



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Estudo teórico de opioides sintéticos no contexto das Novas Substâncias Psicoativas”

Luiz Felipe Colli Sinhorini

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

Ribeirão Preto - SP

2020



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Estudo teórico de opioides sintéticos no contexto das Novas Substâncias Psicoativas”

Luiz Felipe Colli Senhorini

Orientadora: Prof. Dra. Aline Thaís Bruni

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

VERSÃO CORRIGIDA

Ribeirão Preto - SP

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Colli Sinhorini, Luiz Felipe

Estudo teórico de opioides sintéticos no contexto das Novas Substâncias Psicoativas. Ribeirão Preto, 2020.

121 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientadora: Bruni, Aline Thaís

1. Opioides sintéticos. 2. Simulação Computacional. 3. DFT. 4. Quimiometria. 5. *Docking* molecular.

Nome: SINHORINI, Luiz Felipe Colli.

Título: Estudo teórico de opioides sintéticos no contexto das Novas Substâncias Psicoativas

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

*Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz
Fernando e Marisa, à minha irmã Maria
Fernanda, e à Stella.*

Agradecimentos

Agradeço à minha família por todo apoio oferecido e pelas condições que me permitiram realizar este trabalho. Especialmente ao meu pai Luiz Fernando, à minha mãe Marisa e à minha irmã Maria Fernanda. Obrigado por todo carinho, amor, conselhos e ensinamentos.

Agradeço à minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Aline Thaís Bruni, pela orientação, amizade e incentivo. Obrigado por se esforçar para nos proporcionar a melhor experiência possível, não só na área acadêmica, mas também na área profissional e pessoal.

Agradeço à Stella por me apoiar e incentivar neste momento tão importante. Obrigado por estar do meu lado e acreditar sempre em mim. Agradeço também por compartilhar seu olhar e opinião científica.

Aos colegas de LEI-DQ, agradeço pelas conversas, conselhos e amizade. Agradeço especialmente ao Caio, Jade, Nathália e Paulo pelos momentos compartilhados durante todo o trabalho.

Agradeço a todos os amigos que encontrei pelo caminho, especialmente ao Guilherme, Antônio, Eduardo e Andressa.

Agradeço ao Departamento de Química da FFCLRP-USP pela estrutura e suporte.
Agradeço à CAPES pelo apoio técnico e financeiro.

RESUMO

SINHORINI, Luiz Felipe Colli. **Estudo teórico de opioides sintéticos no contexto das Novas Substâncias Psicoativas**. 2020, 119 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Substâncias análogas sintéticas do fentanil que não foram aprovadas para uso médico são conhecidas como fentanils não farmacêuticos (NPF, *Non-Pharmaceutical Fentanyl*s). Sua síntese clandestina envolve a modificação química de um medicamento existente, que pode ter efeitos farmacológicos imprevisíveis. Essas mudanças também tornam a identificação química difícil. Como novas estruturas estão surgindo em um ritmo rápido, os métodos experimentais usados para caracterizar essas substâncias não conseguem acompanhar esse ritmo. Nesse cenário, os métodos *in silico* tornaram-se uma alternativa para estudar esses sistemas. Neste trabalho aplicamos o planejamento fatorial para decidir as melhores condições relacionadas a métodos de teoria do funcional da densidade (DFT, *Density Functional Theory*) para realizar os cálculos. O método que apresentou os melhores resultados foi o conjunto B3LYP, 6-311G**, LooseSCF e NormalOpt, pois reproduziu de maneira satisfatória as estruturas experimentais utilizadas para comparação. Essas condições foram usadas para calcular o espectro infravermelho de 45 NPF apreendidos reportados na literatura. Os espectros calculados foram validados por comparação com dados experimentais e têm potencial, portanto, de servirem como uma referência para compostos desconhecidos. Métodos quimiométricos foram utilizados para estabelecer as principais características dessas substâncias de acordo com a variação estrutural. Métodos *in silico* também foram utilizados para estudar a tendência de comportamento biológico dessas substâncias. Para isso, utilizamos métodos de ancoragem molecular, que dão uma ideia sobre a interação dessas drogas com o receptor. Os metabólitos dessas substâncias também foram estudados por metodologia computacional e puderam ser comparados com resultados reportados na literatura. Em conclusão, os métodos *in silico* forneceram informações valiosas sobre substâncias ilegais. Além disso, esses métodos são úteis para prever as propriedades espectroscópicas e biológicas dos NPF e para melhorar a qualidade das informações disponíveis sobre eles.

Palavras-chave: Opioides sintéticos, simulação computacional, DFT, quimiometria, *docking* molecular.

ABSTRACT

SINHORINI, Luiz Felipe Colli. **Theoretical study of synthetic opioids in the context of the New Psychoactive Substances.** 2020, 119 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Synthetic fentanyl analog substances that have not been approved for medical use are known as Non-Pharmaceutical Fentanyls (NPF). Its clandestine synthesis involves the chemical modification of an existing drug, which can lead to unpredictable pharmacological effects. These changes also make chemical identification difficult. As new structures are emerging at a rapid rate, the experimental methods used to characterize these substances cannot keep pace. In this scenario, *in silico* methods have become an alternative to study these systems. In this work we apply factorial planning to decide the best conditions related to Density Functional Theory (DFT) to perform the calculations. The method that presented the best results was the B3LYP, 6-311G **, LooseSCF and NormalOpt set, as it reproduced in a satisfactory way the experimental structures used for comparison. These conditions were used to calculate the infrared spectrum of 45 apprehended NPF reported in the literature. The calculated spectra were validated by comparison with experimental data and therefore have the potential to serve as a reference for unknown compounds. Chemometric methods were used to establish the main characteristics of these substances according to the structural variation. *In silico* methods were also used to study the tendency of biological behavior of these substances. In this sense, we use molecular docking methods, which give an idea about the interaction of these drugs with its receptors. The metabolites of these substances were also studied by computational methodology and could be compared with results reported in the literature. In conclusion, *in silico* methods provided valuable information on illegal substances. In addition, these methods are useful for predicting the spectroscopic and biological properties of NPF and for improving the quality of available information about them.

Key words: Synthetic opioids, computational simulation, DFT, chemometrics, molecular docking.

Lista de ilustrações

Figura 1 - Níveis vibracionais e curva real de energia potencial.....	30
Figura 2 - Superfície de Energia Potencial: Pontos de mínimos global e local conectados pelo ponto de sela	31
Figura 3 - Otimização geométrica para o ponto mínimo de energia (A e B) mais próximo da estrutura de input (A' e B')	32
Figura 4 - Aproximação da função de Slater por meio de diversas funções Gaussianas	44
Figura 5 - Ortogonalidade entre duas Componentes Principais para duas variáveis.....	53
Figura 6 - Procedimentos gerais da ancoragem molecular.....	56
Figura 7 - Receptor opioide: TM1 – TM7	62
Figura 8 - Rota de metabolização do fentanil.....	63
Figura 9 - Regiões de substituição dos análogos do fentanil.....	64
Figura 10 - Diagrama de Pareto para Energia Eletrônica.....	71
Figura 11 - Diagrama de Pareto para RMSD	72
Figura 12 - Diagrama de Pareto para o Tempo de Cálculo	72
Figura 13 - Espectro de infravermelho do fentanil: Bio-Rad® experimental (a) e calculado (b)	74
Figura 14 - Espectro de infravermelho teórico do o-fluoroisobutirfentanil (vermelho), m-fluoroisobutirfentanil (azul) e p-fluoroisobutirfentanil (preto).....	78
Figura 15 - HCA dos espectros de infravermelho das estruturas	79
Figura 16 - Resultado dos scores da PCA em 3D. Verde (Subgrupo I, S-I); Vermelho (Subgrupo II, S-II); Preto (Subgrupo III, S-III); Azul (Subgrupo IV, S-IV).....	80
Figura 17 - PCA 3D das variáveis	81
Figura 18 - Sobreposição 2D dos resultados das PCAs	82
Figura 19 - Espectro de infravermelho teórico do fentanil (preto), heptanoilfentnail (vermelho), acetilfentanil (amarelo) e 2-tiofenoilfentanil (azul).....	82
Figura 20 - Análise dos outliers.....	84
Figura 21 - Energias de ligação previstas pelos softwares a) iGemdock, b) PyRx e c) GOLD	89
Figura 22 - Possibilidade de interação do fentanil com o receptor μ -opioide: a) Pose I e b) Pose II.....	92
Figura 23 - Interações do p-metilacetilfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD	93
Figura 24 - Interações do acriloilfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD	94
Figura 25 - Interações do butirfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD.....	94
Figura 26 - Interação do fentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD	100
Figura 27 - Interações do alfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD	101
Figura 28 - Interações do carfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD.....	102

Figura 29 - Interações da a) cis-3R-4S-3-metilfentanil; b) cis-3S-4R-3-metilfentanil; c) trans-3S-4S-3-metilfentanil; d) trans-3R-4R-3-metilfentanil pelo software PyRx	104
Figura 30 - Interações da a) cis-3R-4S-3-metilfentanil; b) cis-3S-4R-3-metilfentanil; c) trans-3S-4S-3-metilfentanil; d) trans-3R-4R-3-metilfentanil pelo software GOLD	105
Figura 31 - Principais rotas metabólicas dos análogos do fentanil.....	110
Figura 32 - Principais metabólitos do ocfentanil.....	111
Figura 33 - Principais metabólitos do butirfentanil	112
Figura 34 - Principais metabólitos do p-fluoroisobutirfentanil	112
Figura 35 - Principais metabólitos do furanilfentanil.....	113

Lista de tabelas

Tabela 1 - Níveis dos fatores	46
Tabela 2 - Matriz do planejamento fatorial completo 2 ⁴	47
Tabela 3 - Cálculo da diferença média entre as respostas	48
Tabela 4 - Substituintes de cada região de substituição	65
Tabela 5 - Valores codificados e reais dos fatores	67
Tabela 6 - Valores de referência das frequências vibracionais	68
Tabela 7 - Planejamento fatorial completo 2 ⁴ e suas respostas	70
Tabela 8 - Resultado ANOVA para Energia Eletrônica.....	71
Tabela 9 - Resultado ANOVA para RMSD	72
Tabela 10 - Resultado ANOVA para Tempo de Cálculo	72
Tabela 11 - Comparação entre os picos dos espectros Teóricos (T) e Experimentais (E). O número “1” especifica quando o pico está presente enquanto que o número “0” especifica quando ausente	75
Tabela 12 - Resultados da SIMCA	84
Tabela 13 - Resíduos interclasses	85
Tabela 14 - Distâncias interclasses	85
Tabela 15 - Correlação entre os números e os aminoácidos.....	95
Tabela 16 - Presença (1) ou ausência (0) dos aminoácidos nas ancoragens.....	96
Tabela 17 - Comparação das rotas metabólicas obtidas de maneira experimental e computacional. As cores representam os Subgrupos que as estruturas pertencem de acordo com os dados quimiométricos: Subgrupo I (verde), Subgrupo II (vermelho), Subgrupo III (preto) e S.....	106

Lista de abreviaturas

AC – Adenilato Ciclase

AM1 – *Austin Model 1*

AMF – alfa-Metilfentanil

ANOVA – *Analysis of Variance*

ANPP – 1-fenetil-N-fenilpiperidin-4-amina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

B3LYP – *Becke 3-parameter, Lee-Yang-Parr*

BFGS – Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno

cAMP – Monofosfato Cíclico de Adenosina

CC – *Coupled Cluster*

CNDO – *Complete Neglect of Differential Overlap Approximation*

CSD – *Cambridge Structural Database*

DEA – *Drug Enforcement Administration*

DFT – *Density Functional Theory*

DOR – δ *Opioid Receptor*

ED50 – *Median Effective Dose*

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

GA – *Genetic Algorithm*

GC – *Gas Chromatography*

GDP – Guanosina Difosfato

GGA – *Generalized Gradient Approximation*

GOLD – *Genetic Optimization of Ligand Docking*

GPCR – *G Protein-Coupled Receptor*

GTO – *Gaussian Type Orbitals*

GTP – Guanosina Trifosfato

HCA – *Hierarchical Cluster Analysis*

HF – Hartree-Fock

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

HRMS – *High Resolution Mass Spectrometry*

ILS – *Iterated Local Search*

INDO – *Intermediate Neglect of Differential Overlap Approximation*

KOR – κ *Opioid Receptor*
LC – *Liquid Chromatography*
LCAO – *Linear Combination of Atomic Orbitals*
LD50 – *Median Lethal Dose*
LDA – *Local Density Approximation*
LSDA – *Local Spin Density Approximation*
MDMA - Metilenodioximetanfetamina
MGGA – *meta-Generalized Gradient*
MM – Mecânica Molecular
MOR – μ *Opioid Receptor*
MPn – Moller-Plesset
MS – *Mass Spectrometry*
MS – Ministério da Saúde
NDDO – *Neglect of Diatomic Differential Overlap*
NPF – *Non-Pharmaceutical Fentanyl*
NPP – N-fenetil-4-piperidinona
NPS – *New Psychoactive Substances*
ONU – Organização das Nações Unidas
Opt – *Optimization*
PBE – Perdew-Burke-Ernzerhof
PC – *Principal Component*
PCA – *Principal Component Analysis*
PDB – *Protein Data Bank*
PM3 – *Parameterization Method 3*
PPP – Parisier-Parr-Pople
R# – Região de Substituição
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RMSD – *Root Mean Square Deviation*
ROHF – *Restricted Open Shell Hartree-Fock*
SAR – *Structure-Activity Relationship*
SCF – *Self Consistent Field*
SEP – Superfície de Energia Potencial
SIMCA – *Soft Independent Modeling of Class Analogies*

SISNAD – Sistema Nacional de Políticas Públicas sobre Drogas

SMILES – *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*

STO – *Slater Type Orbitals*

SVS – Secretaria de Vigilância Sanitária

SWGDRUG – *Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs*

TM – Transmembrana

TZVP – *Valence Triple Zeta Polarization*

UFF – *Universal Force Field*

UHF – *Unrestricted Hartree-Fock*

VMD – *Visual Molecular Dynamics*

Sumário

I – Introdução.....	19
Fentanil e seus análogos.....	19
Os primeiros surgimentos dos NPFs.....	20
A epidemia dos opioides.....	21
Produção e tráfico dos NPFs.....	22
Contenção das Novas Substâncias Psicoativas no Brasil.....	24
Utilização de métodos computacionais para o estudo dos NPS.....	25
II – Definição do problema.....	26
III – Objetivos.....	27
IV - Fundamentação Teórica.....	28
Química Computacional.....	28
Superfície de Energia Potencial.....	29
Otimização Estrutural.....	32
Mecânica Molecular.....	33
Mecânica Quântica.....	35
Método Hartree-Fock.....	37
Métodos ab initio.....	40
Métodos Semiempíricos.....	40
Teoria do Funcional da Densidade.....	41
Conjunto de Bases.....	43
Planejamento Experimental.....	45
Planejamento Fatorial Completo 2^4	46
ANOVA.....	49
Diagrama de Pareto.....	50
Quimiometria.....	51
HCA.....	51
PCA.....	52
SIMCA.....	54
Docking.....	54
Algoritmos.....	56
Interações.....	58
Farmacologia.....	59

Mecanismo de ação	61
Metabolismo.....	63
V – Sistema de estudo	64
VI – Procedimentos computacionais	66
Parte 1. Condições de cálculo	66
Parte 2. Avaliação do espectro Infravermelho	67
Parte 3. <i>Docking</i> molecular	69
Parte 4. Estudo da rota metabólica	69
VII – Resultados e Discussões.....	70
Parte 1. Condições de cálculo	70
Parte 2. Avaliação dos espectros Infravermelho	73
Parte 3. <i>Docking</i> molecular	88
Parte 4. Rota Metabólica	105
VIII - Conclusão	113
IX – Referências Bibliográficas	114
X – Material Suplementar.....	122

I – Introdução

Fentanil e seus análogos

O fentanil (nome químico N-fenil-N-[1-(2-feniletil)piperidin-4-il]propanamida, fórmula molecular $C_{22}H_{28}N_2O$ e massa molar $336,47 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) é um opioide sintético utilizado como analgésico e anestésico desde 1972¹. Ele foi sintetizado pela Janssen Pharmaceutical, na Bélgica, em 1960¹. Seu primeiro uso médico foi em cirurgias como um anestésico intravenoso e hoje é um dos medicamentos mais utilizados para o tratamento de dores pós-operatórias, severas e crônicas em todo o mundo². Seu efeito farmacêutico é produzido pela atividade agonista com o receptor μ -opioide do sistema nervoso central^{3,4}. Estima-se que o fentanil seja em torno de 100 vezes mais potente que a morfina, e cerca de 30-50 vezes mais potente que a heroína³.

Diferente da morfina ($C_{17}H_{19}NO_3$), um opiáceo isolado da papoula (*Papaver somniferum*), e da heroína ($C_{21}H_{23}NO_5$), um opioide semissintético derivado da morfina, o fentanil é totalmente sintetizado em laboratório⁵. Apesar de apresentar mecanismo de ação e propriedades similares aos opiáceos e opioides, ele estruturalmente pertence a uma classe de opioides sintéticos denominada de 4-anilidopiperidina^{5,6}. Como o nome sugere, essa classe é caracterizada pelas substâncias com a presença de um grupo anilina (C_6H_7N) ligada a um anel piperidina ($C_5H_{11}N$) com o átomo de nitrogênio na posição 4.

A repetida administração do fentanil leva à dependência e tolerância, e o seu simples uso gera sintomas como sonolência, euforia, constrição das pupilas e depressão respiratória. Este último efeito é o principal causador das mortes por overdose, uma vez que leva à parada respiratória e ao edema pulmonar^{4,7}. O uso do fentanil também pode causar efeitos colaterais como náusea, tontura e vômito, e sintomas de abstinência como ansiedade, câimbra, dores nos ossos e diarreia⁸.

Devido a sua alta solubilidade lipídica, o fentanil rapidamente cruza a barreira hematoencefálica, proporcionando uma ação mais rápida e de menor duração^{5,7}. Quando comparado à morfina, o fármaco até então mais utilizado, gera menos riscos cardiovasculares⁹. Aliado a isso, a síntese do fentanil se mostrou mais vantajosa economicamente do que a obtenção da morfina a partir da papoula, devido a grande disponibilidade de precursores sintéticos^{5,7}. Essas vantagens fizeram com que o fentanil

rapidamente emergisse como o analgésico mais utilizado no mundo⁸ e, posteriormente, como uma poderosa droga de abuso¹⁰.

Seguindo o sucesso do fentanil, muitos análogos foram desenvolvidos por meio de modificações em sua estrutura. Embora o objetivo dessas sínteses fosse produzir novos fármacos¹¹, como o sufentanil, alfentanil e o remifentanil, isso possibilitou que novos estudos e métodos fossem disponibilizados e utilizados para a produção de novas drogas de abuso na forma de Novas Substâncias Psicoativas (NPS, do inglês *New Psychoactive Substances*)⁸.

O fentanil e suas substâncias análogas que são produzidos ilegalmente ou que não tenham seu uso médico aprovado são conhecidos por NPF (*Nonpharmaceutical fentanyl*)⁹, uma classe dentro das NPS. Eles são drogas sintetizadas clandestinamente por meio de uma modificação química em uma droga já existente. Com essa modificação, a nova droga pode tanto manter seus efeitos farmacológicos como amenizá-los ou potencializá-los. Além disso, ela pode se tornar indetectável pelos métodos rotineiros de análise e não ter sua produção e comércio regularizado pelos órgãos de controle, facilitando sua produção e o tráfico⁵. As principais modificações podem ser vistas no Capítulo V – Sistema de estudos.

Os primeiros surgimentos dos NPFs

Os primeiros casos documentados do uso ilícito do fentanil, ou um análogo, em larga escala foi em 1979 na Califórnia, EUA, quando uma série de overdoses supostamente provocada por opioides foi reportada. Entretanto, apesar da necropsia e dos vestígios encontrados confirmarem a suspeita das mortes, nenhum traço de heroína ou algum outro opioide rotineiramente analisado foi identificado. A droga em questão era o alfa-metilfentanil (AMF), um NPF que só foi identificado meses depois por meio de uma ação do DEA (do inglês *Drug Enforcement Administration*) contra a entrada de heroína vinda do sudeste asiático⁵. O segundo surto de um NPF aconteceu em 1984 na Pensilvânia, EUA. O 3-metilfentanil, um dos dois mais potentes análogos do fentanil já criado, foi responsável por 16 mortes por overdose¹.

No início dos anos 90, dez NPFs já haviam sido identificados no mercado ilícito¹³. Entretanto, foi entre 2005 e 2007 que houve o maior surto de overdose causada pelos NPFs antes do início da epidemia em 2013. Esse surto teve fim após o rastreamento dessas drogas, que levaram a um único laboratório clandestino em Toluca no México. Esse fato

teve como consequência a regulação dos principais precursores utilizados na síntese do fentanil, o N-fenetil-4-piperidinona (NPP) em 2007, e o 1-fenetil-N-fenilpiperidin-4-amina (ANPP) em 2010⁵.

Além das mortes provenientes do tráfico, desde 1972 há o registro de diversas overdoses causadas pelo uso acidental ou indevido do fentanil⁹. Essas overdoses estão relacionadas à exposição diária e ao fácil acesso à droga por parte dos anesthesiologistas e cirurgiões, e à popularização do uso farmacêutico do fentanil por meio da liberação de adesivos transdérmicos. Essas overdoses foram tantas que o fentanil passou a ser prescrito apenas nos casos em que um opioide menos potente não seria suficiente para o alívio da dor, ou quando o paciente já havia desenvolvido tolerância a outros opioides⁵.

A epidemia dos opioides

A epidemia causada pelos opioides teve início em 2013 nos EUA, quando o número de mortes provocadas por opioides sintéticos, no geral, subiu 79%¹⁴. Em 2014, o número de mortes relacionadas a qualquer tipo de opioide atingiu 28.647 casos¹⁵, representando 61% de todas as mortes por overdose no país¹⁶. Esse aumento foi seguido pelo número de apreensões contendo fentanil, que subiu 426%, representando 3,87% do total de apreensões de drogas daquele ano¹⁷. Além do fentanil, o acetilfentanil, o butirfentanil, e o beta-hidroxitiofentanil surgiram para o mercado ilícito de drogas em 2013, 2014 e 2015, respectivamente, sendo responsáveis por centenas de overdoses por todo o país¹⁸. No ano de 2015, o número de apreensões do fentanil já havia triplicado, atingindo 14.051 detecções, se tornando a nona droga mais identificada de todos EUA¹⁷.

Já em 2016, o número de NPF proliferou, passando de apenas uma nova droga por ano para dezenas delas¹⁷, contribuindo para que o número de apreensões chegasse ao dobro em relação ao ano anterior¹⁴. Nesse período deve-se destacar o surgimento do carfentanil para o mercado ilícito, um opioide sintético utilizado como anestésico de animais de grande porte, como o elefante, e cerca de cem vezes mais potente que o próprio fentanil¹⁹. Além dele, o furanilfentanil, o acrilfentanil, o p-fluoroisobutirfentanil, o 3-metilfentanil, o tetrahydrofuranilfentanil e o valerilfentanil também surgiram como os principais responsáveis pelo aumento de overdoses naquele ano¹⁸. Em 2017, dentre os NPFs que surgiram, o metoxiacetilfentanil e o ciclopropilfentanil foram os que mais contribuíram para a epidemia¹⁸, sendo que aproximadamente 33% das mortes por overdose naquele ano tiveram algum opioide envolvido²⁰. Além disso, o número de

overdose aumentou dez vezes de 2013 a 2017 nos EUA⁴. O acetilfentanil foi o principal análogo do fentanil que surgiu em 2018²⁰, e comparando as mortes por fentanil entre 2016 e 2018, observou-se um aumento de 25%²⁰.

Não é só os EUA que sofrem com a epidemia, os NPFs também são encontrados com frequência no Canadá e na Europa^{8,21}. Das 1.019 mortes relacionadas ao fentanil entre 2009 e 2014 no Canadá, mais da metade ocorreu em 2013 e 2014, justamente no período em que a epidemia se iniciou⁸. Na Europa, estima-se que 3,5% das mortes de pessoas entre 19 e 39 anos estão relacionadas ao uso de algum opioide²¹. Diversos países europeus já tiveram ao menos um surto de overdose relacionado aos NPFs, estando entre eles a Estônia, Finlândia, Alemanha, Grécia, Itália, Suécia, Reino Unido e República Tcheca^{7,22}. Na Estônia, por exemplo, o fentanil é o opioide mais utilizado entre os usuários de drogas, ultrapassando até mesmo a heroína²². Essa relação também se repete na Finlândia e na República Tcheca, onde os opioides sintéticos são os maiores responsáveis pelas internações de usuários em clínicas de reabilitação²¹.

No início da epidemia, os NPFs geralmente eram encontrados misturados com heroína ou comprimidos prescritos falsificados, por também serem opioides e atingirem o mesmo público¹. Entretanto, com o passar do tempo, além de serem encontrados isolados, também foram identificados em misturas com cocaína, maconha⁹, MDMA¹⁵ e benzodiazepínicos⁷. Isso agravou ainda mais a epidemia, já que a ingestão de alguns miligramas de um NPF pode ser fatal para uma pessoa sem tolerância ao opioide, como é o caso dos usuários de outras drogas⁹. Além disso, os NPFs podem ser encontrados em forma de pó, spray nasal, líquidos e em comprimidos⁸.

Produção e tráfico dos NPFs

Até o final da década de 80, o método utilizado para a produção dos NPFs era o mesmo desenvolvido por Paul Janssen quando sintetizou o fentanil pela primeira vez. Entretanto, esse método era complexo e sofisticado tecnicamente por não utilizar um precursor de fácil obtenção, possibilitando apenas a produção de uma quantidade limitada de NPF. Com a publicação de uma rota alternativa de produção, no início dos anos 80, a síntese de NPF foi facilitada. O método Siegfried utilizava apenas um precursor (NPP ou ANPP), não necessitava de equipamentos sofisticados e nem elevado conhecimento técnico em química. Assim, a produção em larga escala passou a ser viável, gerando lucro para os produtores ilegais⁵.

Com o passar do tempo, o controle do NPP e ANPP foi intensificado pela ONU (Organização das Nações Unidas) e pela China. Essa ação forçou o desenvolvimento de novas rotas sintéticas utilizando outros precursores como o benzilfentanil e o 4-anilidopiperidina²³.

Estima-se que uma pílula contendo fentanil é vendida por 10 a 20 dólares nas ruas, sendo que um quilo de um NPF puro pode ser comprado por 2.000 a 4.000 dólares pelos traficantes. Devido à quantidade da droga em cada pílula ser muito pequena, um quilo de NPF pode gerar de 5 a 20 milhões de dólares em vendas, se tornando um negócio muito rentável^{1,14}.

A regulação e o monitoramento das indústrias químicas e farmacêuticas da China são difíceis de fiscalizar. Por esse fato, esse país é o principal responsável pelo fornecimento dos opioides sintéticos e seus precursores para os Estados Unidos e a Europa¹⁴. Quando o destino é o mercado norteamericano, a droga é majoritariamente enviada ao México, onde é sintetizada, misturada com a heroína, transformada em pílulas ou apenas distribuída através da fronteira sudoeste dos Estados Unidos. Esse transporte é feito pelos cartéis e distribuidores mexicanos ou até mesmo pelos correios. Em menor quantidade, a droga também é enviada ao Canadá, onde entra no mercado ilegal local, chegando até os Estados Unidos pela fronteira nordeste¹.

O tráfico para a Europa, além do fornecimento chinês, conta com a produção ilegal em países vizinhos da União Europeia como a Rússia, Belarus e a Ucrânia, onde a droga é posteriormente transportada para todo o continente²¹. Além disso, uma segunda fonte de obtenção desses opioides é o desvio de fármacos contendo o fentanil de fornecedores regularizados²². Outros países como Alemanha, Japão¹⁵, Bulgária, Grécia, Portugal e Eslováquia também já foram reportados como produtores e distribuidores de NPF²².

Outro fator que contribui para o rápido aparecimento dos NPFs é a internet, que com o seu mecanismo global de vendas, dificulta a regulação das novas drogas, propagando-as para todo o mundo¹⁴. A internet proporciona uma facilidade na disponibilidade e no acesso às drogas de abuso, além de possibilitar pequenos e grandes distribuidores a aumentarem seus lucros com as vendas online. Tanto a internet normal (*surface web*), quanto a *deep web* podem ser utilizadas para as compras de drogas e de precursores em quantidade para uso pessoal ou para o tráfico. Além disso, ela possibilita os meios mais variados de pagamento, abrangendo desde o uso de cartão de crédito e transferências bancárias, até o Western Union, PayPal e criptomoedas¹.

Contenção das Novas Substâncias Psicoativas no Brasil

O Brasil, assim como o mundo todo, também foi afetado pelas Novas Substâncias Psicoativas. Nos últimos anos, centenas de NPS foram identificadas pela Polícia Federal²⁴. Entretanto, diferente do que se vê nos Estados Unidos e na Europa, as substâncias mais identificadas no Brasil são pertencentes às classes das catinonas sintéticas, das feniletilaminas e dos canabinoides sintéticos, nessa ordem. Os NPFs, apesar de representarem menos de 1% das novas substâncias identificadas, tiveram dois análogos, o fentanil e o furanilfentanil, encontrados em 5 estados brasileiros, sendo eles, Acre, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo²⁴ e São Paulo²⁵.

A Lei nº 11.343/2006, também conhecida como Lei de Drogas, é a lei que institui o Sistema Nacional de Políticas Públicas sobre Drogas (SISNAD) e, entre outras medidas, estabelece normas para repressão à produção ilegal e ao tráfico ilícito de drogas, além de definir os crimes envolvendo o uso irregular de alguma substância no Brasil. Para que uma substância possa ser enquadrada em algum crime estabelecido por essa lei, é necessário que ela conste na lista da Portaria SVS/MS nº 344/98 ou em suas atualizações, função essa, que é desenvolvida pela Anvisa, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC)²⁴.

De acordo com essa Lei, as drogas ilícitas são entendidas como substâncias entorpecentes, psicotrópicas, precursoras e outras sob controle especial dessa Portaria. Assim, as novas substâncias psicoativas e seus precursores estão sujeitos às mesmas sanções previstas para as drogas já tradicionais, como a maconha e a cocaína²⁶.

Os opioides sintéticos são controlados nominalmente, estando, o fentanil, seus análogos e precursores, presentes em três listas da Portaria SVS/MS nº 344/98. Na Lista A1, referente às substâncias entorpecentes sujeitas a notificação de receita “A”, estão presentes o alfentanil, fentanil, remifentanil e o sufentanil. Na Lista D1, contendo as substâncias precursoras de entorpecentes e/ou psicotrópicos sujeitas a receita médica sem retenção, estão presentes o ANPP e o NPP. Já na Lista F1, representando as substâncias entorpecentes de uso proscrito no Brasil, estão presentes o 3-metilfentanil, 3-metiltiofentanil, 4-fluoroisobutirfentanil, acetil-afa-metilfentanil, acetilfentanil, acrilioilfentanil, alfa-metilfentanil, alfa-metiltiofentanil, beta-hidroxi-3-metilfentanil, beta-hidroxifentanil, butirfentanil, carfentanil, ciclopropirilfentanil, furanilfentanil, metoxiacetilfentanil, ocfentanil, orto-fluorofentanil, para-fluorobutirfentanil, para-fluorofentanil, tetrahidrofuranilfentanil e o tiofentanil²⁶.

Também cabe à Anvisa, representando o Ministério da Saúde, por meio do Decreto nº 5.912/2006, editar normas sobre limitação, fiscalização e controle da produção, e do comércio de drogas, assim como a avaliação do risco relacionado a essas substâncias, seus possíveis usos médicos, científicos e industriais²⁴. Com isso, a comunidade científica acaba esbarrando na legislação quando se trata de pesquisas utilizando alguma substância proscrita. Sendo assim, seria necessária uma autorização junto à Anvisa para que a universidade pudesse realizar estudos com essas substâncias, podendo consumir muito tempo, além de poder sofrer restrições de uso e quantidade disponível para pesquisa, dificultando o trabalho.

Utilização de métodos computacionais para o estudo dos NPS

Uma maneira de contornar os problemas burocráticos e legais para o estudo dessas substâncias é a utilização de métodos computacionais, também conhecidos como métodos *in silico*. Métodos *in silico* se baseiam em simulações e aproximações computacionais por meio de softwares, e podem ser empregados em um vasto campo científico, inclusive no estudo de substâncias proscritas que a universidade não tem autorização para trabalhar, sintetizar ou cultivar. Por meio desses métodos, podemos prever com certa confiança diversos parâmetros físico-químicos, toxicológicos e espectrais de um grande grupo de compostos em um curto período. Além disso, compostos que ainda não foram sintetizados podem ser estudados por esses métodos^{27,28}.

Os métodos *in silico* foram desenvolvidos na década de 70, e hoje, com o avanço da tecnologia, puderam ser aprimorados e agilizados, mostrando-se, mais do que nunca, uma importante ferramenta alternativa de estudo. Além de ser um método de baixo custo, também não necessita a utilização de animais em ensaios, a compra de reagentes e padrões analíticos, e o emprego de equipamentos e técnicas sofisticadas^{27,28}.

Entre as possibilidades de utilização desses métodos, convém destacar a obtenção da relação estrutura-atividade (SAR) de um novo composto, a afinidade de uma droga pelo seu receptor no sistema nervoso central, a obtenção de informações toxicológicas, como o LD50²⁹, ED50 e LogP, e metabólicas^{30,31}, além de simulações de espectros Infravermelho, Raman e RMN, e a determinação de energias eletrônicas e termodinâmicas por meio de cálculos quânticos^{32,33}.

II – Definição do problema

A epidemia dos opioides segue um certo padrão tanto nos EUA como na Europa^{20,21}. Apesar de diversos NPFs entrarem para o mercado ilícito, dentro de alguns meses eles já não são mais encontrados. Isso acontece pois, quando o NPF é sintetizado, ele não se encontra sob regulamentação e controle de nenhum órgão federal, tendo sua produção, comércio e até mesmo a entrada em outros países legalizados. Assim, ele permanece no mercado até ser apreendido, identificado e colocado sob regulamentação. Entretanto, quando isso acontece, já existe outro NPF disponível no mercado ainda sem regulamentação que o substituirá, e assim sucessivamente^{20,21}. Com isso, pode-se dizer que o mecanismo de combate aos NPFs é reativo¹.

Uma das atitudes para iniciar um combate mais proativo dessas drogas foi a mudança no método de regulação e controle de substâncias por parte dos órgãos federais³⁴. A listagem das substâncias proscritas geralmente é feita nominalmente, com a introdução do nome de cada substância a ser controlada individualmente. Entretanto, na tentativa de acompanhar a rápida aparição das NPS, começou a ser utilizado um sistema de classificação de substâncias juntamente com a listagem nominal. Esse sistema traz uma abordagem genérica, com a inserção de classes estruturais e substâncias análogas. Com isso, as medidas de controle das drogas listadas nominalmente são estendidas a um grupo maior de substâncias²⁴.

Em diversos países essa abordagem genérica de controle de substâncias para pelo menos uma classe de drogas pode ser encontrada. Entretanto, nem todos os países que utilizam dessa abordagem englobam os opioides sintéticos³⁴. Dentre os países que controlam os análogos do fentanil dessa maneira destaca-se os EUA, Canadá, Reino Unido e Nova Zelândia^{1,35}. No Brasil, esse novo sistema começou a ser utilizado em 2016, controlando dez classes estruturais dos canabinoides sintéticos, e em 2017, controlando uma classe estrutural das catinonas sintéticas, duas das principais classes de NPS identificadas durante este período²⁴. Os opioides, por sua vez, ainda são listados nominalmente no Brasil, sendo necessária a atualização da lista de substâncias proscritas pela ANVISA para se tornarem ilegais²⁴.

Para compensar a rápida aparição dos NPFs no mercado ilícito e possibilitar sua apreensão é necessário que haja métodos analíticos de detecção e identificação, assim como protocolos de análises sejam desenvolvidos e atualizados na mesma velocidade³⁴. Essas técnicas são indispensáveis tanto para o estudo e caracterização de uma nova droga

para a atualização da lista de substâncias proscritas, como para a confirmação de que uma droga pertence a uma classe de substâncias específicas. Porém, o que se verifica é a falta de um monitoramento de rotina que seja eficaz em todo o mundo^{1,14}. Alguns kits de imunoensaios são disponíveis para a detecção de alguns análogos e metabólitos do fentanil em amostras biológicas, mas o resultado falso-positivo para algumas moléculas de estruturas parecidas é bastante comum^{1,36}. O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) também é disponível para alguns análogos, entretanto algumas de suas necessidades operacionais, como o processo em bateladas e longo tempo de análise, não viabilizam sua larga utilização³⁶. Além disso, para uma detecção definitiva, segundo diretrizes do SWGDRUG, ainda é necessário a utilização de métodos mais robustos e complexos como cromatografias gasosa e líquida acopladas ao espectrômetro de massa (GC-MS, LC-MS/MS e HPLC-MS), cromatografia líquida de alta resolução acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução (LC-HRMS)^{1,36}, espectroscopia Raman, espectroscopia de Infravermelho³⁷ e ressonância magnética nuclear¹⁴.

Com exceção da LC-HRMS, todos os outros métodos rotineiros de análise necessitam de um padrão analítico de referência ou de uma biblioteca de espectros para a identificação de uma droga desconhecida^{1,36}. Com essa vantagem, a LC-HRMS emergiu como o principal método de análise dos NPF e seus metabólitos, e foi a principal técnica utilizada para a descoberta dessas novas drogas. Entretanto, devido a seu alto custo, ela não está disponível para a maioria dos laboratórios clínicos e forenses de rotina^{1,14}. Assim, a disponibilidade de padrões de referência é essencial para a investigação dessas drogas, sendo que novos métodos de obtenção de espectros para as técnicas mais acessíveis são de suma importância para auxiliar na resolução de problemas como a contenção das NPS³⁸. Além disso, o estudo e divulgação de informações toxicológicas e procedimentos de identificação também são estratégias de resposta e de contenção da rápida aparição dessas novas drogas, uma vez que possibilitam um procedimento de sistema de aviso prévio e de avaliação de risco, e direcionam as tomadas de decisões em relação as políticas públicas^{29,38}.

III – Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral estudar e avaliar a aplicação de métodos computacionais, também conhecidos como métodos *in silico*, para a obtenção de informações sobre o fentanil e seus análogos sintéticos. Tais informações são obtidas com a intenção de auxiliar no processo de contenção da rápida aparição dessas substâncias no mercado ilegal de drogas e possibilitar a tomada de decisões em questões de política e saúde pública. De maneira específica, este trabalho busca trazer uma abordagem de química molecular e quântica para simular espectros de infravermelho dessas substâncias e observar as tendências existentes entre eles por meio de quimiometria, mostrando as semelhanças e diferenças entre os espectros estudados. Dessa maneira, dados de referência podem ser criados e utilizados para auxiliar em um processo de identificação química. Também como objetivo específico, este trabalho avalia três métodos de *docking* molecular para a predição de atividades biológicas dessas drogas com o receptor cerebral, além da utilização de métodos computacionais e pesquisas bibliográficas para a obtenção dos metabólitos provenientes dessas drogas.

IV - Fundamentação Teórica

Química Computacional

A química pode ser descrita por meio de métodos matemáticos, e a aplicação desses métodos pode ser definida pelo termo “química teórica”³⁹. Quando esses métodos matemáticos são desenvolvidos bem o suficiente a ponto de serem automatizados e implementados em um computador, na forma de um software por exemplo, capaz de representar comportamentos experimentais, passamos a utilizar o termo “química computacional” ou “modelagem molecular”^{39,40}. Em outras palavras, esse termo pode ser definido por um conjunto de técnicas utilizadas na investigação de um problema químico em um ambiente computacional, por meio da simulação de comportamentos experimentais⁴⁰.

As principais questões investigadas pela química computacional são relacionadas à energia e estado de transição, reatividade química, propriedade física, interação com enzimas, geometria molecular e simulação de espectros de uma ou mais moléculas⁴⁰. Nesse contexto, as últimas três questões serão discutidas de forma mais aprofundada neste trabalho.

Poucos aspectos químicos podem ser exatamente calculados pelos métodos computacionais, mas muitos aspectos podem ser descritos de forma aproximada de maneira qualitativa e/ou quantitativa. Além disso, são métodos que podem ter um custo mais adequado por envolverem apenas computadores e softwares, e em muitos casos podem ser mais rápidos quando comparados aos métodos experimentais^{39,40}. Os resultados gerados por meio de computador podem ser obtidos em um tempo que varia de alguns segundos a alguns dias. O tempo vai depender da complexidade da molécula, do problema investigado, do método utilizado e da capacidade de processamento do computador^{39,40}.

Mesmo que aumentem o consumo de energia elétrica e que gerem algum tipo de lixo eletrônico, os métodos computacionais são considerados ambientalmente seguros por não gerarem resíduos químicos e ajudarem na diminuição da quantidade de testes em animais³⁹. Ainda que cada vez mais confiável, a química computacional não substitui os métodos experimentais, uma vez que eles são os responsáveis pelas reais descobertas da natureza e da criação dos parâmetros utilizados nos próprios cálculos computacionais^{39,40}. Entretanto, eles são muito empregados antes do início de experimentos como um norteador ou como um método de triagem, fazendo com que os resultados obtidos em laboratórios sejam agilizados e tenham seu custo diminuído^{39,40}.

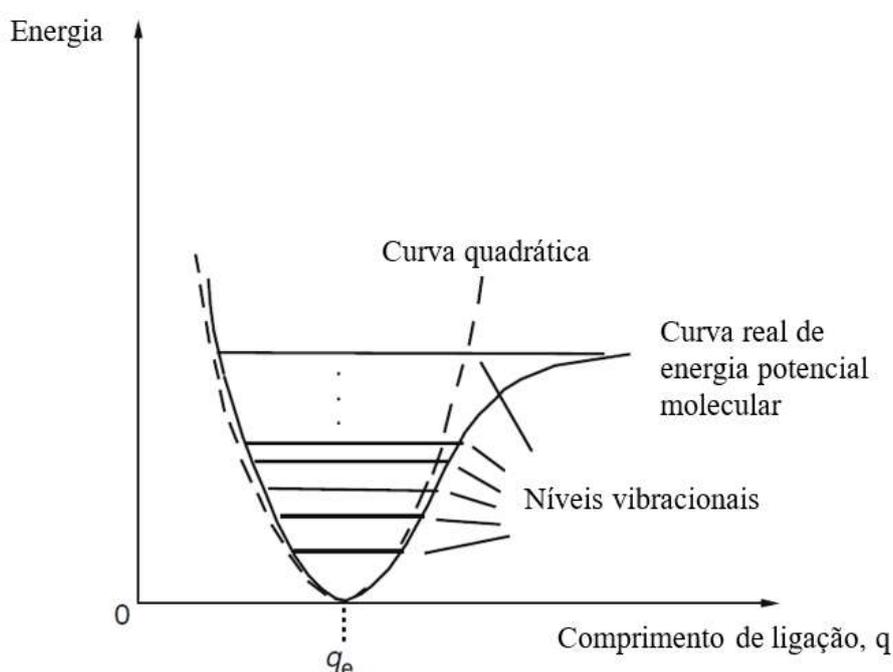
Superfície de Energia Potencial

Na química computacional muitos conceitos que parecem matematicamente desafiadores, podem ser compreendidos por meio da ideia da Superfície de Energia Potencial (SEP). A SEP nada mais é que uma relação gráfica (ou matemática) entre a energia de uma molécula com a sua geometria. A ideia é entender como a energia potencial de uma molécula se comporta em relação a todos seus possíveis arranjos atômicos. Para que os métodos computacionais se aproximem ainda mais dos experimentais, é necessário utilizar da SEP para considerar não só uma estrutura geométrica, mas sim todas as possíveis geometrias relacionadas ao cálculo de uma determinada molécula⁴⁰.

Assim como a Mecânica Molecular, uma molécula na SEP pode ser interpretada por esferas representando os átomos, e molas representando as ligações químicas. Com isso, a compressão ou estiramento da “mola” envolve um deslocamento de energia. Moléculas reais se comportam de maneira similar a este modelo, mas diferem em dois

principais aspectos: 1) As moléculas vibram incessantemente, e com isso, elas nunca estarão em seu ponto estacionário com a energia cinética nula. Por isso, pode haver uma representação composta por linhas na parte inferior da curva representando os níveis vibracionais que essa molécula pode ocupar; 2) Perto do comprimento de ligação ótimo, uma molécula real pode ser descrita muito bem por uma equação quadrática (oscilador harmônico simples). Entretanto, longe deste ponto a curva quadrática sofre um desvio em relação curva real da energia potencial da molécula^{40,41}. Esses dois aspectos podem ser visualizados na Figura 1 a seguir.

Figura 1 - Níveis vibracionais e curva real de energia potencial



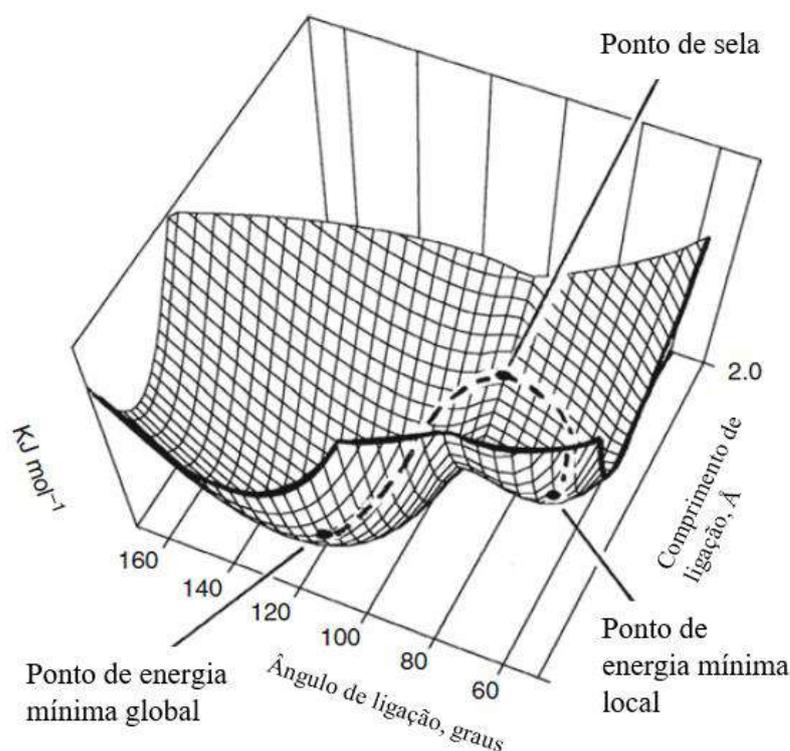
Fonte: Modificado de Lewars et al (2011)

Para ilustrar a construção de uma SEP, imagine um gráfico no qual a coordenada interna seria o comprimento de ligação entre dois átomos. Assim, quando adicionamos um átomo, por não haver nenhum grau de liberdade geométrica, ele definirá a origem da superfície. Ao adicionar um segundo átomo, sua posição se dará exclusivamente pela distância do primeiro átomo. Com isso, o sistema diatômico passa a apresentar um único grau de liberdade, o comprimento de ligação, satisfazendo a equação $3N - 5$ graus de liberdade ($N = 2$ átomos). Se um terceiro átomo for adicionado, sua posição se dará ou pelas distâncias em relação a cada átomo anterior, ou pela distância em relação a um átomo e um ângulo entre as duas ligações já definidas para um átomo em comum. Assim,

para um sistema com três átomos, três graus de liberdade estarão presentes, satisfazendo a equação $3N - 6$ ($N = 3$ átomos), não considerando a colinearidade. A partir desse ponto, cada átomo adicional necessita de mais três coordenadas para definir sua posição em relação aos outros átomos presentes, satisfazendo a equação $3N - 6$ ($N \geq 3$ átomos)⁴¹.

Devido a diversos números de coordenadas, é possível compreender que uma SEP completa para sistemas poliatômicos é de difícil visualização. Por isso, geralmente são analisados trechos da SEP envolvendo uma ou duas coordenadas, mas que mostrem curvas (2D) ou superfícies (3D) de energia potencial relevantes. Dessa maneira é possível identificar os pontos na SEP mais importantes para os cálculos computacionais. São eles o ponto de energia mínima local, que corresponde à estrutura geométrica ótima para uma determinada molécula, e o ponto de sela, que permite visualizar o caminho de menor energia que conecta os pontos entre dois mínimos, possibilitando a identificação do estado de transição de uma molécula^{40,41}. Essa relação pode ser visualizada na Figura 2.

Figura 2 - Superfície de Energia Potencial: Pontos de mínimos global e local conectados pelo ponto de sela



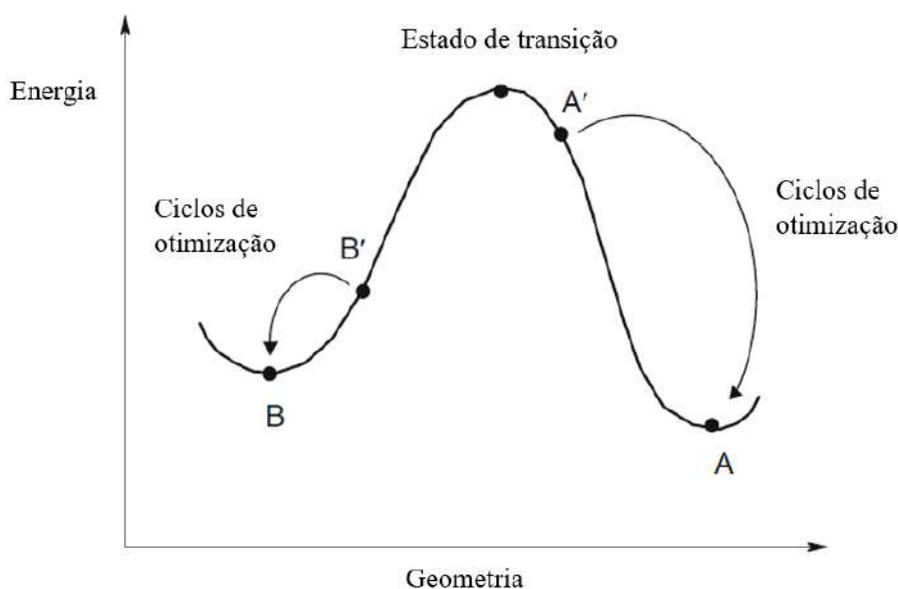
Fonte: Modificado de Lewars et al (2011)

Otimização Estrutural

A otimização estrutural pode ser definida pela busca do ponto estacionário de uma molécula em uma SEP, obtendo-se sua energia potencial e suas coordenadas geométricas nesse ponto. Essa otimização é feita por meio de uma estrutura de *input* inicial, que é submetida a um algoritmo computacional que promove mudanças nessa estrutura até que o ponto estacionário seja atingido. Quanto mais semelhante ao ponto estacionário a estrutura de *input* for, melhor e mais rápido será o resultado. Isso porque o ponto de mínimo encontrado geralmente representa o mínimo local mais próximo da estrutura de *input* e não o mínimo global⁴⁰.

Como a SEP não tem uma curvatura exatamente quadrática, vários ciclos são necessários para a otimização da maioria das moléculas, uma vez que elas apresentam várias coordenadas. Assim, o primeiro ciclo da otimização resulta em um novo ponto geralmente mais próximo do mínimo de energia do que a estrutura de *input* inicial. Esse ponto gerado, por sua vez, serve como *input* para o início do segundo ciclo, que gera um ponto mais próximo do mínimo de energia. Esse processo se repete até que a energia potencial chegue a um ponto estacionário⁴⁰, como pode ser visto na Figura 3.

Figura 3 - Otimização geométrica para o ponto mínimo de energia (A e B) mais próximo da estrutura de input (A' e B')



Fonte: Modificado de Lewars et al (2011)

A curvatura da SEP no ponto estacionário é a responsável por determinar se aquela estrutura é um ponto de energia potencial mínima ou um ponto de sela. Em outras palavras, a segunda derivada da energia potencial em relação aos parâmetros geométricos é a responsável por essa determinação, uma vez que a primeira derivada é igual a zero para os dois casos. Para o ponto de energia mínima, a segunda derivada é positiva para todas as coordenadas, enquanto para o ponto de sela, a segunda derivada é negativa para a coordenada da reação e positiva para todas as outras coordenadas. Além do cálculo da primeira e segunda derivadas, também é possível diferenciar o ponto de mínimo do ponto de sela por meio do cálculo do espectro vibracional da molécula. Para uma molécula no ponto de energia potencial mínima, todas as vibrações são reais, ou seja, são positivas. Já para uma molécula no ponto de sela, haverá uma vibração imaginária (negativa), que representa a movimentação dessa molécula ao longo da coordenada da reação^{40,41}.

Mecânica Molecular

A Mecânica Molecular (MM) se baseia no modelo matemático no qual as moléculas são representadas por esferas e molas. As esferas representam os átomos, que estão ligados uns aos outros por meio de molas, que representam as ligações químicas. Nesse modelo, a energia da molécula se altera à medida que sua geometria sofre alterações, uma vez que as molas oferecem resistência quando esticadas ou comprimidas para longe de seu comprimento (e/ou ângulo) ótimo, e as esferas oferecem resistência quando colocadas muito próximas umas às outras⁴⁰. A essa altura, fica evidente que a mecânica molecular ignora todos os efeitos eletrônicos existentes. Esses efeitos serão considerados posteriormente pela Mecânica Quântica.

O modelo de MM busca expressar a energia de uma molécula constituindo um campo de força. O campo de força utiliza a resistência relacionada ao estiramento de uma ligação, ao dobramento de uma ligação, à torção de um ângulo diedro e à interação entre átomos não ligados como parâmetros para o cálculo de energia. Com isso, essa energia quantizada é utilizada para encontrar o ponto ótimo de cada um desses parâmetros, representando a estrutura geométrica responsável pela energia mínima da molécula. Além da energia mínima, pode-se também determinar a SEP, possibilitando a realização de uma análise conformacional completa da molécula em questão^{40,41}.

A energia potencial de uma molécula pode ser escrita pela seguinte equação (Eq.) de campo de força:

$$E = \sum_{\text{Ligação}} E_{est} + \sum_{\text{Ângulos}} E_{dob} + \sum_{\text{Diedros}} E_{tor} + \sum_{\text{NãoLigados}} E_{int} \quad (\text{Eq. 1});$$

onde os termos representam respectivamente a somatória da energia de cada um dos quatro parâmetros mencionados anteriormente. Essa equação ainda pode ser decomposta em relação a energia de cada termo individualmente^{40,42}:

$$E_{estiramento} = k_{estiramento} (l - l_{eq})^2 \quad (\text{Eq. 2}),$$

na qual $k_{estiramento}$ é a constante proporcional de força da ligação química, l é o comprimento de ligação após o estiramento e l_{eq} é o comprimento de ligação ótimo.

$$E_{dobramento} = k_{dobramento} (a - a_{eq})^2 \quad (\text{Eq. 3}),$$

onde, $k_{dobramento}$ é a constante proporcional de força, a é o ângulo da ligação após o dobramento e a_{eq} é o ângulo de ligação ótimo.

$$E_{torção} = k_o + \sum_{r=1}^n k_r [1 + \cos(r\theta)] \quad (\text{Eq. 4}),$$

na qual k_o é a constante de planaridade necessária para alguns grupos específicos, k_r é a constante de força rotacional e de torção, r é o termo de periodicidade do diedro dentro de 360° e θ é o ângulo diedro entre as ligações A-B e C-D.

$$E_{interação} = k_{nb} \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (\text{Eq. 5}).$$

A Equação 5 também é conhecida como Potencial de Lennard-Jones. Nela, o k_{nb} é o poço de potencial que relaciona a atração entre os átomos não ligados em questão, r é a distância entre esses átomos e σ é a distância na qual o potencial entre esses átomos é zero⁴².

Cada uma dessas equações descreve uma curva que representa a variação da energia potencial de uma molécula dentro de cada parâmetro geométrico específico. Por

isso, a somatória dessas equações realizada pela Equação 1 possibilita a criação de uma Superfície de Energia Potencial.

A parametrização do campo de força geralmente não é feita pelo pesquisador, uma vez que muitos campos de força já foram desenvolvidos e podem ser utilizados em diversos softwares. Quando esses campos de força são utilizados para moléculas de mesma classe de sua parametrização, os resultados encontrados são satisfatórios⁴¹. Neste trabalho, o campo de força utilizado foi o *Universal Force Field* (UFF), um dos campos de força mais utilizados e que inclui parâmetros para 126 elementos químicos. Além disso, o UFF inclui quatro termos de valência e também pode ser utilizado para compostos contendo elementos inorgânicos^{42,43}.

A Mecânica Molecular possui diversas aplicações em modelagem molecular, sendo que a criação de estruturas de *input* é a principal aplicação neste trabalho. Por meio dela, é possível obter essas estruturas de maneira rápida e sem muito esforço computacional. Além disso, o método é de fácil operação e tem parâmetros disponíveis para quase todos os elementos químicos e para diversas classes de compostos químicos^{40,41}.

A principal desvantagem da MM, como já dito anteriormente, é a negligência por parte dos elétrons. Dessa maneira, efeitos como distribuição de cargas e comportamentos nucleofílicos e eletrofílicos são menosprezados. Além disso, os parâmetros utilizados devem ser correspondentes com a classe dos compostos em questão^{40,41}.

Mecânica Quântica

A base para os cálculos quânticos computacionais provém da equação de Schrödinger:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (\text{Eq. 6});$$

onde \hat{H} é o operador Hamiltoniano, Ψ é a função de onda e E é a energia eletrônica. Nessa equação, matematicamente falando, Ψ é uma autofunção e E é um autovalor. A função de onda Ψ , como o nome sugere, descreve o comportamento eletrônico como sendo uma onda. Assim, por meio da função de onda ao quadrado (Ψ^2),

pode-se descrever a densidade de probabilidade de os elétrons estarem em uma determinada posição, mas não sua posição exata³⁹⁻⁴¹.

Os termos de energia cinética nuclear e eletrônica, assim como os termos de interação eletrostática, estão contidos no operador Hamiltoniano:

$$\hat{H} = T_N + T_e + V_{Ne} + V_{NN} + V_{ee} \quad (\text{Eq. 7});$$

onde N representa os núcleos e o e representa os elétrons. Dessa forma, T_N corresponde à energia cinética nuclear, T_e à energia cinética eletrônica, V_{Ne} à energia potencial de atração elétron-núcleo, V_{NN} à energia potencial de repulsão entre os núcleos, e V_{ee} à energia potencial de repulsão entre os elétrons. Esses termos podem ser especificamente representados pelas expressões a seguir:

$$T_N = -\sum_A \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 \quad (\text{Eq. 8}).$$

$$T_e = -\sum_a \frac{1}{2} \nabla_a^2 \quad (\text{Eq. 9}).$$

$$V_{Ne} = -\sum_a \sum_A \frac{Z_A}{|R_{Aa}|} \quad (\text{Eq. 10}).$$

$$V_{NN} = \sum_A \sum_{B>A} \frac{Z_A Z_B}{|R_{AB}|} \quad (\text{Eq. 11}).$$

$$V_{ee} = \sum_a \sum_{b>a} \frac{1}{|R_{ab}|} \quad (\text{Eq. 12}).$$

Nas Equações de 8 a 12, A e B representam os núcleos, a e b os elétrons, M a massa da partícula, Z a carga da partícula, R a distância entre as partículas e ∇_x^2 o operador Laplaciano que age sobre a partícula em questão.

O operador Hamiltoniano descrito acima quase nunca é utilizado na forma em que foi mencionado. Ele é simplificado considerando a aproximação de Born-Oppenheimer. Nessa aproximação, o movimento nuclear é separado do movimento eletrônico, uma vez que os núcleos apresentam massa muito maior que os elétrons. Devido a essa diferença, os elétrons se adaptam quase que instantaneamente ao movimento nuclear. Com isso, o

termo da energia cinética nuclear (T_N) pode ser desprezado, e o termo de energia potencial de repulsão entre os núcleos (V_{NN}) pode ser considerado constante⁴⁰.

Dessa maneira, a equação de Schrödinger não é resolvida para todas as partículas simultaneamente. Primeiro a parte eletrônica é calculada para cada posição fixa dos núcleos, e depois a repulsão nuclear é adicionada. Isso é possível pois, a adição de uma constante a um operador não influencia na autofunção (Ψ), apenas é somado ao autovalor (E)^{40,41}. Resolvendo a questão nuclear, o próximo passo é buscar soluções para o operador Hamiltoniano eletrônico (\hat{H}_e) a seguir:

$$\hat{H}_e = T_e + V_{Ne} + V_{ee} \quad (\text{Eq. 13}).$$

Método Hartree-Fock

Após a derivação da equação de Schrödinger, no final da década de 1920, Hartree introduziu o método do campo auto consistente (SCF, do inglês *Self-Consistent Field*). Com esse método, o cálculo aproximado das funções de onda e de energia para sistemas multieletrônicos foi descrito. Esse método, posteriormente denominado de método Hartree-Fock (HF) é a aproximação mais utilizada na maioria dos tipos de cálculo *ab initio*³⁹.

A inovação do HF é a separação da equação de Schrödinger para um sistema com N elétrons em N equações mais simples, onde cada equação descreve o comportamento de um elétron do sistema. Para isso, é considerado que o elétron interaja apenas com os núcleos e a nuvem eletrônica dos demais elétrons, e não com cada elétron explicitamente. Essa nuvem eletrônica é representada por uma distribuição de carga média produzida pelos outros elétrons^{39,40}. Dessa maneira, cada elétron é tratado independentemente e suas funções de onda podem ser separadas por meio da seguinte equação, também denominada como produto de Hartree:

$$\Psi(R) = \Psi_1(R_1) + \Psi_2(R_2) + \Psi_3(R_3) \dots = \prod_i^N \Psi_i R_i \quad (\text{Eq. 14}).$$

Entretanto, esse produto não satisfaz a propriedade de anti-simetria e, conseqüentemente, o princípio de exclusão de Pauli. O princípio de exclusão de Pauli impede que um átomo possua mais de um elétron com o mesmo conjunto de números

quânticos (estado). É necessário que cada orbital possua no máximo dois elétrons com spin anti-simétricos (um spin positivo e um spin negativo). Portanto, essa forma de escrever as funções de onda não pode ser utilizada, pois possibilita que dois elétrons ocupem o mesmo estado. Para satisfazer o princípio de exclusão de Pauli, a função de onda passou a ser descrita na forma de determinantes, sendo que o determinante de Slater (Φ) é o mais utilizado^{40,41}:

$$\Phi = \frac{1}{\sqrt{n!}} \begin{vmatrix} \Psi_1(1) & \Psi_2(1) & \cdots & \Psi_n(1) \\ \Psi_1(2) & \Psi_2(2) & \cdots & \Psi_n(2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \Psi_1(n) & \Psi_2(n) & \cdots & \Psi_n(n) \end{vmatrix} \quad (\text{Eq. 15}),$$

sendo,

$$\Psi(x) = \chi(x) \quad (\text{Eq. 16}),$$

onde as funções de onda são ortonormais e representam os spin-orbitais, por meio de uma função orbital (χ) e uma função de spin (x). Assim, quando dois elétrons ocuparem o mesmo spin-orbital, duas colunas do determinante de Slater serão idênticas, fazendo com que o determinante seja zero. Dessa maneira, não será considerada a ocupação de um mesmo orbital por mais de um elétron. Qualquer quantidade de determinante pode ser utilizada para descrever uma função de onda, entretanto, é mais simples utilizar um único determinante de Slater para descrever uma única função de onda^{40,41}. Assim, cada estado eletrônico é representado por uma única configuração:

$$\Psi \simeq \Phi \quad (\text{Eq. 17}).$$

A determinação das funções orbitais χ do determinante de Slater são realizadas utilizando o princípio variacional⁴¹. Com isso, é possível obter a função de onda para cada estado eletrônico e sua energia correspondente por meio da equação de autovalor de Hartree-Fock:

$$f(i) \chi(x_i) = \varepsilon \chi(x_i) \quad (\text{Eq. 18}),$$

$$f(i) = -\frac{1}{2}\nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{R_{iA}} + v^{HF}(i) \quad (\text{Eq. 19}),$$

nas quais f é o operador de Fock de um elétron e v^{HF} é o potencial de campo médio que atua sobre o elétron i .

As equações de Hartree-Fock posteriormente foram reformuladas por Roothaan, que sugeriu que as funções utilizadas para representar os orbitais moleculares fossem substituídas por funções que representassem os orbitais atômicos. Essa reformulação ficou conhecida como método de combinação linear de orbitais atômicos (LCAO, do inglês *linear combination of atomic orbitals*), e contornou o problema de assimetria dos orbitais moleculares⁴¹. A parte espacial dos orbitais eram expandidas por conjuntos de funções, e por meio de diagonalização matricial, soluções numéricas eram obtidas por meio da equação Secular³⁹⁻⁴¹:

$$F C = S C \varepsilon \quad (\text{Eq. 20}),$$

onde F é a matriz de Fock, C a matriz de coeficientes, S a matriz de recobrimento e ε a energia dos orbitais. Com isso, a matriz de Fock passa a depender dos orbitais moleculares, que dependem dos coeficientes dos orbitais. Para resolver essa situação, e o método Hartree-Fock ser aplicado, é necessário a utilização de um método iterativo³⁹.

O método HF tem início a partir de uma suposição inicial dos coeficientes dos orbitais. Esses coeficientes são utilizados tanto para calcular a energia dos orbitais iniciais, como para gerar outra disposição eletrônica. A partir dessa nova disposição, sua energia é calculada e outros coeficientes são gerados. Esse processo continua até que duas repetições seguidas mostrem a mesma energia e os mesmos coeficientes dos orbitais, atingindo assim, um campo auto consistente (SCF). Quando isso acontece, é dito que o cálculo convergiu³⁹⁻⁴¹.

Importante dizer que essa convergência está dentro de um intervalo de confiança, e não de maneira exata, além de nem sempre ser obrigatória. Vários parâmetros do cálculo podem influenciar nessa questão, sendo que o nível do SCF é um deles⁴⁰. Neste trabalho, dois níveis de SCF foram testados, sendo que o TightSCF garante a convergência do cálculo com diferença mínima de 10^{-8} ua de energia, e o LooseSCF com diferença mínima de 10^{-5} ua de energia entre duas repetições seguidas⁴⁴.

Métodos *ab initio*

O termo *ab initio* vem do latim “desde o princípio”, significando que ele utiliza as teorias iniciais de descrição eletrônica para a realização dos cálculos. Dessa maneira, esses métodos se baseiam apenas na resolução da equação de Schrödinger por meio do operador Hamiltoniano e do método Hartree-Fock. Como mostrado anteriormente, o método HF assume que cada elétron é influenciado pelo campo médio gerado pelos outros elétrons do sistema, e não de maneira independente entre si. Essa hipótese possibilitou diversas descobertas e um enorme progresso no desenvolvimento de cálculos eletrônicos. Entretanto, ela negligencia a correlação entre esses elétrons, um fator importante que influencia nas propriedades químicas das moléculas^{39,40,45}.

Utilizando o método HF podemos chegar apenas a um valor mínimo de energia, denominado limite de Hartree-Fock. Esse valor limite, justamente por não considerar a correlação eletrônica, é sempre menor que o valor de energia real do sistema⁴¹. A diferença entre essas duas energias é chamada de energia de correlação. Essa relação pode ser facilmente identificada pela seguinte equação:

$$E_{cor} = E - E_{HF} \quad (\text{Eq. 21}),$$

onde E_{cor} é a energia de correlação eletrônica, E é a energia real do sistema e E_{HF} é o limite de HF.

Para tentar contornar essa questão, tanto métodos com alterações no método HF, como métodos pós-HF foram desenvolvidos. Entre os métodos HF podemos citar o Hartree-Fock de Camada Aberta Restrita (ROHF) e Hartree-Fock Irrestrito (UHF), e entre os métodos pós-HF podemos citar o Coupled Cluster (CC) e a Teoria de Perturbação de Moller-Plesset (MPn). De maneira geral, cálculos com esses métodos dispendem de um alto custo computacional, sendo sua utilização mais viável em sistemas moleculares simples e pequenos⁴⁵.

Métodos Semiempíricos

Os métodos semiempíricos também são resolvidos baseados na equação de Schrödinger, e conseqüentemente, no operador Hamiltoniano e na equação de Hartree-Fock. Entretanto, eles contam com aproximações e omissões de algumas integrais,

geralmente referente aos elétrons do caroço. Elétrons esses, que estão localizados nas camadas internas dos átomos, não participando das ligações químicas. Para contornar essa redução no número de integrais, esses métodos utilizam parâmetros obtidos experimentalmente para substituí-las^{39,40}.

A parametrização tem como sua principal vantagem a aceleração dos cálculos eletrônicos quando comparados aos métodos *ab initio*. Assim, os métodos semiempíricos viabilizam o estudo de moléculas maiores e mais complexas. Como desvantagem, os cálculos por métodos semiempíricos apenas serão confiáveis quando uma parametrização feita por moléculas similares à molécula em questão for utilizada^{41,45}.

Diferentes métodos semiempíricos foram desenvolvidos para aumentar sua confiabilidade. Dentre eles, podemos citar os mais importantes como sendo os: PPP (desenvolvido por Pariser-Parr-Pople), negligência completa da sobreposição diferencial (CNDO, do inglês *complete neglect of differential overlap*), negligência intermediária da sobreposição diferencial (INDO, do inglês *intermediate neglect of differential overlap*), negligência da sobreposição diatômica diferencial (NDDO, do inglês *neglect of diatomic differential overlap*), *Austin Model 1* (AM1) e *Parameterization Method 3* (PM3). Os dois últimos métodos citados são os mais utilizados até hoje, sendo que cada um tem suas vantagens e desvantagens, dependendo da molécula estudada em questão⁴⁶.

Teoria do Funcional da Densidade

A Teoria do Funcional da Densidade (DFT, do inglês *Density Functional Theory*) parte do princípio de que a energia de uma molécula pode ser determinada por sua densidade eletrônica, e não por meio de sua função de onda, como eram baseados os métodos *ab initio* e semiempírico. Essa nova abordagem eletrônica traz duas principais vantagens em relação aos métodos anteriores. A primeira é que, diferentemente da função de onda, a densidade eletrônica é uma grandeza mensurável (por difração de Raio-X, por exemplo), e não apenas observável, possibilitando uma maior compreensão e parametrização do método. A segunda vantagem é a diminuição do custo computacional, uma vez que, por ser uma função de posição, a densidade eletrônica tem apenas três variáveis (x, y, z). Já a função de onda possui $4n$ variáveis, uma vez que cada elétron (n) possui três coordenadas espaciais e uma coordenada de spin. Dessa maneira, independentemente do tamanho da molécula em questão, um cálculo DFT será menos exigido computacionalmente do que um cálculo *ab initio*³⁹⁻⁴¹.

Essa teoria foi primeiramente proposta por Thomas e Fermi em 1927, porém, só em 1964, Hohenberg e Kohn mostraram que as propriedades de uma molécula no estado fundamental poderiam ser determinadas somente pela sua densidade eletrônica, além de incluírem os termos de energia de troca e correlação eletrônica, não utilizados anteriormente⁴⁰. Pouco tempo depois, Kohn e Sham desenvolveram uma aplicação prática para essa teoria que relacionava a energia eletrônica do sistema com a densidade eletrônica (ρ)^{40,41}:

$$E(\rho) = T(\rho) + V_{Ne}(\rho) + V_J(\rho) + E_{tro}(\rho) + E_{cor}(\rho) \quad (\text{Eq. 22}),$$

onde T se refere à energia cinética, V_{Ne} à energia potencial de atração entre o núcleo e o elétron, V_J à energia de repulsão entre os elétrons, E_{tro} à energia de troca eletrônica, que separa os elétrons de mesmo spin, e E_{cor} à energia de correlação eletrônica, que representa a interação independente entre os elétrons. Essa aplicação pode ser resolvida de maneira similar ao método Hartree-Fock, ou seja, por meio de um método iterativo com o determinante formado por uma combinação linear de funções bases^{39,40}.

Um funcional é uma função de uma função, que nesse caso é a densidade eletrônica. Analisando os cinco termos descritos anteriormente, temos que os funcionais dos três primeiros termos apresentam uma solução analítica. Entretanto, os funcionais dos termos de troca e correlação eletrônica não são inteiramente conhecidas⁴⁰. As aproximações realizadas para resolver esses funcionais classificam os diferentes tipos de métodos DFT.

A Aproximação da Densidade Local (LDA, do inglês *Local Density Approximation*) é a aproximação mais simples. Ela considera a densidade eletrônica local em um dado ponto da molécula, uma vez que assume que essa densidade seja uniforme. A Aproximação da Densidade Local de Spin (LSDA, do inglês *Local Spin Density Approximation*) adiciona um termo para alocar spins opostos em diferentes orbitais. A Aproximação do Gradiente Generalizado (GGA, do inglês *Generalized Gradient Approximation*) adiciona um termo do gradiente da densidade eletrônica (primeira derivada), passando a considerar também a não uniformidade eletrônica da molécula. A Aproximação meta-GGA (MGGA), além das aproximações vistas anteriormente, adiciona um termo da segunda derivada da densidade eletrônica (operador Laplaciano). Por último, temos os métodos híbridos, no qual, adicionam a energia de troca pela

aproximação do método Hartree-Fock, junto com funcionais para a energia de troca e correlação eletrônica⁴⁵.

Neste trabalho foram utilizados dois métodos DFT, sendo que o método PBE⁴⁷ (parâmetros de Perdew, Burke e Ernzerhof) é classificado como GGA, e o método B3LYP^{48,49} (3 parâmetros de Becke, e termo de correlação de Lee-Yang-Parr) é classificado como um método híbrido-GGA. O método B3LYP pode ser definido pela seguinte equação:

$$E_{xc}^{B3LYP} = (1 - a)E_x^{LSDA} + aE_x^{HF} + b\Delta E_x^B + (1 - c)E_c^{LSDA} + cE_c^{LYP} \quad (\text{Eq. 23}),$$

estando presentes três termos para energia de troca eletrônica (E_x^{LSDA} , E_x^{HF} e ΔE_x^B) e dois termos de energia de correlação eletrônica (E_c^{LSDA} e E_c^{LYP}). Onde os três parâmetros a , b e c , são 0,20, 0,72 e 0,81, respectivamente^{41,48,49}.

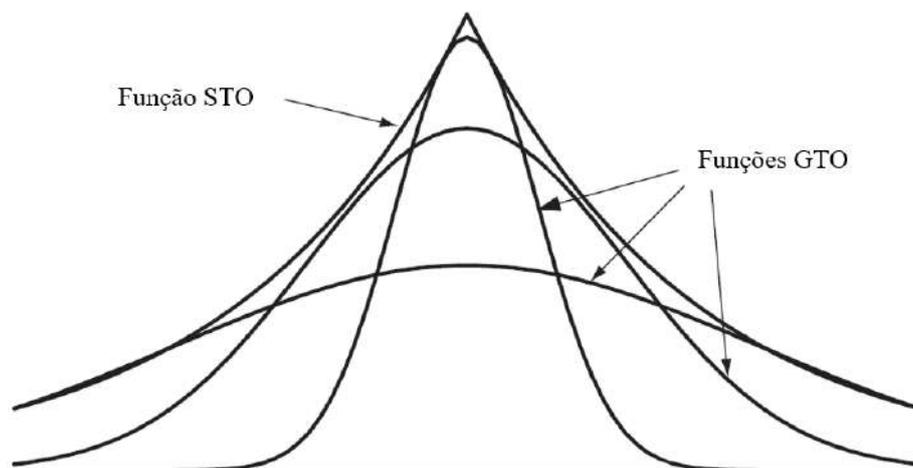
Conjunto de Bases

Conjunto de bases é o nome dado a um conjunto de funções matemáticas utilizado para representar os orbitais moleculares de uma molécula. Na maioria das vezes, esses orbitais moleculares são representados por uma combinação linear de funções matemáticas dos orbitais atômicos, passando a ser comumente chamado de LCAO (do inglês *Linear Combination of Atomic Orbitals*). Uma vez que essas funções descrevem a distribuição eletrônica em volta do átomo, a combinação dessas funções descreve a distribuição eletrônica por toda molécula^{39,40}.

Dentre todas as representações possíveis, as funções de Slater e as funções Gaussianas, por serem as mais simples matematicamente, foram utilizadas para descrever a distribuição eletrônica. As funções de Slater foram utilizadas para construir os primeiros tipos de conjunto de bases, os quais recebiam o nome de STO (do inglês *Slater Type Orbitals*). Apesar dessas funções proporcionarem uma boa descrição dos orbitais, sua utilização foi comprometida devido ao excessivo esforço computacional necessário para a realização dos cálculos. Uma função Gaussiana, por sua vez, não consegue proporcionar uma descrição tão boa quanto uma função de Slater, porém exige menos esforço computacional. Para contornar esse problema, uma função Gaussiana deu lugar a uma combinação linear de funções Gaussianas para descrever o orbital, como mostra a Figura

4. Esse tipo de conjunto de base recebeu o nome de GTO (do inglês, *Gaussian Type Orbitals*)^{39,45}.

Figura 4 - Aproximação da função de Slater por meio de diversas funções Gaussianas



Fonte: Modificado de Young et al (2001)

O número de funções base que representam os orbitais de caroço e de valência também tipificam o conjunto de base. Para um conjunto de base mínima, os dois orbitais são representados por apenas uma função Gaussiana, recebendo o nome de *single-zeta*. Para os conjuntos de base dupla, também chamado de *double-zeta*, os orbitais de caroço continuam sendo representados por apenas uma função cada, mas cada orbital de valência passa a ser representado por duas funções bases. O mesmo princípio é aplicado às bases triplas, que também são conhecidas por *triplo-zeta*. Com relação aos orbitais de valência, eles ainda podem ser separados de acordo com suas camadas, das mais internas para as mais externas, dando origem aos conjuntos de base de valência separada (*Split Valence Basis Set*)^{40,45}.

Além dessas funções, também pode ser necessário a utilização de outros tipos de funções, as de polarização e as difusas. As funções de polarização, como o nome diz, descreve a polarização, ou seja, a deformação sofrida pelos orbitais que participam de uma ligação química. Ela pode ser representada por um asterisco (*) quando considerar apenas os orbitais “p”, ou por dois asteriscos (**) quando considerar os orbitais “s” e “p”. Já as funções difusas descrevem melhor sistemas que tenham a densidade eletrônica distante do núcleo, ou seja, sistemas com uma região maior dos orbitais ocupados. Elas

são representadas pelo sinal + ou ++ quando considerar os orbitais “p” ou “s” e “p”, respectivamente^{40,45}.

Neste trabalho, dois conjuntos de bases foram utilizados, ambos sendo classificados como base tripla de valência separada com função de polarização. O conjunto de base TZVP⁵⁰ (do inglês, *Triple-Zeta Valence Polarization*) foi desenvolvido por Ahlrichs, e o 6-311G**^{51,52} foi desenvolvido por Pople. Neste último, há a especificação de que os orbitais de caroço são representados por uma função composta por seis funções Gaussianas, e os orbitais de valência da primeira, segunda e terceira camada são representados por uma função cada, composta por três, uma e uma funções Gaussianas, respectivamente, além das funções de polarização para os orbitais “s” e “p”^{51,52}.

Planejamento Experimental

As ferramentas estatísticas são amplamente utilizadas como um meio de investigar resultados de um experimento complexo. Dessa forma, é possível prever erros sistemáticos e aleatórios, e com isso, traçar planos para contorná-los. Isso, sem dúvidas, é uma aplicação crucial dessas ferramentas. Entretanto, esses conceitos estatísticos também podem ser utilizados para planejar o experimento. Essa ação é chamada de planejamento ou design experimental, e por meio dela, é possível encontrar fontes de erros antes mesmo do experimento começar⁵³.

Em análises nas quais mais de uma resposta é desejável, o número e a influência das variáveis experimentais estarão diretamente relacionados com os resultados. Em um planejamento experimental, essas variáveis recebem o nome de “fatores”, cada parâmetro (ou valor) dessas variáveis recebem o nome de “nível”, e as combinações possíveis entre os níveis e fatores recebem o nome de “tratamento”. Então, cabe ao planejamento experimental analisar e identificar quais níveis desses fatores são os mais importantes para cada resposta estudada, e usá-los na melhor combinação possível (melhor tratamento) para obter os melhores resultados para as respostas em questão. Por meio desse planejamento, o método em questão será otimizado para que os resultados sejam obtidos da maneira mais confiável possível e com redução de recursos, para só depois ser utilizado como um método de rotina. Esses recursos podem ser vistos como repetições de análises, amostras, reagentes, equipamentos, custo, tempo, entre outros⁵³.

Dentre os diversos tipos de planejamento experimental, como o Delineamento em Blocos, Quadrado Latino e Plackett-Burman, destacam-se também os Planejamentos Fatoriais. Os planejamentos fatoriais permitem o estudo de todos os tratamentos entre k fatores com j níveis cada, além de analisar também as interações entre esses fatores. Quando todas as combinações são analisadas, esse processo é denominado de Planejamento Fatorial Completo j^k . Entretanto, é fácil visualizar que à medida que os fatores e níveis aumentam, o número total de experimentos também aumenta, podendo chegar a uma quantidade inviável de análises. Para isso, foi desenvolvido o Planejamento Fatorial Fracionado j^{k-p} , onde o p representa a fração do planejamento fatorial completo usado. Ou seja, nesse planejamento algumas interações entre os fatores são negligenciadas^{54,55}.

Neste trabalho foi utilizado um Planejamento Fatorial Completo 2^4 para obter as melhores energias eletrônicas, desvio médio quadrático (RMSD, do inglês *Root Mean Square Deviation*)⁵⁶ e tempo de cálculo da estrutura do fentanil, de modo a economizar tempo e esforço computacional na simulação dos espectros infravermelho do fentanil e seus análogos.

