GLAUCIO RÉGIS NAGURNIAK

ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE A ESTRUTURA QUÍMICA E A ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE ANTAGONISTAS MOLECULARES DO RECEPTOR μ -OPIÓIDE

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São
Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências (Físico-Química)

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof^o Dr. Albérico Borges Ferreira da Silva

São Carlos
2013

À minha família, Antonio, Elisabeth, Robson e Jaile.

AGREDECIMENTOS

Ao Profº Dr. Albérico, pela orientação, amizade, companheirismo, paciência, conhecimento dividido e também por suas histórias nos momentos de descontração;

A Profª. Drª Káthia Maria Honório, pela ajuda com o tratamento dos dados e análise estatística;

Ao Profº Drº Rosivaldo dos Santos Borges e ao Dr. Rommel Bezerra Viana pelos conselhos, ajuda e ensinamentos;

A Profª Drª Maria Teresa Gambardella, Drª Munuella Ferreira de Lima, e aos colegas de mestrado: Amanda Guimarães, Tiago Teodoro Quevedo, Lilian Fiorini, Nayane Borges, Anderson Arandas, por me ajudarem em um momento de dificuldade;

Aos meus ex-colegas de república: Dione Guilherme de Melo Costa, Cleber de Melo Costa, Paulo de Tarso, Martin Andres Rivas Castillo, Manuel Alejandro Rivas Castillo e Renato Luiz Galvão Júnior por me receberem em São Carlos e por toda ajuda.

Aos meus pais, Antonio Rogério, Elisabeth e irmãos, Rogéria Jaile e Robson pela ajuda, apoio e compreensão;

A todos meus amigos que fiz durante a pós-graduação: Adriel, Aline DeBoleto, Tiago Chimenez, Renato Encarnacion, Castelo Branco, Luiz Terrabuio, Rafael Vicceti, Aline Alves Oliveira, Régis Santiago, Estevão Bonbonato, Aldinéia Pereira, Ronaldo Fernandez.

À CAPES, pela bolsa de mestrado.

RESUMO

Desde os tempos antigos, o leite de papoula é usado como sedativo e poderoso analgésico. Hoje, na terapêutica, a morfina - a qual se encontra em grande proporção no leite da papoula - continua sendo utilizada como analgésico em casos de dor moderada e severa. Concomitantemente, drogas derivadas da morfina têm sido amplamente utilizadas; sendo a heroína uma das drogas com maior potencial viciante conhecido.

O desenvolvimento de antagonistas do receptor alvo da morfina/heroína (receptor μ -opioide) pode auxiliar tanto no desenvolvimento de medicamentos analgésicos mais seguros e potentes, bem como no desenvolvimento de medicamentos que podem ter utilidade no tratamento da dependência por drogas opiáceas.

Com o intuito de criar a relação entre a atividade biológica de um conjunto de 51 moléculas e sua respectiva ação antagonista ao receptor μ -opioide, foram selecionadas, da literatura, moléculas que apresentam interações biológicas contra o receptor μ -opioide.

As moléculas selecionadas tiveram suas geometrias otimizadas e suas propriedades calculadas pelo método DFT/B3LYP, com um conjunto de funções de base 6-31g++(d,p). Os dados obtidos, como informações sobre a estrutura eletrônica, propriedades topológicas e físico-químicas, foram relacionados com os valores de pKi. Para a correta análise das variáveis que são úteis na descrição da atividade biológica, métodos de análise estatística como PCA, HCA, SIMCA e KNN foram utilizados, além do método de PLS para a construção do modelo matemático de relação entre atividade biológica e as variáveis.

Os resultados mostram que variáveis como a energia do orbital LUMO, a quantidade de nitrogênios na cadeia da molécula, o volume de alguns substituintes e o valor das variáveis E1p e E3u (mensuradas respectivamente pela polarizabilidade molecular e peso atômico) têm grande relação com a atividade biológica.

O modelo criado é útil na previsão da atividade biológica de outras moléculas, bem como ao fornecer ideias para uma síntese planejada de novos compostos com atividade antagonista promissora.

ABSTRACT

Since antiquity, the poppy's milk has been used as sedative and powerful analgesic. Nowadays, in the therapy, the morphine - that is found in large proportion in poppy's milk - is still being used as painkiller in cases of moderate and severe pain. Concurrently, drugs made from morphine have been widely used; being the heroin the drug with the highest known addictive potential.

The development of the antagonists of the morphine/heroin target receptor (μ -opiate receptor) can help on more safety and powerful medicine developments, and also to develop medicines that can be useful in treating opiate drugs addiction.

In order to create the relationship between biological activity of a set of 51 molecules and their respective antagonist action by μ -opiate receptor, was selected, from the literature, molecules that show biological interaction against μ -opiate receptor.

The selected molecules had their geometries optimized and their properties calculated by DFT/B3LYP method, with a set of base functions 6-31g++(d,p). The data obtained, as information about the electronic structure, topological properties and physical-chemical, were related to the pKi values. To the correct analysis of the variables that are useful on the description of the biological activity, were used statistical analysis methods as PCA, HCA, SIMCA and KNN, other than the PLS method for building the mathematical model of relationship between the biological activity and the variables.

The results show that variables as the energies of LUMO orbital, the quantity of nitrogen in the molecular chain, the volume of some substituents and the value of the variables E1p and E3u (measured respectively by molecular polarity and atomic weight) has big relationship with the biological activity.

The created model is useful in biological activity prevision for other molecules, as well as providing ideas for a planned synthesis of new compounds with promissory antagonist activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FLOR DA PAPOULA	12
FIGURA 2 - PÁGINA DO PAPIRO DE TEBAS.....	13
FIGURA 3 - PRINCIPAIS ALCALOIDES PRESENTES NO ÓPIO.....	13
FIGURA 4 - LIGANTE OPIOIDE DESCOBERTO POR ZIMMERMAN	16
FIGURA 5 - CICLO DE REAÇÕES INTRACELULARES DA PROTEÍNA G.....	17
FIGURA 6 - ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DO RECEPTOR M-OPIÓIDE ...	19
FIGURA 7 - SISTEMA DE COORDENADAS	23
FIGURA 8 - N,N-DIMETIL-A-BROMO-FENILETILAMINA	34
FIGURA 9- GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> PARA AS DUAS PRIMEIRAS COMPONENTES PRINCIPAIS (PC'S).....	50
FIGURA 10 - GRÁFICO DOS <i>SCORES</i> DAS MOLÉCULAS INDICANDO O PONTO DE SEPARAÇÃO ENTRE OS AGRUPAMENTOS COM MAIOR (LADO DIREITO) E MENOR (LADO ESQUERDO) AFINIDADE PELO RECEPTOR M-OPIOIDE	51
FIGURA 11 - DENDOGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DAS MOLÉCULAS DO CONJUNTO TREINAMENTO EM <i>CLUSTERS</i> COM MAIORES E MENORES VALORES MEDIOS DE PKI.....	53
FIGURA 12 - GRÁFICO DA PROJEÇÃO DAS CLASSES DE MOLÉCULAS EM FORMA DE NUVEM, À ESQUERDA MOLÉCULAS COM BAIXO PKI, A DIREITA MOLÉCULAS COM ALTO PKI.....	54
FIGURA 13 - PROJEÇÃO BIDIMENSIONAL DAS CLASSES DE COMPOSTOS, À ESQUERDA MOLÉCULAS COM BAIXO PKI, A DIREITA MOLÉCULAS COM ALTO PKI.....	54
FIGURA 14 - RELAÇÃO ENTRE PKI MENSURADO E PKI PREDITO DOS COMPOSTOS DO CONJUNTO TREINAMENTO	56
FIGURA 15 - COMPOSTO 10 (ESQUERDA) DA TABELA 3, ORBITAL LUMO (DIREITA), VALOR DE PKI = 5.92.....	58
FIGURA 16 - COMPOSTO 15 (ESQUERDA) DA TABELA 3, ORBITAL LUMO (DIREITA), VALOR DE PKI = 9.30.....	58
FIGURA 17 - COMPOSTO 1 (ESQUERDA) DA TABELA 2, ORBITAL LUMO (DIREITA), VALOR DE PKI = 8.72.....	59

FIGURA 18 - COMPOSTO 7 (ESQUERDA) DA TABELA 2, ORBITAL LUMO (DIREITA), VALOR DE PKI = 6.10.....	59
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - TRANSFORMAÇÃO DE SISTEMAS DE COORDENADAS ESFÉRICAS POLARES PARA CARTESIANAS	23
TABELA 2 - ESTRUTURA GERAL, SUSTITUÍNTES E VALORES DE PKI DOS DERIVADOS DAS HIDROXI-FENIL-PIPERIDINAS.....	44
TABELA 3 - ESTRUTURA GERAL, SUSTITUÍNTES E VALORES DE PKI DOS DERIVADOS DAS CARBOXI AMIDO FENIL PIPERIDINAS.....	45
TABELA 4 - CONTRIBUIÇÃO DE CADA VARIÁVEL NA FORMAÇÃO DAS DUAS PRIMEIRAS COMPONENTES PRINCIPAIS.....	51
TABELA 5 - ANÁLISE DA INTERFERÊNCIA DA QUANTIDADE DE FATORES NA PORCENTAGEM DE DESCRIÇÃO DO MODELO E NA SOMA DOS QUADRADOS DOS RESÍDUOS DE VALIDAÇÃO E CALCULADO (PRESS VAL E PRESS CAL)	51
TABELA 6 - SUCESSO NA CLASSIFICAÇÃO DAS MOLÉCULAS COM MAIORES E MENORES VALORES DE PKI EM RELAÇÃO À QUANTIDADE DE VIZINHOS	55
TABELA 7 - RELAÇÃO ENTRE PKI MENSURADO E PKI PREDITO DOS COMPOSTOS DO CONJUNTO TESTE E SEUS RESPECTIVOS RESÍDUOS	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	11
1.2 ASPECTOS HISTÓRICOS	12
1.3 ASPECTOS TERAPÊUTICOS	15
1.4 GPCRs	17
1.5 OS RECEPTORES μ -OPIÓIDES.....	18
2 MECÂNICA QUÂNTICA	20
2.1 CONSIDERAÇÕES HISTÓRICAS	20
2.2 RESOLUÇÃO DA EQUAÇÃO DE SCHRÖDINGER PARA O ÁTOMO DE HIDROGÊNIO	21
2.3 RESOLUÇÃO PARA SISTEMAS COMPLEXOS	26
2.3.1 SISTEMA COM DOIS NÚCLEOS E UM ELÉTRON	26
2.3.2 SISTEMA COM DOIS NÚCLEOS E DOIS ELÉTRONS	26
2.4 RESOLUÇÃO DE HARTREE-FOCK.....	28
2.5 RESOLUÇÃO PELO METODO DO FUNCIONAL DA DENSIDADE (DFT). 30	
2.5.1 O MODELO DE THOMAS-FERMI	30
2.5.2 HOHENBERG-KOHN.....	31
2.5.3 KOHN-SHAM.....	32
3 RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE.....	33
3.1 VARIÁVEIS CALCULADAS	35
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
4.1 PCA.....	36
4.2 HCA	37
4.3 KNN.....	37
4.4 SIMCA.....	37
4.5 PLS.....	38
5 MOTIVAÇÃO.....	41
5.1 OBJETIVO GERAL	41
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
6 METODOLOGIA.....	43
6.1 OBJETO DE ESTUDO	43

	10
6.2 CALCULOS QUÂNTICOS	48
6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
7 RESULTADOS	49
7.1 PCA	50
7.2 HCA.....	53
7.3 SIMCA	54
7.4 KNN	55
7.5 PLS	56
8 CONCLUSÃO.....	61
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Desde as épocas mais remotas, o homem vem tentando adaptar-se ao meio onde vive, desde o desenvolvimento de ferramentas para o trabalho, bem como a criação de utensílios úteis ao conforto. Obviamente, outro aspecto interessante para promover o bem estar é o desenvolvimento de métodos de cura para diferentes enfermidades, doenças e dores. Nesse intuito, a sabedoria popular teve aspecto importante, pois, no desenvolvimento de medicamentos, o conhecimento dos poderes curativos de plantas, minerais, sais, extratos animais auxiliou de forma rudimentar as intervenções medicamentosas.

