tenta relacionar com a atividade da MAO B. Também foi realizada uma PCA para os compostos do Grupo 2 excluindo-se os compostos 55a, 55o, 55p e 55q (Figura 5.9b) e as moléculas 55a, 55o, 55p, 55q e selegilina (Figura 5.9c) uma vez que estas possuem as estruturas químicas mais distintas do que aquelas apresentadas pelas estruturas 50 a 53, podendo sugerir um agrupamento segundo a estrutura química e não segundo os descritores calculados. Contudo, os resultados obtidos mostraram-se de acordo com aquele obtido para todos os compostos do Grupo 2, onde existe um padrão quando se relaciona com a MAO A e não apresenta nenhuma relação com a MAO B.

Quando se analisa o gráfico dos pesos das moléculas do Grupo 2, Figura 5.10, percebe-se que o agrupamento das moléculas do gráfico do escores da Figura 5.9 é dado, principalmente, pela energia total da molécula, assim como para o Grupo 1, onde os compostos com energia menores encontram-se em valores positivos de PC1.

Figura 5.10 - Gráfico de PC1 versus PC2 dos pesos para as moléculas do Grupo 2 utilizando-se a energia do HOMO.

É importante notar que a PCA foi feita com os dados autoescalados e, desta forma, efeitos da grandeza dos descritores foram eliminados. Ainda na intenção de identificar um padrão para a MAO B, fez-se uma PCA utilizando o FERMO, apresentado na Figura 5.11.

Figura 5.11 – Gráfico dos escores de PC1 versus PC2 para (a) todas as moléculas do Grupo 2, (b) moléculas do Grupo 2 excluindo-se os compostos 55n, 55o, 55p e 55q e (c) moléculas do Grupo 2 excluindo-se os compostos 55n, 55o, 55p, 55q e selegilina

Pode-se perceber no gráfico da Figura 5.11a que as moléculas do Grupo 2 encontram-se agrupadas em três diferentes subgrupos, um em valores negativos de PC1 (menor que -200) e negativos de PC2, outro em valores de PC1 entre -150 e 50, e o terceiro em valores de PC1

superiores a 150. De forma geral, as moléculas mais potentes frente a MAO A encontram-se em valores de PC1 e PC2 próximos a zero. Já para a MAO B a molécula mais potente, isto é, a selegilina, encontra-se em valor positivo de PC1 e negativo de PC2, próxima a moléculas inativas e em um grupo diferente dos demais compostos ativos. Assim, os ligantes ativos não apresentam um padrão de agrupamento segundo a sua potência biológica. Por esta razão, fez-se novamente uma análise de PCA excluindo, inicialmente, os compostos 55n, 55o, 55p e 55q, Figura 5.11b e uma terceira análise, excluindo-se também a selegilina, Figura 5.11c, tendo-se em vista que esta molécula apresentou-se como um *outlier*, isto é, muito diferente dos demais, entretanto, o padrão de agrupamento não foi alterado. Desta forma, como no caso anterior, só foi possível estabelecer-se uma relação destes compostos frente a MAO A.

O gráfico dos pesos de PC1 versus PC2 encontra-se apresentado na Figura 5.12 abaixo.

Figura 5.12 – Gráfico dos pesos de PC1 versus PC2 para todas as estruturas do Grupo 2.

Pode-se perceber neste gráfico dos pesos de PC1 *versus* PC2 que o a energia total da molécula é o descritor responsável pelo padrão de agrupamento dos compostos observado no gráfico da Figura 5.11a.

Os resultados obtidos e aqui apresentados para os derivados anfetamínicos dos Grupos 1 e 2 não apresentaram um padrão claro de agrupamento entre os descritores eletrônicos obtidos através de cálculos de química-quântica com o método HF/6-31G(d,p) e a atividade biológica destes compostos, e por esta razão, foi feito um estudo destes mesmo compostos com o método DFT, com o funcional B3LYP, por introduzirem correlação eletrônica, e função de onda 6-31G(d,p) importante na descrição de sistemas eletrônicos, conforme explicado no item 4.1, página 39. Porém, os resultados obtidos são semelhantes aos aqui apresentados para o método HF, como pode ser visto nos gráficos da Figura 5.13 abaixo e, desta forma, não serão discutidos. É importante notar que, ao contrário do esperado, a introdução de correlação eletrônica no processo de otimização de geometria e no cálculo dos descritores químico-quânticos não mostrou diferença significativa nos resultados quando comparados com aqueles obtidos com o método HF.

(a)

(b)

Figura 5.13 – Gráfico dos escores de PC1 versus PC2 para as moléculas do (a) Grupo 1 e (b) Grupo 2.

Tendo-se em vista que os resultados obtidos com química-quântica, tanto com a utilização do método HF, como após a introdução da correlação eletrônica com a utilização do método DFT, não foram satisfatórios para a descrição da atividade biológica frente a MAO destes derivados anfetamínicos, decidiu-se utilizar a estrutura do receptor biológico na modelagem destes compostos, para desta forma, avaliar-se os modos de interação ligante-receptor, e então, se possível, propor-se um modelo teórico capaz de explicar a relação entre a estrutura química e a atividade biológica.

Este estudo foi realizado durante o doutorado sanduíche, sob orientação do professor Dr. Philip Biggin do *Structural Bioinformatics and Computational Biochemistry Unit* (SBCB), do departamento de bioquímica da University of Oxford, Inglaterra. A escolha deste grupo para a realização dos estudos de modelagem molecular deveu-se ao amplo e vasto conhecimento do Dr. Philip Biggin na simulação de proteínas bem como seu particular interesse pela enzima MAO, a qual já vinha sendo estudada em seu grupo.

Desta forma, e ainda na intenção de se identificar possíveis relações entre esses compostos e sua atividade biológica, foram feitos estudo de *docking* e de dinâmica molecular, na tentativa de que a modelagem molecular baseada na estrutura do receptor biológico forneça tais resultados. Estes estudos encontram-se apresentados nas seções 5.4 e 5.5 a seguir.

5.4 Docking molecular

A chave para um bom estudo de *docking* é a utilização de um programa o qual seja capaz de reproduzir resultados experimentais do modo de interação entre ligante e receptor. Conforme resultados da literatura¹⁰² e explicado no item 4.4.1, página 32, o programa GOLD mostrou-se adequado para esse estudo.

Porém, ainda no intuito de se verificar a confiabilidade deste programa para o grupo de anfetaminas estudadas, avaliou-se o poder de reprodução do programa GOLD para os dados de cristalografia de raios-X das estruturas PDB da MAO B. Nesta etapa, retirou-se o ligante complexado experimentalmente e fez-se a sua docagem na estrutura de raios-X da sua própria enzima, o qual foi chamado de *dockingback*. Também avaliou-se os resultados de *docking* de um ligante complexado experimentalmente através da sua docagem em uma estrutura PDB da MAO diferente da qual ele foi cristalizado, chamado de *crossdocking*. Ambos os resultados estão apresentados na seção 5.4.1 a seguir. Os resultados de *docking* para os derivados anfetamínicos estão apresentados na seção 5.4.2, página 69.

5.4.1 Dockingback e crossdocking

O estudo de *dockingback* e *crossdocking* foram realizados para as seis estruturas da MAO B e para as cinco estruturas da MAO A para se avaliar o poder de reprodução dos dados experimentais pelo programa GOLD. Entretanto, tendo-se em vista a semelhança nos resultados obtidos, apenas os estudos de *dockingback* e *crossdocking* das estruturas 1OJA e 2BK3 serão apresentados e podem ser vistos nas Figuras 5.14 e 5.15, respectivamente.

As diferentes estruturas PDB da MAO foram cristalizadas com diferentes ligantes. As relações entre essas estruturas e seus ligantes encontram-se apresentados na Tabela 5.2, bem como a sua abreviação (sigla) utilizada no decorrer deste trabalho.

Tabela 5.2 – Estruturas PDB referentes às enzimas MAO A e MAO B, ligante complexado e esta estrutura e sua abreviação.

	Ligante	Sigla
1O5W	N-[3-(2,4-Diclorofenoxi)propil]-N-metil-N-prop-2-inilamina (clorgilina)	MLG
2BXR	N-[3-(2,4-Diclorofenoxi)propil]-N-metil-N-prop-2-inilamina	MLG
2BXS	N-[3-(2,4-Diclorofenoxi)propil]-N-metil-N-prop-2-inilamina	MLG
2Z5X	7-metoxi-1-metil-9H- β -carbolina, harmine	HRM
2Z5Y	7-metoxi-1-metil-9H- β -carbolina, harmine	HRM
1OJA	Isatina	ISN
2BK3	Farnesol	FOH
1OJ9	1,4-difenil-2-butenol	1PB
2V60	7-(3-clorobenziloxi)-4-carboxaldeido-cumarina	C17
2V61	7-[(3-clorobenzil)oxi]4-[(metilamino)metal]2H-chromen-2-ona	C18
2V5Z	(S)-(+)-2-[4-(Fluorbenziloxi-benzilamino)propinamida]	SAG

Como pode ser visto na Tabela 5.2, os ligantes das estruturas 1O5W, 2BXR e 2BXS é o MLG, bem como das estruturas 2Z5X e 2Z5Y, é o HRM, porém estão sendo tratadas como estruturas diferentes. Esta diferenciação decorre do fato de outros ligantes estarem complexados a estas enzimas, podendo, assim, modificar o modo de interação do inibidor com o receptor biológico.