Planejamento Fatorial Completo 2^4

Como dito anteriormente, o Planejamento Fatorial Completo 2^4 é um planejamento conveniente para um experimento com poucos tratamentos. Assim, sua escolha foi viável, uma vez que quatro fatores foram estudados em dois níveis cada, totalizando 16 tratamentos, uma quantidade executável de análises. Uma tabela representando os níveis dos fatores e uma matriz representando o planejamento completo podem ser vistas a seguir.

Tabela 1 - Níveis dos fatores

Fatores	Níveis	
A	+1	-1
B	+1	-1
C	+1	-1
D	+1	-1

Tabela 2 - Matriz do planejamento fatorial completo 2⁴

Trat.	Esp.	A	B	C	D	A B	A C	A D	B C	B D	C D	AB C	BC D	AC D	AB D	AB CD
1	(1)	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
2	a	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	1	-1
3	b	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1
4	ab	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
5	c	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1
6	ac	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	1
7	bc	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1
8	abc	1	1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1
9	d	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1
10	ad	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1
11	bd	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1
12	abd	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1
13	cd	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1
14	acd	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1
15	bcd	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
16	abcd	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

A segunda coluna da tabela são especificações que abreviam os níveis dos fatores. As letras a, b, c, e d indicam que os seus respectivos fatores (A, B, C e D) estão no nível +1, enquanto a ausência dessas letras indicam que os fatores estão no nível -1. Já o número (1) indica que todos os fatores estão no nível -1⁵⁵.

Interessante notar que as interações entre os fatores também são consideradas na análise. Tanto as interações entre dois fatores, quanto as interações entre três e quatro fatores. Entretanto, é comum que apenas os fatores independentes e a interação entre dois fatores sejam suficientes para descrever a variabilidade das respostas⁵³.

Dessa maneira, dois efeitos poderão estar presentes: o efeito principal e o efeito de interação. O efeito principal ocorre quando um fator atua independente dos outros fatores em uma resposta, e o efeito de interação consiste na situação em que um fator sofre influência de outro fator dependendo de seu nível. Esses efeitos podem ser positivos ou negativos, e são analisados independentemente para cada resposta estudada. Quando positivos, eles contribuem para o aumento da resposta em questão, e quando negativos, contribuem para a diminuição⁵³.

O modelo de regressão linear para um Planejamento Fatorial Completo 2⁴ permite prever os resultados por meio dos coeficientes de regressão, podendo ser representado pela equação geral^{54,55}:

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_i^k \beta_i x_i + \sum_{ij}^k \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{ijl}^k \beta_{ijl} x_i x_j x_l + \sum_{ijlm}^k \beta_{ijlm} x_i x_j x_l x_m \text{ (Eq. 24),}$$

onde \hat{y} representa a resposta predita, β representa os coeficientes de regressão dos fatores, x representa os fatores independentes codificados e suas interações (representadas por i, j, l e m) e k representa a quantidade de fatores. Assim, pode-se relacionar esse modelo de regressão com a matriz do planejamento (Tabela 2), na qual os fatores independentes (A, B, C e D) são representados pelo segundo termo da regressão, as interações entre dois fatores (AB, AC, AD, BC, BD e CD) pelo terceiro termo, as interações entre três fatores (ABC, BCD, ACD e ABD) pelo quarto termo, e a interação entre os quatro fatores (ABCD) pelo quinto termo da regressão. O primeiro termo representa o coeficiente de regressão médio^{54,55}.

Os coeficientes de regressão são obtidos pela divisão do efeito de cada fator por dois. Os efeitos, por sua vez, podem ser calculados pela diferença média das respostas. Para isso, ao calcular o efeito do fator A, por exemplo, deve-se fixar os níveis dos outros fatores e variar os níveis do fator A entre -1 e +1, como na tabela a seguir⁵³:

Tabela 3 - Cálculo da diferença média entre as respostas

Níveis dos Fatores			Níveis do Fator A		Diferença
B	C	D	-	+	
-1	-1	-1	y1	y2	y2-y1
1	-1	-1	y3	y4	y4-y3
-1	1	-1	y5	y6	y6-y5
1	1	-1	y7	y8	y8-y7
-1	-1	1	y9	y10	y10-y9
1	-1	1	y11	y12	y12-y11
-1	1	1	y13	y14	y14-y13
1	1	1	y15	y16	y16-y15
Soma das diferenças					T
Diferença média					$\frac{T}{8}$

Dividindo o valor da diferença média por dois, temos o coeficiente de regressão do fator A (β). Dessa maneira, podem-se calcular os coeficientes de regressão para todos os fatores e suas interações. O coeficiente de regressão médio (β_0), como o próprio nome

diz, é a média entre todos esses coeficientes. Definidos todos os coeficientes, pode-se utilizar da tabela ANOVA para analisar a significância de cada fator para cada resposta⁵³.

ANOVA

A ANOVA, do inglês *Analysis of Variance*, é usada para determinar a significância estatística das variáveis (fatores) em experimentos onde há mais de duas combinações de variáveis (tratamentos). Ela se baseia na comparação da variabilidade dos resultados dos tratamentos com a variabilidade do erro residual^{54,57}. Com isso, é possível avaliar a significância do modelo de regressão utilizando o teste F, que pode ser calculado pela equação⁵⁵:

$$F_0 = \frac{MS_{Tr}}{MS_E} = \frac{\frac{SS_{Tr}}{a-1}}{\frac{SS_E}{a(n-1)}} \quad (\text{Eq. 25}),$$

onde F_0 é o F calculado, MS_{Tr} é o Quadrado Médio (*Mean Square*) de cada tratamento, MS_E é o Quadrado Médio do erro, SS_{Tr} é a Soma dos Quadrados (*Sum of Squares*) de cada tratamento, SS_E é a Soma dos Quadrados do erro, e $a - 1$ e $a(n - 1)$ são os graus de liberdade do tratamento e do erro, respectivamente. a é o número de tratamentos e n é o número de observáveis⁵⁵. Ainda temos que a Soma dos Quadrados Total (SS_T) é dada pela Soma dos Quadrados mencionadas anteriormente, ou seja^{54,55}:

$$SS_T = SS_{Tr} + SS_E = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (\text{Eq. 26}),$$

onde \hat{y}_i é o valor predito para o respectivo tratamento, \bar{y} é a média da resposta observada e y_i é o valor observado da respectiva resposta.

Com o cálculo do F_0 para cada tratamento, o valor de F tabelado pode ser comparado para os graus de liberdade e intervalo de confiança em questão. Assim, para os fatores e/ou suas interações onde $F_0 > F$, temos seus valores de probabilidade p dentro do intervalo de confiança, sendo considerados como estatisticamente significativos. Tomando como exemplo o intervalo de confiança de 95%, os fatores e/ou suas interações que mostrarem o valor de p menores que 0,05 serão considerados significativos. Após essa constatação, é possível verificar quais fatores mais influenciaram em cada resultado, permitindo a otimização do experimento⁵⁴.

Diagrama de Pareto

O Diagrama de Pareto é outra forma de analisar os resultados obtidos pela regressão linear e pela ANOVA^{54,58}. Por meio do efeito de cada fator e de suas interações, mostrados anteriormente, podem-se obter seus respectivos efeitos padronizados, também chamados de $t_{\text{calculado}}$. Esse valor pode ser calculado pela seguinte equação⁵⁴:

$$t_{\text{calc}} = \frac{\theta}{ep} \quad (\text{Eq. 27}),$$

onde θ representa o efeito do fator, e ep representa o erro padrão, que pode ser calculado pela divisão do Desvio Padrão (dp) pela raiz quadrada do tamanho amostral⁵⁴. As equações estão mostradas a seguir:

$$dp = \sqrt{\frac{\sum_i^N (y - \bar{y})^2}{N}} \quad (\text{Eq. 28}),$$

$$ep = \frac{dp}{\sqrt{N}} \quad (\text{Eq. 29}),$$

nas quais N representa o tamanho amostral e i o tratamento.

Interessante notar que em experimentos sem réplicas não se pode estimar o erro padrão dessa maneira. Entretanto, para contornar essa situação, pode-se utilizar as interações entre três e quatro fatores, uma vez que elas não serão significativas para as respostas, na maioria das vezes. Assim, o erro padrão pode ser obtido utilizando as interações de ordem mais alta por meio da seguinte equação⁵⁹:

$$ep = \sqrt{\frac{(\sum \text{interações de ordem maior})^2}{N}} \quad (\text{Eq. 30})$$

Dessa maneira, quando o $t_{\text{calculado}}$ for obtido (Eq. 27), ele pode ser comparado com o t_{tabelado} para o grau de liberdade e intervalo de confiança do experimento. Quando o $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}$, temos esse fator como estatisticamente significativo. Isso significa também, que em um intervalo de confiança de 95%, esses fatores apresentarão o valor de probabilidade p maior que 5%^{54,59}.

Quimiometria

A quimiometria pode ser entendida como a área da quimioinformática que utiliza métodos estatísticos e matemáticos para se extrair informações relevantes de dados químicos. Hoje em dia, sua maior aplicação está na análise de dados multivariados, uma vez que os métodos analíticos mais modernos são capazes de analisar diversas variáveis em um único analito, gerando uma grande quantidade de dados digitalizados⁵³.

Utilizando a quimiometria, por exemplo, é possível comparar todas as respostas das variáveis de um analito de maneira simultânea, de modo a discriminar e/ou classificar esse analito dentro de um ou vários grupos. A discriminação pode ser vista como a participação ou não desse analito em um grupo específico, e a classificação pode ser vista como a divisão de diversos analitos em grupos com propriedades semelhantes⁵³.

Para analitos em que apenas duas variáveis são analisadas, um gráfico pode ser utilizado para representar essas informações, sendo que as coordenadas do gráfico são caracterizadas pelos valores medidos por cada variável. Quando três variáveis são analisadas, uma representação gráfica em três dimensões ainda pode ser utilizada para visualizar as informações. Entretanto, com quatro ou mais variáveis, uma representação gráfica não é mais possível, sendo necessário a utilização de álgebra matricial e ferramentas quimiométricas para a determinação de padrões e relações entre os dados gerados⁶⁰.

As ferramentas quimiométricas podem ser divididas em não-supervisionadas (exploratórias) e supervisionadas (classificatórias). Os métodos não-supervisionados têm como objetivo revelar as relações entre os dados sem nenhuma informação prévia, de modo a determinar quais amostras pertencem a quais grupos. Já os métodos supervisionados têm como objetivo melhorar a classificação dos grupos por meio do fornecimento de alguma informação prévia. Neste trabalho, dois métodos não-supervisionado (HCA e PCA) e um supervisionado (SIMCA) foram utilizados⁶⁰.

HCA

A HCA, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*, é um método de separação em grupos por hierarquia. Ele consiste na divisão de um grupo de amostras em classes (*clusters*), onde as amostras similares pertencerão ao mesmo agrupamento. Por ser um método hierárquico, uma vez que uma amostra é designada a uma *cluster*, o processo não

pode ser revertido. Além disso, suas amostras são organizadas na forma de um dendograma, possibilitando observar a relação entre as amostras de acordo com suas distâncias euclidianas. Quanto mais próximas as distâncias, maior a similaridade entre as amostras⁵³.

As distâncias euclidianas (d) podem ser definidas pela seguinte equação:

$$d = \sqrt{(x_1 - y_1)^2 + (x_2 - y_2)^2 + \dots + (x_n - y_n)^2} \quad (\text{Eq. 31}),$$

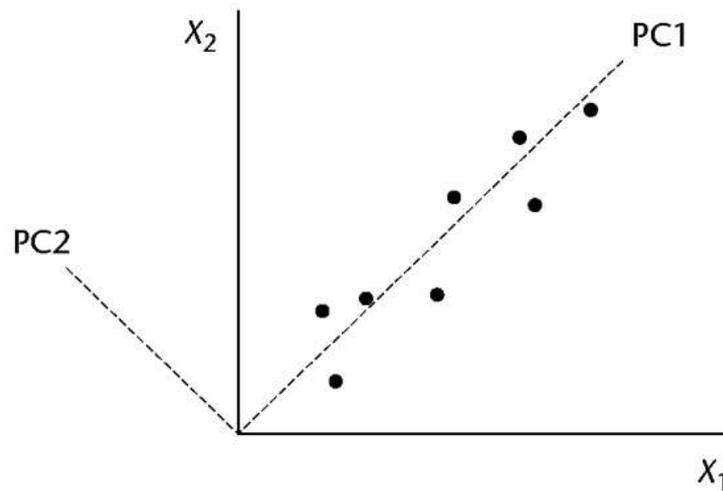
onde x_n e y_n representam as respostas das amostras x e y para a variável n .

O processo utilizado para a determinação dos agrupamentos por hierarquia é denominado de método aglomerativo. Esse método assume que cada amostra inicial forma o seu próprio cluster, e assim, a distância entre esses clusters é calculada e comparada. Dessa forma, os agrupamentos que estão mais próximos são unidos. À medida que os *clusters* vão se formando, suas distâncias vão sendo calculadas e comparadas para novas combinações. Esse processo se repete até que todos os agrupamentos componham um grupo principal, terminando a análise e gerando um dendograma⁵³.

PCA

A PCA, do inglês *Principal Component Analysis*, é o método quimiométrico mais utilizado para relacionar dados multivariados. O princípio da PCA é reduzir as dimensões do sistema formando assim, um novo sistema de coordenadas por meio de variáveis latentes. Essas variáveis são chamadas de Componentes Principais (PC, do inglês *Principal Components*) e preservam a correlação entre os dados. As componentes principais são dispostas de maneira ortogonal entre si, como pode ser visto na Figura 5, eliminando assim, as informações redundantes. Essa redução de dimensão permite que os dados multivariados sejam visualizados na forma de um gráfico de dispersão de duas ou três dimensões, separados pelas informações mais relevantes contidas nos dados^{53,60}.

Figura 5 - Ortogonalidade entre duas Componentes Principais para duas variáveis



Fonte: Modificado de Miller et al (2010)

As componentes principais podem ser definidas como combinações lineares das variáveis originais que descrevem cada amostra. A primeira componente principal (PC1) descreve a maior variação entre os dados, a segunda componente principal (PC2) descreve a segunda maior variação entre os dados, e assim por diante. Dessa maneira, uma correlação significativa entre os dados é possível utilizando um número muito menor de componentes principais do que o número de variáveis originais^{53,60}.

Dois vetores podem ser utilizados para descrever as componentes principais: i. o vetor *loading*, representado por p , é uma normalização das variáveis que indica a influência de cada variável para a correlação dos dados; ii. o vetor *score*, representado por t , é uma combinação linear dos *loadings* e dos valores das variáveis, podendo ser definido pela equação^{53,60}:

$$t_{i1} = x_{i1} p_1 + \dots + x_{im} p_m \quad (\text{Eq. 32}),$$

onde i representa cada amostra e m representa o número de variáveis. Assim, de maneira geral, os *scores* da primeira componente principal (PC1) podem ser obtidos pela seguinte equação^{53,60}:

$$t_1 = X p_1 \quad (\text{Eq. 33}),$$

onde X representa a matriz contendo os valores das m variáveis das i amostras^{53,60}.

SIMCA

O método de classificação SIMCA, do inglês *Soft Independent Modeling of Class Analogy*, é um método de modelagem flexível capaz de prever se uma amostra pertence a uma ou mais classes, ou se não pertence a nenhuma das classes definidas anteriormente. A ideia do SIMCA é descrever a estrutura dos dados multivariados para cada classe por meio de uma hipersuperfície utilizando PCA. Entretanto, nesse caso, a PCA é aplicada separadamente para cada classe e não de maneira geral. Além disso, as componentes principais (PCs) são selecionadas individualmente para um melhor agrupamento em classes. Por ser um método supervisionado, as classes já foram definidas antes da análise⁶⁰.

Docking

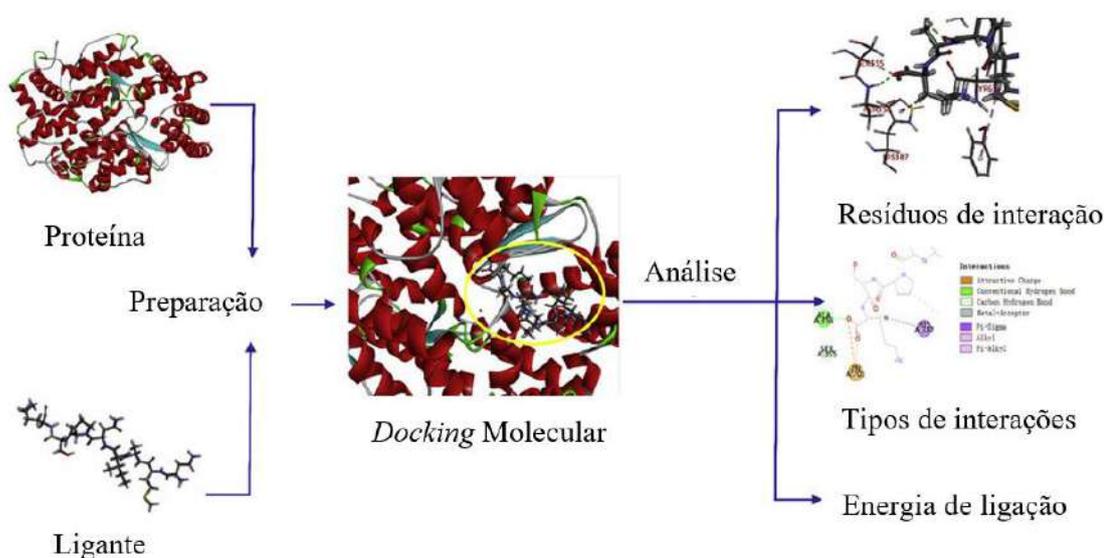
O *Docking* molecular, também conhecido como Ancoragem molecular, é um método computacional utilizado para prever a interação entre duas moléculas. Esse método permite modelar interações entre um ligante e uma proteína em nível atômico, possibilitando a caracterização do comportamento do ligante em questão com o sítio ativo da proteína alvo. Com isso, o processo bioquímico envolvido nessa interação pode ser elucidado^{61,62}.

Os primeiros métodos de ancoragem se baseavam no modelo “chave-fechadura”. Nesse modelo, o ligante se encaixava em seu receptor como uma chave se encaixava em sua fechadura, ou seja, sem sofrer alterações em suas estruturas. Assim, tanto os ligantes como as proteínas eram tratados como corpos rígidos. Esse processo ficou conhecido como *docking* rígido. Em seguida, foi desenvolvido o modelo de ajuste induzido, no qual o sítio ativo da proteína sofre contínuas remodelagens devido a suas interações com o ligante. Nesse caso, tanto o ligante como a proteína são considerados flexíveis, recebendo o nome de *docking* flexível⁶¹.

A essa altura fica evidente que o *docking* flexível traz interações mais precisas que o *docking* rígido. Entretanto, devido ao alto grau de flexibilidade dos receptores, e o grande esforço computacional relacionado a isso, o método mais popular utilizado na ancoragem molecular é tratando o ligante como flexível e o receptor como rígido⁶¹.

De maneira geral, podem-se destacar quatro principais passos envolvidos na ancoragem molecular^{62,63}: i. Preparação da proteína: a estrutura tridimensional digitalizada da proteína é obtida por métodos cristalográficos, e são disponibilizadas para *download* em banco de dados específicos, como o *Protein Data Bank* (PDB)⁶⁴. Essa proteína ainda deve ser preparada por meio da remoção de moléculas de água, remoção das moléculas dos ligantes e da estabilização das cargas; ii. Predição do sítio ativo: geralmente as proteínas possuem mais de um sítio ativo. Por isso, deve-se saber qual o sítio ativo específico responsável pela interação com o ligante em questão; iii. Preparação do ligante: o ligante pode ser encontrado em diversos banco de dados de estruturas cristalográficas. Quando não disponível, ele pode ser obtido por otimização estrutural utilizando ferramentas de mecânica molecular e mecânica quântica. Entretanto, deve-se considerar o estado de ionização no qual se encontrará no organismo antes do início da ancoragem. Isso pode ser obtido por meio do pKa do ligante e do pH fisiológico; iv. Ancoragem propriamente dita: o ligante é ancorado com a proteína e suas interações são analisadas. Dois processos estão presentes nesta etapa. O primeiro é a predição da conformação do ligante, assim como sua posição e orientação dentro do sítio ativo. Ou seja, encontrar as melhores poses para os ligantes dentro do sítio ativo da proteína. Esse processo é realizado por meio de algoritmos de busca (ou de amostragem), sendo que diferentes softwares utilizam diferentes tipos de algoritmos. O segundo processo é o ranqueamento dessas poses de acordo com a afinidade da ligação proteína-ligante. Dessa maneira, determina-se qual pose representa a melhor interação do ligante com a proteína. Esse ranqueamento é realizado por meio de funções de pontuação, que assim como os algoritmos de busca, variam entre os softwares⁶³. A Figura 6 mostra os passos gerais envolvidos na ancoragem molecular, assim como os resultados possíveis de serem analisados: Resíduos de interação; Tipos de interações; e Energia de ligação⁶².

Figura 6 - Procedimentos gerais da ancoragem molecular



Fonte: Modificado de Tu et al (2018)

Algoritmos

Devido aos altos graus de liberdade conformacional, translacional e rotacional tanto do ligante quanto da proteína, uma quantidade enorme de poses de ligação entre as duas moléculas é possível. Gerar todas essas conformações em uma única ancoragem molecular seria inviável uma vez que o gasto computacional seria excessivo. Para contornar esse problema, diversos algoritmos foram desenvolvidos para gerar as melhores conformações exigindo um esforço computacional aceitável. Esses algoritmos recebem o nome de algoritmos de busca ou de amostragem^{61,65}.

Além dos algoritmos de busca, também são utilizadas funções de pontuação. Essas funções têm o objetivo de determinar quais poses geradas estão corretas ou incorretas, e/ou aptas ou inaptas de seguirem com suas modificações conformacionais. Além disso, essas funções têm o papel de estimar a afinidade da ligação entre o ligante e a proteína dentro de um tempo computacional aceitável^{61,65}.

Um dos algoritmos de busca mais utilizados é o Algoritmo Genético (GA, do inglês *Genetic Algorithm*), que é um método estocástico baseado na teoria da evolução de Darwin⁶⁵. Nele, os graus de liberdade de um ligante estão codificados na forma de uma cadeia binária chamada de gene. Como em um organismo vivo, esses genes formam os cromossomos, que por sua vez, representam as poses do ligante. Essas poses são geradas

por dois operadores genéticos: mutação e *crossover*. As mutações realizam trocas aleatórias nos genes e o *crossover* realiza trocas dos genes entre dois cromossomos. Assim, quando essas modificações são realizadas, novas conformações de ligantes são geradas. Essas conformações são avaliadas, e as que forem selecionadas são utilizadas para geração de novas estruturas⁶⁵. Os softwares utilizados neste trabalho, iGemdock⁶⁶, GOLD⁶⁷ (do inglês *Genetic Optimization for Ligand Docking*) e PyRx⁶⁸ empregam o Algoritmo Genético.

Como função de pontuação, o software iGemdock⁶⁶ utiliza um método empírico denominado de função de pontuação farmacológica⁶⁶. Essa função envolve a utilização de valores experimentais de um conjunto de estruturas teste por meio de uma regressão linear. Para isso, essa função inclui as interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre o ligante e a proteína⁶⁶. Em relação ao software GOLD⁶⁷, dentre as diferentes funções de pontuação disponibilizadas, foi utilizada a ChemPLP⁶⁹. Essa função empírica considera a complementaridade estérica entre a proteína e o ligante, além das distâncias e ângulos das interações mostradas anteriormente somadas à interação metálica e flexibilidade do ligante⁶⁹. Essa função foi escolhida por ser mais rápida e efetiva na predição das poses dos ligantes.

O software PyRx⁶⁸, por sua vez, utiliza o AutodockVina⁷⁰ como ferramenta de busca conformacional^{61,70}. Para o desenvolvimento dessa ferramenta, uma otimização de diversos métodos estocásticos, incluindo o Algoritmo Genético, otimização por enxame de partículas, recozimento simulado e otimização local foram utilizados⁷⁰. Dentre esses métodos, destaca-se o algoritmo de busca local iterada (ILS, do inglês *Iterated Local Search*). Esse algoritmo consiste em uma sucessão de etapas onde ocorrem modificações aleatórias seguidas de otimizações locais, sendo que cada etapa deve ser aprovada por um critério para sua continuação. Essa aprovação é realizada por meio de uma função de pontuação derivada de métodos de potencial conhecido e de métodos empíricos. Assim, ela consegue extrair informações experimentais da conformação entre o receptor e o ligante, além da afinidade experimental entre eles⁷⁰.

A função de pontuação ainda é avaliada pelo método de Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS)^{70,71}. Nele, não é utilizado apenas um valor da função de pontuação, mas sim o gradiente dessa função. Em outras palavras, a derivada da função de pontuação em relação à orientação, posição e torção do ligante é calculada. Dessa maneira, tomando a pontuação como a energia de ligação, o valor obtido será a força total atuando sobre o ligante. Mesmo que a obtenção desse gradiente seja mais demorada do

que a obtenção do valor da função, o processo de ancoragem molecular é agilizado uma vez que a utilização do gradiente acelera significativamente a otimização do ligante⁷¹.

Interações

As interações que possibilitam a ligação de um ligante com uma proteína são chamadas de interações não-covalentes. Elas diferem das ligações covalentes por não compartilharem elétrons entre átomos ou moléculas. Além disso, muitas vezes elas são chamadas de interação e não de ligação, uma vez que a energia liberada em uma interação não-covalente é muito baixa em comparação a uma ligação covalente. Embora essas interações sejam fracas, múltiplas interações não-covalentes podem proporcionar associações estáveis entre moléculas, sendo responsáveis pela dinâmica de diversos processos biológicos. Em um processo de ancoragem molecular, essas interações estão presentes em quatro classificações, sendo elas as interações eletrostáticas, efeito π , forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas^{72,73}.

As interações eletrostáticas estão presentes na forma de interações iônicas e ligações de hidrogênio. As interações iônicas são formadas entre moléculas que contenham átomos com cargas opostas, cuja diferença de carga resulta na atração do íon positivo (cátion) pelo íon negativo (ânion). Já as ligações de hidrogênio envolvem a atração dipolo-dipolo entre o átomo de hidrogênio parcialmente positivo com outro átomo de eletronegatividade elevada, como flúor, oxigênio e nitrogênio⁷².

O efeito π está associado com as interações de moléculas que apresentam ligações π entre seus átomos, como os aromáticos e os alcenos, por exemplo. Essas regiões com o sistema π possibilitam que as moléculas se envolvam em diversos fenômenos moleculares como as interações π -cátion, π - π e π -polar. A interação π -cátion consiste na atração de um cátion pelos elétrons de um sistema π de uma molécula. A interação π - π está associada ao empilhamento entre dois orbitais π por meio de interações dispersivas entre eles. A interação π -polar envolve a atração de moléculas polares (dipolos permanentes) por moléculas com momento quadrupolo provocados por elétrons π ⁷³.

As forças de Van der Waals são interações eletrostáticas entre moléculas que envolvem dipolos permanentes e dipolos induzidos. Elas são divididas em três interações, sendo dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido e dipolo induzido-dipolo induzido. A interação dipolo-dipolo, também conhecida por força de Keesom, é caracterizada pela atração entre dipolos permanentes de alta e baixa densidade eletrônica. A interação

dipolo-dipolo induzido, também conhecida por força de Debye, consiste na aproximação de uma molécula polar de dipolo permanente com uma molécula apolar, sendo que essa aproximação resulta na polarização dos elétrons da molécula apolar, induzindo-a a um momento de dipolo. A interação dipolo induzido-dipolo induzido, também conhecida por força de dispersão de London, estão presentes em todas as moléculas, polares ou não. Elas ocorrem devido a repulsão eletrônica temporária entre moléculas vizinhas, uma vez que a densidade eletrônica nessas moléculas pode estar momentaneamente distribuída assimetricamente, gerando dipolos parcialmente positivos e negativos entre elas^{72,73}.

As interações hidrofóbicas ocorrem em moléculas apolares quando se encontram em soluções aquosas. Nessa situação, as regiões apolares das moléculas se agregam para minimizar a área de superfície exposta às moléculas polares da água^{72,73}.

Farmacologia

O fentanil começou a ser utilizado como anestésico substituindo a morfina, um opiáceo (extraído diretamente da papoula, *Papaver somniferum*)^{2,5}. As principais vantagens que levaram a essa substituição foi o fato do fentanil ter uma ação mais rápida e menos duradoura quando comparado à morfina, além de ser mais potente e mais barato de se adquirir⁵. O fentanil é aproximadamente 100 vezes mais potente que a morfina³. Entretanto, esse fato não é explicado pela afinidade das moléculas com o receptor opioide, uma vez que ambos apresentam afinidade de ligação similares, mas sim pela diferença de lipofilicidade entre eles⁷⁴. O fato do fentanil ser mais lipofílico contribui para que ele ultrapasse a barreira hematoencefálica com maior facilidade, aumentando sua potência e acelerando o início da ação, e acelera sua distribuição para o sangue e tecidos, diminuindo o tempo de duração da ação^{5,7,74}. Além disso, essa propriedade possibilitou o desenvolvimento de novas rotas de administração por meio de formulações não injetáveis⁷⁴.

O uso farmacêutico do fentanil e de seus análogos varia de acordo com o tratamento e com o medicamento administrado⁷⁴. Para o tratamento de dores agudas, o fentanil propriamente dito não é administrado por rota entérica, mas sim por rota transmucosa por meio da via sublingual, bucal ou nasal, na forma de pastilha ou spray^{74,75}. Para o tratamento de dores crônicas, o fentanil é administrado por meio de adesivo transdérmico. Para o uso anestésico em cirurgias, o fentanil, alfentanil, remifentanil e sufentanil, os únicos análogos aprovados para uso farmacêutico humano, são

administrados pelas vias intramuscular, intratecal ou intravenosa⁷⁵. O carfentanil, análogo aprovado como anestésico para uso veterinário em animais de grande porte, também é administrado pelas vias intramuscular, intratecal ou intravenosa^{19,75}.

As mortes por overdose de opioides são causadas principalmente pela depressão respiratória^{1,2,5,7}. A ação do fentanil e seus análogos nos receptores opioides reduzem a resposta para a concentração elevada de CO₂ e para a concentração reduzida de O₂, diminuindo, assim, a capacidade respiratória e causando períodos de apneia⁷. Pode ocorrer também o enrijecimento de músculos, como o intercostal e o diafragma, dificultando ainda mais a respiração⁷. Além disso, diversas complicações como o edema pulmonar e cerebral, hipotermia e insuficiência renal podem contribuir para a overdose fatal^{5,8}.

A dose letal suficiente para matar 50% da população testada (LD₅₀) do fentanil não é conhecida para humanos, mas em testes com ratos e com macacos essa dose é, respectivamente, 3,1 mg kg⁻¹ e 0,03 mg kg⁻¹⁷⁶. A dose efetiva para tratar 50% da população testada (ED₅₀) do fentanil é 0,062 mg kg⁻¹, enquanto que a dose da morfina é 13,9 mg kg⁻¹⁷⁵. Cabe citar que alguns análogos do fentanil apresentam ED₅₀ maiores, como o remifentanil (0,73 mg kg⁻¹) e acriloilfentanil (0,082 mg kg⁻¹), e alguns análogos apresentam ED₅₀ menores, como o carfentanil (0,00032 mg kg⁻¹) e o alfa-metilfentanil (0,0058 mg kg⁻¹)⁷⁵. Esses valores são baseados em testes com animais, sendo apenas para mostrar a potência dos análogos do fentanil em relação à morfina, e que há diferenças significativas entre os próprios análogos, uma vez que eles diferenciam em lipofilicidade e nas interações com o receptor.

Observando os casos de overdoses fatais envolvendo essas drogas, fica difícil estipular uma concentração média responsável pela overdose para cada análogo. Diversos fatores influenciam nesses casos como, por exemplo, a mistura com outras drogas, vias de administração, faixa etária e sexo dos usuários. Em overdoses fatais envolvendo o fentanil propriamente dito, as concentrações variam entre 3 e 28 ng mL⁻¹ na corrente sanguínea. Outros análogos responsáveis por overdoses fatais mostram as seguintes concentrações: alfa-metilfentanil (2 – 11 ng mL⁻¹); cis-3-metilfentanil (0,06 – 2,59 ng mL⁻¹); trans-3-metilfentanil (0,19 – 1,91 ng mL⁻¹); acetilfentanil (310 – 600 ng mL⁻¹); butirfentanil (3,7 – 99 ng mL⁻¹); carfentanil (0,010 – 2 ng mL⁻¹), entre outros^{8,75}.

Uma maneira efetiva de reverter um quadro de overdose é pela administração de compostos antagonistas do receptor opioide. Os antagonistas mais indicados são a naloxona e naltrexona para o uso humano, e a diprenorfina para o uso veterinário^{1,5,7,8}.

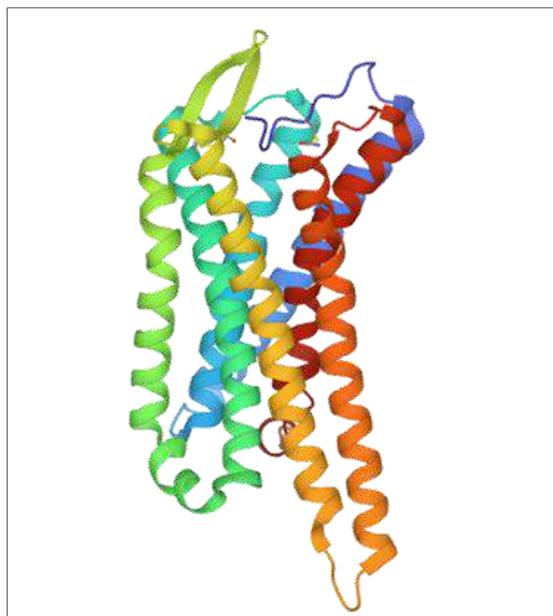
Esses compostos devem ser administrados em casos de suspeita de overdose causada por opioides mesmo que não se saiba a rota de ingestão da droga^{5,8}. Depois da administração, as respostas são perceptíveis aproximadamente em dois minutos, quando por via intravenosa, e em dez minutos por outras vias⁵.

Mecanismo de ação

O fentanil e seus análogos seletivamente se ligam e ativam os receptores opioides do sistema nervoso central, mimetizando os efeitos dos opioides endógenos, como a endorfina por exemplo^{75,77}. Os receptores opioides são pertencentes à classe de receptores acoplados à proteína G (GPCR, do inglês *G Protein Coupled Receptor*)⁴, que são responsáveis pela mediação das respostas do corpo humano para a maioria dos hormônios, neurotransmissores, drogas, além de estarem envolvidos na percepção sensorial da visão, paladar e olfato⁷⁸. Dos cinco tipos de receptores opioides, os três mais conhecidos e estudados são os receptores mu(μ)-opioides (MOR), delta(δ)-opioides (DOR) e kappa(κ)-opioides (KOR)⁷⁸, sendo que o fentanil apresenta maior afinidade pelo MOR⁷⁴.

Esses receptores são compostos por uma única cadeia polipeptídica que formam sete transmembranas helicoidais, chamadas de TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6 e TM7. Todas as hélices se agrupam, como mostrado na Figura 7, formando uma cavidade interior hidrofílica propícia para a ligação das moléculas, e uma região externa hidrofóbica⁷⁹. Dentre as transmembranas do receptor μ -opioide, podem-se citar TM3, TM5, TM6 e TM7 como as que mais participam das interações receptor-ligante, uma vez que são compostas por aminoácidos cruciais responsáveis pela estabilização do complexo. São eles: Asp147, Tyr148, Val143, Ile144 e Met151 (TM3); Val236 (TM5); His297, Val300, Trp293 e Ile296 (TM6); Trp318, Ile322 e Tyr326 (TM7)⁷⁹⁻⁸¹.

Figura 7 - Receptor opioide: TM1 – TM7



Fonte: Modificado de Huang et al (2015)

A ativação do receptor opioide pelo fentanil ou seu análogo, estimula a conversão da guanosina trifosfato (GTP) em guanosina difosfato (GDP) no complexo da proteína G. Essa conversão inibe a enzima adenilato ciclase (AC) e impede a catalisação da produção do monofosfato cíclico de adenosina (cAMP)^{4,78}. Todo esse processo inibe o fluxo de Ca^{2+} , bloqueando a secreção dos neurotransmissores, e aumenta o fluxo de K^{+} , hiperpolarizando o neurônio. Dessa maneira, o fentanil atua tanto na inibição como na excitação da junção pré-sináptica e pós-sináptica do neurônio, respectivamente⁷⁸.

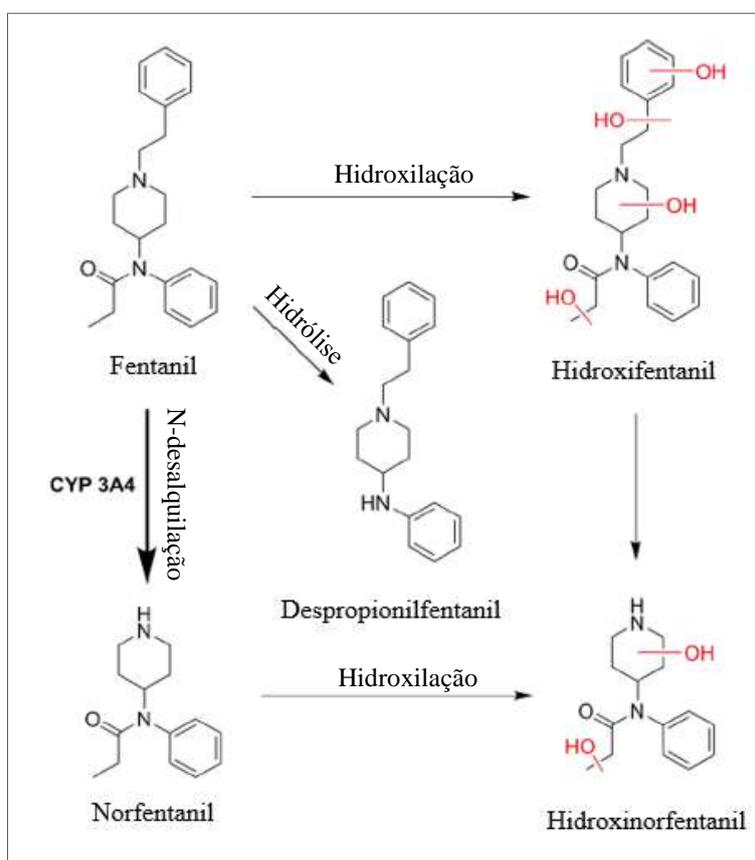
Os receptores mu-opioides são responsáveis pelas propriedades analgésicas e pelos efeitos de euforia, dependência, constrição das pupilas, constipação, miose e depressão respiratória^{75,78}. Os receptores delta-opioides além de contribuírem para a analgesia, também são responsáveis pela sedação, depressão, constipação e falta de coordenação motora^{75,78}. Os receptores kappa-opioides, por sua vez, também provocam analgesia, além de diurese, disforia, deficiência cognitiva, alteração no humor e no controle da temperatura do corpo^{75,78}. Ainda em relação aos receptores kappa-opioides, eles podem causar efeitos alucinatórios ou dissociativos quando ativados significativamente por um opioide⁷⁵.

Metabolismo

A maioria dos análogos do fentanil não tem seus metabólitos identificados, entretanto, muitos análogos têm seus metabólitos postulados na literatura científica. Mesmo que esses metabólitos sejam preditos, e não confirmados em um estudo de caso autêntico, quando utilizando rotas metabólicas já conhecidas é possível obter informações que poderão ser úteis em estudos toxicológicos⁷⁵.

O fentanil é metabolizado no fígado pelo citocromo P450, mais precisamente pela sua isoforma CYP3A4. Seu principal metabólito é o norfentanil, uma molécula inativa ao organismo humano, por meio de uma N-desalquilação. Em menor concentração é formado o despropionilfentanil por hidrólise do grupo amida, e o hidroxifentanil por hidroxilação principalmente do grupo alquila^{9,75,82}. Além disso, o próprio norfentanil pode sofrer hidroxilação e o hidroxifentanil pode sofrer N-desalquilação⁹. A rota metabólica está ilustrada na Figura 8.

Figura 8 - Rota de metabolização do fentanil



Fonte: Modificado de Burns et al (2018)

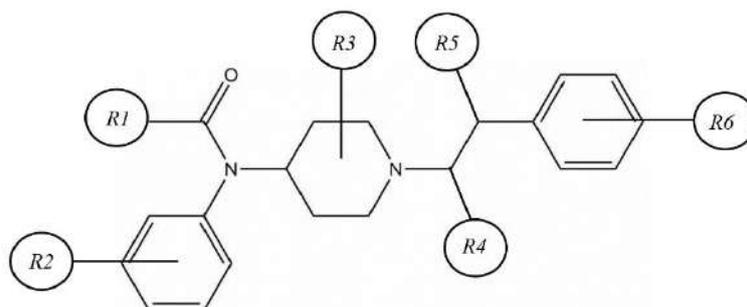
De maneira geral, pode-se dizer que os análogos do fentanil também são metabolizados na fase I por essas reações de hidrólise, hidroxilação dos grupos alquila e arila e N-desalquilação, além da O-desalquilação, metilação e oxidação, dependendo das modificações sofridas pela estrutura básica do fentanil^{75,82}. As reações metabólicas da fase II consistem na formação conjugada de sulfato ou de glicuronídeo⁸².

V – Sistema de estudo

A Figura 9 mostra a estrutura básica dos análogos do fentanil^{6,12}. A molécula do fentanil tem no total seis regiões de substituição que dão origem aos seus análogos^{6,12,79,81}. As regiões de substituição R1 e R2 estão localizadas nos grupos carbonila e fenil da porção N-fenilpropanamida, respectivamente. A região de substituição R3 está localizada no anel piperidina, enquanto as regiões R4, R5 e R6 estão localizadas nos carbonos alfa, beta e no grupo fenil da porção N-feniletil, respectivamente.

Os NPFs são sintetizados principalmente por meio de uma modificação ou substituição na cadeia propionil (R1) ou pela substituição da porção N-feniletil (R4, R5 e R6) da molécula do fentanil^{8,12}. A cadeia propionil geralmente é alongada por uma cadeia carbônica alifática ou aromática, ou ainda por meio da ligação de um grupo metóxi, furano ou tiofeno. Já na porção N-feniletil, podem ser adicionados grupos metilas e hidróxidos, assim como o átomo de enxofre. Além dessas modificações, podem ser adicionados halogênios, flúor e cloro principalmente, e grupos metóxi ou metila no anel N-fenil (R2)⁸. O anel piperidina (R3) também pode ser modificado com a adição dos grupos metila e éster¹².

Figura 9 - Regiões de substituição dos análogos do fentanil



A Tabela 4 mostra todos os substituintes de cada região de substituição para cada análogo do fentanil e seus números de identificação. A estrutura completa de todos os compostos se encontra no Material Suplementar.

Tabela 4 - Substituintes de cada região de substituição

#	Estrutura	R1	R2	R3	R4	R5	R6
1	Fentanil	-C ₂ H ₅	-H	-H	-H	-H	-H
2	Heptanoilfentanil	-C ₆ H ₁₃	-H	-H	-H	-H	-H
3	Ocfentanil	-C ₂ H ₄ OCH ₃	-F	-H	-H	-H	-H
4	Alfentanil	-C ₂ H ₅	-H	-CH ₂ OCH ₃	-H	-H	-CON ₄ CH ₂ CH ₃
5	Hexanoilfentanil	-C ₅ H ₁₁	-H	-H	-H	-H	-H
6	m-Fluoroisobutirfentanil	-C ₃ H ₇	-F	-H	-H	-H	-H
7	o-Fluoroisobutirfentanil	-C ₃ H ₇	-F	-H	-H	-H	-H
8	p-Cloroisobutirfentanil	-C ₃ H ₇	-Cl	-H	-H	-H	-H
9	p-Fluoroacetilfentanil	-CH ₃	-F	-H	-H	-H	-H
10	Valerilfentanil	-C ₄ H ₉	-H	-H	-H	-H	-H
11	Carfentanil	-C ₂ H ₅	-H	-COOCH ₃	-H	-H	-H
12	Acriloilfentanil	-C ₂ H ₃	-H	-H	-H	-H	-H
13	Furanilfentanil	-C ₄ OH ₃	-H	-H	-H	-H	-H
14	Acetilfentanil	-CH ₃	-H	-H	-H	-H	-H
15	Butirfentanil	-C ₃ H ₇	-H	-H	-H	-H	-H
16	p-Fluoroisobutirfentanil	-C ₃ H ₇	-F	-H	-H	-H	-H
17	p-Fluorobutirfentanil	-C ₃ H ₇	-F	-H	-H	-H	-H
18	2-Tiofenoilfentanil	-C ₄ SH ₃	-H	-H	-H	-H	-H
19	3-Furanilfentanil	-C ₄ OH ₃	-H	-H	-H	-H	-H
20	Benzoilbenzilfentanil	-C ₆ H ₅	-H	-H	-H	-	-H
21	4-Metoxibutirfentanil	-C ₃ H ₇	-CH ₂ OCH ₃	-H	-H	-H	-H
22	Metoxiacetilfentanil	-CH ₂ OCH ₃	-H	-H	-H	-H	-H
23	o-Fluorofentanil	-C ₂ H ₅	-F	-H	-H	-H	-H
24	m-Fluorobutirfentanil	-C ₃ H ₇	-F	-H	-H	-H	-H
25	Crotonilfentanil	-CHCHCH ₃	-H	-H	-H	-H	-H
26	Ciclopentanoilfentanil	-C ₅ H ₉	-H	-H	-H	-H	-H
27	Benzoilfentanil	-C ₆ H ₅	-H	-H	-H	-H	-H
28	Isobutirfentanil	-C ₃ H ₇	-H	-H	-H	-H	-H
29	Ciclopropilfentanil	-C ₃ H ₅	-H	-H	-H	-H	-H
30	o-Fluorobutirfentanil	-C ₃ H ₇	-F	-H	-H	-H	-H
31	4'-Metilacetilfentanil	-CH ₃	-H	-H	-H	-H	-CH ₃
32	Tetrahidrofuranilfentanil	-C ₄ OH ₇	-H	-H	-H	-H	-H
33	p-Metilacetilfentanil	-CH ₃	-CH ₃	-H	-H	-H	-H
34	Benzilfentanil	-C ₂ H ₅	-H	-H	-H	-	-H
35	2-Furanilbenzilfentanil	-C ₄ OH ₃	-H	-H	-H	-	-H
36	2R-4S-2-Metilfentanil	-C ₂ H ₅	-H	-CH ₃	-H	-H	-H
37	Acetil-alfa-R-Metilfentanil	-CH ₃	-H	-H	-CH ₃	-H	-H
38	Cis-3R-4S-3-Metilfentanil	-C ₂ H ₅	-H	-CH ₃	-H	-H	-H
39	Beta-R-Hidroxitiofentanil	-C ₂ H ₅	-H	-H	-H	-OH	-C ₄ SH ₃
40	p-Metoxifentanil	-C ₂ H ₅	-OCH ₃	-H	-H	-H	-H
41	Beta'-Fenilfentanil	-CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	-H	-H	-H	-H	-H
42	Trans-3R-4R-3-Metilfentanil	-C ₂ H ₅	-H	-CH ₃	-H	-H	-H
43	Beta-R-Hidroxfentanil	-C ₂ H ₅	-H	-H	-H	-OH	-H
44	Cis-3S-4R-3-Metilfentanil	-C ₂ H ₅	-H	-CH ₃	-H	-H	-H
45	Beta-S-Hidroxfentanil	-C ₂ H ₅	-H	-H	-H	-OH	-H
46	Trans-3S-4S-3-Metilfentanil	-C ₂ H ₅	-H	-CH ₃	-H	-H	-H

VI – Procedimentos computacionais

Parte 1. Condições de cálculo

O principal objetivo deste procedimento é a escolha das melhores condições de cálculo para as estruturas mostradas na Tabela 4.

Nós usamos a molécula do fentanil^{2,6,12} como precursor de todos os outros análogos. A estrutura mais recente depositada do fentanil^{83a} foi retirada do *The Cambridge Structural Database (CSD)*⁸⁴. O campo de força UFF (*Universal Force Field*)⁸⁵ implementado no software Avogadro v. 1.2.0⁸⁶ foi utilizado para a primeira otimização da molécula, gerando o *input* para os cálculos quânticos.

Um planejamento fatorial completo 2⁴ foi realizado utilizando o software Statistica⁸⁷ para determinar o melhor método de simulação do espectro infravermelho do fentanil e seus análogos^{88,89}. Os quatro fatores e seus dois respectivos níveis são: a) Método DFT⁹⁰: B3LYP^{48,49} e PBE⁴⁷; b) Conjunto de base: 6-311G**^{51,52} e TZVP⁵⁰; c) Nível do Campo Auto consistente (SCF): TightSCF e LooseSCF⁴⁴; e d) Nível de Otimização: TightOpt e NormalOpt⁴⁴.

Além desses parâmetros, quatro palavras chaves RIJCOSX⁹¹, D3BJ⁹², Grid5⁴⁴ e NoFinalGrid⁴⁴ foram utilizadas como parâmetros constantes em todos os cálculos. O RIJCOSX é uma aproximação das integrais de troca do método Hartree-Fock utilizado para acelerar os cálculos HF e DFT híbridos^{44,91}; D3BJ é uma correção na energia de dispersão de átomos emparelhados^{44,92}; Grid5 é o nível de aproximação das integrais, sendo que, quanto maior o nível (Grid7) maior a acurácia, e NoFinalGrid desativa a mudança do nível do Grid no último ciclo, permanecendo o Grid inicial até o final do cálculo⁴⁴.

Energia eletrônica, RMSD⁵⁶ e tempo de cálculo foram as respostas analisadas. O planejamento avalia os efeitos de cada variável de acordo com cada resposta. Os valores codificados e seus respectivos parâmetros computacionais, também chamados de valores reais, estão presentes na Tabela 5. A estrutura de *input* foi determinada por Mecânica Molecular e submetida à Mecânica Quântica para atingir o ponto estacionário. Todos os cálculos e simulações foram realizados utilizando o software Orca v.4.0.1⁹³.

^a A estrutura selecionada possui o código de referência do CSD como UGIYEP e número de deposição de 716913⁸³.

Tabela 5 - Valores codificados e reais dos fatores

Fatores	Níveis	
	+1	-1
Método DFT	PBE	B3LYP
Conjunto de base	TZVP	6-311G**
SCF	TightSCF	LooseSCF
Opt	TightOpt	NormalOpt

A energia eletrônica e o tempo de cálculo foram obtidos por meio do *output* gerado ao final do cálculo. O valor do RMSD (Desvio Médio Quadrático)⁵⁶ foi obtido por meio da sobreposição de cada estrutura otimizado com a estrutura de referência retirada do CSD, utilizando o software Visual Molecular Dynamics (VMD v. 1.9.3)⁹⁴. Esse software providencia as estruturas já com os hidrogênios adicionados. A significância e a importância das variáveis para cada resposta também foram obtidas pelo software Statistica⁸⁷ por meio da análise da tabela ANOVA (Análise de variância)⁵⁷ e do diagrama de Pareto⁵⁸.

Depois da avaliação dos efeitos para cada resposta, nós aplicamos o método mais conveniente para a otimização e simulação dos espectros de infravermelho dos 45 análogos do fentanil. Os análogos foram construídos a partir de modificações estruturais na molécula do fentanil de referência utilizando o software Avogadro v. 1.2.0⁸⁶. Todos os cálculos foram realizados pelo software Orca v.4.0.1⁹³. Os análogos estudados foram reportados em apreensões de drogas, e seus espectros experimentais de infravermelho foram obtidos por meio dos sites SWGDRUG (*Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs*)⁸⁸ e SpectraBase⁸⁹.

Parte 2. Avaliação do espectro Infravermelho

Nessa parte, nós focamos na avaliação dos dados teóricos obtidos. Para validá-los, nós fizemos uma comparação qualitativa entre os espectros simulados e os experimentais correspondentes, para observar se eles compartilham os mesmos picos e frequências. Assim, uma tabela binária foi feita onde os picos que recebem o número 1 estão presentes no espectro avaliado enquanto os picos que recebem o número 0 estão ausentes. Esses picos estão de acordo com as frequências vibracionais^{95,96} mostradas na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de referência das frequências vibracionais

Pico	Frequência (cm ⁻¹)	Ligação
1	3700-3200	Estiramento (O-H)
2	3100-3000	Estiramento (C-H) alceno sp ²
3	3000-2850	Estiramento (C-H) alceno sp ³
4	2830-2695	Estiramento (N(C-H) ₃)
5	2500-2400	Estiramento (C-H) cloridrato
6	~1745	Estiramento (-N(C=O)N-) tetrazolil
7	~1715	Estiramento (C=O) éster
8	~1680	Estiramento (C=O) amida terciária
9	~1620	Estiramento (C=C) alceno
10	~1600	Estiramento (C=C) aromático
11	~1550	Estiramento (C=C) aromático adicional
12	1470-1350	Dobramento (C-H) alceno
13	~1200/1050/650	Estiramento (Tiofeno)
14	1340-1020	Estiramento (C-N) amina
15	1400-1000	Estiramento (C-F)
16	1225-1050	Estiramento (C-O)
17	750-690	Dobramento (C-H) sp ² fora do plano

Uma avaliação dos espectros teóricos de infravermelho foi realizada utilizando o software Pirouette⁵³. A ideia é observar as similaridades entre as moléculas do grupo de estudos. A Análise de Grupos por Hierarquia, HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*)⁵³, foi primeiramente utilizada com abordagem aglomerativa e com agrupamento incremental. Ela foi utilizada para explorar a organização das estruturas, tanto dentro dos grupos como entre eles de uma maneira rápida. A Análise de Componentes Principais, PCA (*Principal Component Analysis*)⁵³, foi utilizada para reduzir as dimensões do sistema em Componentes Principais (PC, do inglês *Principal Components*), o que possibilita a análise de padrões e da relação entre as modificações estruturais com os espectros de infravermelho. Os resultados encontrados pela HCA e PCA foram submetidos a uma técnica de classificação supervisionada para verificar a confiabilidade dos agrupamentos feitos por técnicas não supervisionadas. Para isso uma técnica de modelagem flexível, a SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*) foi utilizada. Todas as análises quimiométricas foram realizadas utilizando uma matriz 46x676 feita no Microsoft Excel (2016) com dados extraídos dos *outputs* dos cálculos teóricos. As linhas representam as intensidades respectivas de um número de onda para cada análogo e as colunas representam os números de onda. Ainda, sobreposições entre os espectros de mesmo

grupo com o espectro do fentanil foram realizadas pelo software Microsoft Excel (2016), e as alterações das frequências vibracionais e de suas intensidades foram analisadas.

Parte 3. *Docking* molecular

Os arquivos de *input* para os análogos do fentanil foram criados a partir dos parâmetros determinados na etapa de seleção de método, e a otimização das estruturas também foi realizada pelo software Orca v.4.0.1⁹³. O receptor μ -opioide cristalografado (de código 5C1M ancorado com o opioide sintético BU72)⁹⁷ foi retirado do site Protein Data Bank⁶⁴. Nós realizamos o *docking* em triplicata em três diferentes softwares: iGemdock⁶⁶, PyRx⁶⁸ e GOLD⁶⁷. Os softwares PyMOL⁹⁸ e Discovery Studio⁹⁹ permitiram a visualização e a análise conformacional entre as estruturas e o receptor obtidos pelos softwares PyRx e GOLD. Uma tabela binária foi criada comparando os resultados das ancoragens entre os dois softwares, sendo que o número 1 indica a presença e o número 0 indica a ausência do respectivo aminoácido na ancoragem de cada análogo do fentanil.

O fentanil é um composto com pKa de 8.4¹⁰⁰, e o pH intracelular de um cérebro saudável é de 7.2¹⁰¹. Assim, o equilíbrio químico indica que o estado catiônico da molécula é favorecido. Por esse motivo, o software Avogadro v. 1.2.0⁸⁶ foi utilizado para protonar as estruturas no átomo de nitrogênio do anel piperidina, antes da otimização das estruturas e da realização do *docking*.

Parte 4. Estudo da rota metabólica

A estrutura SMILES (do inglês, *simplified molecular input line entry specification*) de todos os 46 compostos foi obtida por meio do software Open Babel 2.3.2¹⁰² e submetidos à simulação de seus metabólitos utilizando o software Alttox¹⁰³. Uma pesquisa bibliográfica foi realizada em busca dos metabólitos gerados pelos análogos do fentanil. As rotas metabólicas do fentanil e seus análogos obtidos pelo software Alttox foram comparadas com os dados encontrados na literatura científica obtidos de forma experimental, seja por métodos *in vitro*, com células do fígado humano ou de rato, ou *in vivo* por meio da urina e sangue humano ou de ratos. Uma tabela foi montada comparando as duas respostas e as semelhanças e diferenças foram avaliadas.

VII – Resultados e Discussões

Parte 1. Condições de cálculo

O planejamento fatorial completo 2^4 com seus 16 tratamentos e suas 3 respostas podem ser vistos na Tabela 7.

Tabela 7 - Planejamento fatorial completo 2^4 e suas respostas

Cálculo	DFT	Conj. Base	SCF	Opt	EE(Eh)	RMSD(Å)	Tempo
1	PBE	TZVP	TightSCF	TightOpt	-1039.00	0.689	7h0m
2	B3LYP	TZVP	TightSCF	TightOpt	-1039.73	0.355	10h31m
3	PBE	6-311G**	TightSCF	TightOpt	-1038.92	0.673	7h48m
4	B3LYP	6-311G**	TightSCF	TightOpt	-1039.65	0.231	12h30m
5	PBE	TZVP	LooseSCF	TightOpt	-1039.00	0.685	6h43m
6	B3LYP	TZVP	LooseSCF	TightOpt	-1039.72	0.352	10h58m
7	PBE	6-311G**	LooseSCF	TightOpt	-1038.92	0.674	4h50m
8	B3LYP	6-311G**	LooseSCF	TightOpt	-1039.65	0.228	8h19m
9	PBE	TZVP	TightSCF	NormalOpt	-1039.00	0.688	6h53m
10	B3LYP	TZVP	TightSCF	NormalOpt	-1039.73	0.352	10h0m
11	PBE	6-311G**	TightSCF	NormalOpt	-1038.92	0.674	7h37m
12	B3LYP	6-311G**	TightSCF	NormalOpt	-1039.65	0.225	11h57m
13	PBE	TZVP	LooseSCF	NormalOpt	-1039.00	0.688	6h52m
14	B3LYP	TZVP	LooseSCF	NormalOpt	-1039.73	0.353	11h37m
15	PBE	6-311G**	LooseSCF	NormalOpt	-1038.92	0.670	4h26m
16	B3LYP	6-311G**	LooseSCF	NormalOpt	-1039.65	0.222	7h45m

A significância dos fatores e suas combinações foram avaliadas pela ANOVA⁵⁷ com nível de confiança de 95% (Tabelas 8-10). Os efeitos são estatisticamente significantes quando o valor de p (valor da probabilidade) for menor que 0.05⁵⁷. Para a energia eletrônica, o método DFT (1) foi o fator mais significativo, seguido pelo conjunto de bases (2). Os outros fatores e as interações entre eles foram insignificantes. Em relação ao RMSD, o método DFT (1) foi o fator mais relevante, seguido pelo conjunto de bases (2) e a interação entre esses dois fatores (1 pelo 2), respectivamente. Para o tempo de cálculo, o método DFT (1) foi o fator mais relevante, seguido pela interação do conjunto de bases com o nível do SCF (2 pelo 3) e pelo nível do SCF (3), respectivamente.

O diagrama de Pareto⁵⁸ possibilita a análise da importância relativa de cada efeito principal e suas interações (Figuras 10-12). A energia eletrônica é diretamente proporcional ao método DFT, e indiretamente proporcional ao conjunto de bases. Em

outras palavras, a energia eletrônica cresce substancialmente quando o método DFT utilizado é representado pelo fator +1 (PBE) e decresce quando o conjunto de bases utilizado é representado pelo fator +1 (TZVP). O valor do RMSD é diretamente proporcional ao método DFT e ao conjunto de bases utilizados, enquanto é indiretamente proporcional a interação entre eles. O tempo de cálculo sofreu um grande efeito negativo do método DFT e da interação entre o conjunto de bases e o nível do SCF, enquanto sofreu um pequeno efeito positivo do nível do SCF.

Para prosseguir com a simulação dos espectros de infravermelho, o tratamento com a melhor combinação de respostas foi utilizado. Uma vez que as frequências vibracionais estão diretamente ligadas com a estrutura geométrica da molécula, o método com o menor RMSD e tempo de cálculo, e uma energia eletrônica consideravelmente baixa foi escolhido.

Tabela 8 - Resultado ANOVA para
Energia Eletrônica

Energia Eletrônica					
Fator	SQ	Gl	QM	F	p
(1)DFT	2.124306	1	2.124306	339889.0	0.000000
(2)Base	0.024806	1	0.024806	3969.0	0.000000
(3)SCF	0.000006	1	0.000006	1.0	0.363217
(4)Opt	0.000006	1	0.000006	1.0	0.363217
1 by 2	0.000006	1	0.000006	1.0	0.363217
1 by 3	0.000006	1	0.000006	1.0	0.363217
1 by 4	0.000006	1	0.000006	1.0	0.363217
2 by 3	0.000006	1	0.000006	1.0	0.363217
2 by 4	0.000006	1	0.000006	1.0	0.363217
3 by 4	0.000006	1	0.000006	1.0	0.363217
Erro	0.000031	1	0.000006		
Total SQ	2.149194	15			

*SQ: Soma dos quadrados; Gl: Grau de liberdade; QM:

Quadrado médio; F: F estatístico; p: probabilidade.

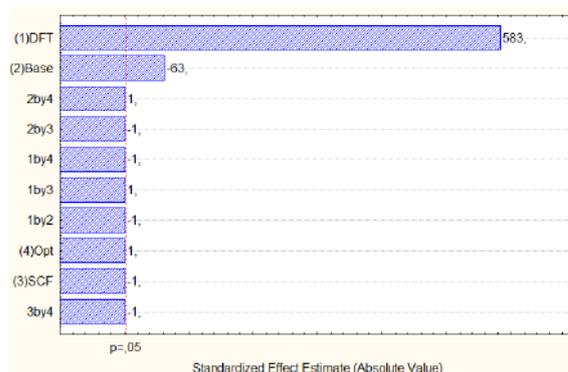


Figura 10 - Diagrama de Pareto para
Energia Eletrônica

Tabela 9 - Resultado ANOVA para
RMSD

RMSD					
Fator	SQ	GI	QM	F	p
(1)DFT	0.609571	1	0.609571	181284.9	0.000000
(2)Base	0.019952	1	0.019952	5933.6	0.000000
(3)SCF	0.000014	1	0.000014	4.2	0.096250
(4)Opt	0.000014	1	0.000014	4.2	0.096250
1 by 2	0.012488	1	0.012488	3713.9	0.000000
1 by 3	0.000000	1	0.000000	0.0	0.896875
1 by 4	0.000011	1	0.000011	3.1	0.136532
2 by 3	0.000001	1	0.000001	0.2	0.699465
2 by 4	0.000014	1	0.000014	4.2	0.096250
3 by 4	0.000001	1	0.000001	0.2	0.699465
Erro	0.000017	5	0.000003		
Total SQ	0.642081	15			

*SQ: Soma dos quadrados; GI: Grau de liberdade; QM: Quadrado médio; F: F estatístico; p: probabilidade.

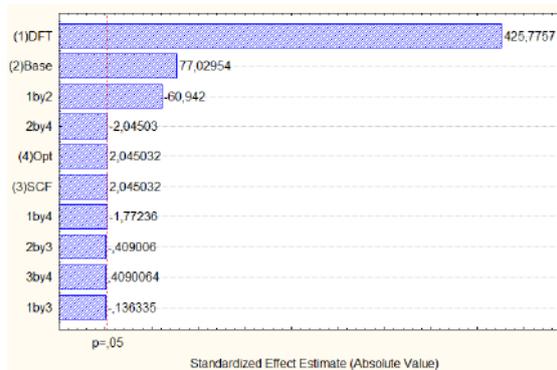


Figura 11 - Diagrama de Pareto para
RMSD

Tabela 10 - Resultado ANOVA para
Tempo de Cálculo

Tempo de Cálculo					
Fator	SQ	GI	QM	F	p
(1)DFT	223965.6	1	223965.6	186.9866	0.000038
(2)Base	6440.1	1	6440.1	5.3767	0.068157
(3)SCF	36768.1	1	36768.1	30.6973	0.002629
(4)Opt	517.6	1	517.6	0.4321	0.540007
1 by 2	10.6	1	10.6	0.0088	0.928830
1 by 3	3.1	1	3.1	0.0026	0.961630
1 by 4	39.1	1	39.1	0.0326	0.863781
2 by 3	60393.1	1	60393.1	50.4216	0.000858
2 by 4	715.6	1	715.6	0.5974	0.474500
3 by 4	280.6	1	280.6	0.2342	0.648852
Erro	5988.8	5	1197.8		
Total SQ	335121.9	15			

*SQ: Soma dos quadrados; GI: Grau de liberdade; QM: Quadrado médio; F: F estatístico; p: probabilidade.

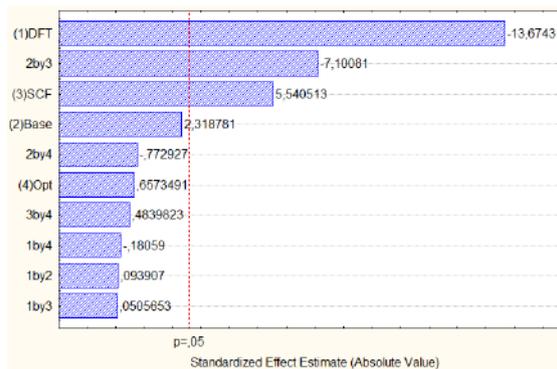


Figura 12 - Diagrama de Pareto para o
Tempo de Cálculo

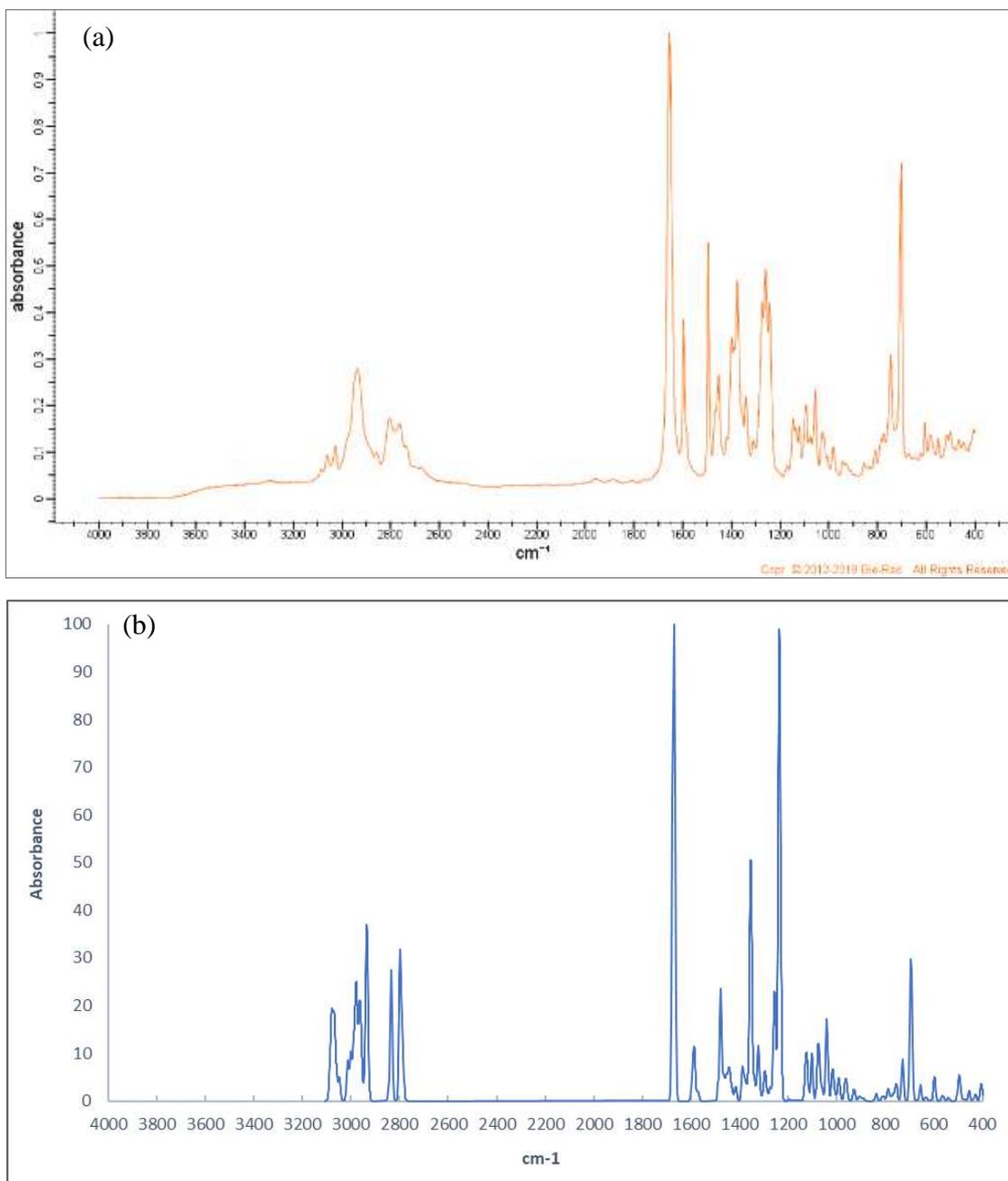
O espectro de infravermelho do fentanil e de seus 45 análogos foram simulados empregando o método DFT B3LYP^{48,49} junto com o conjunto de bases 6-311G**^{51,52}, nível do SCF como Loose e nível de otimização como Normal. Todos os cálculos foram realizados pelo software Orca v4.0.1⁹³. As moléculas foram otimizadas e suas frequências foram calculadas para verificar se as estruturas se encontravam em um estado mínimo de energia. As otimizações foram confirmadas quando nenhuma frequência imaginária (frequências negativas) foi notificada. Além disso, as frequências vibracionais foram

multiplicadas por um fator de escala para se aproximar ainda mais dos espectros experimentais. Essa correção compensa dois problemas: a aproximação do cálculo da estrutura eletrônica e o fato de que a superfície de energia potencial não é harmônica. Para o método empregado nos cálculos das frequências vibracionais, o fator de correção é de 0.967¹⁰⁴.

Parte 2. Avaliação dos espectros Infravermelho

O espectro de infravermelho experimental (ATR-IR)¹⁰⁵ e o calculado (B3LYP/6-311G**/LooseSCF/NormalOpt) do fentanil são mostrados na Figura 13. Podemos observar que eles possuem um formato semelhante. Entretanto, há alguns desvios nas frequências devido às aproximações dos cálculos. Os picos vibracionais de estiramento da ligação C-H dos aromáticos e dos alcanos se encontram em 3052 e 2948 cm⁻¹ no espectro experimental^{105,106}. No espectro calculado, eles são observados em 3067 e 2940 cm⁻¹. O pico de estiramento da carbonila C=O é localizado próximo ao pico do estiramento da ligação C=C dos aromáticos. Contudo, enquanto o primeiro é de alta intensidade, o segundo é de baixa^{105,106}. Esses picos são observados em 1650 e 1600 cm⁻¹ no espectro experimental¹⁰⁵, e 1670 e 1589 cm⁻¹ no espectro calculado, respectivamente. Os picos referentes ao dobramento da ligação C-H nos alcanos começam em 1500 cm⁻¹ no espectro experimental enquanto que no espectro calculado eles começam em 1478 cm⁻¹. O pico do estiramento C-N da amina aparece em 1250 e 1236 cm⁻¹ no espectro experimental e no calculado, respectivamente^{105,106}. Os dois principais picos que representam o dobramento C-H fora do plano dos aromáticos são observados em 750 e 700 cm⁻¹ no espectro experimental¹⁰⁵ enquanto que no espectro calculado eles são observados em 728 e 695 cm⁻¹.

Figura 13 - Espectro de infravermelho do fentanil: Bio-Rad® experimental (a) e calculado (b)



Todos os espectros teóricos e experimentais de infravermelho se encontram no Material Suplementar. A correlação entre os espectros experimentais e seus respectivos espectros calculados mostraram uma boa concordância. Todas as vibrações observadas nos espectros experimentais puderam ser vistas nos espectros calculados, mesmo que às vezes elas estavam ligeiramente deslocadas ou com diferentes intensidades. Os resultados podem ser vistos na Tabela 11.

Tabela 11 - Comparação entre os picos dos espectros Teóricos (T) e Experimentais (E).

O número “1” especifica quando o pico está presente enquanto que o número “0”

especifica quando ausente

Analog	Espectro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
2	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
3	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
4	T	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
	E	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
5	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
6	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1
7	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1
8	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1
9	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1
10	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
11	T	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
	E	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
12	T	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1
13	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1
	E	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1
14	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
15	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
16	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1
17	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1
	E	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1
18	T	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1
	E	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1
19	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1
20	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1
21	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1
22	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
23	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1
24	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1
25	T	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1
26	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1

27	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
28	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
29	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
30	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1
31	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
32	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1
	E	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1
33	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
34	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
35	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1
	E	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1
36	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
37	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
38	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
39	T	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
40	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1
41	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
42	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
43	T	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
44	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
45	T	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
46	T	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
	E	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1

Observando a Tabela 11 e os respectivos espectros teóricos e experimentais, algumas diferenças podem ser notadas. O pico 4 representa o estiramento da ligação C-H dos três carbonos ligados ao nitrogênio do anel piperidina da molécula do fentanil base, enquanto o pico 5 representa essas mesmas vibrações da molécula do fentanil em sua forma de cloridrato. Como alguns espectros experimentais só foram encontrados na forma de cloridrato, a principal diferença entre os espectros experimentais e teóricos foi em relação à presença e ausência dos picos 4 e 5, uma vez que o espectro apresenta apenas um desses dois picos.

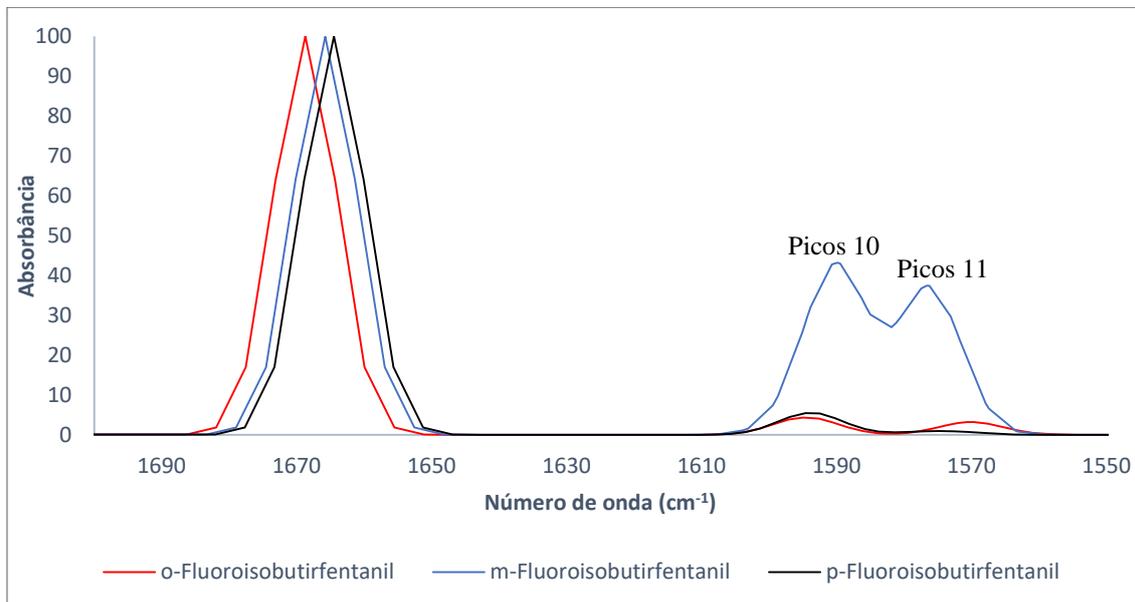
Em relação à presença de picos deslocados, pode-se citar o pico 1 referente ao estiramento do grupo hidroxila (ligação O-H) como o mais deslocado. Apesar de eles

aparecerem nos espectros teóricos do beta-R-hidroxitiofentanil e nos dois isômeros ópticos do beta-hidroxfentanil, eles estão deslocados em maiores números de onda quando comparados com seus respectivos espectros experimentais. Nos espectros experimentais esse pico aparece aproximadamente em 3300 cm^{-1} e 3220 cm^{-1} , enquanto nos espectros teóricos eles aparecem em 3980 cm^{-1} , 3516 cm^{-1} (beta-R) e 3690 cm^{-1} (beta-S), respectivamente. Além disso, os isômeros ópticos R apresentam maior intensidade nesses picos.

Analisando as intensidades dos picos, tem-se que o pico 17 referente ao dobramento fora do plano da ligação C-H de carbonos sp^2 é o que apresenta maior divergência entre os espectros teóricos e experimentais. Na maioria dos espectros experimentais, esse pico é o mais intenso ou um dos mais intensos, ficando atrás apenas dos picos 8 e/ou 14 (estiramento C=O e C-N, respectivamente), enquanto nos espectros teóricos esse pico apresenta intensidade média ou baixa na maioria das vezes. Esse comportamento pode ser visto observando os espectros do furanilfentanil, butirfentanil, ciclopropilfentanil e acetilfentanil por exemplo.

Entre as principais semelhanças, podem-se citar os picos 6, 7, 8, 9, 10 e 11, todos referentes ao estiramento de ligações duplas na faixa entre 1500 cm^{-1} e 1800 cm^{-1} . Muitas vezes os picos encontrados nessa região são os principais responsáveis por caracterizar a estrutura em questão. Como exemplo, pode-se observar o surgimento desses picos característicos nos espectros teórico e experimental do alfentanil (pico 6: estiramento C=O presente no anel tetrazolil); carfentanil (pico 7: estiramento C=O presente no grupo éster); acriloilfentanil e crotonilfentanil (pico 9: estiramento C=C alifático); furanilfentanil (pico 11: estiramento C=C do anel aromático adicional), entre outros. Esses picos também possibilitam a identificação de isômeros de posição *orto*, *meta* e *para* tanto nos espectros teóricos como nos experimentais. Nos isômeros *orto*, *meta* e *para* fluoroisobutirfentanil, por exemplo, o pico 10 está presente em baixa, média e baixa intensidade, e o pico 11 em intensidade baixa, média e ausente, respectivamente, como mostra a Figura 14.

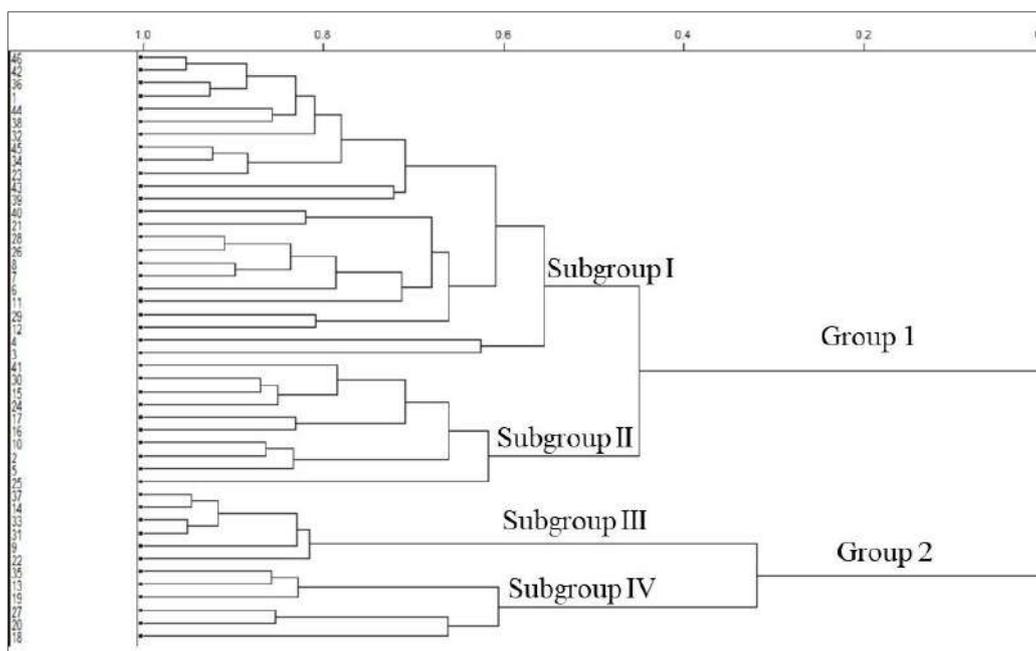
Figura 14 - Espectro de infravermelho teórico do o-fluoroisobutirfentanil (vermelho), m-fluoroisobutirfentanil (azul) e p-fluoroisobutirfentanil (preto)



Além desses picos, os picos 15 e 16 referentes aos estiramentos da ligação C-F e do grupo metóxi (ligação C-O), respectivamente, estiveram presentes nos espectros teóricos e experimentais. Esses picos, mesmo tendo uma sobreposição na região de incidência no espectro, puderam ser utilizados para identificar algumas estruturas. Nos compostos contendo flúor, o pico 15 pode ser observado na região de 1200 cm^{-1} , enquanto nos compostos contendo o grupo metóxi o pico 16 pode ser observado na região de 1050 cm^{-1} .

Os dados espectrais foram analisados por HCA e PCA. A HCA, Figura 15, mostrou a presença de dois principais grupos contendo 34 estruturas (Grupo 1) e 12 estruturas (Grupo 2). Cada grupo principal ainda pôde ser dividido em dois Subgrupos contendo 24 estruturas (Subgrupo I), 10 estruturas (Subgrupo II), 6 estruturas (Subgrupo III) e 6 estruturas (Subgrupo IV).