Com o advento dos conhecimentos desenvolvidos por Paracelso, o qual estabeleceu que “se existia algum poder curativo em determinada planta, é devido ao fato de que deve existir alguma substância a qual é responsável por determinado efeito” áreas como a farmacologia, e obviamente a química aplicada à saúde humana começou a se desenvolver. Os alquimistas da era medieval, muitas vezes tinham suas atividades voltadas ao desenvolvimento de poções, unguentos, xaropes, pomadas, etc. Não somente com a cura de doenças que os alquimistas se preocupavam, mas também com a visionária ideia de conseguir enganar a morte com o famoso elixir da vida eterna.

Em tempos não tão remotos, o conhecimento popular, aliado a descrição científica das propriedades curativas da casca do salgueiro, culminou no isolamento do ácido salicílico, que 69 anos mais tarde foi modificado quimicamente pela empresa farmacêutica Bayer resultando no ácido acetilsalicílico, menos tóxico do que na versão sem o grupamento acetato, sendo o marco inicial da síntese de medicamentos pela indústria farmacêutica.

A química aplicada ao desenvolvimento de compostos químicos ganhou grande impulso no último século, desde aos primeiros esforços em tentar entender a relação existente entre a atividade biológica e a estrutura química de uma molécula, bem como com o desenvolvimento de outras áreas da química, como a química quântica a qual é utilizada para estabelecer a estrutura molecular de um composto sob investigação, trazendo assim, diversas informações que podem estar correlacionadas com a atividade biológica do mesmo.

1.2 ASPECTOS HISTÓRICOS

As propriedades analgésicas da morfina têm sido utilizadas pelo homem há milênios, desde os tempos rudimentares onde o “leite da papoula” era utilizado para diminuir a dor bem como até para sedar as pessoas.

Sendo obtido da seiva do fruto imaturo da papoula (*Papaver somniferum*) o látex chamado pelos gregos de *opion* (diminutivo de *ópos*) que significa suco vegetal, o ópio já tinha utilização como hipnótico e euforizante sendo que os sumérios a seis mil anos à apelidaram de “planta da alegria”. (NORN, 2005) (RYAN, 2001)

Figura 1 - Flor da Papoula

Fonte: <http://www.infoescola.com/drogas/heroina/>

Em “A Odisséia” de Homero, escrito no final do século VIII A.C. no livro 4, linha 220 há a seguinte menção “...então ela lançou um medicamento no vinho que acalmaria toda a dor e raiva e iria trazer o esquecimento de todo o sofrimento”. Esse talvez seja um dos primeiros registros históricos da utilização do ópio para fins medicinais e/ou recreativos.

No papiro de Ebers (Figura 2), um manuscrito Egípcio que foi escrito perto de 1500 A.C., porém acredita-se que ele tenha sido copiado de manuscritos mais antigos ainda, datando de 3400 AC é tido como sendo um dos mais antigos e importantes manuscritos egípcios sobre medicina, já fazia menção sobre a utilização do ópio para o tratamento de dores. (DUARTE, 2005) (CHUNG, 2005)

Figura 2 - Página do papiro de Tebas

Fonte: <http://www.egiptofo.ro.com/forums/showthread.php?t=13337>

Os principais alcaloides presentes no ópio são divididos em dois grupos, os fenantrênicos, os quais se destacam a morfina, codeína e a tebaína, e os benzilquinoleicos, representados pela papaverina e noscapina. (SCHIFF, 2002)

Figura 3 - Principais alcaloides presentes no ópio

Morfina

Codeína

Tebaína

Noscapina

Papaverina

Sendo que desses, o alcaloide predominante é a morfina, a qual constitui cerca de 10% do peso do ópio. A morfina foi primeiramente isolada em 1804 por Friedrich Sertürner, a qual foi nomeada inicialmente de “principium somniferum” por motivo do seu forte poder entorpecente, provocando perda dos sentidos, sono e distúrbios de consciência (KLOCKGETHER-RADKE, 2002). Mais tarde veio a chama-la de “Morphium” em referência ao deus grego Morfeu, o deus dos sonhos. Em 1817 já era utilizado como analgésico, mas somente em 10 anos depois veio a ser comercializada pela farmácia que tornou-se hoje a Merck, grande indústria do setor farmacêutico.

Mesmo com a síntese e comercialização do principal alcaloide do ópio, o seu uso na forma de narcótico, inalando a fumaça do óleo do ópio era muito comum na Europa e na Grã-Bretanha, por exemplo a utilização do ópio era tão comum como hoje é comum o uso de medicamentos como aspirina e paracetamol! Entre 1831 e 1859 o consumo de ópio aumentava cerca 2,4% ao ano. Nessa mesma época a importação do ópio foi de cerca de 40 toneladas, chegando em 1860 a 127 toneladas, sendo que desses cerca de $\frac{1}{4}$ foi reexportado para as Américas. (DUARTE, 2005)

O ópio é a única droga pela qual foi feita uma guerra na história da nossa civilização, no século XIX, a Inglaterra no intuito de manter-se como potência econômica, inseriu na vida da população chinesa o consumo de ópio, sendo isso uma maneira de obter lucros na intermediação do comércio do ópio plantado na Índia. Com a sua população viciada, e sofrendo consequências econômicas com a compra de grandes quantidades de ópio, o governo chinês proibiu o uso do ópio, iniciando assim um impasse com a Inglaterra, o que culminou em um conflito militar conhecido como “Guerra do Ópio”.

1.3 ASPECTOS TERAPÊUTICOS

Hoje, a morfina tem seu uso na medicina como potente sedativo e analgésico sendo o mais conhecido medicamento para o tratamento da dor em nível médio até o mais severo. Sabe-se que a molécula da morfina liga-se aos receptores μ -opioides anexadas às proteínas G (ALDRISCH, 1996). Alguns problemas existem na utilização da morfina como medicamento, efeitos colaterais como depressão respiratória, euforia, disforia, prisão de ventre, rigidez muscular, vasodilatação, reações alérgicas diversas, vômitos, disfunção sexual, perda de apetite, entre outros. (RUAN, 2007; RANG, 2003)

Atualmente existem dois medicamentos que atuam nos receptores μ -opioides como antagonistas, servindo para o tratamento desses efeitos adversos esses dois medicamentos são: Naloxone e Naltrexone.

Esses dois medicamentos estão recebendo atenção da sociedade científica a fim de investigar mais efeitos úteis a saúde humana efeitos clínicos e terapêuticos tem sido observados e estudados com a aprovação do FDA (Food and Drug Administration), tais como a utilização em casos de:

- Overdose por metadona (WALDRON, 1973) (BUCHNER, 1972);
- Depressão respiratória; (GALL, 1989) (LONGNECK, 1973)
- Depressão respiratória e circulatória em ocasiões pós-operatória; (HACKSHAW, 1990)
- Tratamento do alcoolismo; (FULLER, 2001) (BUDZYNSKI, 2000)
- Tratamento de dependência de opiáceos; (CRABTREE, 1984) (LOIMER, 1990)

Outros estudos preliminares, que ainda não tem a aprovação do FDA, mas que estão em pauta para a investigação desses medicamentos:

- Obesidade;
- Prurido; (PAULI-MAGNUS, 2000)
- Tratamento do mal de Parkinson; (KURLAN, 1991)
- Substituto para a metadona no tratamento da dependência de opiáceos. (DAFTERY, 1974)

Outros dois medicamentos, como o N-metilnaltrexone e Alvimopan então sob análise do FDA para a possível utilização em ocasiões de pós-operatório e para utilização no sistema nervoso periférico.

A heroína, (3,6-diacetil-morfina) é uma substância análoga à morfina, de altíssimo poder viciante, onde cerca de 3 em cada 10 usuários conseguem livrar-se da dependência. Trazendo uma mistura de sensações ao usuário, tais como, sentimento de leveza, euforia, torpor, fuga da realidade haja vista que é um depressor do sistema nervoso central, inibe a angústia, e causa ausência de dor, a algumas vezes alucinações. Causando forte dependência química, após a heroína fazer efeito, junto com a abstinência vem as alucinações, paranóia, ansiedade para consumir novamente e fortes dores musculares por todo o corpo, causa disso é que o indivíduo viciado deixa de produzir analgésicos endócrinos, devido ao fato que a aquisição por meio externo simula muito bem os efeitos daqueles produzidos pelo próprio corpo, portanto o período de abstinência torna-se um calvário para o usuário.

Agindo no sistema parassimpático, que esta em constante equilíbrio com o sistema simpático, os quais exercem influência no comportamento humano, modulando funções como: fuga, relaxamento, sonolência, humor, libido, etc. A acetilcolina, um neurotransmissor muito importante é deixada de ser fabricada, quando o consumo de heroína aumenta, portanto, o desequilíbrio químico gerado é imenso, e mesmo após cessar o consumo do opiáceo o corpo humano leva algum tempo para retomar a produção desse neurotransmissor, durante esse tempo a crise de abstinência e os sintomas adversos são muito grandes. (Heroína, O analgésico que mata, 1987)

Em 1978 Zimmerman e colaboradores anunciaram a descoberta de uma nova classe de ligantes do receptor opióide, *trans*-3,4-dimetil-4-(3-hidroxifenil)piperidinas, (Figura 4) que apresentavam atividade como a de um “puro opioide antagonista” ou seja, um ligante que apresente atividade *in vivo* ou *in vitro* em concentrações menores que 10µM. (ZIMMERMAN, 1978)

Figura 4 - Ligante opioide descoberto por Zimmerman

Após a avaliação da atividade biológica deste tipo de molécula, tornou-se interessante a investigação de moléculas similares a esta que poderiam apresentar

melhores valores, bem como propriedades moleculares que fossem mais compatíveis para a inserção da mesma na terapêutica.

1.4 GPCRs

No dia 10 de outubro de 2012 a real academia suéca de ciências concedeu o prêmio Nobel de química a Robert J. Lefkowitz e Brian K. Kobilka, pelos estudos dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (2012). Os GPCRs tem tomado a atenção de pesquisas científicas por que se atribui a esses a intermediação de diversos ligantes com seus receptores, gerando respostas biológicas diversas como as mediadas por hormônios, feromônios, e uma grande quantidade de neurotransmissores como se não fosse o bastante eles são alvos de cerca de 40% dos medicamentos desenvolvidos atualmente! (FILMORE, 2004)

De forma geral, a G-proteína é composta de 3 partes (α , β e γ) sendo que a parte α vem ligada a uma unidade da guanosina di-fosfato (GDP), após o receptor acoplado à proteína ser ativado, um ciclo de reações bioquímicas é desencadeado catalisando a reação onde a guanosina adquire mais um grupamento fosfato (guanosina tri-fosfato, GTP), fazendo com que toda a porção α -GTP se desloca das outras duas porções e interagindo com com uma outra proteína a qual catalisa a reação de dissociação da GTP para GDP desencadeando enzimaticamente a abertura dos canais iônicos para a acepção de cargas carregadas do meio extracelular para o intra celular (Figura 5).

Figura 5 - Ciclo de reações intracelulares da proteína G

Fonte: <http://diccionariofisiologia.blogspot.com.br/2009/05/proteina-g.html>

Outra interação importante que é considerada como um mecanismo secundário de sinalização intracelular onde a porção α -GTP ativa a adenilil ciclase a qual converte a adenosina tri-fosfato (ATP) em adenosina mono-fosfato cíclica (cAMP) esta que por sua vez é capaz de ativar a proteína quinase dependente, que fosforila uma ampla quantidade de proteínas do meio desencadeando uma série de reações.

1.5 OS RECEPTORES μ -OPIÓIDES

Os receptores opióides estão amplamente espalhados no cérebro, também podem ser encontrados na espinha dorsal e no trato gastro-intestinal. Estudos demonstram que a maioria dos efeitos dos alcaloides que ativam esse tipo de receptor atua na classe dos μ -receptores (MATTHES, 1996). Os μ -receptores constituem uma das 3 classes desses receptores, sendo que as outras duas são δ e o κ . Essas 3 classes são GPCRs (LORD, 1977), sendo que a ativação do μ -receptor é responsável por grande parte dos efeitos provocados pela morfina (motivo da designação deste receptor) como o tratamento da: dor, edemas pulmonares, tosse, diarreia e tremores.