Pode-se ver nas Figuras 5.14 e 5.15 que o programa GOLD reproduziu os resultados experimentais de modo satisfatório, mostrando-se adequado para o estudo de *docking* das anfetaminas nessas estruturas PDB, como era esperado segundo resultados da literatura¹⁰². A Figura 5.14 mostra as posições de docagem que obtiveram a maior função de score (melhor resultado) para a estrutura 1OJA com o seu próprio ligante (*dockingback*) isto é, para a molécula do ISN, bem como os melhores resultados de *crossdocking* para os demais ligantes da MAO B (FOH, 1PB, C17, C18 e SAG).

Figura 5.14 – Comparação entre a melhor conformação do ligante obtida no estudo de *docking*, isto é, conformação com maior valor de score (ciano) das moléculas (a) ISN, (b) FOH, (c) 1PB, (d) C17, (e) C18 e (f) SAG, com seu dado de cristalografia (amarelo), para a estrutura PDB 1OJA. As moléculas de água cristalográficas encontram-se representadas na forma bola.

O resultado teórico (ciano) é, de modo geral, semelhante aquele obtido experimentalmente (amarelo) onde os ligantes estão próximos a molécula do FAD (sítio de reação com a enzima) indicando possíveis interações com esta molécula. Percebe-se ainda possíveis interações dos ligantes com as moléculas de água cristalográficas (representadas na forma bola) presentes no sítio ativo da enzima, explicadas posteriormente.

O mesmo pode ser observado na Figura 5.15 para a estrutura 2BK3, onde o resultado teórico encontra-se em ciano, o experimental em amarelo e as moléculas de água cristalográficas na forma bola. Assim, estes resultados mostraram que o programa GOLD é adequado para o estudo dessa enzima.

Figura 5.15 – Comparação entre a melhor conformação do ligante obtida no estudo de *docking*, isto é, conformação com maior valor de score (ciano) das moléculas (a) ISN, (b) FOH, (c) 1PB, (d) C17, (e) C18 e (f) SAG, com seu dado de cristalografia (amarelo), para a estrutura PDB 2BK3. As moléculas de água cristalográficas encontram-se representadas na forma bola.

Tendo-se em vista que as estruturas cristalográficas apresentam moléculas de água no sítio ativo da enzima, e da importância da inclusão destas nos estudos de *docking*, uma vez que as águas podem apresentar um papel importante no modo de interação entre o ligante e o receptor^{121,122}, conforme explicado no item 4.4.1, página 32, escolheu-se a estrutura 1OJA como estrutura para avaliação da importância da inclusão das moléculas de água cristalográficas durante o estudo de *docking*. A escolha desta estrutura PDB deveu-se ao fato desta ser a estrutura disponível obtida com a maior resolução (1,7Å) bem como pela disponibilidade de estudos teóricos disponíveis na literatura^{25,123}.

Os resultados de *dockingback* obtidos para a estrutura 1OJA e seu ligante ISN mostraram o efeito das águas cristalográficas neste estudo, onde a conformação de docagem

do ligante é diferente e dependente da presença ou ausência das águas cristalográficas, conforme pode ser visto na Figura 5.16, abaixo para os resultados com os maiores valores da função de escore.

Figura 5.16 – Representação simplificada da estrutura 1OJA da MAO B (amarelo) com o FAD (estrutura bola-palito) da (a) estrutura cristalográfica e, para os melhores resultados de *dockingback* para o ligante ISN (forma palito), (b) com moléculas de águas cristalográficas e (c) sem moléculas de águas cristalográficas.

Com este resultado, e em concordância com resultados disponíveis na literatura^{121,122}, pode-se ver que a conformação do ligante é dependente do sistema utilizado, isto é, da inclusão ou exclusão de moléculas de águas presentes na estrutura cristalográfica. Pode-se ver na Figura 5.16a que na estrutura cristalográfica existem duas moléculas de água orientando a posição do ISN e sua interação com a molécula FAD, sítio no qual os ligantes irão interagir ou reagir para produzir o efeito biológico desejado. Após a docagem do ISN na estrutura 1OJA, Figura 5.16b, vê-se que a orientação do ISN é diferente daquela observada experimentalmente, sugerindo que a interação entre o ligante e a enzima ocorre de modo diferente daquele observado experimentalmente, isto é, a interação entre o FAD e o ISN ocorre através do átomo de oxigênio do ISN e o nitrogênio do FAD. Os resultados de densidade eletrônica mostram uma grande densidade de carga sobre esse átomo, bem como sobre a molécula de água, indicando esta interação. Os estudos de *dockingback* sem as moléculas de água cristalográficas, Figura 5.16c, mostram que a orientação do ligante é

diferente dos dois resultados anteriores, onde a interação com o FAD dá-se, provavelmente, entre o átomo de N do FAD e o átomo de N do ISN, sendo, desta forma, uma reação menos favorável do que aquela mediada pelas moléculas de água, como sugerido pelos resultados anteriormente explicados, confirmando, assim, a importância da presença de moléculas de água no sítio ativo da enzima para este ligante.

Após se avaliar a importância da inclusão das moléculas das águas cristalográficas no modelo, fez-se a docagem das 63 moléculas estudadas nas cinco estruturas PDB da MAO A e nas seis estruturas PDB selecionadas para a MAO B. Os resultados encontram-se na seção 5.4.2 a seguir.

5.4.2 Docking das moléculas do Grupo 1 e do Grupo 2

Após a verificação da importância da inclusão das águas cristalográficas através do estudo de *dockingback* do ISN na estrutura 1OJA, realizou-se a docagem de todas as moléculas dos Grupos 1 e 2 nas estruturas disponíveis no PDB para a MAO A e as estruturas PDB selecionadas para a MAO B, conforme explicado no item 4.4, página 31. A Figura 5.17 mostra esses resultados.

Tendo-se em vista que o melhor resultado no estudo de *docking* é aquele que apresenta os valores mais altos da função de escore (GOLDScore) para as moléculas mais potentes e valores menores de GOLDScore para os compostos pouco potentes ou inativos. Pode-se perceber no gráfico da Figura 5.17 que os resultados obtidos na docagem dos 63 compostos são dependentes da estrutura PDB utilizada, tanto para a MAO A quanto para a MAO B. Para ambas as isoformas da MAO, onde a variação do GOLDScore é pouco explicativa segundo a

potência do composto, entretanto bastante útil quanto a determinação da estrutura PDB mais adequada para estudos posteriores.

Figura 5.17– Gráfico da melhor função de escore obtida no GOLD (GOLD score) para os 63 ligantes anfetamínicos estudados para (a) MAO A e (b) MAO B.

A Figura 5.17a mostra que a estrutura 2Z5X apresentou os piores resultados para essa série de ligantes, onde alguns deles apresentam valores negativos do GOLD Score, seguido da 2Z5Y. Estas duas estruturas foram obtidas por Son e colaboradores⁵² e seus resultados mostram que há sete moléculas de água no sítio ativo da enzima. Desta forma, este grande número de moléculas de água no sítio ativo da enzima, pode dificultar a interação entre a biomacromolécula e o inibidor. A Figura 5.18 mostra de maneira esquemática este resultado

para as estruturas 53d e a estrutura 53e, as quais apresentaram os piores valores de GoldScore na enzimas 2Z5X e 2Z5Y, respectivamente. Pode-se perceber, na Figura 5.18a que o inibidor 53d está muito próximo das moléculas de água e, ainda, que a orientação do grupo propargil está diferente daquela esperada, estando distante do sitio de reação com o FAD. Esta inversão na sua orientação pode ser resultado de tamanho da cavidade catalítica, bem como da interação com as moléculas de água. O mesmo pode ser observado para o ligante 53e na Figura 5.18b.

As estruturas 2BXR, 2BXS e 1O5W apresentam resultados semelhantes e positivos para todas as estruturas. Vale a pena ressaltar que a estrutura 1O5W corresponde a rMAO A sendo mais semelhante com a hMAO B, conforme explicado anteriormente no item 4.4. Seus resultados de *docking* são mais semelhantes para a hMAO B do que para a hMAO A, sugerindo que esses ligantes possuem, de forma geral, maior afinidade pela hMAO B.

Figura 5.18 – Representação esquemática dos compostos com o menor valor do GOLDScore com a proteína (cinza) o FAD (forma palito-bola) e águas cristalográficas (forma bola) do ligante (forma palito), (a) 53d para a estrutura 2Z5X e (b) 53e na estrutura 2Z5Y.

Já para a MAO B, a estrutura 1OJA apresentou os piores resultados obtidos (preto), sendo na maioria das vezes negativos, sugerindo que esta estrutura não é a estrutura mais adequada para o estudo dessa série de compostos, como pensado inicialmente. Os resultados

obtidos para as demais cinco estruturas da MAO mostraram-se semelhantes, onde os valores obtidos da função de escore são bastante parecidos e sempre positivos.

Os gráficos da Figura 5.19 abaixo mostram os valores dos GoldScore apenas para os compostos anfetamínicos ativos frente as duas isoformas da enzima, isto é, para aqueles com um valor de IC_{50} menor que $100\mu M$ para, então, se determinar quais as estruturas mais adequadas para o estudos destes inibidores.