Figura 15 - HCA dos espectros de infravermelho das estruturas



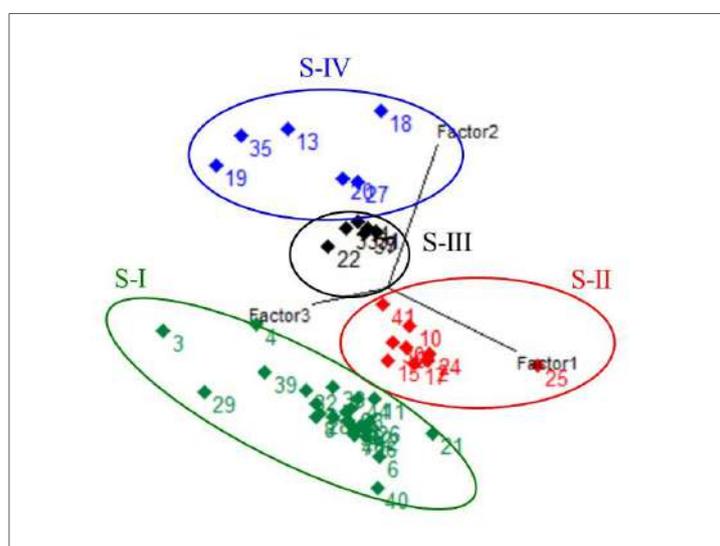
Apesar da boa separação das estruturas em grupos, quatro estruturas mostraram um comportamento atípico. Embora o Ocfentanil (#3) e o Alfentanil (#4) pertençam ao Subgrupo I, eles foram agrupados separadamente do restante das estruturas de mesmo Subgrupo. Dentro do Subgrupo II, o crotonilfentanil (#25) mostrou esse mesmo comportamento e não agrupou com nenhuma outra estrutura de seu Subgrupo. No Subgrupo IV, o 2-tiofenoilfentanil (#18) se agrupou com apenas duas estruturas de seu Subgrupo.

A mesma classificação em grupos foi obtida pelos *scores* da PCA. O resultado em 3D é mostrado na Figura 16. Podemos observar que os Subgrupos I e II tiveram uma separação bem distinta entre eles. Entretanto, o 4-fluoroisobutirfentanil (#16), que pela HCA pertence ao Subgrupo II, foi classificado pela PCA como pertencente ao Subgrupo I. Comparando a estrutura desse composto com as estruturas de ambos os Subgrupos, podemos observar que ela possui mais semelhança com as estruturas do Subgrupo I. Assim, nesse caso, a PCA se mostrou mais confiável que a HCA, e essa estrutura foi considerada como pertencente ao Subgrupo I.

Estruturas com comportamentos incomuns na HCA, como o alfentanil (#3), ocfentanil (#4), crotonilfentanil (#25) e 2-tiofenoilfentanil (#18) foram alocadas mais distantes do centro do Subgrupo quando comparados às outras estruturas. Esse comportamento também acontece com as estruturas 4-metoxibutirfentanil (#21),

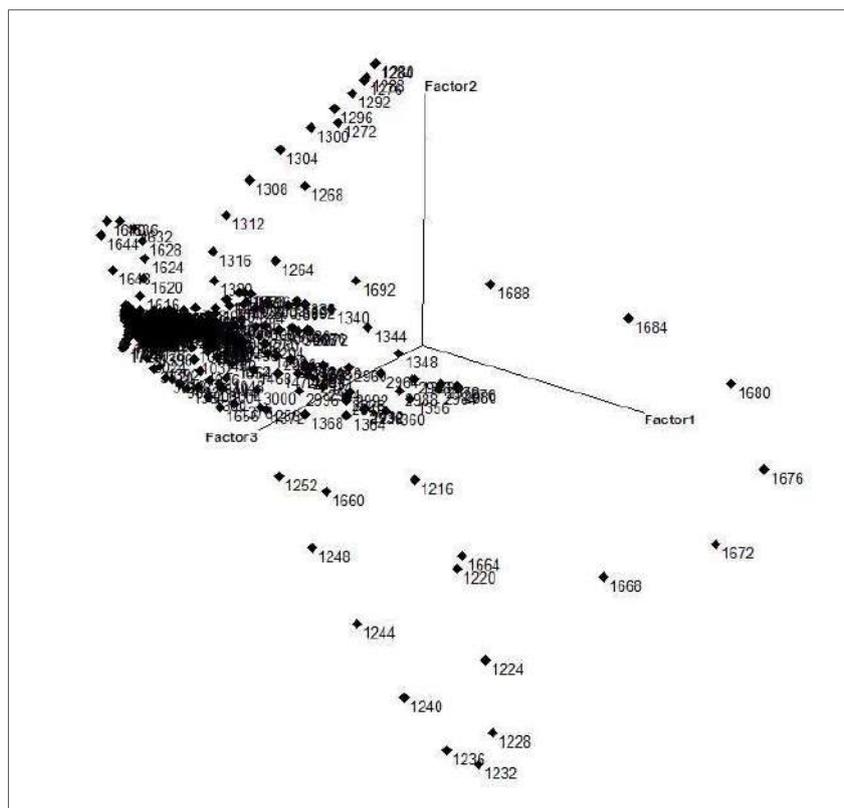
ciclopropilfentnil (#29), beta-R-hidroxitiofentnil (#39) e p-metoxifentnil (#40), indicando que esses análogos possuem consideráveis modificações estruturais em relação aos outros análogos de seus respectivos Subgrupos. Os Subgrupos III e IV foram bem definidos e tiveram uma considerável separação entre eles. O Subgrupo III possui todas suas estruturas alocadas próximas umas às outras, enquanto o Subgrupo IV possui suas estruturas mais distantes.

Figura 16 - Resultado dos scores da PCA em 3D. Verde (Subgrupo I, S-I); Vermelho (Subgrupo II, S-II); Preto (Subgrupo III, S-III); Azul (Subgrupo IV, S-IV)



Os *loadings* da PCA também foram analisados, e o resultado em 3D é mostrado na Figura 17. Quando comparado com os *scores* do PCA em uma sobreposição, os *loadings* mostram as principais variáveis que foram responsáveis pelo agrupamento das estruturas. Nesse caso, as variáveis são os números de onda (cm^{-1}) dos espectros de infravermelho.

Figura 17 - PCA 3D das variáveis



Analisando os resultados das PCAs das Figuras 16 e 17, podemos observar que os Subgrupos I e II foram influenciados pela frequência de estiramento do grupo carbonila quando próximo de 1670 cm^{-1} . Entretanto, o Subgrupo I mostrou o estiramento C-N da amina com frequência maior que 1230 cm^{-1} enquanto o Subgrupo II mostrou esse estiramento com frequência menor. O Subgrupo III mostrou um aumento no pico de estiramento da carbonila e da ligação C-N, com frequências maiores que 1680 cm^{-1} e 1270 cm^{-1} , respectivamente. O Subgrupo IV mostrou um aumento maior ainda no pico de estiramento da ligação C-N para valores maiores que 1290 cm^{-1} , mas um decréscimo no pico de estiramento da carbonila para valores menores que 1650 cm^{-1} . Esses desvios nas frequências ocorrem devido às similaridades das estruturas entre cada Subgrupo e às diferenças das estruturas entre diferentes Subgrupos. No geral, os estiramentos dos grupos carbonila e amina foram os principais responsáveis pelas classificações em grupos. A sobreposição entre as PCAs que possibilita uma melhor visualização dessa análise e a comparação de um espectro de cada Subgrupo são mostrados nas Figuras 18 e 19.

Figura 18 - Sobreposição 2D dos resultados das PCAs

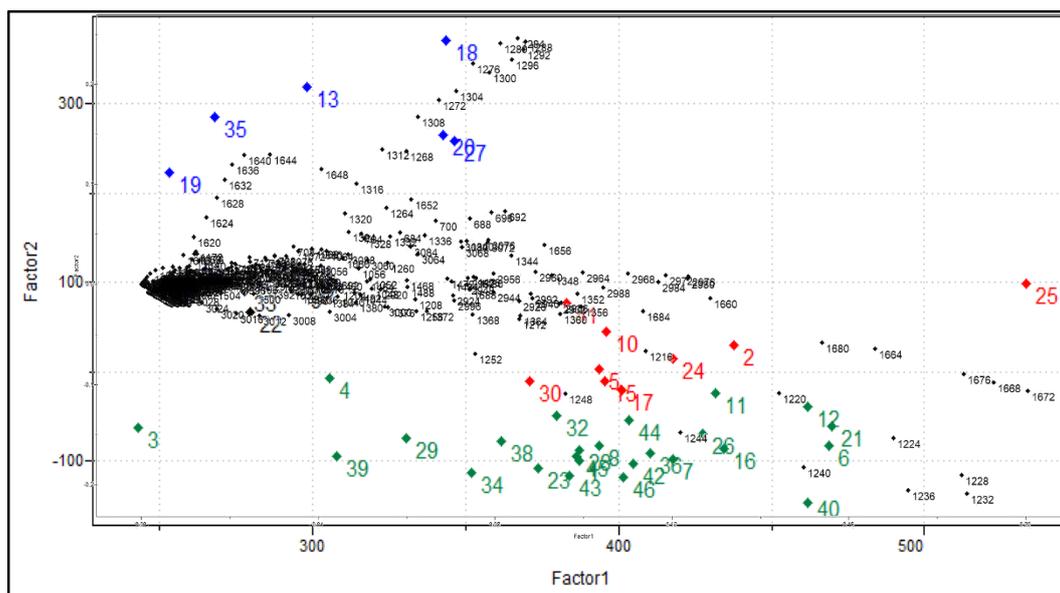
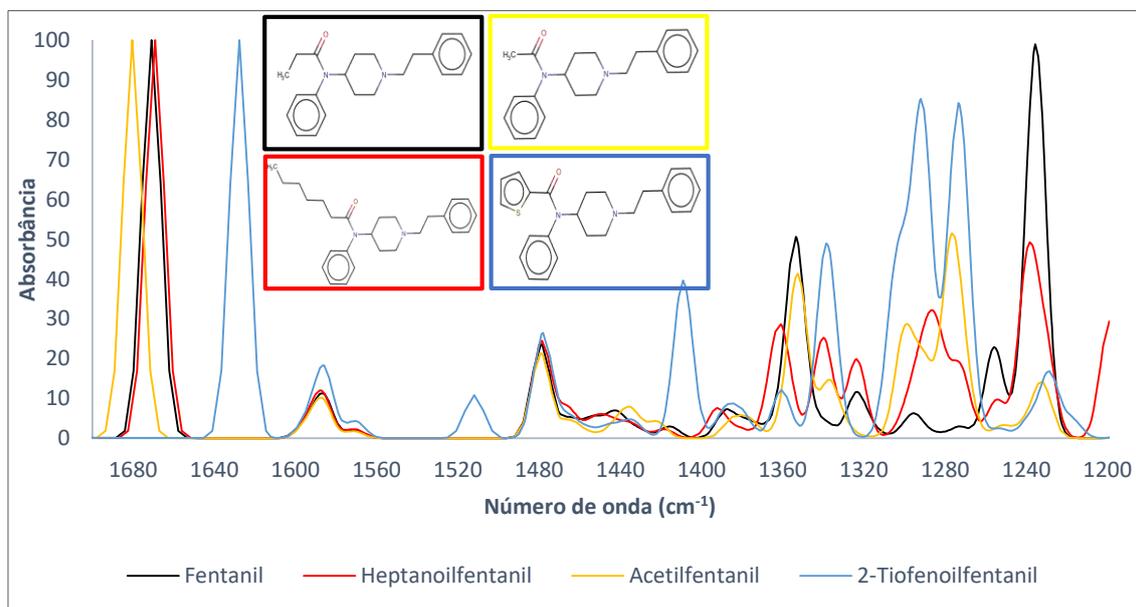


Figura 19 - Espectro de infravermelho teórico do fentanil (preto), heptanoilfentanil (vermelho), acetilfentanil (amarelo) e 2-tiofenoilfentanil (azul)



Comparando esses resultados com os espectros experimentais, algumas similaridades podem ser observadas. Os análogos dos Subgrupos I e II mostraram seus picos de estiramento dos grupos carbonila e amina entre $1640\text{--}1660\text{ cm}^{-1}$ e $1240\text{--}1270\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. Isso faz deles os Subgrupos mais difíceis de agrupar. No Subgrupo III, alguns análogos sofreram um aumento nos picos de estiramento da carbonila e amina

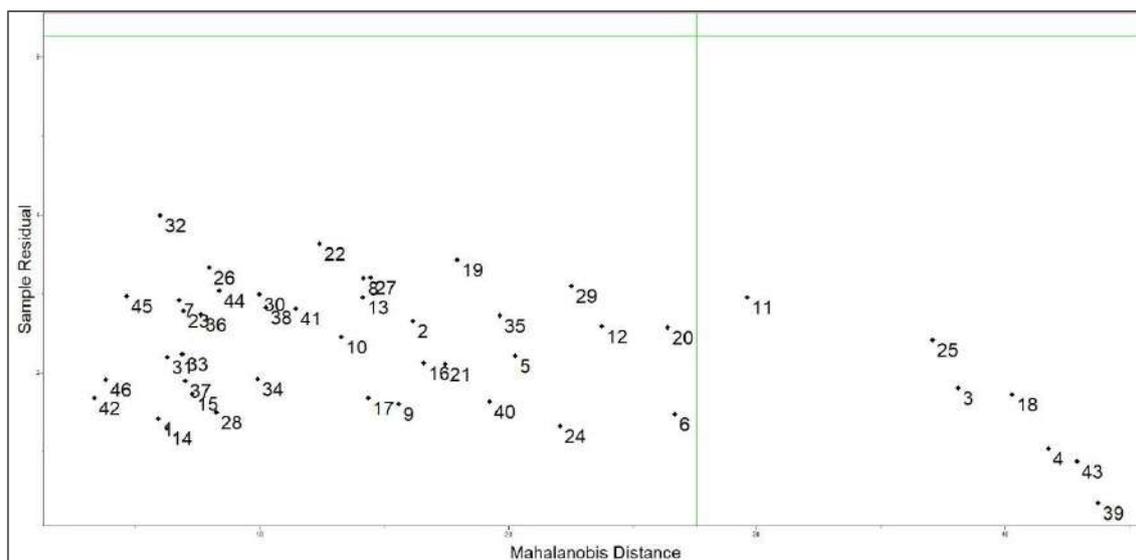
atingindo 1670 cm^{-1} e 1307 cm^{-1} , respectivamente. Todos os compostos do Subgrupo IV tiveram uma diminuição no pico de estiramento da carbonila entre $1609\text{-}1645\text{ cm}^{-1}$ e aumento no pico de estiramento da amina entre $1290\text{-}1330\text{ cm}^{-1}$.

Depois da análise de todos os espectros de infravermelho, foi possível identificar que a região de substituição R1 foi a região mais importante de substituição, determinando os agrupamentos na HCA e na PCA. Apesar das estruturas do Subgrupo I conterem diferentes substituintes na região R1, os outros Subgrupos mostraram um padrão nessa região de substituição. A maioria das estruturas do Subgrupo II têm uma elongação de cadeia acíclica alifática não ramificada na região R1; todas as estruturas do Subgrupo III têm um grupo acetila ligado ao grupo carbonila (também em R1); e todas as estruturas do Subgrupo IV têm um anel aromático ligado ao grupo carbonila (também em R1). A região de substituição R1 mostrou ser a região mais sensível em relação às modificações estruturais, uma vez que essas modificações podem provocar alterações mais significativas nas frequências e intensidades dos picos no espectro de infravermelho, principalmente nos picos de estiramento dos grupos carbonila e amina, como a Figura 19 mostrou.

Uma análise dos *outliers* retirada da PCA pode ser vista na Figura 20. Embora nenhum *outlier* tenha sido encontrado (nenhum composto na região superior direita do gráfico), sete estruturas ficaram mais distantes das outras (região inferior direita). Como esperado, cinco compostos com comportamento incomum na análise de PCA (ocfentanil #3, alfentanil #4, 2-tiofenoilfentanil #18, crotonilfentnail #25 e beta-R-hidroxitiofentanil #39) foram encontrados nessa área. Carfentanil #11 e beta-R-hidroxfentanil #43 foram os outros dois compostos encontrados nessa área.

Todos esses comportamentos incomuns podem ser explicados por meio das diferenças estruturais entre esses sete compostos com os outros compostos de seus respectivos Subgrupos. Duas considerações podem ser citadas: 1) Se esses sete análogos tivessem suas estruturas mais parecidas com as estruturas de seus subgrupos, esse comportamento não seria observado; 2) Se tivesse novos análogos que fossem similares o suficiente a cada uma dessas sete estruturas para serem adicionados à PCA, provavelmente novos Subgrupos teriam sido criados e esse comportamento não seria observado.

Figura 20 - Análise dos outliers



Nós realizamos uma análise SIMCA a partir dos dados da PCA e a Tabela 12 mostra os resultados. Apenas uma componente principal foi suficiente para modelar cada classe e nenhuma classificação errada foi observada. Os resíduos entre as classes, que podem ser vistos na Tabela 13, mostra que os valores dentro da mesma classe (diagonal) são os menores. Além disso, a distâncias de uma classe para ela mesma é zero, como pode ser visto na Tabela 14. Todos os resultados confirmam que os agrupamentos obtidos pelas técnicas não-supervisionadas HCA e PCA foram confiáveis.

Tabela 12 - Resultados da SIMCA

	P_Class1	P_Class2	P_Clas3	P_Class4	Misclassification
O_Class 1	9	0	0	0	0
O_Class 2	0	25	0	0	0
O_Class 3	0	0	6	0	0
O_Class 4	0	0	0	6	0

*O_Class=Classe Original, P_Class=Classe Predita.

Tabela 13 - Resíduos interclasses

	P_Class1	P_Class2	P_Clas3	P_Class4
O_Class 1	5.6125	10.3961	15.300	12.0370
O_Class 2	10.7516	7.5144	16.7631	14.5864
O_Class 3	15.1572	17.6402	7.3620	16.1572
O_Class 4	8.9636	11.4438	11.4097	2.1559

Tabela 14 - Distâncias interclasses

	P_Class1	P_Class2	P_Clas3	P_Class4
O_Class 1	0	0.5946	1.3264	1.4962
O_Class 2	0.5946	0	1.3132	1.3716
O_Class 3	1.3264	1.3132	0	1.5784
O_Class 4	1.4962	1.3716	1.5784	0

Todos os espectros de infravermelho foram analisados e comparados com o espectro do fentanil para avaliar a contribuição de cada modificação estrutural (Tabela 2 do Material Suplementar). Assim, tentamos avaliar as regiões de substituição e os grupos substituintes de acordo com sua capacidade de gerar picos na região do infravermelho. O propósito dessa análise foi avaliar a capacidade da simulação de espectro de infravermelho em ajudar na identificação dessas drogas.

Subgrupo I

O Subgrupo I é composto pelo fentanil e 24 análogos com modificações presentes em todas as regiões de substituição. Existem cinco estruturas com uma elongação na região R1 por uma cadeia alifática acíclica e ramificada. Essas estruturas são o isobutirfentanil, *orto*, *meta* e *para* fluoroisobutirfentanil e *p*-cloroisobutirfentanil. O isobutirfentanil (#28) possui um grupo isobutila (-CCH₂CH₂CH₃) ligado ao grupo carbonila. Essa modificação também é vista no *orto* (#7), *meta* (#6) e *para* (#16) fluoroisobutirfentanil e *p*-cloroisobutifentanil (#8), mas essas estruturas contam com a presença do átomo de flúor e de cloro nos respectivos carbonos *o*, *m* e *p* de cada grupo benzila.

Duas estruturas possuem a ligação de uma cadeia alifática cíclica na região de substituição R1. Ciclopropilfentanil (#29) e ciclopentanoilfentanil (#26) apresentam a adição dos grupos ciclopropila (-C₃H₇) e ciclopentila (-C₅H₉), respectivamente.

Um grupo metila foi introduzido na região de substituição R3 de cinco análogos. Em todas as estruturas do metilfentanil, o 2-metilfentnail (1 análogo, #36) e o 3-metilfentanil (4 análogos, #38, #42, #44, #46) possuem o grupo metila ligado ao seu respectivo carbono 2 e 3 do anel piperidina.

Três estruturas sofreram a adição de um grupo hidroxila na região de substituição R5. O *Beta*-R-hidroxi-fentanil (#43) e o *beta*-S-hidroxi-fentanil (#45) tiveram o grupo hidroxila ligado ao carbono *beta* da porção etilfenil. Essa modificação também é vista no *beta*-R-hidroxitiofentanil (#39) junto com a substituição do benzeno por um anel tiofeno na região de substituição R6.

Duas estruturas contêm a ligação de um grupo metóxi no carbono *para* da região de substituição R2. Essa é a única modificação do *p*-metoxifentanil (#40) enquanto no *p*-metoxibutirfentanil (#21) também há uma elongação na região de substituição R1 por uma cadeia alifática acíclica e não ramificada de três carbonos.

O acriloilfentanil (#12) sofre a adição de uma ligação dupla entre os carbonos *alfa* e *beta* da região de substituição R1. O tetrahydrofuranilfentanil (#32) possui um grupo tetrahydrofurano, um anel heterocíclico alifático, ligado ao grupo carbonila da região de substituição R1. O benzilfentanil (#34) apresenta uma substituição do grupo etilfenil por um grupo benzila ligado ao nitrogênio do anel piperidina. O carfentanil (#11) sofre a ligação de um grupo metil éster na região de substituição R3. O alfentanil (#4) sofre a adição de um grupo carbometóxi na região de substituição R3 junto com a substituição do anel benzeno da porção etilfenil por um anel tetrazolil. O ofentanil (#3) possui a ligação de um grupo metóxi na região de substituição R1 junto com a adição de um átomo de flúor no carbono *orto* do grupo benzila.

Oito dos 24 análogos do Subgrupo I mostraram algum comportamento incomum nas análises de HCA e PCA devido a suas diferenças estruturais. O ofentanil é o único análogo a ter um grupo metóxi ligado a região de substituição R1; o alfentanil é o único composto a ter um grupo carbometóxi ligado a região de substituição R3 e um anel tetrazolil; e o carfentanil é o único composto a ter um grupo éster em sua estrutura. O *Beta*-R-hidroxi-fentanil e o *beta*-R-hidroxitiofentanil são os únicos análogos a apresentar o grupo hidroxila em uma posição R. O 4-metoxibutirfentanil e o *p*-metoxifentanil são os

únicos análogos com a adição de um grupo metóxi, e ciclopropilfentanil é o único composto com a adição do grupo ciclopropila.

Subgrupo II

Sete estruturas do Subgrupo II possuem uma elongação por cadeia alifática acíclica e não ramificada na região de substituição R1. Quatro estruturas apresentam apenas essa modificação. O butirfentanil (#15), o valerilfentanil (#10), o hexanoilfentanil (#5) e o heptanoilfentanil (#2) sofreram a elongação por cadeias contendo três, quatro, cinco e seis carbonos, respectivamente.

O orto (#30), *meta* (#24) e *para* (#17) fluorobutirfentanil possuem adição de um átomo de flúor em seus respectivos carbonos *o*, *m* e *p* do grupo benzila (região de substituição R2) junto com a elongação por cadeia contendo três carbonos na região R1.

O beta'-fenilfentanil (#41) sofreu a ligação de um grupo fenil no carbono *beta* do grupo carbonila da região de substituição R1, enquanto o crotonilfentanil (#25) possui a adição do grupo crotonila (-CH=CHCH₃) na mesma região de substituição. Esses dois análogos são os únicos com suas respectivas modificações estruturais. Entretanto, apenas o crotonilfentanil mostrou um comportamento incomum na HCA e na PCA devido à capacidade do grupo crotonila de gerar pico no espectro de infravermelho.

Subgrupo III

Todas as seis estruturas desse subgrupo possuem um átomo de carbono excluído da região de substituição R1. Assim, essas estruturas passaram a ser chamadas de acetilfentanil e seus análogos. Entretanto, outras modificações ocorrem em outras regiões de substituição de algumas dessas moléculas. O acetil-alfa-R-metilfentanil (#37) e o 4'-metilacetilfentanil (#31) possuem adições de um grupo metila (-CH₃) nos carbonos *alfa* e da posição 4' da porção etilfenila, respectivamente. O *p*-metilacetilfentanil (#33) possui em grupo metila ligado ao carbono *para* do grupo benzila enquanto o *p*-fluoroacetilfentanil (#9) possui um átomo de flúor ligado no mesmo carbono. O metoxiacetilfentanil (#22) possui um grupo metóxi (O-CH₃) substituindo o carbono excluído na região de substituição R1. Devido a essas semelhanças estruturais, nenhum composto desse subgrupo mostrou comportamento incomum nas análises de HCA e PCA.

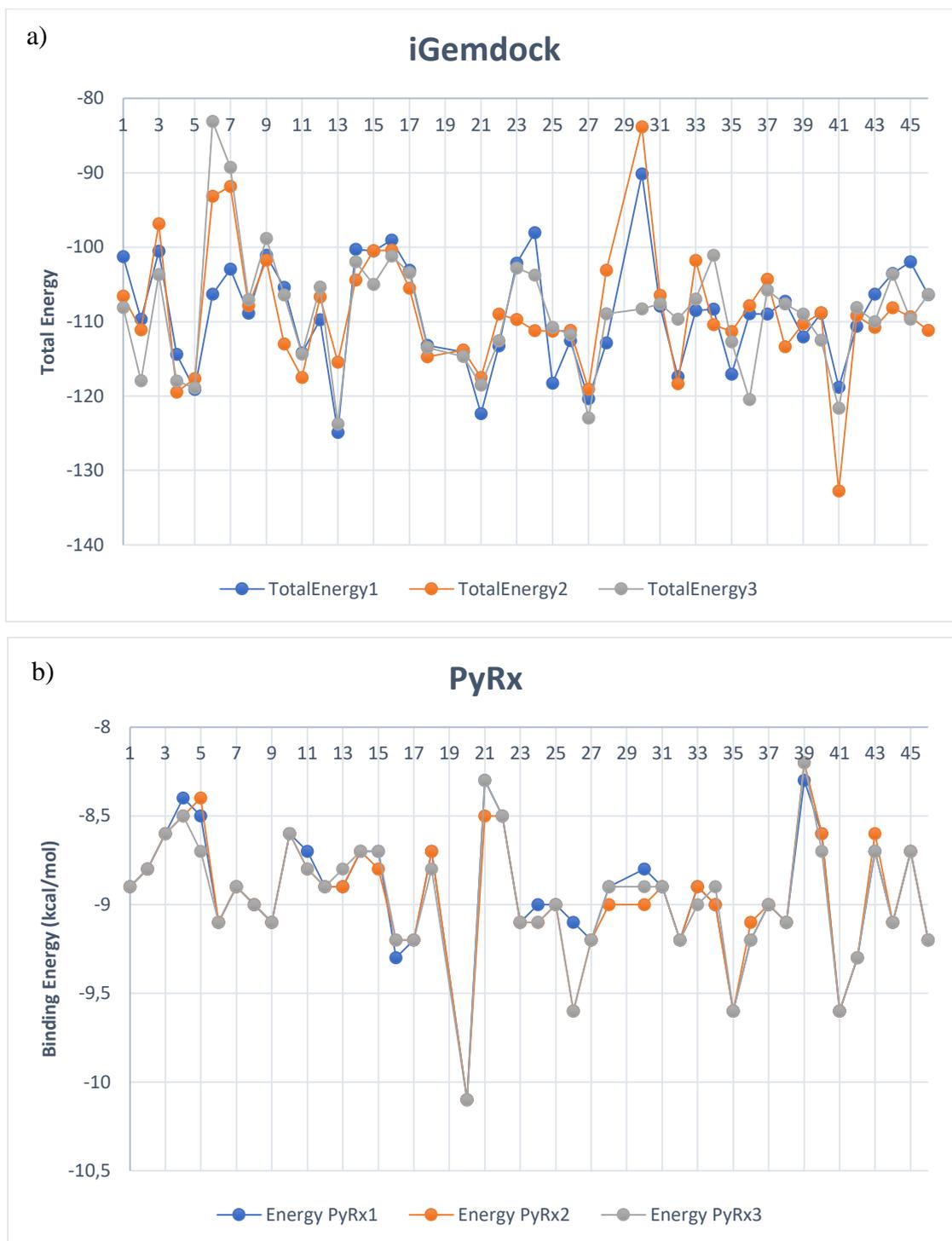
Subgrupo IV

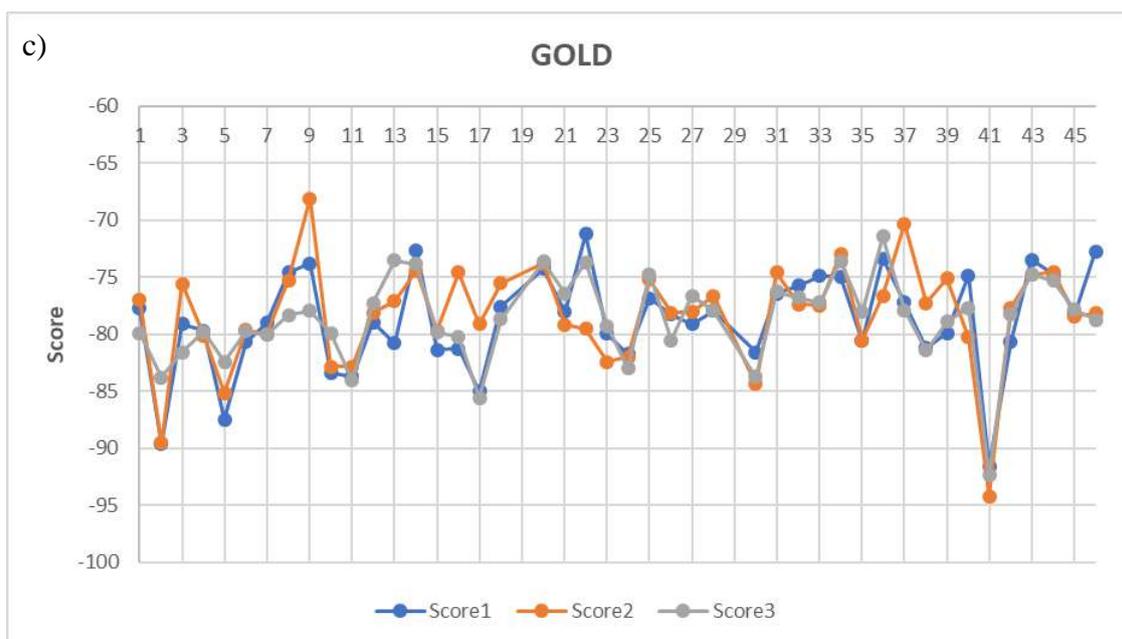
Todos os análogos pertencentes ao Subgrupo IV possuem um anel aromático ligado ao grupo carbonila da região de substituição R1. Os análogos furanilfentanil (#13), 2-furanilbenzilfentanil (#35) e 3-furanilfentanil (#19) sofreram adição do grupo furano, um anel aromático heterocíclico representado pela fórmula química C_4H_4O . O grupo tiofeno (C_4H_4S) pode ser visto na estrutura do 2-tiofenoilfentanil (#18), e o grupo benzila está presente no benzoilfentanil (#27) e benzoilbenzilfentanil (#20). Assim, o 2-tiofenoilfentanil, único análogo a apresentar o grupo tiofeno, foi o único composto do Subgrupo IV a mostrar um comportamento incomum na HCA e PCA.

Parte 3. *Docking* molecular

Nós utilizamos três softwares para prever a energia de ligação do fentanil e seus análogos com o receptor μ -opioide. Os softwares iGemdock⁶⁶ e GOLD⁶⁷ fazem a predição baseados no algoritmo de busca genético enquanto que o PyRx⁶⁸ se baseia no algoritmo de otimização AutoDock Vina⁷⁰. Os softwares também mostram a conformação dos ligantes dentro da cavidade do receptor, além de suas interações com os aminoácidos presentes. Entretanto, devido à má visualização gerada pelo software iGemdock⁶⁶, ele foi utilizado apenas para prever as energias de ligação. A visualização conformacional dos resultados gerado pelo PyRx⁶⁸ e GOLD⁶⁷ foram obtidas por meio dos softwares PyMOL⁹⁸ e Discovery Studio⁹⁹. As predições foram realizadas em triplicata para cada software e as energias de ligação obtidas são mostradas na Figura 21.

Figura 21 - Energias de ligação previstas pelos softwares a) iGemdock, b) PyRx e c)
GOLD





Pode-se observar que os resultados mostraram um certo padrão entre as três predições de cada software independentemente. Entretanto, o PyRx foi o mais reprodutível, sendo que 27 dos 44 análogos obtiveram a mesma energia de ligação em todas as predições. Já o GOLD e o iGemdock, não mostraram a mesma energia de ligação para muitos compostos, embora mostraram energias próximas para a maioria dos compostos em pelo menos duas predições.

Comparando os resultados com os encontrados por Jaronczyk et al. (2017)⁸¹, obtivemos a melhor correlação utilizando o software iGemdock. Temos que as substituições no anel piperidina (região de substituição R3) aumentam a afinidade do ligante com o receptor, o que pode ser confirmado pela diminuição da energia de ligação do carfentanil (#11), 2-metilfentanil (#36) e 3-metilfentanil (#38 e #42) em relação ao fentanil. Ou seja, elas são mais estáveis dentro do receptor do que o fentanil. Por outro lado, a ligação de um átomo de flúor no grupo fenil da porção N-fenilpropanamida (região de substituição R2) diminui a atividade dos compostos no receptor. Esse comportamento pode ser visto pelo aumento da energia de ligação dos compostos ofentanil (#3) e dos análogos do fluorofentanil (#6, #7, #9, #16, #17, #23, #24 e #30). As predições do iGemdock também mostram que a ligação de um anel aromático na região de substituição R1 aumenta a afinidade do ligante pelo receptor como é o caso do furanilfentanil (#13) e do 2-tiofenoilfentanil (#18).

Este último comportamento também foi predito pelo PyRx, e ambos os softwares mostraram o benzoilbenzilfentanil (#20) e o benzoilfentanil (#27) com um aumento de

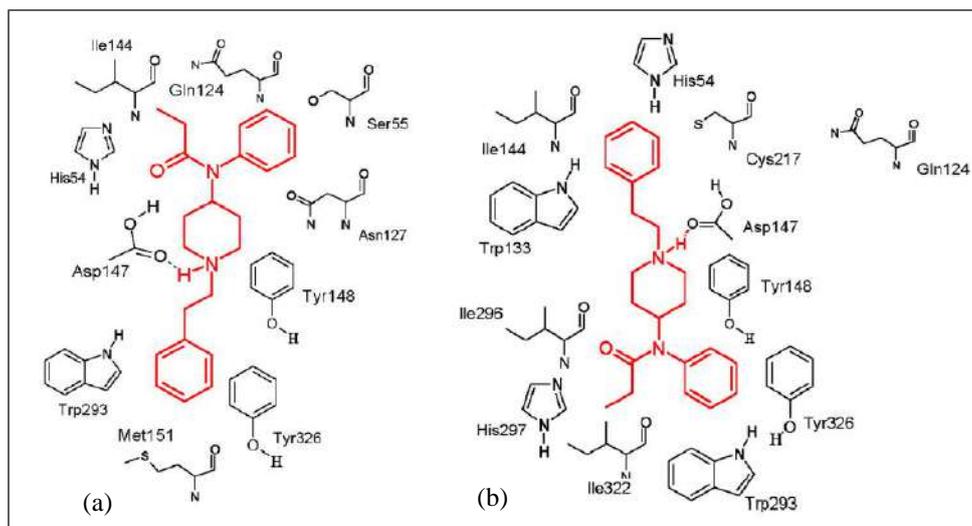
afinidade pelo receptor. Assim como o iGemdock, o PyRx mostra um aumento de afinidade para o tetrahydrofuranilfentanil (#32) e o 2-metilfentanil (#36). Entretanto, diferentemente do iGemdock o PyRx mostrou que os análogos do fluorofentanil (#6, #9, #16 e #17) tiveram um aumento na afinidade. Outra predição do PyRx é que os análogos do 3-metilfentanil (#38, #42, #44 e #46) tiveram suas afinidades aumentadas, e que os análogos com o grupo hidroxila (#39, #43 e #45) tiveram suas estabilidades diminuídas.

O software GOLD convergiu com os resultados do PyRx em relação aos análogos do fluorofentanil, uma vez que as estruturas #16, #17, #24 e #30 tiveram suas atividades aumentadas. Entretanto, em relação aos compostos que sofreram alongação por cadeia alifática acíclica e não ramificada (na região de substituição R1), o comportamento entre os dois softwares divergiu. Enquanto o GOLD mostrou aumento de estabilidade para os compostos heptanoilfentanil (#2), hexanoilfentanil (#5), valerilfentanil (#10) e butirfentanil (#15) (o que também foi predito pelo iGemdock), o PyRx mostrou uma diminuição da estabilidade dessas moléculas com o receptor.

Importante notar que três compostos tiveram o mesmo comportamento em todos os softwares. O metoxiacetilfentanil (#22) se mostrou menos estável que o fentanil, enquanto o 2-furanilbenzilfentanil (#35) e o beta'-fenilfentanil (#41) tiveram a estabilidade aumentada, sendo que este último composto foi um dos mais estáveis em todas as predições. Além disso, fica evidente que estudos de energia de interação receptor-ligante devem ser realizados de maneira consensual utilizando mais de um software.

Estudos publicados anteriormente utilizando *docking* molecular, Dosen-Micovic et al. (2006)⁸⁰ e Jaronczyk et al. (2017)⁸¹, mostraram que o fentanil e seus análogos podem adquirir duas possíveis poses quando interagem com o receptor μ -opioide. É chamada de pose I quando a porção N-fenilpropanamida está direcionada aos aminoácidos Gln124, Asn127 e Ile144. Já a pose II se caracteriza quando a porção N-fenilpropanamida está direcionada aos aminoácidos Val236, Trp293 e Ile296. Um esquema completo com as duas poses modificado da publicação de Jaronczyk et al. (2017)⁸¹ pode ser visto na Figura 22. Esse mesmo estudo mostra que a configuração do ligante na pose II traz mais estabilidade dentro da cavidade do receptor quando comparado com a pose I, para a maioria dos análogos. Essa mesma conclusão pode ser tirada analisando as conformações obtidas pelos softwares PyRx e GOLD, sendo que, respectivamente, 35 e 37 dos 44 análogos estudados mostraram a pose II como a melhor conformação de ancoragem.

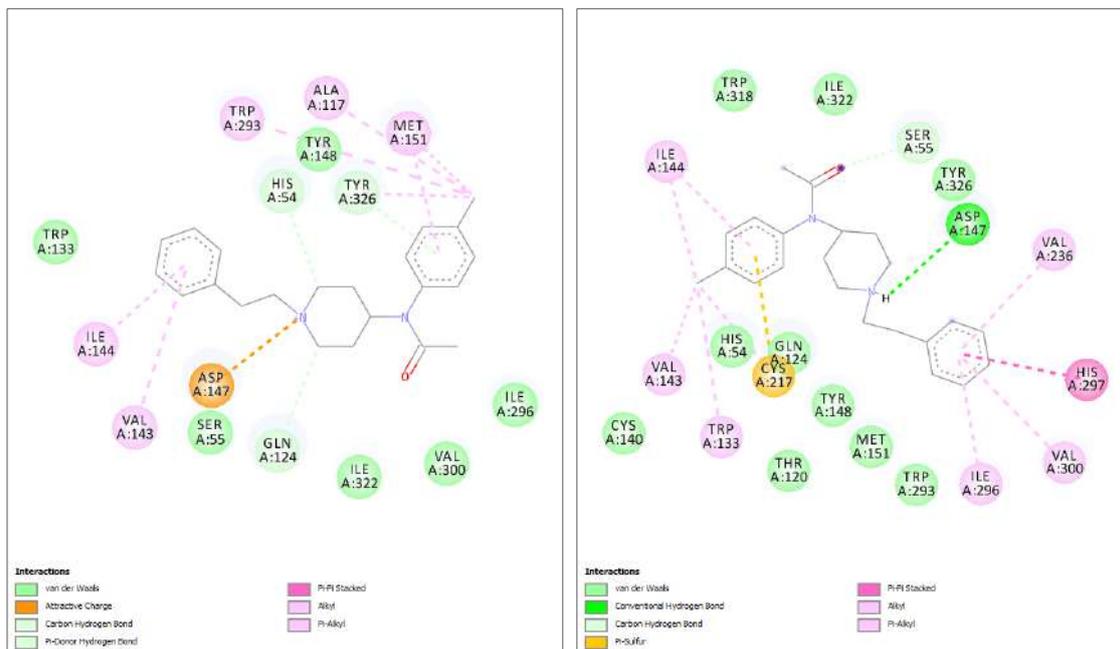
Figura 22 - Possibilidade de interação do fentanil com o receptor μ -opioide: a) Pose I e b) Pose II



Fonte: Modificado de Jaronczyk et al. (2017)

Comparando os resultados das configurações de ambos os softwares, temos que apenas sete estruturas mostraram divergências entre as melhores poses de ancoragem. Os análogos p-fluoroacetilfentanil (#9), 4'-metilacetilfentanil (#31) e p-metilacetilfentanil (#33, ilustrado na Figura 23) tomaram a pose II no software PyRx e pose I no software GOLD, enquanto que os compostos furanilfentanil (#13), 2-tiofenoilfentanil (#18), metoxiacetilfentanil (#22) e ciclopentanoilfentanil (#26) tomaram a pose I no software PyRx e pose II no software GOLD. Isso mostra que 4 dos 6 análogos do acetilfentanil (75%) tiveram problemas para convergirem seus resultados de interação, sendo o grupo de estruturas com o maior índice de divergência.

Figura 23 - Interações do p-metilacetilfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD



Enquanto 33 das 44 estruturas tomaram a pose II para ambos os softwares, como esperado para a maioria dos análogos, 4 estruturas tomaram a pose I: Butirfentanil (#15), p-fluorobutirfentanil (#17), tetrahydrofuranilfentanil (#32) e acetil-alfa-R-metilfentanil (#37). Como ambos os softwares convergiram para esse resultado, podemos interpretar que para esses quatro análogos a pose mais estável dentro do receptor seria a pose I.

Das 37 ancoragens que convergiram para as mesmas poses nos dois softwares, pode-se observar, por meio da Tabela 12 e pelas interações mostradas no Material Suplementar, que 27 análogos interagiram, na maioria das vezes, com os mesmos aminoácidos nas mesmas regiões da estrutura dos análogos. Sabe-se também que há uma interação iônica entre o grupo carbonila do aminoácido Asp147 e o nitrogênio protonado do anel piperidina^{80,81}. Essa interação é considerada o ponto de ancoragem do acoplamento receptor μ -opioide com os análogos do fentanil. Esse fato explica a presença dessa interação em 41 e 39 dos 44 análogos nos softwares PyRx e GOLD, respectivamente. Essas observações também podem ser vistas nas Figuras 24 e 25.

Figura 24 - Interações do acríloilfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

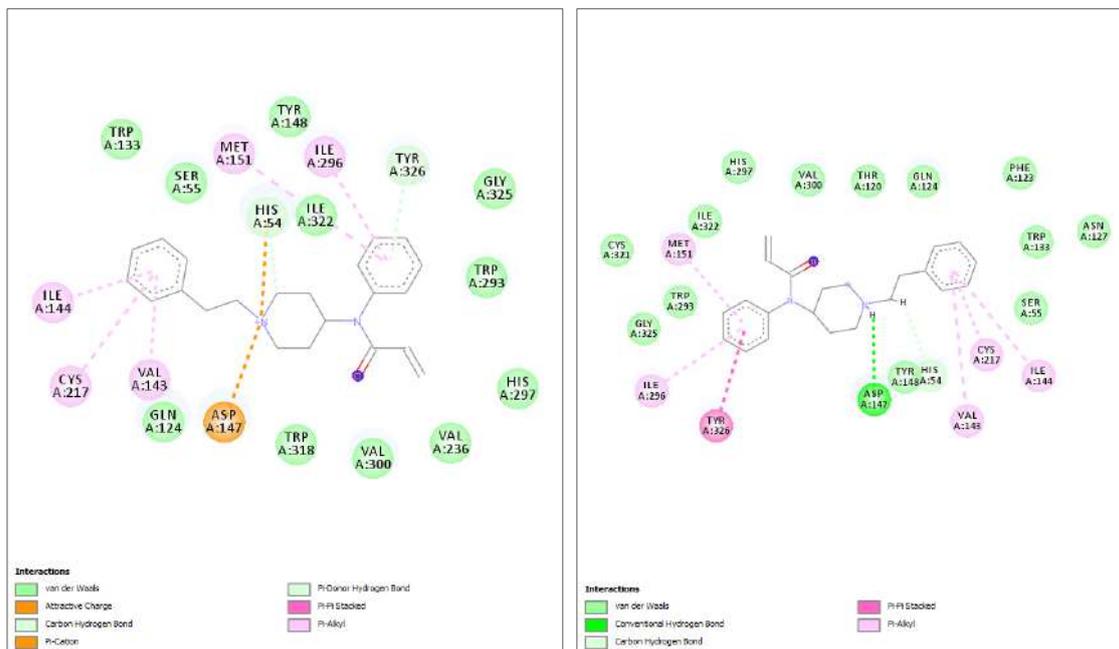
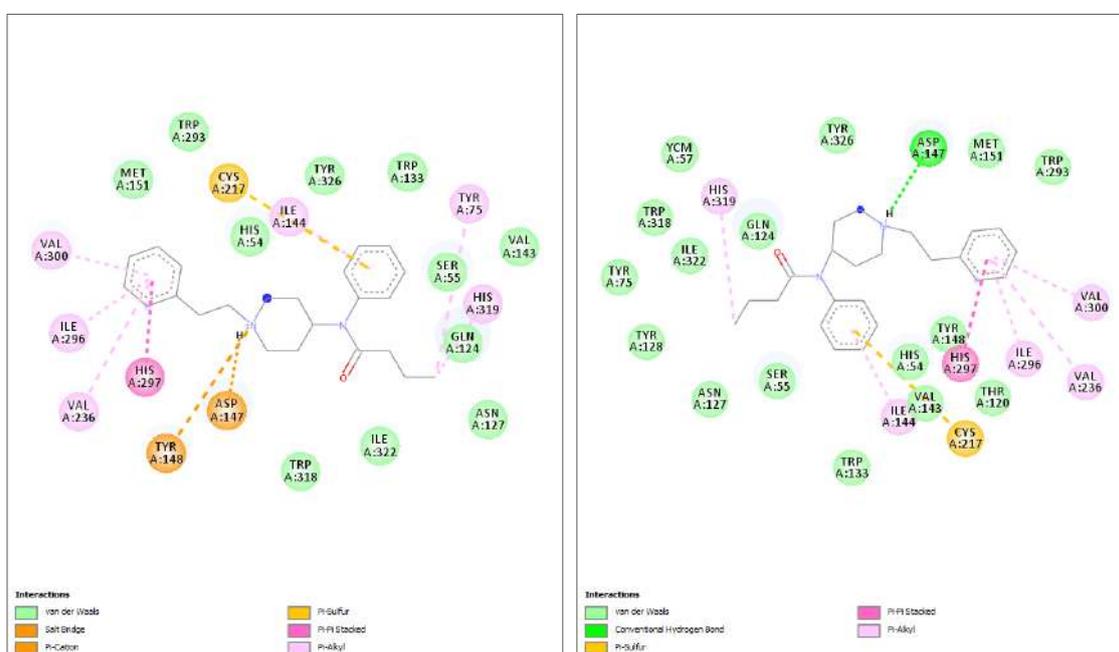


Figura 25 - Interações do butirfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD



A Tabela 15 mostra todos os 30 aminoácidos possíveis de estarem presentes nas ancoragens, representados por números. A Tabela 16 mostra os aminoácidos, presentes

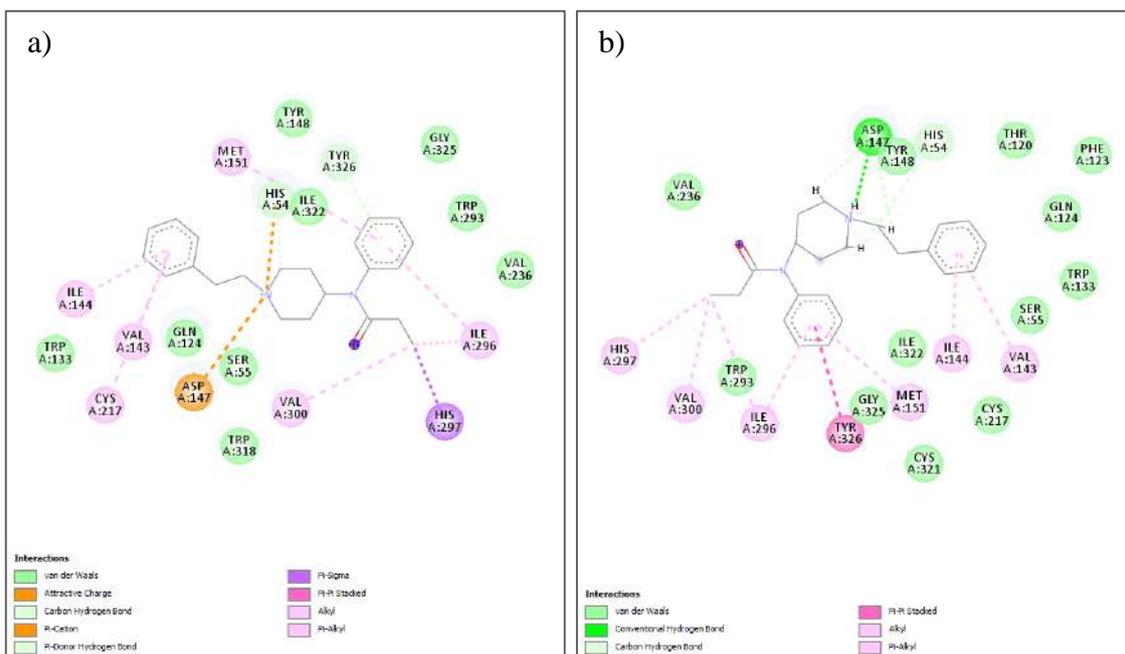
(1) ou ausentes (0), nas ancoragens dos 44 análogos realizadas por cada software, onde o P representa o PyRx e o G representa o GOLD. A primeira coluna indica a molécula analisada e a segunda o software utilizado. As colunas seguintes se referem aos aminoácidos descritos na Tabela 15. Analisando os resultados, vemos que os principais aminoácidos que desenvolvem um papel chave na estabilização das estruturas dentro do receptor são: 1) Asp147; 2) His54; 3) His297; 4) Val300; 5) Ile296; 7) Tyr326; 8) Met151; 9) Ile144; 10) Val143; 11) Cys217; e 13) Val236, uma vez que eles interagem com a maioria dos análogos pelos dois softwares. Além disso, a maioria dos análogos mostram interações semelhantes entre os dois softwares utilizados.

Tabela 15 - Correlação entre os números e os aminoácidos

Nº	Aminoácidos	Nº	Aminoácidos	Nº	Aminoácidos
1	Asp147	11	Cys217	21	Ser55
2	His54	12	Gln124	22	His319
3	His297	13	Val236	23	Ycm57
4	Val300	14	Lys233	24	Tyr75
5	Ile296	15	Trp293	25	Asn127
6	Ile322	16	Leu232	26	Phe237
7	Tyr326	17	Tyr148	27	Ile301
8	Met151	18	Gly325	28	Phe221
9	Ile144	19	Trp318	29	Cys140
10	Val143	20	Trp133	30	Ala117

A ancoragem molecular da estrutura do fentanil por ambos os softwares é mostrada na Figura 26. Como os estudos anteriores sugeriram, o fentanil tomou a pose II dentro do receptor, e a interação iônica entre a Asp147 e o nitrogênio protonado está presente nos dois softwares. Além disso, o grupo fenil da porção etilfenil interage com a Ile144, Val143 e Cys217 (este último apenas no PyRx) por interações Pi. O grupo fenil da porção N-fenilpropanamida está próximo da Trp293 e Ile322 enquanto interage com a Ile296 e Met151 por interações Pi e com a Tyr326 por forças de van der waals (PyRx) e interações Pi (GOLD). Os aminoácidos His297, Val300 e Ile296 interagem com o grupo metila da propanamida por interações Pi, e a His54 interage com o anel piperidina por forças de van der waals. Assim, temos que os resultados entre os dois softwares estão em concordância e convergiram mesmo que algumas interações fossem de diferentes tipos.

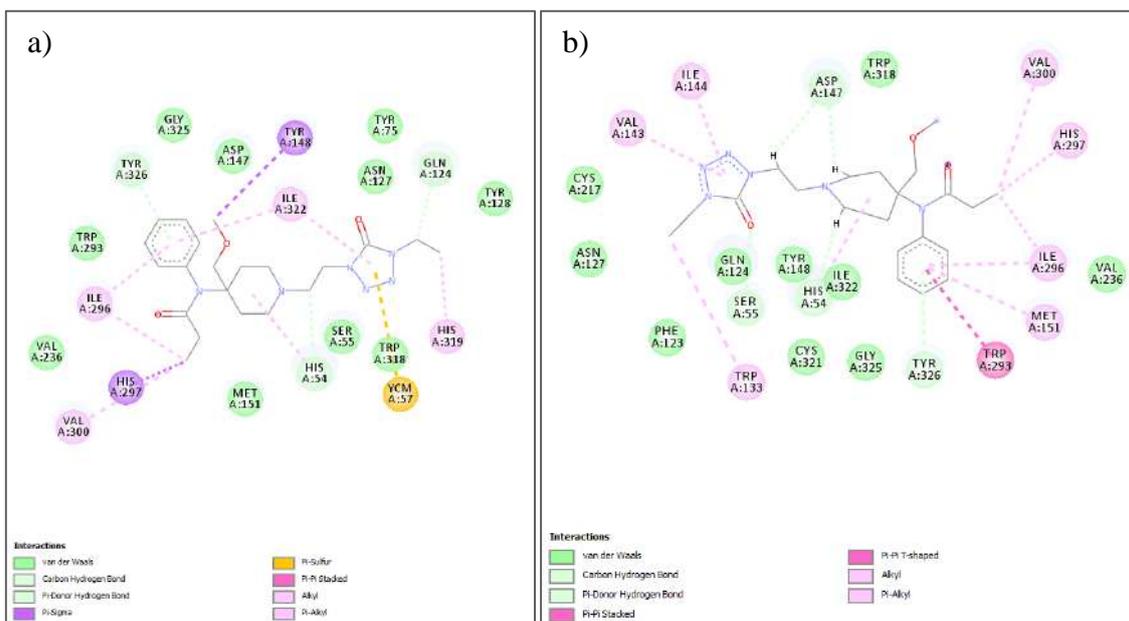
Figura 26 - Interação do fentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD



A estrutura do alfentanil não apresenta o ponto de ancoragem entre a Asp147 e o nitrogênio protonado uma vez que seu pKa é menor do que o do fentanil¹⁰⁰. O alfentanil é uma base fraca de pKa 6,5, o que significa que no pH intracelular sua presença será predominantemente em sua forma não ionizada¹⁰⁰. Apesar dessa diferença, assim como o fentanil, o alfentanil também assume a pose II na cavidade do receptor, o que pode ser visto na Figura 27. Em ambos os softwares, o anel tetrazolil é direcionado para os

aminoácidos Ser55, Asn127 e Gln124, assim como Jaronczyk et al. (2017)⁸¹ sugere, entretanto, as interações presentes são diferentes. No PyRx, o grupo carbometoxi interage com a Tyr148 e o anel tetrazolil com a Ile322, His319 e Ycm57 por interações Pi. No GOLD, o mesmo grupo carbometoxi não interage com nenhum aminoácido e o anel tetrazolil interage com a Ile144, Val143 e Trp133 por interações Pi. As similaridades nas interações entre os dois softwares são em relação à porção N-fenilpropanamida, uma vez que ela interage com a His297, Val300 e Ile296 por interações Pi, e com a Tyr326 por forças de van der waals. O estudo publicado por Jaronczyk et al. (2017)⁸¹ mostra que o grupo carbometoxi interage com a Ile296, Val300 e Ile322, o que seria possível no presente estudo apenas se a porção N-fenilpropanamida sofresse uma torção em direção à esses aminoácidos.

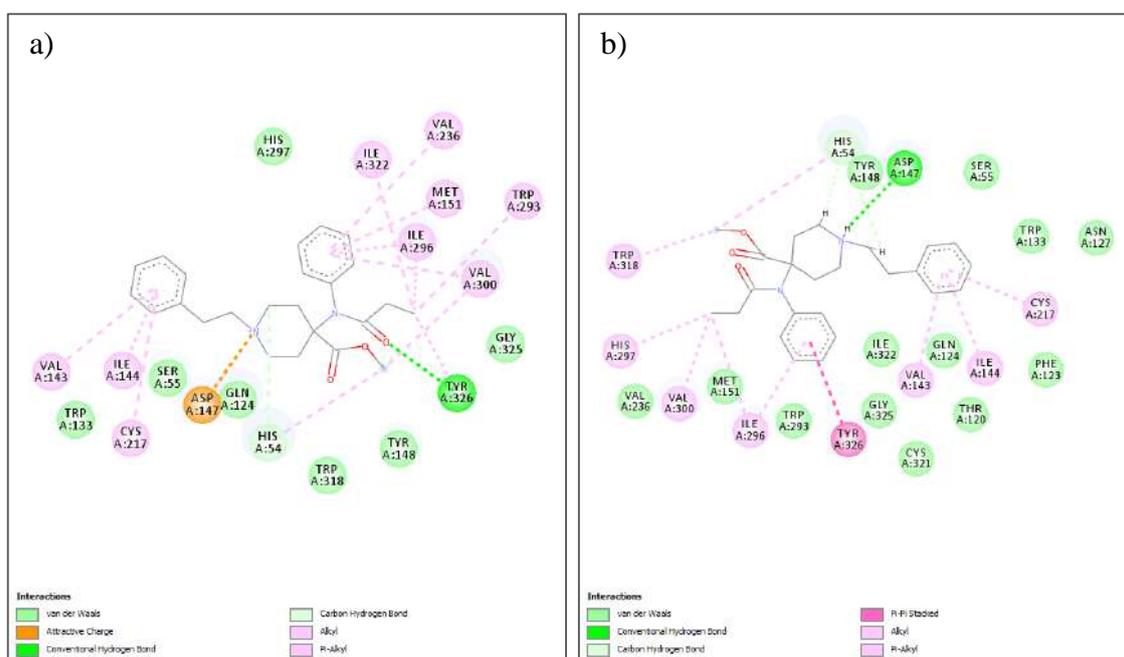
Figura 27 - Interações do alfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD



O carfentanil é um dos análogos mais potentes e possui uma alta estabilidade quando ancorado no receptor. Esse comportamento pode ser explicado pelo contato adicional entre o grupo carbometoxi com a His54 por interação Pi identificado pelo PyRx, GOLD e Jaronczyk et al. (2017)⁸¹. A interação da His297 com o oxigênio do grupo metóxi relatado por Dosen-Micovic et al. (2006)⁸⁰, não foi identificada nessas análises, apesar de no software GOLD, a His297 estar próxima do oxigênio em questão. Entretanto, no PyRx, essa interação só seria possível se a porção N-fenilpropanamida sofresse uma torção para

viabilizar essa aproximação. Em ambos os softwares, a interação iônica entre a Asp147 e o nitrogênio protonado está presente, e diversas interações Pi podem ser observadas no grupo fenil das porções etilfenil (Ile144, Val143 e Cys217) e N-propanamida (Ile296 e Val300). A principal diferença entre os dois softwares é em relação à interação da Tyr326 com a porção N-fenilpropanamida. No PyRx, esse aminoácido interage com o oxigênio por meio de uma ligação de hidrogênio, enquanto no GOLD, ele interage com o grupo fenil por interação Pi. Como esperado, o carfentanil assumiu a pose II dentro do receptor em ambos os softwares. As configurações podem ser vistas na Figura 28.

Figura 28 - Interações do carfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD



Os quatro isômeros do 3-metilfentanil diferem substancialmente em relação a suas potências. O cis-3R-4S-3-metilfentanil é aproximadamente vinte vezes mais potente que o fentanil, enquanto o isômero trans-3S-4S é apenas três vezes mais potente. Além deles, ambos os isômeros cis-3S-4R e trans-3R-4R 3-metilfentanil são menos potentes que o fentanil⁷⁶. O estudo de *docking* realizado aqui e mostrado nas Figuras 29 e 30, encontrou algumas diferenças nas interações entre esses isômeros com o receptor μ -opioide que podem ajudar a explicar o comportamento citado.

Os aminoácidos Asp147, Trp318 e Ile322 têm um papel chave na estabilidade dessas estruturas. Esses aminoácidos apresentam interações estéricas hidrofóbicas e não

favoráveis quando localizados próximos ao grupo metila⁸⁰. No isômero mais potente, o *cis*-3R-4S-3-metilfentanil, o grupo metila é localizado distantemente desses aminoácidos, e próximo ao Tyr148, onde eles interagem. Em relação ao segundo isômero mais potente, o *trans*-3S-4S-3-metilfentanil, o grupo metila está localizado mais perto da Asp147 e mais distante da Tyr148, sugerindo uma perda de estabilidade dentro do receptor, quando comparado ao isômero mais potente. Os dois isômeros menos potentes que o fentanil estão localizados mais próximos dos aminoácidos Trp318 e Ile322, onde as interações hidrofóbicas os desestabilizam. De maneira geral, os dois isômeros mais potentes que o fentanil têm o grupo metila interagindo com o Tyr148, enquanto os dois isômeros menos potentes têm o grupo metila interagindo com o Trp318 e Ile322.

As interações entre esses quatro análogos com o receptor convergiram em ambos os softwares. Em todos os casos, a interação iônica da Asp147 com o nitrogênio protonado está presente (com exceção do *cis*-3S-4R-3-metilfentanil em uma corrida no GOLD) e todas as estruturas assumiram a pose II dentro da cavidade do receptor. As principais interações da porção N-fenilpropanamida são com a His297, Val300, Ile296 e Tyr326, enquanto da porção etilfenil são com a Val143 e Ile144.

O estudo toxicodinâmico, ou seja, o estudo sobre o mecanismo de ação das substâncias químicas em relação às moléculas alvo no nosso organismo, pode fornecer informações sobre a toxicidade desses compostos. Essas informações são importantes na determinação de suas potências, por meio da dose letal (LD50) e dose eficaz (ED50) por exemplo, uma vez que seu mecanismo de ação pode causar alterações biológicas e bioquímicas, desencadeando efeitos tóxicos no nosso organismo. No entanto, é importante notar que o estudo toxicodinâmico não é o único responsável por caracterizar a potência de uma substância. A toxicocinética estuda a ação que o organismo realiza sobre a substância química, atuando nas etapas de absorção, distribuição, metabolização e excreção desses compostos. Portanto, a toxicocinética e a toxicodinâmica são complementares.

Figura 29 - Interações da a) cis-3R-4S-3-metilfentanil; b) cis-3S-4R-3-metilfentanil; c) trans-3S-4S-3-metilfentanil; d) trans-3R-4R-3-metilfentanil pelo software PyRx

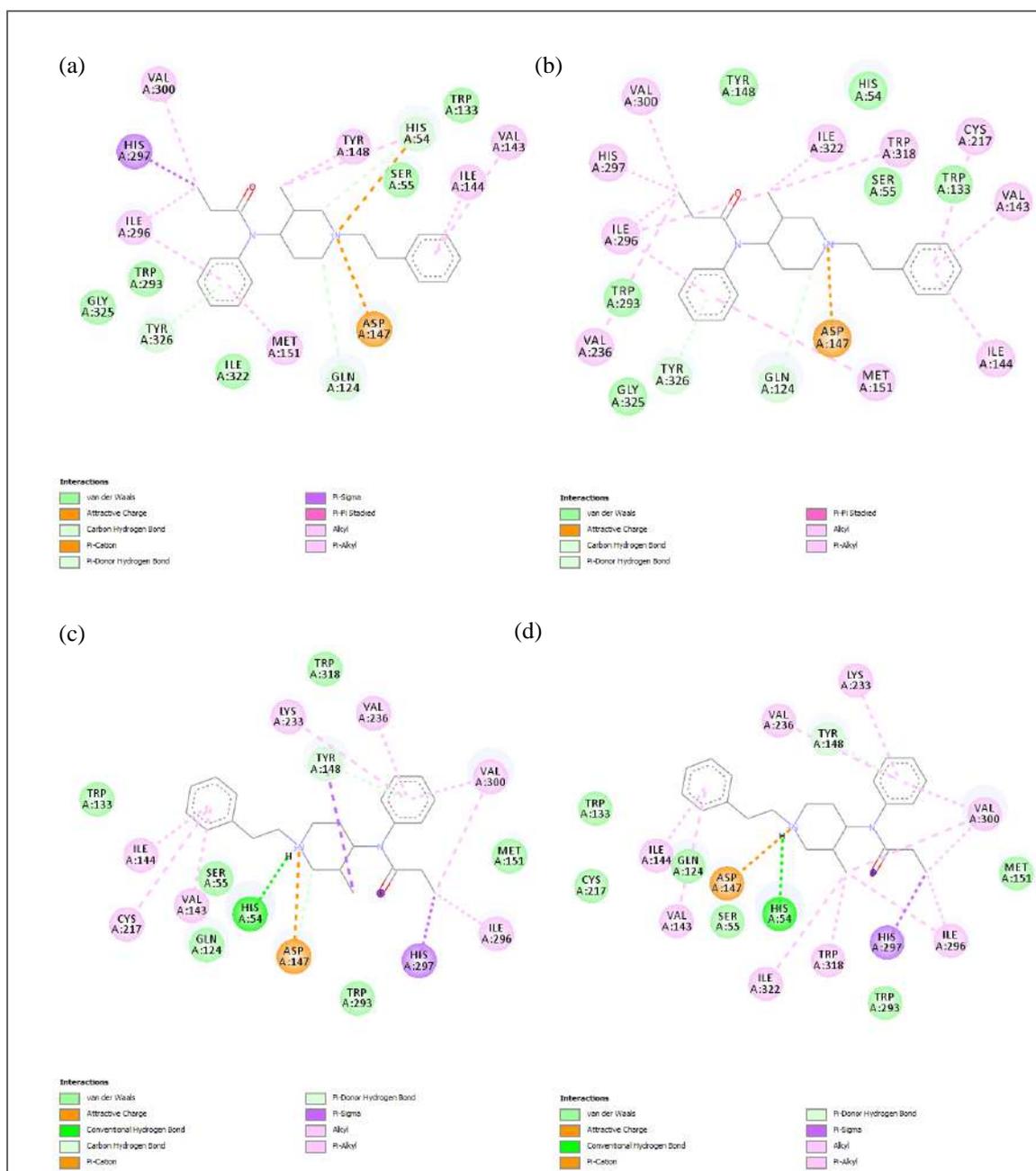
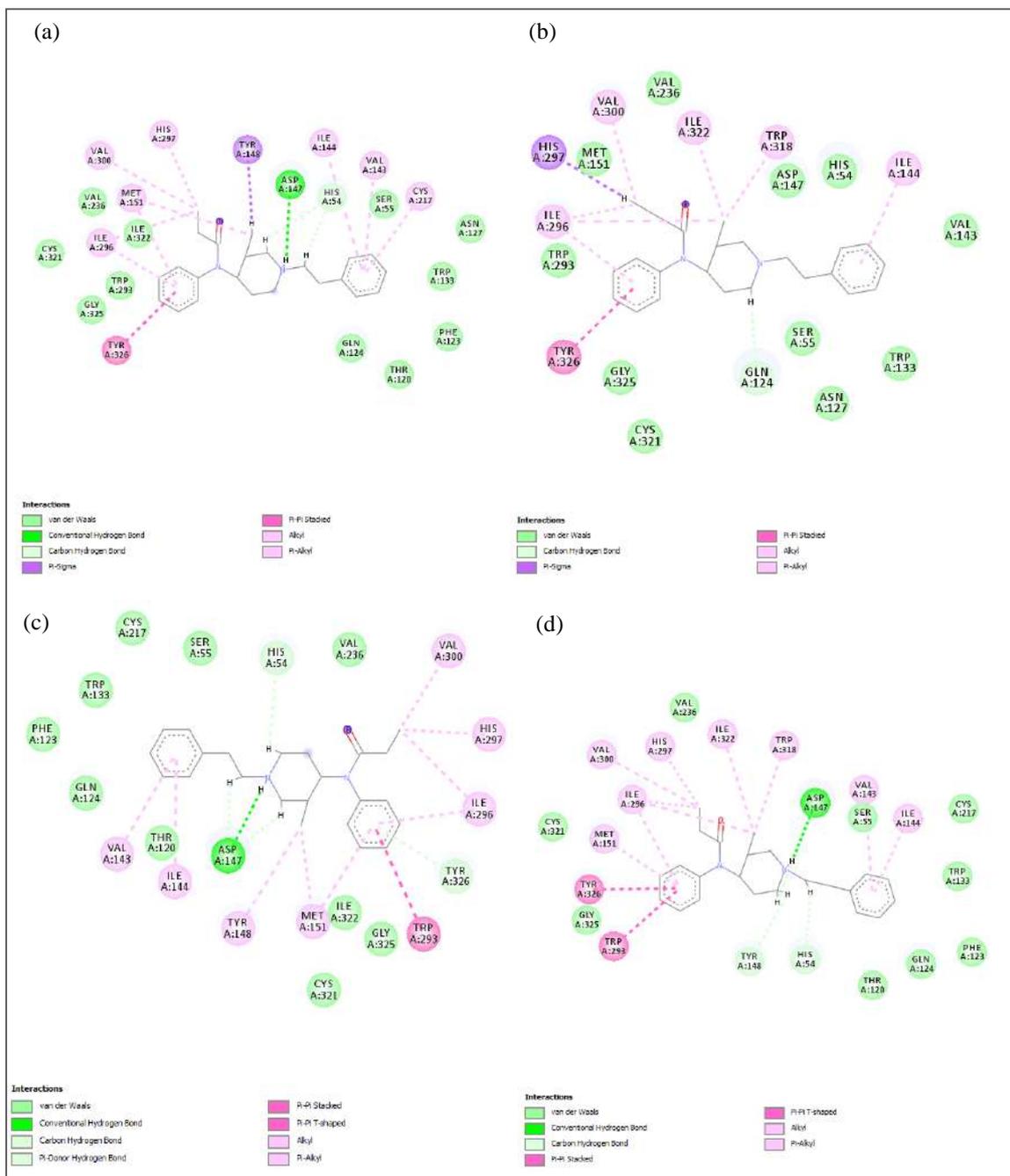


Figura 30 - Interações da a) cis-3R-4S-3-metilfentanil; b) cis-3S-4R-3-metilfentanil; c) trans-3S-4S-3-metilfentanil; d) trans-3R-4R-3-metilfentanil pelo software GOLD

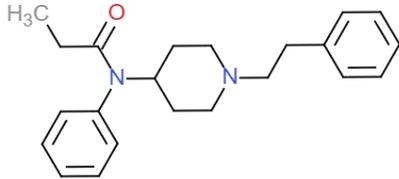
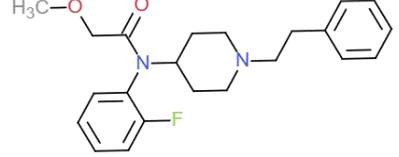
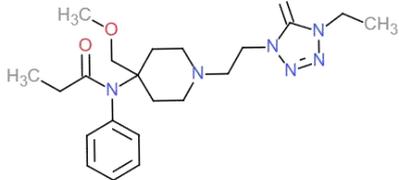
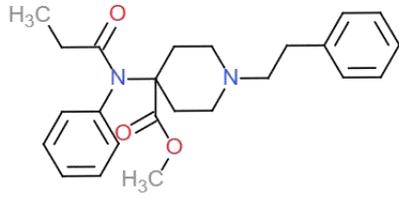
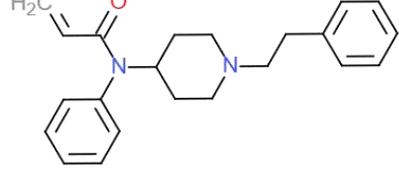


Parte 4. Rota Metabólica

As rotas metabólicas obtidas pelo software Alttox foram comparadas com dados encontrados na literatura científica. Dos 46 opioides estudados neste trabalho, 18 tiveram algum metabólito determinado experimentalmente e publicado por Pichini et al (2019)⁸².

A comparação entre esses resultados pode ser vista na Tabela 17, onde as principais rotas metabólicas estão em ordem decrescente nas colunas.

Tabela 17 - Comparação das rotas metabólicas obtidas de maneira experimental e computacional. As cores representam os Subgrupos que as estruturas pertencem de acordo com os dados quimiométricos: Subgrupo I (verde), Subgrupo II (vermelho), Subgrupo III (preto) e S

Composto	Fórmula Estrutural	Rota Metabólica Experimental	Rota Metabólica Predita
(1) Fentanil		-N-Desalquilação -Hidroxilação (alquila) -Hidrólise (amida)	-Hidroxilação (fenil) -N-Desalquilação -Hidrólise (amida)
(3) Ocfentanil		-O-Desmetilação -Hidroxilação (anel feniletíl)	-O-Desmetilação -Hidroxilação (fenil) -N-Desalquilação
(4) Alfentanil		-N-Desalquilação	-O-Desmetilação -Hidroxilação (fenil) -N-Desalquilação
(11) Carfentanil		-N-Desalquilação -Hidroxilação (piperidina) -Hidrólise (éster) -Hidroxilação + oxidação	-Hidrólise (éster) -Hidroxilação (fenil) -N-Desalquilação
(12) Acriloilfentanil		-N-Desalquilação - (Di)hidroxilação (piperidina e/ou grupo etila) -Hidrólise (amida)	-Oxidação (vinil) -Hidroxilação (fenil) -N-Desalquilação

(16) p-Fluoroisobutirfentanil		-N-Desalquilação -Hidroxilação (piperidina ou grupo etila) -N-Oxidação -Dihidroxilação + Metilação (anel feniletíl)	-N-Desalquilação -Hidroxilação (grupo isobutila ou etila) -Hidrólise (amida)
(23) o-Fluorofentanil		-N-Desalquilação	-Hidroxilação (fenil) -N-Desalquilação
(26) Ciclopentanoilfentanil		-Hidroxilação (ciclopentila) -N-Desalquilação	-Hidroxilação (fenil) -N-Desalquilação -Hidroxilação (ciclopentila)
(29) Ciclopropilfentanil		-N-Desalquilação -Hidroxilação (piperidina)	-Hidroxilação (fenil) -N-Desalquilação
(32) Tetrahidrofuranilfentanil		-N-Desalquilação -Hidroxilação (grupos alquila e arila) -Abertura do anel -Hidrólise (amida)	-Hidroxilação (fenil) -N-Desalquilação -Hidrólise (amida) -Abertura do anel -Hidroxilação (grupos alquila)
(38) Cis-3R-4S-3-Metilfentanil		-N-Desalquilação + Hidroxilação (grupos alquila e arila) -Hidroxilação + Oxidação (grupo alquila) -Hidroxilação + Metilação (fenil)	-Hidroxilação (fenil) -N-Desalquilação -Hidrólise (amida)
(42) Trans-3R-4R-3-Metilfentanil			*O software não fez distinção entre os isômeros

(44) Cis-3S-4R-3-Metilfentanil		*Os trabalhos não fazem distinção entre os isômeros	
(46) Trans-3S-4S-3-Metilfentanil			
(15) Butirfentanil		-N-Desalquilação -Hidroxilação (grupo butila) -Dihidroxilação (anel feniletíl) -Carboxilação (grupo butila) -Carboxilação (grupo butila) + Hidroxilação (anel feniletíl)	-Hidroxilação (fenil) -N-Desalquilação -Hidroxilação (grupo butila) -Hidrólise (amida)
(14) Acetilfentanil		-N-Desalquilação -Hidroxilação (anel feniletíl ou grupo etila) -Hidroxilação + Metoxilação (anel feniletíl)	-N-Desacetilação -Hidroxilação (fenil) -N-Desalquilação
(22) Metoxiacetilfentanil		-O-Desmetilação -Hidrólise (amida) -N-Desalquilação -Hidroxilação (grupos alquila e arila)	-O-Desmetilação -Hidroxilação (fenil) -N-Desalquilação -Hidrólise (amida)
(13) Furanilfentanil		-Hidrólise (amida) -Dihidroxilação (grupo furano, formação de dihidrodíol) -N-Desalquilação	-Hidroxilação (fenil) -N-Desalquilação -Hidrólise (amida)

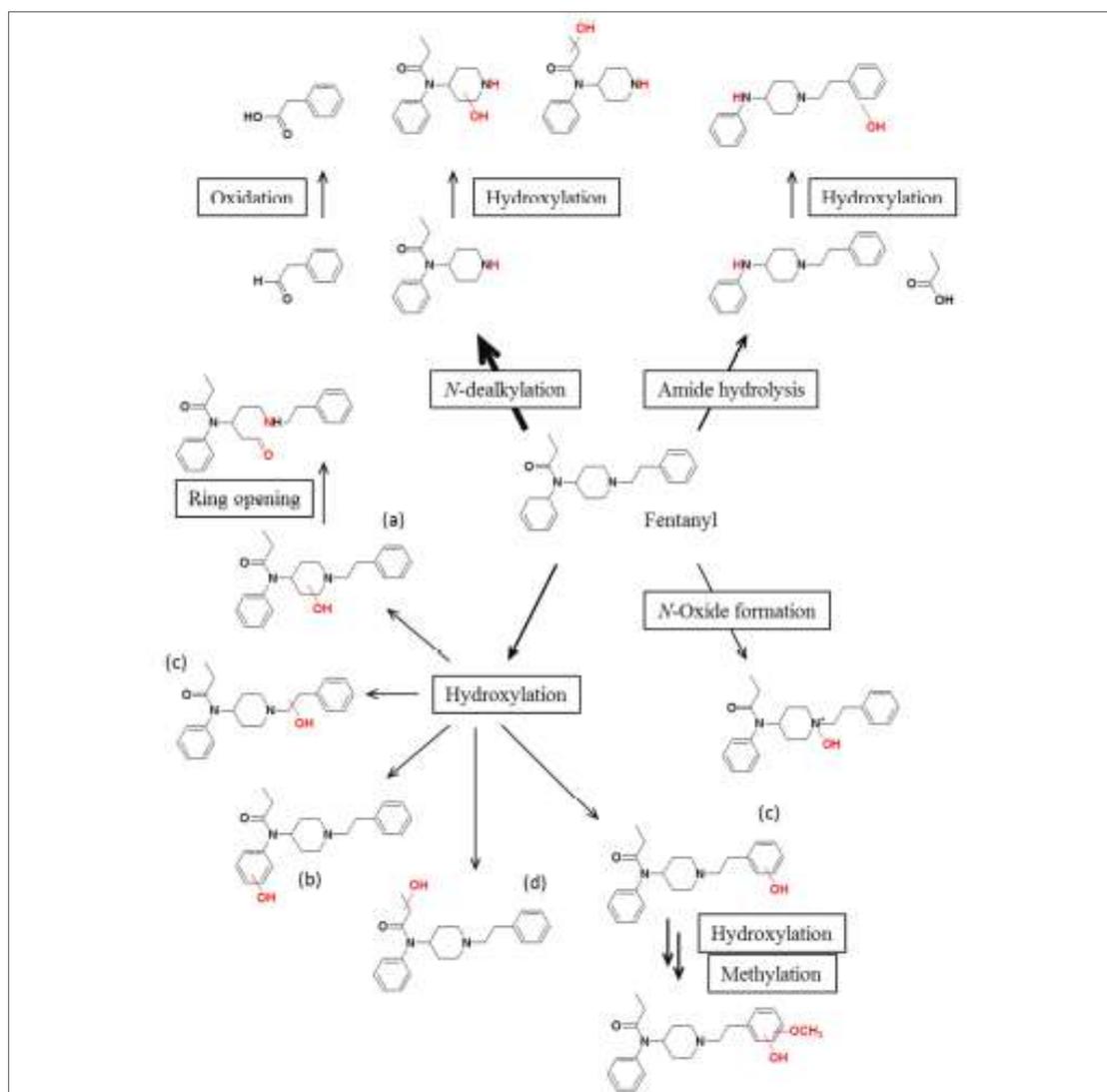
Analisando a Tabela 17 de maneira geral, pode-se observar que as principais rotas metabólicas estiveram presentes nos resultados experimentais e computacionais. Essas rotas são a N-desalquilação, hidroxilação, hidrólise, e O-desmetilação. As únicas reações que foram observadas em apenas um dos métodos foram a oxidação do grupo vinil (no acrilóilfentanil por método computacional), a N-desacetilação (no acetilfentanil por método computacional) e a dihidroxilação do grupo furano (no furanilfentanil por método experimental). Outras reações que são mostradas apenas por um método na tabela também foram observadas pelo outro método, porém, em baixa intensidade.

Observando a principal rota metabólica de cada composto pelos dois métodos, apenas três convergiram para a mesma reação. São eles o ocfentanil (O-desmetilação), o p-fluoroisobutirfentanil (N-desalquilação) e o metoxiacetilfentanil (O-desmetilação). Além disso, fica evidente que o método computacional utilizado prioriza a hidroxilação aromática no grupo fenil da porção propanamida, o que não acontece na metabolização experimental, que prioriza a hidroxilação alifática nos grupos alquila (cadeia alifática da porção propanamida), piperidina e etila (cadeia alifática da porção feniletil) ou hidroxilação aromática no anel feniletil.

Algumas reações características em relação ao grupo do substituinte adicionado foram observadas pelos dois métodos. A O-desmetilação foi observada no ocfentanil e metoxiacetilfentanil devido à adição do grupo metóxi. A hidrólise do grupo éster foi observada apenas no carfentanil, justamente por ser o único análogo a ter esse grupo como substituinte. A hidroxilação do grupo ciclopentila e butila foi observada respectivamente no ciclopentanoilfentanil e butirfentanil, e a abertura do anel do tetrahidrofuranilfentanil por O-desalquilação também foi observada pelos dois métodos.

Para melhor visualização das reações de metabolização mencionadas, um esquema contendo algumas reações está ilustrado na Figura 31.