Quando esses receptores são ativados pela interação do ligante, há entrada de íons cálcio e a promoção da saída de íons potássio, essa despolarização leva a diminuição da liberação do ácido gama amino butirico (GABA) gerando uma grande excreção de dopamina, que irá ocupar a fenda sináptica gerando o efeito de prazer. (SHUKLA, 2011). Outro aspecto dessa é a inibição da adenilato ciclase, reduzindo as quantidades de AMP cíclico dentro da célula, que atuando novamente nos canais de K^+ e Ca^{2+} a hiperpolarização da membrana celular diminuindo a excitabilidade neural, por isso o fenomeno de depressão do sistema nervoso central. (RANG, 2003) (PIESTRZENIEWICZ, 2006)

Com o intuito de entender melhor como ocorre a interação fármaco-receptor, (MANGLIK, 2012) descreveram a estrutura cristalográfica do μ -receptor opióide complexado com um antagonista irreversível derivado da morfina. Na imagem abaixo, é mostrado o receptor μ -opióide com suas 7 α -hélices transmembranares, complexada com β -funal-traxamina (β -FNA).

Figura 6 - Estrutura cristalográfica do receptor μ -opióide

Fonte: MANGLIK, A., Crystal structure of the mu-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. **Nature**. p. 321-327, 2012.

2 MECÂNICA QUÂNTICA

2.1 CONSIDERAÇÕES HISTÓRICAS

Em 1827, Robert Brown descreveu sua observação dos vacúolos do pólen de flor suspenso na água, como se tivessem “vida”, suas observações são a respeito do movimento caótico do mesmo, sem que existisse a princípio uma descrição matemática de como deveria ser esse movimento. Tal movimento, hoje conhecido como movimento Browniano foi uma contribuição inestimável para o desenvolvimento da teoria atômica da matéria.

Em 1905, Albert Einstein, publica um trabalho de pesquisa onde explica como as pequenas partículas se moviam em suspensão, aos moldes da observação de Brown, podendo inclusive determinar o tamanho dos átomos bem como a comprovação do número de Avogadro (EINSTEIN, 1905). Esta publicação foi a sucessora de outro trabalho onde Einstein quebra o paradigma a respeito do efeito fotoelétrico onde em concordância com ideias anteriores que veem desde a época da resolução da “catástrofe do ultra-violeta” ou problema da radiação do corpo negro, passando pelas ideias de que os estados energéticos de um sistema físico podem ser discretos, até a ideia de Max Planck em 1900 que estabeleceu que qualquer energia irradiada por um sistema atômico pode ser dividido em um número de elementos discretos de energia, denominado quantum (EINSTEN, 1905).

Com tantas ideias, descobertas e cientistas debatendo a respeito da natureza elementar da matéria, a ideia de quantatização da energia começou a “solidificar” precedendo assim a mecânica quântica, a qual diferentemente da mecânica Newtoniana (dita clássica) consegue explicar o movimento dos elétrons ao redor do núcleo.

2.2 RESOLUÇÃO DA EQUAÇÃO DE SCHRÖDINGER PARA O ÁTOMO DE HIDROGÊNIO

Considerando o sistema de um átomo de hidrogênio, portanto, contendo somente um próton e um elétron a equação de Schrödinger independente do tempo pode ser descrita de forma resumida como apresentada abaixo: (LEVINE, 2001) (ATKINS, 2002)

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

Onde o primeiro termo é um operador algébrico referente à energia cinética ($\hat{T}$) mais a contribuição da energia potencial ($\hat{V}$) aplicado a uma função de onda, onde resulta em outro operador (o qual descreve a energia do sistema) aplicado à mesma função de onda. O operador hamiltoniano pode ser expresso:

$$H = \hat{T} + \hat{V} \quad (2)$$

O potencial atrativo coulombiano é expresso por coordenadas cartesianas como:

$$\hat{V}(x_e, y_e, z_e, X, Y, Z) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_p q_e}{\sqrt{(x_e - X)^2 + (y_e - Y)^2 + (z_e - Z)^2}} \quad (3)$$

Sendo q_p a carga do próton, q_e a carga do elétron e o termo dentro da raiz quadrada o responsável pelo distanciamento e posição no espaço euclidiano do próton e do elétron. Sendo que aqui, o operador de energia potencial corresponde ao mesmo na teoria clássica, $\hat{V} = V$. O operador de energia cinética para esse sistema é definido como:

$$\hat{T} = -\frac{\hbar^2}{2M} \left(\frac{\partial^2}{\partial X^2} + \frac{\partial^2}{\partial Y^2} + \frac{\partial^2}{\partial Z^2} \right) - \frac{\hbar^2}{2m} \left(\frac{\partial^2}{\partial x_e^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_e^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_e^2} \right) \quad (4)$$

Utilizando-se a notação com laplacianos, a fim de resumir a escrita:

$$\hat{T} = \frac{\hbar^2}{2m} \nabla_e^2 - \frac{\hbar^2}{2M} \nabla_p^2 \quad (5)$$

Sendo que a primeira parte da equação é responsável pela energia cinética do elétron e a segunda pela energia cinética do núcleo. Portanto, pode-se reescrever a equação de Schrödinger como:

$$\left\{ \frac{\hbar^2}{2m} \nabla_e^2 - \frac{\hbar^2}{2M} \nabla_p^2 + \hat{V}(x_e, y_e, z_e, X, Y, Z) \right\} \Psi(x_e, y_e, z_e, X, Y, Z) = E \Psi(x_e, y_e, z_e, X, Y, Z) \quad (6)$$

O tratamento feito para resolver a equação acima se faz dividindo o problema em dois, resolvendo de forma diferencial ambas a fim de descrever o movimento eletrônico ao redor do núcleo, bem como o movimento de translação do átomo. Com fins de simplificação desta equação, foi proposto um modelo onde o núcleo é considerado estático e também possuindo massa extremamente maior que o elétron, e tendo sua posição fixada no centro das coordenadas cartesianas. Considerando então a massa reduzida do sistema, como $\mu = \frac{M.m}{M+m}$, obtemos a seguinte equação: (TRSIC, 2009)

$$\left\{ -\frac{\hbar^2}{2\mu} \nabla^2 + \hat{V}(x, y, z) \right\} \Psi(x, y, z) = E \Psi(x, y, z) \quad (7)$$

Como estamos considerando o núcleo fixo então a energia potencial considerada no cálculo será somente do elétron, portanto:

$$\hat{V}(x, y, z) = \frac{1}{4\pi\epsilon_o} \frac{q_p q_e}{\sqrt{x^2 + y^2 + z^2}} \quad (8)$$

Sendo assim, então:

$$\left\{ -\frac{\hbar^2}{2\mu} \left(\frac{\partial^2}{\partial X^2} + \frac{\partial^2}{\partial Y^2} + \frac{\partial^2}{\partial Z^2} \right) + \frac{1}{4\pi\epsilon_o} \frac{q_p q_e}{\sqrt{x^2 + y^2 + z^2}} \right\} \Psi(x, y, z) = E \Psi(x, y, z) \quad (9)$$

A fim de resolver a Equação acima, uma modificação no sistema de orientação é necessária, portanto á a transposição do sistema de coordenadas cartesianas para um novo sistema, o sistema de coordenadas esféricas polares, a relação entre esses sistemas é exemplificado na figura 7.

Figura 7 - Sistema de coordenadas

A forma algébrica que essa transformação é feita entre as coordenadas esféricas polares e as coordenadas cartesianas são descritas na Tabela 1:

Tabela 1 - Transformação de sistemas de coordenadas esféricas polares para cartesianas

Esféricas polares para cartesianas	Cartesianas para polares esféricas
$X = r \sin\theta \cos\phi$	$r = \sqrt{x^2 + y^2 + z^2}$
$X = r \sin\theta \sin\phi$	$\theta = \arctg\left(\frac{\sqrt{x^2 + y^2}}{z}\right)$
$Z = r \cos\theta$	$\phi = \arctg\left(\frac{y}{x}\right)$

Utilizando estas relações o operador de energia potencial pode ser convertido:

$$\hat{V}(r, \theta, \phi) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_p q_e}{r} \quad (10)$$

E o operador de energia cinética é representado como:

$$\hat{T} = -\frac{\hbar^2}{2\mu} \left(\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2 \sin\theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin\theta \frac{\partial}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{r^2 \sin^2\theta} \frac{\partial^2}{\partial \phi^2} \right) \Psi(r, \theta, \phi) + \hat{V}(r, \theta, \phi) \Psi(r, \theta, \phi) = E \Psi(r, \theta, \phi) \quad (11)$$

Apesar de mais complicada a equação acima traz um benefício incrível, que é a possibilidade de fatoração da função de onda em três variáveis independentes umas das outras, ou seja, $\Psi(r,\theta,\varphi) = R(r)\Theta(\theta)\Phi(\varphi)$.

Assim podemos separar a resolução em três equações diferenciais ordinárias:

$$\bullet \quad \frac{1}{\Phi} \frac{d^2}{d\varphi^2} \Phi = -m_l^2 \quad (12)$$

$$\bullet \quad \frac{1}{\Theta \sin \theta} \frac{d}{d\theta} \left(\sin \theta \frac{d\Theta}{d\theta} \right) + \left(b - \frac{ml^2}{\sin^2 \theta} \right) \Theta = 0 \quad (13)$$

$$\bullet \quad \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{dR}{dr} \right) + \frac{2\mu r^2}{\hbar^2} [E - V(r)] R - \frac{b}{r^2} \frac{\hbar^2}{2\mu} R = 0 \quad (14)$$

Sendo que dessas três equações a primeira é um tipo de equação que quando resolvida (ou seja derivando duas vezes a mesma equação) produziria a mesma função multiplicada por uma constante. Portanto um tipo de equação que se ajusta no exemplo anteriormente citado é a função abaixo:

$$\Phi(\varphi) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{im_l \varphi} \quad (15)$$

Para a possível resolução desse tipo de equação, m_l deve assumir valores como 0, ± 1 , ± 2 ,...

A segunda equação diferencial ordinária assemelha-se muito com as conhecidas “Equações associadas de Legendre”, porém para que a equação em questão seja idêntica à de Legendre é necessária a satisfação, $b = l(l+1)$, sendo que $l = 0, 1, 2, 3, \dots$, $|m_l| \leq l$. Sendo assim as funções dependentes em Θ assumem o formato:

$$\Theta_{l,m_l}(\cos \theta) = \sqrt{\frac{(l-m_l)!(2l+1)}{(l+m_l)!2}} P_l^{m_l}(\cos \theta) \quad (16)$$

Sendo que, $P_l^{m_l}(\cos \theta)$ é conhecido como “polinômio associado de Legendre” sendo que para a resolução desse caso as duas restrições impostas pela equação são os valores de l e m_l que devem respeitar os seguintes valores:

$$l = 0, 1, 2, \dots$$

$$m_l = 0, \pm 1, \pm 2, \dots, \pm l$$

O produto das funções Θ e Φ é denominado “harmônico esférico”,

$$Y_{l,ml}(\Theta, \Phi) = \Theta_{l,ml}(\theta) \Phi_{ml}(\varphi) \quad (17)$$

Por fim a última das três partes, depende exclusivamente da variável r , sendo que a solução encontrada é conhecida pela correspondência com a equação diferencial resolvida pelas “equações associadas de Laguerre”, tais funções tem uma resolução característica, expressas matematicamente como:

$$R_{n,l}(\rho) = \rho^l e^{-\rho^2} L_{n-l-1}^{2l+1}(\rho) \quad (18)$$

Sendo que $\rho = \frac{2Zr}{na_0}$, onde Z é o número atômico, $a_0 = \frac{\hbar^2}{\mu e^2}$, n são números inteiros, não nulos e positivos (1, 2, 3,...) e $L_{n-l-1}^{2l+1}(\rho)$ são funções polinomiais conhecidos como “polinômios associados de Laguerre”. Sendo que o produto resultante é igual a:

$$\Psi_{n,l,ml}(r, \theta, \varphi) = N_{n,l,ml} (\xi r)^l e^{-\xi r/2} L_{n-l-1}^{2l+1}(\xi r) P_l^{|ml|}(\cos \theta) e^{iml\varphi} \quad (19)$$

onde $\xi = 2Z/na_0$

Equacionando a expressão acima para o átomo de hidrogênio, encontramos a relação:

$$E = -\frac{\mu e^4}{(4\pi\epsilon_0)2\hbar^2 n^2} \quad (20)$$

Assim é possível verificar a relação da energia com o valor de n^2 , sendo que esse valor pode apresentar valores de l até um máximo de $(n-1)$ e para cada valor de l valores de m_l variando de 0, $\pm 1, \pm 2, \dots, \pm l$, gerando assim diversos estados degenerados.