Pode-se perceber nos gráficos da Figura 5.19, que a estrutura 1O5W é a que apresenta o melhor resultado de *docking* para os derivados anfetamínicos em estudo para a MAO A, como dito anteriormente, e a estrutura 2BK3 é aquela que apresenta o maior número de compostos com os maiores valores da função escore, isto é, maior valor para o GoldScore para a MAO B. Desta forma, selecionou-se esta estrutura para os demais estudos realizados com a isoforma B da enzima. Vale a pena ressaltar que os gráficos das Figuras 5.19b e d correspondem as moléculas ativas da MAO A e B, respectivamente, com as estruturas que apresentaram apenas resultados positivos para o GoldScore.

É importante ressaltar que se esperava que os compostos mais potentes obtivessem um valor alto de GoldScore e as moléculas inativas, valores baixos, entretanto isso não foi observado para nenhuma das estruturas utilizadas. Assim, decidiu-se por avaliar aquela que apresentava os melhores valores da função de escore para todas as moléculas.

Figura 5.19 – Gráfico das moléculas ativas da série de 63 derivados anfetamínicos em estudo versus a função de escore (Gold Score) para as estruturas (a) 2Z5X, 2Z5Y, 2BXR, 2BXS e 1O5W da MAO A, (b) 2BXR, 2BXS e 1O5W da MAO A, (c) 1OJA, 1OJ9, 2BK3, 2V5Z, 2V60 E 2V61 da MAO B e (d) 1OJ9, 2BK3, 2V5Z, 2V60 E 2V61 da MAO B.

Após a obtenção destes resultados, avaliou-se quais as principais diferenças entre essas estruturas da enzima MAO B a fim de se verificar as razões que levaram a resultados diferentes. Estes resultados serão apresentados no item 5.4.3 a seguir.

5.4.3 Diferenças entre as seis estruturas PDB da MAO B em estudo

Tendo-se em vista as diferenças obtidas nos resultados de *docking* para as seis estruturas da MAO B, calculou-se o tamanho do sítio ativo da estrutura 1OJA e da 2BK3 a fim de se avaliar uma possível diferença no tamanho da cavidade, como mostrado na Figura 5.20. Neste cálculo, foi utilizado o programa Mustela*.

Pode-se perceber através da Figura 5.20 que o tamanho da cavidade calculada em função do eixo Z da enzima é bastante diferente para as duas estruturas, onde a cavidade da estrutura 1OJA é menor que a da estrutura 2BK3 em aproximadamente 6 Å, o que corresponde a um aumento de 23% aproximadamente no tamanho da cavidade em relação ao eixo Z na estrutura 2BK3.

Figura 5.20 – (a) Gráfico do raio da cavidade do sítio ativo das estruturas 1OJA e 2BK3 em função do eixo Z e, representação esquemática da cavidade calculada (branco) para as estruturas (b) 1OJA e (c) 2BK3.

* Mustela, in house software developed at the SBCB unit. University of Oxford, Inglaterra.

A análise das estruturas das proteínas utilizadas mostrou que a principal diferença entre a estrutura 1OJA e as demais está na conformação de um resíduo de aminoácido, a isoleucina 199 (Ile 199) o qual encontra-se na conformação denominada fechada nesta enzima e na conformação aberta para as demais estruturas da MAO B utilizadas, conforme pode ser visto na Figura 5.21. A conformação fechada da Ile 199 divide a cavidade catalítica da enzima 1OJA em duas diferentes cavidades, denominadas de cavidade de entrada e o sitio ativo propriamente dito, sendo então, de tamanho menor que a cavidade do sitio ativo das demais estruturas, conforme explicado anteriormente no item 2.3.1, página 7. Devido ao seu tamanho reduzido, esta estrutura não é adequada para ligantes grandes, ou maiores que o ISN (ligante complexado nesta enzima) justificando assim, os resultados obtidos para a função de escore dos derivados anfetamínicos em estudo.

Figura 5.21 – Representação esquemática da conformação do aminoácido ILE 199 (bola) nas estruturas (a) 1OJA e (b) 2BK3. Moléculas do ligante, ISN e do cofator, FAD, estão representadas na forma palito, águas cristalográficas na forma bola e proteína em amarelo.

Além da conformação da Ile 199 existem outras pequenas diferenças entre as estruturas da MAO B utilizadas, como por exemplo, número e posição das moléculas de água cristalográfica e o volume da enzima, o qual pode variar de acordo com o tamanho do ligante, conforme pode ser visto na Figura 5.22 abaixo para as estruturas 1OJA e 2BK3. Entretanto essas diferenças são muito pequenas entre as estruturas estudadas e podem ser desprezadas na comparação das estruturas, como por exemplo, a estrutura 1OJA e 2BK3 as quais apresentam

um desvio médio quadrático (do inglês *root mean square deviation*, RMSD) de apenas 0,67 nm.

Figura 5.22 – Comparação das estruturas 1OJA (ciano) e 2BK3 (laranja) e das suas moléculas de água cristalográficas em vermelho e amarelo para as duas estruturas, respectivamente.

Após se identificar a diferença na conformação do Ile 199, utilizou-se o programa PyMOL¹²⁴ para gerar as possíveis conformações desse aminoácido nas duas estruturas utilizadas anteriormente. Foram encontrados seis diferentes rotâmeros deste aminoácido e, então, calculou-se o tamanho da cavidade do sitio ativo para essas conformações, conforme pode ser visto nos gráficos da Figura 5.23.

Figura 5.23 – Gráfico da variação do tamanho da cavidade do sitio ativo da estrutura cristalográfica em relação ao eixo Z dos seis diferentes rotâmetros do aminoácido Ile 199 para as estruturas (a) 1OJA e (b) 2BK3.

Pode-se ver nos gráficos da Figura 5.23 que o tamanho da cavidade varia de acordo com o rotâmetro analisado. Para a estrutura 1OJA os rotâmetros 1 e 6 apresentam uma cavidade maior que os demais e semelhantes entre si. A visualização destes rotâmetros mostra que o Ile 199 está na conformação aberta, semelhante àquela apresentada pela estrutura 2BK3 e, ainda que o rotâmetro 1 coincide com a conformação experimental apresentada por esta estrutura. Entretanto, para esses rotâmetros a cavidade do sitio ativo é maior do que aquela apresentada pela estrutura 2BK3 em aproximadamente 14 Å, sugerindo outras pequenas modificações na estrutura 1OJA pouco relevante, a princípio, para a orientação dos ligantes. O rotâmetro 4 corresponde a estrutura cristalográfica da 1OJA.

Já para a estrutura 2BK3 percebe-se que o rotâmetro 4 apresenta uma cavidade menor que a apresentada pelos demais. Neste rotâmetro tem-se a conformação fechada para o Ile 199, onde este aminoácido adquire a mesma conformação da estrutura 1OJA apresentando a cavidade catalítica de tamanho semelhante a desta estrutura, isto é, de aproximadamente 32 Å em relação ao eixo Z.

Estas diferenças no tamanho da cavidade do substrato levam a diferentes orientações do ligante no sitio ativo da biomacromolécula, sugerindo uma forte relação entre o tamanho da cavidade, o tamanho do ligante e sua interação com a enzima, conforme pode ser visto, de maneira esquemática para a estrutura 1OJA, na Figura 5.24, abaixo.

Pode-se perceber na Figura 5.24 que a conformação e orientação do ligante ISN independem da conformação do Ile199, já os ligantes FOH e selegilina mostraram-se bastante sensíveis quanto a sua conformação e orientação de acordo com a conformação deste aminoácido, sugerindo que, para compostos maiores, o tamanho da cavidade é determinante no modo de interação entre ligante e receptor. Resultados semelhantes foram encontrados para os demais rotâmetros da estrutura 1OJA e para a 2BK3.

Figura 5.24 – Representação esquemática da posição de docagem do ISN, FOH e Selegilina (forma palito) na estrutura 1JOJA da MAO B para (a) a estrutura cristalográfica e rotâmero 4 e (b) para o rotâmero 1. O ILE 199 está representado na forma bola.

Ainda a fim de se avaliar a influência do tamanho da cavidade do sitio catalítico após interação com ligantes, calculou-se o tamanho do sitio após a docagem dos 63 derivados anfetamínicos nas duas estruturas cristalográficas da MAO B, isto é, as estruturas 1OJA e 2BK3, mostrado nos gráficos da Figura 5.25.

Figura 5.25 – Gráfico do tamanho do sítio ativo das estruturas (a) 1OJA para os ligantes ativos, (b) 1OJA para os ligantes inativos, (c) 2BK3 para os ligantes ativos e (d) 2BK3 para os ligantes inativos.

Os gráficos da Figura 5.25 mostram que o tamanho do sítio ativo não varia, ou varia de maneira pouco significativa após o *docking* dos ligantes para as estruturas 1OJA e 2BK3. Entretanto, como mostrado para os rotâmeros da estrutura 1OJA, a posição e orientação de docagem destes ligantes é bastante sensível a conformação do Ile 199, onde o tamanho da cavidade catalítica influencia na conformação do ligante, conforme pode ser visto na Figura 5.26 abaixo para as estruturas cristalográficas 1OJA e 3BK3 para os ligantes selegilina, ETA e 52a, por exemplo.

Figura 5.26 - Representação nesquemática dos resultados com maior valor de GoldScore para as moléculas (a) selegilina, (b) ETA e (c) 52a na estrutura 1OJA (amarelo) e (d) selegilina, (e) ETA e (f) 52a para a estrutura 2BK3 (verde). Ile 199 representado em azul e as águas cristalográficas em azul.