Figura 31 - Principais rotas metabólicas dos análogos do fentanil



Fonte: Modificado de Pichini et al (2019)

Seguindo a tendência dos resultados encontrados experimentalmente e computacionalmente, assim como a semelhança dos grupos substituintes adicionados, alguns dos principais metabólitos dos 46 análogos do fentanil foram desenhados. Os análogos que sofreram adição de um grupo metóxi, por exemplo, como o 4-metoxibutirfentanil e o p-metoxifentanil, assim como os já mencionados ofentanil (Figura 32) e metoxiacetilfentanil, têm como um de seus metabólitos principais o produto da O-desmetilação. Outro exemplo são os análogos que sofreram adição de uma cadeia alifática saturada na região de substituição R1 da porção propanamida, como o butirfentanil (Figura 33), já mencionado, e o valerilfentanil, hexanoilfentanil e heptanoilfentanil. Um dos principais metabólitos desses análogos são provenientes da

hidroxilação alifática da cadeia carbônica adicionada, além dos metabólitos provenientes de sua posterior carboxilação. Essa observação também pode ser estendida aos isômeros *o*, *m* e *p* fluorobutirfentanil, além da dihidroxilação do anel feniletíl seguido de uma metilação. Entretanto, para os isômeros *o*, *m* e *p* fluoroisobutirfentanil (Figura 34), a reação metabólica de hidroxilação acontece principalmente no anel piperidina e no grupo etila da porção feniletíl. Por último, pode-se estender a dihidroxilação do grupo furano do furanilfentanil (Figura 35) para os análogos contendo grupos furano (2-furanilbenzilfentanil e 3-furanilfentanil) e tiofeno (2-tiofenoilfentanil).

Alguns exemplos podem ser vistos nas Figuras 32-35, além de todos estarem ilustrados no Material Suplementar.

Figura 32 - Principais metabólitos do ocfentanil

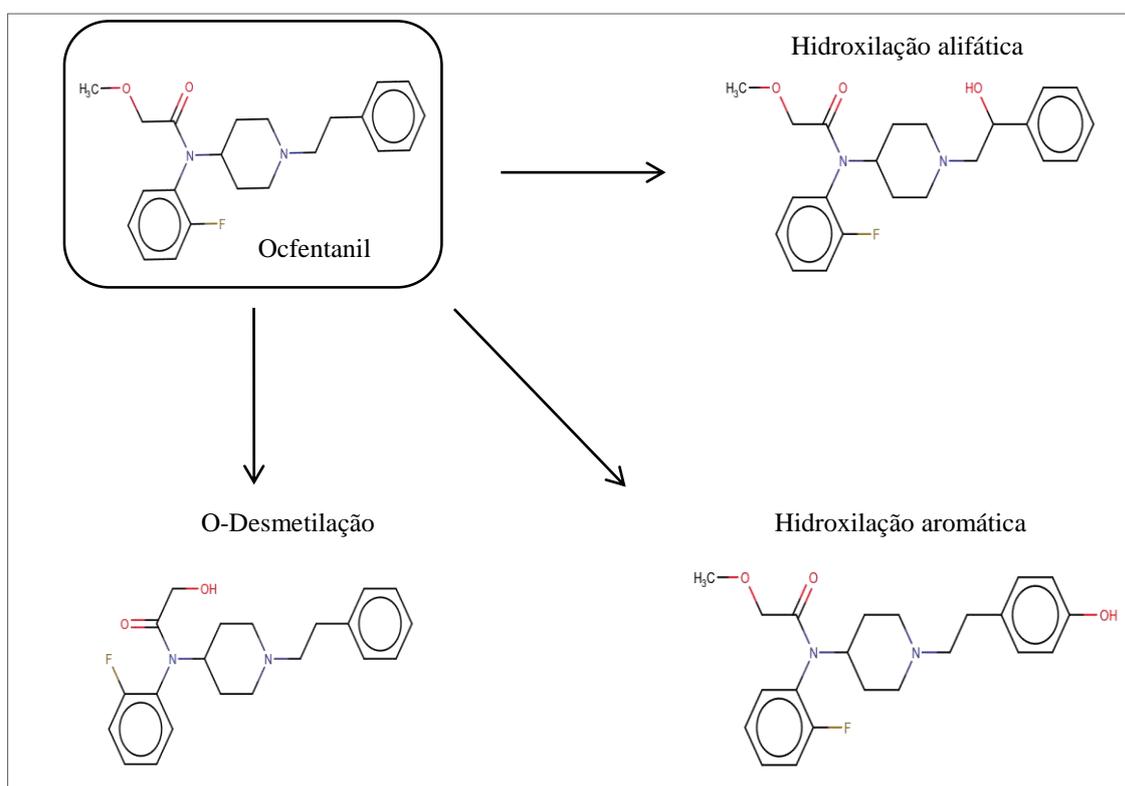


Figura 33 - Principais metabólitos do butirfentanil

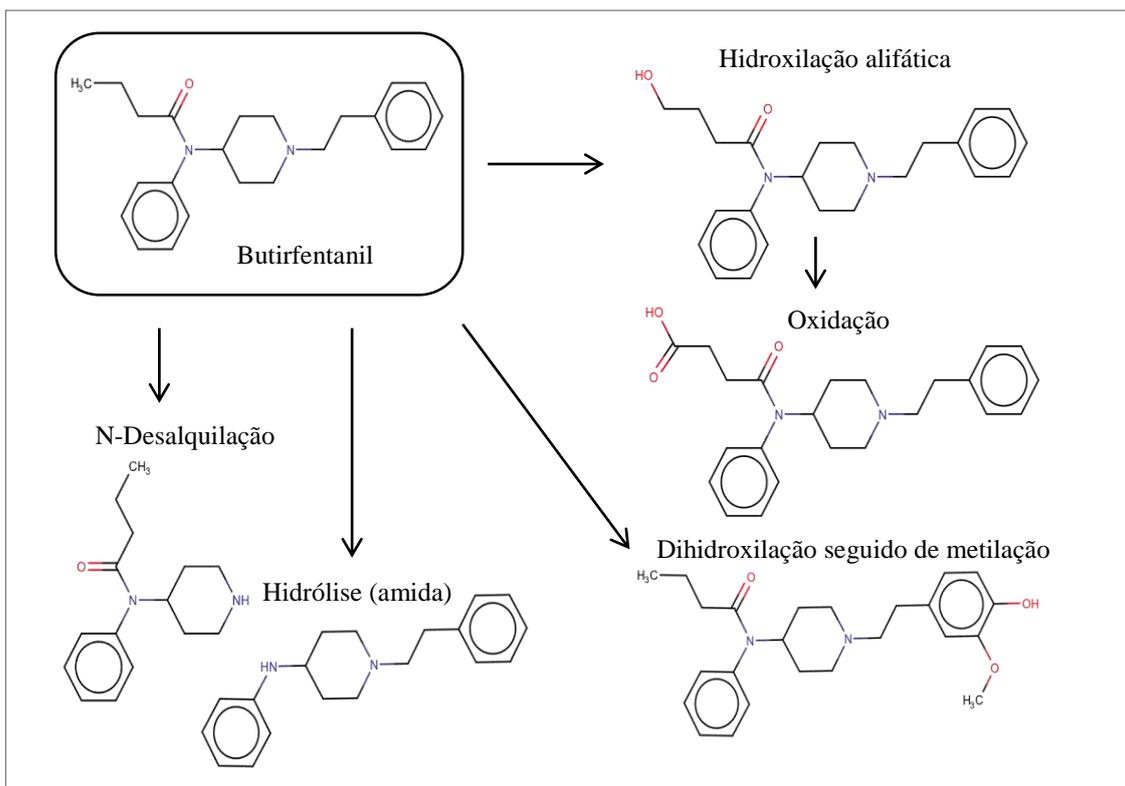


Figura 34 - Principais metabólitos do p-fluoroisobutirfentanil

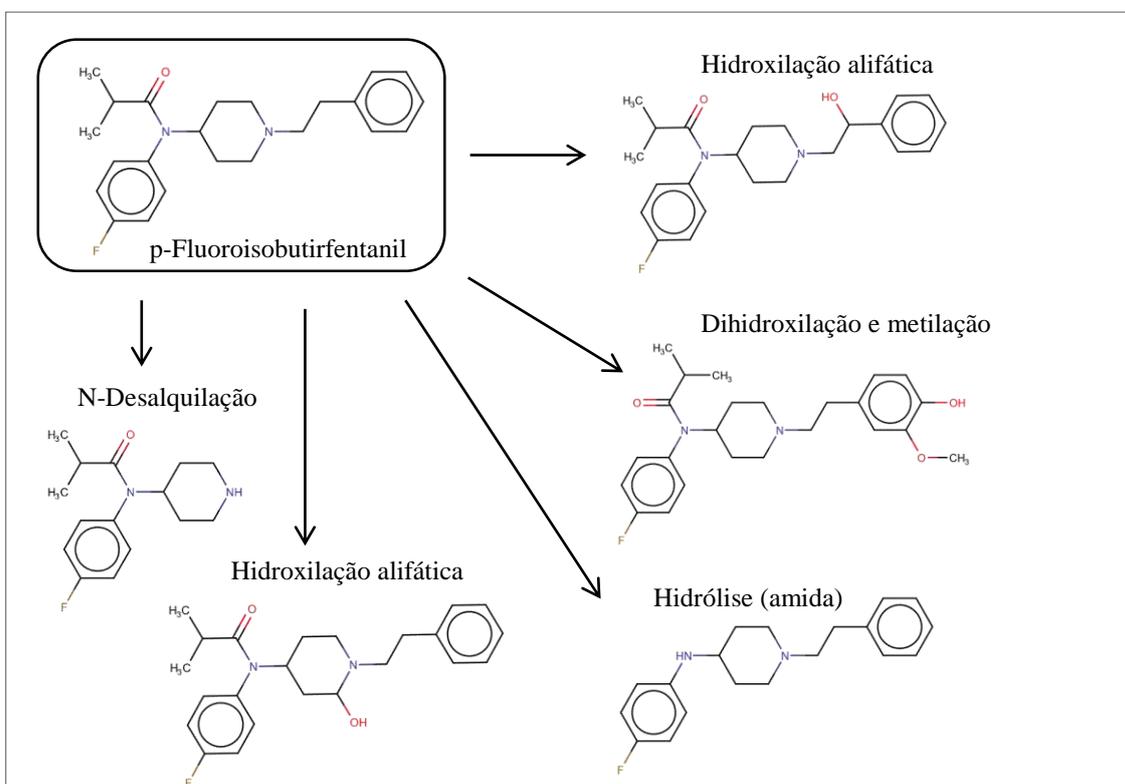
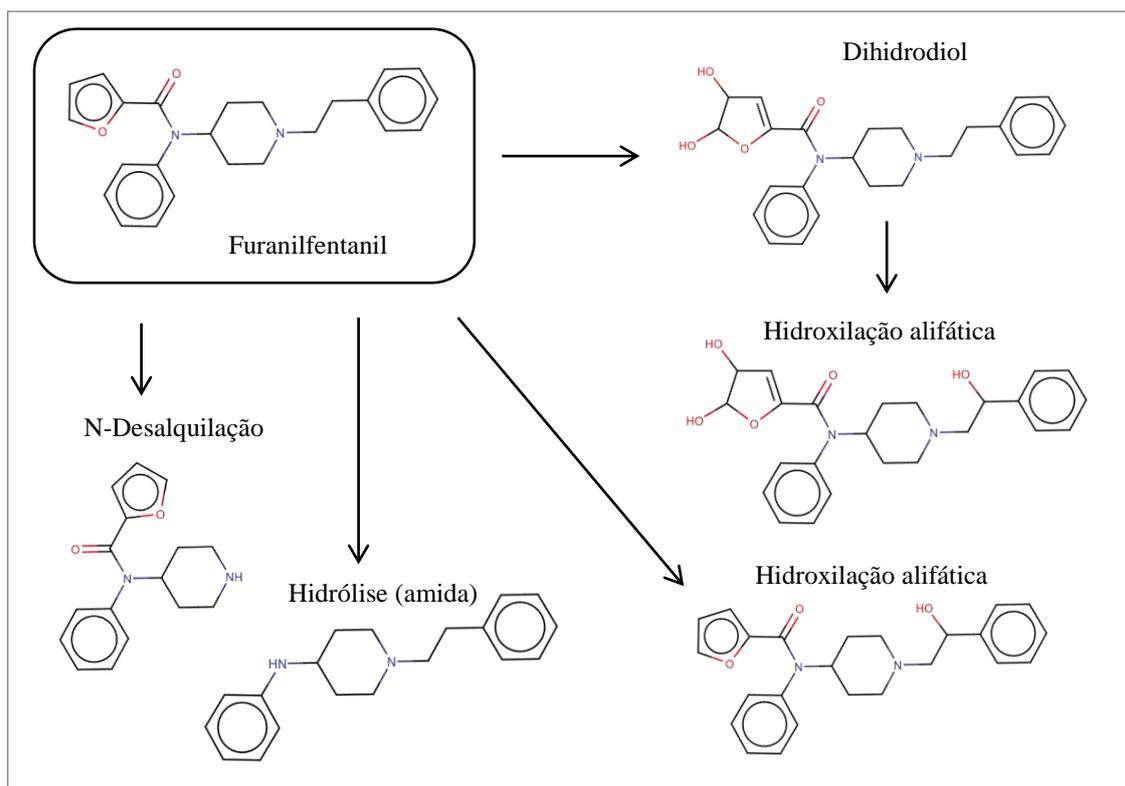


Figura 35 - Principais metabólitos do furanilfentanil



VIII - Conclusão

Neste trabalho, foram utilizados métodos *in silico* para estudar opioides sintéticos a partir do fentanil. Com a ausência de dados sobre substâncias sintéticas, essa metodologia pode apresentar vantagens no que diz respeito à previsibilidade de propriedades e comportamentos de moléculas desconhecidas. Na primeira parte do trabalho, usamos um planejamento fatorial 2^4 para encontrar as melhores condições de cálculo. O tratamento escolhido por meio do planejamento fatorial foi o B3LYP, 6-311G**, LooseSCF e NormalOpt. Esse tratamento foi utilizado para otimizar todas as moléculas e obter seus respectivos espectros de infravermelho. Os resultados encontrados foram compatíveis com os resultados experimentais retirados da literatura. Para avaliar a resposta à variação da estrutura, usamos as técnicas quimiométricas de aprendizado não supervisionado, mais especificamente HCA e PCA. Ambas mostraram tendência de agrupamento para variação estrutural principalmente relacionada ao grupo de substituição em R1. O SIMCA confirmou corretamente os agrupamentos encontrados pelo HCA e PCA. Dessa forma, temos que os métodos *in silico* foram hábeis em discriminar os

opioides sintéticos estudados de acordo com a variação estrutural, o que pode fornecer importante referência para a identificação dessas substâncias.

As interações dessas drogas com o alvo biológico também foram investigadas. Realizamos um procedimento de *docking* com três softwares diferentes, mais precisamente iGemdock, PyRx e GOLD. Os resultados de energia de ligação obtidos no programa PyRx foram considerados mais reprodutíveis, enquanto os resultados do iGemdock mostraram a melhor concordância com os dados encontrados em uma publicação recente. Fica claro que mais de um software deve ser utilizado para esse tipo de estudo, visto que houve consideráveis divergências entre as energias de ligações das moléculas estudadas pelos três softwares. Entretanto, os resultados das poses e interações entre as moléculas e os aminoácidos do receptor opioide foram satisfatórios, uma vez que muitas convergências foram encontradas entre os softwares PyRx e GOLD.

A previsão qualitativa dos metabólitos do fentanil e seus análogos pelo software Alttox foi satisfatória. Entretanto, é necessário um conhecimento prévio do grupo estrutural das moléculas em estudo, assim como as principais rotas metabólicas que este grupo estará sujeito. Dessa maneira, é possível filtrar e interpretar os dados previstos com maior eficácia.

Podemos dizer que os métodos *in silico* foram capazes de fornecer informações sobre o comportamento dessas drogas quanto à detecção e mecanismos de ação biológica relacionados ao receptor e aos metabólitos. Esses tipos de avaliações podem auxiliar no conhecimento de propriedades de substâncias sintéticas, levando a uma maior segurança no que diz respeito à interpretação das principais características desses compostos. Essa segurança pode auxiliar tanto em mecanismos de investigação quanto orientar tomadas de decisão em procedimentos de redução de danos e de saúde pública relacionados a essas substâncias.

IX – Referências Bibliográficas

1. Armenian, P., Vo, K. T., Barr-Walker, J. & Lynch, K. L. Fentanyl, fentanyl analogs and novel synthetic opioids: A comprehensive review. *Neuropharmacology* **134**, 121–132 (2018).
2. Stanley, T. H. The fentanyl story. *J. Pain* **15**, 1215–1226 (2014).
3. Lee, D. *et al.* Illicit fentanyl-related fatalities in Florida: Toxicological findings. *J. Anal. Toxicol.* **40**, 588–594 (2016).

4. de Waal, P. W. *et al.* Molecular mechanisms of fentanyl mediated β -arrestin biased signaling. *PLoS Comput. Biol.* **16**, e1007394 (2020).
5. Suzuki, J. & El-Haddad, S. A review: Fentanyl and non-pharmaceutical fentanyls. *Drug Alcohol Depend.* **171**, 107–116 (2017).
6. Bagley, J. R. *et al.* Evolution of the 4anilidopiperidine class of opioid analgesics. *Med. Res. Rev.* **11**, 403–436 (1991).
7. Hill, R., Santhakumar, R., Dewey, W., Kelly, E. & Henderson, G. Fentanyl depression of respiration: Comparison with heroin and morphine. *Br. J. Pharmacol.* **177**, 254–266 (2020).
8. Zawilska, J. B. An expanding world of novel psychoactive substances: Opioids. *Front. Psychiatry* **8**, (2017).
9. Burns, S. M., Cunningham, C. W., Mercer, S. L. Dark Classics in Chemical Neuroscience: Fentanyl. *ACS Chem. Neurosci.* (2018).
10. Bick, M. J. *et al.* Computational design of environmental sensors for the potent opioid fentanyl. *Elife* **6**, 1–23 (2017).
11. Došen-Mićović, L. Molecular modeling of fentanyl analogs. *J. Serbian Chem. Soc.* **69**, 843–854 (2004).
12. Vucković, S. *et al.* Fentanyl analogs: structure-activity-relationship study. *Curr. Med. Chem.* **16**, 2468–74 (2009).
13. Henderson, G. L. Fentanyl-related deaths: Demographics, circumstances and toxicology of 112 cases. *J. Forensic Sci.* (1991).
14. Prekupec, M. P., Mansky, P. A. & Baumann, M. H. Misuse of Novel Synthetic Opioids: A Deadly New Trend. *J. Addict. Med.* **11**, 256–265 (2017).
15. Lucyk, S. N. & Nelson, L. S. Novel Synthetic Opioids: An Opioid Epidemic Within an Opioid Epidemic. *Ann. Emerg. Med.* **69**, 91–93 (2017).
16. Rudd, R. A., Aleshire, N., Zibbell, J. E. & Gladden, R. M. Increases in Drug and Opioid Overdose Deaths — United States, 2000–2014. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **64**, 1378–1382 (2015).
17. Moody, M. T., Diaz, S., Shah, P., Papsun, D. & Logan, B. K. Analysis of fentanyl analogs and novel synthetic opioids in blood, serum/plasma, and urine in forensic casework. *Drug Test. Anal.* 1–10 (2018). doi:10.1002/dta.2393
18. Fogarty, M. F., Papsun, D. M. & Logan, B. K. Analysis of Fentanyl and 18 Novel Fentanyl Analogs and Metabolites by LC-MS-MS, and report of Fatalities Associated with Methoxyacetylfentanyl and Cyclopropylfentanyl. *J. Anal. Toxicol.* **42**, 592–604 (2018).
19. Casale, J. F., Mallette, J. R. & Guest, E. M. Analysis of illicit carfentanil: Emergence of the death dragon. *Forensic Chem.* **3**, 74–80 (2017).
20. O'Donnell, J., Gladden, R. M., Goldberger, B. A., Mattson, C. L. & Kariisa, M. Notes from the Field: Opioid-Involved Overdose Deaths with Fentanyl or Fentanyl Analogs Detected — 28 States and the District of Columbia, July 2016–December 2018. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **69**, 271–273 (2020).

21. Guerrieri, D., Rapp, E., Roman, M., Thelander, G. & Kronstrand, R. Acrylfentanyl: Another new psychoactive drug with fatal consequences. *Forensic Sci. Int.* **277**, e21–e29 (2017).
22. Mounteney, J., Giraudon, I., Denissov, G. & Griffiths, P. Fentanyls: Are we missing the signs? Highly potent and on the rise in Europe. *Int. J. Drug Policy* **26**, 626–631 (2015).
23. Drug Enforcement Administration. Designation of Benzylfentanyl and 4-Anilinopiperidine, Precursor Chemicals Used in the Illicit Manufacture of Fentanyl, as List I Chemicals. *Diversion Control Division* (2020). Available at: https://www.deadiversion.usdoj.gov/fed_regs/rules/2020/fr0415.htm. (Accessed: 4th November 2020)
24. Macêdo, M. L. S., Lopes, L. S., Giudice, G. H., Souza, R. M. *GRUPO DE TRABALHO PARA CLASSIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS CONTROLADAS*. (2019).
25. United Nations Office on Drugs and Crime. Fentanyl and its analogues - 50 years on. 12 (2017).
26. National Agency of Sanitary Vigilance. RDC n° 227. 76–83 (2018).
27. Amberg, A. *Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinect Assays*. (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013). doi:10.1007/978-3-642-25240-2
28. Idakwo, G. *et al.* A review on machine learning methods for in silico toxicity prediction. *J. Environ. Sci. Heal. Part C* **36**, 169–191 (2018).
29. Rodrigues, C. H. P. & Bruni, A. T. In silico toxicity as a tool for harm reduction: A study of new psychoactive amphetamines and cathinones in the context of criminal science. *Sci. Justice* **59**, 234–247 (2019).
30. de Ruyck, J., Brysbaert, G., Blossey, R. & Lensink, M. F. Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry* **9**, 1 (2016).
31. Kazmi, S. R., Jun, R., Yu, M. S., Jung, C. & Na, D. In silico approaches and tools for the prediction of drug metabolism and fate: A review. *Computers in Biology and Medicine* **106**, 54–64 (2019).
32. de Castro, J. S., Rodrigues, C. H. P. & Bruni, A. T. In Silico Infrared Characterization of Synthetic Cannabinoids by Quantum Chemistry and Chemometrics. *J. Chem. Inf. Model.* **60**, 2100–2114 (2020).
33. Bruni, A. T., de Carvalho, P. O. M., Rodrigues, C. H. P. & Leite, V. B. P. In silico methods in forensic science: Quantum chemistry and multivariate analysis applied to infrared spectra of new amphetamine- and cathinone-derived psychoactive substances. *Forensic Chem.* **9**, 21–34 (2018).
34. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Legal Approaches To Controlling New Psychoactive Substances - updated 2016. *Perspect. Drugs* 4 (2016).
35. Abdulrahim, D. & Bowden-jones, O. *The misuse of synthetic opioids: harms and clinical management of fentanyl, fentanyl analogues and other novel synthetics*

- opioids*. (2018).
36. Jannetto, P. J. *et al.* The fentanyl epidemic and evolution of fentanyl analogs in the United States and the European Union. *Clin. Chem.* **65**, 242–253 (2019).
 37. Green, T. C. *et al.* An assessment of the limits of detection, sensitivity and specificity of three devices for public health-based drug checking of fentanyl in street-acquired samples. *Int. J. Drug Policy* **77**, 102661 (2020).
 38. (EMCDDA), E. M. C. for D. and D. A. *European Drug Report. European Union Publications Office* (2019). doi:10.1097/JSM.0b013e31802b4fda
 39. Young, D. C. *CHEMISTRY COMPUTATIONAL CHEMISTRY A Practical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems*. **9**, (John Wiley & Sons, Ltd, 2001).
 40. Lewars, E. G. *Computational Chemistry: Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics*. (Springer, 2011). doi:10.1007/978-90-481-3862-3
 41. Cramer, C. J. *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2004).
 42. González, M. A. Force fields and molecular dynamics simulations. *Collect. SFN* **12**, 169–200 (2011).
 43. Casewit, C. J., Colwell, K. S. & Rappé, A. K. Application of a Universal Force Field to Main Group Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10046–10053 (1992).
 44. Bjornsson, R.; Kraemer, T.; Sparta, M.; Schapiro, I.; Berilone, J.; Rose, B. ORCA Input Library.
 45. Jensen, F. *Introduction to computational chemistry*. (Wiley, 2017).
 46. Thiel, W. Semiempirical quantum-chemical methods. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **4**, 145–157 (2014).
 47. Perdew, J. P., Burke, K. & Ernzerhof, M. *Generalized Gradient Approximation Made Simple*. (1996).
 48. Lee, C., Yang, eitao & Parr, R. G. *Development of the Colic-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density*. **37**,
 49. Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **98**, 5648–5652 (1993).
 50. Dunning, T. H. Gaussian basis functions for use in molecular calculations. III. Contraction of (10s6p) atomic basis sets for the first-row atoms. *J. Chem. Phys.* (1971). doi:10.1063/1.1676139
 51. Krishnan, R., Binkley, J. S., Seeger, R. & Pople, J. A. Selfconsistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions. *Cit. J. Chem. Phys* **72**, 650 (1980).
 52. Frisch, M. J., Pople, J. A. & Binkley, J. S. Self-consistent molecular orbital methods 25. Supplementary functions for Gaussian basis sets. *J. Chem. Phys.*

- (1984). doi:10.1063/1.447079
53. Miller, J. N. & Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry Sixth edition*.
 54. Fukuda, I. M., Pinto, C. F. F., Moreira, C. D. S., Saviano, A. M. & Lourenço, F. R. Design of experiments (DoE) applied to pharmaceutical and analytical quality by design (QbD). *Brazilian J. Pharm. Sci.* **54**, 1–16 (2018).
 55. Durakovic, B. Design of experiments application, concepts, examples: State of the art. *Period. Eng. Nat. Sci.* **5**, 421–439 (2017).
 56. Root Mean Square Deviation (RMSD). *Wiley StatsRef Stat. Ref. Online* (2014). doi:10.1002/9781118445112.stat00728
 57. Stahle, L., Wold, S. Analysis of Variance (ANOVA). *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **6**, 259–272 (1989).
 58. Wilkinson, L. Revising the Pareto Chart Statistical Computing and Graphics Revising the Pareto Chart. (2012). doi:10.1198/000313006X152243
 59. Silveira, Z. de C. Análise Estatística e Otimização de Parâmetros de Projeto em Componentes de Sistemas Mecânicos. 201 (2003).
 60. Varmuza, K. & Filzmoser, P. *Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics*. (Taylor & Francis Group, 2009).
 61. Prieto-Martínez, F. D., Arciniega, M. & Medina-Franco, J. L. Acoplamiento Molecular: Avances Recientes y Retos. *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas* **21**, 0–23 (2018).
 62. Tu, M., Cheng, S., Lu, W. & Du, M. Advancement and prospects of bioinformatics analysis for studying bioactive peptides from food-derived protein: Sequence, structure, and functions. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **105**, 7–17 (2018).
 63. Chaudhary, K. K. & Mishra, N. A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery. *JSM Chem* **4**, 1029 (2016).
 64. Berman, H. M. *et al.* The Protein Data Bank Helen. *Nucleic Acids Res.* (2000). doi:10.1093/nar/28.1.235
 65. Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M. & Cui, M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Curr. Comput. Aided-Drug Des.* **7**, 146–157 (2012).
 66. Hsu, K., Chen, Y., Lin, S. & Yang, J. iGEMDOCK : a graphical environment of enhancing GEMDOCK using pharmacological interactions and post-screening analysis. **12**, 1–11 (2011).
 67. Jones, G., Willet, P., Glen, R. C., Leach, A. R. & Taylor, R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *J. Molecular Biol.* (1997).
 68. Dallakyan, S. & Olson, A. J. Chapter 19 Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx. **1263**, 243–250 (2015).

69. CCDC. CSD Web interface - intuitive, cross-platform, web-based access to CSD data. (2017).
70. Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **31**, 455–461 (2011).
71. Nocedal, J. & Wright, S. *Numerical optimization*. (Springer Verlag, 1999).
72. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. *Molecular Cell Biology*. (2000).
73. Anslyn, E. V., Dougherty, D. A. *Modern Physical Organic Chemistry*. (2006).
74. Comer, S. D. & Cahill, C. M. Fentanyl: Receptor pharmacology, abuse potential, and implications for treatment. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **106**, 49–57 (2019).
75. United Nations Office on Drugs and Crime. Recommended methods for the Identification and Analysis of Fentanyl and its Analogues in Biological Specimens. (2017).
76. Vardanya, R. . & Hraby, V. . Future Prospects for Pharmaceutical Applications. *Future Med. Chem.* **6**, 385–412 (2014).
77. Bowery, N. G. in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* 1–5 (Elsevier Inc., 2007). doi:10.1016/B978-008055232-3.61745-3
78. Dhaliwal, A. & Gupta, M. *Physiology, Opioid Receptor*. StatPearls (StatPearls Publishing, 2019).
79. Dosen-Micovic, L. Molecular modelling of fentanyl analogs. *J. Serbian Chem. Soc.* **69**, 843–854 (2004).
80. Dosen-Micovic, L., Ivanovic, M. & Micovic, V. Steric interactions and the activity of fentanyl analogs at the μ -opioid receptor. *Bioorganic Med. Chem.* **14**, 2887–2895 (2006).
81. Jarończyk, M., Lipiński, P. F. J., Dobrowolski, J. C. & Sadlej, J. The FMO analysis of the molecular interaction of fentanyl derivatives with the μ -opioid receptor. *Chem. Pap.* **71**, 1429–1443 (2017).
82. Pichini, S., Zaami, S., Pacifici, R., Tagliabracchi, A. & Busardò, F. P. *Editorial: The challenge posed by new synthetic opioids: Pharmacology and toxicology*. *Frontiers in Pharmacology* **10**, (2019).
83. Ogawa, N., Nagase, H., Endo, T., Loftsson, T. & Ueda, H. Crystal structure of fentanyl base. *X-ray Struct. Anal. Online* **25**, 83–84 (2009).
84. Groom, C. R., Bruno, I. J., Lightfoot, M. P. & Ward, S. C. The Cambridge Structural Database. 171–179 (2016). doi:10.1107/S2052520616003954
85. Rappé, A. K., Casewit, C. J., Colwell, K. S., Goddard, W. A. & Skiff, W. M. UFF, a Full Periodic Table Force Field for Molecular Mechanics and Molecular Dynamics Simulations. *J. Am. Chem. Soc.* (1992). doi:10.1021/ja00051a040
86. Hanwell, M. D. *et al.* Avogadro : an advanced semantic chemical editor , visualization , and analysis platform. 1–17 (2012).

87. StatSoft. Inc. STATISTICA. (2004).
88. SWGDRUG. Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs. Available at: <http://www.swgdrug.org/ir.htm>. (Accessed: 3rd July 2019)
89. Bio-Rad Laboratories, I. S. Spectrabase. 2019 (2019). Available at: <http://spectrabase.com/>. (Accessed: 3rd July 2019)
90. Kohn, W., Becke, A. D. & Parr, R. G. Density functional theory of electronic structure. *J. Phys. Chem.* (1996). doi:10.1021/jp9606691
91. Kossmann, S. & Neese, F. Efficient structure optimization with second-order many-body perturbation theory: The RIJCOSX-MP2 method. *J. Chem. Theory Comput.* **6**, 2325–2338 (2010).
92. Grimme, S., Ehrlich, S. & Goerigk, L. Effect of the damping function in dispersion corrected density functional theory. *J. Comput. Chem.* (2011). doi:10.1002/jcc.21759
93. Neese, F. The ORCA program system. **2**, 73–78 (2012).
94. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD : Visual Molecular Dynamics. **7855**, 33–38 (1996).
95. IR Spectrum Table & Chart | Sigma-Aldrich. Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/ir-spectrum-table.html>. (Accessed: 13th August 2020)
96. Infrared Spectroscopy Absorption Table - Chemistry LibreTexts. Available at: https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Ancillary_Materials/Reference/Reference_Tables/Spectroscopic_Parameters/Infrared_Spectroscopy_Absorption_Table. (Accessed: 13th August 2020)
97. Huang, W. *et al.* Structural insights into mu-opioid receptor activation. *Nature* **524**, 315–321 (2015).
98. DeLano, W. L. PyMOL. (2006).
99. Dassault Systèmes BIOVIA. Discovery Studio Visualizer. (2016).
100. Taeger, K. f Human Cerebral Extraction. 1559–1567 (2000).
101. Orłowski, P., Chappell, M., Park, C. S., Grau, V., Payne, S. Modelling of pH dynamics in brain cells after stroke. *Interface Focus* **1**, 408–416 (2011).
102. O’Boyle, N. M. *et al.* Open Babel: An Open chemical toolbox. *J. Cheminform.* **3**, (2011).
103. Matos dos Santos, C. E. Alttox Ltd.
104. NIST. Computational Chemistry Comparison and Benchmark DataBase. (2018). Available at: <https://cccbdb.nist.gov/vibnotes.asp>. (Accessed: 11th July 2019)
105. Bio-Rad Laboratories, I. S. SpectraBase Compuond ID=2KmHuCaQAx. Available at: http://spectrabase.com/spectrum/CCvkKc7ex9K?a=SPECTRUM_CCvkKc7ex9K. (Accessed: 3rd July 2019)

106. Asadi, Z. *et al.* A structural study of fentanyl by DFT calculations, NMR and IR spectroscopy. *J. Mol. Struct.* **1128**, 552–562 (2017).
107. Wiley SpectraBase. Fentanyl - ATR-IR Spectrum - SpectraBase Compound ID=2KrnHuCaQAx SpectraBase Spectrum ID=CCvkKc7ex9K. Available at: <https://spectrabase.com/spectrum/CCvkKc7ex9K>. (Accessed: 11th September 2020)
108. Wiley SpectraBase. Ocfentanil - ATR-IR Spectrum - SpectraBase Compound ID=3IIACgleahh SpectraBase Spectrum ID=Jb335Fopp3A. Available at: <https://spectrabase.com/spectrum/Jb335Fopp3A>. (Accessed: 11th September 2020)
109. Wiley SpectraBase. Alfentanil - ATR-IR Spectrum - SpectraBase Compound ID=D9PZyuqPebb SpectraBase Spectrum ID=LeD48rAOdjc. Available at: <https://spectrabase.com/spectrum/LeD48rAOdjc>. (Accessed: 11th September 2020)
110. Wiley SpectraBase. Valeryl fentanyl - ATR-IR Spectrum - SpectraBase Compound ID=CDfFiee1p7B SpectraBase Spectrum ID=IniJYfbTZQ9. Available at: <https://spectrabase.com/spectrum/IniJYfbTZQ9>. (Accessed: 11th September 2020)
111. Wiley SpectraBase. Furanyl fentanyl - ATR-IR Spectrum - SpectraBase Compound ID=W1zLspFBWJ SpectraBase Spectrum ID=ECHT0UmsHHH. Available at: <https://spectrabase.com/spectrum/ECHT0UmsHHH>. (Accessed: 11th September 2020)
112. Wiley SpectraBase. Acetyl fentanyl - ATR-IR Spectrum - SpectraBase Compound ID=DeCFvKUrpAr SpectraBase Spectrum ID=7XjZ89qKvBd. Available at: <https://spectrabase.com/spectrum/7XjZ89qKvBd>. (Accessed: 11th September 2020)
113. Wiley SpectraBase. Butyryl fentanyl - ATR-IR Spectrum - SpectraBase Compound ID=9EPRnsEGRcY SpectraBase Spectrum ID=JraC6aucIpe. Available at: <https://spectrabase.com/spectrum/JraC6aucIpe>. (Accessed: 11th September 2020)

X – Material Suplementar

FENTANIL

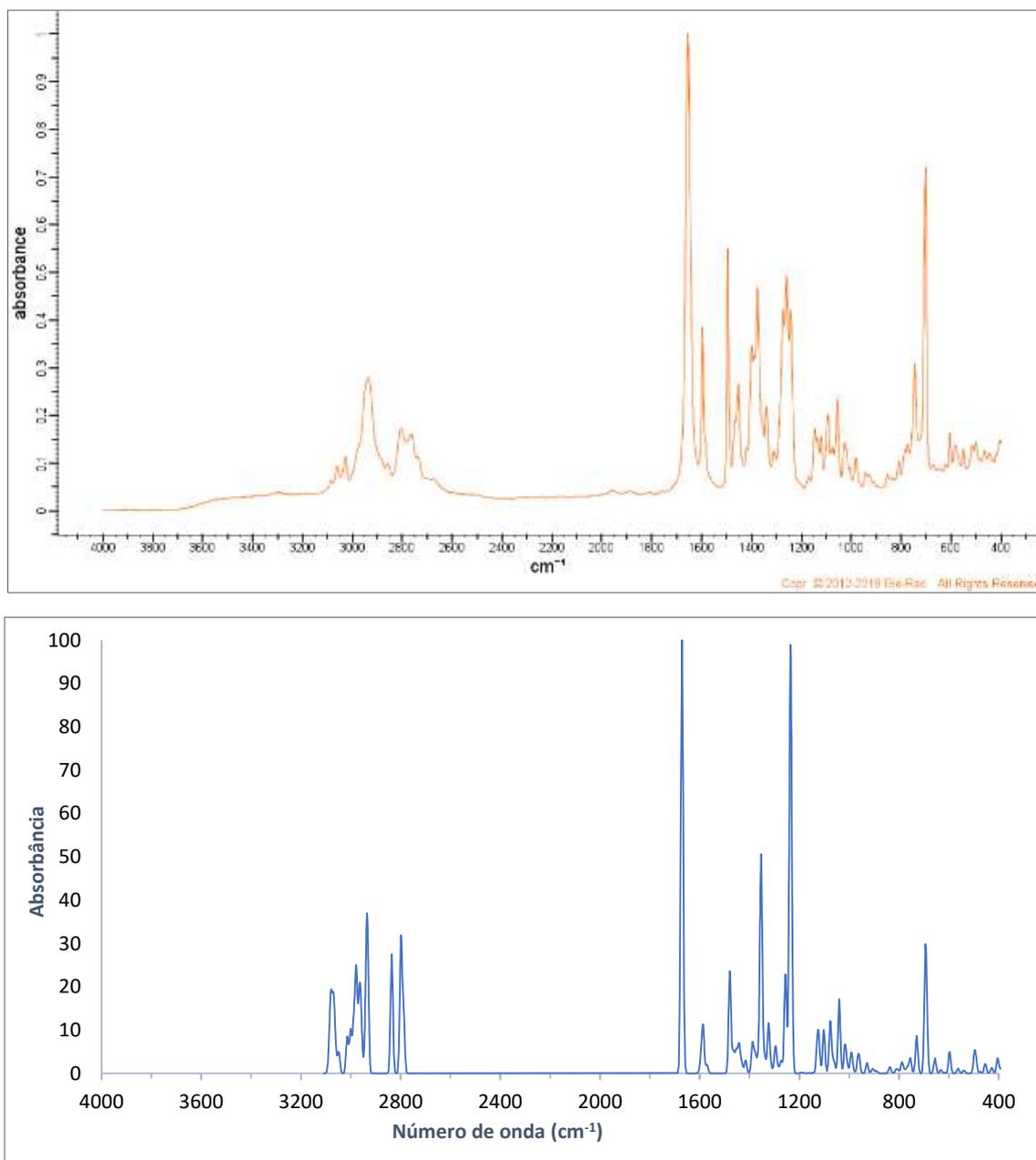


Figura 1. Espectro Infravermelho do fentanil: (a) Bio-Rad[®] experimental¹⁰⁷ e (b) teórico

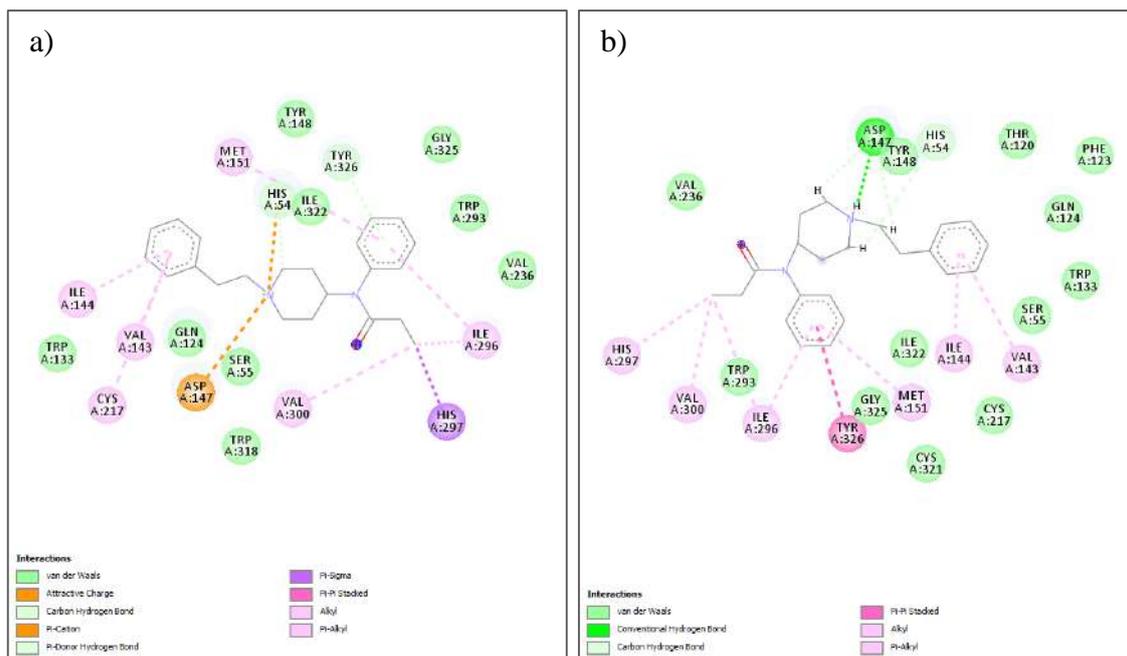


Figura 2. Interação do fentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

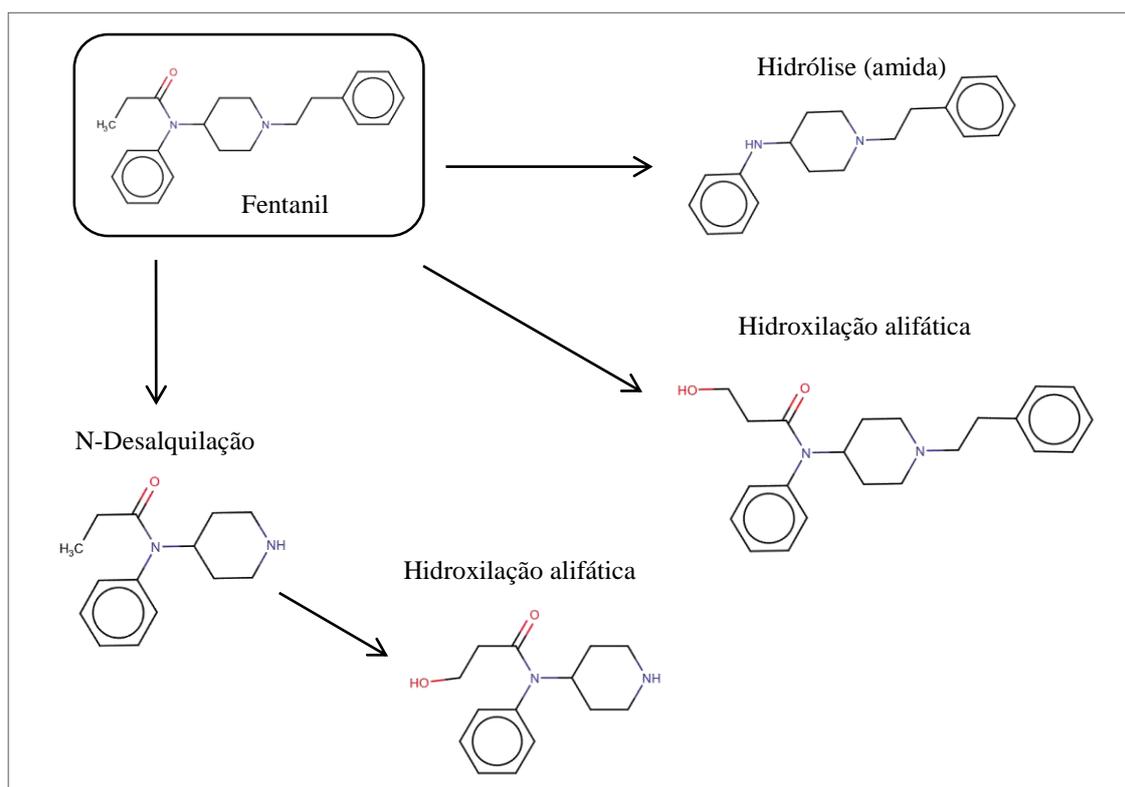


Figura 3. Principais metabólitos do fentanil

HEPTANOILFENTANIL

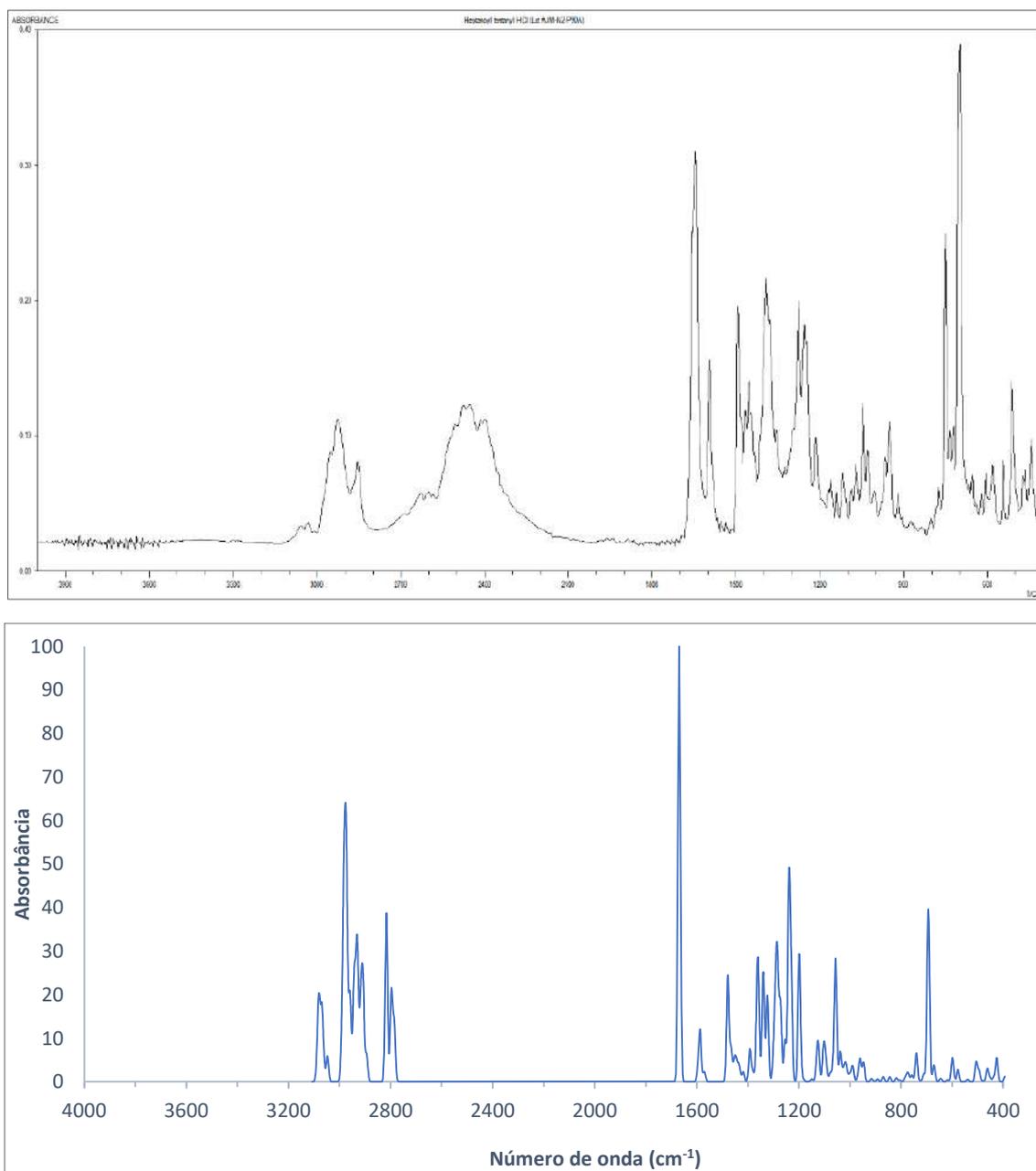


Figura 4. Espectro Infravermelho do heptanoilfentani: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

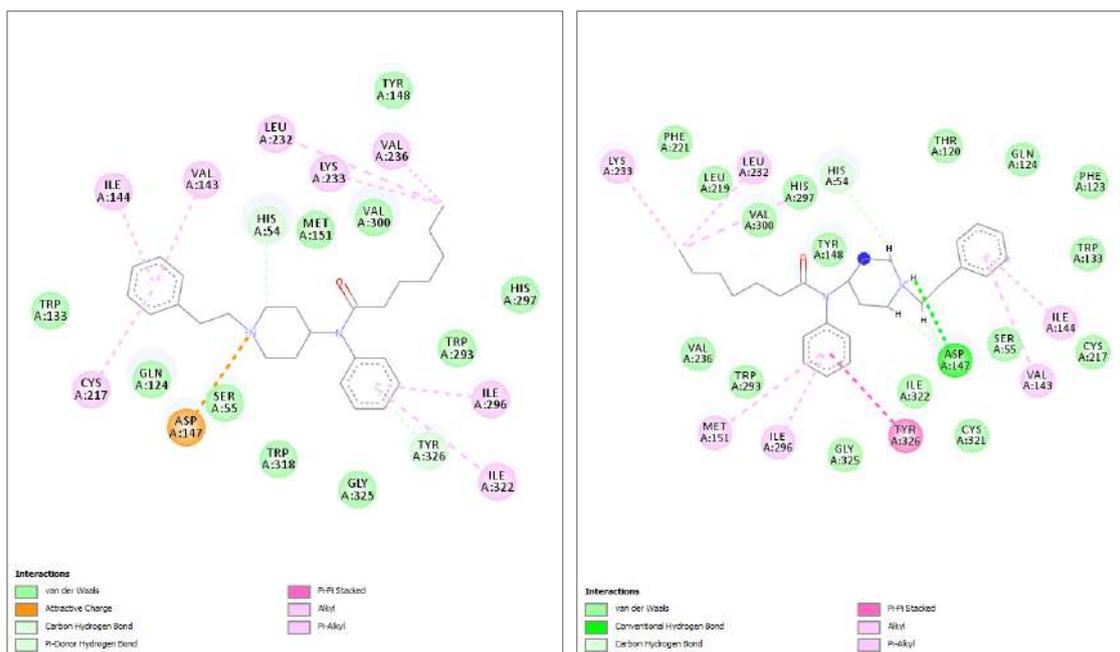


Figura 5. Interação do heptanoifentaniil com o receptor μ -opioides (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

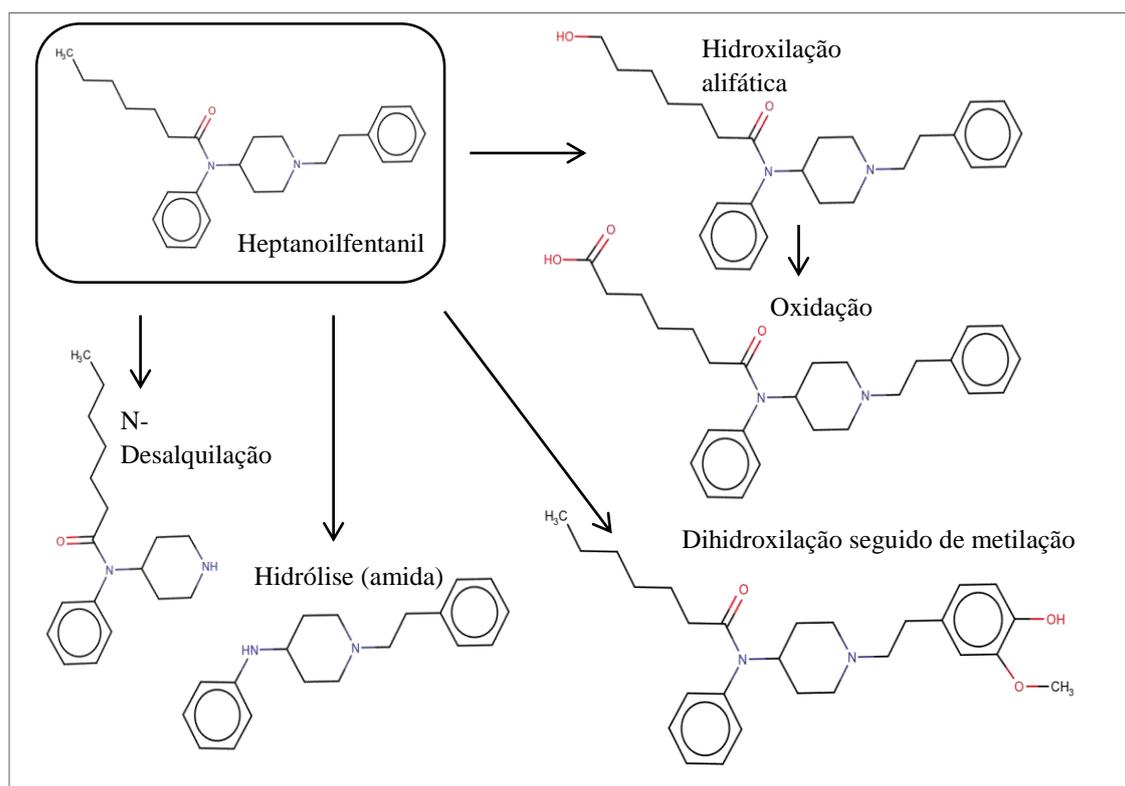


Figura 6. Principais metabólitos do heptanoifentaniil

OCFENTANIL

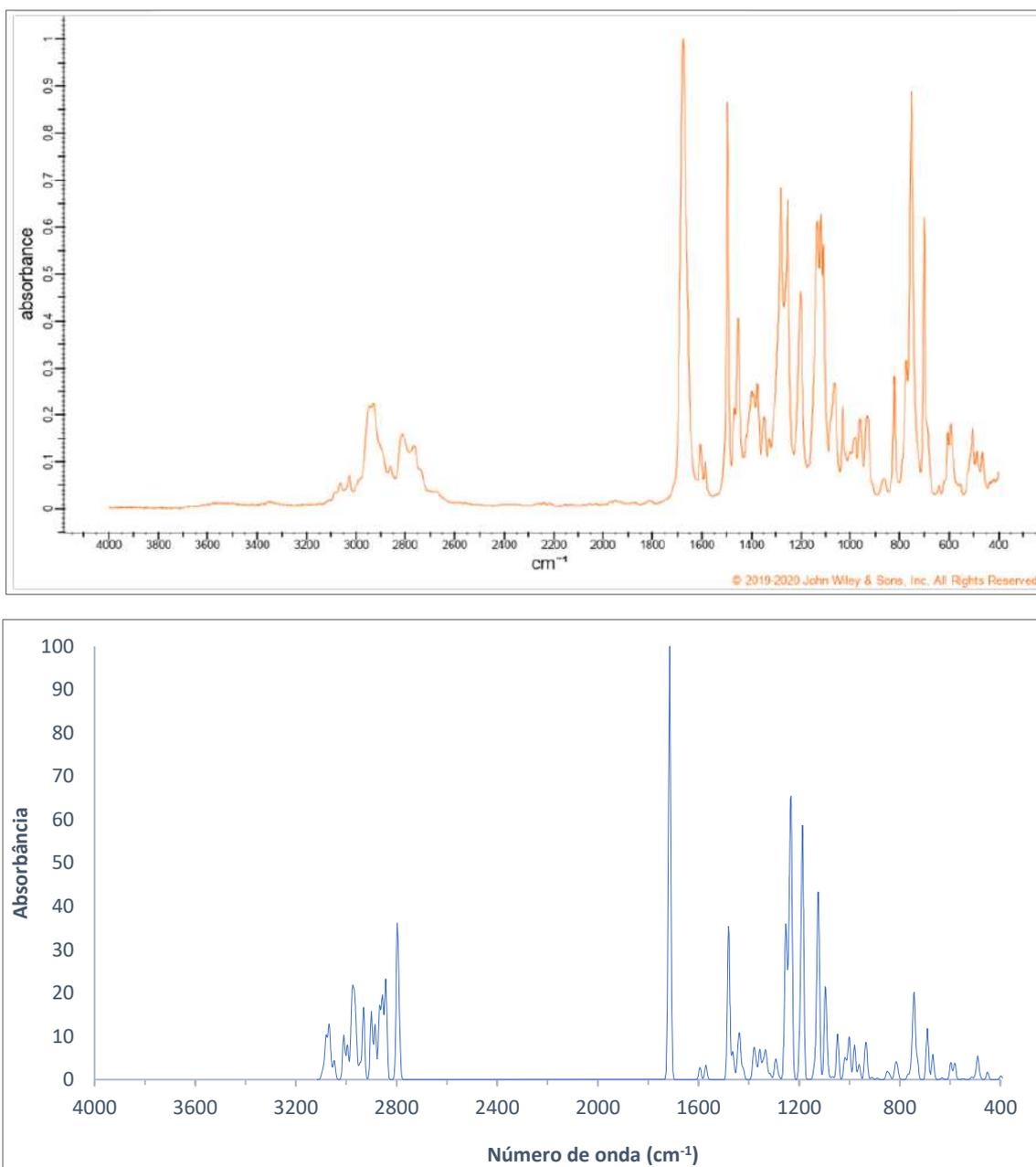


Figura 7. Espectro Infravermelho do ocfentanil: (a) Bio-Rad[®] experimental¹⁰⁸ e (b) teórico

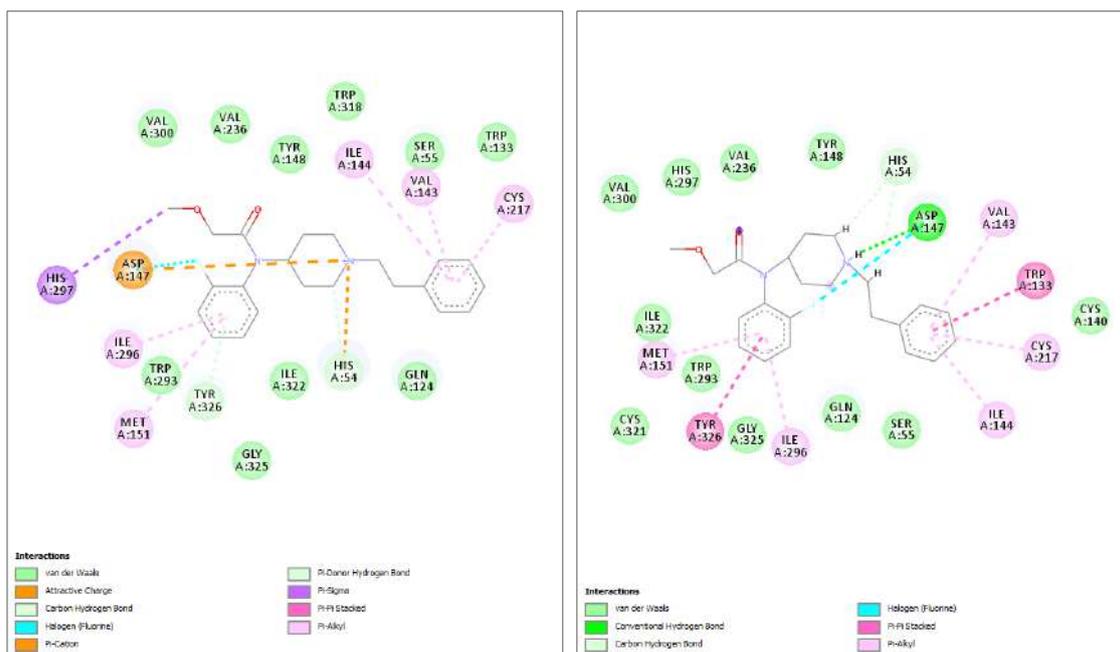


Figura 8. Interação do ocfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

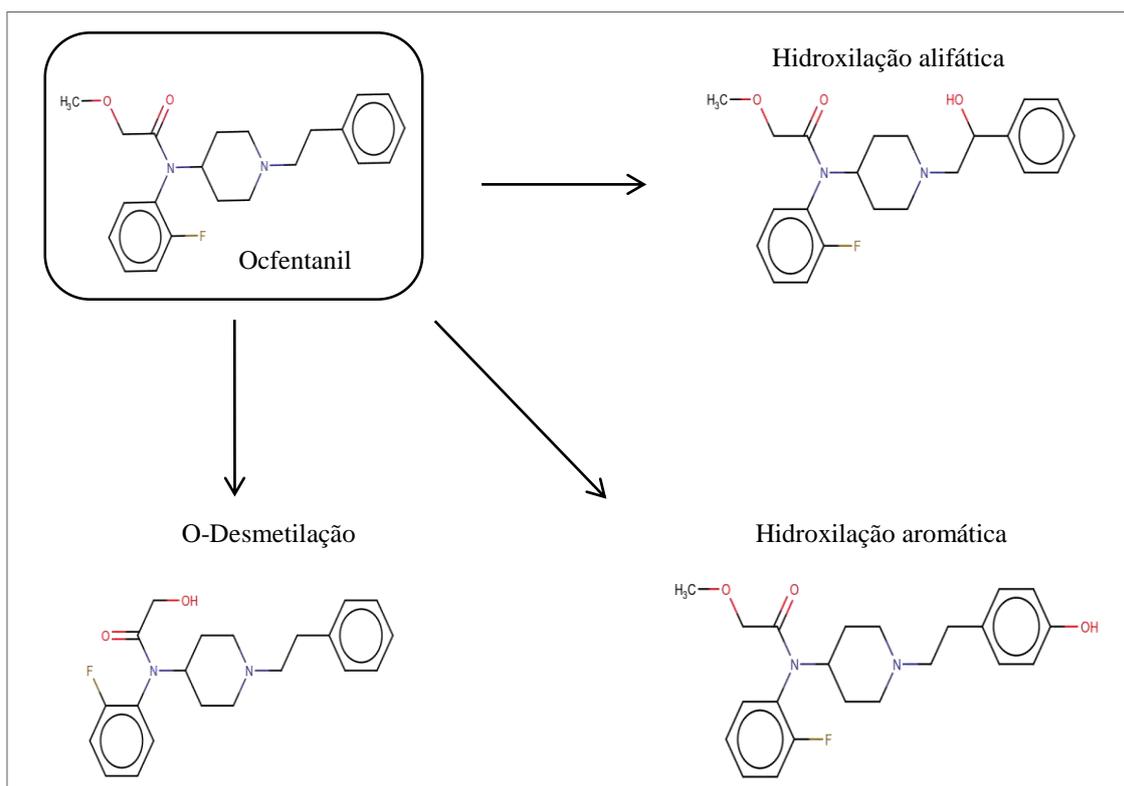


Figura 9. Principais metabólitos do ocfentanil

ALFENTANIL

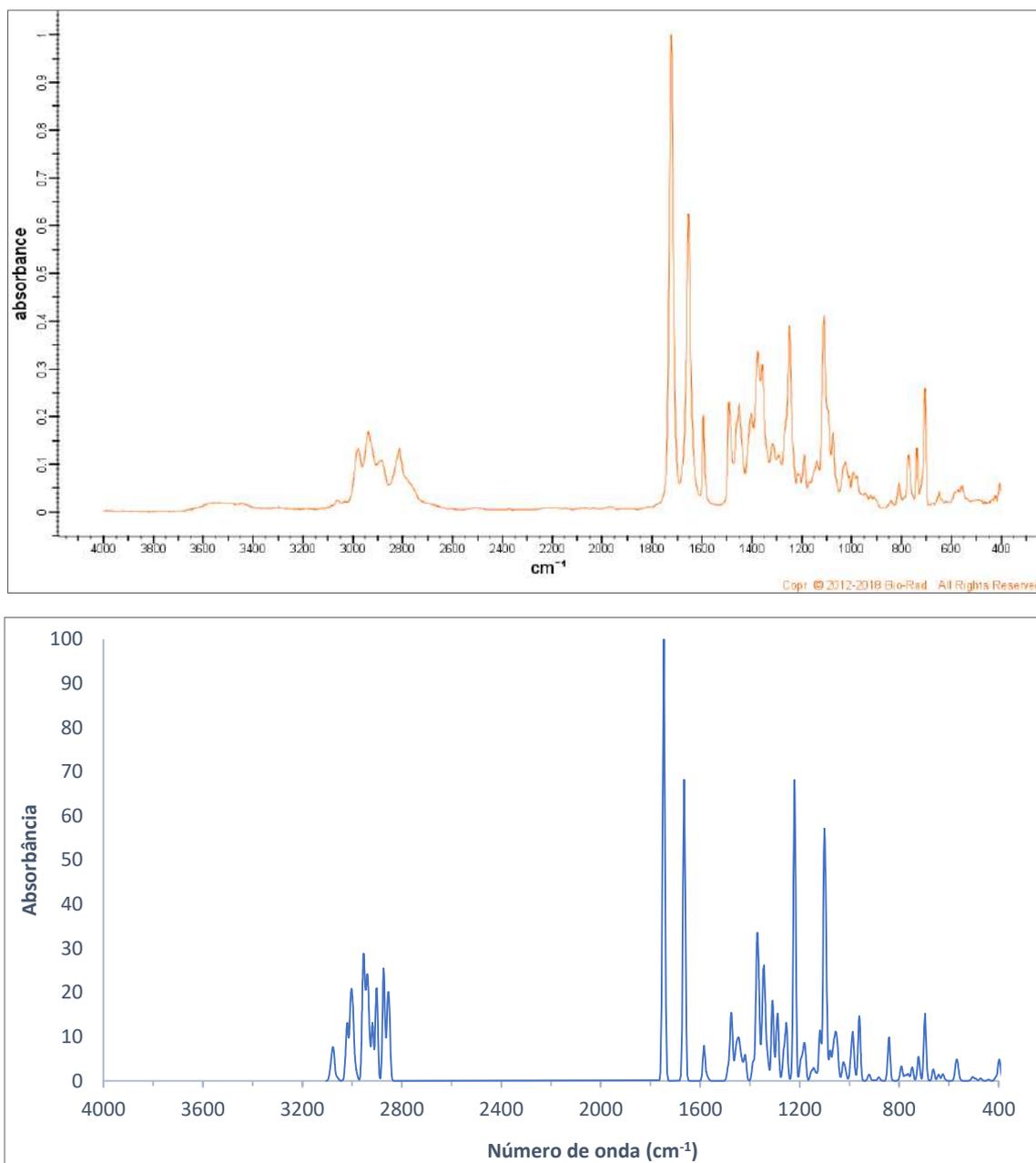


Figura 10. Espectro Infravermelho do alfentanil: (a) Bio-Rad[®] experimental¹⁰⁹ e (b) teórico

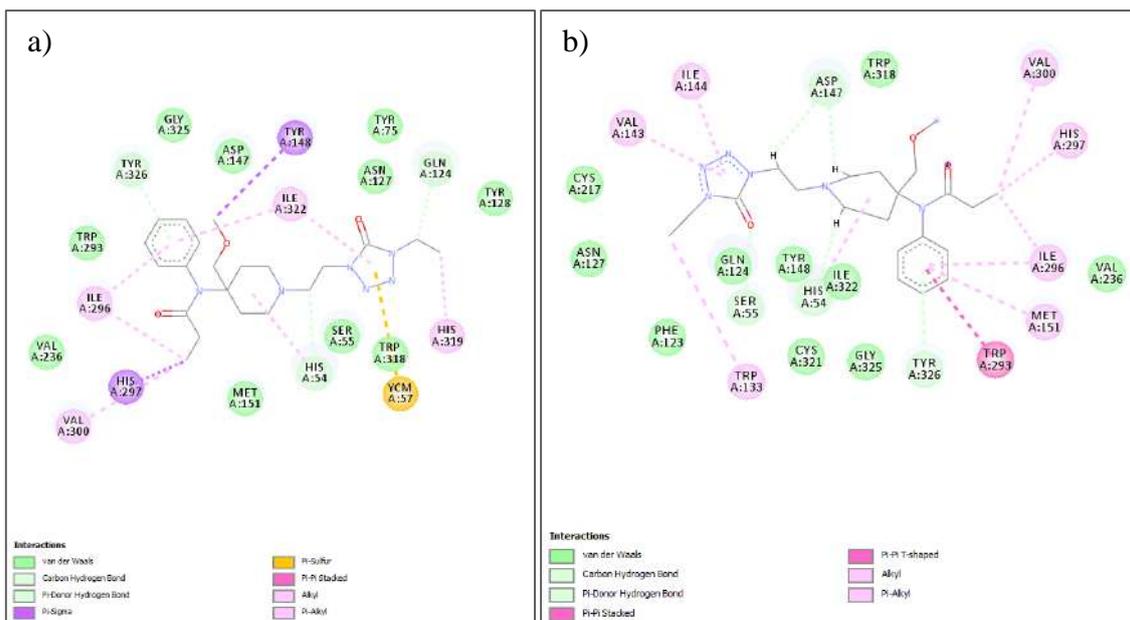


Figura 11. Interações do alfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

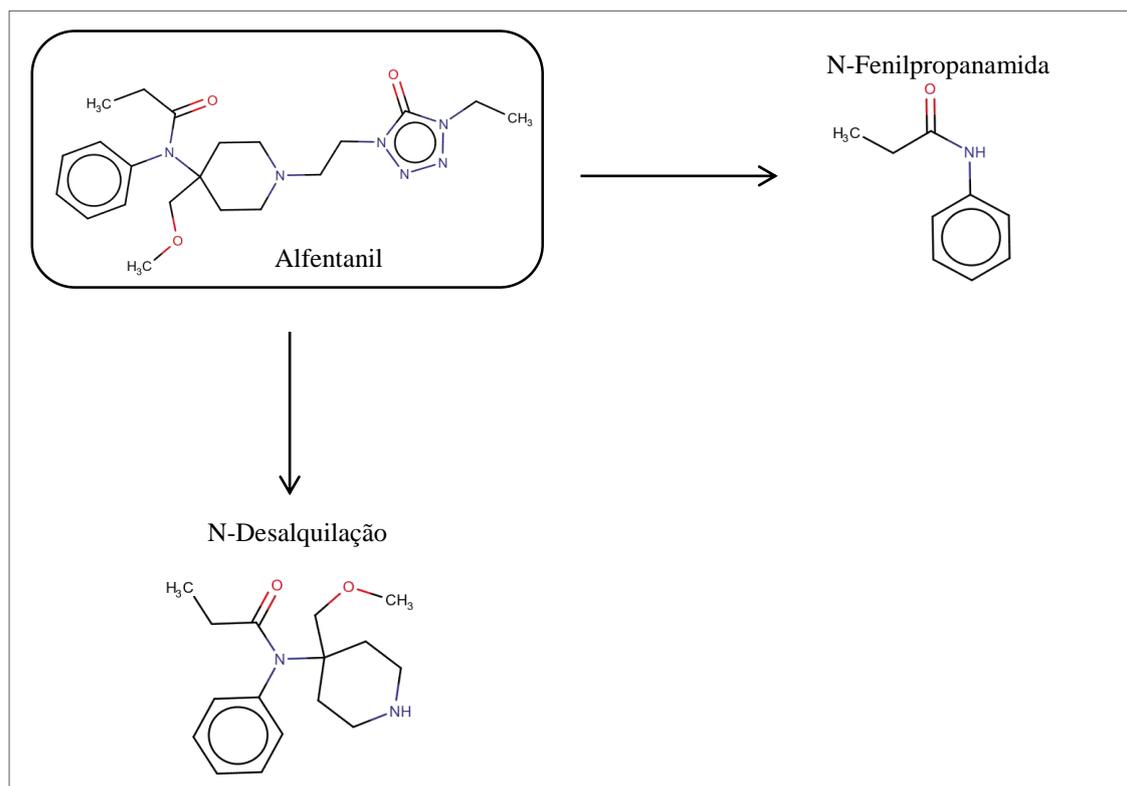


Figura 12. Principais metabólitos do alfentanil

HEXANOILFENTANIL

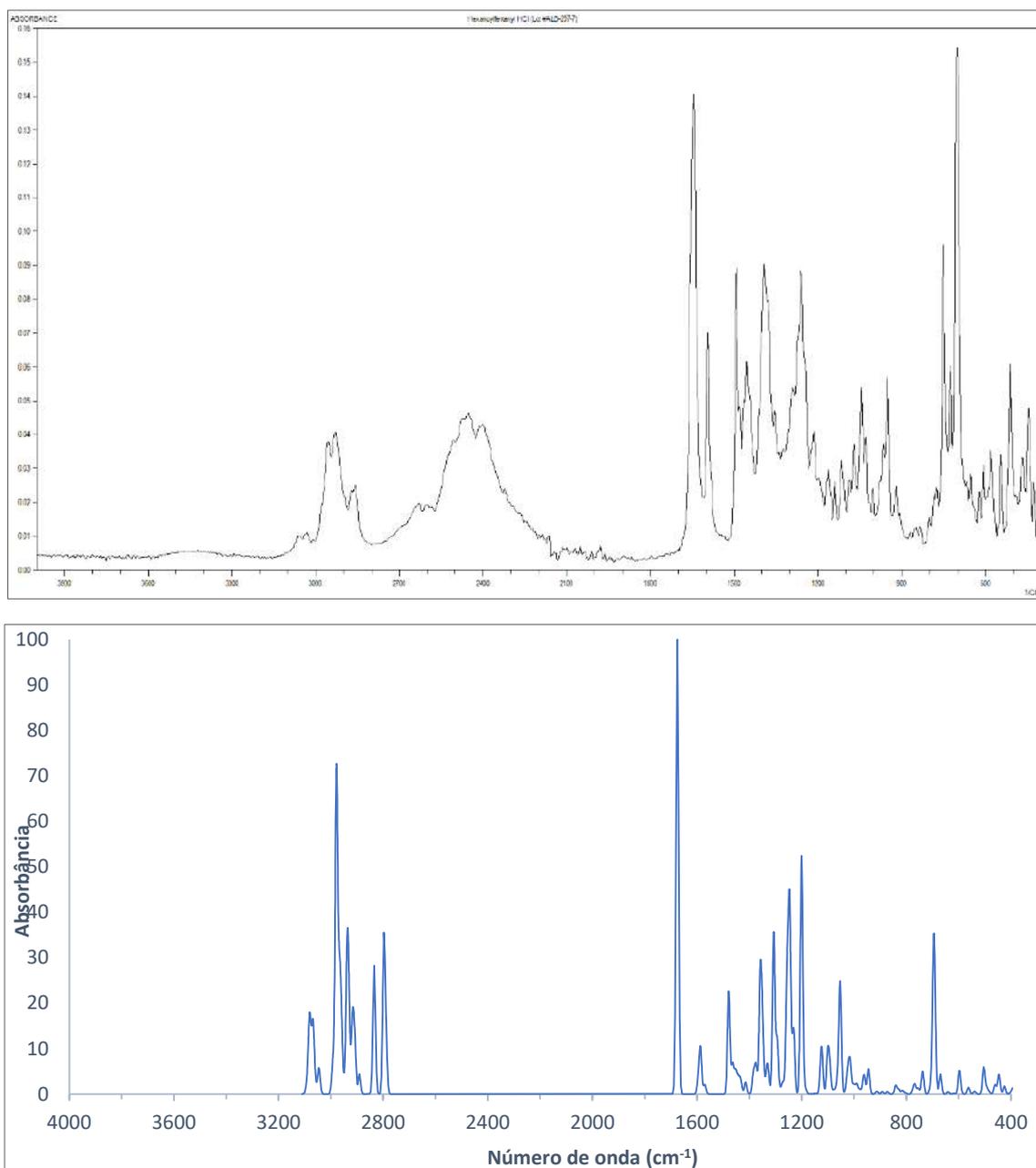


Figura 13. Espectro Infravermelho do hexanoilfentani: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

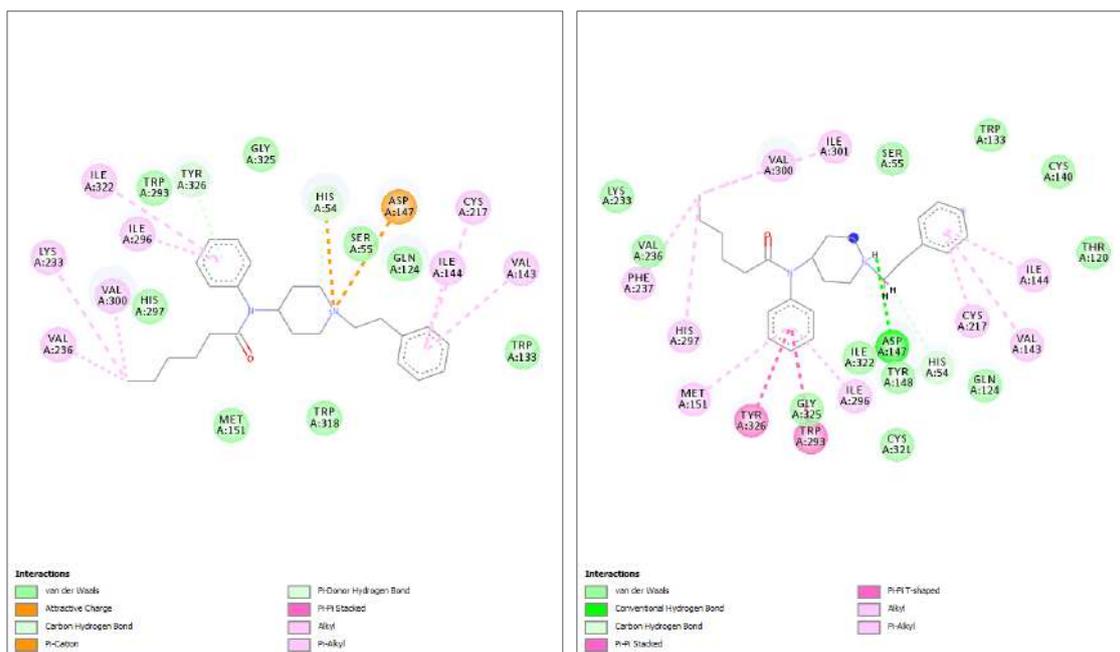


Figura 14. Interações do hexanoilfentamil com o receptor μ -opiode (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