2.3 RESOLUÇÃO PARA SISTEMAS COMPLEXOS

A resolução de sistemas mais complexos e a aproximação de Born-Oppnheimer:

2.3.1 SISTEMA COM DOIS NÚCLEOS E UM ELÉTRON

Imaginando um sistema molecular como H_2^+ , portanto com dois núcleos (núcleo A e B) e um elétron, o hamiltoniano do sistema é definido como:

$$\hat{H} = -\frac{1}{2}\nabla_{ea}^2 - \sum_N \frac{1}{2R} \nabla_N^2 - \sum_N \frac{Z_N}{r_{e-N}} + \frac{Z_{Na}Z_{Nb}}{r_N} \quad (21)$$

Onde R é a razão entre a massa do núcleo e a massa do elétron, Z_N é a carga do núcleo N, r_{e-N} é a distancia entre o elétron e o núcleo e r_N é a distancia entre o núcleos. O primeiro termo da Equação 1 representa a energia cinética do elétron enquanto o segundo trata a energia cinética dos núcleos. No terceiro são calculadas as forças coulômbicas atrativas entre o elétron e os núcleo e no quarto termo a repulsão entre os dois núcleos. A aproximação de Born-Oppenheimer transforma a equação acima em uma muito mais simples:

$$\hat{H} = -\frac{1}{2}\nabla_{ea}^2 - \sum_N \frac{Z_N}{r_{e-N}} \quad (22)$$

O segundo e o quarto termo são responsáveis pela representação da energia cinética dos núcleos. Como o elétron tem massa muito menor do que a do próton, e como esta a uma velocidade muito maior do que ambos os prótons a mudança nas coordenadas do elétron não chega a interferir no movimento do núcleo. Sendo assim a aproximação de Born-Oppenheimer considera que os núcleos permanecem fixos durante o movimento dos elétrons, desprezando a energia cinética dos núcleos, bem como a repulsão entre os núcleos é considerada constante, não havendo motivo para manter esse termo na equação, simplificando assim a resolução do modelo para a molécula ionizada de H_2^+ .

2.3.2 SISTEMA COM DOIS NÚCLEOS E DOIS ELÉTRONS

Imaginando o sistema molecular H_2 , portanto, contendo dois núcleos e dois elétrons, o operador hamiltoniano deverá levar em consideração as seguintes interações:

- Repulsão núcleo-núcleo;
- Repulsão elétron-elétron;
- Atração núcleo A-elétron A;
- Atração núcleo A-elétron B;
- Atração núcleo B-elétron A;
- Atração núcleo B-elétron B.

Desta forma, montando a equação de Schrödinger, teremos um operador hamiltoniano muito complexo com varios termos, portanto, a aproximação de Born-Oppenheimer se faz necessária, com a qual anula-se alguns termos sobrando somente uma equação muito mais simplificada, mostrada abaixo:

$$\hat{H} = -\sum_e \frac{1}{2} \nabla_{ei}^2 - \sum_e \sum_N \frac{Z_N}{r_{e-N}} + \frac{1}{r_{eA-eB}} \quad (23)$$

Onde r_{eA-eB} é a distância entre os dois elétrons. Sendo o ultimo termo da equação acima o grande problema na resolução desse sistema, pois como o movimento dos elétrons é muito rápido, as distancias entre um elétron e outro varia também de forma muito rápida tornando esse termo inexato!

2.4 RESOLUÇÃO DE HARTREE-FOCK

A equação de Schrödinger não pode ser resolvida analiticamente para sistemas com mais de um elétron, problemas na interação elétron-elétron gera erros consideráveis, bem como a impossibilidade da resolução da parte radial da equação abaixo:

$$\Psi(r,\theta,\varphi) = R(r) \Theta(\Phi) \theta(\varphi) \quad (24)$$

O modelo de tratamento de vários elétrons proposto por Douglas Hartree estabelece que um elétron não exerça influência instantânea sobre os demais elétrons, porém a repulsão elétron-elétron é considerada de uma forma mais generalizada, portanto, os demais elétrons são tratados como um potencial externo constante. As equações de Hartree trazem uma nova abordagem na descrição do elétron, por exemplo, para o átomo de hidrogênio os orbitais hidrogenóides são substituídos por uma combinação linear de funções matemáticas χ_j multiplicados por coeficientes de expansão do i -ésimo orbital hidrogenóide.

$$\Psi_{H,i} = \sum_{j=1}^K c_{ji} \chi_j \quad (25)$$

Esse método respeita o teorema variacional, que estabelece que o conjunto de funções de onda que geram a menor energia para o sistema é mais adequado na descrição da energia real da molécula. Este princípio está fundamentado no fato que a energia depende do hamiltoniano e da função de onda deve estar matematicamente normalizada, portanto:

$$E = \frac{\langle \Psi | H | \Psi \rangle}{\langle \Psi | \Psi \rangle} \quad (26)$$

Sendo que a normalização faz com que o termo $\langle \Psi | \Psi \rangle$ seja igual a 1.

O método de Hartree para um sistema de vários elétrons gera funções de onda denominadas spin-orbitais, e são assim chamadas por que são produtos da combinação linear entre a função espacial do elétron e com a função de spin do mesmo. O problema desse método é que o spin do elétron ficaria confinado às funções que definem seu espaço, porém, como os elétrons são partículas indistinguíveis o princípio da anti-

simetria não seria respeitado, ou seja, segundo o método proposto por Hartree os elétrons não podem permutar. Essa é uma característica que as funções de onda precisam ter, ela deve trocar de sinal toda vez que for efetuadas trocas nas coordenadas de dois elétrons quaisquer. Foi somente com V. Fock utilizando o sistema do determinante de Slater (27) que foi possível adequar o método de Hartree fazendo com que o princípio da anti-simetria fosse respeitado. Isso foi feito criando dois operadores um que representa a repulsão eletrônica e o outro representando às permutações. Assim foi criado “operador de Fock” que é igual a contribuição do operador Hamiltoniano mais o somatório do operador Coulombico menos o somatório do operador de troca.

$$\Psi = \frac{1}{\sqrt{(2n)!}} \begin{vmatrix} \phi_1(1) & \phi_1(2) \cdots \phi_1(2n) \\ \phi_2(1) & \phi_2(2) \cdots \phi_2(2n) \\ \vdots & \vdots \quad \ddots \quad \vdots \\ \phi_{2n}(1) \phi_{2n}(2) \cdots \phi_{2n}(2n) \end{vmatrix} \quad (27)$$

Por fim, Roothaan utilizando a combinação linear de orbitais atômicos (LCAO) conseguiu simplificar o método de Hartree-fock para sistemas moleculares, haja vista que o este método tinha boa aplicabilidade para sistemas atômicos, porém para sistemas moleculares a complexidade computacional aumentava muito, tornando o cálculo inviável. (CUSTÓDIO, 2002)

2.5 RESOLUÇÃO PELO METODO DO FUNCIONAL DA DENSIDADE (DFT)

2.5.1 O MODELO DE THOMAS-FERMI

Um modelo alternativo para tentar explicar e calcular a energia de um sistema eletrônico é o modelo de Thomas e Fermi (1927 e 1928). Esse modelo usa a distribuição da densidade eletrônica, $\rho(r)$, para determinar a energia de um dado sistema. Matematicamente $\rho(r)$ é definido como: (FITTS, 1999)

$$\rho(r) = N \int \cdots \int |\psi(x_1, x_2, \dots, x_N)|^2 dx_1 dx_2 \dots dx_N \quad (28)$$

Um fato interessante deste método é que ele não utiliza uma função de spin para os elétrons, portanto a densidade de distribuição eletrônica é definida unicamente em função das três coordenadas espaciais. Portanto essa é a primeira vantagem em relação ao modelo anteriormente visto. A fim de mensurar estas propriedades, o operador hamiltoniano para este método é:

$$\hat{H} = -\frac{1}{2} \sum_i \nabla_i^2 + \frac{1}{2} \sum_{j \neq i} \frac{1}{|r_i - r_j|} + v(r_i) \quad (29)$$

$$v(r_i) = -\sum_{\alpha} \frac{Z_{\alpha}}{|r_i - R_{\alpha}|} \quad (30)$$

Onde o $v(r_i)$ é definido como o potencial externo resultante da interação entre os elétrons e a distribuição nuclear. Neste modelo a interação elétron-elétron, é devido somente à interação coulombiana entre as partículas com a distribuição clássica de cargas.

A repulsão eletrostática de Hartree entre as densidades eletrônicas, substituindo a interação total elétron-elétron e dado pela expressão:

$$U_H(\rho) = \frac{1}{2} \int \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} dr_1 dr_2 \quad (31)$$

O termo referente a energia cinética na equação (29) é dado por:

$$T[\rho] = \int t[\rho(r)] dr \quad (32)$$

Onde $t[\rho]$ é a densidade de energia cinética para um sistema eletrônico não interagente com densidade eletrônica ρ . Conceitualmente é tido que $\rho(r)$ varia de forma tão pequena no espaço que um elétron no espaço r sente somente um meio homogêneo de densidade. Expandindo os conceitos a fim de interpolar uma função matemática em relação a densidade de energia cinética é utilizado o funcional da energia cinética de Thomas e Fermi:

$$T_0[\rho] = C_F \int \rho(r)^{\frac{5}{3}} dr \quad (33)$$

Assim a energia eletrônica total é definida como:

$$E_{TF}[\rho, v] = \int v(r)\rho(r)dr + U_H[\rho(r)] + C_F \int \rho(r)^{\frac{5}{3}} dr \quad (34)$$

O método de Thomas-Fermi apesar de tratar de modo aproximado a energia cinética e negligenciar a energia de troca e correlação, foi útil ao estimar a densidade de carga e o potencial eletrostático.

2.5.2 HOHENBERG-KOHN

Hohenberg e Kohn mostraram que é possível usar uma única variável (que neste caso é a densidade eletrônica ρ) para descrever a energia eletrônica dos elétrons ao invés da dependência com o número de elétrons e o potencial externo como o modelo anteriormente citado. Eles conseguiram provar de forma simples dois teoremas: (FORESMAN)

1. Primeiro teorema: A densidade eletrônica como variável básica, sendo que o potencial externo, v , é univocamente determinado pela densidade eletrônica;
2. Segundo teorema: A energia do estado fundamental pode ser obtida variacionalmente.