Na Figura 5.26 pode-se perceber que na estrutura 1OJA o Ile 199 está na conformação fechada e assim, ligantes grandes, como as anfetaminas apresentam uma conformação pouco favorável para a interação com o FAD onde, muitas vezes o ligante se sobrepõe a este resíduo (Figura 5.26c). Já quando o Ile 199 está na conformação aberta (estrutura 2BK3) esses ligantes apresentam uma melhor conformação de docagem, indicando possíveis interações com o receptor, sugerindo que as estruturas com Ile 199 na conformação aberta, em particular

a estrutura 2BK3, são as mais adequadas para o estudo dos derivados anfetamínicos em estudo.

Após a avaliação do docking destes ligantes nas estruturas cristalográficas da MAO, e da verificação da influência da conformação da isoleucina 199 neste resultado, realizou-se um estudo *dockingback* do ISN nas trajetórias obtidas por dinâmica molecular da estrutura 1OJA. Este estudo foi possível por ter sido feito em colaboração com os pesquisadores que realizaram as simulações MD desta estrutura^{25,123}, durante o doutorado sanduíche no SBCB.

5.4.4 Estudo de *dockingback* da ISN nas trajetórias MD da 1OJA

Tendo-se em vista os resultados obtidos para as seis diferentes estruturas da MAO, realizou-se também a docagem do ISN, ligante co-cristalizado com a estrutura 1OJA nas trajetórias obtidas na simulação de dinâmica molecular, para se avaliar os efeitos na mudança da conformação da proteína após a simulação sobre a conformação de interação do ligante na proteína. Vale a pena ressaltar que a simulação MD foi realizada sem o ligante ISN, ou seja com a enzima na sua forma APO, o qual foi excluído anteriormente ao início da simulação, e apenas nos estudos de *docking*, o ligante, com a conformação experimental, foi introduzido no sistema.

O gráfico da Figura 5.27 abaixo mostra os melhores valores do GoldScore após o docking do ISN para cada uma das trajetórias obtidas por MD para a estrutura 1OJA.

Figura 5.27 – Gráfico do GoldScore para o ISN nas trajetórias MD da estrutura 1OJA.

Pode-se perceber no gráfico da Figura 5.27 que o valor do GoldScore varia de maneira significativa de acordo com a trajetória MD, variando entre 22 e 42. Estas diferenças podem ser causadas pela conformação do Ile 199 que, inicialmente, está na forma fechada, porém pode abrir durante a simulação. Desta forma, foi avaliado a conformação deste aminoácido ao longo das trajetórias MD.

A Figura 5.28 mostra alguns resultados de *docking* do ISN nas trajetórias MD bem como a isoleucina para verificação da sua conformação.

Esses resultados mostram que a conformação do Ile 199 varia com o tempo, abrindo e fechando a cavidade do sítio ativo, confirmando, assim, as diferenças nos resultados do GoldScore, apresentados no gráfico da Figura 5.27 acima. Quando se compara a conformação do aminoácido (Figura 5.28) com o valor do GoldScore (Figura 2.27) vê-se que para valores próximos do resultado de *docking* tem-se uma conformação semelhante da isoleucina, como por exemplo, as trajetórias 1 e 9, com GoldScore próximos a 36 e o aminoácido dividindo a cavidade em duas. Entretanto, pode-se perceber que para a trajetória 7 o GoldScore apresenta o menor valor e o Ile 199 está na conformação aberta. Esta aparente contradição pode ser efeito do tamanho da cavidade do sítio, que como mostrado na Figura 5.23a, é bastante grande quando a isoleucina está na chamada conformação aberta e, desta forma, o

ISN pode não interagir de modo correto com a biomacromolécula, ressaltando assim, a necessidade da utilização da estrutura PDB mais adequada para o estudo desse grupo de moléculas.

Figura 5.28 – Snapshot das trajetórias MD da estrutura 1OJA com as melhores posições de docagem do ISN nas trajetórias (a) 1, (b) 7, (c) 9, (d) 14, (e) 33 e (f) 66. Ile 199 na forma está representado na forma bola.

Ainda na intenção de se identificar a variação no tamanho da cavidade do sitio ativo durante a simulação MD, verificou-se a conformação deste aminoácido em cada uma das trajetórias MD obtidas para a estrutura 1OJA sem ligante, através da investigação do valor do

ângulo diédrico C2C5C6C8 do Ile 199 (Figura 5.29), o qual apresenta um valor de 60,83 e 62,46 para as cadeias A e B, respectivamente, na estrutura cristalográfica.

Figura 5.29 – Estrutura molecular do aminoácido isoleucina.

De acordo com os rotâmeros deste aminoácido mostrado anteriormente e do valor do diédro da estrutura cristalográfica, considerou-se a conformação fechada quando este diedro apresentar um valor entre 50° e 79°. Desta forma, percebe-se que o Ile 199 na cadeia A permanece por mais tempo com a conformação aberta, porém, na cadeia B encontra-se, na maior parte do tempo, na conformação fechada, conforme pode ser observado na Tabela 5.3, abaixo.

Tabela 5.3 – Valores do ângulo diédrico C2C5C6C8 do ILE 199 obtidos durante a dinâmica molecular da estrutura 1OJA sem ligante (continua).

Trajetória	Ângulo		Trajetória	Ângulo	
	Cadeia A	Cadeia B		Cadeia A	Cadeia B
1	70,32	85,70	4	61,74	57,30
2	83,75	70,61	5	76,61	72,31
3	70,11	69,40	6	51,85	46,20
7	50,72	82,64	40	163,13	68,03
8	57,10	68,33	41	93,50	65,29
9	63,98	143,19	42	171,54	64,69
10	94,11	62,69	43	166,17	71,04
11	66,76	76,52	44	142,95	52,73

Tabela 5.3 – Valores do ângulo diédrico C2C5C6C8 do ILE 199 obtidos durante a dinâmica molecular da estrutura 1OJA sem ligante (continuação).

Trajetória	Ângulo		Trajetória	Ângulo	
	Cadeia A	Cadeia B		Cadeia A	Cadeia B
12	61,22	89,35	45	157,49	69,26
13	71,58	79,02	46	154,49	37,76
14	66,39	72,59	47	84,76	67,77
15	74,44	64,78	48	154,91	74,58
16	84,92	69,31	49	152,07	52,00
17	87,55	76,25	50	150,53	68,23
18	53,74	54,61	51	176,66	83,54
19	72,59	75,26	52	146,49	52,39
20	69,42	153,20	53	64,80	75,99
21	56,64	79,28	54	161,62	80,39
22	47,12	72,37	55	64,01	94,32
23	80,53	82,98	56	172,15	85,95
24	74,04	89,02	57	68,36	94,60
25	85,21	-176,19	58	70,60	83,77
26	95,44	163,52	59	175,49	77,78
27	137,42	69,35	60	66,67	71,28
28	76,93	76,57	61	82,81	70,47
37	94,04	179,67	34	168,27	82,85
38	112,10	165,57	35	104,58	166,82
39	139,12	70,41	36	140,05	59,46
29	86,99	65,72	62	142,84	157,51
30	73,80	61,02	63	132,45	50,56
31	150,52	57,04	64	172,59	53,29
32	101,73	72,35	65	-179,16	88,00
33	169,06	74,45	66 e 0	170,67	68,53

Tendo-se em vista que o Ile 199 apresenta um número diferente para as conformações aberta e fechada nas cadeias A e B, isto é, encontra-se na forma aberta mais vezes na cadeia A (42 trajetórias MD) do que na cadeia B (24 trajetórias MD) observou-se o modo com o qual

esta enzima está presa a membrana e se esta pode influenciar na rotação deste aminoácido, o qual pode ser observado na Figura 5.30, abaixo.

Figura 5.30 – MAO B presa a bicamada lipídica, o aminoácido Ile 199 (vermelho) nas cadeias A (azul) e B(amarelo) e a molécula do FAD.

Pode-se na Figura 5.30 que a cavidade de entrada do inibidor na MAO B, bem como o sitio ativo estão bastante próximos da bicamada lipídica e que, ainda, na cadeia B (a direita na Figura 5.28 em amarelo) o Ile 199 está mais próximo da célula, apresentando, possivelmente maior interação os demais átomos e por isso apresenta uma menor flexibilidade, permanecendo, na maior parte do tempo, na conformação fechada. Já a cadeia A (a esquerda da Figura 5.30 e em azul) a entrada do sitio ativo encontra-se mais distante da bicamada lipídica, bem como o Ile 199, justificando assim, sua maior mobilidade.

Entretanto, para se ter um maior indício da conformação deste aminoácido e das razões pelo qual ele permanece em uma conformação em detrimento a outra, faz-se necessário o estudo da estrutura 1OJA com um tempo maior de simulação, bem como a avaliação da

isoleucina através de simulação MD na presença do ligante. Este resultado encontra-se apresentado na seção 5.5 abaixo.

Pode-se ainda utilizar os resultados de *docking*, obtidos para a MAO A e MAO B para se avaliar a distância entre os átomos participantes da reação para verificar se eles apresentam uma geometria espacial propícia a tal reação e a interação com as águas cristalográficas. Estes resultados encontram-se apresentados no item 5.4.5 a seguir.