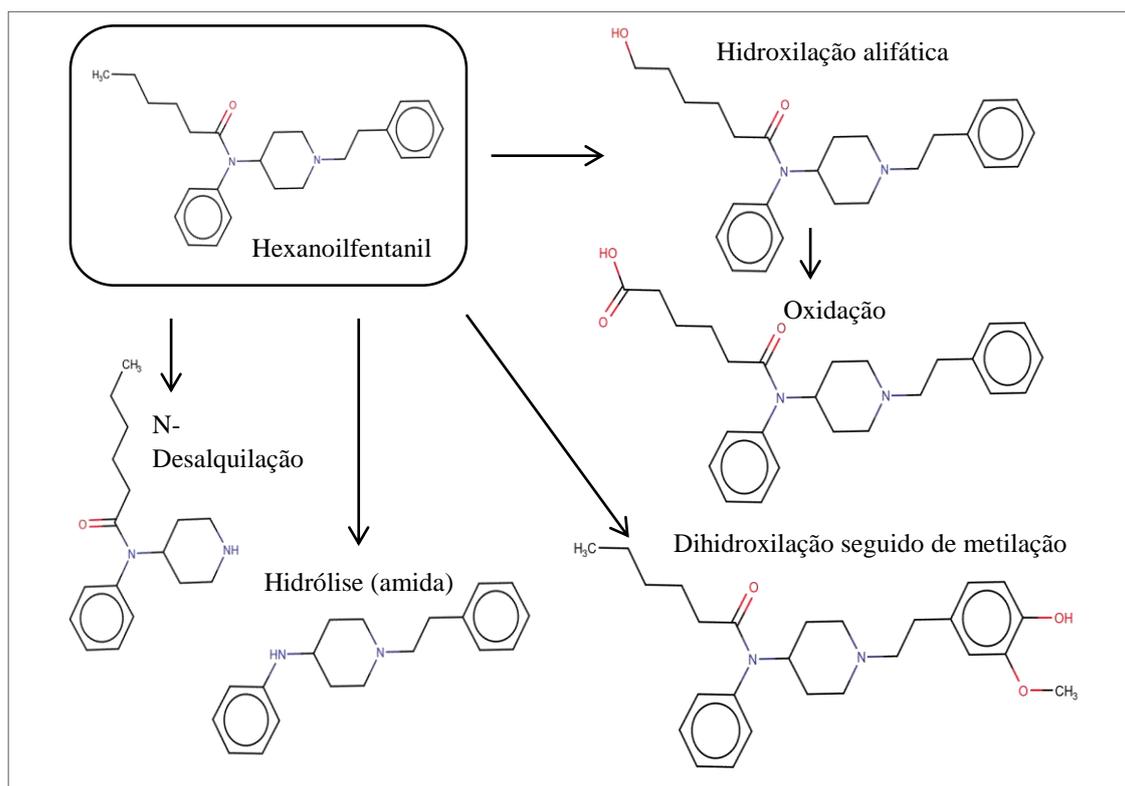


Figura 15. Principais metabólitos do hexanoilfentamil

m-FLUOROISOBUTIRFENTANIL

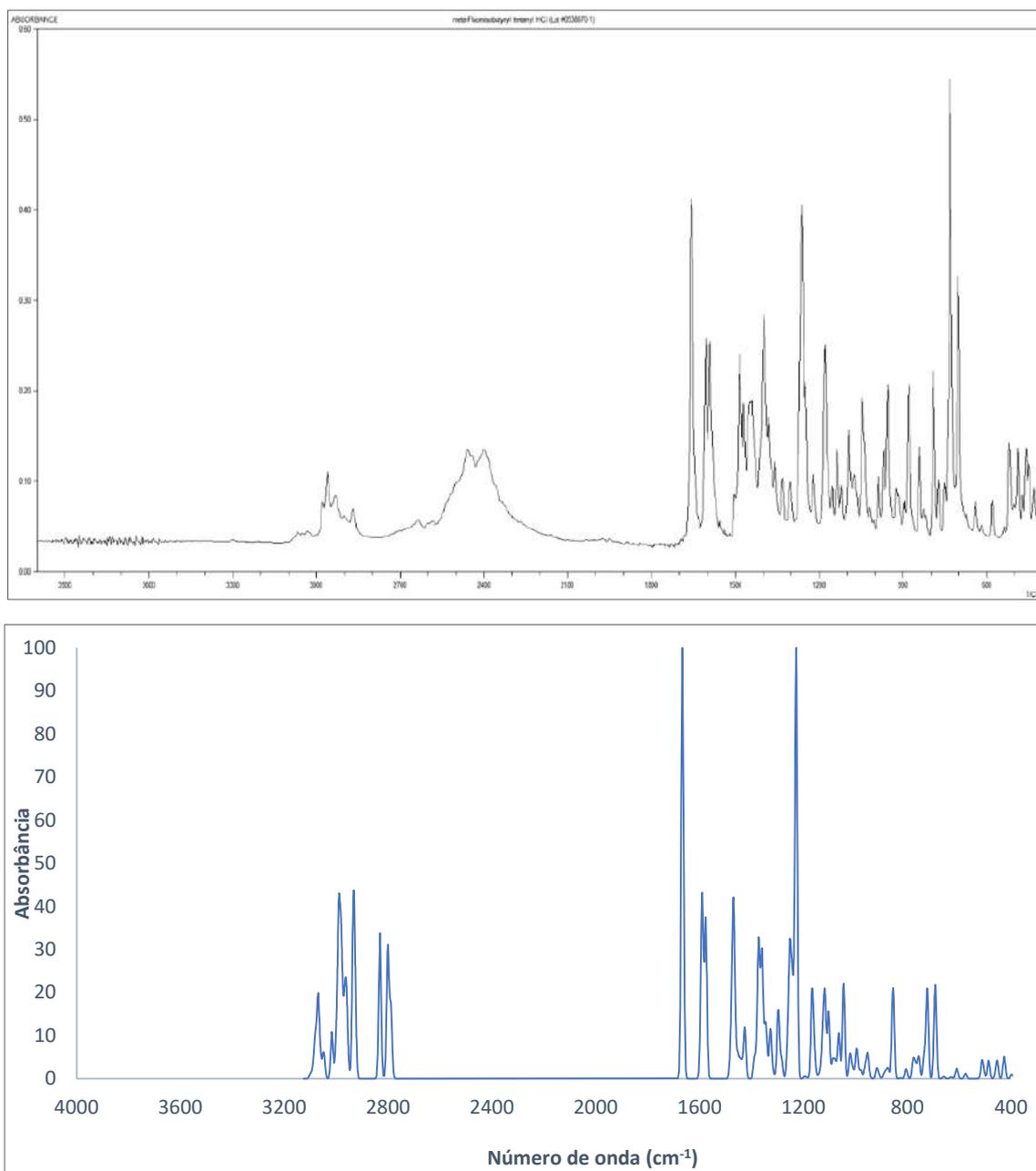


Figura 16. Espectro Infravermelho do m-fluoroisobutirfentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

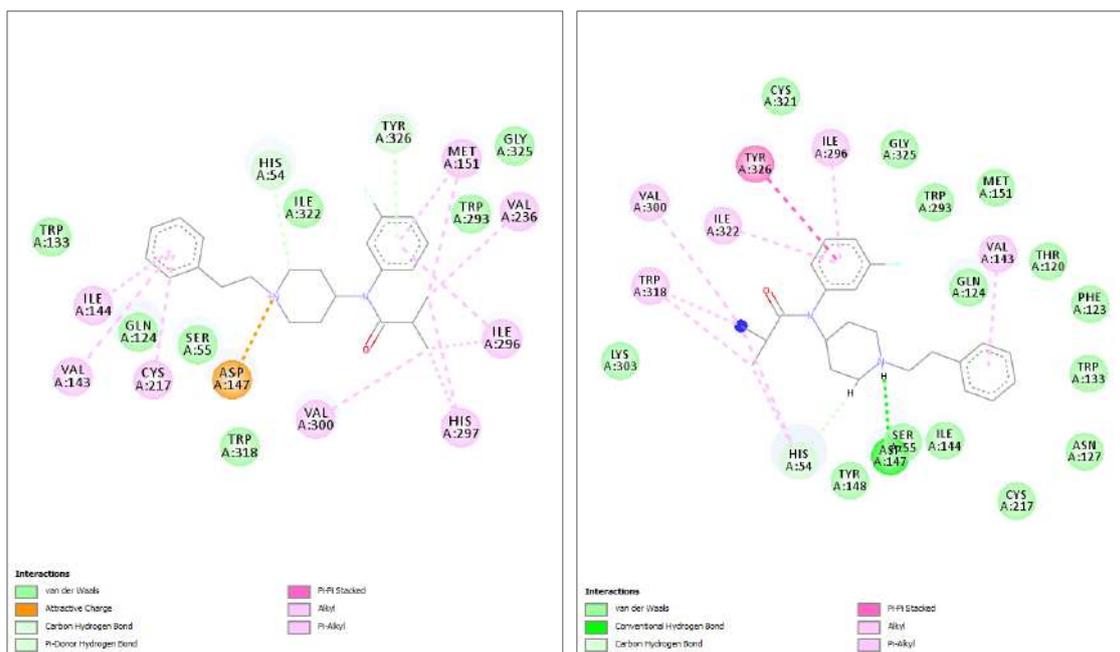


Figura 17. Interações do m-fluoroisobutirfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

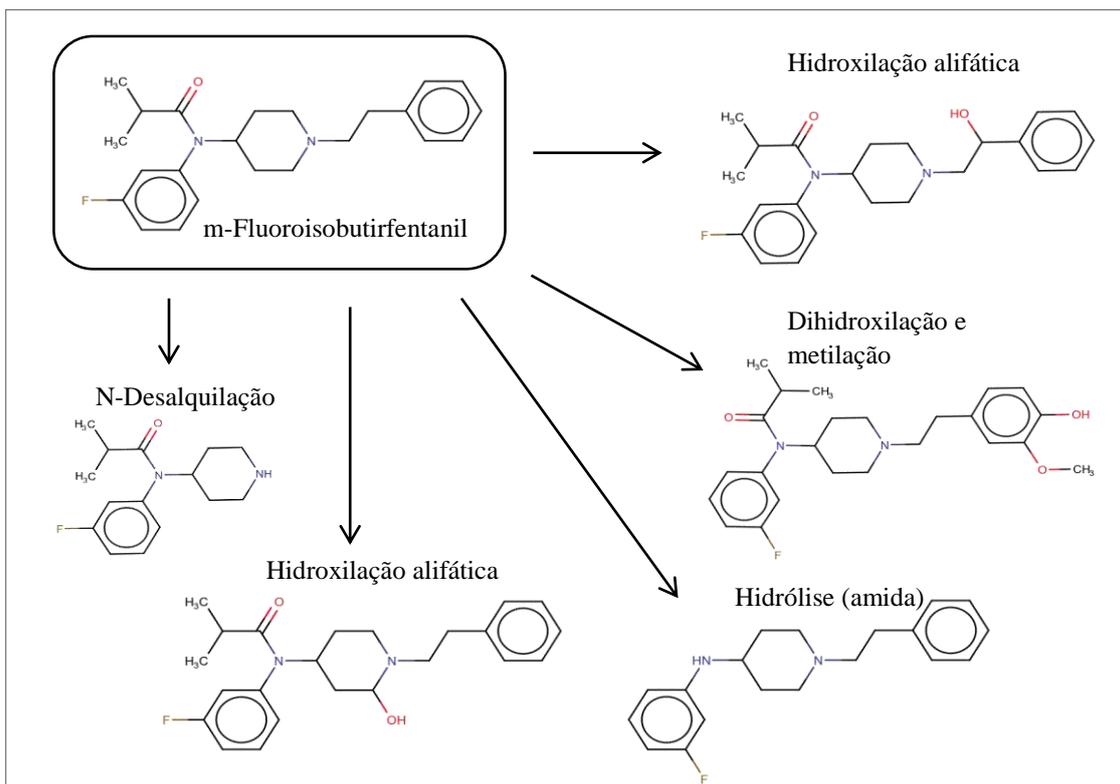


Figura 18. Principais metabólitos do m-fluoroisobutirfentanil

o-FLUOROISOBUTIRFENTANIL

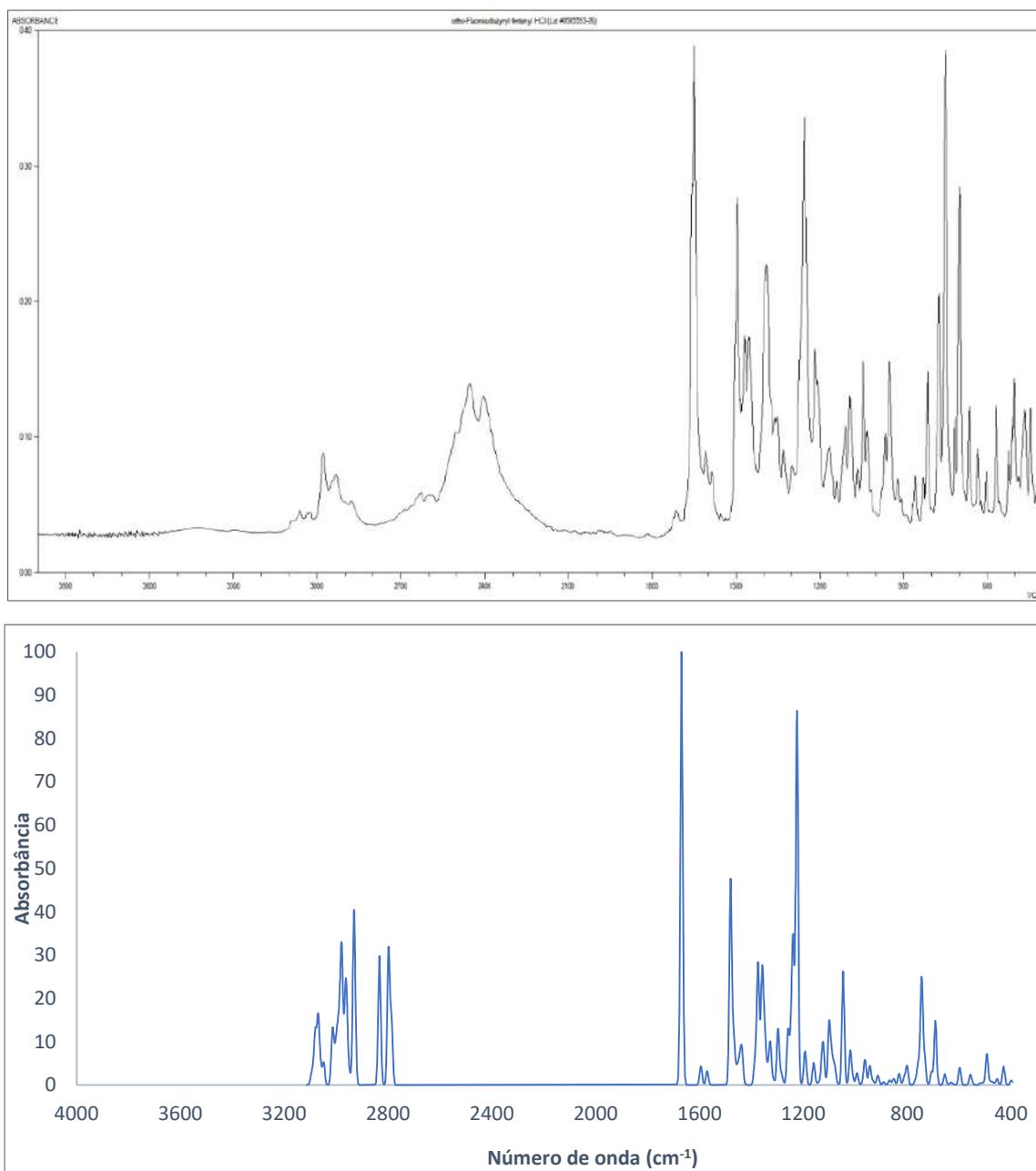


Figura 19. Espectro Infravermelho do o-fluoroisobutirfentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

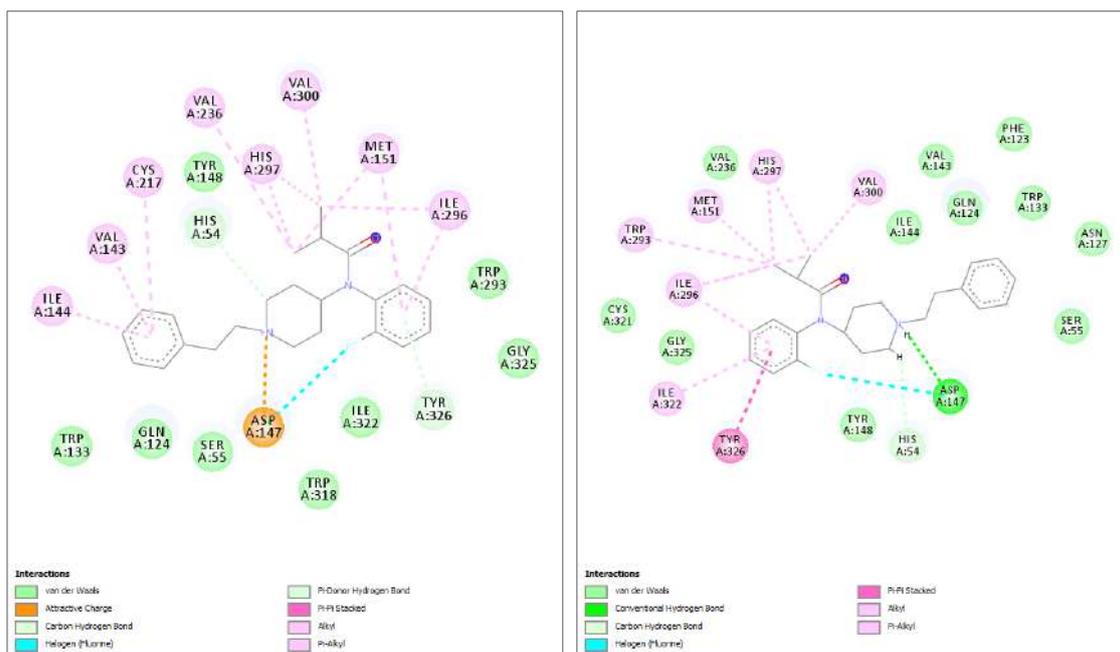


Figura 20. Interações do o-fluoroisobutirfentanil com o receptor μ -opioides (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

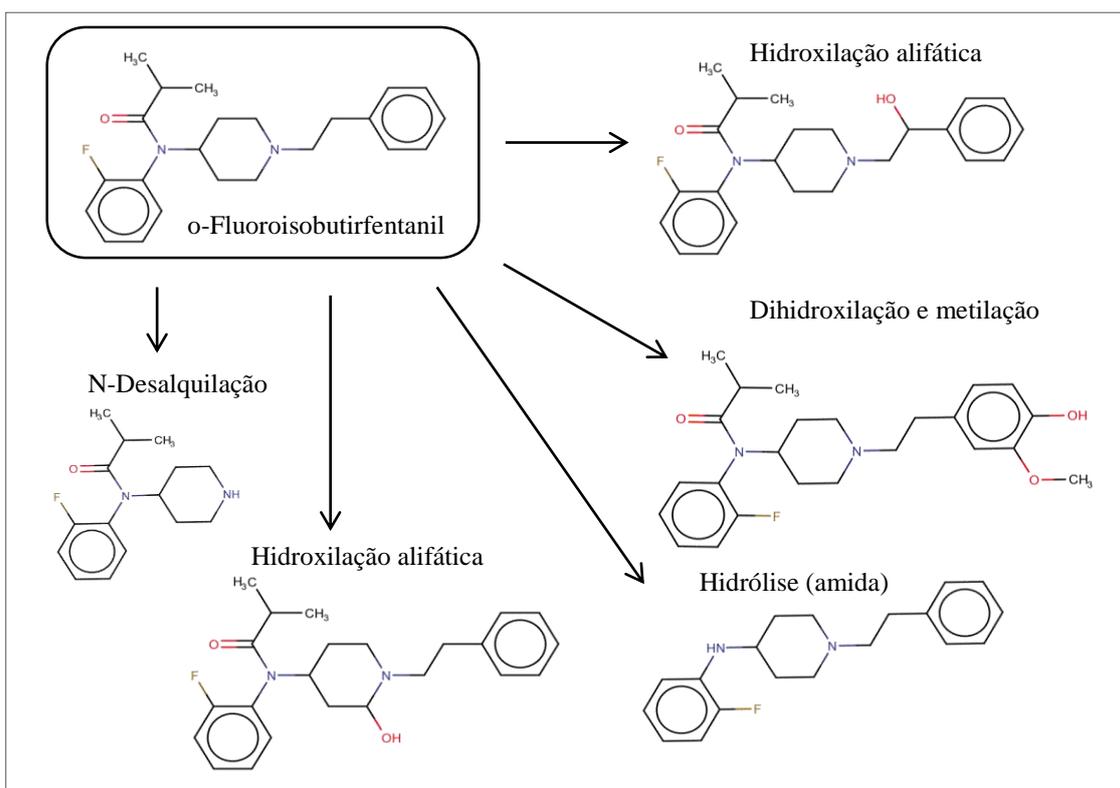


Figura 21. Principais metabólitos do o-fluoroisobutirfentanil

p-CLOROISOBUTIRFENTANIL

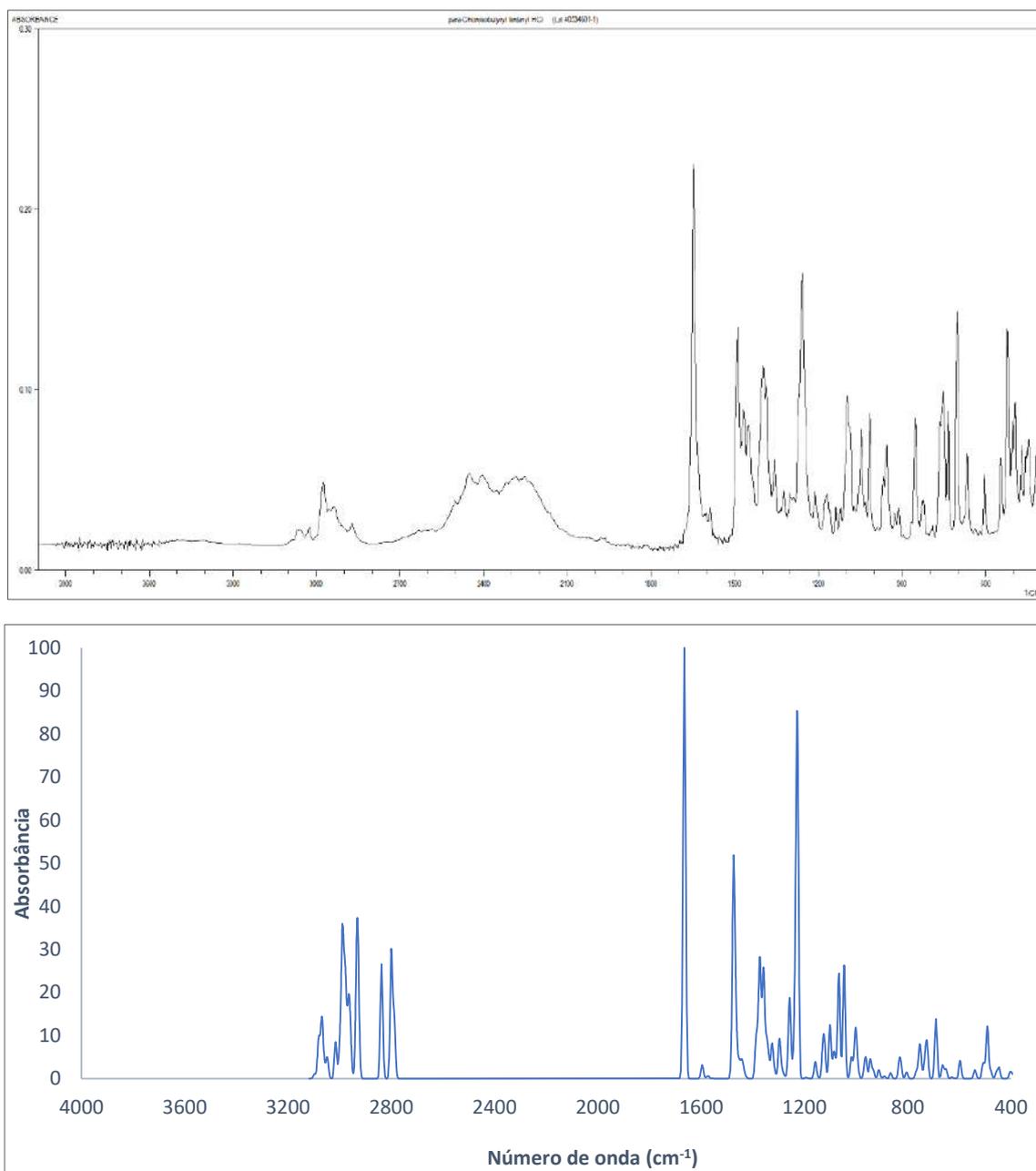


Figura 22. Espectro Infravermelho do p-cloroisobutirfentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

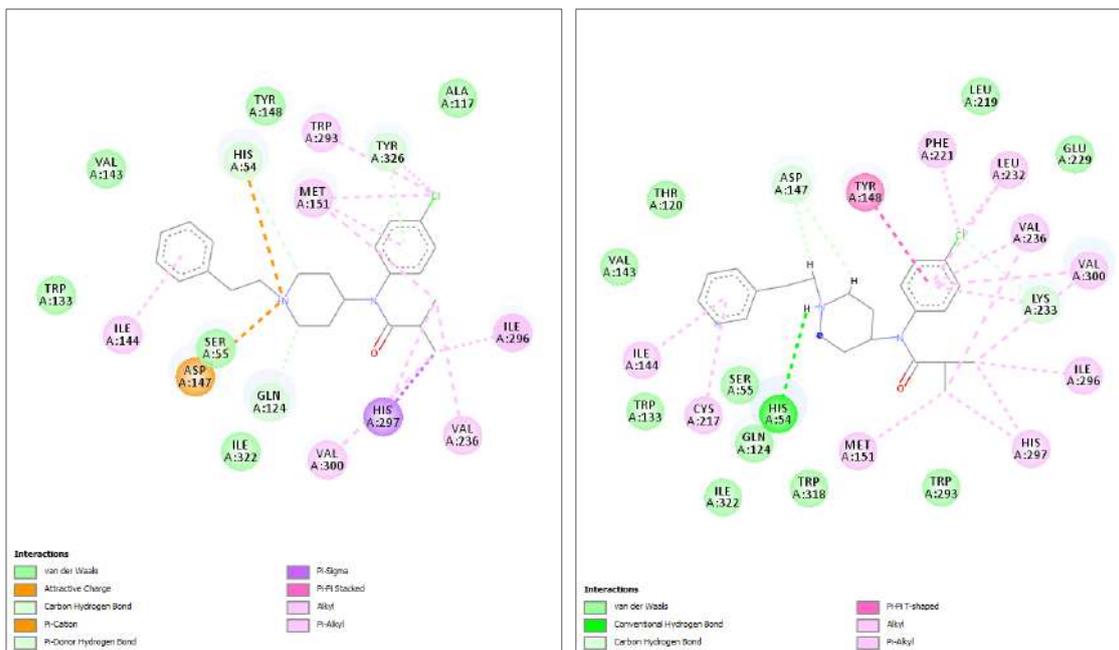


Figura 23. Interações do p-cloroisobutirfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

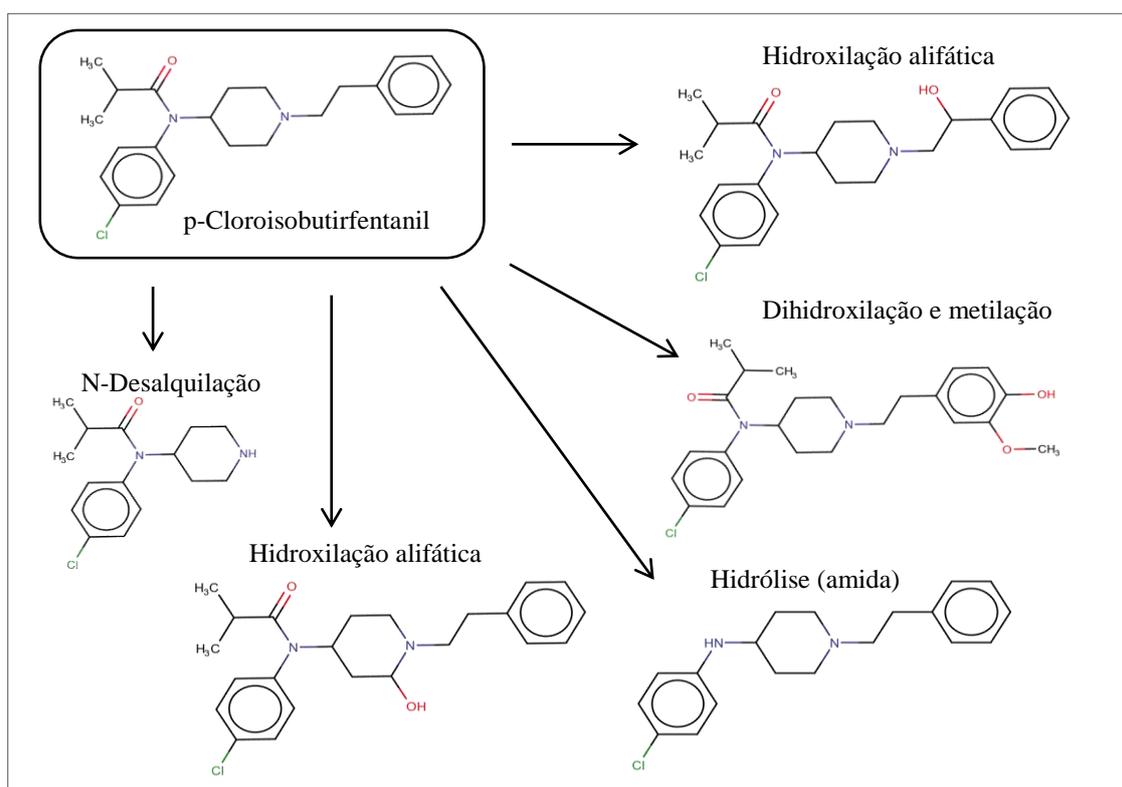


Figura 24. Principais metabólitos do p-cloroisobutirfentanil

p-FLUOROACETILFENTANIL

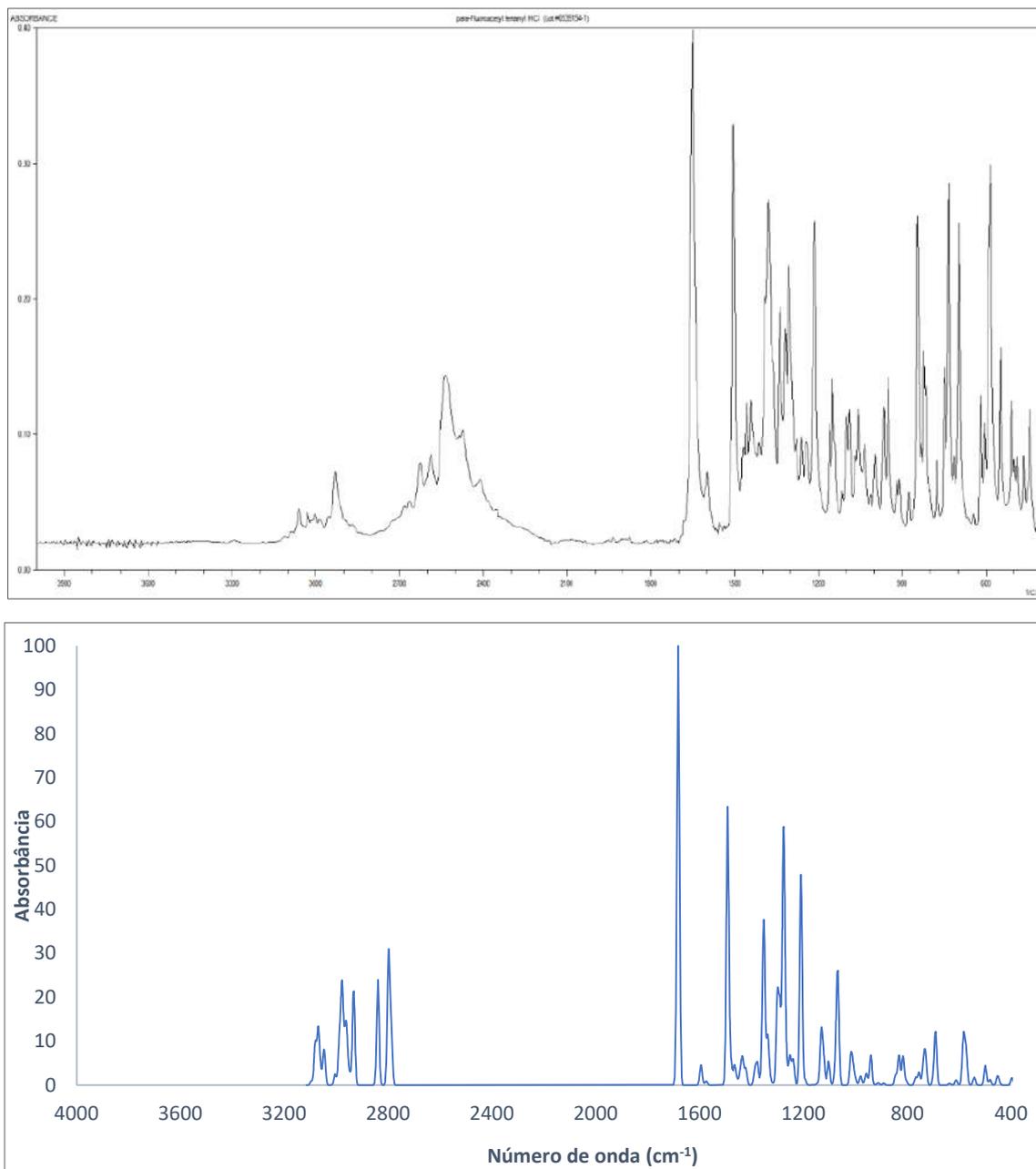


Figura 25. Espectro Infravermelho do p-fluoroacetilfentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

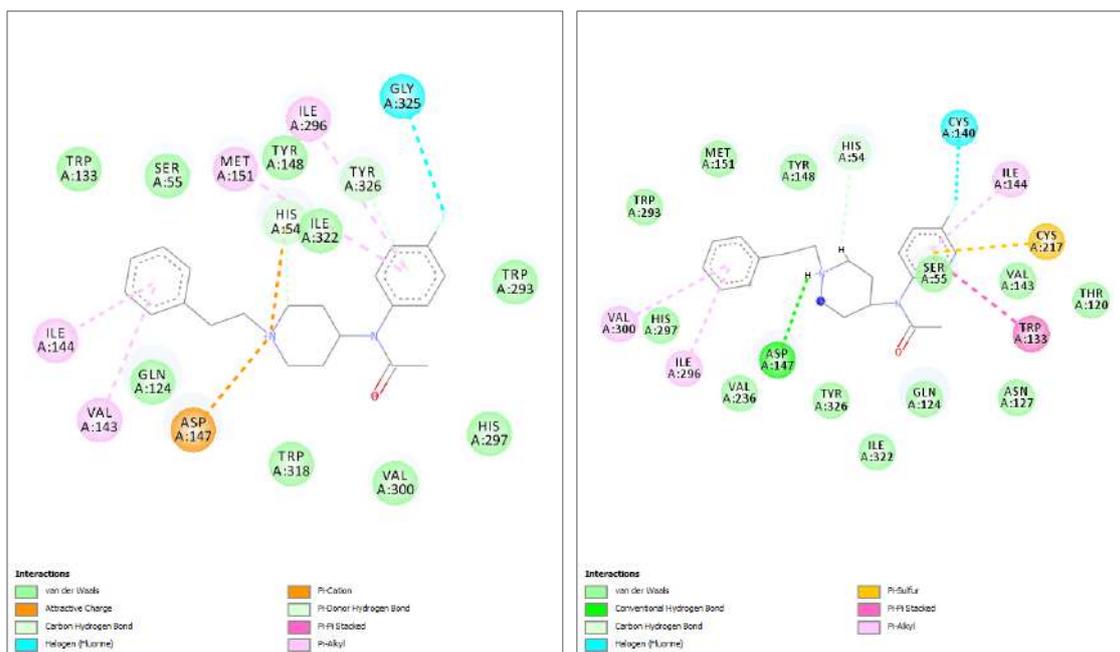


Figura 26. Interações do p-fluoroacetilfentani com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

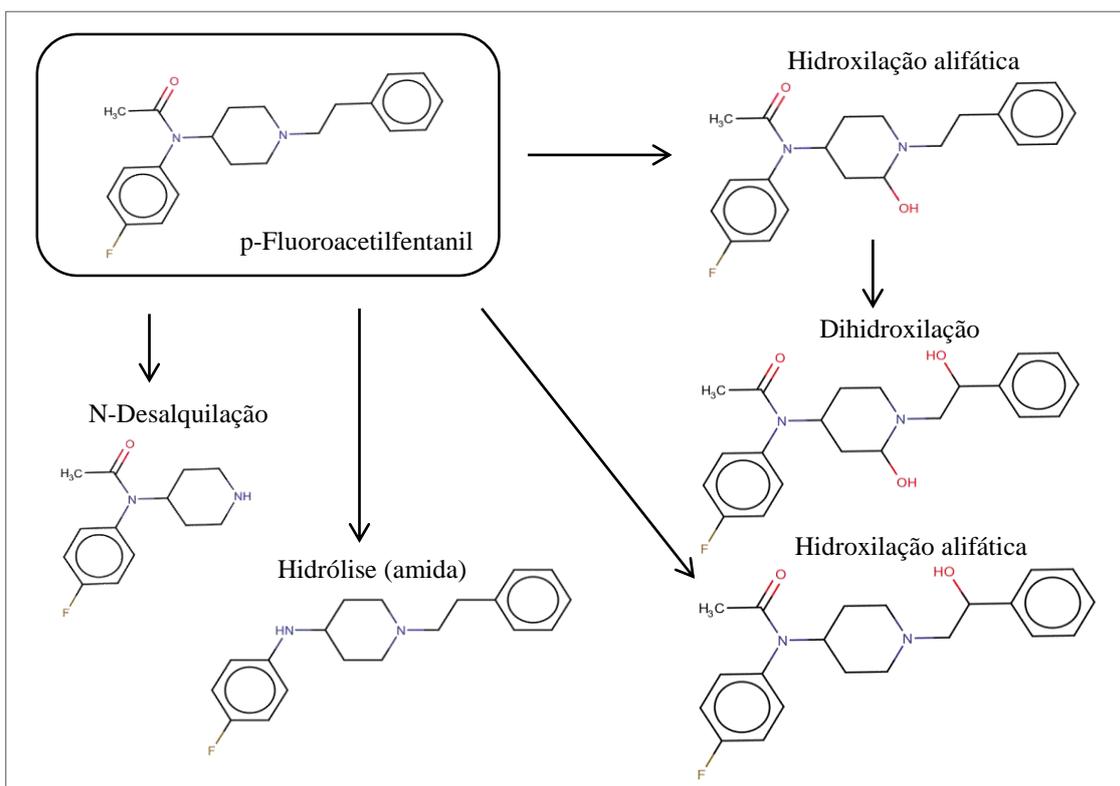


Figura 27. Principais metabólitos do p-fluoroacetilfentani

VALERILFENTANIL

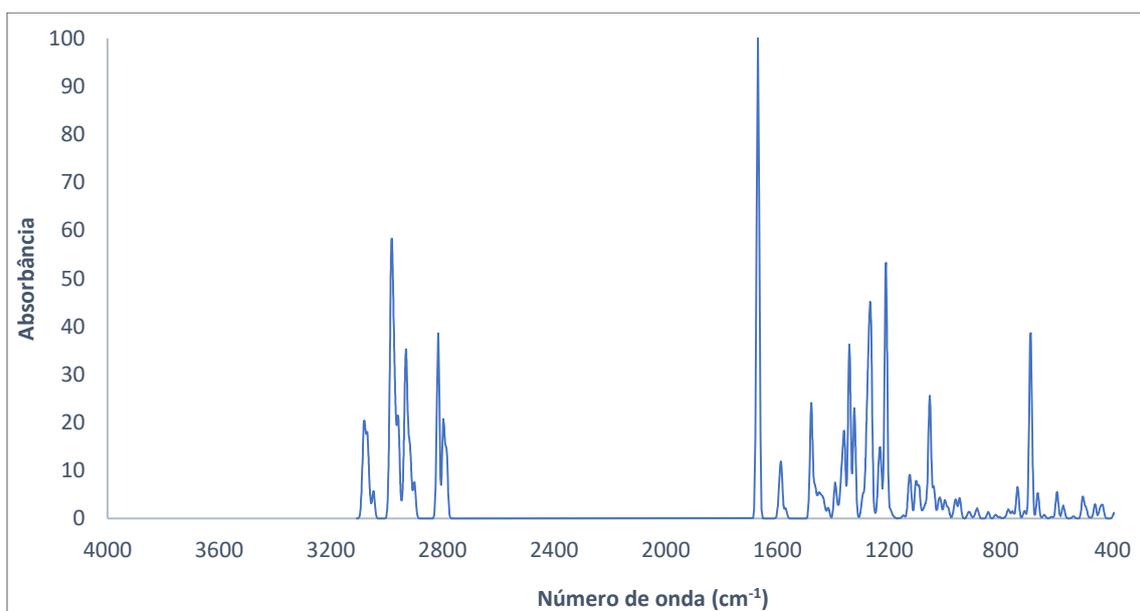
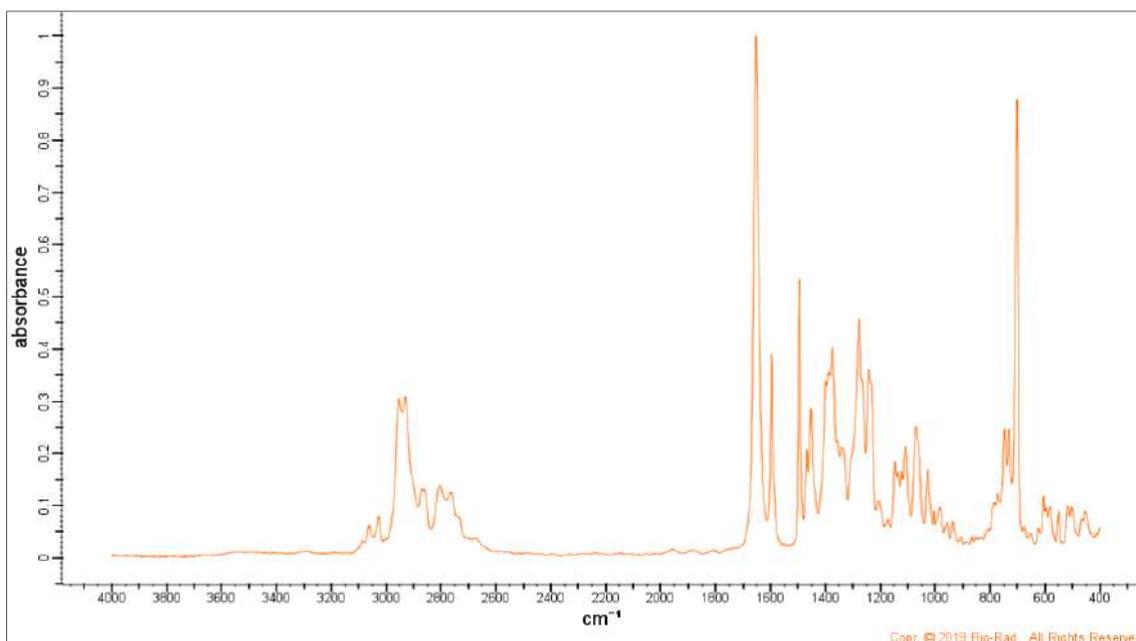


Figura 28. Espectro Infravermelho do valerilfentanil: (a) Bio-Rad[®] experimental¹¹⁰ e (b) teórico

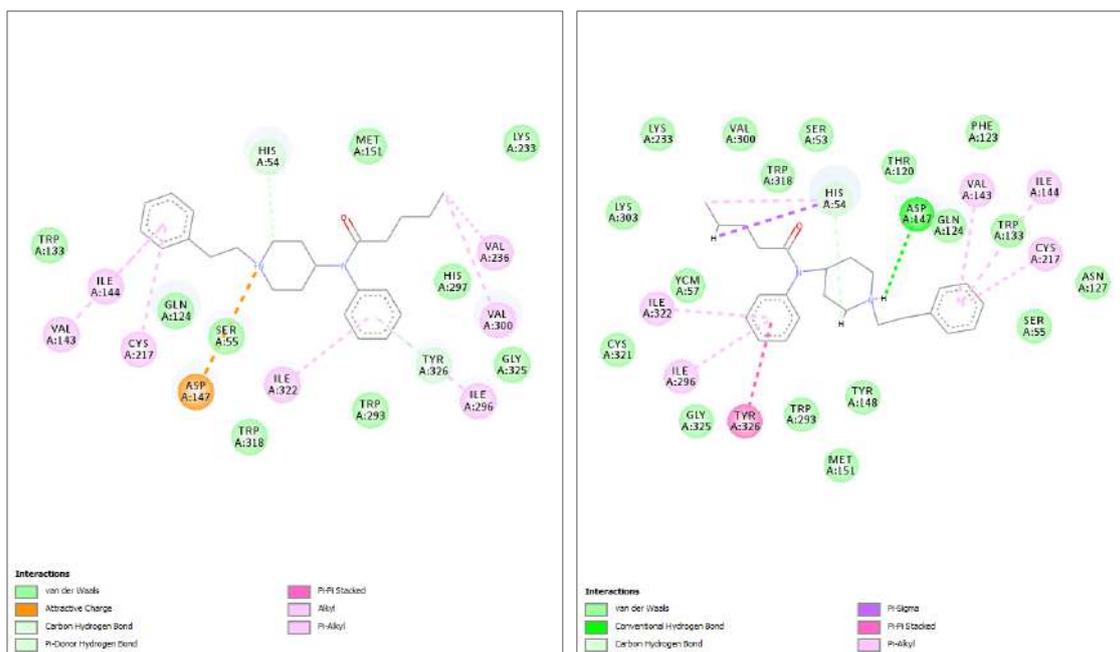


Figura 29. Interações do valerilfentanil com o receptor μ -opioides (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

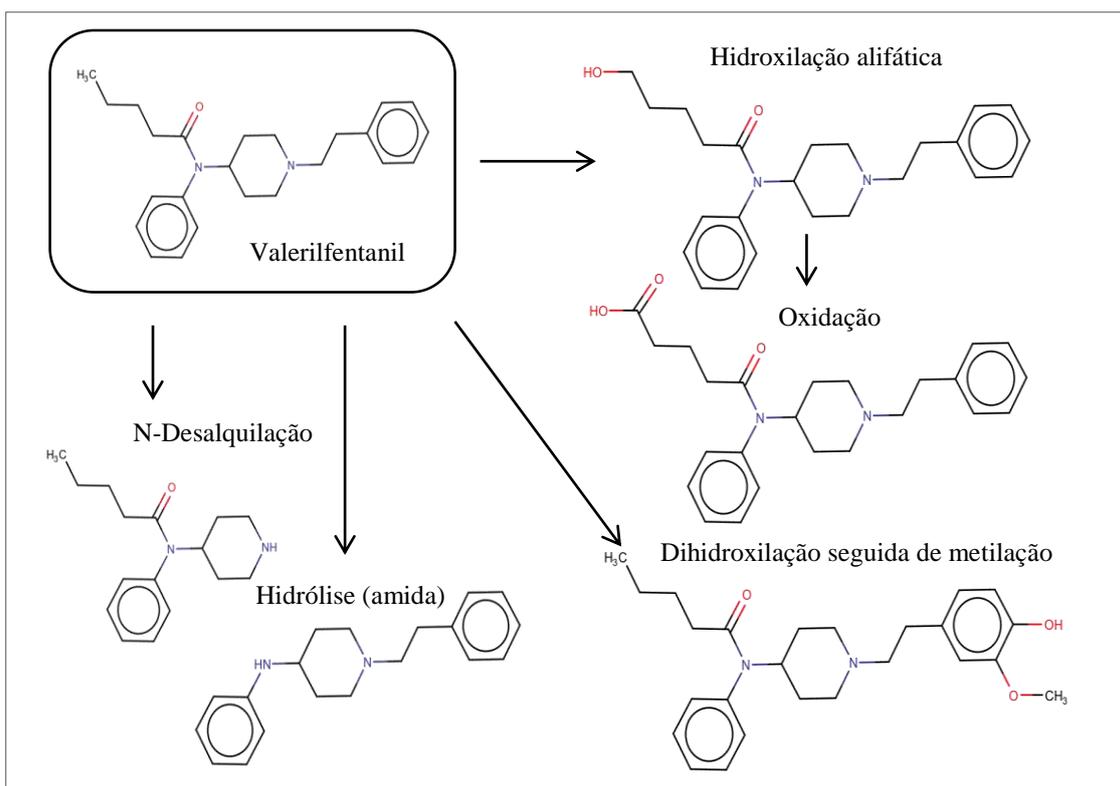


Figura 30. Principais metabólitos do valerilfentanil

CARFENTANIL

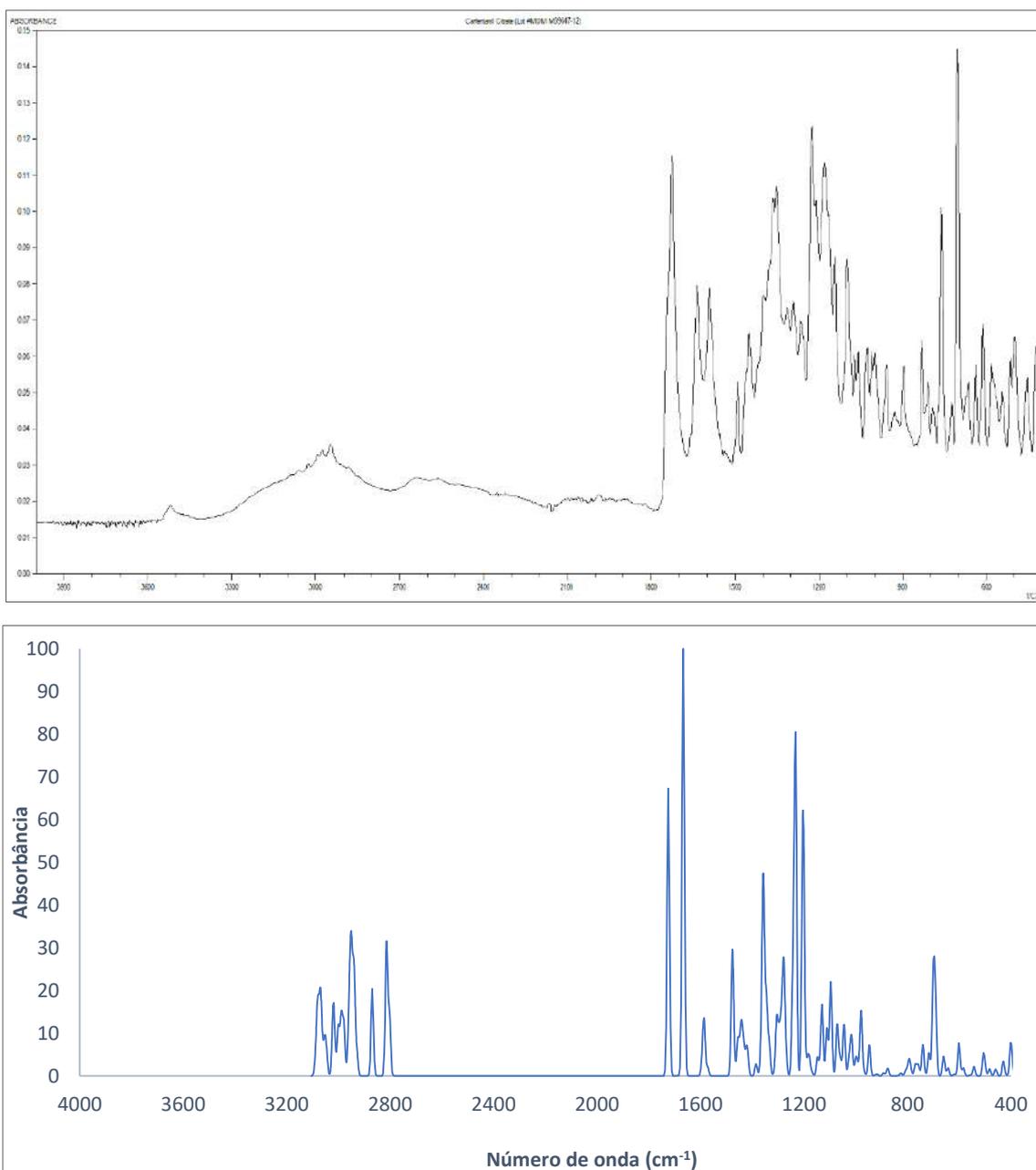


Figura 31. Espectro Infravermelho do carfentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

ACRILÓILFENTANIL

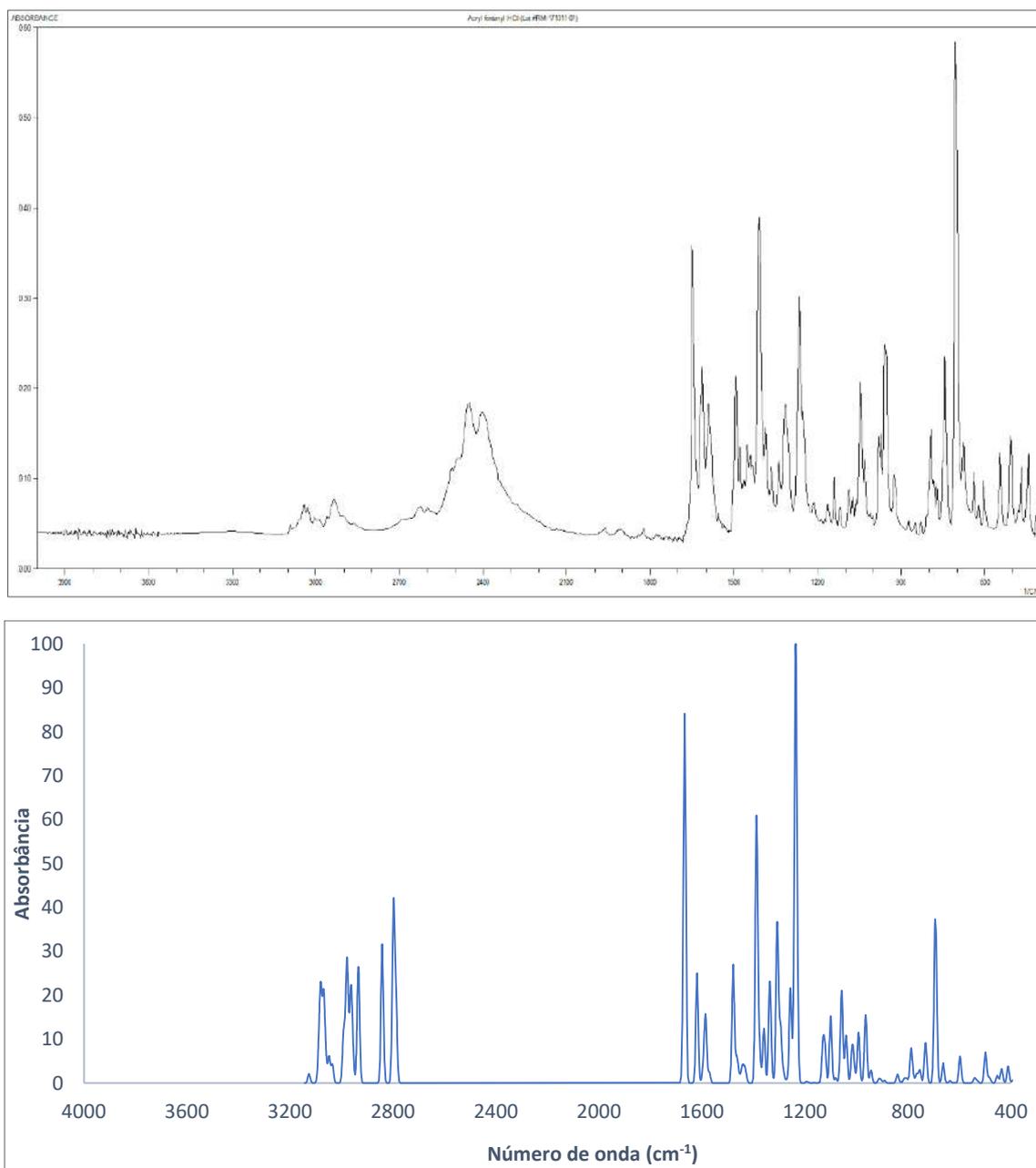


Figura 34. Espectro Infravermelho do acríloilfentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

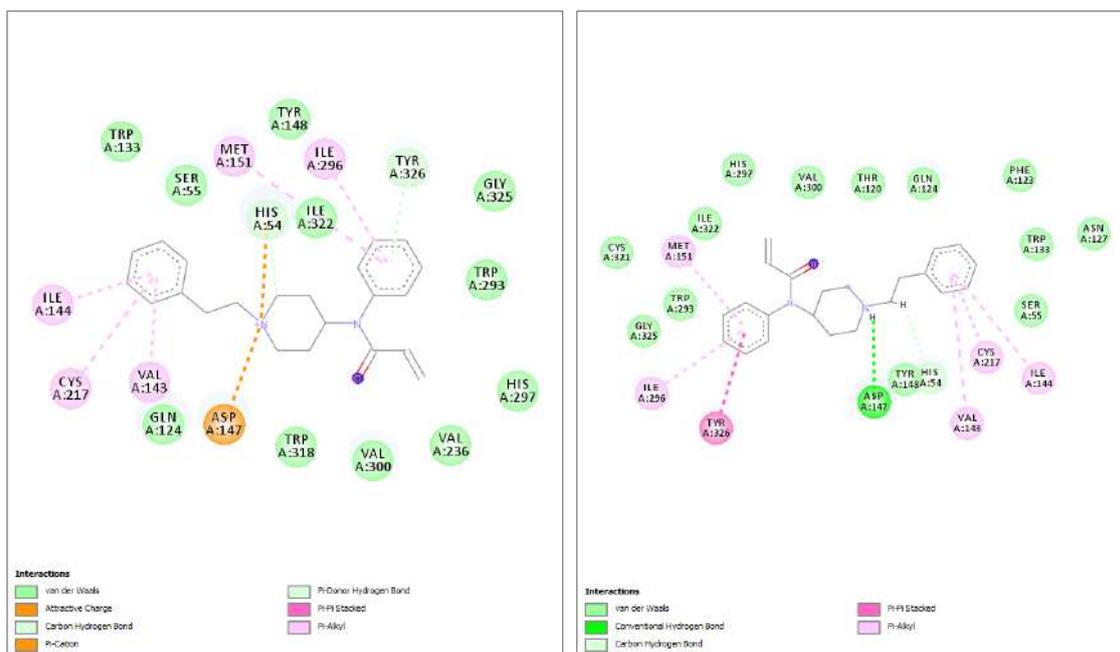


Figura 35. Interações do acriflofantil com o receptor μ -opiode (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

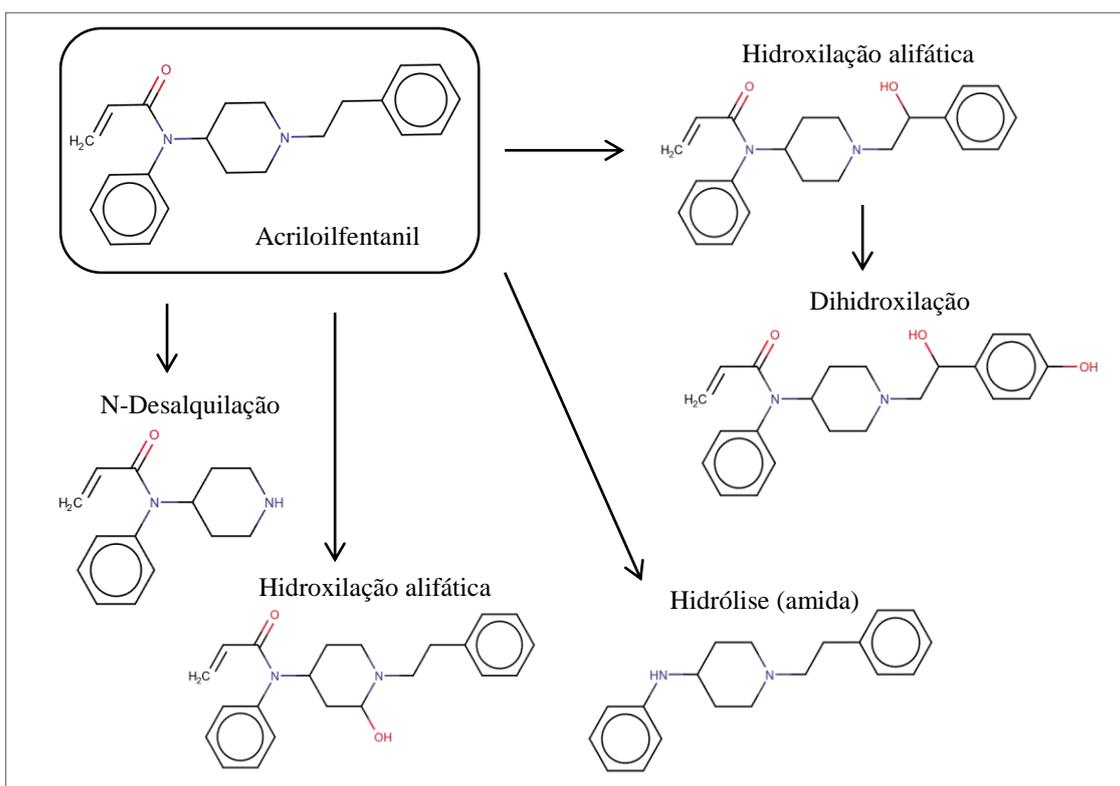


Figura 36. Principais metabólitos do acriflofantil

FURANILFENTANIL

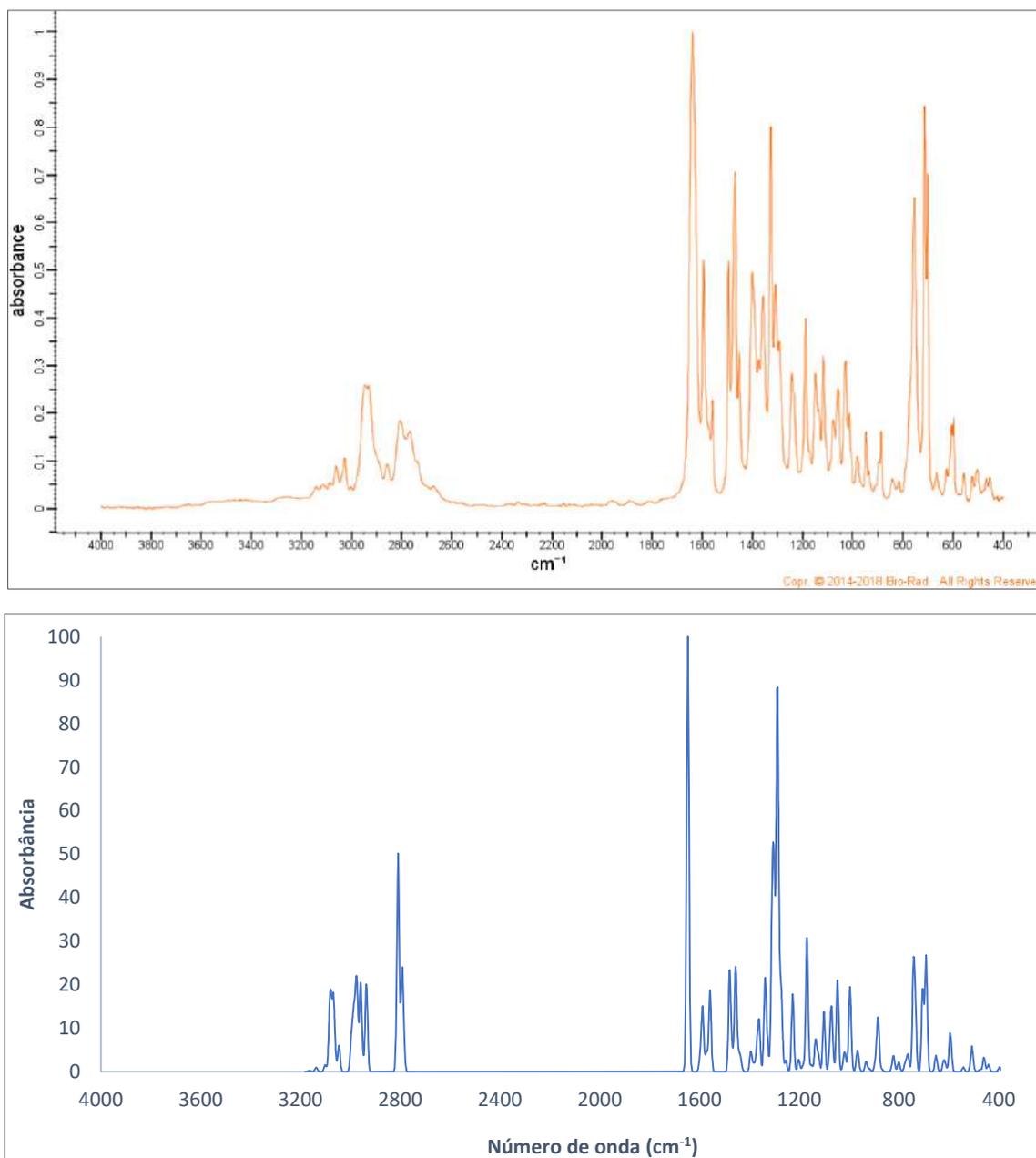


Figura 37. Espectro Infravermelho do furanilfentanil: (a) Bio-Rad® experimental¹¹¹ e (b) teórico

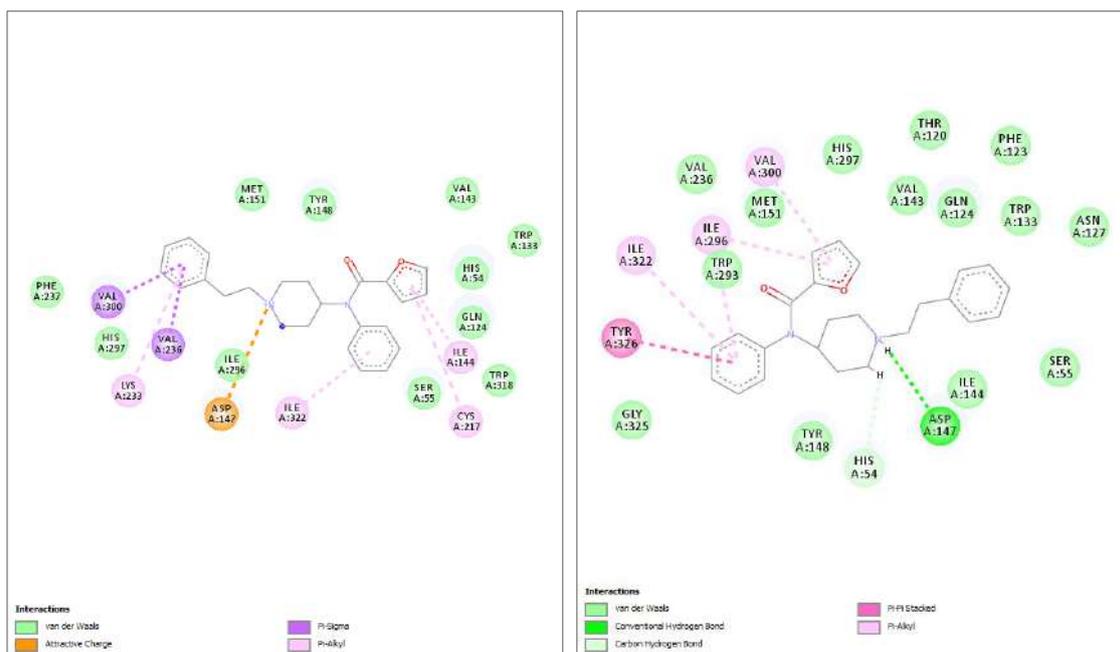


Figura 38. Interações do furanfentanil com o receptor μ -opiode (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

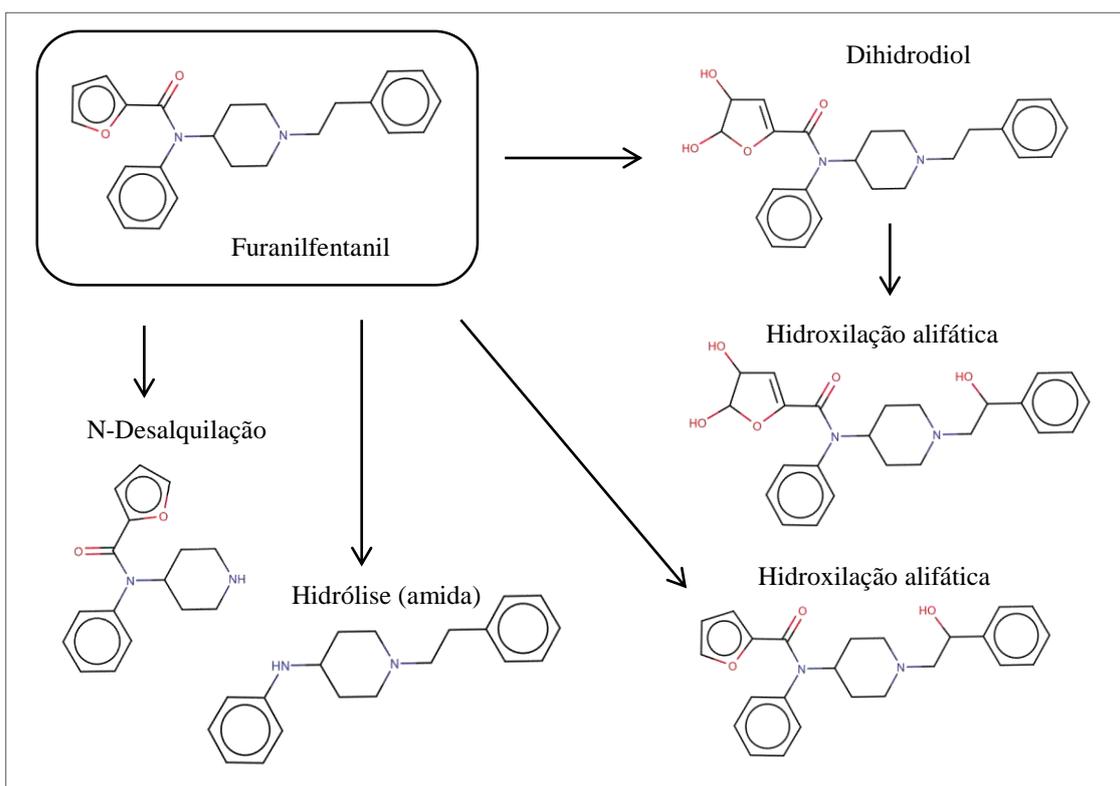


Figura 39. Principais metabólitos do furanfentanil

ACETILFENTANIL

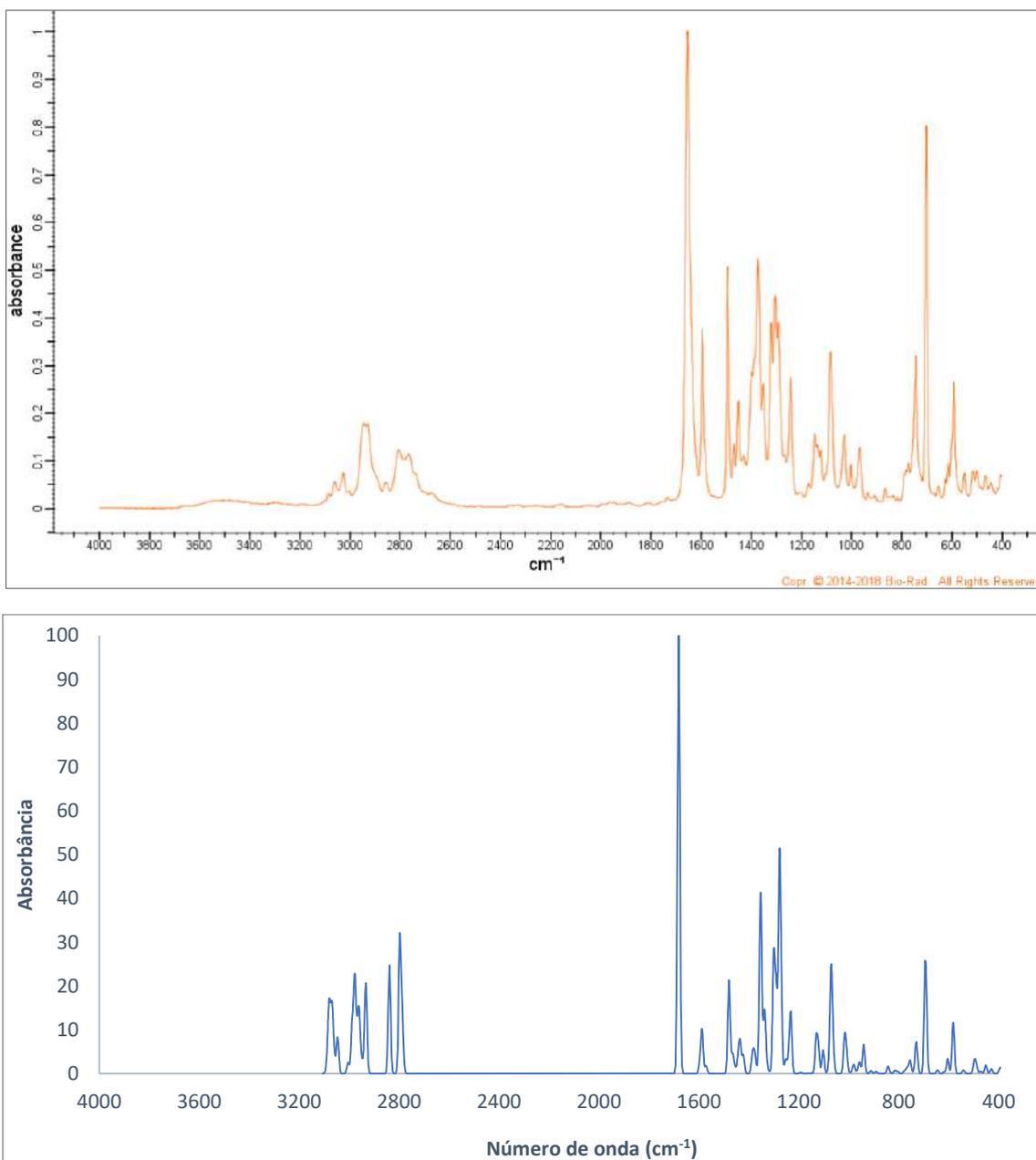


Figura 40. Espectro Infravermelho do acetilfentanil: (a) Bio-Rad[®] experimental¹¹² e (b) teórico

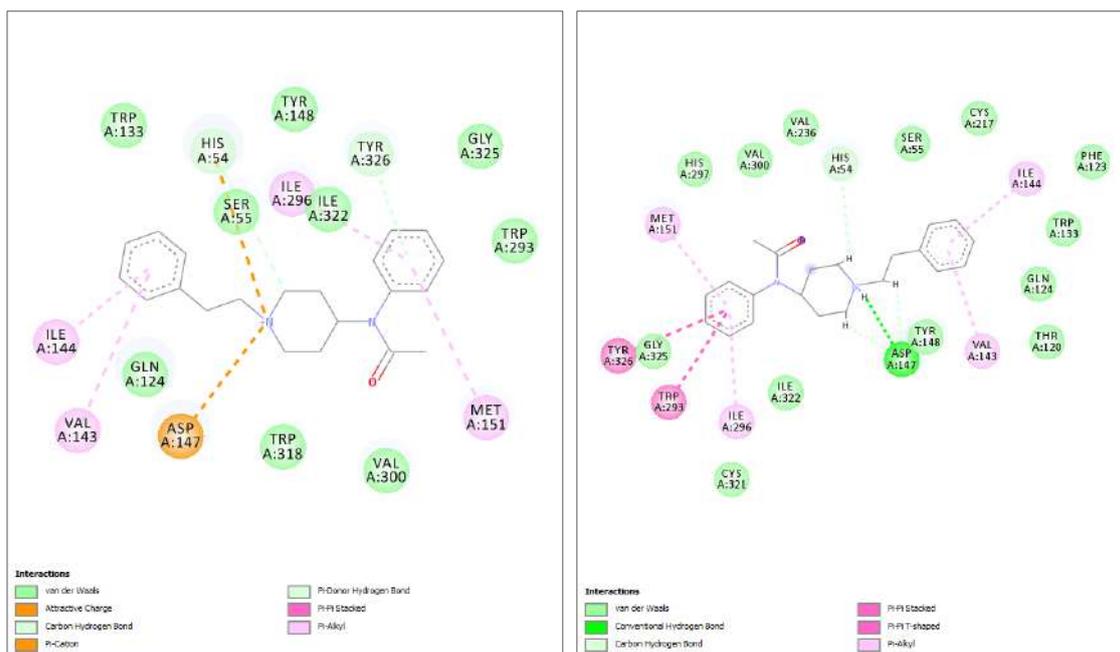


Figura 41. Interações do acetilfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

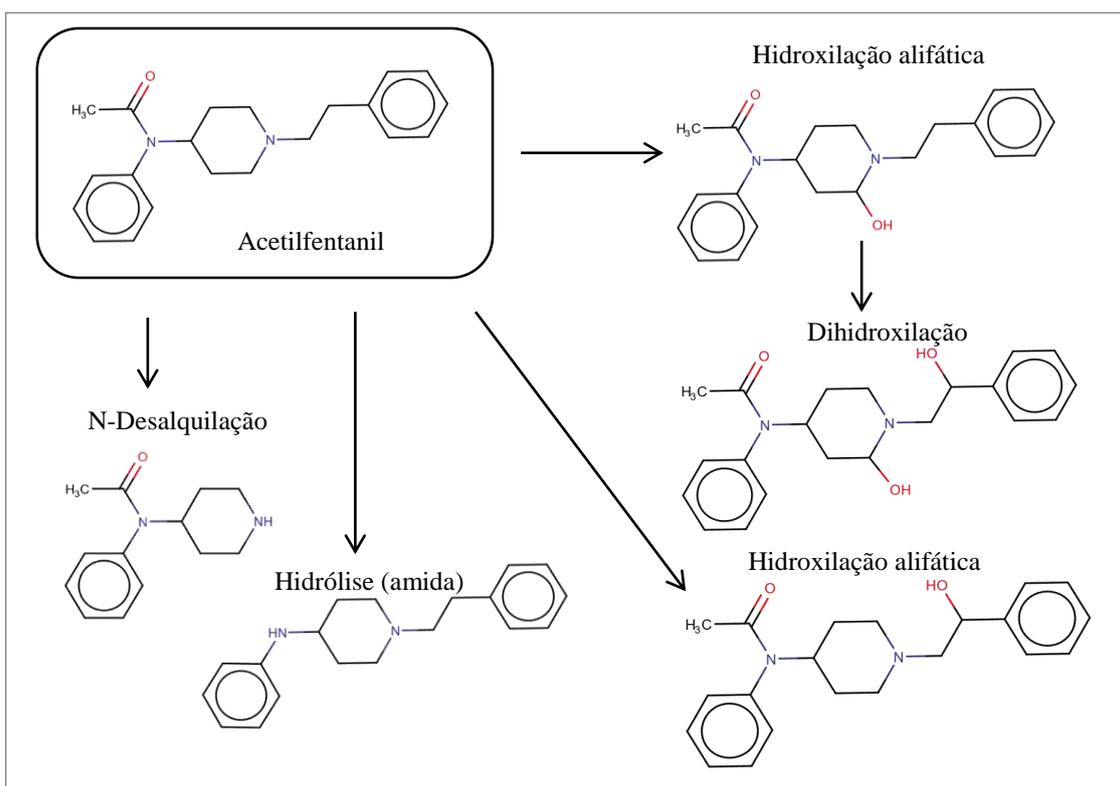


Figura 39. Principais metabólitos do acetilfentanil

BUTIRFENTANYL

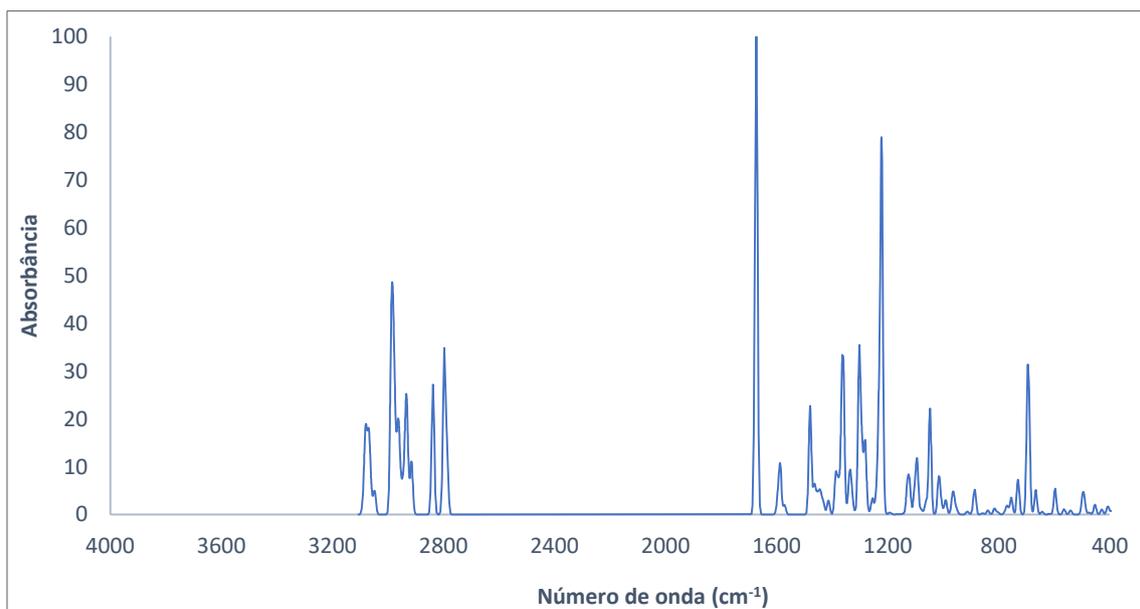
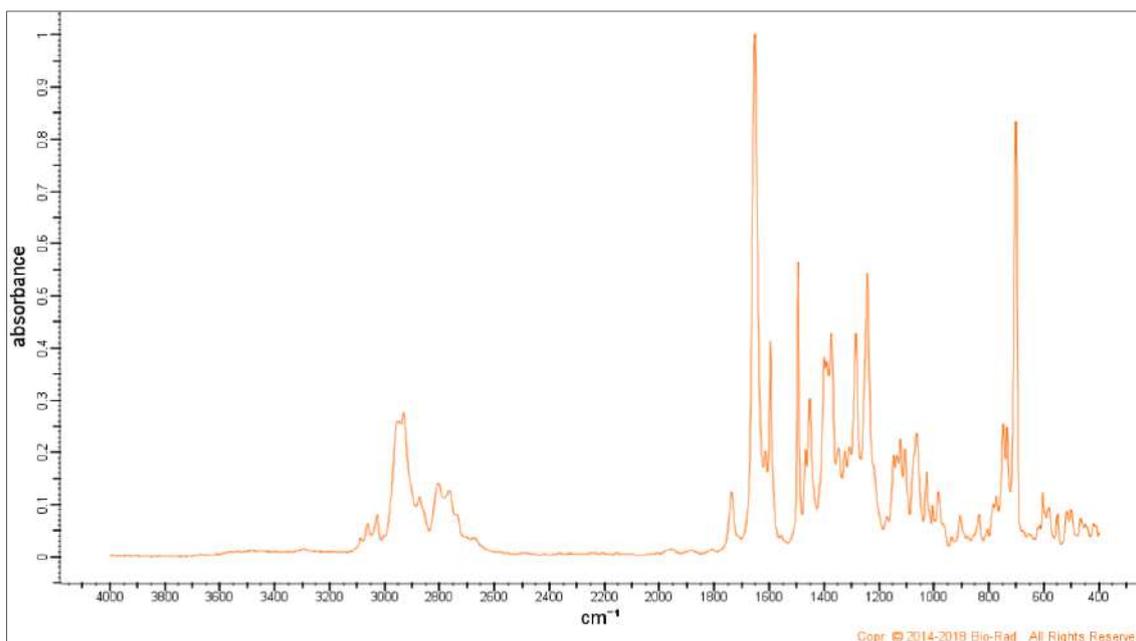


Figura 43. Espectro Infravermelho do butirfentanyl: (a) Bio-Rad[®] experimental¹¹³ e (b) teórico