Sendo assim, o modelo proposto estabelece que todos os termos na expressão da energia total podem ser avaliados como uma soma de funcionais da densidade de carga:

$$E[\rho] = T[\rho] + E_{e-i}[\rho] + U_H + E_{xc}[\rho] + E_{i-i} \quad (35)$$

Onde $E_{e-i}[\rho]$, U_H e E_{i-i} são definidos como:

$$E_{e-i}[\rho] = -\int \rho(r) \sum_{\alpha} \frac{Z_{\alpha}}{|r - R_{\alpha}|} dr \quad (36)$$

$$U_H[\rho] = \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r)\rho(r')}{|r - r'|} dr dr' \quad (37)$$

$$E_{i-i} = \frac{1}{2} \sum_{\alpha \neq \beta} \frac{Z_{\alpha} Z_{\beta}}{|R_{\alpha} - R_{\beta}|} \quad (38)$$

Esses teoremas, bem como a nova expressão que correlaciona a energia do sistema unicamente com o funcional da densidade promoveram um passo a frente no desenvolvimento desse método, porém ainda havia algumas questões para serem solucionadas, como a energia cinética $T[\rho]$ permanecia mal descrita bem como os termos de troca e correlação $E_{XC}[\rho]$. (PARR, 1989)

2.5.3 KOHN-SHAM

O desenvolvimento feito por Kohn-Sham (KOHN, 1965) foi aprimorar o termo referente à energia cinética $T[\rho]$ (equação 39) e também pelo desenvolvimento da porção da equação referente à troca e correlação $E_{XC}[\rho]$ (equação 40) re-arranjadas na formulação do orbital Kohn-Sham (41).

$$T[\rho] = -\frac{1}{2} \sum_1^n \int \varphi_i(r_1) \nabla^2 \varphi_i(r_1) dr_1 \quad (39)$$

$$v_{XC} = \frac{\delta E_{XC}[\rho(r)]}{\delta \rho(r)} \quad (40)$$

$$h_i^{KS} \varphi_i = \varepsilon_i \varphi_i \quad (41)$$

O último desafio para o maior aprimoramento do método DFT é o desenvolvimento de funcionais de troca e correlação (v_{XC}). Um funcional que tem grande expressão sendo largamente utilizado é o B3LYP, que é um funcional híbrido que utiliza o termo de troca advindo da teoria de Hartree-Fock (E_X^{HF}) com outros termos de correlação e troca do DFT (E_X^{LSDA} , E_C^{LYP} , E_X^B , E_C^{LYP} , E_C^{LSDA}) juntamente com parametros semi-empiricos a, b e c , obtidos de forma experiental, resultando então em um termo único (equação 42). (KOCH, 2002)

$$E_{XC}^{B3LYP} = (1 - a)E_X^{LSDA} + aE_X^{HF} + bE_X^B + cE_X^{LYP} + (1 - c)E_X^{LSDA} \quad (42)$$

3 RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE

A criação de correspondência entre as alterações moleculares em uma estrutura e suas respectivas variações de atividades biológicas são denominadas SAR (relação estrutura-atividade). Neste nível de estudo é feita de forma qualitativa, a análise de como a estrutura interfere na atividade biológica de forma a obter ideias de como novas alterações podem prover compostos mais ou menos ativos. Estudos de SPR (relação estrutura propriedade) tem a mesma via lógica de conexão entre as variáveis e a interpretação dos resultados, porém esta tenta ligar a estrutura com alguma atividade específica (ou propriedade) tal como toxicidade, potência, ou em casos avançados de ensaios biológicos a relação com atividade *in vitro* e também *in vivo*, como citotoxicidade, mutagenicidade, distribuição celular, bem como efeitos adversos que podem ser encontrados para cada tipo de moléculas a ser estudada.

De uma forma mais incisiva existe a QSAR (relação quantitativa entre estrutura e atividade), essa cria uma função entre a atividade biológica medida e as variáveis calculadas nas moléculas (como na fórmula abaixo), e não somente uma simples análise estrutural.

$$\text{Atividade} = f(\text{propriedades estruturas/físico-químicas}) + \text{erro}$$

A atividade biológica de um composto é aferida por ensaios específicos de duas formas:

- A fim de estudar a energia de interação do um composto específico com o seu receptor biológico (força mediada pelo K_i) e/ou;
- Estudar a eficácia deste mesmo composto na inibição/ativação/ou morte de um cultivo de células, receptores, entre outros, os quais são mensurados por valores de IC_{50} , DL_{50} , etc.

Historicamente a quantificação da variação da atividade biológica com a estrutura química com fins de análise da toxicidade foi primeiramente proposta por A.F.A. Cross em sua tese na qual se estabeleceu a relação entre a toxicidade de diversos alcoóis em mamíferos era uma relação entre a solubilidade dos mesmos na água. Em 1868 A.Crum e T.r.Fraser estudando o efeito biológico de alcaloides encontraram a relação que estes teriam sua ação descrita conforme propriedades

intrínsecas a essas moléculas, e assim pela primeira vez foi expressa a equação acima criando a relação entre atividade biológica e a constituição química.

Mais tarde Meyer e Overton sugeriram que a ação depressiva de um conjunto de grupos orgânicos estava diretamente ligado ao coeficiente de partição óleo/água.

Em 1940 em um seminal artigo publicado com o título “Physical Organic Chemistry: reactions, equilibria and mechanisms” Hammet analisou a ionização de ácidos benzoicos meta e para substituídos em condições controladas, mostrando que existia uma relação linear entre os logaritmos da constante de ionização do ácido benzoico substituído e o logaritmo da constante de ionização do ácido benzoico. A equação abaixo mostra a relação, também conhecida como constante de Hammett:

$$\sigma = \text{Log} (K_x / K_0) \quad (43)$$

Em 1968 Hahsch e Lien estabeleceram uma relação entre a estrutura química e a atividade biológica de 22 compostos derivados da N,N-dimetil- α -bromo-feniletilamina substituídos nas posições meta e para do anel fenílico (Figura 8). (HANSCH, 1968)

Figura 8 - N,N-dimetil- α -bromo-feniletilamina

A atividade biológica antiadrenérgica aferida em outra publicação (GRAHAM, 1963) foi correlacionada com algumas variáveis gerando o modelo linear abaixo:

$$\log \frac{1}{C} = 1,22\pi - 1,59\sigma + 7,89 \quad (44)$$

Nesta equação, C representa a concentração do fármaco, π é a constante lipofílica de Hansch e σ é a constante eletrônica de Hammett. Este modelo gerado com 22 compostos teve um coeficiente de correlação igual a $R = 0,918$ e o desvio médio do modelo foi de $s = 0,238$.

Outro modelo matemático que explica a atividade biológica dos compostos foi publicado em 1972, apresentado uma dependência maior com as variáveis e também mostrando um coeficiente de correlação maior, $R = 0,961$ e tendo também o desvio médio menor, $s = 0,168$. (CAMMARATA, 1972)

$$\log \frac{1}{C} = 0,747(\pm 0,123)\pi_m - 0,911(\pm 0,249)\sigma_m + 1,666(\pm 0,124)r_v^p + 5,769 \quad (45)$$

Onde as variáveis π_m e σ_m são constantes lipofílicas e eletrônica dos grupos na posição R da figura 8, e r_v^p é o raio de Van der Walls do substituinte R₁ da mesma figura.

Em reação a isso um ano após, Unger e Hansch produziram, um artigo refutando o novo modelo pois ele era incompatível conceitualmente quando era visto à luz da bioquímica, e que talvez também a variável r_v^p estaria correlacionada muito mais acidentalmente com a atividade biológica do que ser uma variável útil na caracterização das espécies. (UNGER, 1973)

3.1 VARIÁVEIS CALCULADAS

Com o intuito de extrair informações relevantes à correlação com a atividade biológica uma grande variedade de informações é obtida de cada molécula otimizada. Descritores moleculares serão tratados como variáveis, esses descritores podem ser de diversas classes, como: (FERREIRA, 2002)

- Constitucionais: Aqueles referentes a constituição básica de cada molécula como número de átomos de determinado elemento químico, número de ligações, peso molecular, quantidade de anéis presentes na cadeia molecular, coeficiente de partição entre fases hidrofílica e hidrofóbica; (PARR, 1999)
- Geométricos: Refente à disposição dos elementos na molécula, ângulos de ligação, ângulos de diedro, localização de fragmentos moleculares (ramificações) em relação à molécula, etc.
- Eletrônicos: Atribuídos a distribuição de cargas pela molécula, ocupação de orbitais moleculares como: Homo (Highest occupied molecular orbital), Lumo (Lowest unoccupied molecular orbital), bem como orbitais efetivos para reações química FERMO (frontier effective-for-reaction molecular orbital). (ANH, 2007) (SILVA, 2006)

De posse da energia dos estados neutro, oxidado e reduzido foi possível calcular propriedades como afinidade eletrônica (AE) (46), potencial de ionização (PI) (47), dureza(η) (48), índice eletrofílico(ω) (49), moleza(S) (50): (PEARSON, 1986)

$$AE = (E_{neu} + ZPE_{neu}) - (E_{red} + ZPE_{red}) \quad (46)$$

$$PI = (E_{ox} + ZPE_{ox}) - (E_{neu} + ZPE_{neu}) \quad (47)$$

$$\eta \cong \frac{(PI - AE)}{2} \quad (48)$$

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (49)$$

$$S = \frac{1}{2\eta} \quad (50)$$

Onde Eneu é a energia da molécula calculada para a molécula no estado neutro, Ered é a energia da molécula no estado reduzido, e Eox é a energia da molécula no estado oxidado. ZPEneu, ZPERed e ZPEox é a energia vibracional intrínseca à molécula no estado de mais baixa energia respectivamente para os estados neutro, reduzido e oxidado. (REIS, 2007) (LAMEIRA, 2006) (LAMEIRA, 2006)

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A fim de racionalizar o grande conjunto de dados que foi obtido com os diversos cálculos realizados, foram usadas técnicas matemáticas para selecionar variáveis interessantes para a construção de um modelo matemático. (BRERETON, 2003)

A primeira triagem foi feita pelo método de peso de Fischer (51) para selecionar aqueles descritores que tinham maior habilidade discriminatória, portanto, maior razão entre valores médios das amostras e as suas respectivas variações.

$$W_{1-2} = \frac{[\bar{X}_{(1)} - \bar{X}_{(2)}]^2}{S_{(1)}^2 + S_{(2)}^2} \quad (51)$$

Altos valores de peso de Fischer foi o parametro de seleção de um conjunto mais sucinto de variáveis hábeis a prosseguirem nas análises exploratorias mais robustas.

4.1 PCA

A Análise de componentes principais (PCA = Principal Component Analysis) é uma sofisticada ferramenta matemática que transforma o espaço vetorial de um grande conjunto de dados correlacionados entre si em uma única variável, denominada componente principal (PC). (ABDI) Os resultados das PCs são discutidas em relação aos “scores” e aos “loadings” que é referente ao peso de cada variável para a formação de cada PC. (SHAW, 2003) A análise de PCA foi útil nesse trabalho para separar no

plano carteseano o conjunto de moléculas inicial em dois agrupamentos, (I) Aqueles com maior afinidade pelo ligante μ -opioide (caracterizado pelos elevados valores de pK_i) e (II) Aqueles com menor afinidade pelo ligante μ -opioide (caracterizado pelos baixos valores de pK_i), sendo que o que irá causar essa separação é a criação de um modelo matemático que relaciona duas ou mais PCs contendo variáveis úteis que posteriormente serão utilizadas na criação de um modelo de regressão (PLS)

4.2 HCA

A análise hierárquica de *clusters* (HCA- Hierarchical Cluster analysis) é outra ferramenta matemática que divide as moléculas em estudo em plano carteseano formando grupos (*clusters*) que tem entre si variáveis similares, portanto, comportamento similar sendo que a distância euclidiana entre cada cluster é a medida de similaridade e/ou dissimilaridade entre estes. (BEEBE, 1998)

4.3 KNN

O KNN ou algoritmo de vizinho mais próximo é outra técnica de reconhecimento de padrões, onde ela classifica objetos com fundamento em exemplos de características próximas sendo essa proximidade medida pela distância euclidiana entre as espécies.

A característica desse método é a capacidade de criação de espaços onde as moléculas são alocadas conforme sua similaridade, portanto, amostras desconhecidas podem ser incluídas na planilha de dados para então ser classificada pela sua distância em relação aos agrupamentos, portanto, quanto maiores as características em comum com um determinado grupo, menor será a distância euclidiana entre a amostra e o grupo, corroborando para o enquadramento desta como sendo de determinada classe.

4.4 SIMCA

A modelagem independente por analogia de classes é uma forma alternativa para a classificação de dados. O método é similar à PCA, portanto, cria componentes principais, as quais agrupam diversas variáveis em uma única componente (PC) essa que agrupa a maior variância dos dados possível, sendo que a diminuição de variáveis é útil na criação de regiões onde as amostras são aglomeradas conforme a característica comum. Um dos pontos fracos desse método é que pode ocorrer que as PCs construídas

não são hábeis para agrupar todas as amostras, portanto, existe a possibilidade do método não conseguir agrupar a amostra em nenhum conjunto.