5.4.5 Estudo de *docking* para a MAO A e MAO B

Para avaliação da posição dos ligantes no sitio ativo da MAO A, utilizou-se a estrutura 2BXS uma vez que esta apresentou os melhores resultados, isto é, os maiores valores para a função de escore, dentre as estruturas humanas da MAO A, conforme apresentado no item 5.4.2, página 69. A Figura 5.31 mostra alguns desses resultados.

Pode-se perceber nesta figura que a posição de docagem é bastante diferente para cada um dos exemplos utilizados, onde, os ligantes da Figura 5.31a e b são bastante potentes, os inibidores da Figuras 5.31c e d são moderados e os das Figuras 5.31e e f são inativos frente a MAO A, sugerindo que não há um padrão para a conformação deste compostos no sitio ativo da enzima os quais expliquem a interação com o FAD e assim a potencia do inibidor. Estes resultados, pouco satisfatório pode ser resultado da não inclusão de moléculas de água nos estudos de *docking*, uma vez que estas não foram determinadas experimentalmente, tendo-se em vista a alta resolução (3,00Å) utilizada nos estudos de raios-X. Desta forma, para a obtenção de um resultado com maior precisão, faz-se necessário a utilização de uma estrutura cristalográfica obtido com menor resolução a fim de estas as águas cristalográficas sejam incluídas no modelo.

Figura 5.31 – Representação esquemática da estrutura 2BXS (cinza) com a molécula de FAD e o ligante (estruturas palito) após o docking dos compostos (a) ETA, (b) 2,4-DMA, (c) Anfetamina, (d) 2Br-4,5-MDA, (e) 45b e (f) 2NO₂-4,5-MDA.

Já para a MAO B, além da dependência com a conformação do aminoácido Ile 199, pode-se perceber que os ligantes mais potentes apresentam uma distância média de 3,5 Å do sítio reativo no FAD e aqueles inativos apresentam uma orientação no sítio ativo da enzima desfavorável para reação, conforme pode ser observado na Figura 5.32.

Figura 5.32 – Representação esquemática da molécula de FAD, o ligante (estruturas palito) e do ILE 199 (azul) após o docking dos compostos (a) selegilina, (b) 53b, (c) ETA, (d) 2Cl-4,5-MDA, (e) 2,4-DMA e (f) 2NO₂-4,5-MDA, no sítio ativo da estrutura 2BK3 (verde).

Pode-se perceber, nas Figuras 5.32a e b que os ligantes mais potentes frente a MAO B apresentam o grupo propargil direcionado para o átomo de nitrogênio do FAD, com uma distância menor que 3,5 Å, já os que não possuem este grupo, e a reação se dá entre o grupo amina do ligante e o carbono do FAD, esta distância é maior, indicando que a interação deve ocorrer através das moléculas de água, conforme pode ser visto na Figura 5.32c e d. Já as moléculas inativas, Figura 5.32e e f, pode-se perceber que o grupo amina do ligante está em uma conformação desfavorável a reação, sendo orientado para o lado oposto do cofator. Desta forma, pode-se concluir que para uma melhor interação entre o ligante e o receptor, a

conformação deste inibidor deve ser tal que o grupo amina ou o grupo propargil, isto é, aqueles que participam da reação, fiquem a uma distância média de 3,5 Å do átomo no qual irá reagir no FAD da biomacromolécula.

Assim, após se determinar possíveis modos de interação entre ligante e receptor por técnicas de *docking*, e tendo-se em vista os resultados obtidos, onde a conformação do Ile 199 pode influenciar na orientação do ligante, bem como a presença e mobilidade das moléculas de água cristalográficas, foi feito um estudo de dinâmica molecular para a estrutura 1OJA com o seu ligante complexado experimentalmente, a isatina e comparou-se o resultado obtido com aqueles presentes na literatura para a simulação na sua forma APO²⁵. Estes resultados encontram-se apresentados a seguir, na seção 5.5.

5.5 Dinâmica molecular

Para uma simulação computacional de dinâmica molecular de boa qualidade, é necessária a utilização de uma estrutura de raios-X de alta qualidade. Desta forma e por apresentar resultados de simulação disponível na literatura^{25,123}, utilizou-se a estrutura 1OJA nesta etapa e o ligante ISN para avaliação da conformação do Ile 199 e da mobilidade das águas cristalográficas. Vale à pena ressaltar que para um estudo de *drug design*, isto é, para o planejamento de fármacos, a utilização de simulações MD é pouco indicada tendo-se em vista o alto custo computacional requerido por esta técnica, com um gasto de bilhões de horas de CPU para simular a ligação de milhares de compostos com seu bioreceptor¹⁰⁰. Por esta razão, utilizou-se apenas o ligante complexado experimentalmente nos estudo de simulação MD o qual foi realizado em um cluster Beowulf com 4 núcleos para processamento, com um custo em tempo real de aproximadamente quatro meses.

Em uma etapa inicial, utilizou-se a estrutura da proteína MAO B obtida através de simulações de dinâmica molecular²⁵ para a estrutura 1OJA uma vez que esta já se encontra relaxada. Nesta estrutura foram introduzidas moléculas de água cristalográfica, em especial aquelas presentes no sítio ativo da enzima e o ligante ISN para avaliação dos modos de interação e da conformação do Ile 199. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos para a forma APO da enzima.

A Figura 5.33 abaixo mostra de maneira esquemática o sistema utilizado para a simulação de dinâmica molecular, isto é, as moléculas de água cristalográficas e do solvente, a bicamada lipídica, a proteína MAO B, estrutura 1OJA do PDB. O cofator (FAD) o ligante (ISN) e os contraíons (Cl) não podem ser visto nessa figura uma vez que se encontram no interior da proteína. Porém podem ser visto, de maneira esquemática no Figura 5.30, página 84.

(a)

Figura 5.33 – Representação esquemática do sistema utilizado na simulação MD com as águas cristalográficas e do solvente em vermelho, bicamada lipídica em azul e proteína no centro, levemente azulada.

Durante a simulação de MD pode-se perceber que a conformação do aminoácido Ile 199 varia entre as formas aberta e fechada descritas anteriormente, conforme explicado no item 5.4.4, página 80, quando se utiliza a forma apo da enzima, isto é, sem ligante, apresentando-se, preferencialmente na forma aberta para cadeia A e na forma fechada para a

cadeia B, diferentemente da estrutura 1OJA experimental, na qual este aminoácido encontra-se na forma fechada para ambas as cadeias. Entretanto, quando se realiza a simulação na presença do ligante, a conformação do Ile 199 varia de maneira pouco significativa entre as formas aberta e fechada, indicando que a conformação deste aminoácido é dependente da presença do ligante, conforme pode ser visto no gráfico da Figura 5.34, a seguir.

Pode-se perceber no gráfico da Figura 5.34 que o diedro C2C5C6C8 permanece por mais tempo, isto é, para um número maior de trajetórias, próximo a 50° para a cadeia B, indicando que este não varia de forma significativa durante a simulação. Já para a cadeia A, este aminoácido varia mais, permanecendo com o diedro próximo a -120° e 75° , entretanto ainda na forma fechada. Este resultado segue a mesma tendência daquele observado para a simulação da enzima APO, onde o Ile 199 da cadeia A tem uma maior mobilidade quando comparado com o aminoácido da cadeia B. Desta forma, percebe-se que a presença do ligante durante a simulação faz com que o Ile 199 não mude de conformação de maneira significativa, permanecendo na sua forma fechada, determinada experimentalmente para esta estrutura.

(a)

(b)

Figura 5.34 – Gráfico da distribuição do ângulo diédrico C2C5C6C8 na simulação MD da estrutura 1OJA para (a) cadeia A e (b) cadeia B.

A mobilidade das moléculas de água cristalográfica não foi analisada neste trabalho uma vez que requerem uma nova simulação MD, e tendo-se em vista o custo computacional e o tempo necessário para realização desta simulação, tornou-se pouco adequado o seu estudo. Entretanto, essa avaliação será realizada em uma outra etapa, como continuação desta pesquisa.

Este resultado indica que esta estrutura pode ser utilizada para os demais estudos de MD com os ligantes dos Grupos 1 e 2 sem comprometimento na qualidade dos resultados obtidos, uma vez que utiliza, como sistema inicial, uma trajetória previamente obtida por simulação MD, com o Ile 199 na conformação aberta, de modo a acomodar o ligante de maneira mais adequada.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

De acordo com os resultados obtidos e apresentados na seção 5, pode-se concluir que o método HF/6-31G(d,p) é o mais adequado para otimização da geometria molecular dos compostos anfetamínicos bem como para o cálculo dos parâmetros de química-quântica. Inclusive a introdução de correlação eletrônica na otimização da geometria e dos cálculos dos descritores com o método DFT, com o funcional B3LYP, não apresentou melhoria nos resultados obtidos.

Os resultados de química-quântica sugerem que os descritores utilizados não são os mais apropriados para uma correta descrição da atividade deste grupo de anfetaminas frente a MAO, uma vez que a PCA não agrupou essa classe de moléculas em diferentes grupos, como era esperado, de forma a se diferenciar os compostos ativos dos inativos, exceto para as moléculas do Grupo B frente a MAO A, onde as moléculas mais potentes encontram-se em valores de PC1 e PC2 próximos a zero no gráfico dos escores. Esse agrupamento deu-se através do momento de dipolo, onde as moléculas inativas se encontram em valores bastante negativos de PC1.