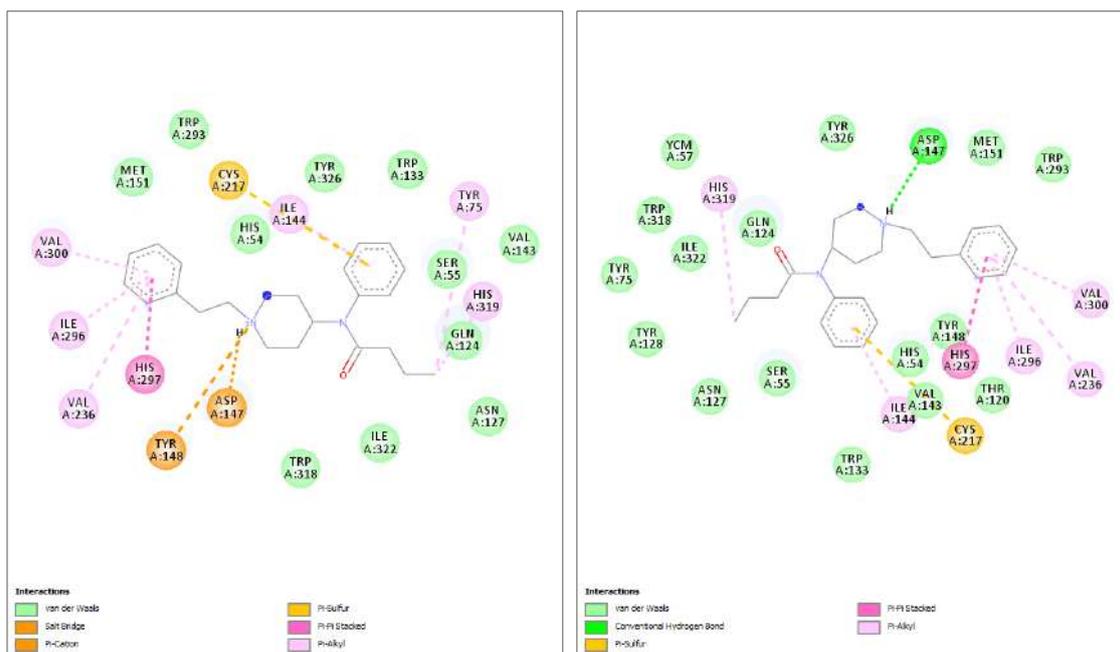


Figura 44. Interações do butirfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

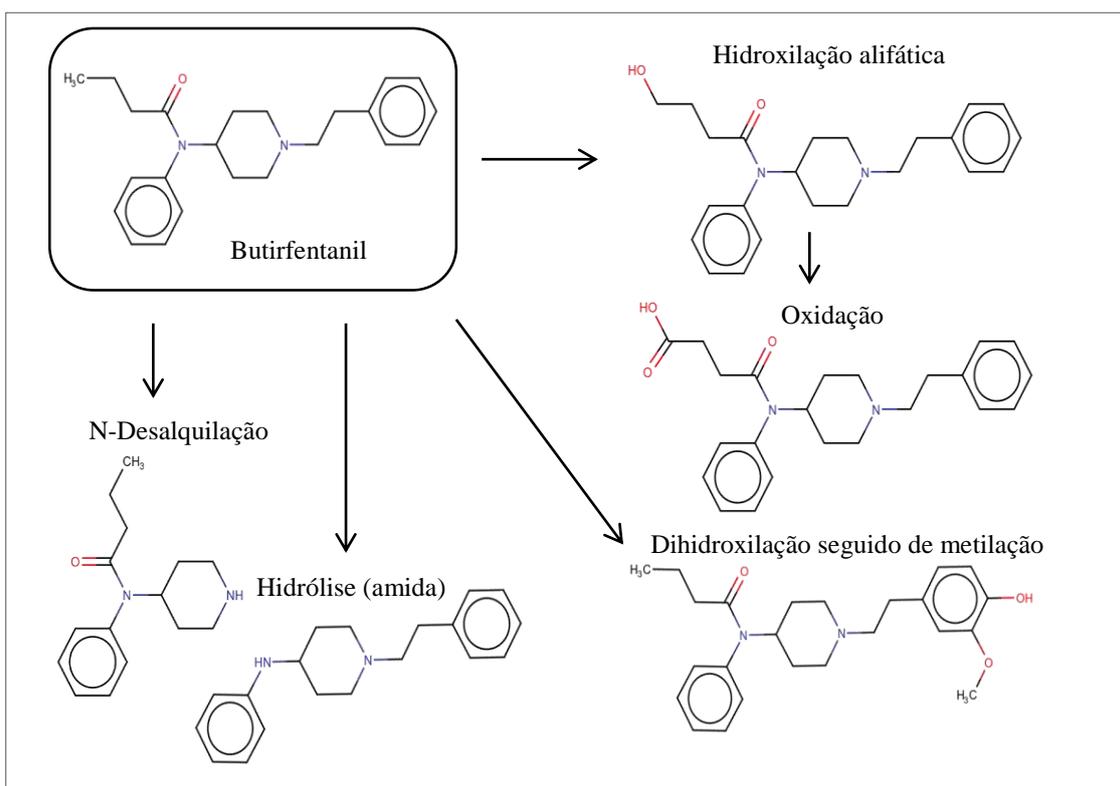


Figura 45. Principais metabólitos do butirfentanil

p-FLUOROISOBUTIRFENTANIL

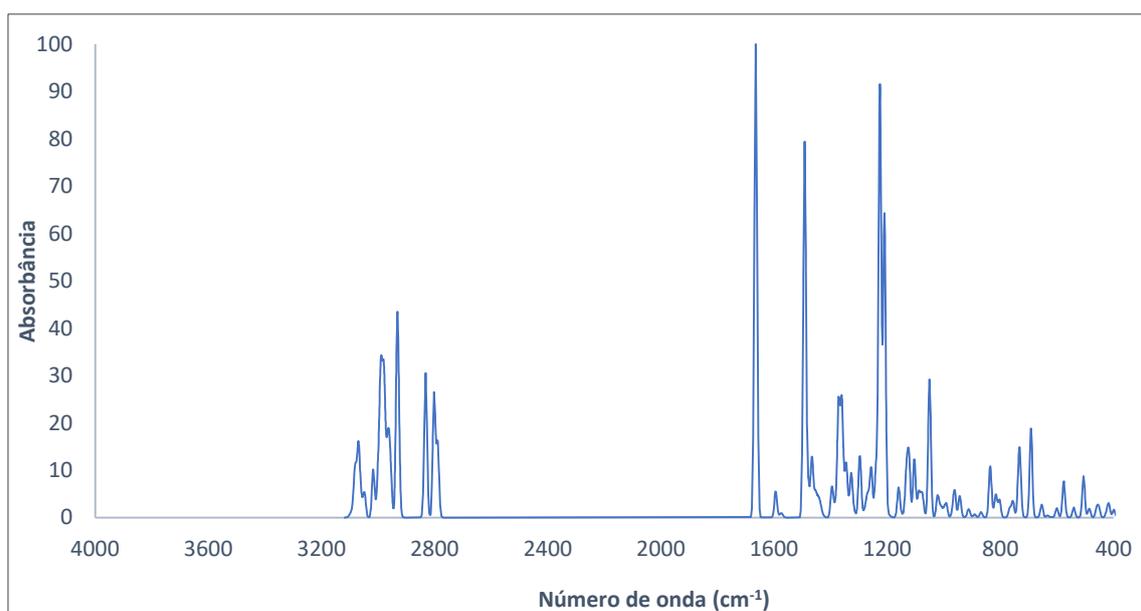
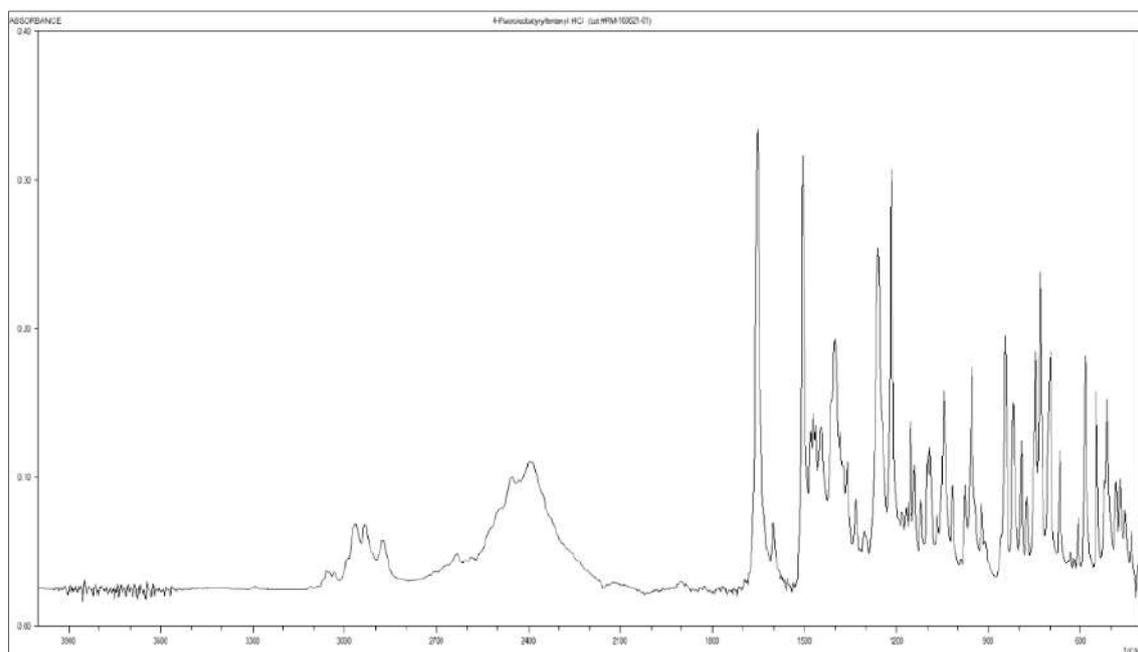


Figura 46. Espectro Infravermelho do p-fluoroisobutirfentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

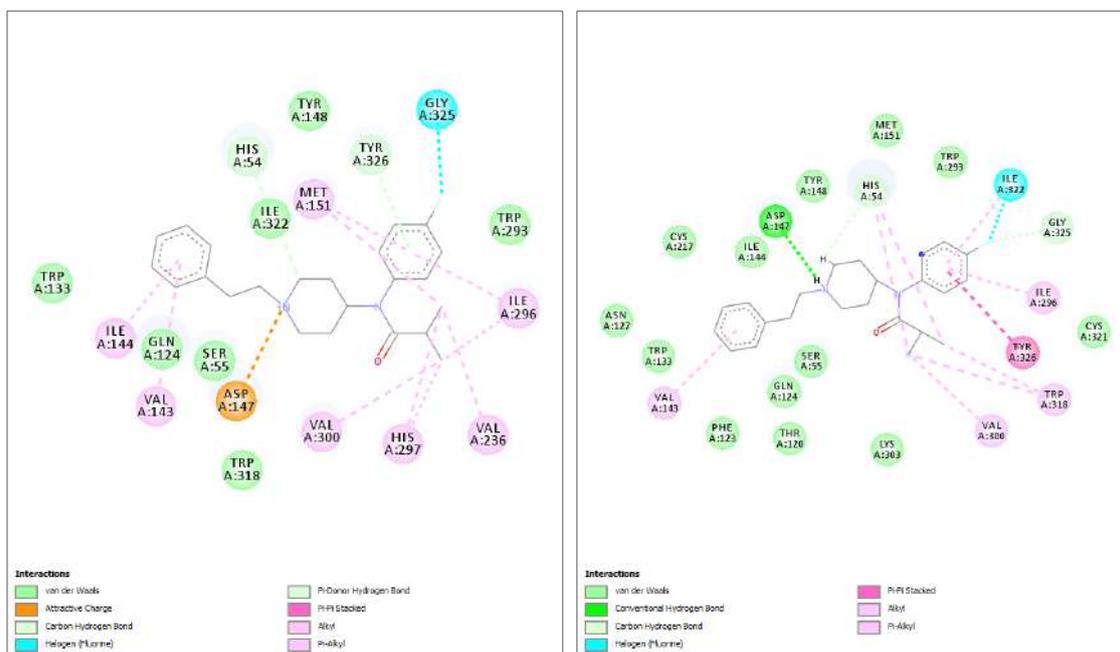


Figura 47. Interações do p-fluoroisobutirfentanil com o receptor μ -opioides (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

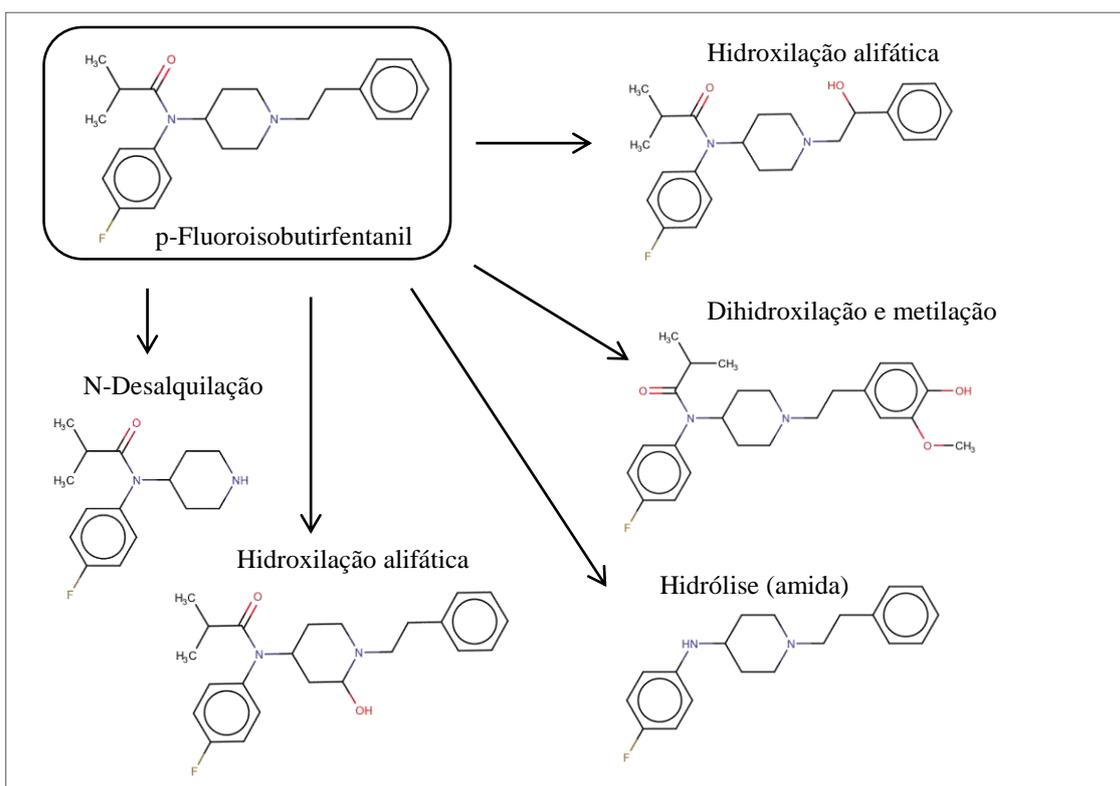


Figura 48. Principais metabólitos do p-fluoroisobutirfentanil

p-FLUOROBUTIRFENTANIL

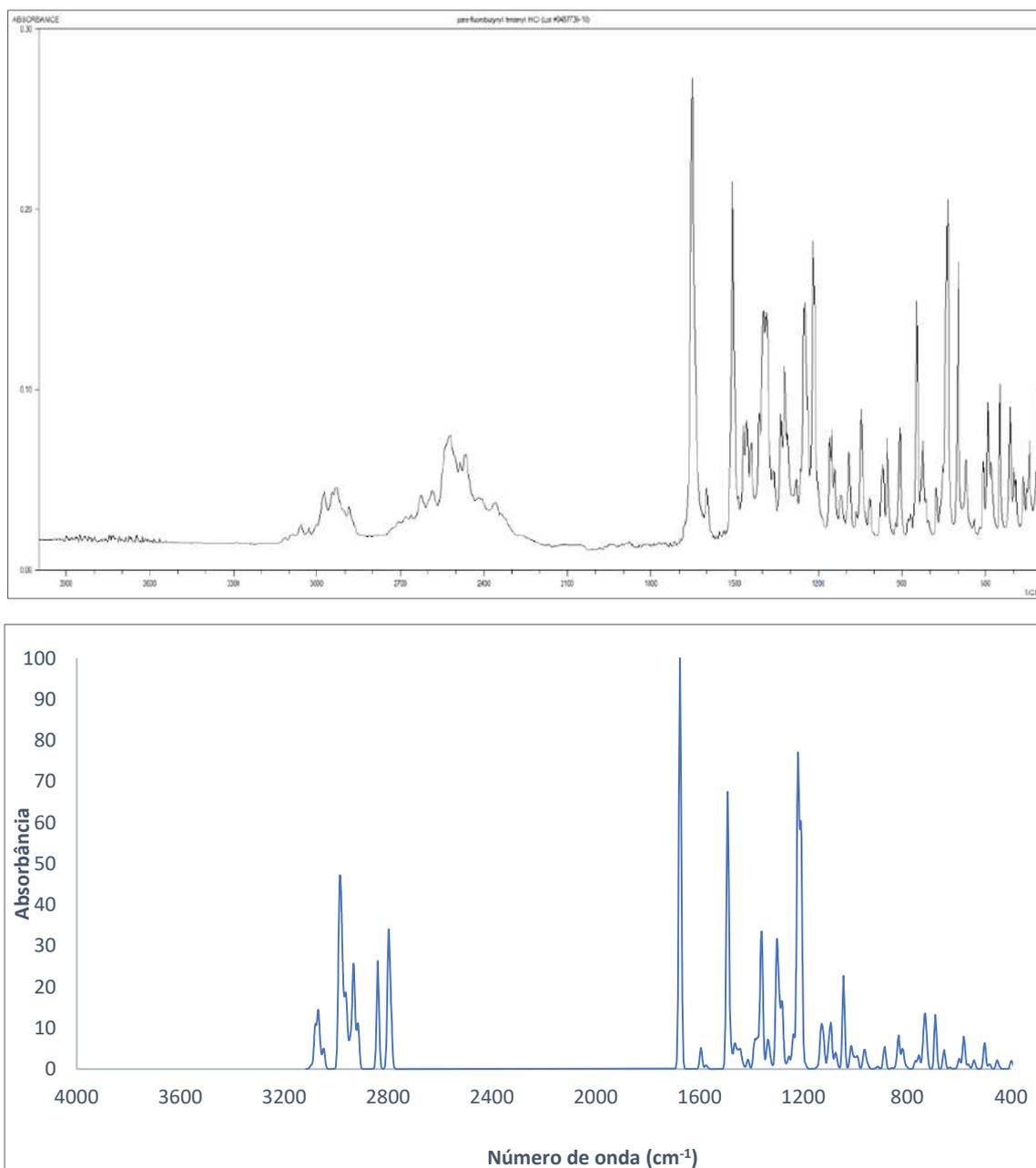


Figura 49. Espectro Infravermelho do p-fluorobutirfentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

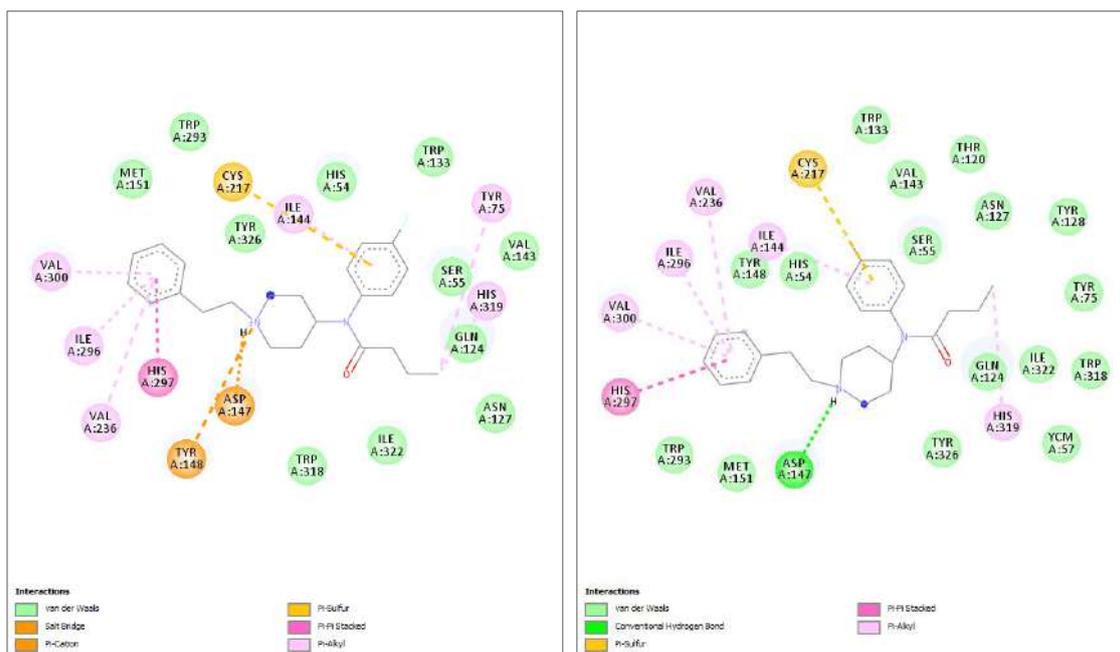


Figura 50. Interações do p-fluorobutirfentanil com o receptor μ -opioides (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

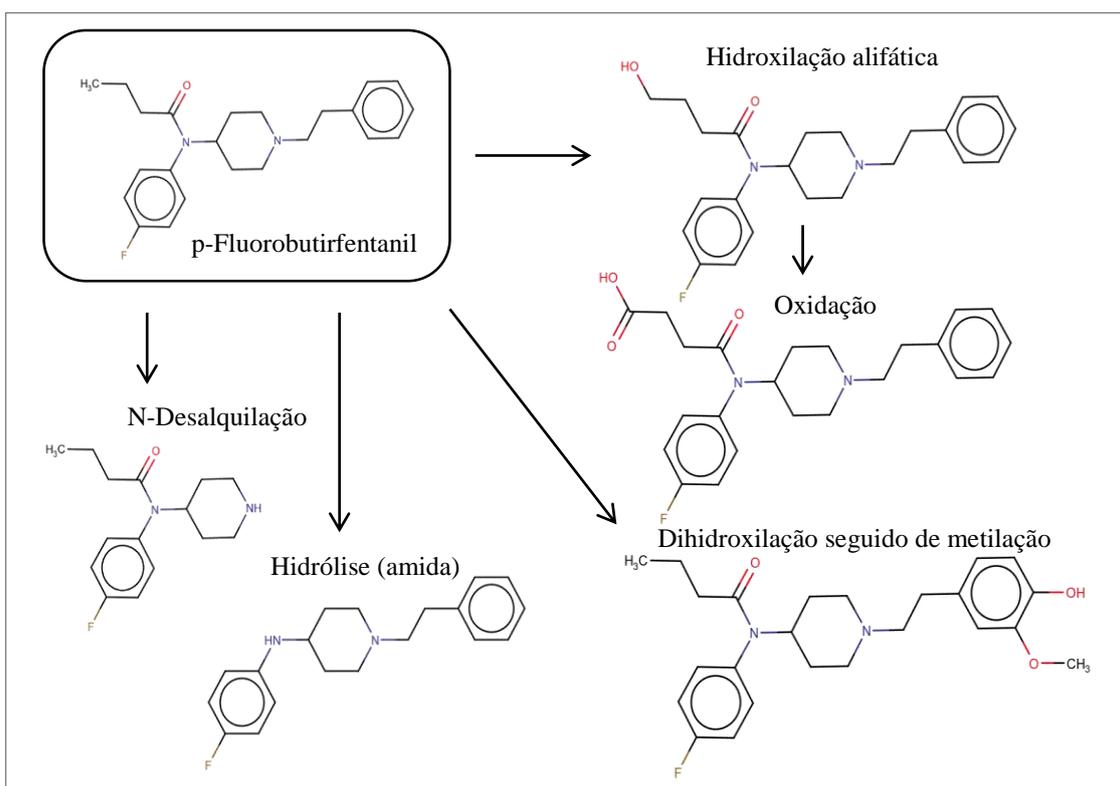


Figura 51. Principais metabólitos do p-fluorobutirfentanil

2-TIOFENOILFENTANIL

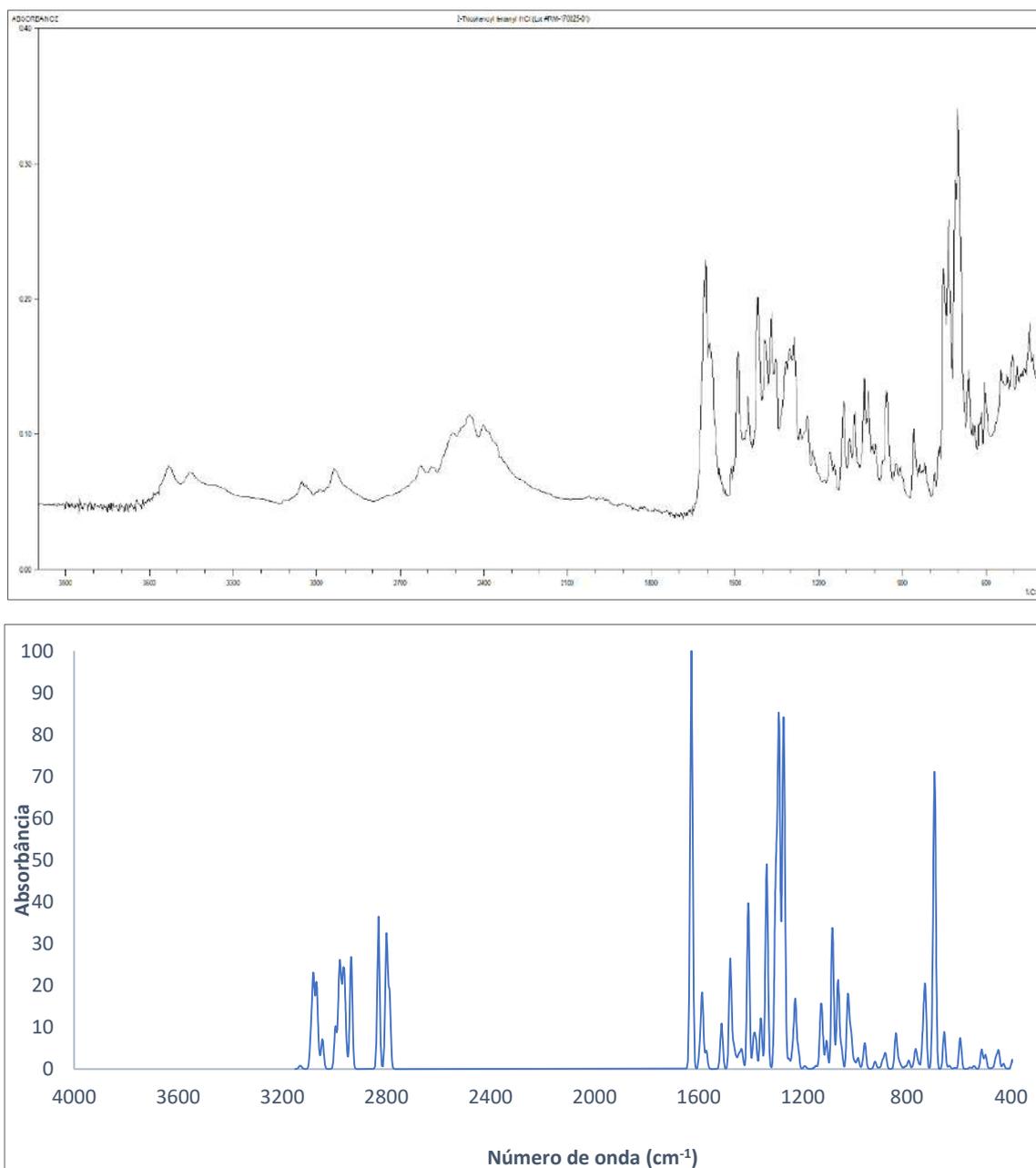


Figura 52. Espectro Infravermelho do 2-tiofenoilfentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

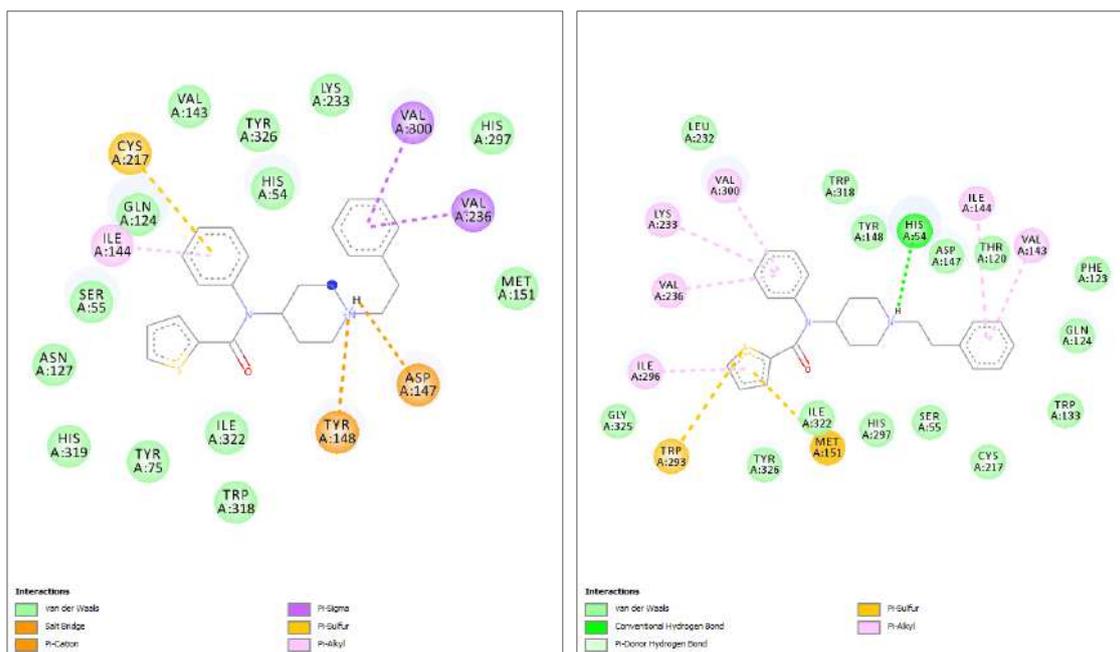


Figura 53. Interações do 2-tiofenilfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

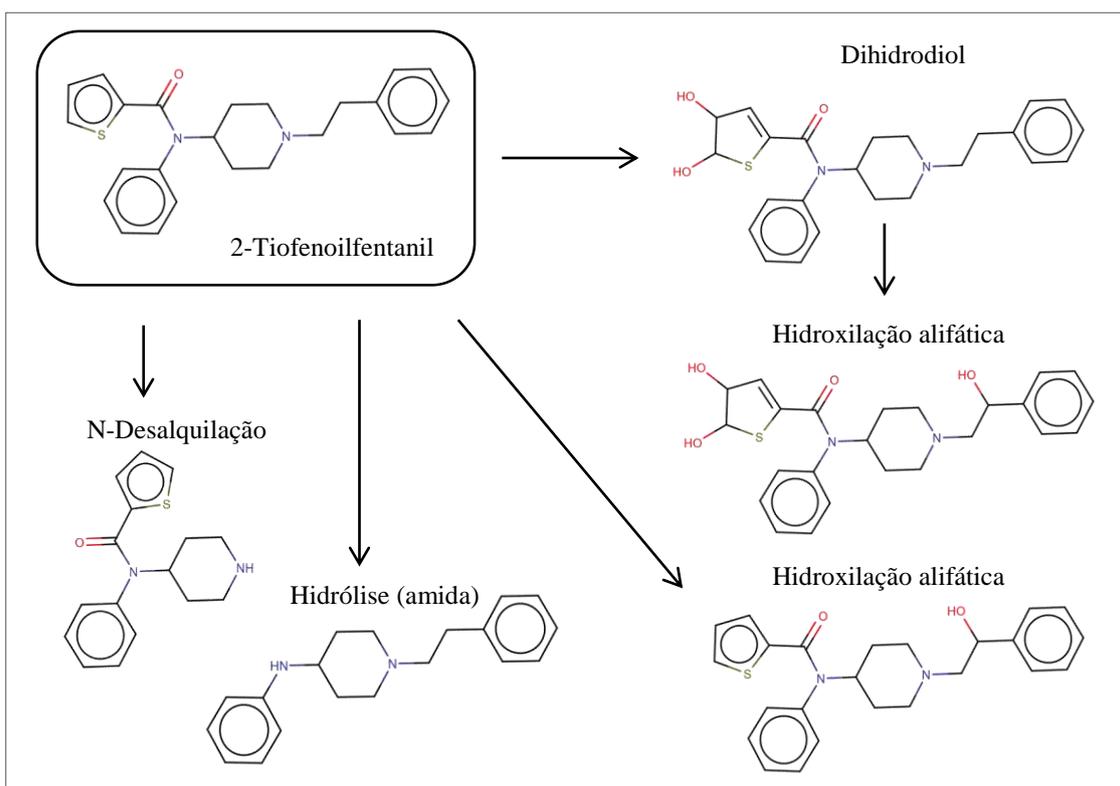


Figura 54. Principais metabólitos do 2-tiofenilfentanil

3-FURANILFENTANIL

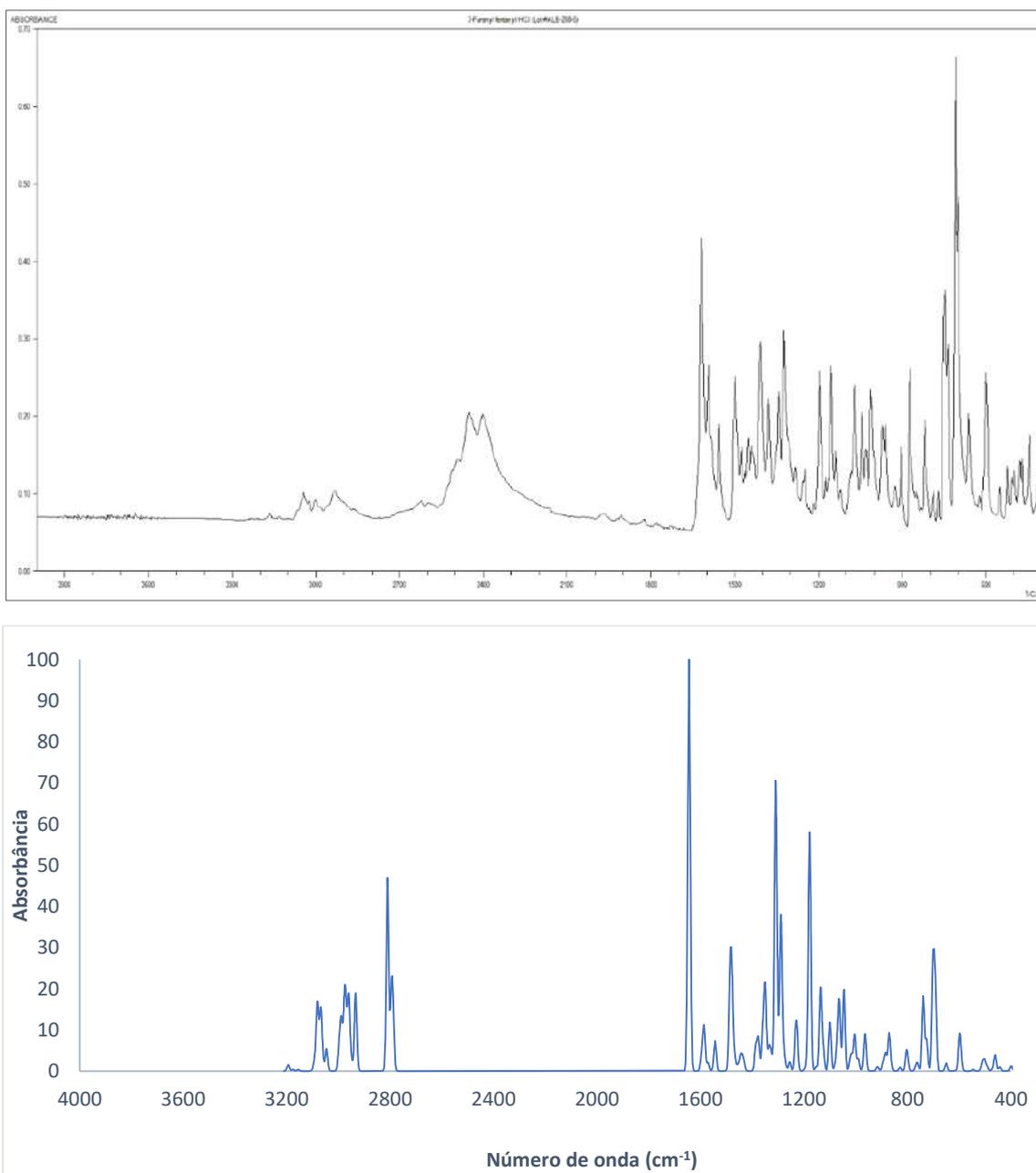


Figura 55. Espectro Infravermelho do 3-furanilfentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

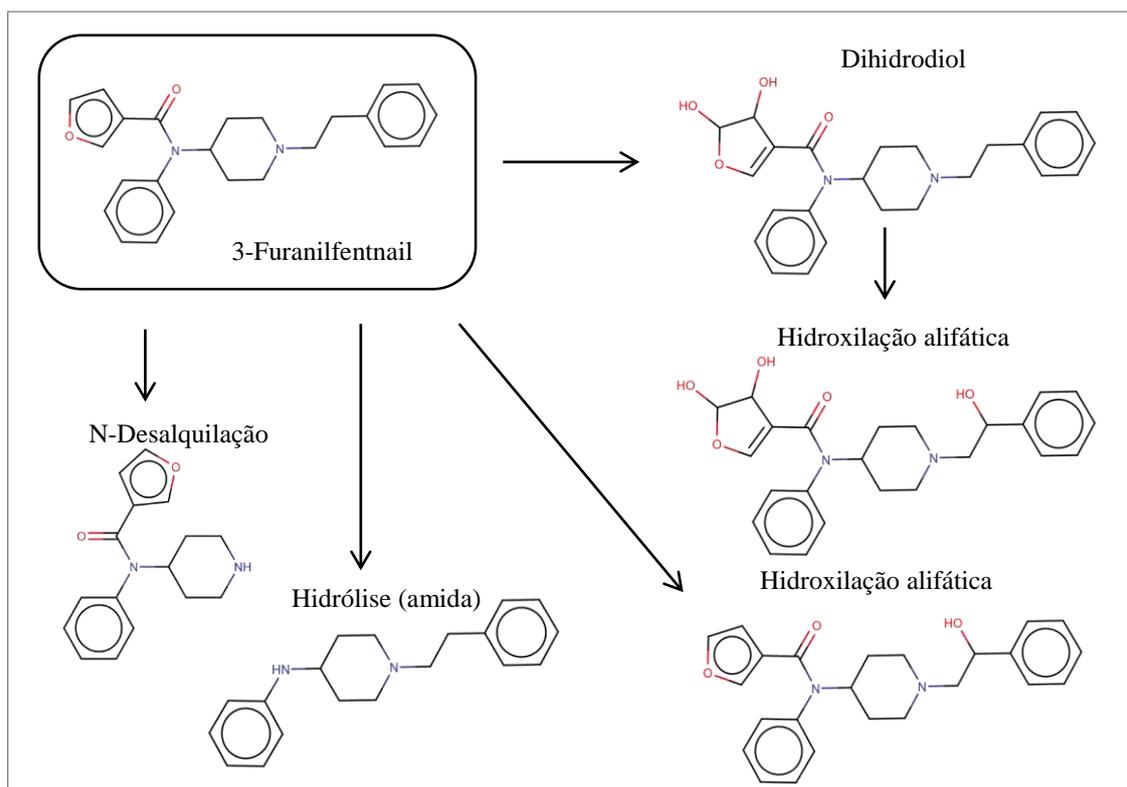
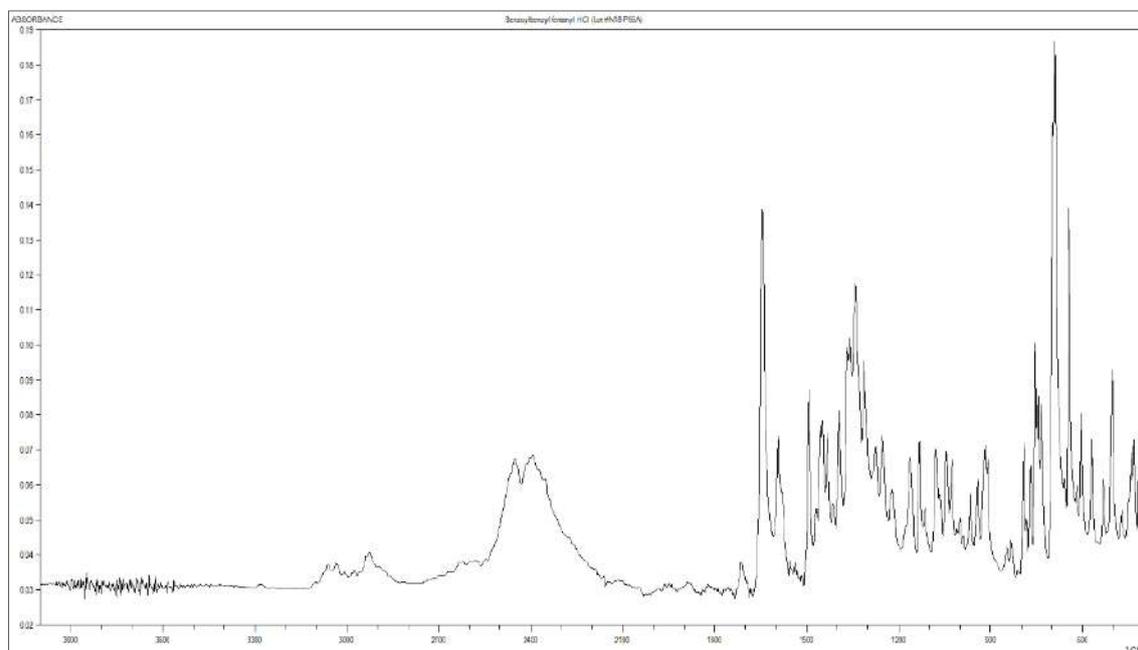


Figura 56. Principais metabólitos do 3-furanilfentanil

BENZOILBENZILFENTANIL



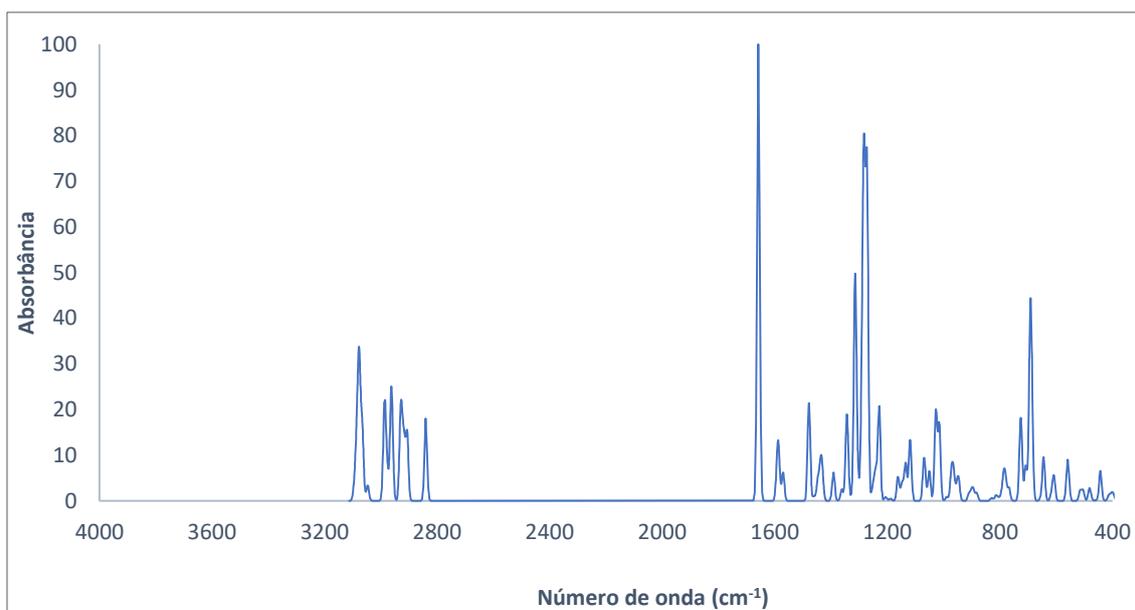


Figura 57. Espectro Infravermelho do benzoilbenzifentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

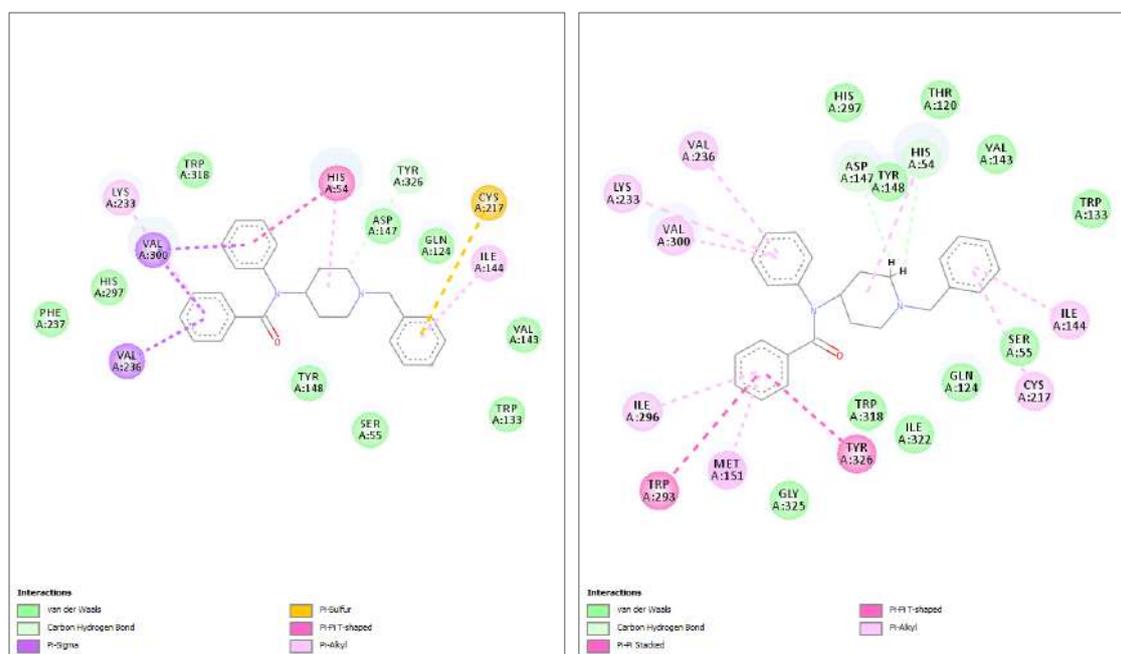


Figura 58. Interações do benzoilbenzifentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

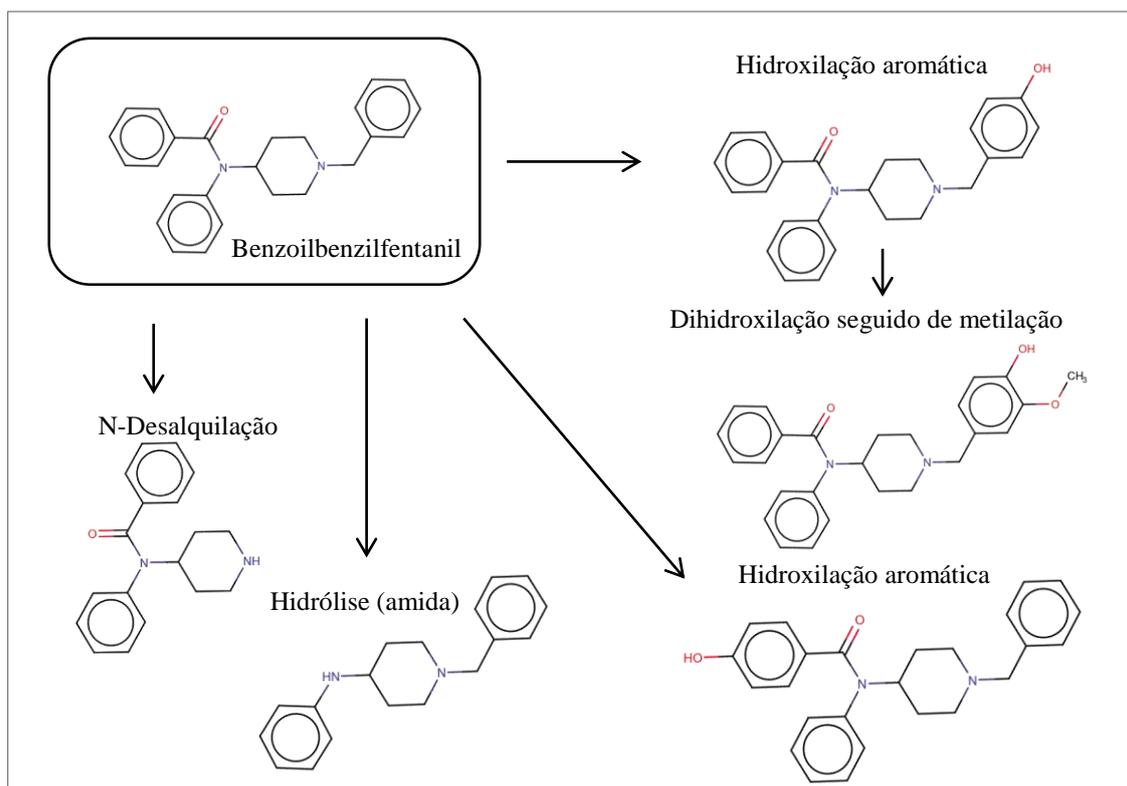
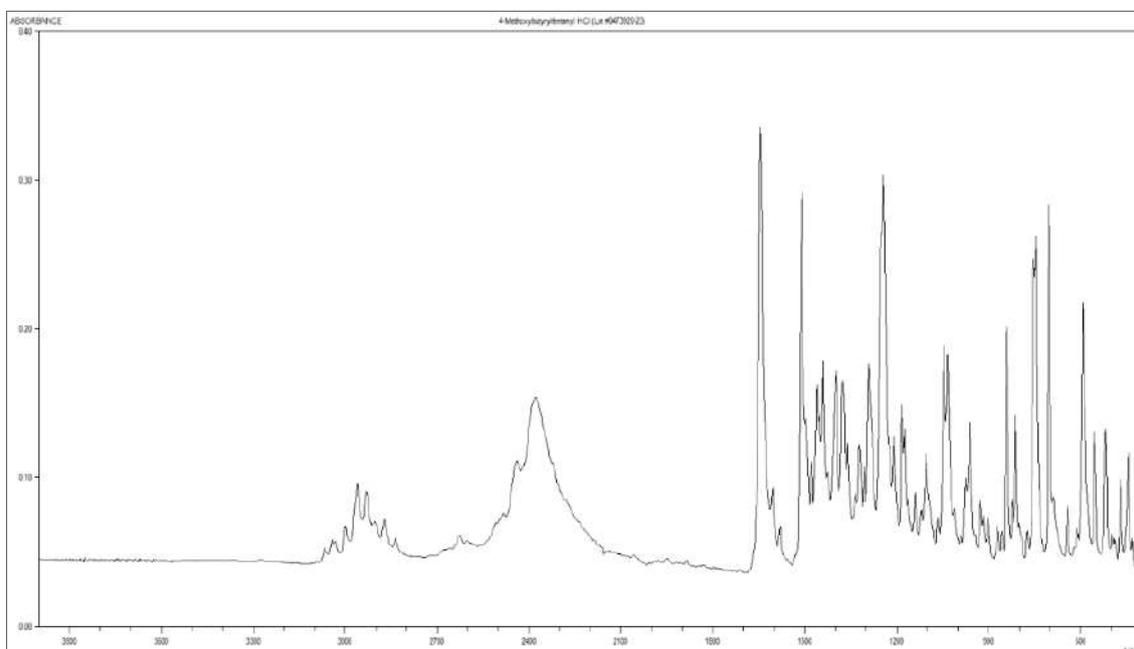


Figura 59. Principais metabólitos do benzoilbenzifentanil

4-METOXIBUTIRFENTANIL



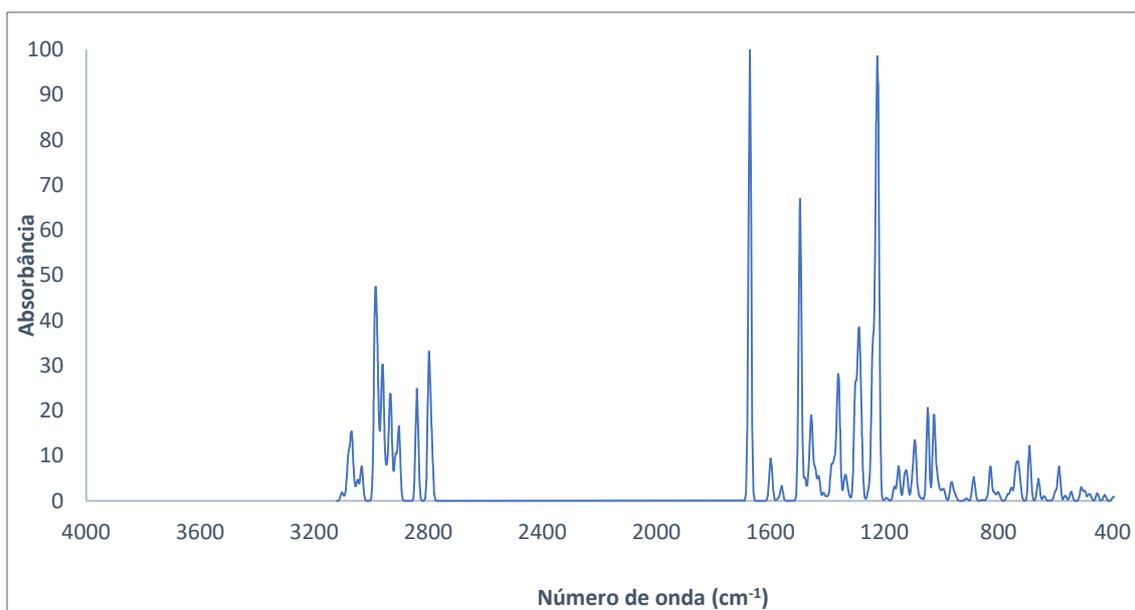


Figura 60. Espectro Infravermelho do 4-metoxibutirfentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

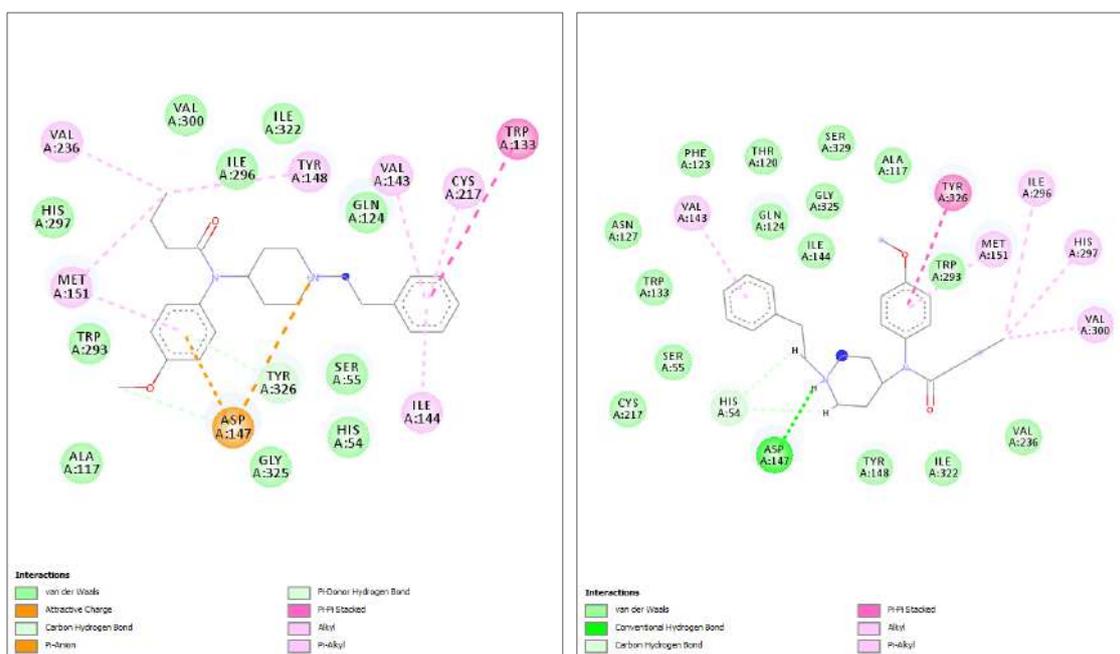


Figura 61. Interações do 4-metoxibutirfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

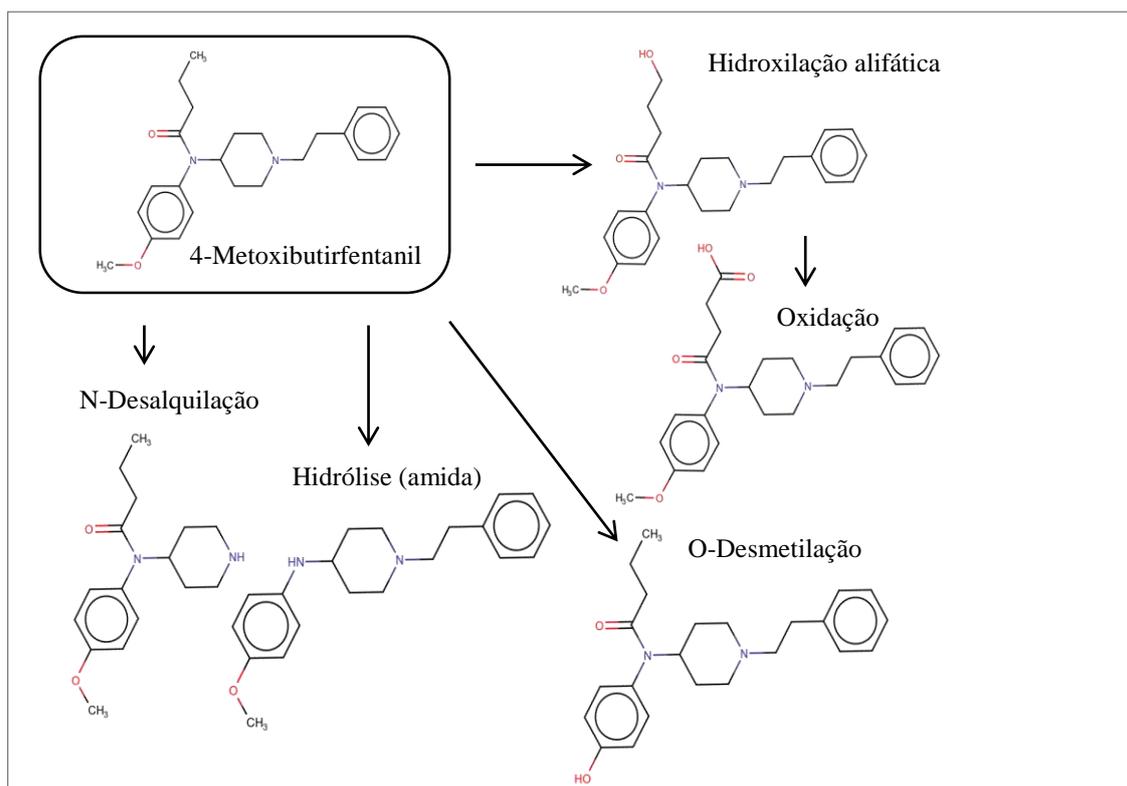
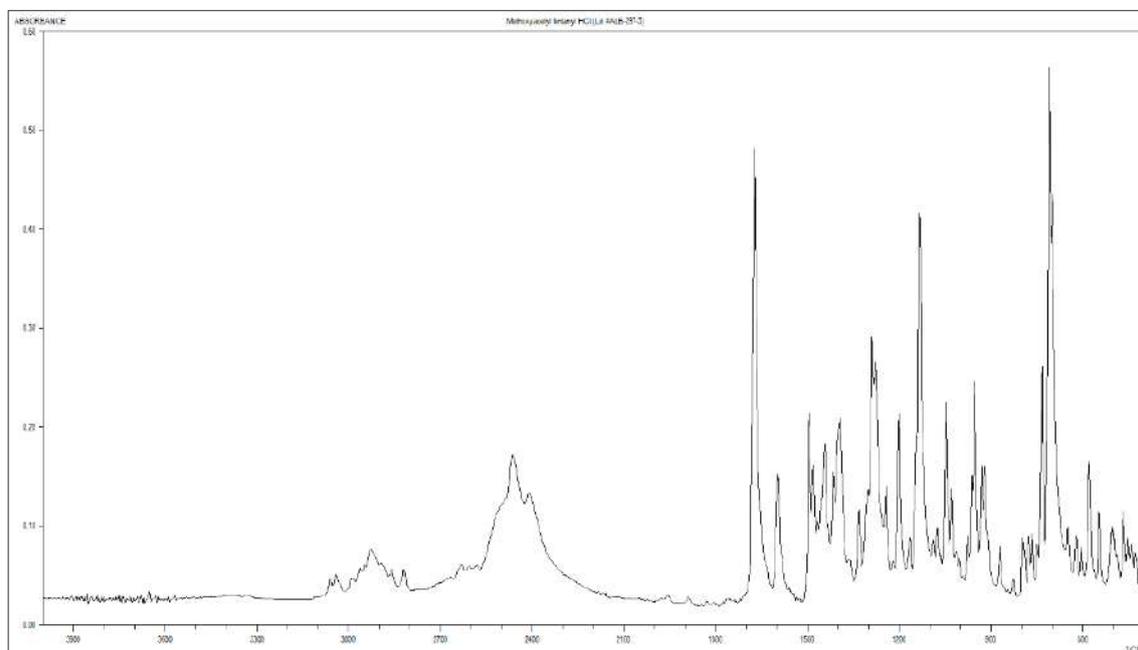


Figura 62. Principais metabólitos do 4-metoxibutirfentanil

METOXIACETILFENTANIL



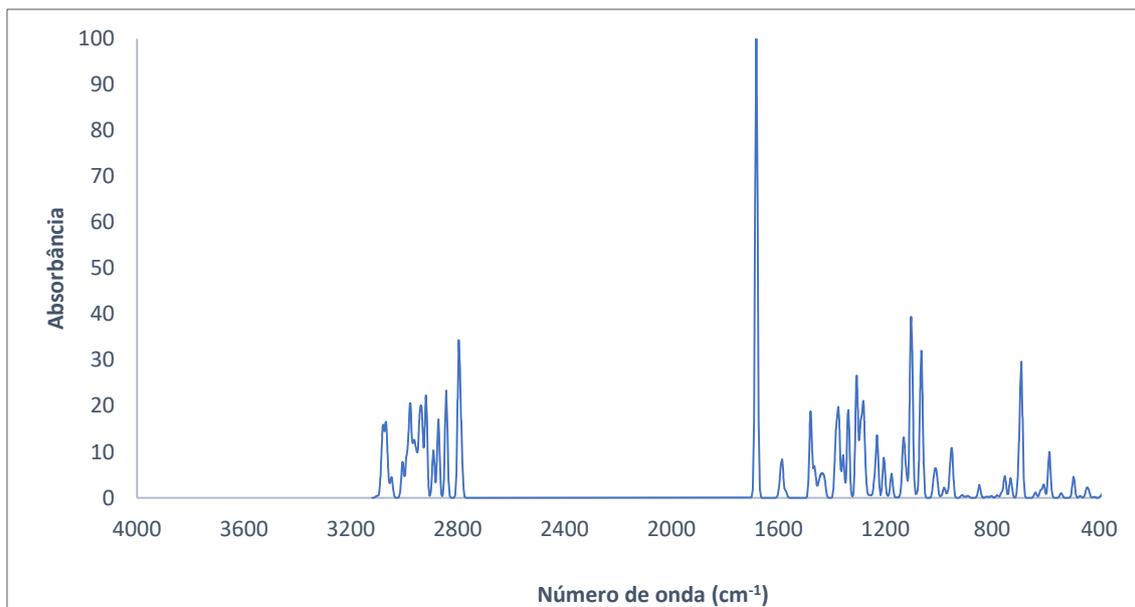


Figura 63. Espectro Infravermelho do metoxiacetilfentani: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

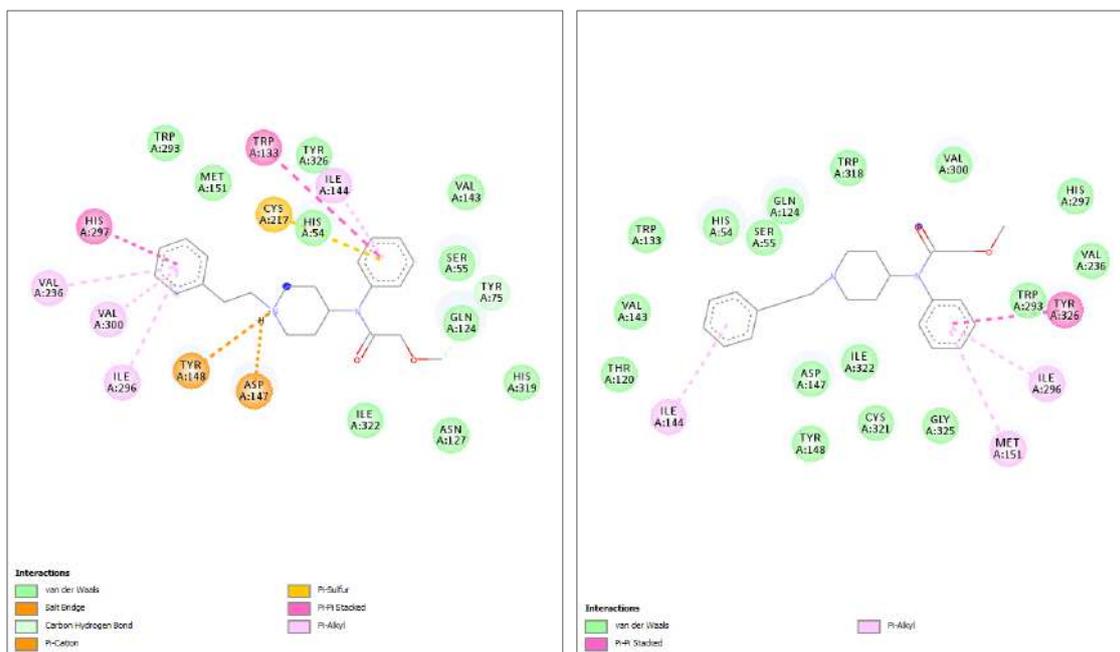


Figura 64. Interações do metoxiacetilfentani com o receptor μ -opioides (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

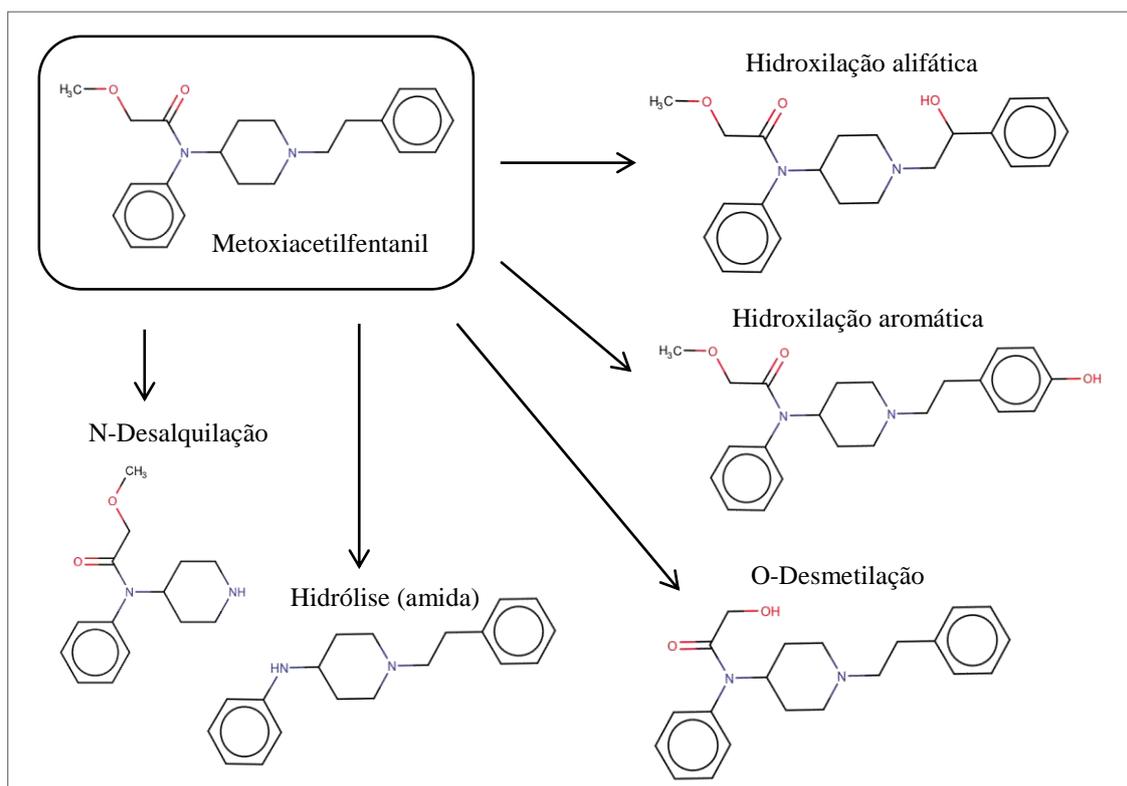
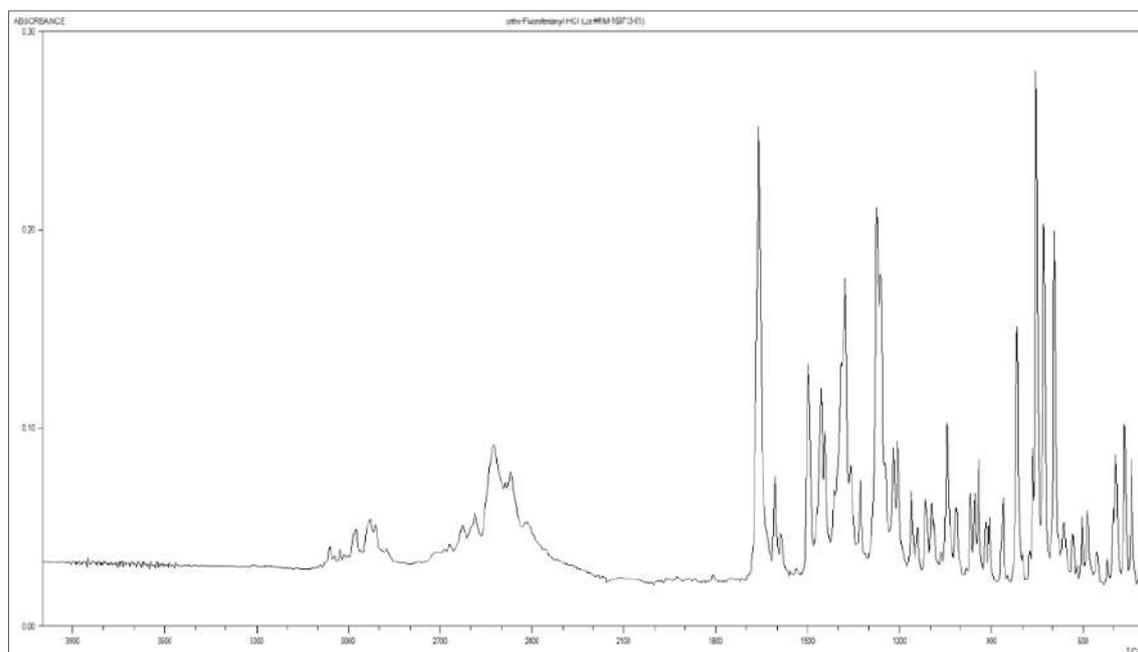


Figura 65. Principais metabólitos do metoxiacetilfentanil

o-FLUOROFENTANIL



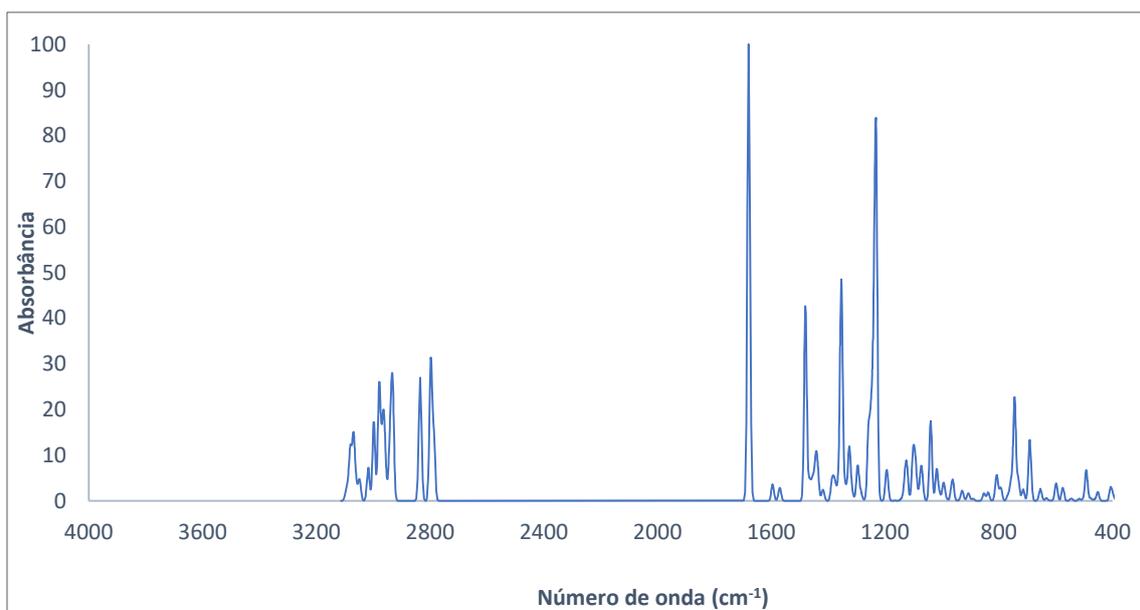


Figura 66. Espectro Infravermelho do o-fluorofentanil: (a) SWGDRUG experimental¹⁸⁸ e (b) teórico

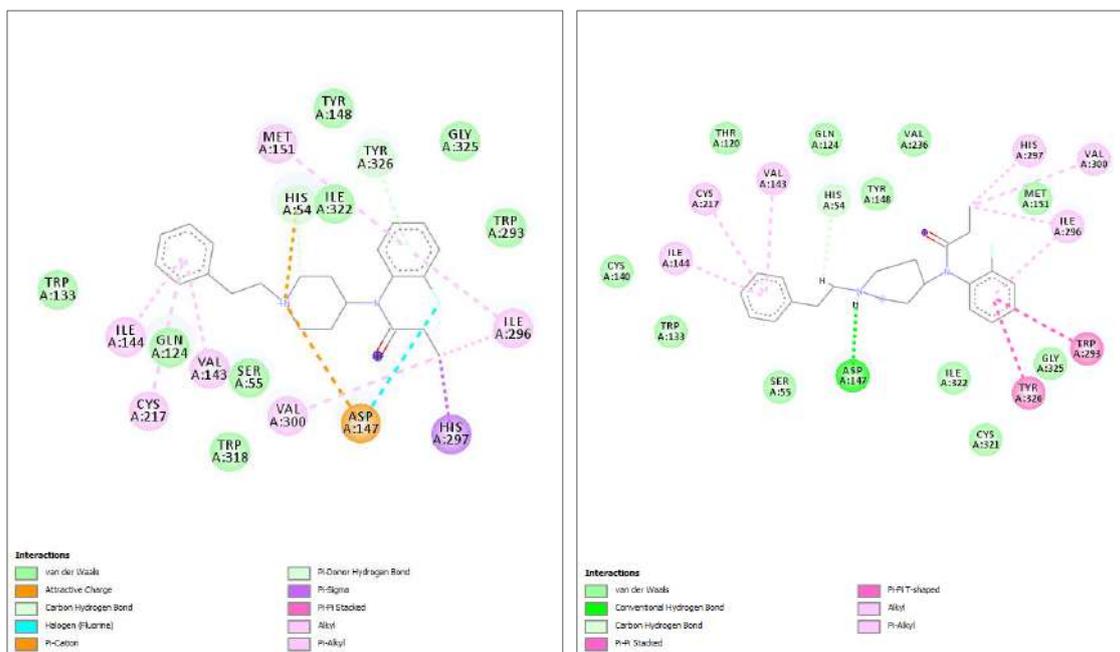


Figura 67. Interações do o-fluorofentanil com o receptor μ -opioidé (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

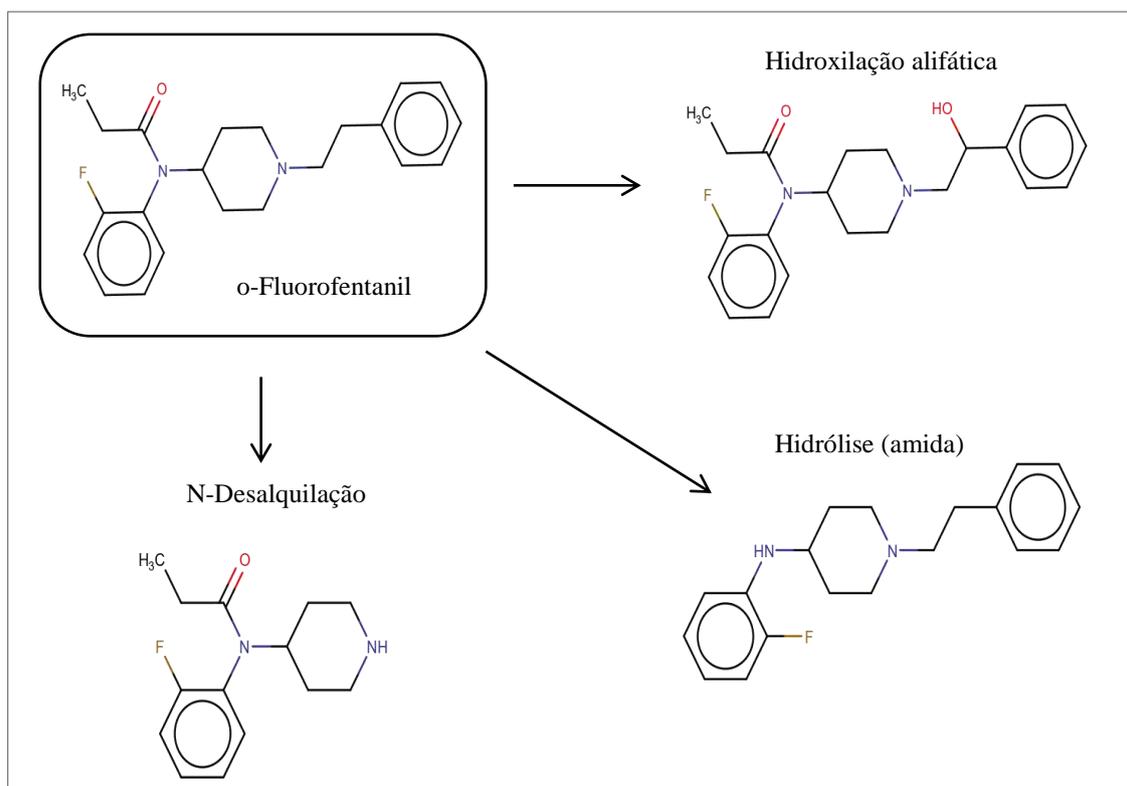
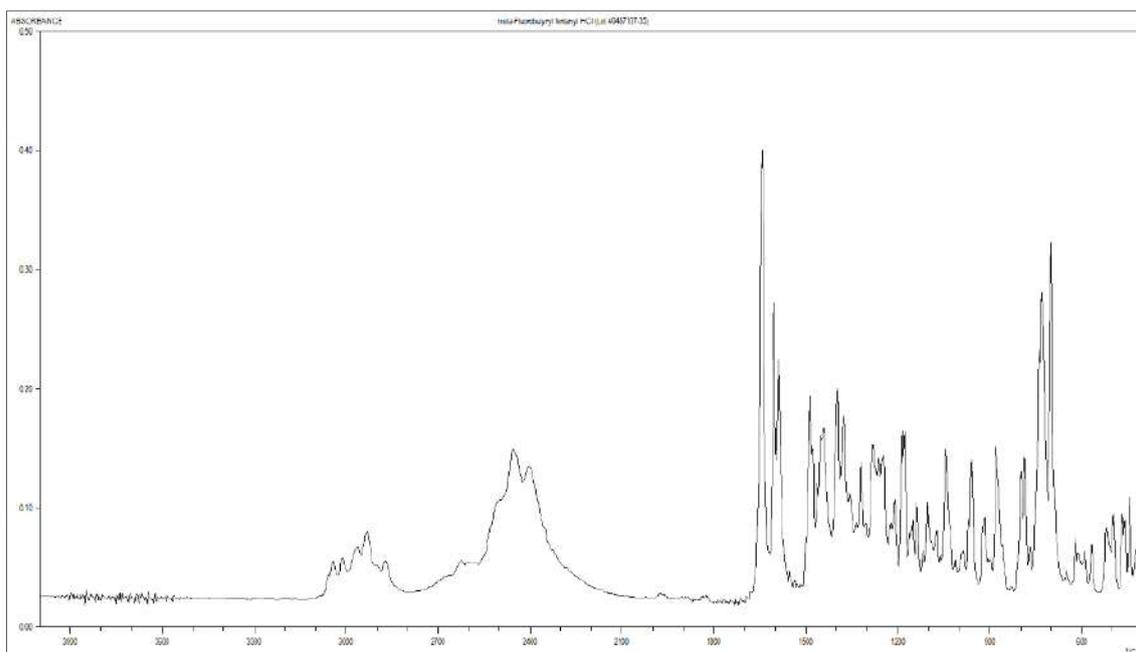