4.5 PLS

Com o fim de encontrar uma relação quantitativa entre as variáveis dependentes com a variável independente esse método de regressão possibilita o desenvolvimento de uma expressão matemática correlacionando as variáveis, sendo que a mesma é capaz de modelar a atividade biológica dos compostos. Um bom modelo de PLS tem um bom valor de coeficiente de correlação, R , o qual determina a razão entre o valor mensurado da atividade biológica e o valor predito pelo modelo matemático gerado, portanto, quanto mais próximo de 1 o valor for, maior será o grau de previsibilidade do modelo, gerando bons valores de predição e consequentemente baixos valores de resíduo (diferença entre o valor observado e predito pelo modelo). Outro parâmetro interessante é o R^2 , que corresponde à fração da variabilidade total que é explicada pelo modelo, portanto quanto mais próximo o valor de R^2 for de 1 maior a capacidade do modelo explicar as variações em torno da média. O cálculo de R^2 é derivado da relação abaixo:

$$(Y - \bar{Y}) = (\hat{Y} - \bar{Y}) + (Y - \hat{Y}) \quad (52)$$

Onde Y é o valor observado, $\bar{Y}$ é a média do valor observado e $\hat{Y}$ é o valor predito pelo modelo. Portanto para essa expressão, a primeira parte representa o desvio em relação à média dos valores observados, a segunda parte é o desvio dos valores preditos em relação à média dos valores observados, e a última parte representa o desvio do valor observado em relação ao valor previsto. Outra maneira de representar a equação (52) é fazendo o somatório dos quadrados das diferenças (53):

$$\sum (Y - \bar{Y})^2 = \sum (\hat{Y} - \bar{Y})^2 + \sum (Y - \hat{Y})^2 \quad (53)$$

Ou de forma simplificada:

$$SS_{tot} = SS_{reg} + SS_{res} \quad (54)$$

Partindo da equação (49) a relação para obtenção do valor de R^2 é expressa como:

$$R^2 = \frac{SS_{reg}}{SS_{tot}} \quad (55)$$

A media da soma dos quadrados dos resíduos de regressão, MS_{reg} , é definido como:

$$MS_{reg} = \frac{SS_{reg}}{k} \quad (56)$$

Analogamente, tem-se também a média da soma dos quadrados dos resíduos entre os valores observados e previstos:

$$MS_{res} = \frac{SS_{res}}{(n - k - 1)} \quad (57)$$

As equações 51 e 52 têm importância, pois, delas derivam a equação de Teste-F (53), a qual é a razão entre a variabilidade explicada pelo modelo e a variabilidade não explicada pelo modelo.

$$F = \frac{MS_{reg}}{MS_{res}} \quad (58)$$

Portanto, um bom modelo de regressão deve ter um Teste F com o maior valor possível, o que remete um modelo que consiga explicar suas variações. O MS_{res} também é relatado na literatura como s^2 , ou seja, o quadrado do desvio padrão.

Por fim, o último parâmetro interessante para analisar a consistência do modelo de regressão é o Q^2 (59), que mensura a capacidade de predição de novos compostos, ou seja, a capacidade de prever se um novo composto pertence a alguma classe específica.

O Q^2 é obtido através da validação cruzada, um interessante mecanismo de fazer a validação cruzada é o método “leave-one-out” o que cria um modelo de regressão sem uma molécula do conjunto, e utilizando esse novo modelo para prever a atividade biológica do composto retirado do conjunto. Então é calculado o desvio padrão entre o valor previsto e observado. Esse processo é repetido até que todas as moléculas do conjunto sejam retiradas e validadas. Ao fim, obtém-se a soma dos quadrados dos resíduos da predição, PRESS. (60)

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{\sum (Y - \bar{Y})^2} \quad (59)$$

$$s_{PRESS} = \sqrt{\frac{PRESS}{(n - k - 1)}} \quad (60)$$

Portanto um bom modelo de PLS é aquele que tem valores de R, R² e Q² próximos de 1, baixos valores de s_{PRESS} e os maiores valores possíveis de Teste-F. (GAUDIO, 2001)

5 MOTIVAÇÃO

Tanto os efeitos terapêuticos dos compostos opióides bem como os efeitos adversos tem tomado grande atenção da sociedade científica, o uso da morfina como sedativo/analgésico aumentou mais de dez vezes durante a época compreendida de 1980 até 1999. As indústrias farmacêuticas têm gastos estimados em mais de U\$2.5 bilhões nas últimas duas décadas no financiamento de pesquisas com o intuito de descobrir novos medicamentos para a dor. (GOODMAN, 2007)

Opióides antagonistas são comumente utilizados para evitar efeitos adversos do uso de opióides, e também como anteriormente citado, diversas pesquisas no desenvolvimento de medicamentos para outras doenças utilizam tais antagonistas como molécula promissora para o desenvolvimento de novos medicamentos.

Nas últimas três décadas uma grande variedade de antagonistas tem sido sintetizadas e testadas biologicamente podendo assim ser aferida o K_i (constante de afinidade pelo receptor) e o IC_{50} (concentração necessária para inibir 50% dos receptores) à qual é um indicativo de o quanto eficaz/forte é a ligação entre o ligante e o receptor μ -opióide bem como aos dois outros tipos de receptores. Diversas moléculas têm alta afinidade por esse receptor, entre elas: trans-3,4-di-metil-4-(3-hidroxi-fenil)-piperidinas, derivados da morfina, fenil morfanos, octahidroquinolizinas e octahidropiridopirazinas.

5.1 OBJETIVO GERAL

Neste trabalho tem como objetivo a investigação teórica de um conjunto de moléculas sintetizadas por Zimmerman e colaboradores em 1978, o qual foi pioneiro no desenvolvimento de uma nova molécula antagonista do sistema μ -opióide as quais foram aprimoradas por trabalhos mais recentes de Allan J. Goodman em colaboração com Bertrand Le Bourdonnec, os quais otimizaram a estrutura química baseada no “esqueleto molecular” proposto por Zimmerman desenvolvendo assim molécula com maior afinidade (ZIMMERMAN, 1978).

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar a otimização da geometria molecular de diferentes conjuntos de análogos da molécula trans-3,4-di-metil-4-(3-hidroxi-fenil)-piperidinas e da trans-3,4-di-metil-4-(3-carboxi-amina-fenil)-piperidinas.

Obter parâmetros físico-químicos, energéticos, topológicos e estruturais de forma a encontrar evidências que possam explicar a atividade biológica;

Obter um modelo matemático qualitativo de relação entre estrutura química e atividade biológica (SAR) para os compostos derivados das trans-3,4-di-metil-4-(3-hidroxi-fenil)-piperidinas e para a trans-3,4-di-metil-4-(3-carboxi-amina-fenil)-piperidinas, utilizando os métodos de análise estatística exploratoria PCA e HCA e de classificação, KNN e SIMCA.

Obter um modelo matemático quantitativo de relação entre estrutura química e atividade biológica (QSAR) para os compostos derivados das trans-3,4-di-metil-4-(3-hidroxi-fenil)-piperidinas e para a trans-3,4-di-metil-4-(3-carboxi-amina-fenil)-piperidinas, utilizando o método de análise de regressão (PLS).

6 METODOLOGIA

6.1 OBJETO DE ESTUDO

Partindo da descoberta de Zimmerman e colaboradores a molécula trans-3,4-dimetil-4-(3-hidroxi-fenil)-piperidina, diversos estudos posteriores com o intuito de otimizar a atividade biológica foram realizados, entre diversas publicações foi selecionado um conjunto de moléculas sintetizadas e testadas biologicamente por Bertrand e Le bourdonnec, tais trabalhos reportam a síntese de similares moleculares o primeiro destes trabalhos traz como forma de investigação a substituição de grupos moleculares no anel piperidínico da estrutura do esqueleto molecular da molécula 2- α -substituições trans-4,5-dimetil-4-(3-hydroxifenil)piperidina (Tabela 2).

(BOURDONNEC, 2006)

Em outro estudo, houve a substituição do agrupamento hidroxil por outros substituintes, na porção hidroxil-fenil afim de otimizar um melhor grupamento para esta posição (Tabela 3).

No intuito de estabelecer um modelo matemático que explique a atividade biológica μ -opióide, após rigorosa triagem dos compostos estudados a fim de escolher moléculas que tenham sido testadas usando o mesmo método, foi dado início aos cálculos de otimização da geometria molecular e de frequência.

Tabela 2 - Estrutura geral, substituintes e valores de pKi dos derivados das hidroxi-fenil-piperidinas

Composto	Estrutura Geral	R	pKi
1		H	8.72
2		CH ₃	7.82
3		CH ₂ CH ₃	7.12
4		(CH ₂) ₂ CH ₃	7.69
5		CH ₂ -i-CH ₃	6.56
6		(CH ₂) ₂ CH ₃	6.95
7		(CH ₂) ₂ NH ₂	6.10
8		(CH ₂) ₂ NHCOCH ₃	6.72
9		(CH ₂) ₂ NHCOC ₆ H ₅	7.22
10		(CH ₂) ₂ -c-NC ₄ H ₈	n
11		C ₆ H ₅	6.55
12		CH ₂ C ₆ H ₅	6.53
13		(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅	6.79
14		(CH ₂) ₃ C ₆ H ₅	6.63
15		H	6.25
16		CH ₂ C ₆ H ₅	6.15
17		(CH ₂) ₃ C ₆ H ₅	7.72
18		CH ₃	6.28
19		CH ₂ CH ₃	6.38
20		(CH ₂) ₂ CH ₃	6.36
21		(CH ₂) ₃ CH ₃	6.25
22		(CH ₂) ₄ CH ₃	6.42
23		(CH ₂) ₅ CH ₃	7.32
24		(CH ₂) ₆ CH ₃	7.88

Fonte: (BOURDONNEC, 2006)

Tabela 3 - Estrutura geral, substituintes e valores de pKi dos derivados das carboxi amido fenil piperidinas

Composto	Estrutura Geral	R	pKi
3		OH	8.72
4		CONH ₂	8.33
5		CH ₂ OH	7.96
6		NHCOCH ₃	7.17
7		CONHCH ₃	7.15
8		NH ₂	6.82
9		CO ₂ CH ₃	6.07
10		CON(CH ₃) ₂	5.92
11		CO ₂ H	n
15			9.30
16			8.77
17			8.51
18			8.49
19			8.30

20

21

22

23

24

25

26

8.28

8.26

8.21

8.10

8.08

8.06

8.01

27

7.89

28

7.82

29

30

7.80

31

7.54

32

7.28

7.16

6.2 CALCULOS QUÂNTICOS

Para esse conjunto de moléculas foi empregado o programa Gaussian 03 (GAUSSIAN, 2003) usando o método de cálculo DFT com o funcional híbrido B3LYP (BECKE) (LEE, 1998) e com a função de base 6-31g ++ (d,p) (POOPLÉ, 1980) para calcular a geometria de mínimo energético global e também para calcular as frequências vibracionais dos compostos. Cálculos de estados oxidados e reduzidos das moléculas em estudo também foram feitos no intuito de mensurar a capacidade de doação e recepção de elétrons.

6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizando os dados de saída dos cálculos das geometrias moleculares também foi possível obter diversos descritores moleculares pelo programa Dragon (TODESCHINI, 2009). Com essa ampla gama de dados foi utilizado um método de separação de variáveis que são úteis para explicar a variação da atividade biológica das que não são. Primeiramente foi utilizado o método de peso de Fischer, após isso a análise exploratória de PCA e de HCA foi realizada a análise classificatória de KNN e SIMCA e por fim a análise de regressão de PLS. Todas as análises foram feitas utilizando o software pirouette 3.1.

7 RESULTADOS

A escolha dos descritores moleculares gerados pelo programa Dragon foi feita respeitando o peso de Fischer (onde as variáveis com os maiores valores foram selecionadas), após isso as variáveis que apresentavam alta correlação entre si foram descartadas mantendo somente uma variável das quais tinha comportamento semelhante, por fim, a análise de correlação com os valores de pKi foi feita, selecionando as variáveis que mantenham correlação com o pKi.

Após a triagem das melhores variáveis, foi empregado o programa pirouette, que traz várias ferramentas estatísticas, para fazer análises exploratórias como a análise de componentes principais (PCA) e análise hierárquica de *clusters* (HCA) para comprovar a capacidade qualitativa de separação de agrupamentos que discriminem compostos com alta e baixa afinidade pelo receptor μ -opioide. Técnicas de análise classificatória como k-ésimo vizinho (KNN) e análise independente de classes análogas (SIMCA) a fim de saber se as variáveis selecionadas na etapa anterior são capazes de alocar as moléculas em conjuntos com características similares (maior ou menor afinidade pelo receptor μ -opioide). Por fim utilizando o método de PLS foi desenvolvido um modelo matemático de regressão que o qual foi hábil a propor um modelo de relação quantitativa entre as estruturas químicas e os valores de pKi.