Já os resultados de *docking* sugerem que a conformação do ligante é determinante para sua interação com o bioreceptor, onde o grupo amina ou o grupo propargil devem estar a uma distância média de 3,5 Å do sitio de reação no FAD da enzima MAO B. Pode-se concluir ainda que, a presença de moléculas de águas no sitio ativo da enzima auxiliam nesta interação para a MAO B e, para o modelo utilizado para MAO A, não forneceu nenhum mecanismo de interação entre os ligantes e a enzima, uma vez que estas moléculas não estão presentes. Ainda nos estudos de *docking*, pode-se concluir que, como a conformação do Ile 199 varia de acordo com a estrutura utilizada, a escolha correta da estrutura de raios-X é determinante para a determinação do complexo enzima-ligante.

Os resultados da simulação MD para a estrutura 1OJA mostraram que a conformação do Ile 199 é dependente do ligante complexado na enzima, uma vez que sua conformação permanece praticamente constante quando se utiliza o inibidor durante a simulação, com o ângulo diédrico C2C5C6C8 próximo a 50°, para a cadeia B e próximo a 75° para a cadeia A, isto é, similar ao ângulo determinado experimentalmente. Pode-se concluir ainda que este ângulo varia de maneira significativa quando a simulação é feita para a enzima na sua forma apo, e que é diferente para cada uma das cadeias da proteína.

Assim, ainda na tentativa de se identificar e avaliar as propriedades que resultam na diferença da potência biológica destes compostos tem-se como perspectiva deste trabalho a realização, do ponto de vista de relação quantitativa estrutura-atividade 3D, QSAR-3D, um estudo dos campos de interação do ligante e do receptor, através da utilização de sondas químicas as quais mimetizem estas interações, como por exemplo, sonda eletrostática, que avalia a superfície de potencial eletrostático, sondas estéricas, as quais avaliam o espaço químico e, sondas hidrofílicas e hidrofóbicas. Ainda, poderá ser utilizado alguns dos ligantes anfetamínicos dos Grupos A e B nas simulações MD a fim de se verificar as interações.

Outra perspectiva deste trabalho é a aplicação e avaliação destes métodos para outros grupos de moléculas, com ação frente a MAO, para um melhor entendimento do seu mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS

1. BULTINCK, P.; TOLLENAERE, J. P.; WINTER, H. **Computational medicinal chemistry for drug discovery**. New York: Marcel Dekker, 2003. 794 p.
2. EDGECOMBE, K. E.; WEAVER, D. F.; SMITH JR, V. H. Electronic structure analysis of compounds of interest in drug design: mono- and dicarboxylated pyridines. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 72, p. 1388-1403 1994.
3. HORNUNG, J. P. The human raphe nuclei and the serotonin-*ergic system*. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 26, p. 331-343, 2003.
4. ROCHE. Disponível em:
<http://www.roche.com.br/TherapeuticAreas/sistema_nervoso_central/depressao/doenca_PT.htm>. Acesso em: 20 out. 2009.
5. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression**. 2005. Disponível em:
<http://www.who.int/mental_health>. Acesso em: 30 abr. 2008.
6. WONG, M. L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 343-351, 2001.
7. FOX, H. H.; GIBAS, J. T. Synthetic tuberculostats. V. Alkylidene derivatives of isonicotinylhydrazine. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 18, p. 983-989, 1953.
8. ZELLER, E. A.; BARSKY, J. In vivo inhibition of liver and brain monoamine oxidase by 1-isonicotinyl-2-isopropyl hydrazine. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 81, p. 459-461, 1952.
9. BUNNEY, W. E.; DAVIS, J. M. Norepinephrine in depressive reactions - a review. **Archives of General Psychiatry**, v. 13, p. 483-494, 1965.
10. SCHILDKRAUT, J. J.; GORDON, E. K.; DURELL, J. Catecholamine metabolism in affective-disorders .1. Normetanephrine and vma excretion in depressed-patients treated with imipramine. **Journal of Psychiatric Research**, v. 3, p. 213-228, 1965.

11. COPPEN, A. Biochemistry of affective disorders. **British Journal of Psychiatry**, v. 113, p. 1237-1264, 1967.
12. WONG, M. L.; LICINIO, J. From monoamines to genomic targets: a paradigm shift for drug discovery in depression. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p.136-151, 2004.
13. SULZES, D.; SONDEERS, M.S.; POULSEN, N.W.; GALLI, A. Mechanism of Neurotransmitter release by amphetamines: a review. **Progress in Neurobiology**, v. 75, p. 406-433, 2005.
14. ROMEIRO, L. A. S.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Novas estratégias terapêuticas para o tratamento da depressão: uma visão da química medicinal. **Química Nova**, v. 26, p. 347-358, 2003.
15. BERMAN, S. M.; KUCZENSKI, R.; MCCracken, J. T.; LONDON, E.D. Potential adverse effects of amphetamine treatment on brain and behavior: a review. **Molecular Psychiatry**, v. 14, p. 123–142, 2009.
16. GOODMAN, L. S.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A.G. (Eds.). **The pharmacological basis of therapeutics**. New York: McGraw-Hill, 2001. 896 p.
17. MADRAS, B. K.; MILLER, G. M.; FISCHMAN, A. J. The dopamine transporter and attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 57, p. 1397-1409, 2005.
18. EDELEANO, L.; Über Einige derivate der Phenylmethacrylsäure und der Phenylisobuttersäure. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 20, p. 616-622, 1887.
19. ALLES, G. A. The comparative physiological actions of dl-beta-phenylisopropylamines. I. pressor effect and toxicity. **Journal of Pharmacology and Experimental**, v. 47, p. 339-354, 1933.
20. ALLES, G. A.; PRINZMETAL, M. The comparative physiological actions of dl-beta-phenylisopropylamines. II. bronchial effect. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 48, p. 161-174, 1933.

21. PINESS, G.; MILLER, H.; ALLES, G. A. Clinical observations on phenylaminoethanol sulphate. **Journal of the American Medical Association**, v. 94, p. 790-791, 1930.
22. PRINZMETAL, M.; BLOOMBERG, W. The use of benzedrine for the treatment of narcolepsy. **Journal of the American Medical Association**, v. 105, p. 2051-2054, 1935.
23. SEIDEN, L. S.; SABOL, K. E. Amphetamine - effects on catecholamine systems and behavior. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 33, p. 639-677, 1993.
24. CALDWELL, J. A.; CALDWELL, J. L.; DARLINGTON, K. K. Utility of dextroamphetamine for attenuating the impact of sleep deprivation in pilots. **Aviation Space and Environmental Medicine**, v. 74, p. 1125-1134, 2003.
25. FOWLER, P. W.; BALALI-MOOD, K.; DEOL, S.; COVENEY, P. V.; SANSOM, M. S. P. Monotopic enzymes and lipid bilayers: a comparative study. **Biochemistry**, v. 46, p. 3108 -3115, 2007.
26. BINDA, C.; LI, M.; HUBÁLEK, F.; RESTELLI, N.; EDMONDSON, D. E.; MATTEVI, A. Insights into the mode of inhibition of human mitochondrial monoamine oxidase B from high-resolution crystal structures. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 9750-9755, 2003.
27. BACH, A. W. J.; LAN, N. C.; ABELL, C. W.; BEMBENEK, M. E.; KWAN, S.W.; SEEBURG, P. H.; SHIH, J. C. cDNA cloning of human monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 85, p. 4934-4938, 1988.
28. MURPHY, D. L. Substrate-selective monoamine oxidase. **Biochemical Pharmacology**, v. 27, p. 1889-893, 1978.
29. JOHNSTON, J. P. Some observation upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. **Biochemical Pharmacology**, v. 17, p. 1285-1297, 1968.

30. SHIH, J. C.; CHEN, K.; GEHA, R. M. Determination of regions important for monoamine oxidase (MAO) A and B substrate and inhibitor selectivities. **Journal of Neural Transmission-Supplement**, v. 52, p. 1-8, 1998.
31. TSUGENO, Y.; HIRASHIKI, I.; OGATA, F.; ITO, A. Regions of the molecule responsible for substrate specificity of monoamine oxidase A and B: a chimeric enzyme analysis. **Journal of Biochemistry**, v. 118, p. 974-980, 1995.
32. KNOLL, J.; MAGYAR, K. Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors. **Advances in Biochemical Psychopharmacology**, v. 5, p. 393-408, 1972.
33. TOM, T. Monoamine oxidase-B inhibitors in the treatment of Alzheimer disease. **Neurobiology of Aging**, v. 21, p. 343-348, 2000.
34. BINDA, C.; NEWTON-VINSON, P.; HUBÁLEK, F.; EDMONDSON, D. E.; MATTEVI, A. Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. **Nature Structural Biology**, v. 9, p. 22-26, 2002.
35. MA J; YOSHIMURA M; YAMASHITA E; NAKAGAWA A; ITO A; TSUKIHARA T. Structure of rat monoamine oxidase A and its specific recognitions for substrates and inhibitors. **Journal of Molecular Biology**, v. 338, p. 103-162, 2004.
36. DE COLIBUS, L.; LI, M.; BINDA, C.; LUSTIG, A.; EDMONDSON, D. E.; MATTEVI, A. Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): relation to the structures of rat MAO A and human MAO B. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 12684-12689, 2005.
37. HUBALEK, F.; BINDA, C.; KHALIL, A.; LI, M.; MATTEVI, A.; CASTAGNOLI, N.; EDMONDSON, D. E. Demonstration of isoleucine 199 as a structural determinant for the selective inhibition of human monoamine oxidase B by specific reversible inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 15761-15766, 2005.