Figura 68. Principais metabólitos do o-fluorofentani

m-FLUOROBUTIRFENTANIL



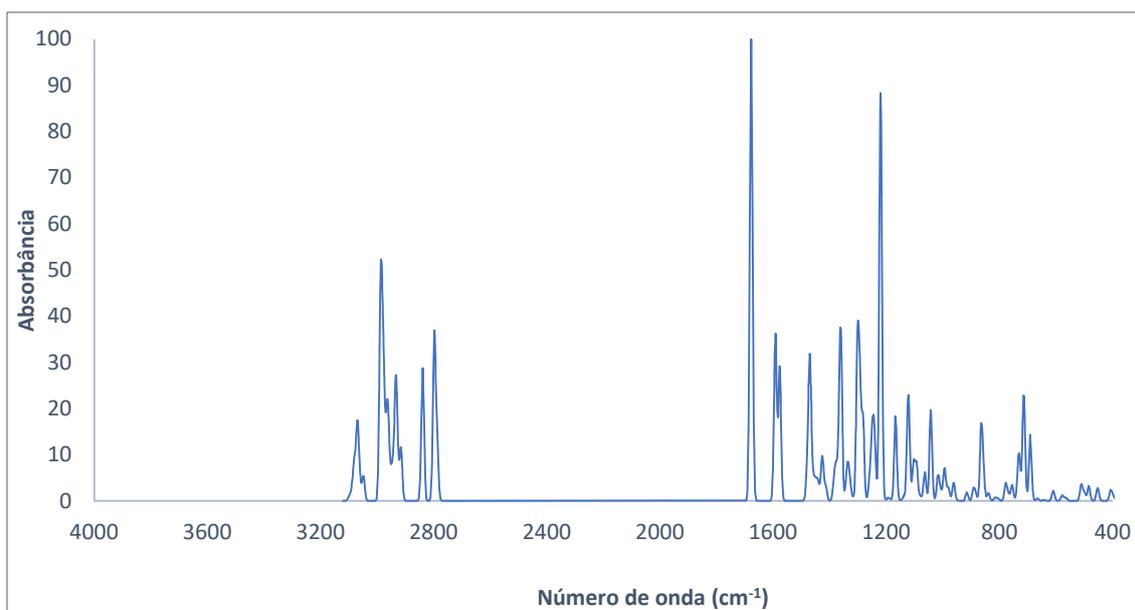


Figura 69. Espectro Infravermelho do m-fluorobutirfentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

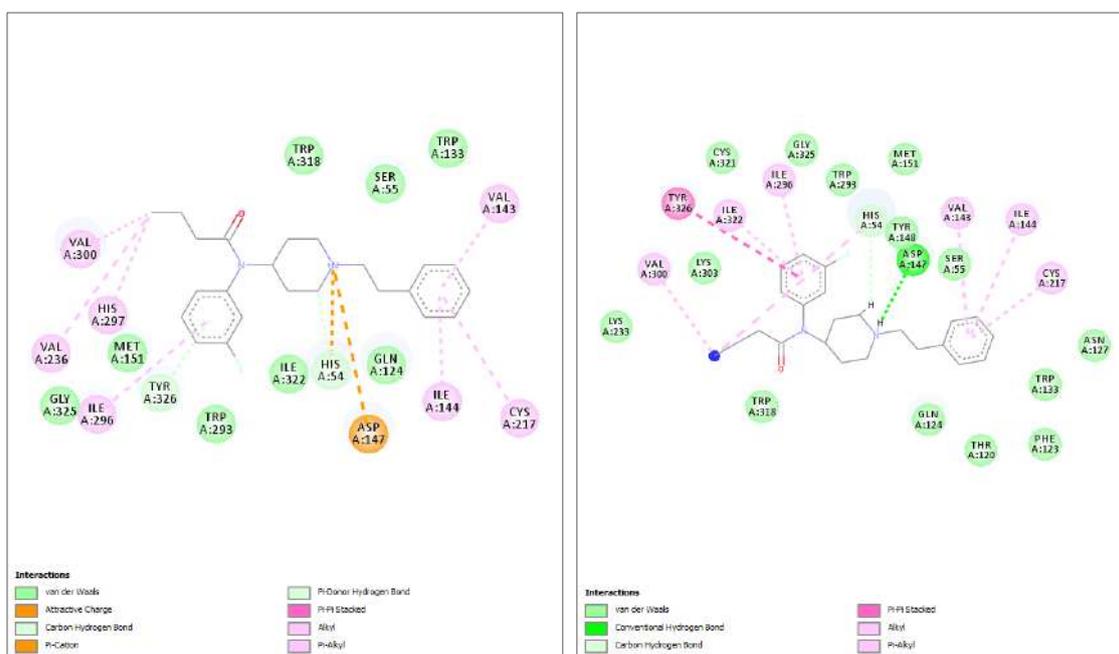


Figura 70. Interações do m-fluorobutirfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

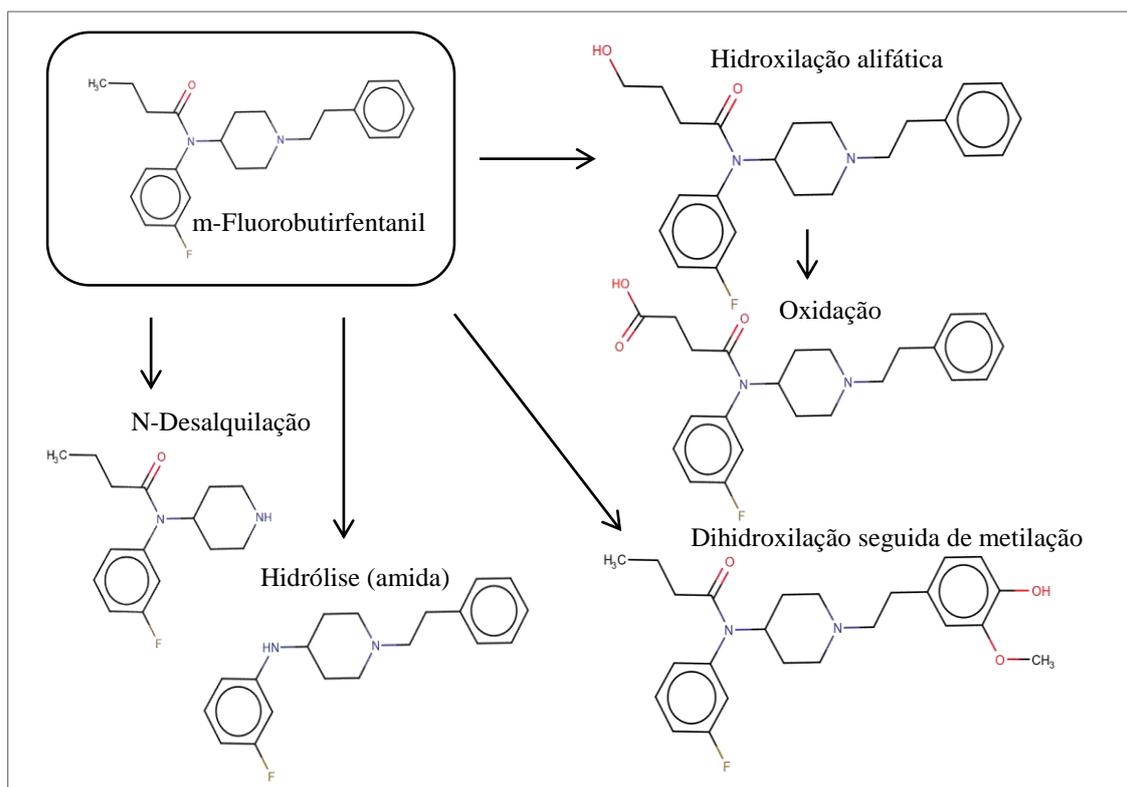
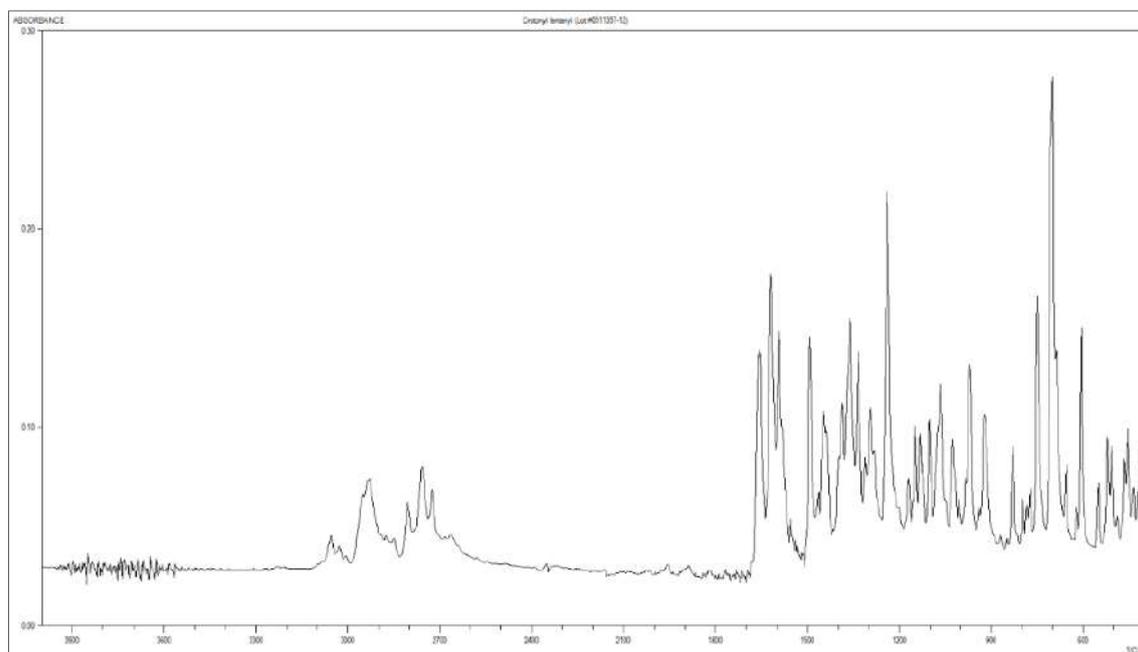


Figura 71. Principais metabólitos do m-fluorobupropionil

CROTONILFENTANIL



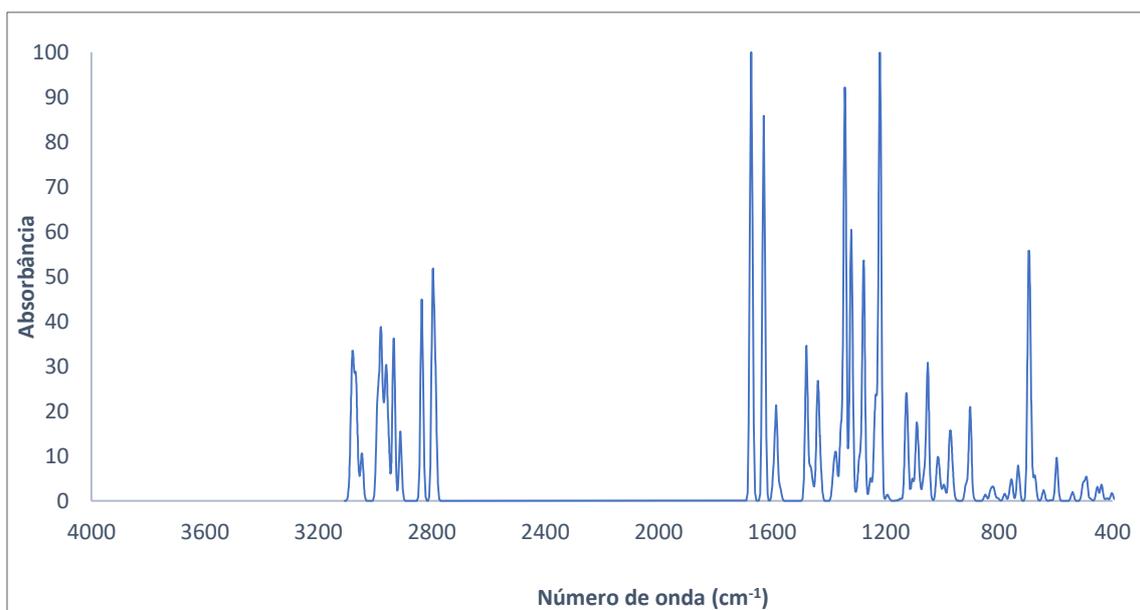


Figura 72. Espectro Infravermelho do crotonilfentani: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

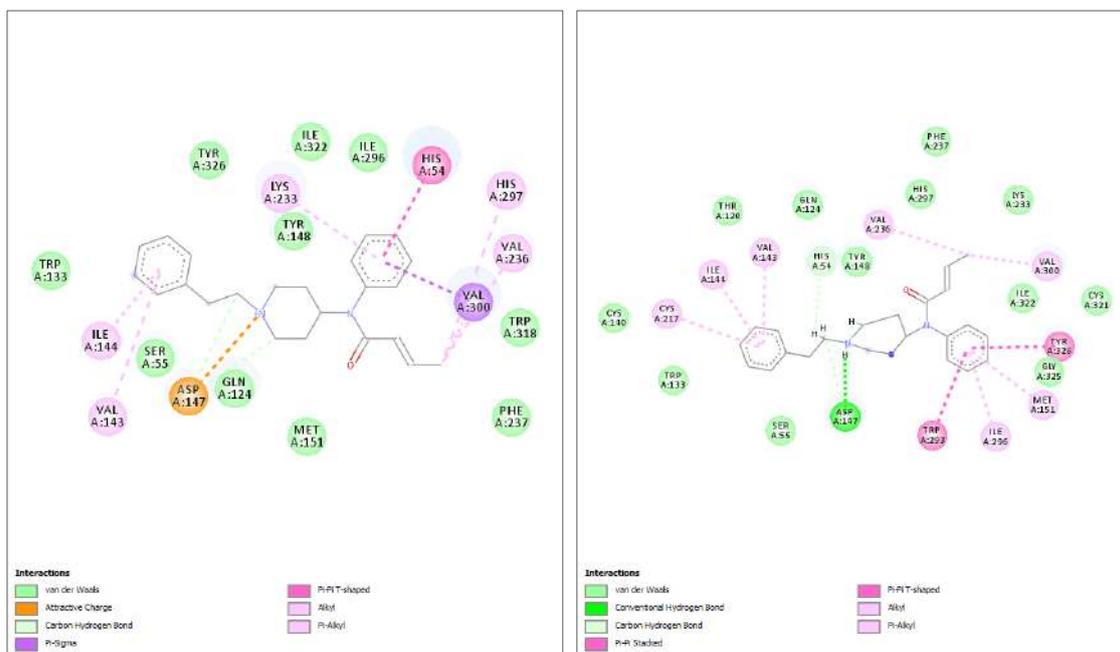


Figura 73. Interações do crotonilfentani com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

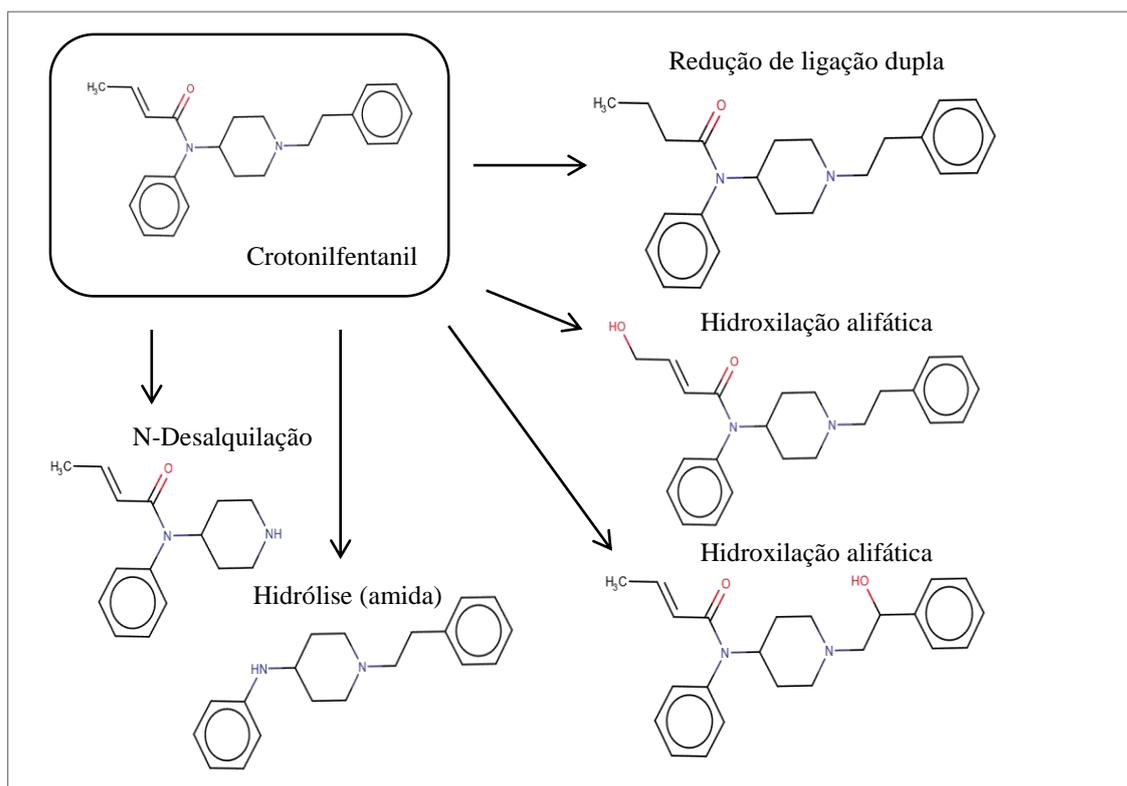
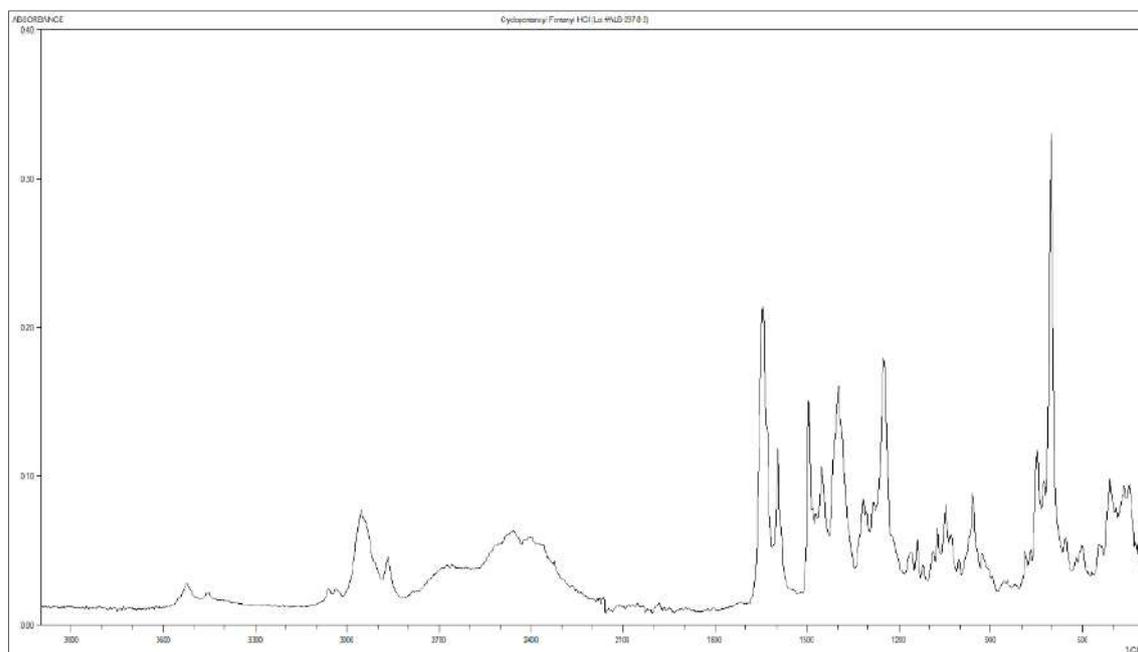


Figura 74. Principais metabólitos do crotonilfentanil

CICLOPENTANOILFENTANIL



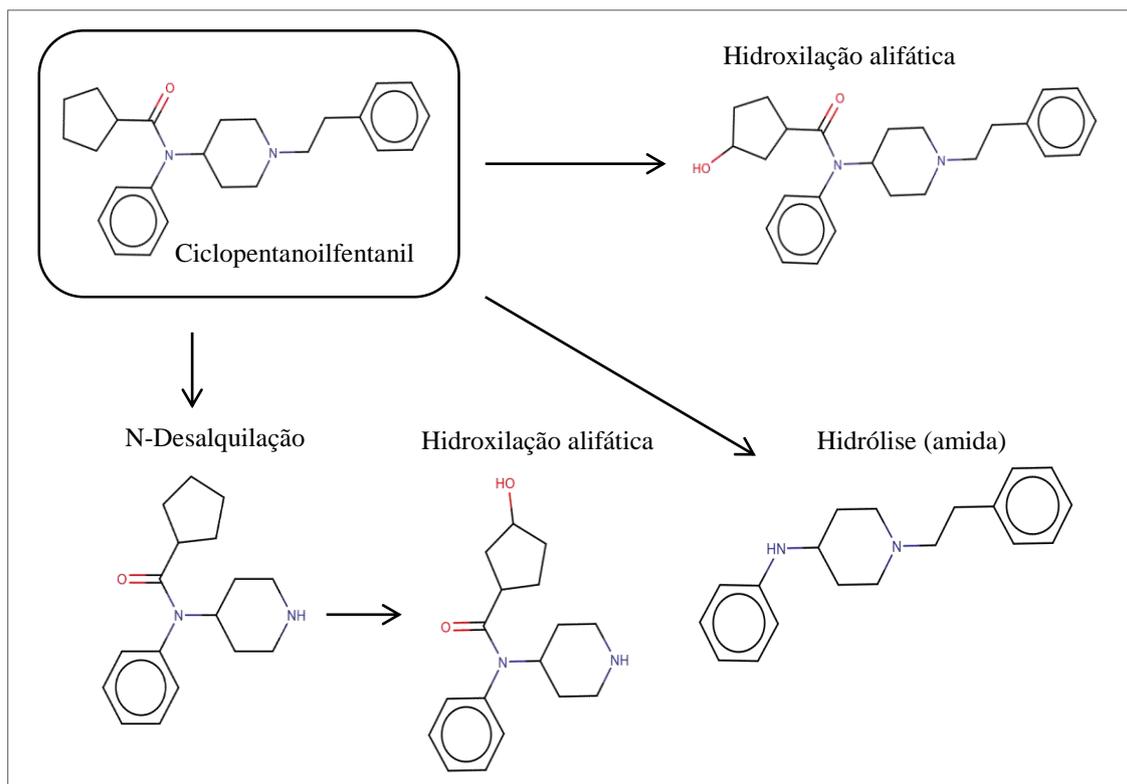
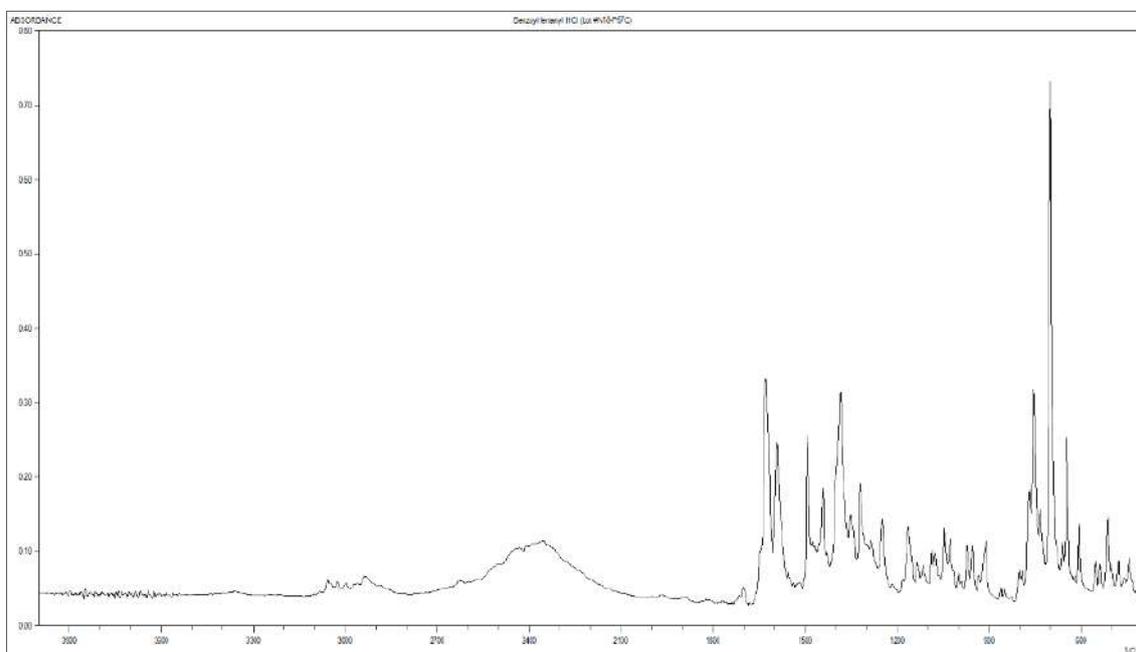


Figura 77. Principais metabólitos do ciclopentanoifentânil

BENZOILFENTANIL



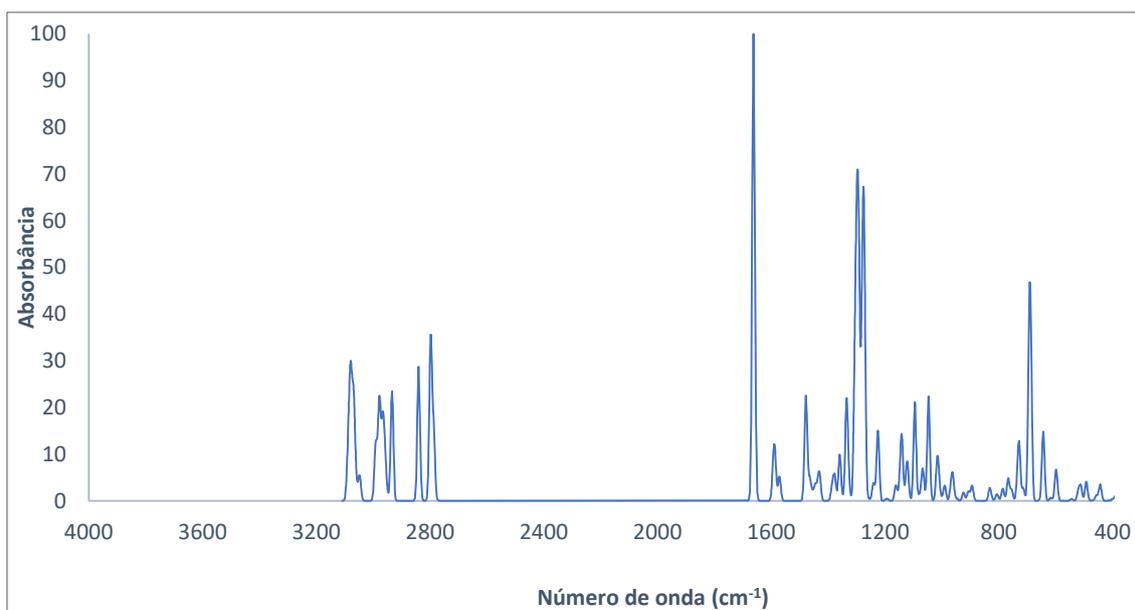


Figura 78. Espectro Infravermelho do benzoilfenetil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

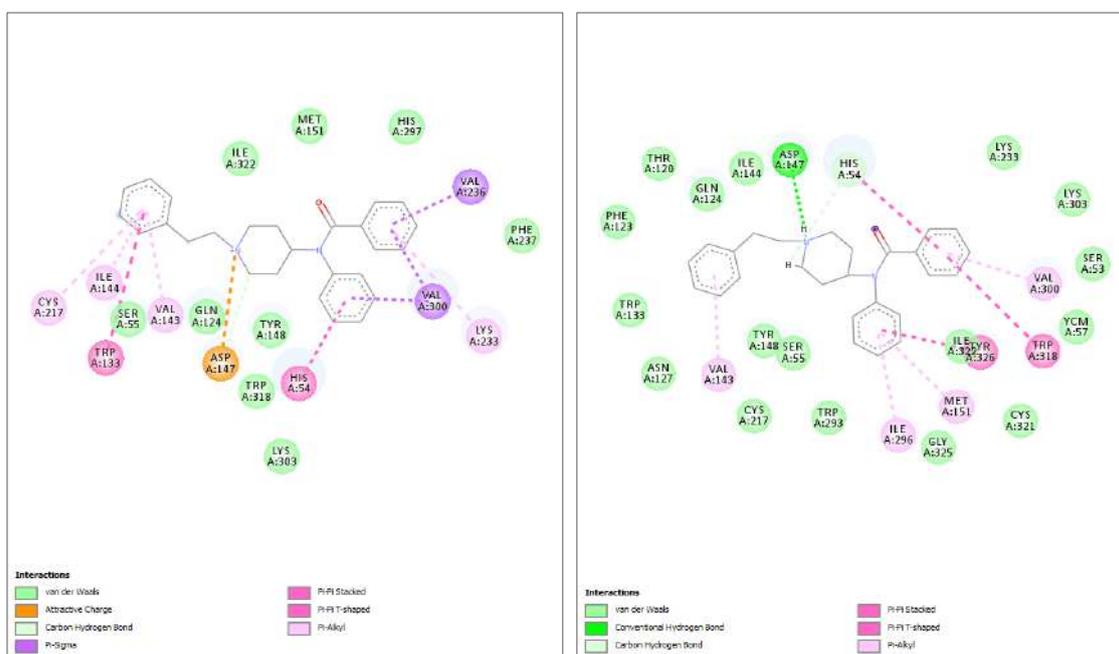


Figura 79. Interações do benzoilfenetil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

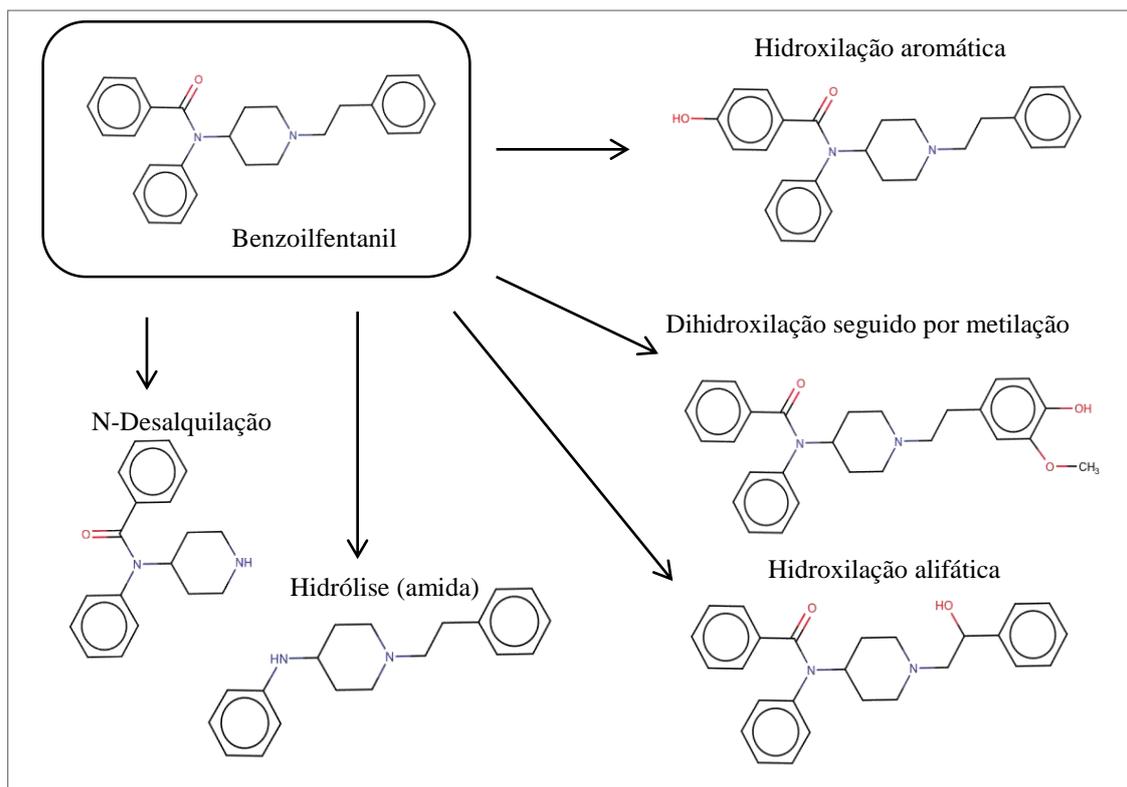
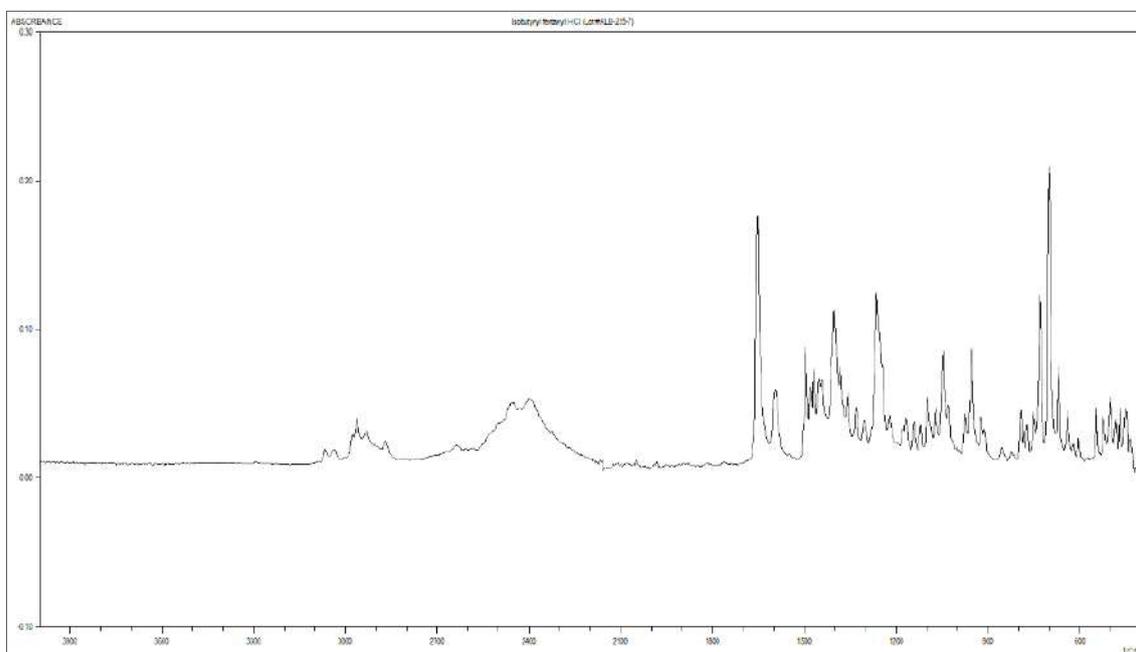


Figura 80. Principais metabólitos do benzoilfentanil

ISOBUTIRFENTANIL



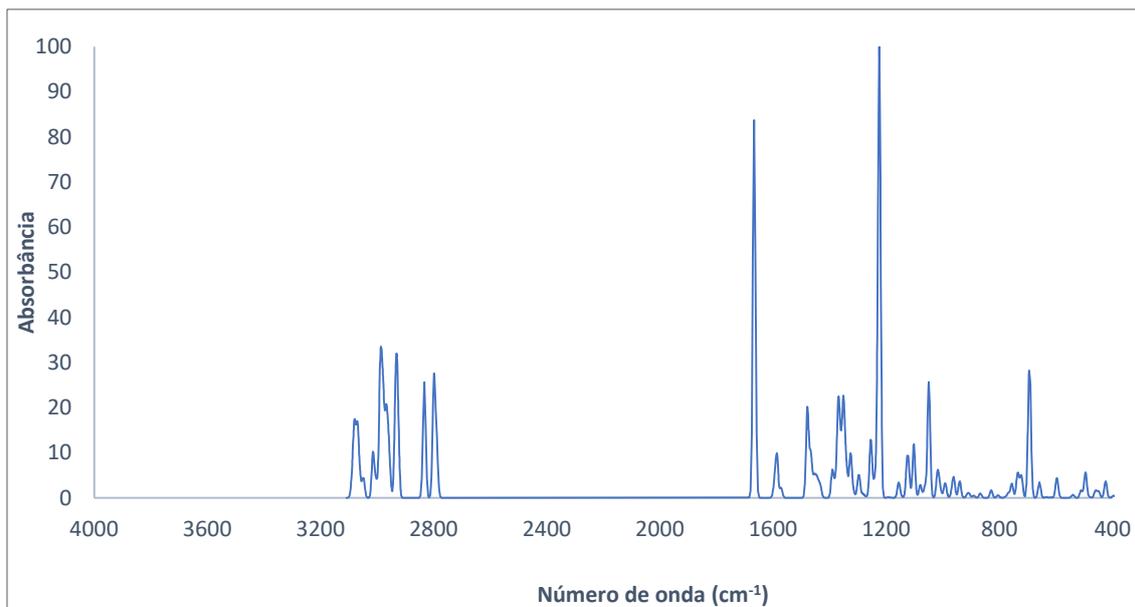


Figura 81. Espectro Infravermelho do isobutirfentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

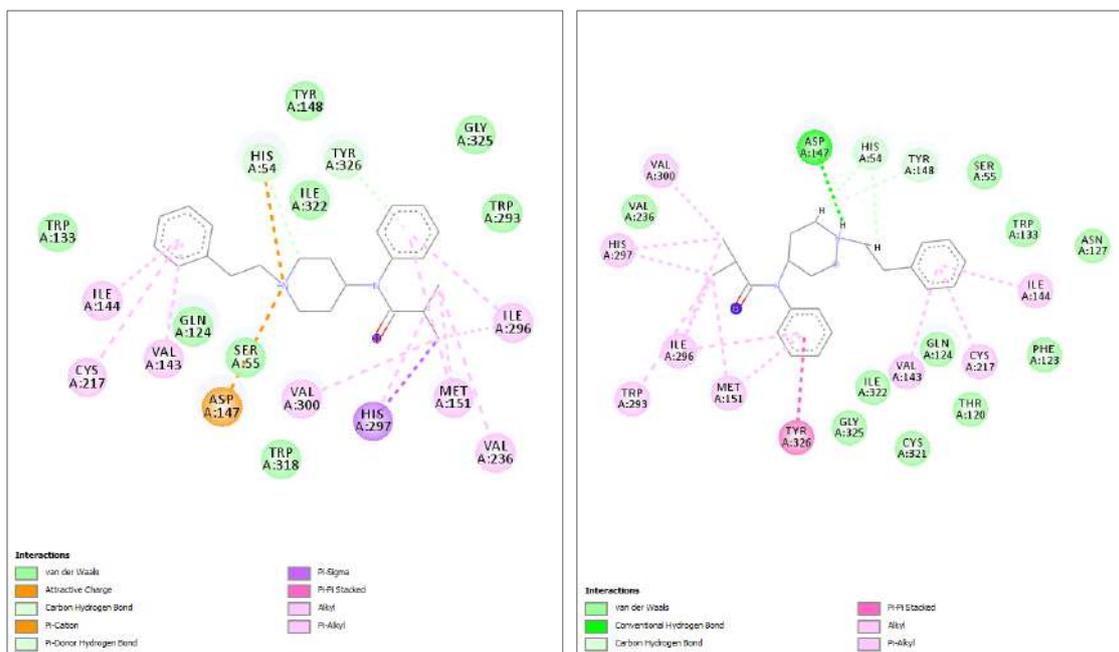


Figura 82. Interações do isobutirfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

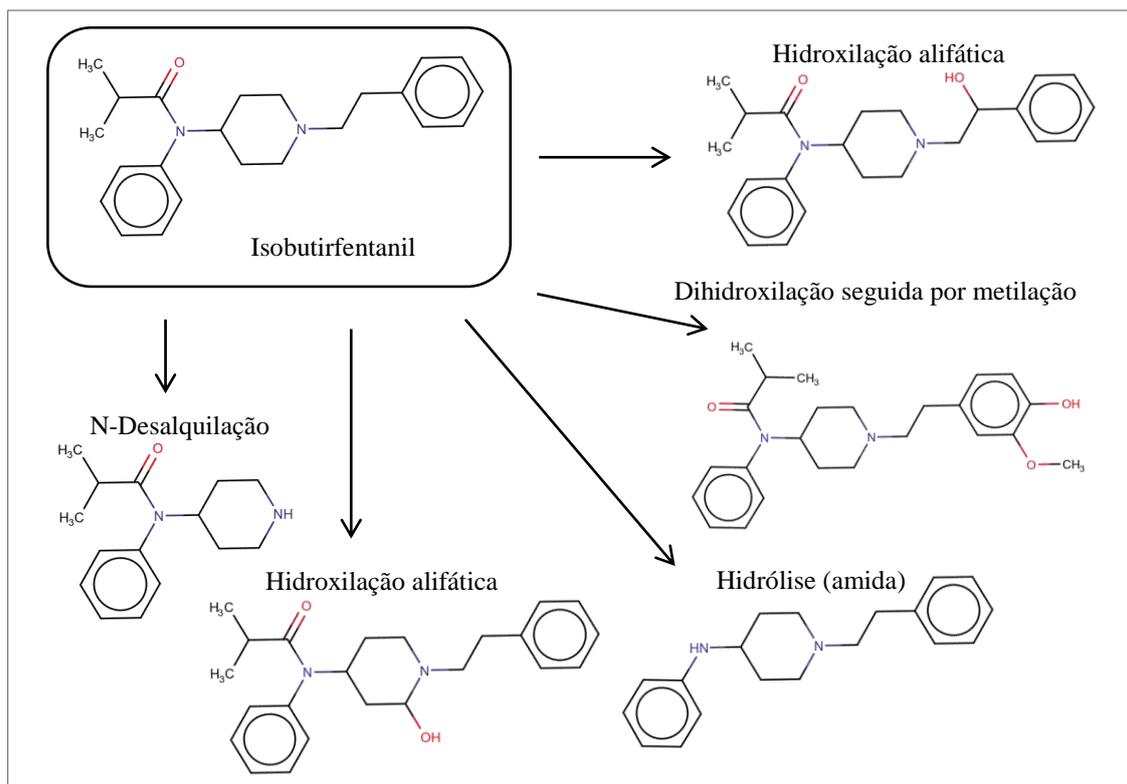
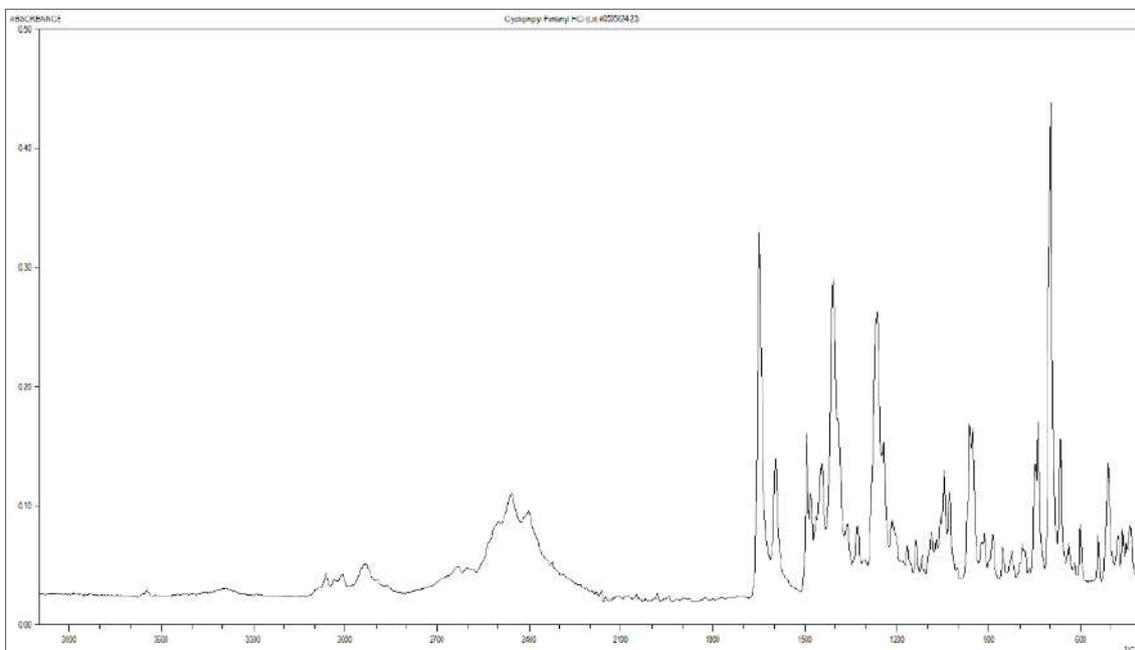


Figura 83. Principais metabólitos do isobutirfentanil

CICLOPROPILFENTANIL



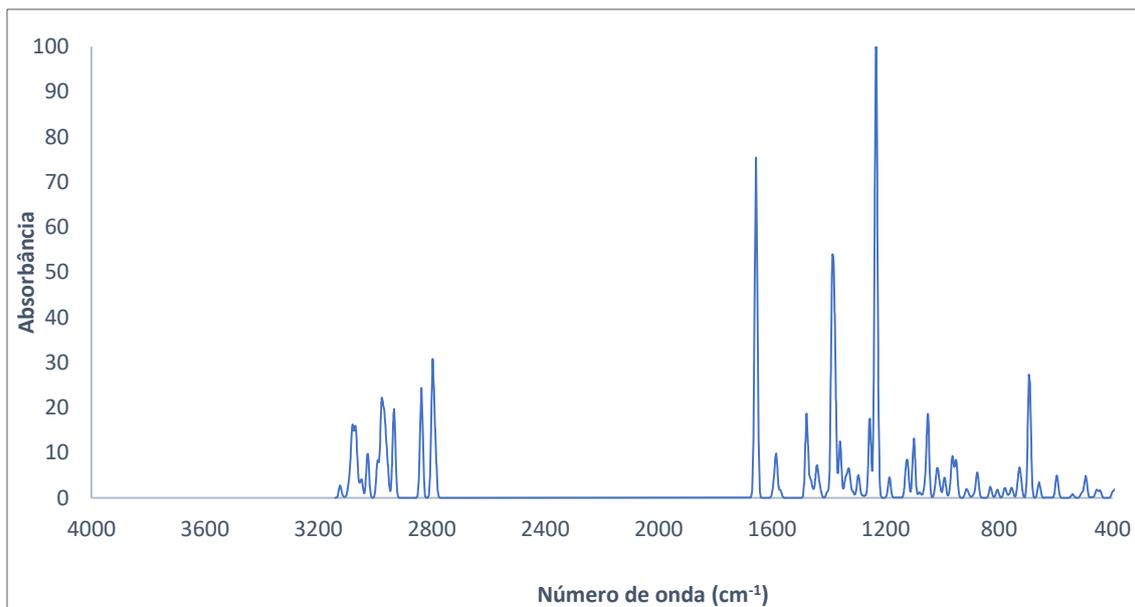


Figura 84. Espectro Infravermelho do ciclopropilfentani: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

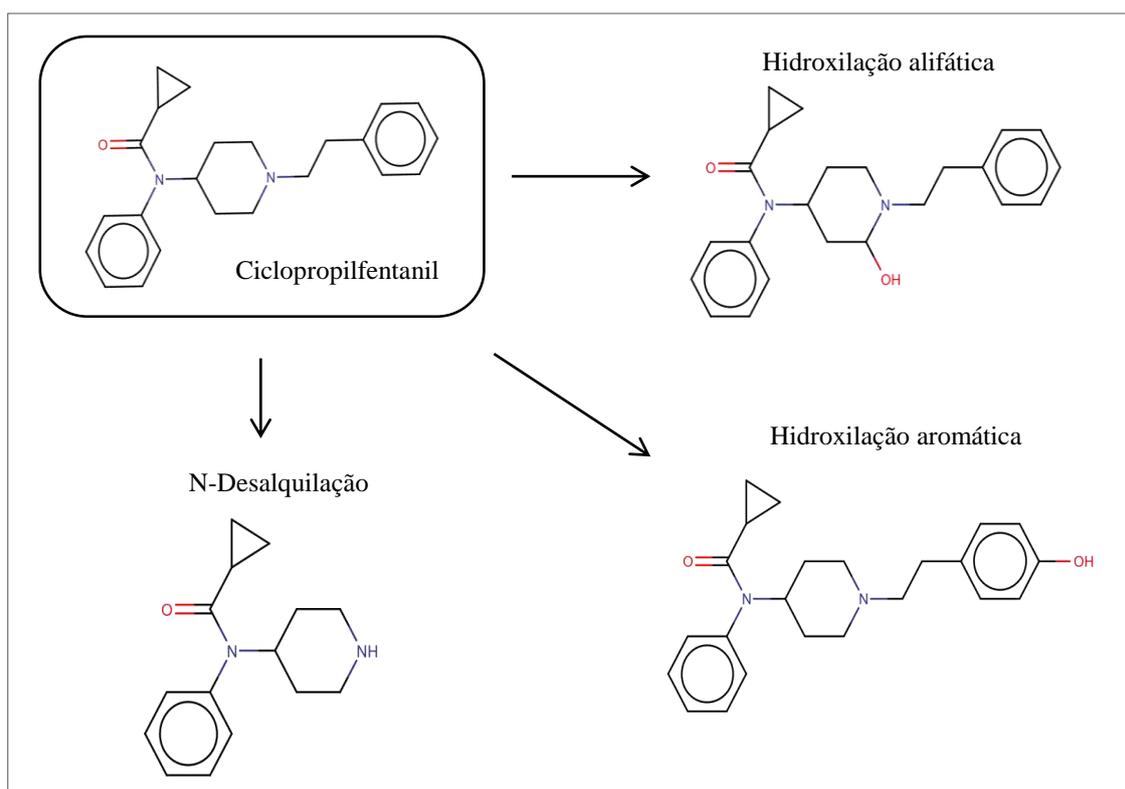


Figura 85. Principais metabólitos do ciclopropilfentani

o-FLUOROBUTIRFENTANIL

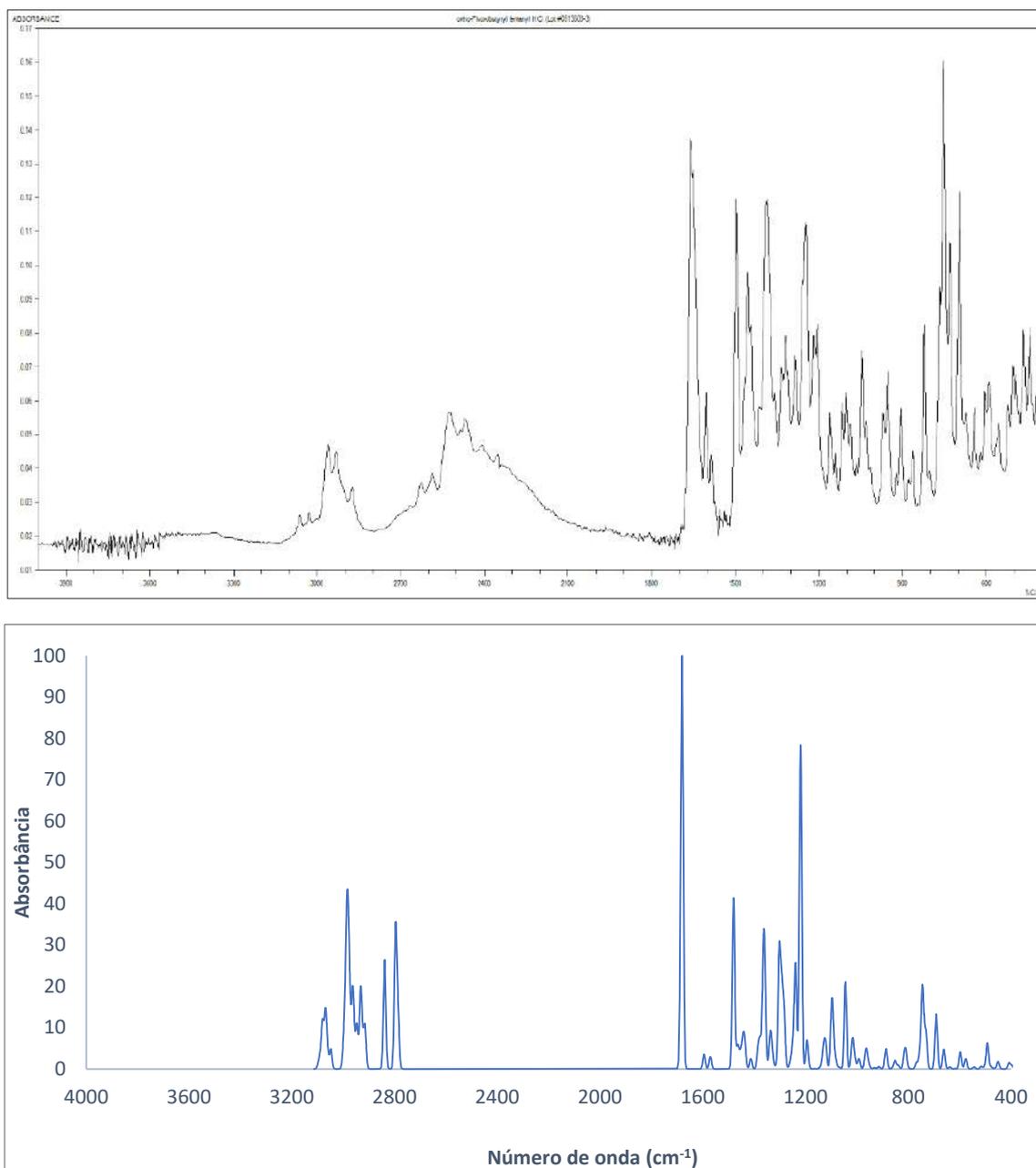


Figura 86. Espectro Infravermelho do o-fluorobutirfentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

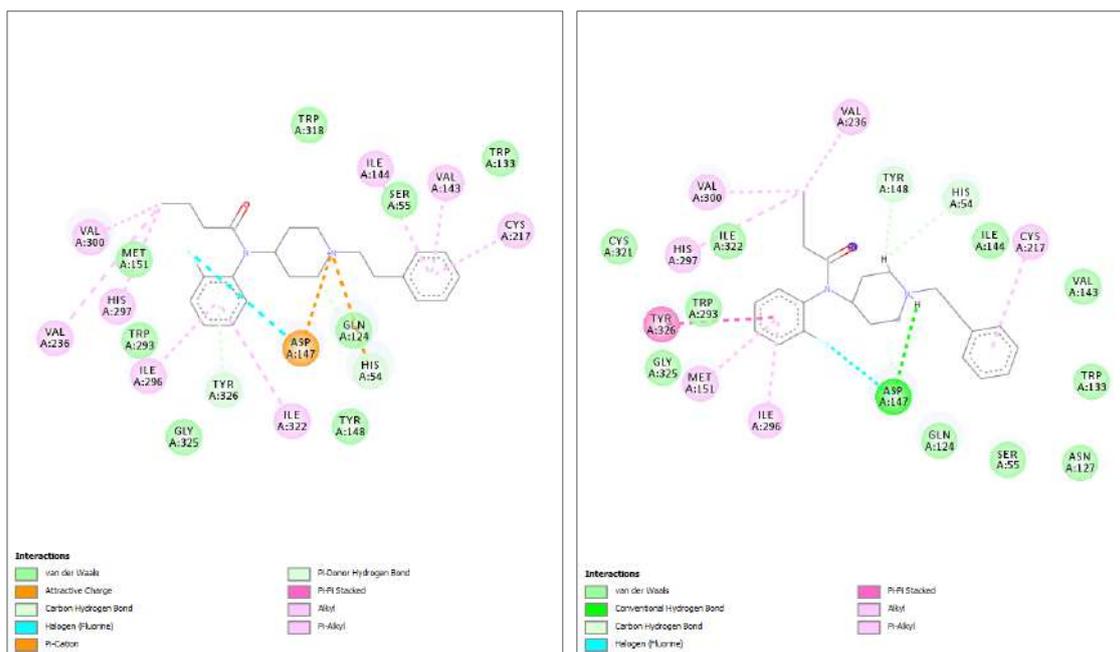


Figura 87. Interações do o-fluorbutirfentanil com o receptor μ -opioides (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

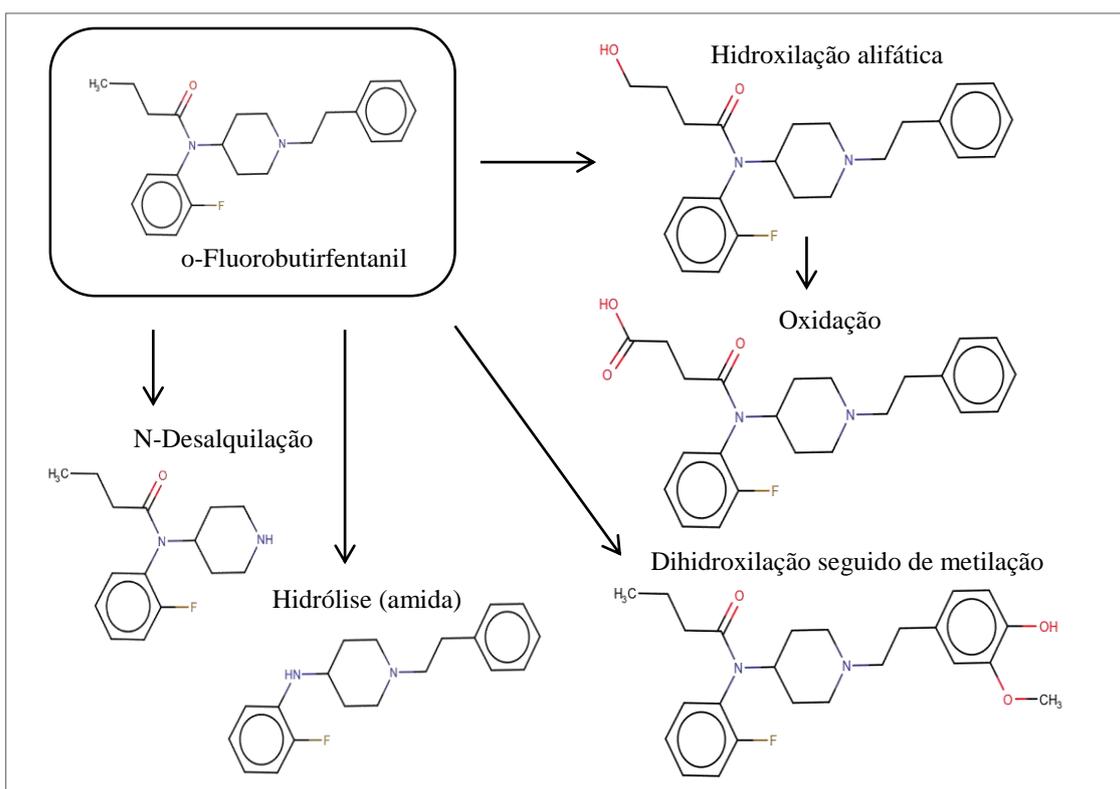


Figura 88. Principais metabólitos do o-fluorbutirfentanil

4'-METILACETILFENTANIL

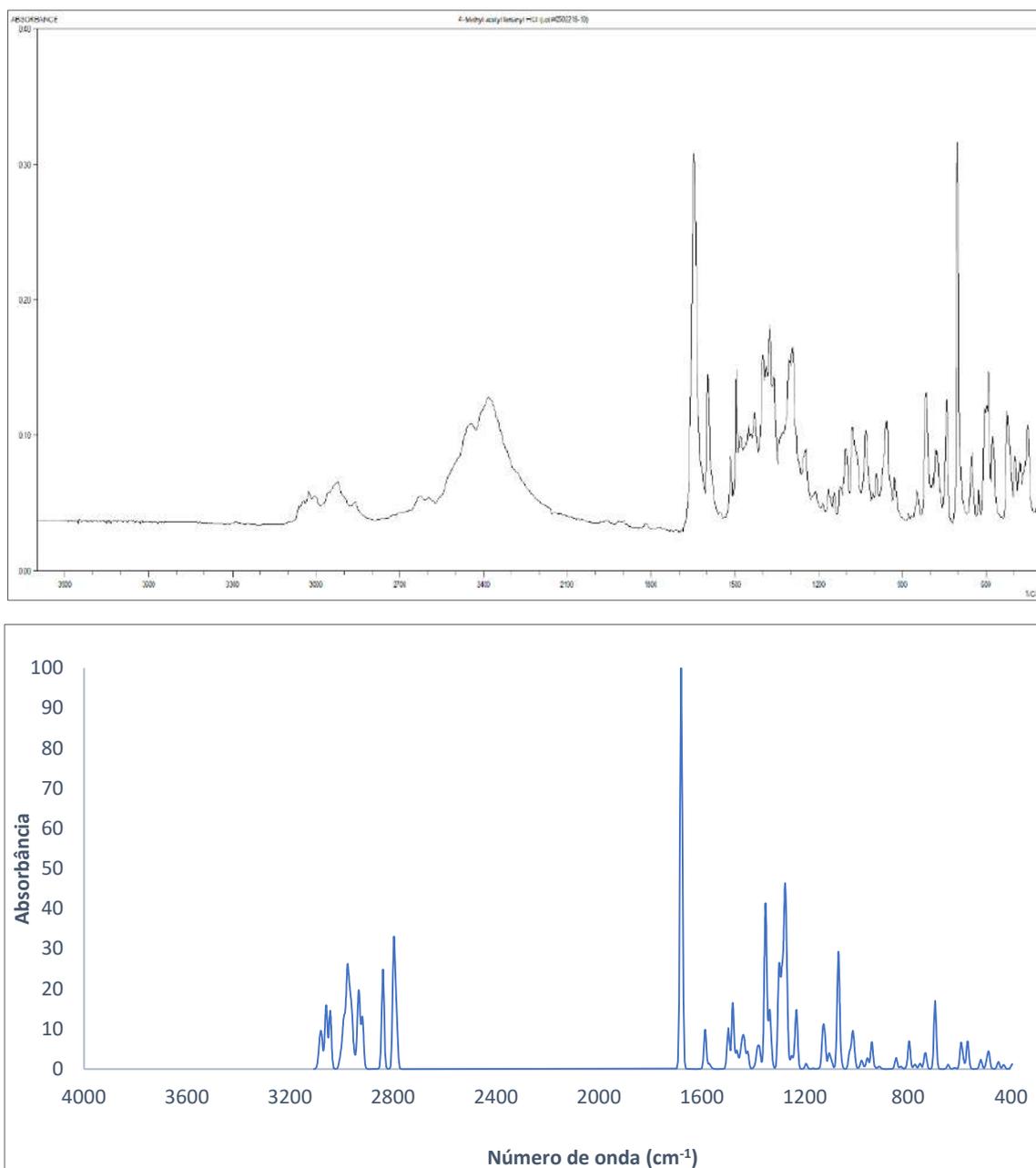


Figura 89. Espectro Infravermelho do 4'-metilacetilfentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

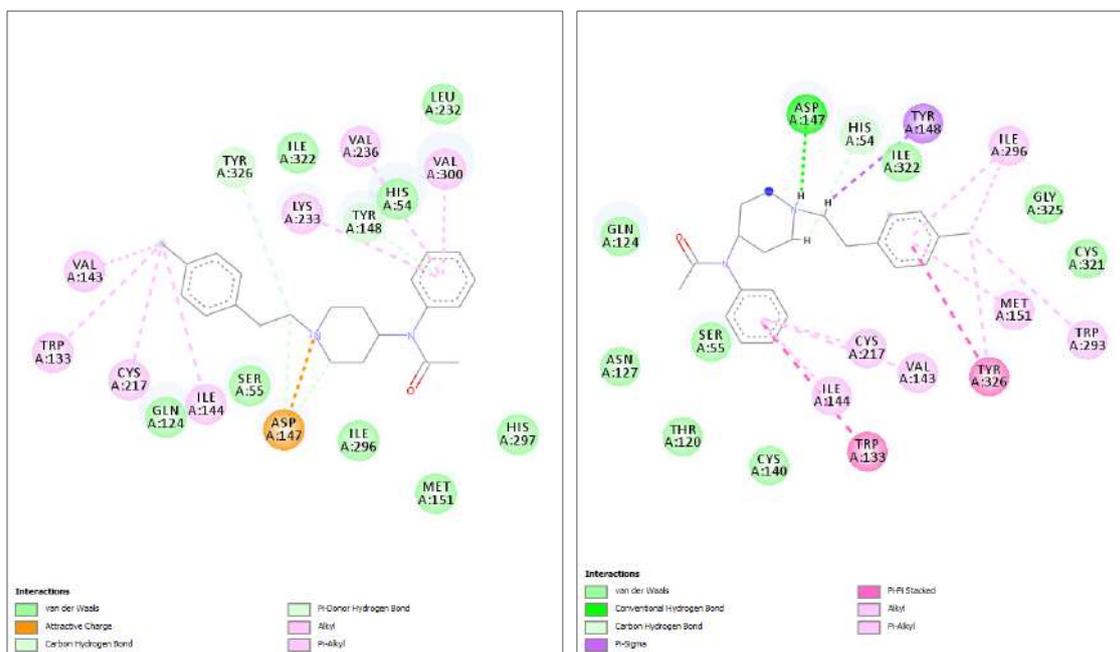


Figura 90. Interações do 4'-metilacetilfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

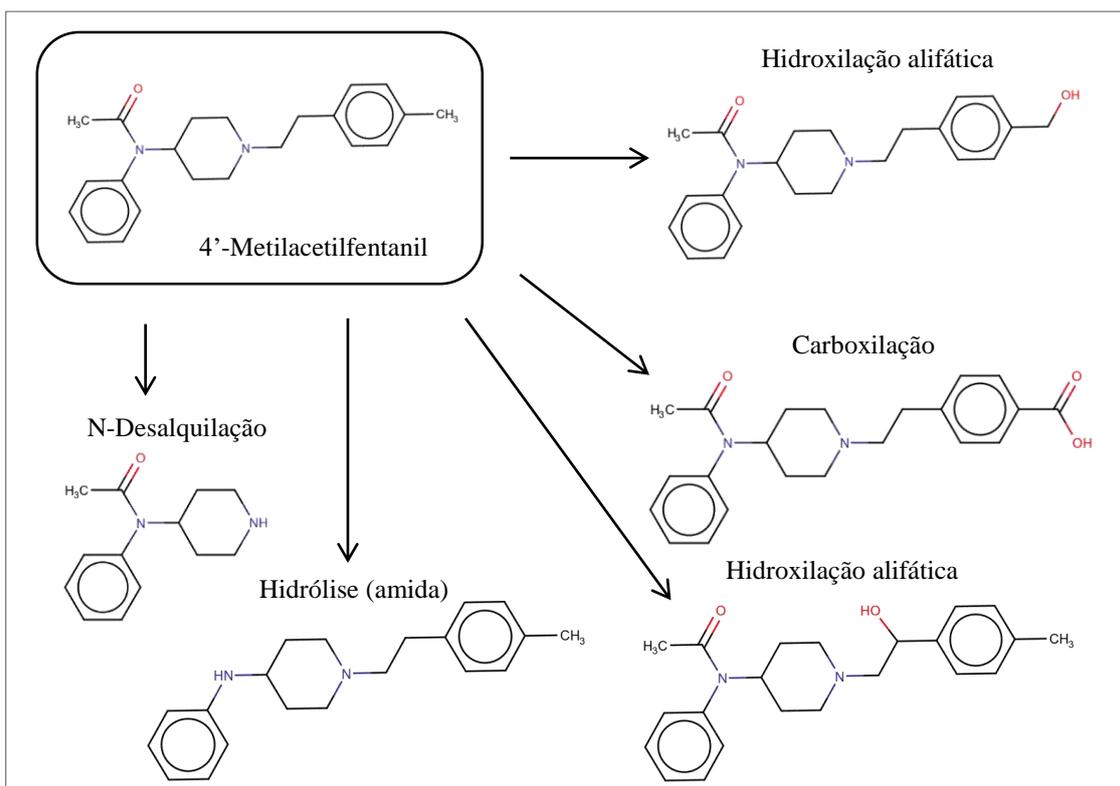


Figura 91. Principais metabólitos do 4'-metilacetilfentanil

TETRAHIDROFURANILFENTANIL

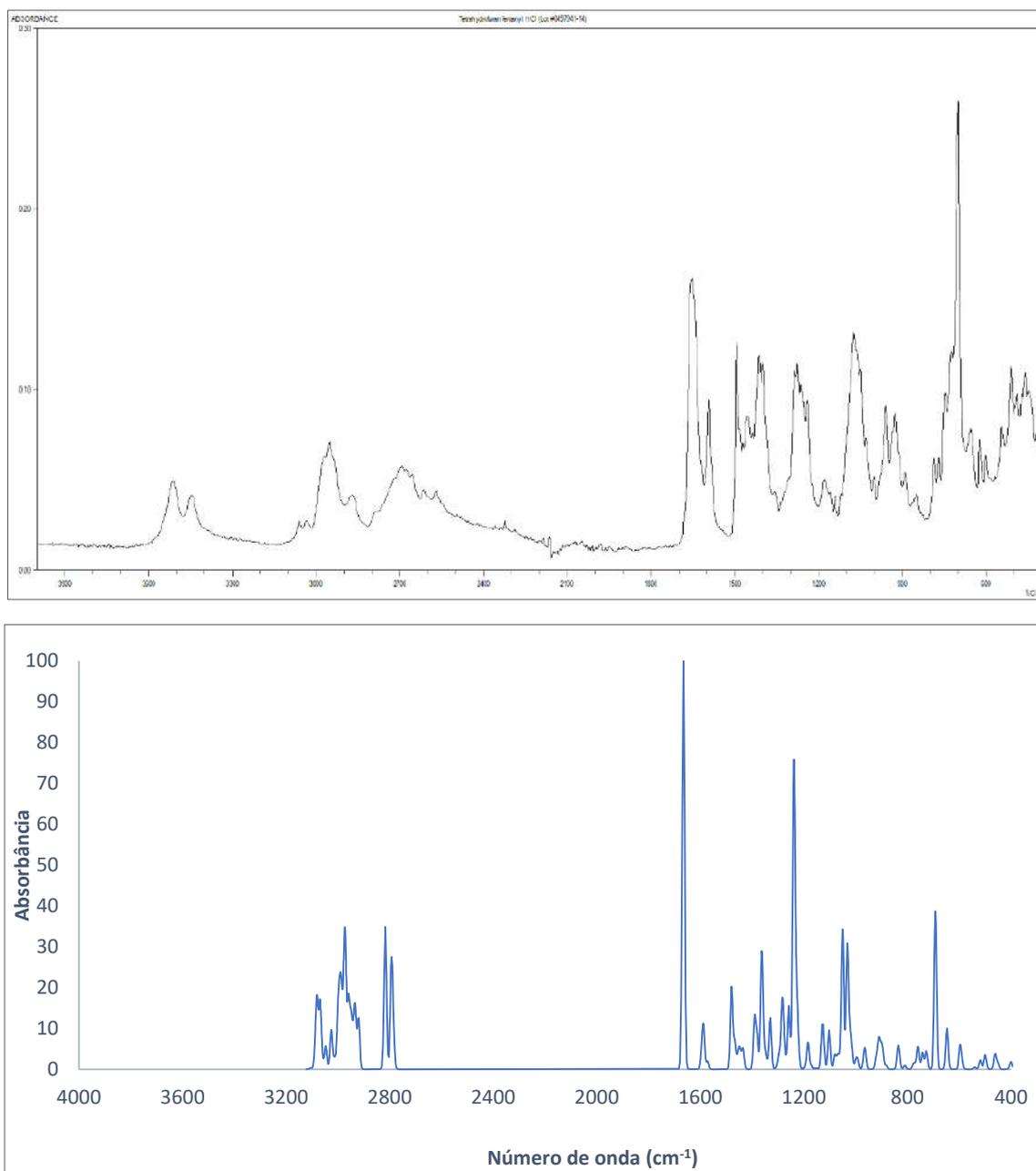


Figura 92. Espectro Infravermelho do tetrahydrofuranilfentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

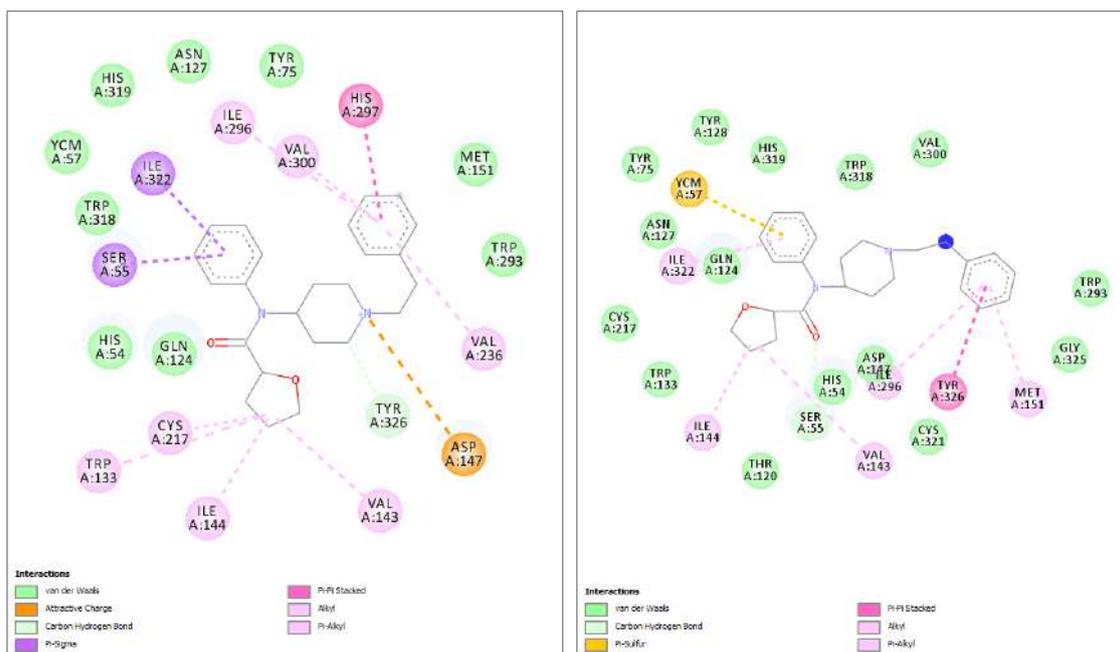


Figura 93. Interações do tetrahydrofuranilfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

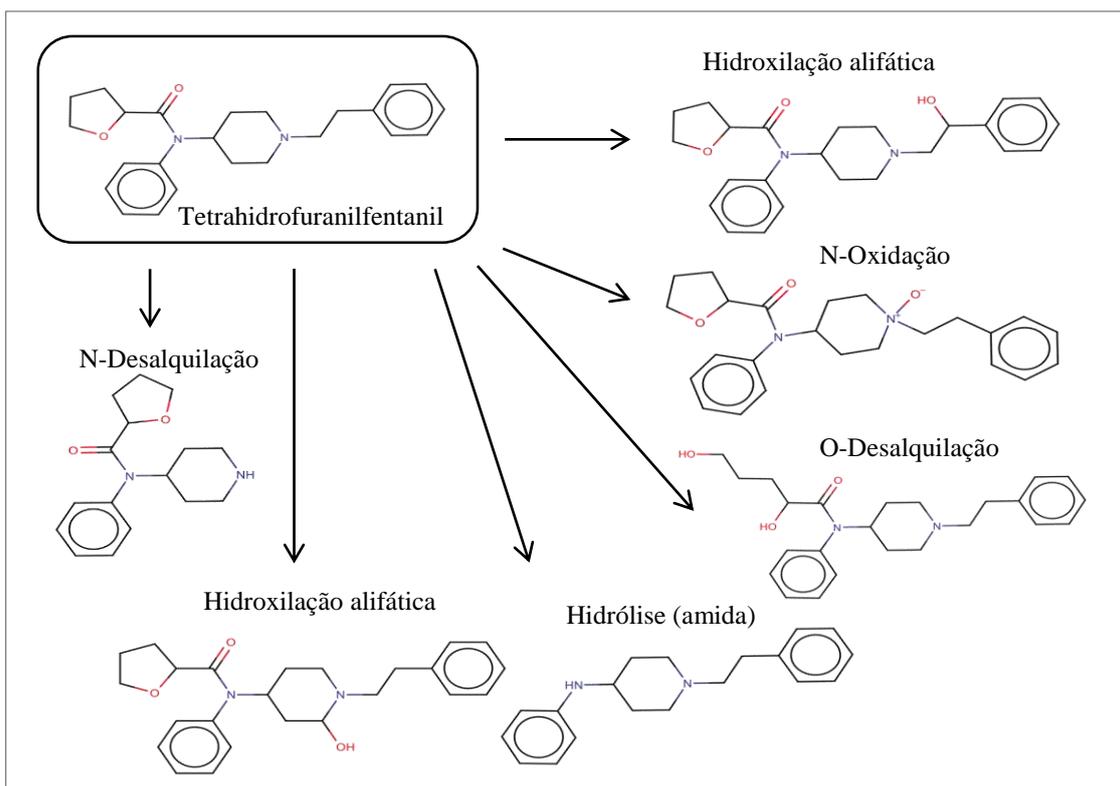


Figura 94. Principais metabólitos do tetrahydrofuranilfentanil

p-METILACETILFENTANIL

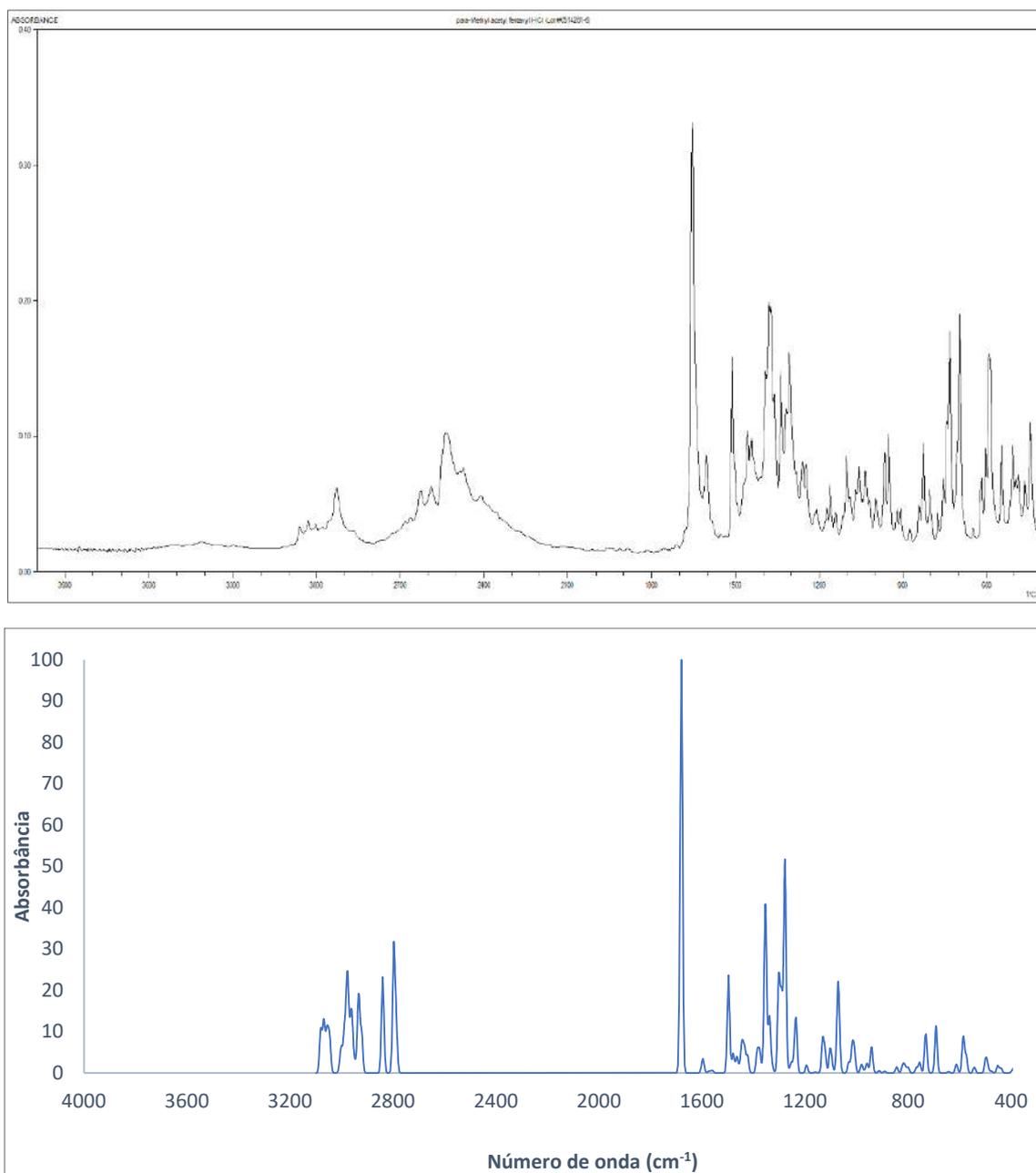


Figura 95. Espectro Infravermelho do p-metilacetilfentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