O conjunto de moléculas foi separado em duas partes, 90% das moléculas do conjunto de estudo irão constituir o “conjunto treinamento” e as 10% restantes irão compor a validação externa denominado “conjunto teste”.

Para denominar as moléculas desse estudo, aquelas que se encontram na Tabela 2 terão seu nome definido como hidX (onde X é o número sequencial do composto apresentado na sua respectiva tabela). Os compostos da Tabela 3 terão seu nome definido como carX (onde X é o número sequencial do composto apresentado na sua respectiva tabela).

7.1 PCA

A análise de PCA das variáveis triou as que mantiveram maior expressão para a construção das PCs fazendo com que as moléculas plotadas no plano carteseano ficassem agrupadas em diferentes conjuntos, esses conjuntos são constituídos de moléculas que reúnem características em comum, sendo assim foi possível obter a separação das moléculas em grupos com maior e menor afinidade pelo receptor μ -opióide.

A análise do gráfico dos *loadings* para o conjunto treinamento mostrado na Imagem 9 e na Tabela 5 abaixo mostra como cada variável tem influência na descrição de cada componente principal (PC) ou como esta nas legendas das imagens (Fatores). Pode-se perceber que a cada variável esta longe do centro carteseano o que prova que ela é importante na contribuição de cada fator.

A análise do gráfico dos *loadings* para o conjunto treinamento mostrado na Imagem 9 e na Tabela 5 abaixo mostra como cada variável tem influência na descrição de cada componente principal (PC). Pode-se perceber que a cada variável esta longe do centro carteseano o que prova que ela é importante na contribuição de cada fator.

Figura 9- Gráfico de *loadings* para as duas primeiras componentes principais (PC's)

Tabela 4 - Contribuição de cada variável na formação das duas primeiras componentes principais

	PC 1	PC 2
Lumo	-0.495	0.071
nN	0.465	-0.181
R8v+	-0.455	-0.019
E1p	0.448	-0.456
E3u	0.362	0.868

A análise dos *scores* revelou que com apenas uma das componentes principais aproximadamente de 72.8% das informações eram representadas no gráfico (Tabela 6), portando, grande quantidade de moléculas na Figura 10, pode ser alocada em um dos dois conjuntos de característica.

Tabela 5 - Análise da interferência da quantidade de fatores na porcentagem de descrição do modelo e na soma dos quadrados dos resíduos de validação e calculado (Press Val e Press Cal)

	Variance	Percent	Cumulative	SEV	Press Val	r Val	SEC	Press Cal	r Cal
Factor1	120.106	72.792	72.792	0.462	7.259	0.833	0.444	6.301	0.856
Factor2	11.316	6.858	79.650	0.472	7.586	0.827	0.410	5.215	0.883
Factor3	17.776	10.773	90.423	0.467	7.402	0.831	0.415	5.162	0.884
Factor4	10.906	6.610	97.033	0.468	7.451	0.829	0.422	5.154	0.884
Factor5	4.896	2.967	100.000	0.470	7.525	0.828	0.429	5.154	0.884

Figura 10 - Gráfico dos *scores* das moléculas indicando o ponto de separação entre os agrupamentos com maior (lado direito) e menor (lado esquerdo) afinidade pelo receptor μ -opioide

Portanto, a análise de PCA indica que foi hábil ao triar as variáveis que tem peso na construção de um modelo qualitativo, haja vista que foram criados varios modelos de PCA porém somente o que obteve maior sucesso na separação das moléculas com maior e menor pKi foi apresentado aqui, sendo assim, a análise de PCA foi útil para indicar quais as variáveis poderão ser úteis na equação de regressão para a criação de um modelo quantitativo de relação entre a estrutura química e a atividade biológica (modelo de QSAR).

7.2 HCA

A análise de HCA, corroborou com o resultado da PCA haja vista que a HCA conseguiu alocar as moléculas em diferentes *cluster's* indicando assim, similaridade entre os componentes de um mesmo conjunto e diferenciando um conjunto do outro, como pode ser visto no dendograma da Figura 11, onde foi possível distinguir *clusters* de diferentes médias de pKi. As moléculas que ficaram à direita do grupo treinamento no gráfico de PCA (Figura 10) estão situadas no primeiro *cluster* (destacado) o qual tem como característica principal altos valores de pKi.

Figura 11 - Dendograma de distribuição das moléculas do conjunto treinamento em *clusters* com maiores e menores valores medios de pKi

7.4 KNN

O método KNN foi utilizado para os mesmos compostos com atividade biológica explorados nos outros métodos, e também as mesmas variáveis foram utilizadas para agrupar as moléculas. Na Tabela 6 abaixo foi feito o panorama de sucesso na classificação das moléculas utilizando 1 e mais vizinhos.

Tabela 6 - Sucesso na classificação das moléculas com maiores e menores valores de pKi em relação à quantidade de vizinhos

Categoria	Número de compostos	Compostos classificados incorretamente		
		1NN	2NN	3NN
pKi > 7.5	21	0	0	0
pKi < 7.5	13	0	0	2
Total	34	0	0	2
% de informação correta		100	100	94.12

Após 3 vizinhos percebeu-se que a porcentagem de erro permanece constante até 7NN, porém a alternativa que leva em conta 2 vizinhos tem boa capacidade de alocação de compostos em diferentes grupos levando em conta a atividade biológica aferida pelo pKi.

7.5 PLS

A análise de PLS do conjunto treinamento gerou a equação de regressão (61) abaixo onde é possível ver as relações lineares entre o pKi e as variáveis em questão:

$$\text{pKi} = -0.261(\text{LUMO}) - 0.139(\text{nN}) - 0.464(\text{R8v+}) + 0.246(\text{E1p}) + 0.161(\text{E3u}) \quad (61)$$

$$(\mathbf{R} = 0.88; \mathbf{R}^2 = 0.82; \mathbf{Q}^2 = 0.74; \mathbf{S}_{\text{PRESS}} = 0.092; \mathbf{F} = 24.65)$$

Com essa equação de regressão foi possível correlacionar as moléculas entre os valores de pKi medidos e os valores de pKi calculados pela equação (61), como é possível ver na Figura 14. Os valores de coeficiente de correlação R^2 , e coeficiente de predição Q^2 , demonstram que o modelo gerado tem consistência interna por conseguir calcular com boa precisão os valores de pKi bem como 74% de capacidade preditiva para novas moléculas. Os valores de S_{PRESS} e Teste F também demonstram que o modelo é consistente estatisticamente.

Figura 14 - Relação entre pKi mensurado e pKi predito dos compostos do conjunto treinamento

A equação de regressão (61) foi validada externamente com um conjunto de 6 moléculas que não participou da geração do modelo, conjunto teste, na tabela 7 estão representados os 6 compostos com seus respectivos pKi calculados com a equação (61) e correlacionados com os valores de pKi obtidos da literatura química. O valor de pKi bem como o resíduo (diferença entre pKi calculado pelo modelo e o valor de pKi obtido da literatura) pode ser observado.

Tabela 7 - Relação entre pKi mensurado e pKi predito dos compostos do conjunto teste e seus respectivos resíduos

	pKi Mensurado	pKi Predito	Resíduo
car30	7.538	7.902	-0.364
car32	7.161	7.789	-0.628
hid8	6.721	6.622	0.099
hid17	7.721	7.188	0.534
car5	7.959	7.379	0.580
car19	8.301	7.962	0.339

O modelo gerado para essa série de estudo mostra que o pKi varia de forma linear e crescente com o valor da energia do orbital virtual de menor energia (LUMO) gerando a ideia que existem regiões nas moléculas que favoreçam a troca de elétrons com o sítio receptor.

As imagens abaixo demonstram algumas moléculas, seus valores de pKi obtidos da literatura química, e o formato do orbital LUMO. Percebeu-se que esse orbital LUMO geralmente situa-se sobre a porção hidróxi-fenil ou carboxi-fenil. O fator determinante que governa a reatividade química nessas regiões, portanto, não é o formato do orbital, mas sim a energia que este apresenta, indicando maior ou menor característica eletro-aceptora.

Figura 15 - Composto 10 (esquerda) da Tabela 3, orbital LUMO (direita), valor de $pK_i = 5.92$

Figura 16 - Composto 15 (esquerda) da Tabela 3, orbital LUMO (direita), valor de $pK_i = 9.30$

Figura 17 - Composto 1 (esquerda) da Tabela 2, orbital LUMO (direita), valor de $pK_i = 8.72$

Figura 18 - Composto 7 (esquerda) da Tabela 2, orbital LUMO (direita), valor de $pK_i = 6.10$

Outra característica da variação do pK_i está em função da variável “nN” que representa a quantidade de nitrogênios presente na molécula, pode-se perceber que na

Tabela 3 após o composto 15, todas as moléculas com mais de 2 nitrogênios apresentam baixos valores de pK_i , os compostos 20, 23 e 24 (todos com 3 nitrogênios) apresentam valores de pK_i que variam de 8.08 até 8.24, o composto 27 que apresenta 4 nitrogênios na cadeia tem o $pK_i = 7.84$. Nota-se que essa é uma importante variável para a discriminação da afinidade pelo receptor, haja vista que pode-se perceber também que grupamentos na porção R altamente hidrofóbicos e de grande volume garantem alta afinidade pelo receptor (alto pK_i).

A variável $R8v+$ é um descritor que explica a relação entre o volume de Van der Waals na “perna 8” ou “porção 8” da molécula, que possivelmente seja a respeito da substituição na lateral no anel piperidinico onde é possível perceber a relação negativa com o pK_i , portanto, compostos com altos valores de pK_i devem ter pequenos volumes de Van der Waal nessa parte da molécula, indicando assim que não são aceitas substituições do hidrogênio por outros grupamentos, como é possível verificar na tabela 2.

A variável $E1p$ e $E3u$ são índices do tipo WHIM portanto é relativo a primeira componente de acessibilidade, e tem seu peso medido pela polarizabilidade e pelo peso atômico, o que quer dizer que existe uma relação entre o pK_i com a distorção da nuvem eletrônica promovida por um campo eletrostático externo (como por exemplo o sítio ativo do receptor em questão).

Esses dois últimos descritores poderiam ter sua contribuição explicada de forma melhor se fossem utilizados estudos de docking molecular/dinâmica molecular a fim de estudar como as cargas de cada elemento presente na cadeia interagem com o sítio ativo.

8 CONCLUSÃO

A análise de PCA dos compostos derivados da hidroxifenil piperidinas e dos derivados das carboxi-amino-fenil piperidinas obteve sucesso na separação qualitativa dos compostos com maior e menor valor de pKi.

A análise hierárquica de *clusters* pôde classificar as moléculas em diferentes níveis de pKi (altos e baixos) demonstrando que as variáveis são úteis na discriminação da atividade biológica.

Os métodos de classificação de KNN e SIMCA foram hábeis ao classificar as moléculas do conjunto treinamento entre as classes de moléculas com maior afinidade pelo receptor μ -opioide (maior pKi) e menor afinidade pelo mesmo receptor (menor pKi).

As variáveis selecionadas foram úteis na confecção do modelo de regressão (PLS), o qual teve bons valores de coeficiente de correlação e predição ($R^2 = 0.82$ e $Q^2 = 0.74$) bem como outros indicativos para ser um modelo estatisticamente válido como S_{PRESS} e Teste-F. A validação externa do modelo também foi satisfatória na predição dos pKi's das moléculas do conjunto teste haja vista que baixos valores de resíduos foram obtidos quando foi feita a diferença entre o valor de pKi obtido da literatura e o valor de pKi obtido pelo modelo matemático.

A energia do orbital de fronteira LUMO, o número de nitrogênios, a polarizabilidade da molécula bem como volumes de determinados substituintes são aspectos decisivos na atividade biológica. Os orbitais moleculares gerados tanto para moléculas com alto valor de pKi quanto para baixos valores, diferem na energia do orbital LUMO e não em seu formato. A utilização do LUMO como variável pode ser representada então pela capacidade de recepção de elétrons dessa porção da molécula por parte do sítio receptor, indicando alta eletronegatividade dos resíduos presentes na região de interação.