38. EDMONDSON, D. E.; DECOLIBUS, L.; BINDA, C.; LI, M.; MATTEVI, A. New insights into the structures and functions of human monoamine oxidases A and B. **Journal of Neural Transmission**, v. 114, p. 703-705, 2007.
39. STROLIN-BENEDETTI, M.; DOSTERT, P. Monoamine oxidase: from physiology and pathophysiology to the design and clinical application of reversible inhibitors. **Advances in Drug Research**, v. 23, p. 65-125, 1992.
40. OOMS, F.; FRÉDÉRICK, R.; DURANT, F.; PETZER, J. P.; CASTAGNOLI N.; VAN DER SCHYF, C. J.; WOUTERS, J. Rational approaches towards reversible inhibition of type B monoamine oxidase. Design and evaluation of a novel 5H-indeno[1,2-c]pyridazin-5-one derivative. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 69-73, 2003.
41. SCORZA, M. C.; CARRAU, C.; SILVEIRA, R.; TORRES, G. Z.; CASSELS, B.K.; REYES, M. Monoamine oxidase inhibitory properties of some methoxylated and alkylthio amphetamine derivatives. **Biochemical Pharmacology**, v. 54, p. 1361-1369, 1997.
42. CHIMENTI, F.; SECCI, D.; BOLASCO, A.; CHIMENTI, P.; BIZZARRI, B.; GRANESE, A.; CARRADORI, S.; YAÑEZ, M.; ORALLO, F.; ORTUSO, F.; ALCARO, S. Synthesis, molecular modeling, and selective inhibitory activity against human monoamine oxidases of 3-carboxamido-7-substituted coumarins. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, p. 1935-1942, 2009.
43. OGUNROMBI, M. O.; MALAN, S. F.; TERRE'BLANCHE, G.; CASTAGNOLI, N.; BERGH, J. J.; PETZER, J.P. Structure-activity relationships in the inhibition of monoamine oxidase B by 1-methyl-3-phenylpyrroles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 2463-2472, 2008.
44. LA REGINA, G.; SILVESTRI, R.; GATTI, V.; LAVECCHIA, A.; NOVELLINO, E.; BEFANI, O.; TURINI, P.; AGOSTINELLI, E. Synthesis, structure-activity relationships and molecular modeling studies of new indole inhibitors of monoamine oxidases A and B. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 9729-9740, 2008.
45. KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, p. 894-902, 2008.

46. HURTADO-GUZMÁN, C.; FIERRO, A.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; SEPÚLVEDA-BOZA, S.; CASSELS, B. K.; REYES-PARADA, M. Monoamine oxidase inhibitory properties of optical isomers and N-substituted derivatives of methylthioamphetamine. **Journal of enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 339-347, 2003.
47. STERLING, J.; HERZIG, 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.; YODIM, M.B.; WEINSTOCK, M. Novel dual inhibitors of AChE and MAO derived from hydroxy aminoindan and phenethylamine as potential treatment for Alzheimer's disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 5260-5279, 2002.
48. RAMACHANDRAN, K. I.; DEEPA, G.; NAMBOORI, K. **Computational chemistry and molecular modeling: principles and applications**. Berlin: Springer, 2008. 397 p.
49. LINDAHL, E. R. Molecular Dynamics Simulations In: KUKOL A. (Eds.). **Molecular Modeling of Proteins**. Totowa: Humana Press, 2008. p. 3-24. (Methods in Molecular Biology, v.443)
50. BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 235-242, 2000.
51. MA, J.; YOSHIMURA, M.; YAMASHITA, E.; NAKAGAWA, A.; ITO, A.; TSUKIHARA, T. Structure of rat monoamine oxidase A and its specific recognitions for substrates and inhibitors. **Journal of Molecular Biology**, v. 338, p. 103-114, 2004.
52. SON, S. Y.; MA, J.; KONDOU, Y.; YOSHIMURA, M.; YAMASHITA, E.; TSUKIHARA, T. Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: the control of opening the entry for substrates/inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 5739-5744, 2008.
53. ROOHTAAN, C. C. J. New developments in molecular orbital theory. **Reviews of Modern Physics**, v. 23, p. 69-89, 1951.

54. ROOHTAAN, C. C. J. Self-consistent field theory for open shells of electronic systems. **Reviews of Modern Physics**, v. 2, p.179-185, 1960.
55. HEHRE, W. J.; RADOM, L.; SCHLEYER, P. V. R.; POPLE, J. A. **Ab initio molecular orbital theory**. New York: John Wiley & Sons, 1986. 548 p.
56. HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. **Physics Review B**, v. 136, p. B864-B871, 1964.
57. KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. **Physics Review**, v. 140, p. 1133-1138, 1965.
58. MOLLER, C.; PLESSET, M. S. Note on an approximation treatment for many-electron systems. **Physics Review**, v. 46, p. 618-622, 1934.
59. COESTER, F. Bound states of a many-particle system. **Nuclear Physics**, v. 7, p.421-424, 1958.
60. KÜMMEL, H.; LÜHRMANN K. H.; ZABOLITZKI, J. G. Many-fermion theory in expS- (or coupled cluster) form. **Physics Reports-Review Section of Physics Letters**, v. 36, p. 1-63, 1978.
61. CIZEC, J. On correlation problem in atomic and molecular systems. Calculation of wavefunction components in ursell-type expansion using quantum-field theoretical methods. **Journal of Chemical Physics**, v. 45, p4256-4266, 1966.
62. Levine, I. **Quantum chemistry**. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2000. 739 p.
63. CRAMER, C. J. **Essentials of computational chemistry**. New York: Willey, 2004. 628 p.

64. FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY, J. A.JR.; VREVEN, T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOŚLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J. A. **GAUSSIAN 03**: Revision C.02 (or D.01). Pittsburgh PA: Gaussian, 2003. 1 CD-ROM.

65. DEWAR, M. J. S.; ZOEBISCH, E. G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. J. P. The development and use of quantum-mechanical molecular-models .76. AM1 - a new general-purpose quantum-mechanical molecular-model. **Journal of the American Chemical Society**, v.107, p. 3902-3909, 1985.

66. STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods .1. Method **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, p. 209-220, 1989.

67. ROCHA, G. B.; FREIRE, R. O.; SIMAS, A. M.; AND STEWART J. J. P. RM1: A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. **Journal of Computational Chemistry**, v. 27, p. 1101-1111, 2006.

68. SZABO, A.; OSTLUND, N. S.; **Modern quantum chemistry**. New York: Dover, 1996. 466 p.

69. MORIMOTO, B. H.; LOVELL, S.; KAHR, B. Ecstasy: 3,4-Methylenedioxy-methamphetamine (MDMA). **Acta Crystallographica C**, v. C54, p. 229-231, 1998.

70. BRENEMAN, C. M.; WIBERG, K. B. Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials - the need for high sampling density in formamide conformational-analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 11, p. 361-373, 1990.

71. BRUNS, R. E.; HAIDUKE, R. L. A.; DO AMARAL, A. T. The linear relationship between Koopmans' and hydrogen bond energies for some simple carbonyl molecules. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, p. 800-805, 2002.
72. FUKUI, K.; YONEZAWA, T.; SHINGU, H. A molecular orbital theory of reactivity in aromatic hydrocarbons. **Journal of Chemical Physics**, v. 20, p. 722-725, 1952.
73. FUKUI, K.; YONEZAWA, T.; NAGATA, C.; SHINGU, H. Molecular orbital theory of orientation in aromatic, heteroaromatic, and other conjugated molecules. **Journal of Chemical Physics**, v. 22, p. 1433-1442, 1954.
74. WOODWARD, R. B.; HOFFMANN, R. Stereochemistry of electrocyclic reactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, p. 395-397, 1965.
75. HOFFMANN, R.; WOODWARD, R. B. Selection rules for concerted cycloaddition reactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, p. 2046-2048, 1965.
76. WOODWARD, R. B.; HOFFMANN, R. Selection rules for sigmatropic reactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, p. 2511-2513, 1965.
77. HOFFMANN, R.; WOODWARD, R. B. Orbital symmetries and endo-exo relationships in concerted cycloaddition reactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, p. 4388-4389, 1965.
78. HOFFMANN, R.; WOODWARD, R. B. Orbital symmetries and orientational effects in a sigmatropic reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, p. 4389-4390, 1965.
79. FUJIMOTO, H.; HOFFMANN, R. Perturbation of molecules by static fields, orbital overlap, and charge-transfer. **Journal of Physical Chemistry**, v. 78, p. 1874-1880, 1974.
80. HOUK, K. N. Frontier molecular-orbital theory of cycloaddition reactions. **Accounts of Chemical Research**, v. 8, p. 361-369, 1975.

81. FUJIMOTO, H.; SUGIYAMA, T. Orbital interaction and chemical bonds - role of antisymmetric orbitals in cyclic additions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, p. 15-22, 1977.
82. FUKUI, K. The role of frontier orbitals in chemical-reactions (nobel lecture) **Angewandte Chemie-International Edition in English**, v. 21, p. 801-809, 1982.
83. DA SILVA, R. R.; RAMALHO, T. C.; SANTOS, J. M.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. On the limits of highest-occupied molecular orbital driven reactions: The frontier effective-for-reaction molecular orbital concept. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 110, p. 1031-1040, 2006.
84. PARR, R. G.; PEARSON, R. G. Absolute hardness - companion parameter to absolute electronegativity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, p. 7512-7516, 1983.
85. PEARSON, R. G. Ionization-potentials and electron-affinities in aqueous-solution. **Journal of the American Chemical Society**, v. 108, p. 6109-6114, 1986.
86. PEARSON, R. G. Recent advances in the concept of hard and soft acids and bases. **Journal of Chemical Education**, v. 64, p. 561-567, 1987.
87. PEARSON, R. G. Absolute electronegativity and hardness - application to inorganic-chemistry. **Inorganic Chemistry**, v. 27, p. 734-740, 1988.
88. MEEK, D. W.; NICPON, P. E.; MEEK, V. I. Mixed thiocyanate bonding in palladium (ii) complexes of bidentate ligands. **Journal of the American Chemical Society**, v. 92, p. 5351-5359, 1970.
89. LEE, J. S.; TITUS, D. D.; ZIOLO, R. F. Structural characterization of bioligomeric triphenyltelluronium thiocyanate salt, $((C_6H_5)_3TE(NCS))_4((C_6H_5)_3TE(NCS))_2$. **Inorganic Chemistry**, v. 16, p. 2487-2492, 1977.
90. FOSTER, G. E.; SOUTHERINGTON, I. G.; BEGLEY, M. J.; SOWERBY, D. B. A new diphenylantimony oxide containing a planar sb6o6 ring. **Journal of the Chemical Society-Chemical Communications**, v. 21, p. 1555-1556, 1991.

91. DA SILVA, R. R.; SANTOS, J. M.; RAMALHOC, T. C.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Concerning the FERMO Concept and Pearson's Hard and Soft Acid-Base Principle. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 223-226, 2006.
92. OLIVEIRA, C. B.; CARACELLI, I.; TRSIC, M. A docking approach for the deposition of perylene derivatives on a water surface. **Materials Chemistry and Physics**, v. 80, p. 457-460, 2003.
93. BINDA, C.; WANG, J.; PISANI, L.; CACCIA, C.; CAROTTI, A.; SALVATI, P.; EDMONDSON, D.E.; MATTEVI, A. Structures of human monoamine oxidase B complexes with selective noncovalent inhibitors: safinamide and coumarin analogs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 5848-5852, 2007.
94. GOLD 3.1: CCDC Software Limited. Cambridge, UK, 2004. CD-ROM.
95. JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, p. 727-748, 1997.
96. LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN DER SPOEL, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **Journal of Molecular Modeling**, v.7, p. 306-317, 2001.
97. BERENDSEN, H.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS - a message-passing parallel molecular-dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, v. 91, p. 43-56, 1995.
98. VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; GROENHOF, G.; MARK, A. E.; BERENDSEN, H. J. GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, p. 1701-1718, 2005.
99. MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E. Métodos de docking receptor-ligante para o desenho racional de compostos bioativos. In: MORGON, N. H.; COUTINHO, K. (Eds.). **Métodos de química teórica e modelagem molecular**. São Paulo: Livraria da USP, 2007, p. 489-531.
100. KUKOL, A. (Ed.). **Molecular modeling of proteins**. Totowa: Humana Press: 2008. 275 p. (Methods in Molecular Biology, v. 443.)

- 101.** 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, p. 935-948, 2004.
- 102.** NISSINK, J. W. M.; MURRAY, C. W.; HARTSHORN, M. J.; VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; TAYLOR, R. A new test set for validating predictions of protein–ligand interaction. **Proteins**, v. 49, p. 457-471, 2002.
- 103.** SOUSA, S. F.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Protein–ligand docking: current status and future challenges **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 65, p.15-26, 2006.
- 104.** POORNIMA, C. S.; DEAN, P. M. Hydration in drug design. 1. multiple hydrogen-bonding features of water molecules in mediating protein-ligand interactions. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 9, p. 500-512, 1995.
- 105.** BARILLARI, C.; TAYLOR, J.; VINER, R.; ESSEX, J. W. Classification of water molecules in protein binding sites. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 2577-2587, 2007.
- 106.** BIGGIN, P. C.; BOND, P. J. Molecular dynamics simulations of membrane proteins. In: KUKOL, A. (Ed.). **Molecular modeling of proteins**. Totowa: Humana Press, 2008, p. 147-160. (Methods in Molecular Biology, v. 443).
- 107.** ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREADY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, p. 531-568, 2006.
- 108.** ALDER, B. J.; WAINWRIGHT, T. E. Phase transition for a hard sphere system. **Journal of Chemical Physics**, v. 27, p. 1208-1209, 1957.
- 109.** RAHMAN, A.; STILLINGER, F. H. Molecular dynamics study of liquid water. **Journal of Chemical Physics**, v. 55, p. 3336–3359, 1971.
- 110.** MCCAMMON, J. A.; KARPLUS, M. Internal motions of antibody molecules. **Nature**, v. 268, p. 765-766, 1977.

111. MARTINEZ, L.; BORIN, I. A.; SKAF, M. S. Fundamentos de simulação por dinâmica molecular. In: MORGON, N. H.; COUTINHO, K. (Eds.). **Métodos de química teórica e modelagem molecular**. São Paulo: EDUSP, 2007. p. 413-452.
112. JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADO-RIVES, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, p. 11225-11236, 1996.
113. CORNELL, W. D.; CIEPLAK, P.; BAYLY, C. I.; GOULD, I. R.; MERZ JR., K. M.; FERGUSON, D. M.; SPELLMEYER, D. C.; FOX, T.; CALDWELL, J. W.; KOLLMAN, P. A. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, p. 5179-5197, 1995.
114. MACKERELL, A. D.; JR., BASHFORD, D.; BELLOTT, M.; DUNBRACK, R. L.; EVANSECK, J. D.; FIELD, M. J.; FISCHER, S.; GAO, J.; GUO, H.; HA, S.; JOSEPH-MCCARTHY, D.; KUCHNIR, L.; KUCZERA, K.; LAU, F. T. K.; MATTOS, C.; MICHNICK, S.; NGO, T.; NGUYEN, D. T.; PRODHOM, B.; REIHER, W. E.; ROUX, B.; SCHLENKRICH, M.; SMITH, J. C.; STOTE, R.; STRAUB, J.; WATANABE, M.; WI'ORKIEWICZ-KUCZERA, J.; YIN, D.; KARPLUS, M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. **Journal of Chemical Physics B**, v. 102, p. 3586-3616, 1998.
115. OOSTENBRINK, C.; VILLA, A.; MARK, A. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, p. 1656-1676, 2004.
116. KACHIGAN, S. K. **Statistical analysis: an interdisciplinary introduction to univariate multivariate methods**. New York: Radius Press, 1986. 589 p.
117. MARDIA, K. V.; KENT, J. T.; BIBBY, J. M. **Multivariate analysis**. London: Academic Press, 1980. 521 p.
118. SUTO, E.; FERREIRA, M. M. C.; BRUNS, R. E. Principal component analysis of dipole moment derivative signs of chloroform. **Journal of Computational Chemistry**, v. 12, p. 885-890, 1991.

119. EDMONDSON, D. E.; BINDA, C.; WANG, J.; UPADHYAY, A. K.; MATTEVI, A. Molecular and mechanistic properties of the membrane-bound mitochondrial monoamine oxidases. **Biochemistry**, v. 48, p. 4220-4230, 2009.
120. SANTANA, L.; GONZALEZ-DIAZ, H.; QUEZADA, E.; URIARTE, E.; YAÑEZ, M.; VIÑA, D.; ORALLO, F. Quantitative structure-activity relationship and complex network approach to monoamine oxidase A and B inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 6740-6751, 2008.
121. QUIOCHO, E. A., WILSON, D. K. AND VYAS, N. K., Substrate-specificity and affinity of a protein modulated by bound water-molecules. **Nature**, v. 340, p. 404-407, 1989.
122. MEIERING, E.M. AND WAGNER, G., Detection of long-lived bound water-molecules in complexes of human dihydrofolate-reductase with methotrexate and nadph. **Journal of Molecular Biology**, v. 247, p. 294-308, 1995.
123. BALALI-MOOD, K.; BOND, P. J.; SANSOM, M. S. P. Interaction of monotopic membrane enzymes with a lipid bilayer: a coarse-grained MD simulation study. **Biochemistry**, v. 48, p. 2135-2145, 2009.
124. PyMOL [™], educational product, DeLano Scientific LLC, Copyright © 2007.

ANEXO A**Tabela A.1** – Nomenclatura e sigla dos aminoácidos.

Aminoácido	Símbolo	Abreviação
Glicina	Gly, Gli	G
Alanina	Ala	A
Leucina	Leu	L
Valina	Val	Va
Isoleucina	Ile	I
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe ou Fen	F
Serina	Ser	S
Treonina	Thr, The	T
Cisteína	Cys, Cis	C
Tirosina	Tyr, Tir	Y
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Aspartato	Asp	D
Glutamato	Glu	E
Arginina	Arg	R
Lisina	Lys, Lis	K
Histidina	His	H
Triptofano	Trp, Tri	W
Metionina	Met	M