Por fim, para futuros trabalhos, tanto a síntese de compostos com diferentes substituintes como também uma síntese planejada guiada por esse estudo seria interessante para aferir a atividade biológica de novos compostos a fim de aumentar a quantidade de informação e diversidade de compostos para futuros estudos de QSAR.

Estudos de docking molecular e dinâmica molecular poderão trazer novas ideias de como esses compostos se comportam no sítio ativo do receptor μ -opioide, bem como prever novos compostos dessa classe.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDI, H., WILLIAMS, L.J., Principal component analysis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**. Vol. 2.
2. ALDRISCH, J.V., **Analgesics**. New York : M.E.Wolff, 1996.
3. ANH, N.T., **Frontier orbitals: a practical manual**. Chichester : s.n., 2007.
4. ATKINS, P.W., **Fundamentos de Físico-Química**. 2002. Vol. 1.
5. BECKE, A.D., **J. Chem. Phys.** 5648, Vol. 98.
6. BEEBE K., PELL, R.J., SEASHOLTZ, M.B., **Chemometric: a pratical guide**. New York : John Wiley & Sons, 1998.
7. BOURDONNEC, B.L., BELANDER, S., et al. Trans-3,4-Dimethyl-4-(3-carboxamidophenyl)piperidines: A Novel Class of u-Selective Opioid Antagonists. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 2003, pp. 4459-4462.
8. BOURDONNEC, B.L., GOODMAN, A.J., et al. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 2006, pp. 864-868.
9. BOURDONEC, B.L., GOODMAN, A.J., et al. Elucidation of the Bioactive Conformation of the N-Substituted trans-3,4-Dimethyl-4-(3-hydroxyphenyl)piperidine Class of u-Opioid Receptor Antagonists. **J.Med.Chem.** 2006, pp. 7278-7289.
10. BOURDONEC, B.L., GOODMAN, A.J., et al. Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel Octahydro-1H-pyrido[1,2-a]pyrazine as u-Opioid Receptor Antagonists. **J.Med.Chem.** 2006, pp. 7290-7306.
11. BRERETON, R.G., **Chemometrics data analysis for the laboratory and chemical plant**. s.l. : Wiley, 2003.
12. BUCHNER, L.H., **N.Y.Med.J.** 1972, pp. 2305-2309.
13. BUDZYNSKI, J., RYBAKOWSKI, J., SWIATKOWSKI, L., **Alcohol Alcohol**. 2000, pp. 91-97.
14. CAMMARATA, A., **J.Med.Chem.** 1972, p. 573.
15. Chemometris, **MILANO**. Dragon 5.1.
16. CHUNG, K.F., Drugs to suppress cough- Expert Opin Investigation Drugs. 19, 2005, Vol. 27.
17. CRABTREE, B.L., **Clin. Pharm.** 1984, pp. 273-280.

18. CUSTÓDIO, R., POLITI, J.R.S., HAIDUKE, R.L.A., Quatro alternativas para resolver a equação de schrödinger para o átomo de hidrogênio. **Química Nova**. 2002, Vol. 25.
19. DAFTERY, V., **Engl. J. Med.** 1974, pp. 979-980.
20. DUARTE, D.F., Opium and opioids: A brief History. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. 55, 2005, Vol. 1.
21. EINSTEIN, A., On the Motion—Required by the Molecular Kinetic Theory of Heat—of Small Particles Suspended in a Stationary Liquid. **Annalen der Physik**. 1905, Vol. 17.
22. EINSTEN, A., On a Heuristic Viewpoint Concerning the Production and Transformation of Light. **Annalen der Physik**. 17, 1905.
23. FERREIRA, M., MONTANARI, C.A., GAUDIO, A.C., Seleção de variáveis em QSAR. **Química Nova**. 2002, Vol. 25.
24. FILMORE, D., It's a GPCR world. **Modern Drug Discovery**. 2004, pp. 24-28.
25. FITTS, D., **Principles of quantum mechanics**. s.l. : Cambridge University Press, 1999.
26. FLATEN, G. R., GRUNG, B., e KVALHEIM, O.M., A method for validation of reference sets in SIMCA modeling, **Chemometrics And Intelligent Laboratory Systems**. 101, 2004, Vol. 72.
27. FORESMAN, J., **Exploring Chemistry with electronic structure methods**. Pittsburg,PA : s.n.
28. FULLER, R., GORDIS, E., **J.Med.** 2001, pp. 1770-1771.
29. GALL, T.A., **Clin. Pharmacol.Ther.** 1989, pp. 66-71.
30. GAUDIO, A.C., ZADONADE, E., Preposição, validação e análise dos modelos que correlacionam estrutura química e atividade biológica. **Química Nova**. 5, 2001, Vol. 24.
31. 2003. GAUSSIAN. Wallingford : s.n., 2003.
32. GAUSSIAN. FRISCH, M.J., TRUCKS, G.W., SCHLEGEL, H.B., SCUSERIA, G.E., ROBB, M.A., CHEESEMAN, J.R., SCALMANI, G., BARONE, V., MENNUCCI, B., PETERSSON, G.A., NAKATSUJI, H., CARICATO, M., LI, X., HRATCHIAN, H.P., IZMAYLOV, A.F., BLOINO, J., ZHENG, G., SONNENBERG, J.L.; HADA, M., EHARA, M., TOYOTA, K., FUKUDA, R., HASEGAWA, J., ISHIDA, M., NAKAJIMA, T., HONDA, Y., KITAO, O., NAKAI, H., VREVEN, T., MONTGOMERY, JR., J.A., PERALTA, J.E., OGLIARO, F., BEARPARK, M., HEYD, J. J., BROTHERS, E., KUDIN, K N.,

- STAROVEROV, V.N., KOBAYASHI, R., NORMAND, J., RAGHAVACHARI, K., RENDELL, A., BURANT, J.C., IYENGAR, S.S., TOMASI, J., COSSI, M., REGA, N., MILLAM, N. J., KLENE, M.; KNOX, J.E., CROSS, J. B., BAKKEN, V., ADAMO, C., JARAMILLO, J., GOMPERTS, R., STRATMANN, R. E., YAZYEV, O., AUSTIN, A. J., CAMMI, R., POMELLI, C., OCHTERSKI, J. W., MARTIN, R. L., MOROKUMA, K., ZAKRZEWSKI, V. G., VOTH, G. A., SALVADOR, P., DANNENBERG, J.J., DAPPRICH, S., DANIELS, A.D., FARKAS, Ö., FORESMAN, J.B., ORTIZ, J. V., CIOŚLOWSKI, J., FOX, D.J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009. Wallingford : s.n., 2003.
33. GOODMAN, A.J., BOURDONNEC, B.L., DOLLE, R.E., Mu Opioid Receptor Antagonists: Recent Developments. **ChemMedChem**. 2007, pp. 1552-1570.
 34. GRAHAM, J.D.P., KARRAR, M.A., **J.Med.Chem**. 1963, p. 103.
 35. HACKSHAW, K.V., PARKER, G.A., ROBERTS, J.W., **Crit. Care Med**. 1990, pp. 47-50.
 36. HANSCH, C., LIEN, E.J., **Biochem. Pharmacol**. 1968, p. 709.
 37. *Heroína, O analgésico que mata*. BOZZO, C. 1987. 1987, **Super interessante**.
 38. KLOCKGETHER-RADKE, F.W., Sertürner and the discovery of morphine. 200 years of pain therapy with opioids. **Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther**. 2002, p. 244.
 39. KOCH, W., HOLTHAUSEN, M., **Chemist's guide o density functional theory**. Weinheim : Wiley, 2002.
 40. KOHN, W., SHAM, L.J., Self-Consistent equations including exchange and correlations effects. **Physical Rewis**. 1965, Vol. 140.
 41. KURLAN, R., MAJUNDAR, L., **Ann. Neurol**. 1991, pp. 19-23.
 42. LAMEIRA, J., ALVES, C.N., A density functional study of flavonoid compounds with anti-HIV activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 2006, Vol. 41.
 43. LAMEIRA, J., REIS, M., ALVES, C.N., Structure–activity relationship study of flavone compounds with anti-HIV-1 integrase activity: A density functional theory study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 2006, Vol. 14.
 44. LEE, C., YANG, W., PARR, R.G., **Phys. Rev. B**. 37, 1998, Vol. 785.
 45. LEVINE, I.N., **Quantum chemistry**. 2001.
 46. LOIMER, N., LENZ, K., PRESSLICH, O., SCHMID, R., **Lancet**. 1990, p. 111.

47. LONGNECK, K.E., **Anesth. Analg.** 1973, pp. 447–453.
48. LORD, J.A., WATERFIELD, A.A., HUGHES, J., KOSTERLILTZ, H.W.,
Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. **Nature.** 1977, pp. 495-499.
49. MANGLIK, A., KRUSE, A.C., KOBILKA, T.S., THIAN, F.S., Crystal structure
of the mu-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. **Nature.** 17 de maio
de 2012, pp. 321-327.
50. MATTHES, H.W., Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and
withdrawal symptoms in mice lacking the m-opioid-receptor gene. **Nature.**
1996, pp. 819-823.
51. MOLINARI, P., Morphine-like opiates selectively antagonize receptor-arrestin
interactions. **J. Biol. Chem.** 2010, pp. 12522-12535.
52. Nobelprize.org. *Nobel Prize*. [Online] Nobel Prize, 10 de outubro de 2012.
[Citado em: 11 de outubro de 2012.]
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2012/press.html.
53. NORN, S., KRUSE, P.R., KRUSE, R., **History of opium poppy and morphine.**
s.l. : Dan Medicinhist Arbog, 2005.
54. PARR, R.G., SZENTPALY, L.V., Electrophilicity index. **Journal of the
American Chemical Society.** 9, 1999, Vol. 121.
55. PARR, R.G., YANG, W., Density functional theory of atoms and molecules.
New York : s.n., 1989.
56. PAULI-MAGNUS, C., MIKUS, G., ALSCHER, D.M., **J. Am. Soc. Nephrol.**
2000, pp. 514-519.
57. PEARSON, R.G., Absolute electronegativity and hardness correlated with
molecular orbital theory. **Proceedings of the National Academy of Sciences
of the United States of America.** 22, 1986, Vol. 83.
58. PIESTRZENIEWICZ, M.K., MICHNA, J., Opioid receptors and their selective
ligands. **Postepy Biochem.** 2006, p. 313.
59. POOPLE, J.A., SEEGER, R., BINKLEY, J.S., KRISHNAN, R., **J. Chem.
Phys.** 650, 1980, Vol. 72.
60. RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., **Farmacologia.** s.l. : Churchill
Livingstone, 2003. pp. 651-662.
61. RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., **Farmacologia.** s.l. : Churchill
Livingstone, 2003.

62. REIS, M., LAMEIRA, J., A theoretical study of phenolic compounds with antioxidant properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 2007, Vol. 42.
63. RUAN, X., Drug-related side effects of long-term intrathecal morphine therapy. **Pain Physician**. 2007.
64. RYAN, J., HUXTABLE, S.K.W., The Isolation of Morphine First Principles in Science and Ethics. **American Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics**; Molecular Interventions, 2001.
65. SCHIFF, P.L.J., Opium and its alkaloids. **American Journal of Pharmaceutical Education**. 2002.
66. SHAW, P.J., Multivariate statistics for the Environmental Sciences. 2003.
67. SHUKLA, A.K.,XIAO, K., LEFKOWITZ, R.J., Emerging paradigms of b-arrestin arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. **Trends Biochem. Sci.** 2011, pp. 457-469.
68. SILVA, R.R., SANTOS, J.M., RAMALHO,T.C., Concerning the FERMO concept and Person's hard and soft acid-base principle. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 2, 2006, Vol. 17.
69. TODESCHINI, R., <http://michem.disat.unimib.it/chm/>. [Online] Milano Chemometrics and QSAR group, 2009.
70. TRSIC, M., PINTO, M., **Química Quântica:Fundamentos e Aplicações**. Barueri : Manole, 2009.
71. UNGER, S.H., HANSCH, C., **J.Med.Chem.** 1973, p. 745.
72. WALDRON, V.D., **J. Am. Med.Assoc.** 1973, p. 53.
73. ZIMMERMAN, D.M., NICKANDER, J.S., HORNG, J.S., WONG, D.T., **Nature**. 1978, pp. 332-334.