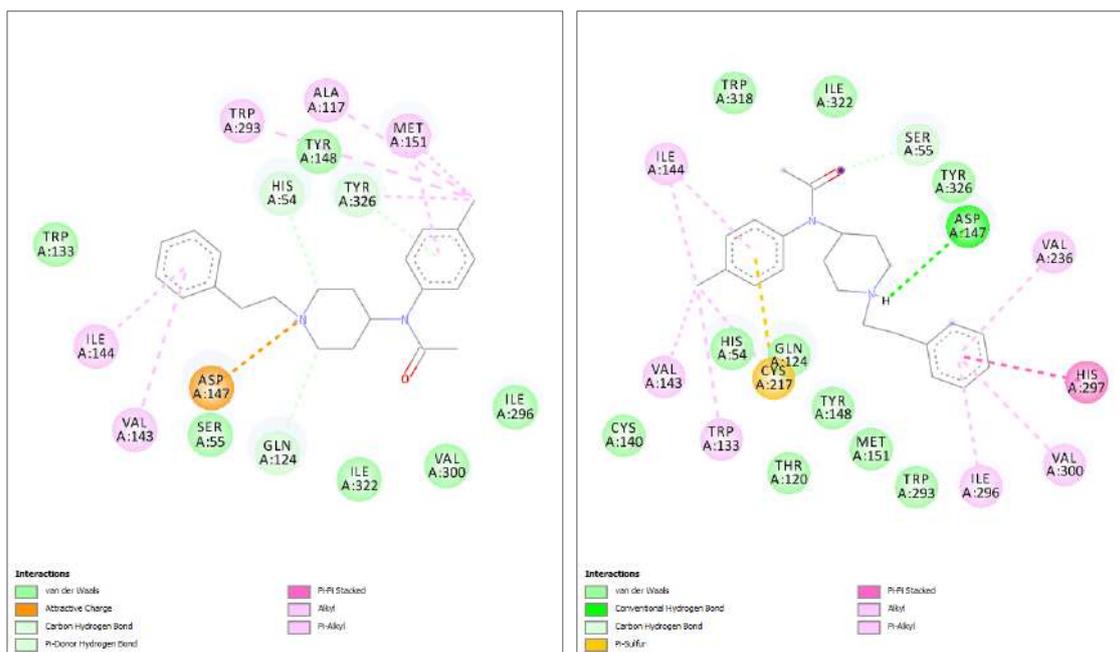


Figura 96. Interações do p-metilacetilfentanil com o receptor μ -opioides (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

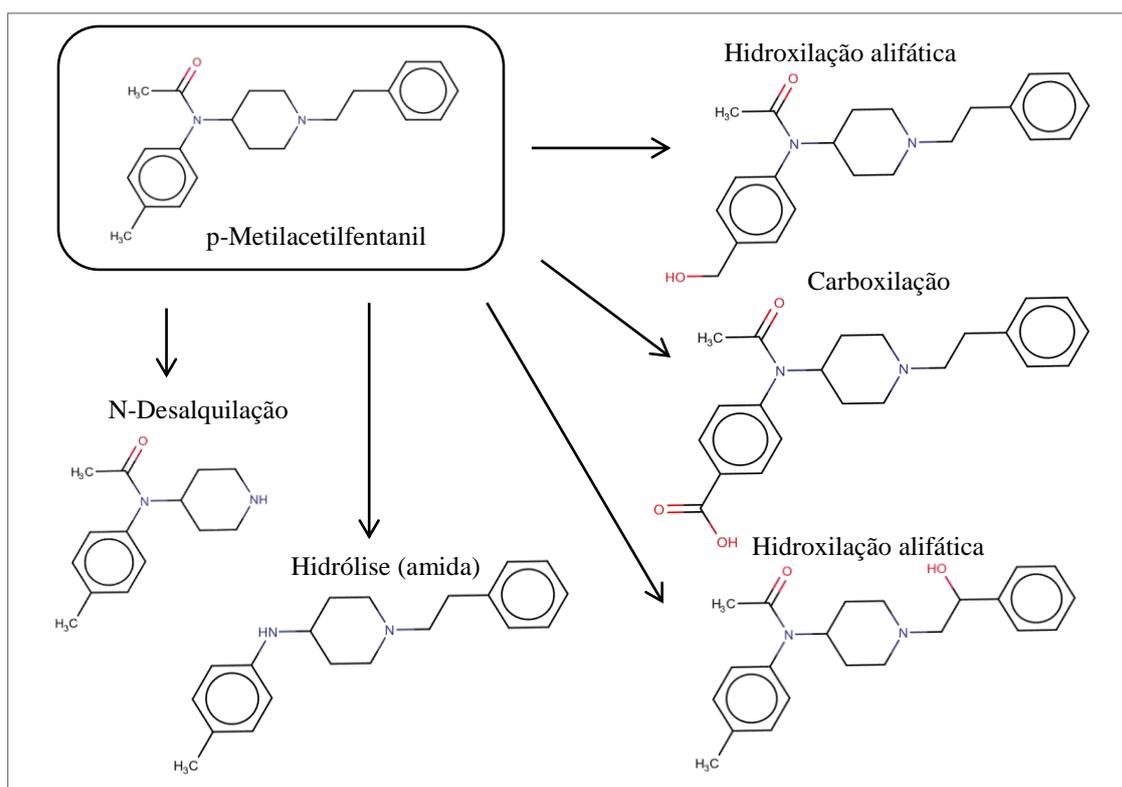


Figura 97. Principais metabólitos do p-metilacetilfentanil

BENZILFENTANIL

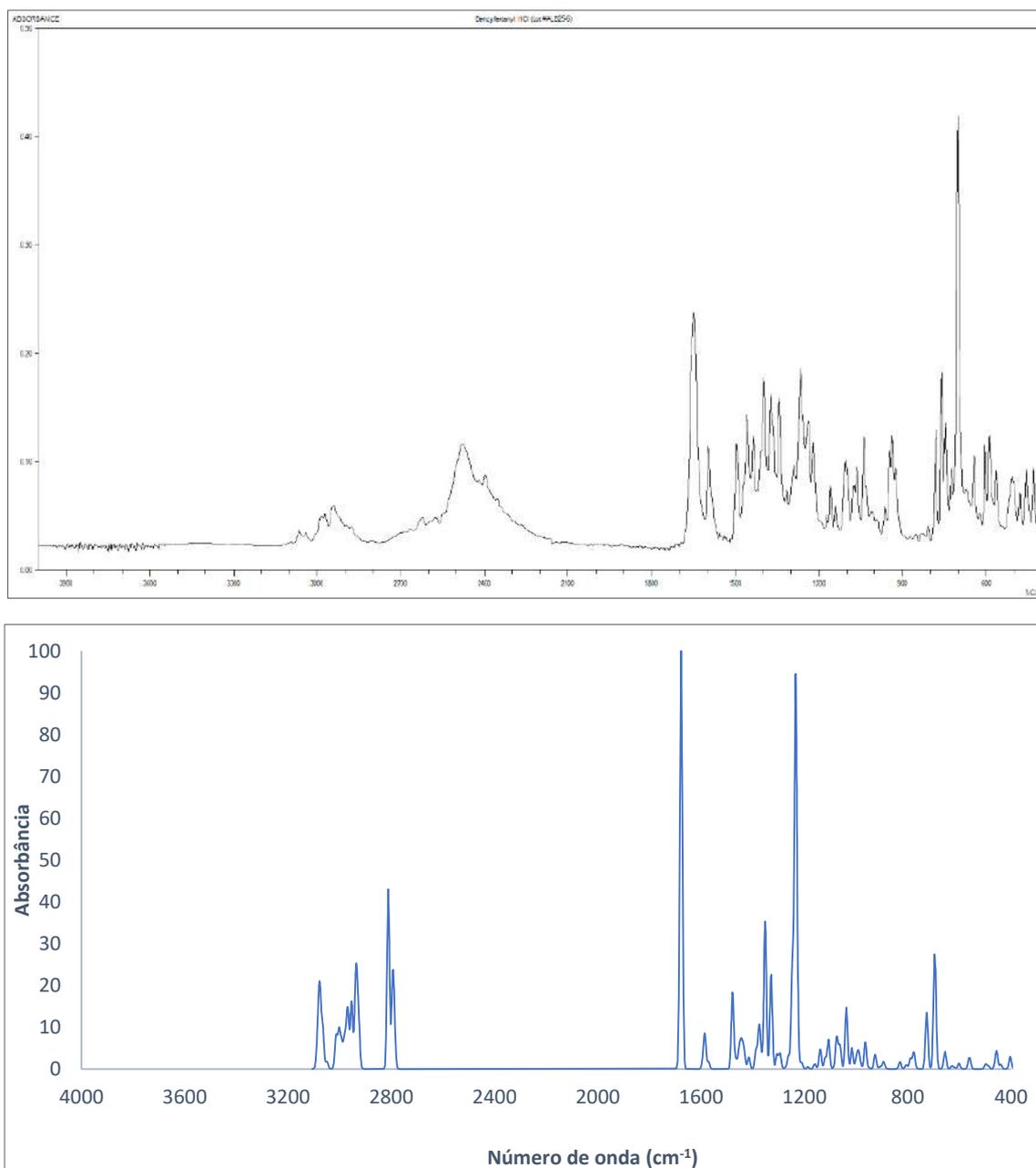


Figura 98. Espectro Infravermelho do benzilfentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

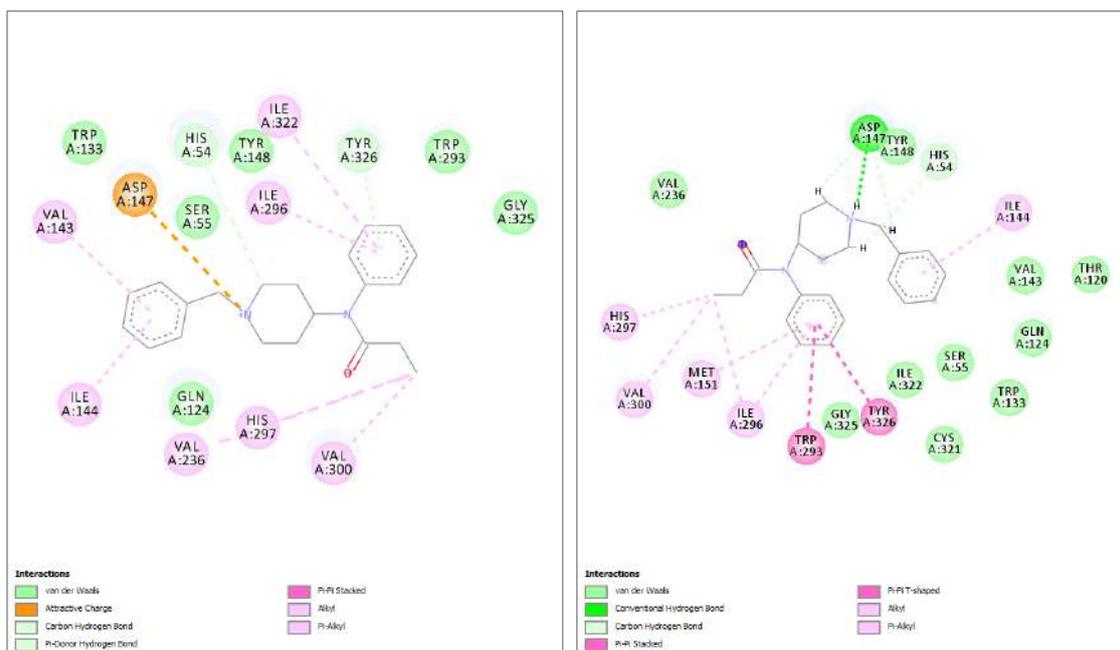


Figura 99. Interações do benzilfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

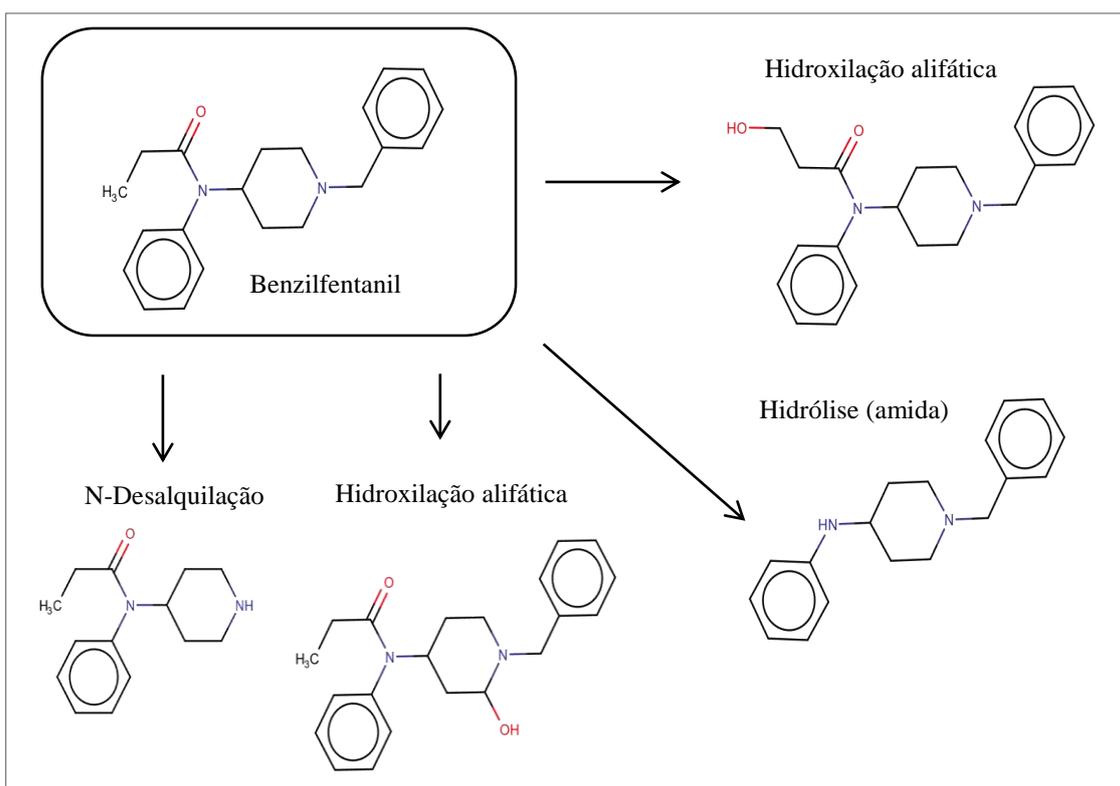


Figura 100. Principais metabólitos do benzilfentanil

2-FURANILBENZILFENTANIL

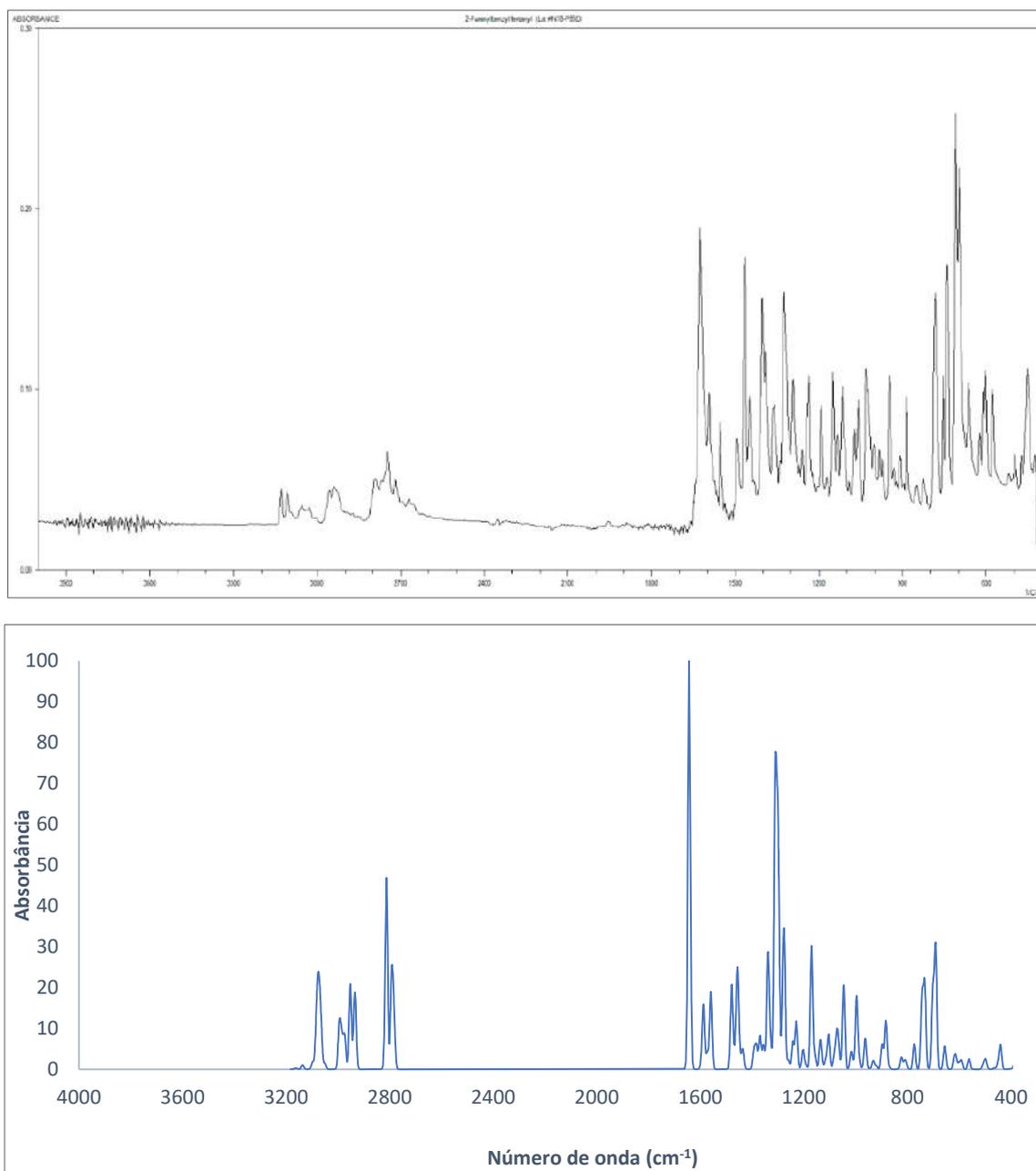


Figura 101. Espectro Infravermelho do 2-furanilbenzilfentaniil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

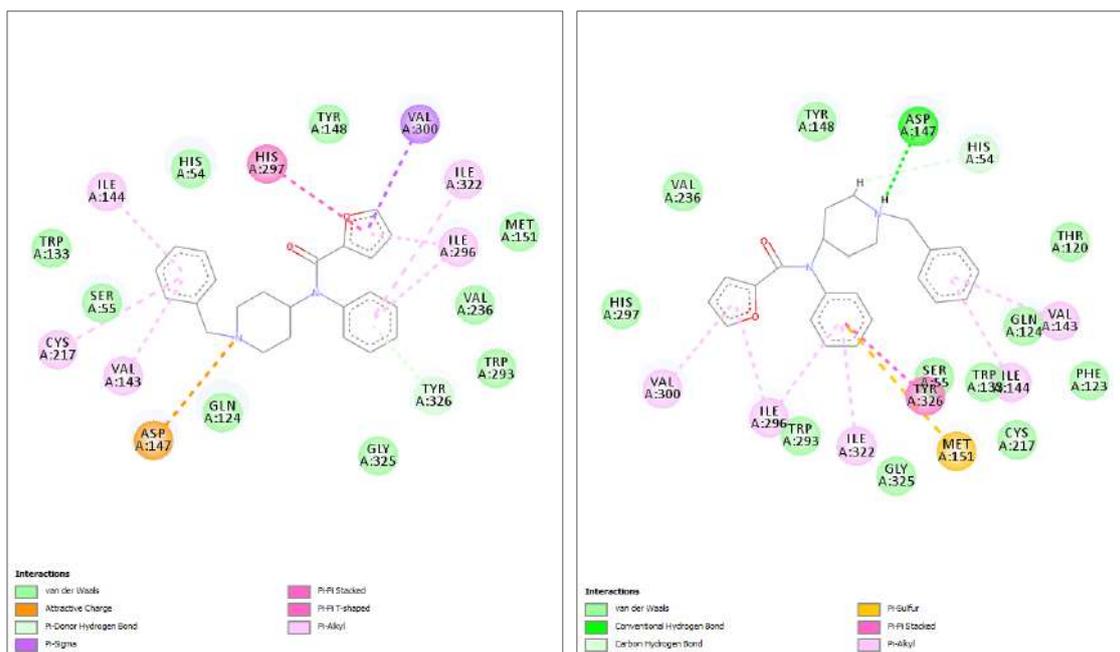


Figura 102. Interações do 2-furanilbenzilfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

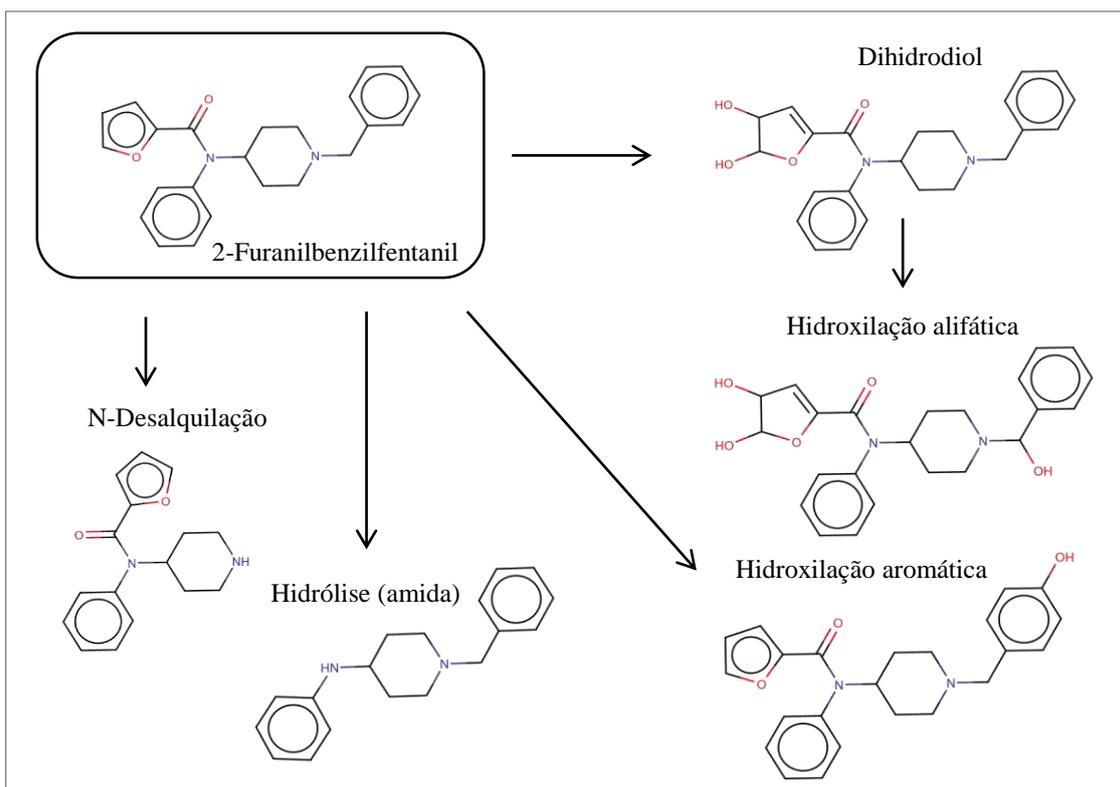


Figura 103. Principais metabólitos do 2-furanilbenzilfentanil

2R-4S-2-METILFENTANIL

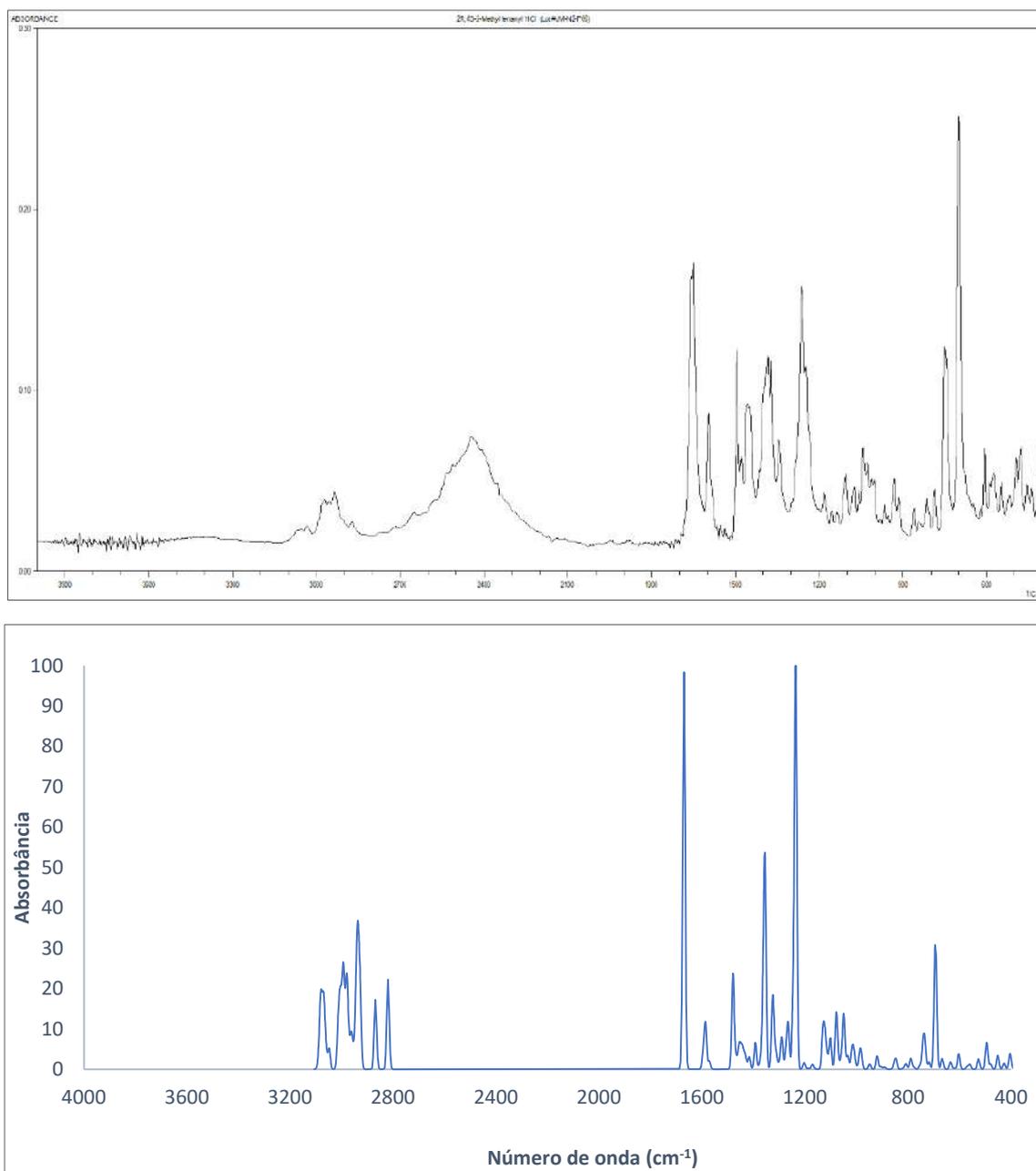


Figura 104. Espectro Infravermelho do 2R-4S-2-metilfentanil: (a) SWGDRUG experimental¹⁸⁸ e (b) teórico

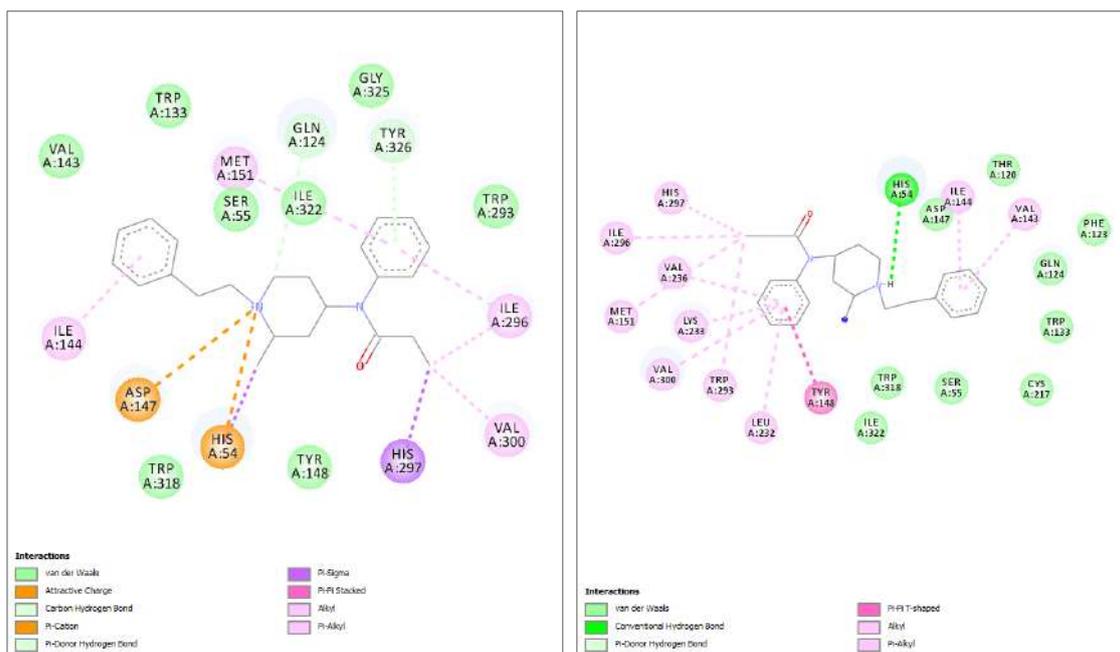


Figura 105. Interações do 2R-4S-2-metilfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

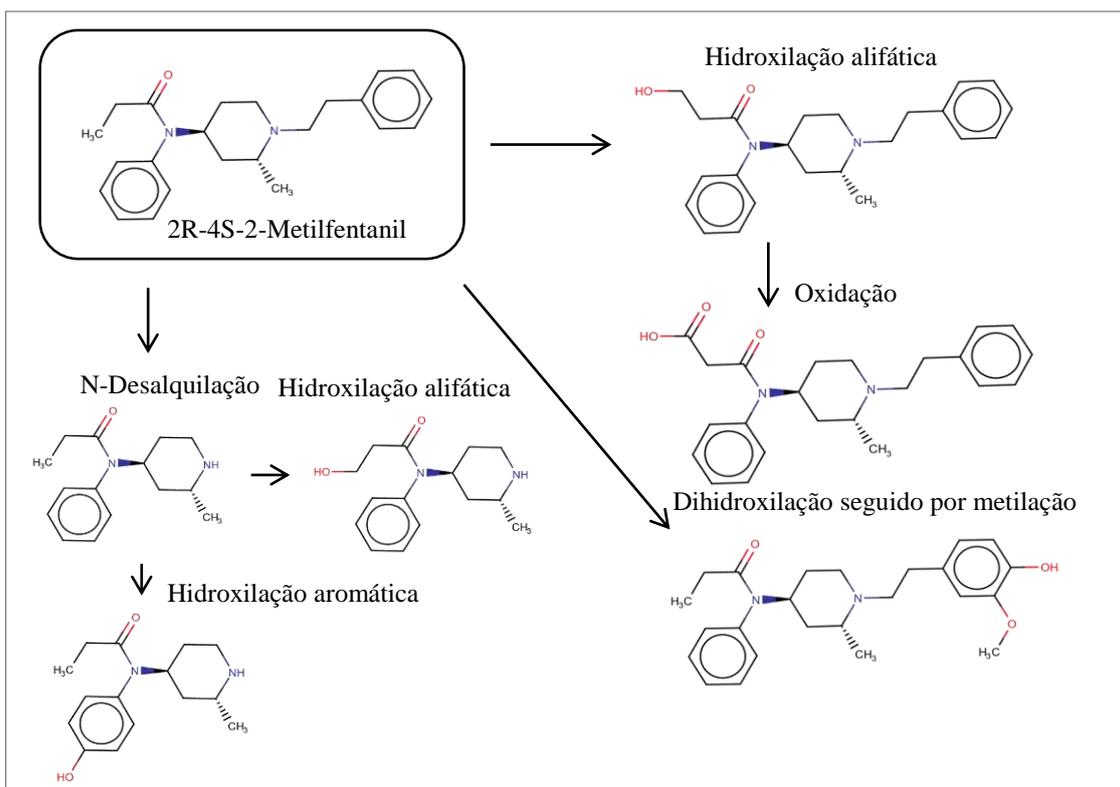


Figura 106. Principais metabólitos do 2R-4S-2-metilfentanil

ACETIL-ALFA-R-METILFENTANIL

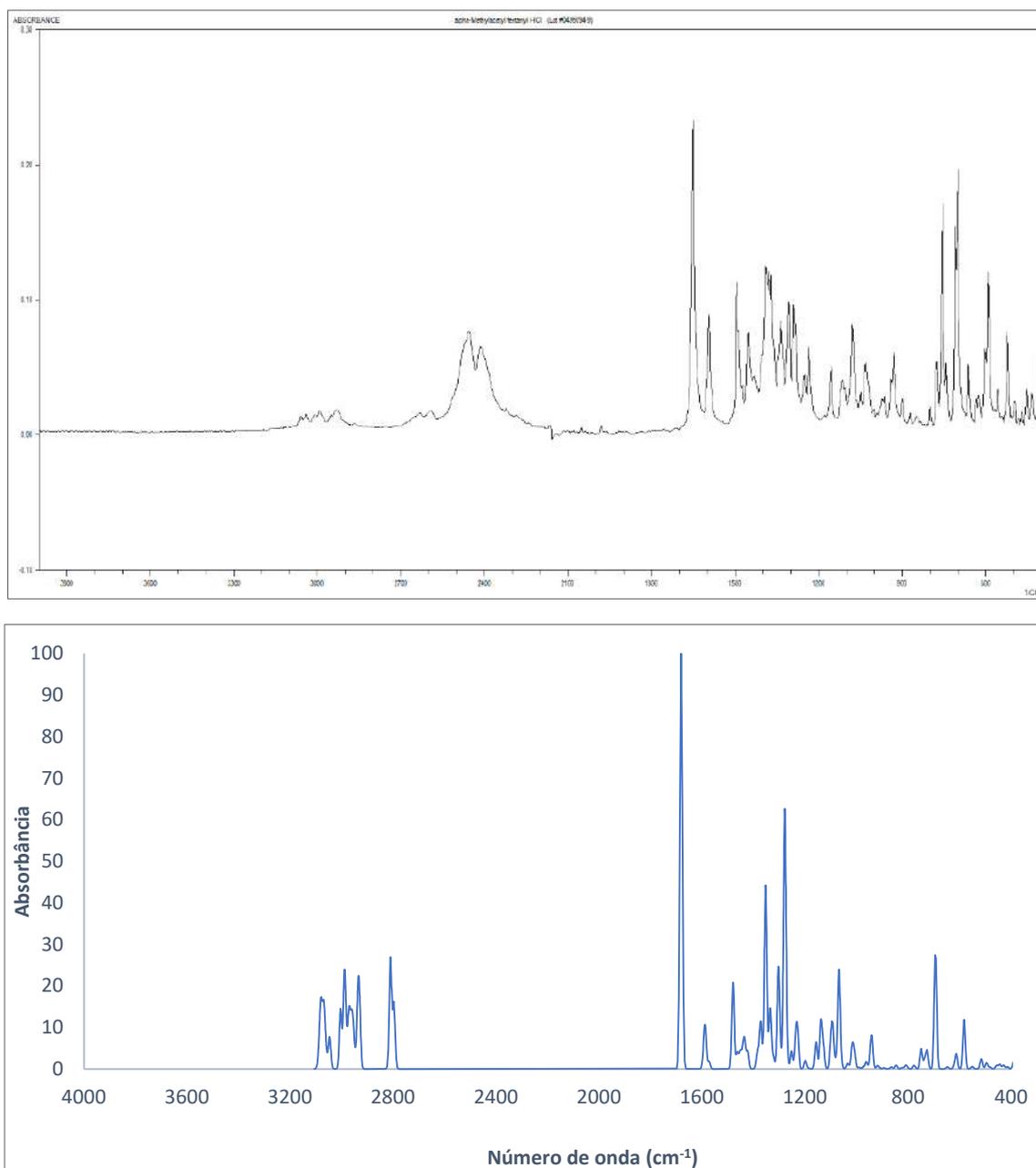


Figura 107. Espectro Infravermelho do acetil- α -R-metilfentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

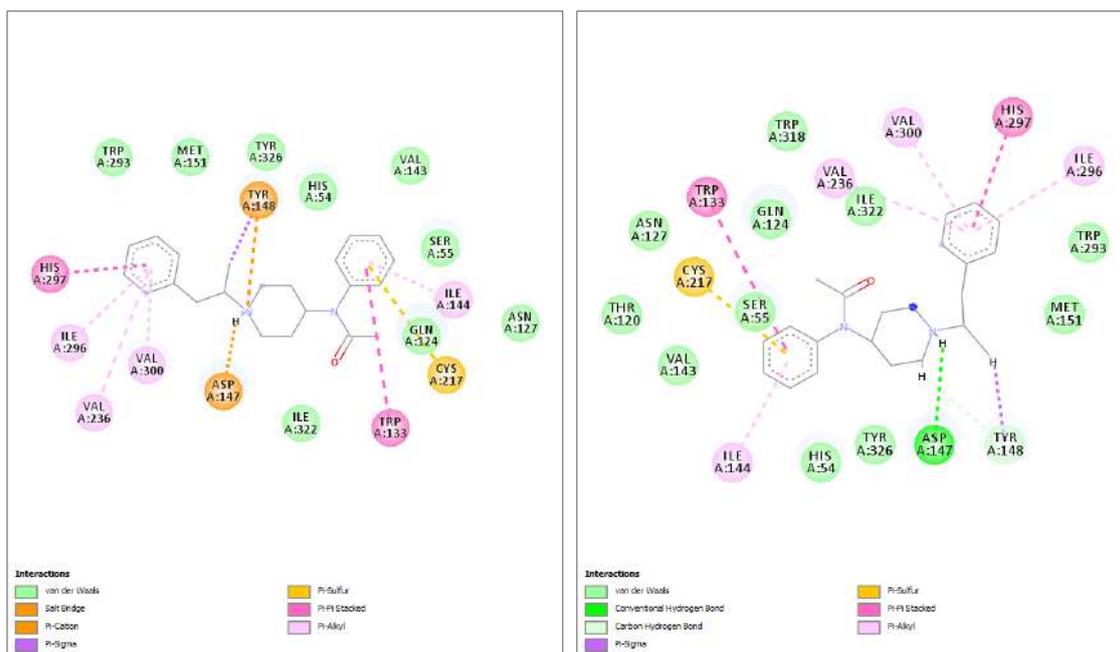


Figura 108. Interações do acetil- α -R-metilfentanil com o receptor μ -opioid (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

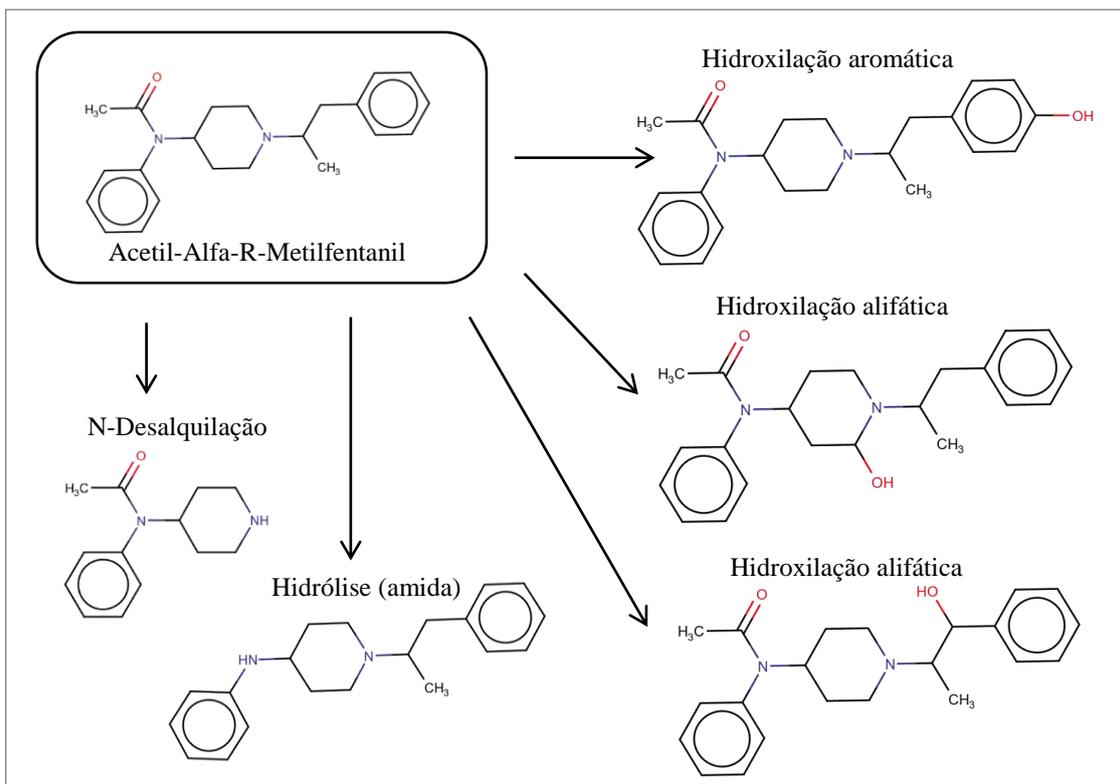


Figura 109. Principais metabólitos do acetil- α -R-metilfentanil

CIS-3-METILFENTANIL

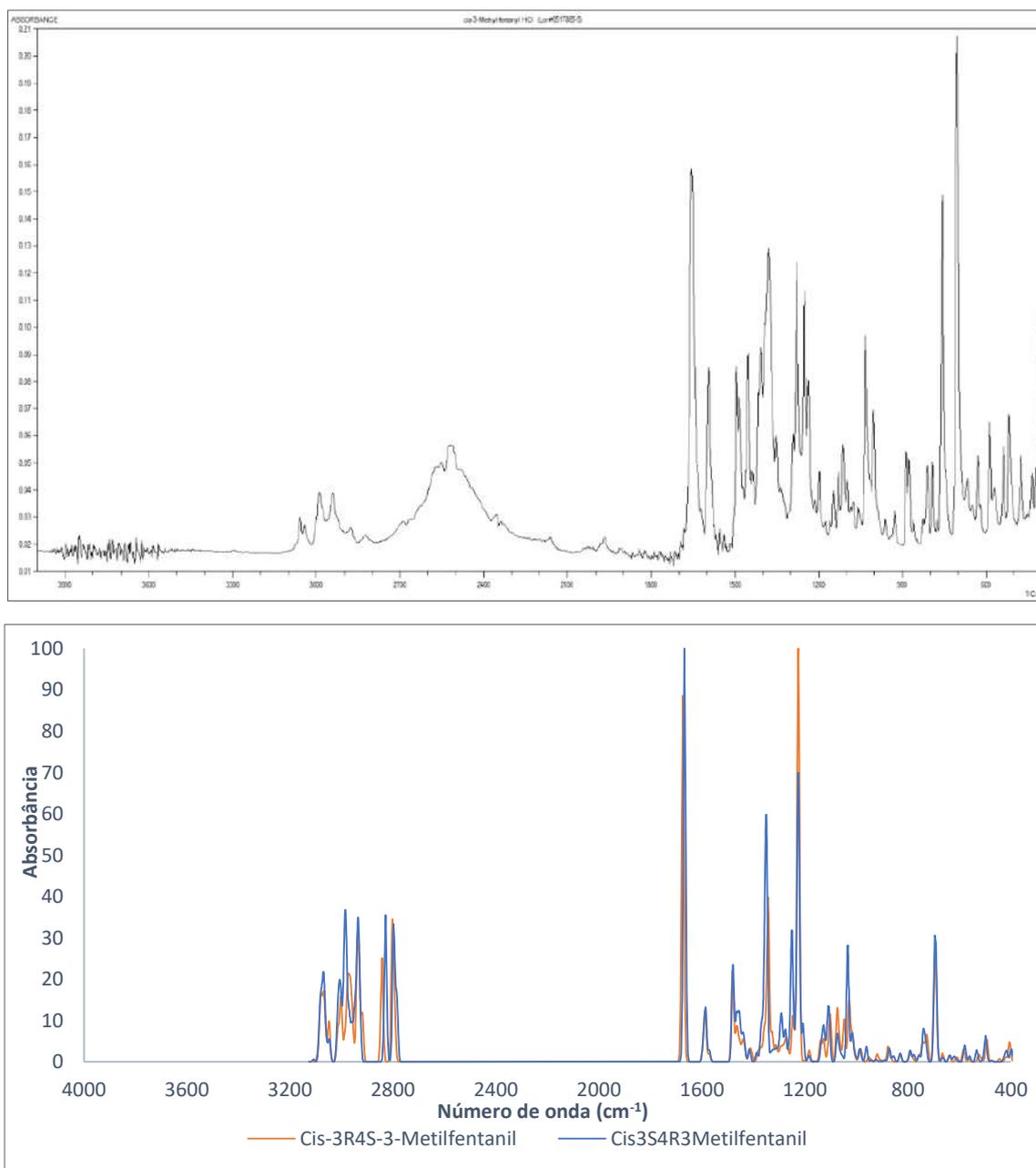


Figura 110. Espectro Infravermelho do Cis-3R-4S-3-metilfentanil (laranja) e Cis-3S-4R-3-metilfentanil (azul): (a) SWGDRUG experimental¹⁸⁸ (Cis-3-metilfentanil, sem especificação) e (b) teórico

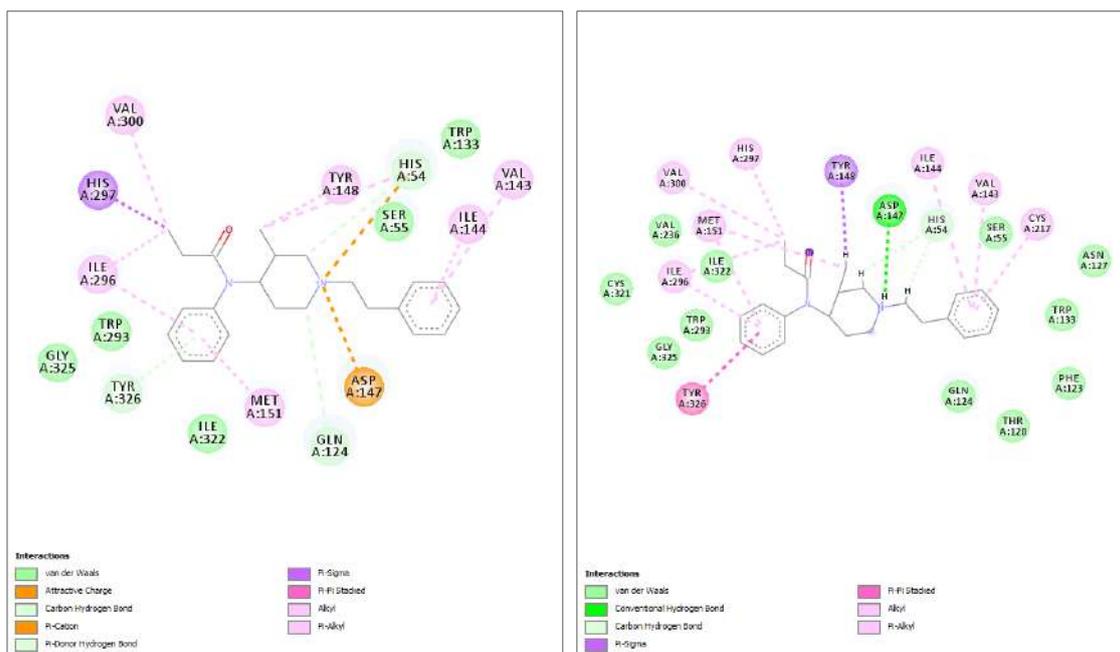


Figura 111. Interações do Cis-3R-4S-3-metilfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

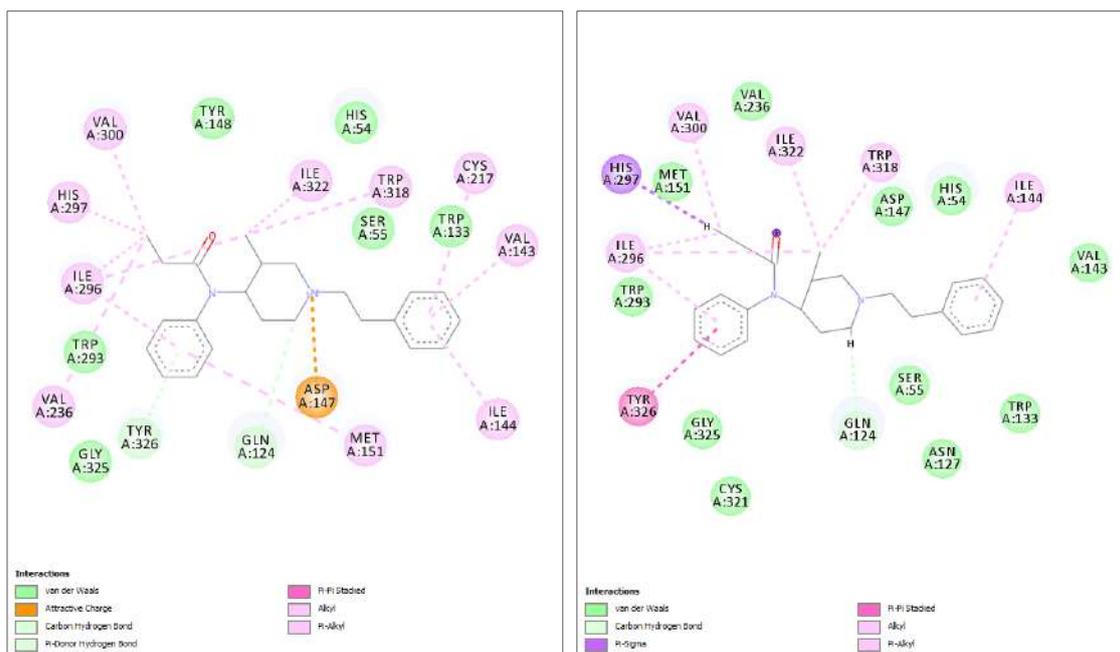


Figura 112. Interações do Cis-3S-4R-3-metilfentanil com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

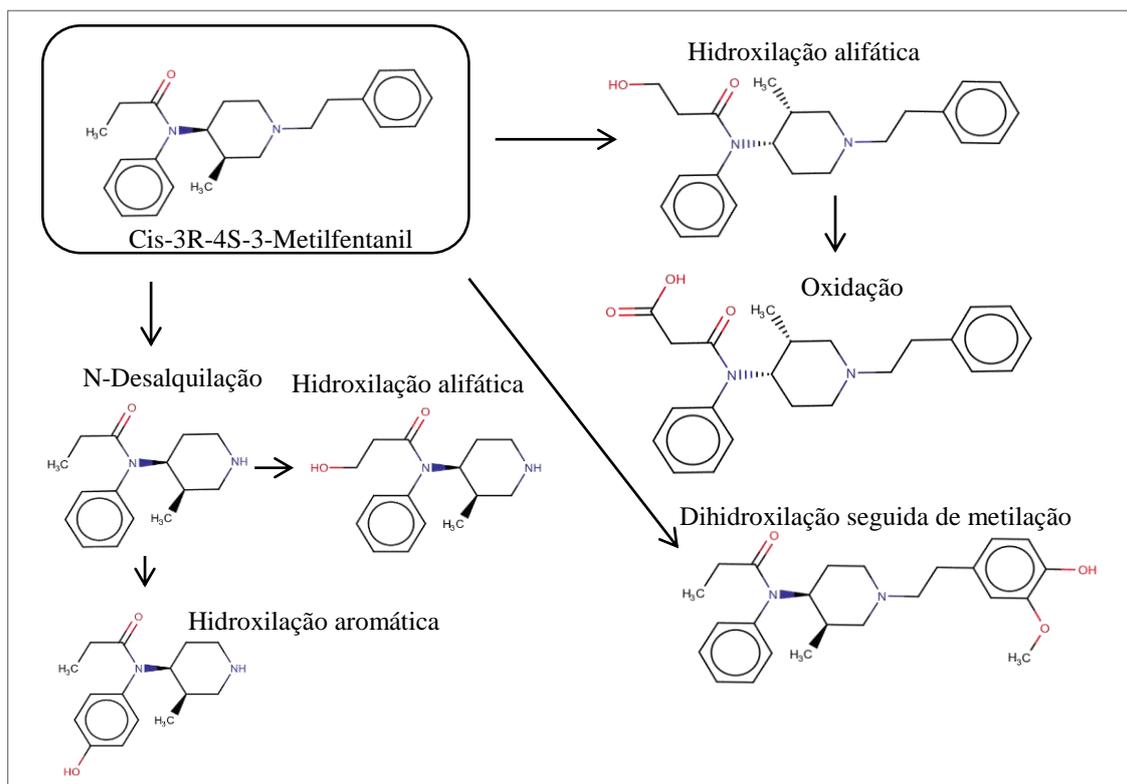


Figura 113. Principais metabólitos do cis-3R-4S-3-metilfentaniil

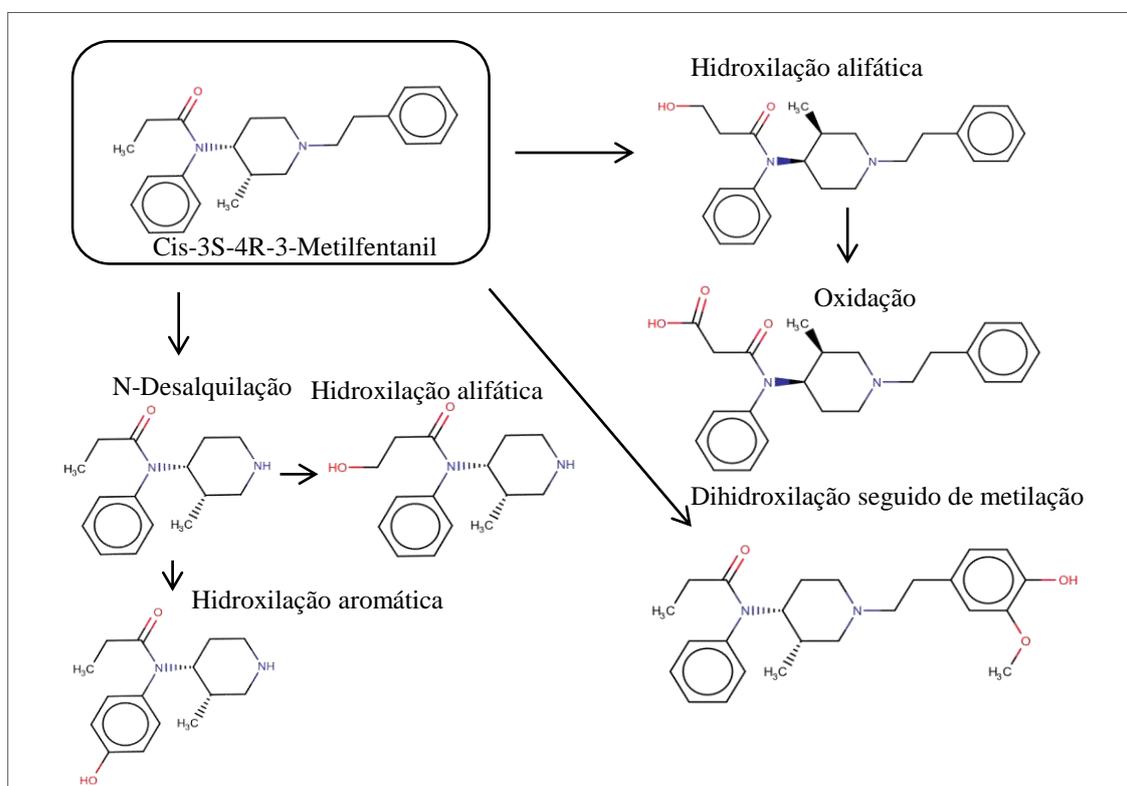


Figura 114. Principais metabólitos do cis-3S-4R-3-metilfentaniil

BETA-R-HIDROXITIOFENTANIL

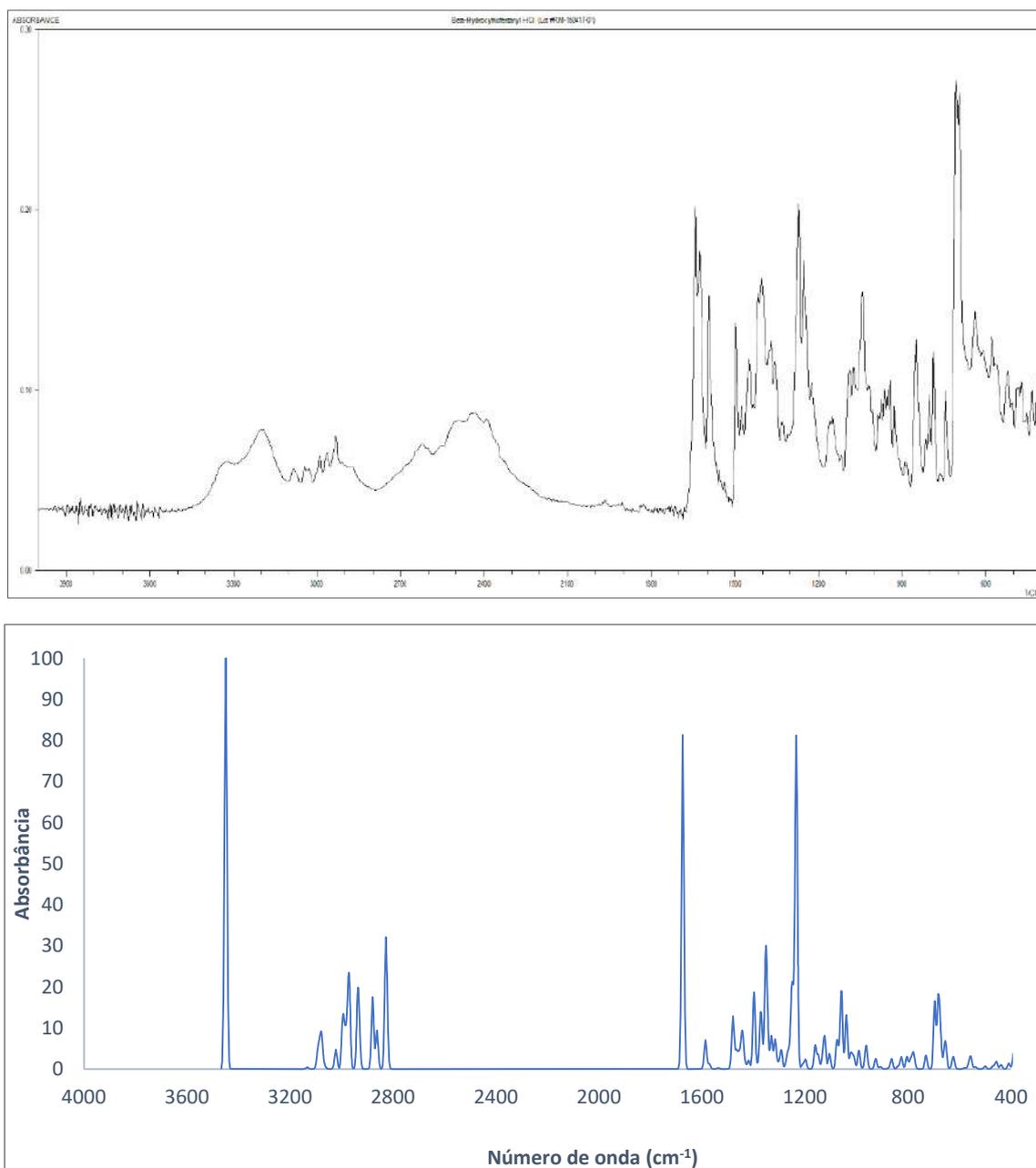


Figura 115. Espectro Infravermelho do beta-R-hidroxitiofentani: (a) SWGDRUG experimental¹⁸⁸ e (b) teórico

p-METOXIFENTANIL

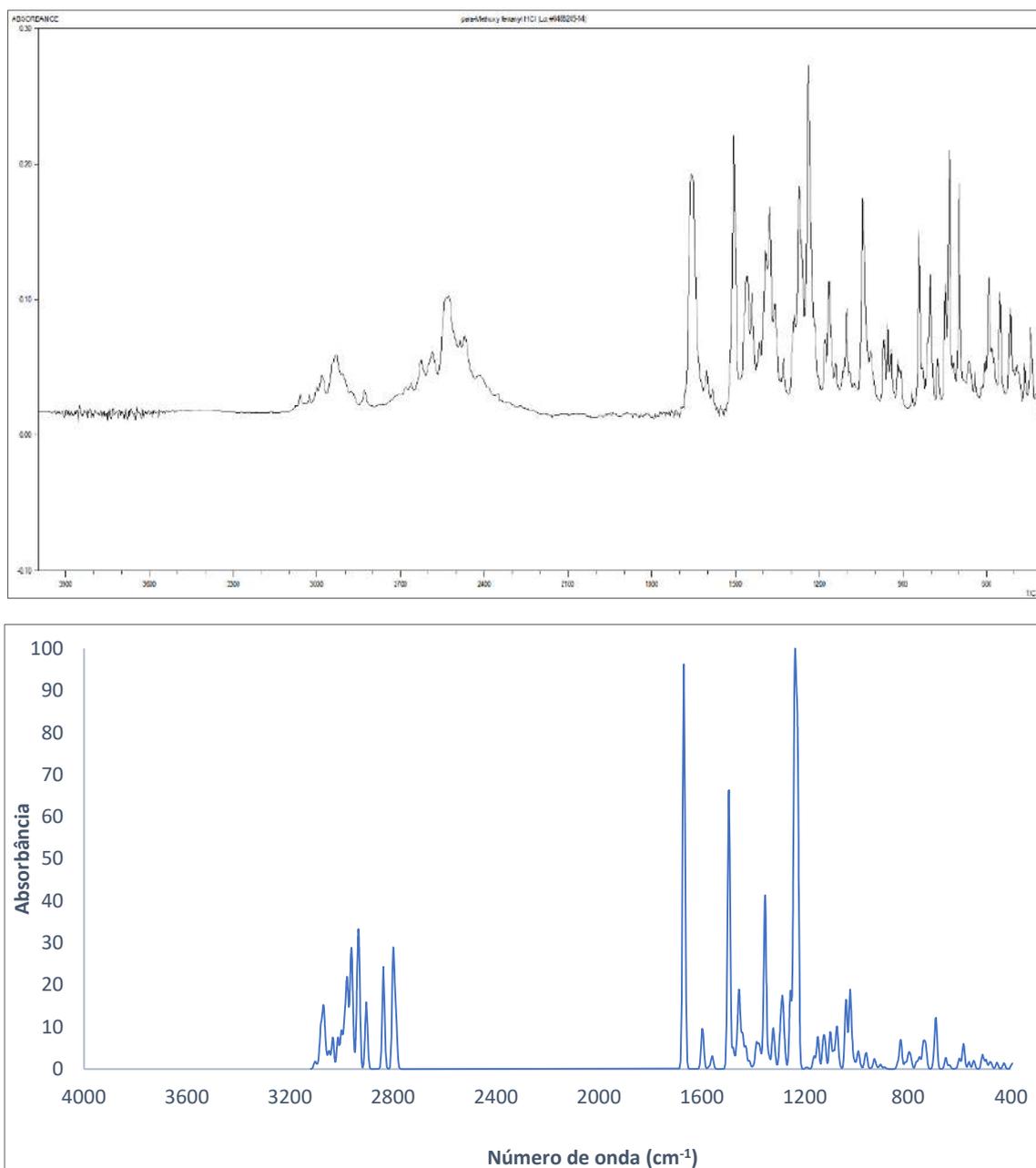


Figura 118. Espectro Infravermelho do p-metoxifentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

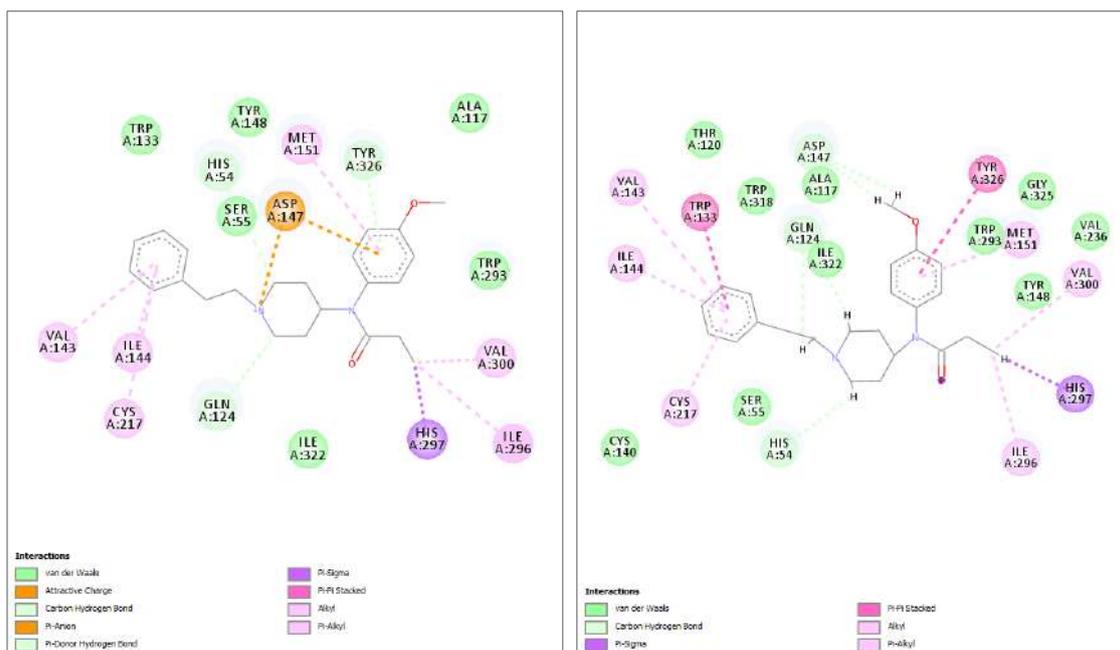


Figura 119. Interações do p-metoxifentani com o receptor μ -opioide (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

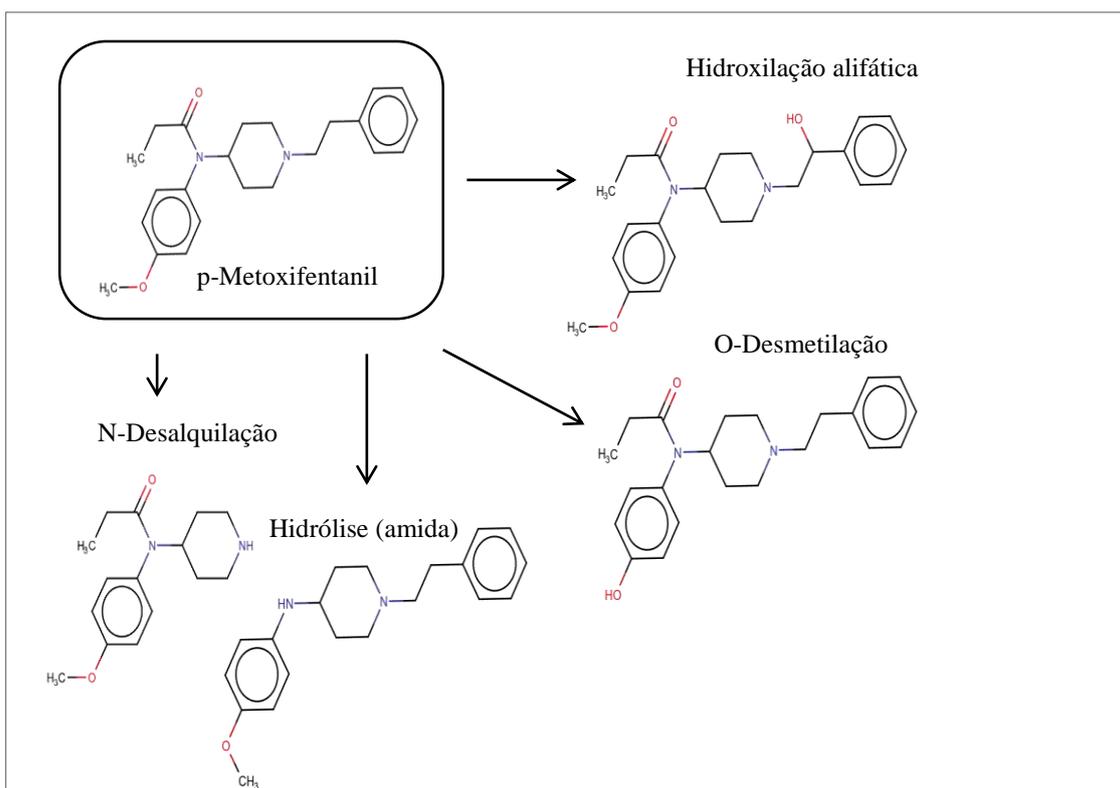


Figura 120. Principais metabólitos do p-metoxifentani

BETA'-FENILFENTANIL

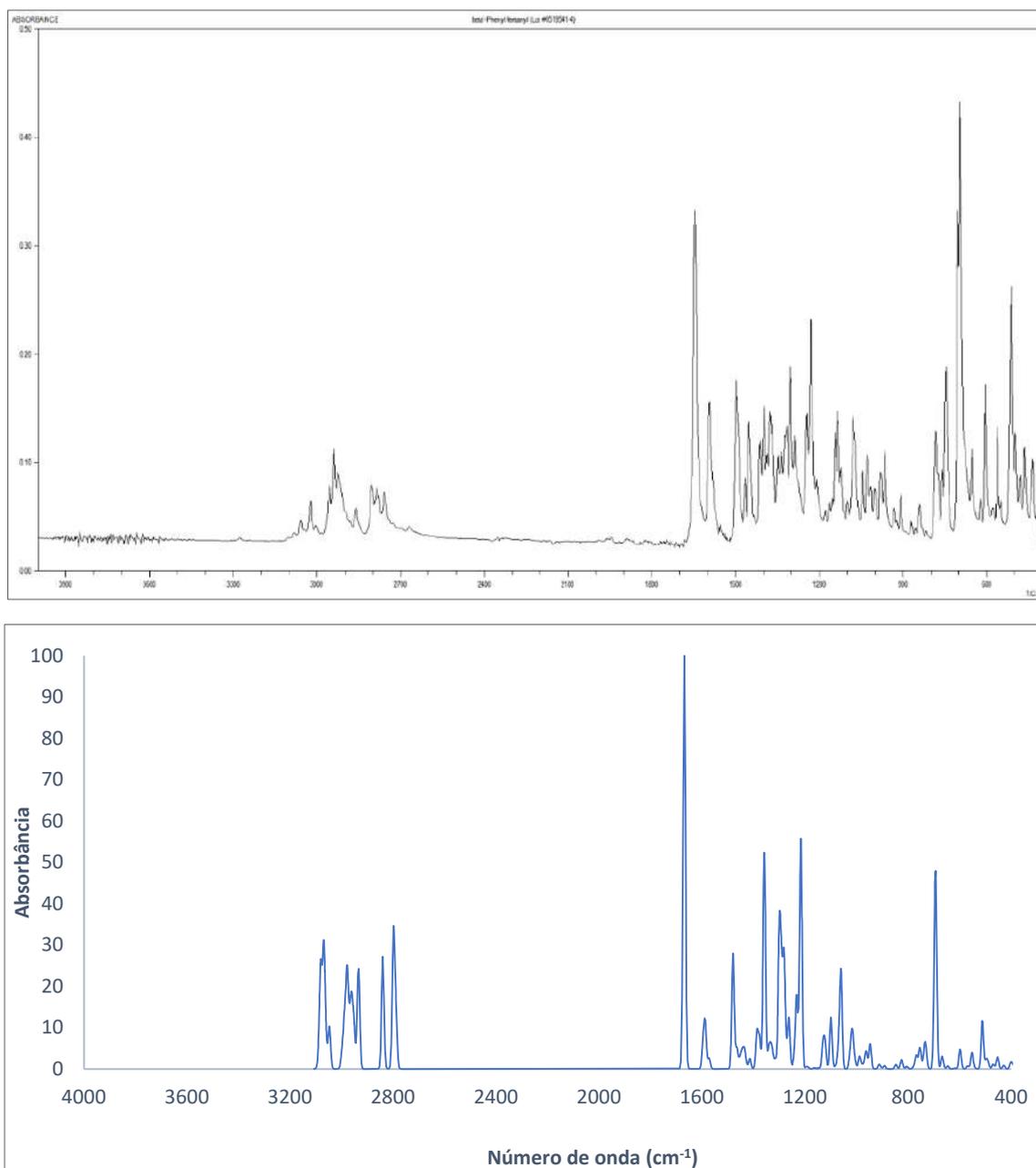


Figura 121. Espectro Infravermelho do beta'-fenilfentanil: (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ e (b) teórico

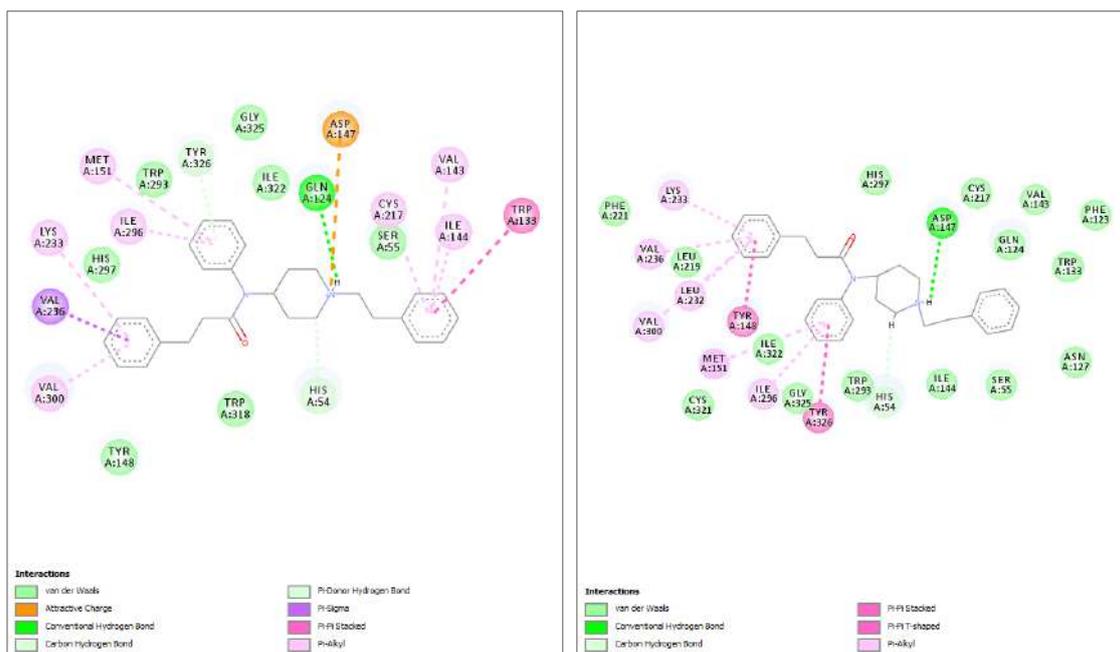


Figura 122. Interações do beta'-fenilfentanil com o receptor μ -opioides (5C1M) pelo a) PyRx e b) GOLD

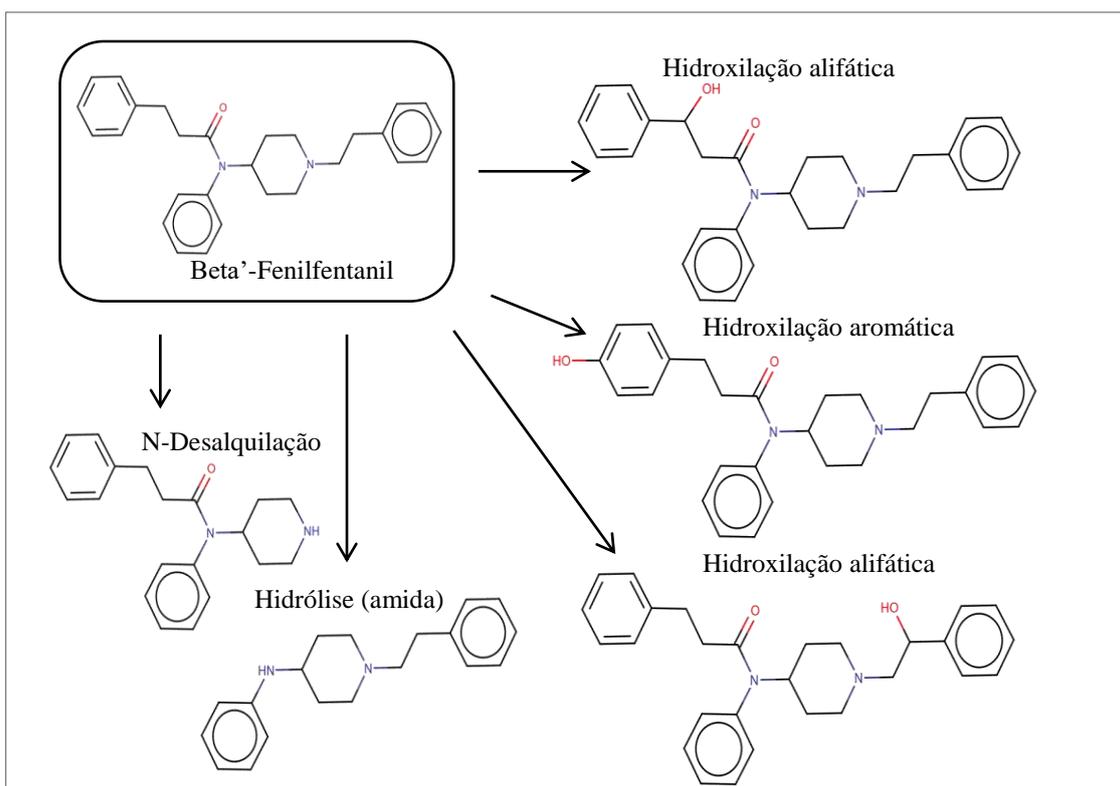


Figura 123. Principais metabólitos do beta'-fenilfentanil

TRANS-3-METILFENTANIL

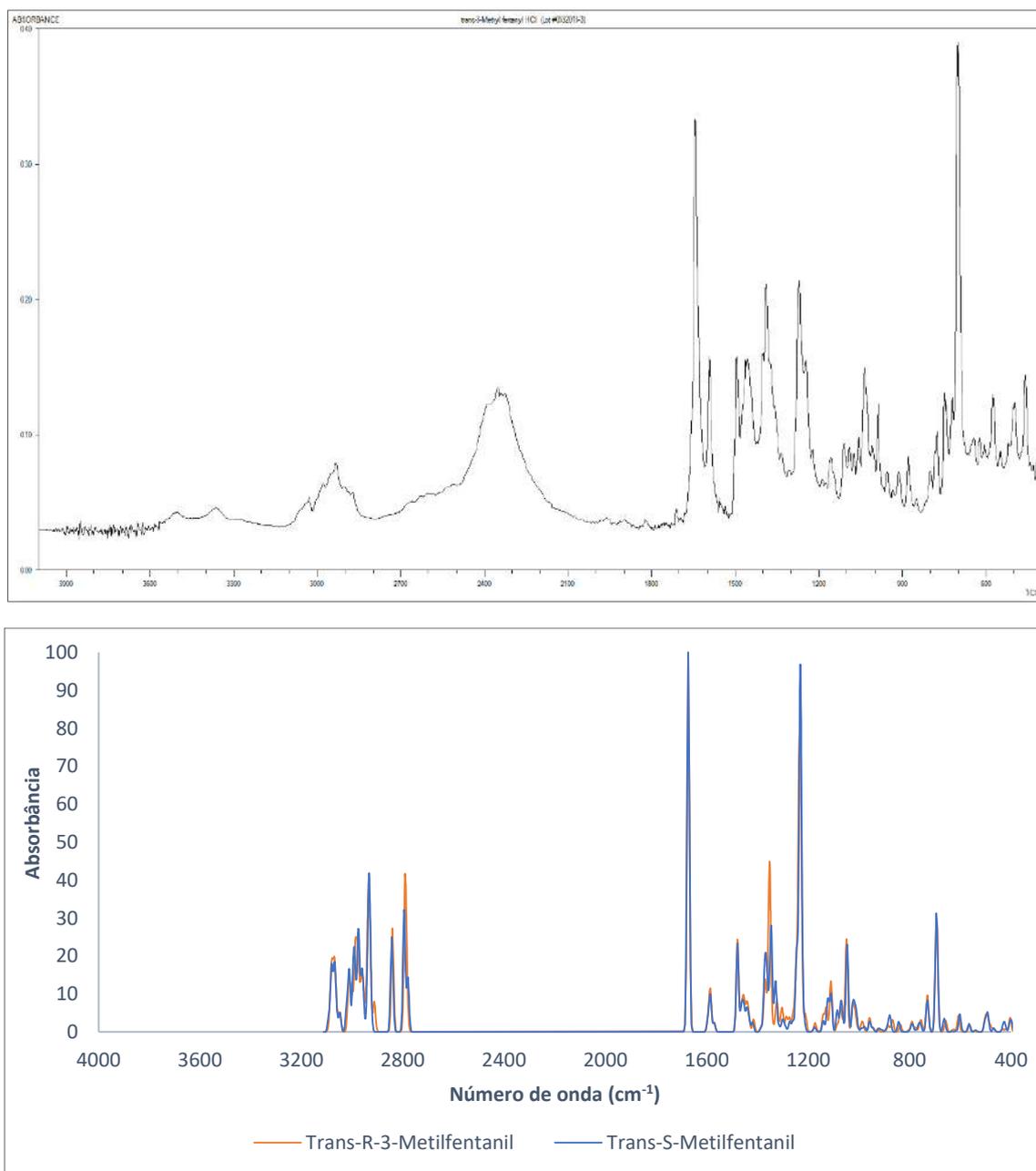


Figura 124. Espectro Infravermelho do Trans-3R-4R-3-metilfentanil (laranja) e Trans-3S-4S-3-metilfentanil (azul): (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ (Trans-3-metilfentanil, sem especificação) e (b) teórico

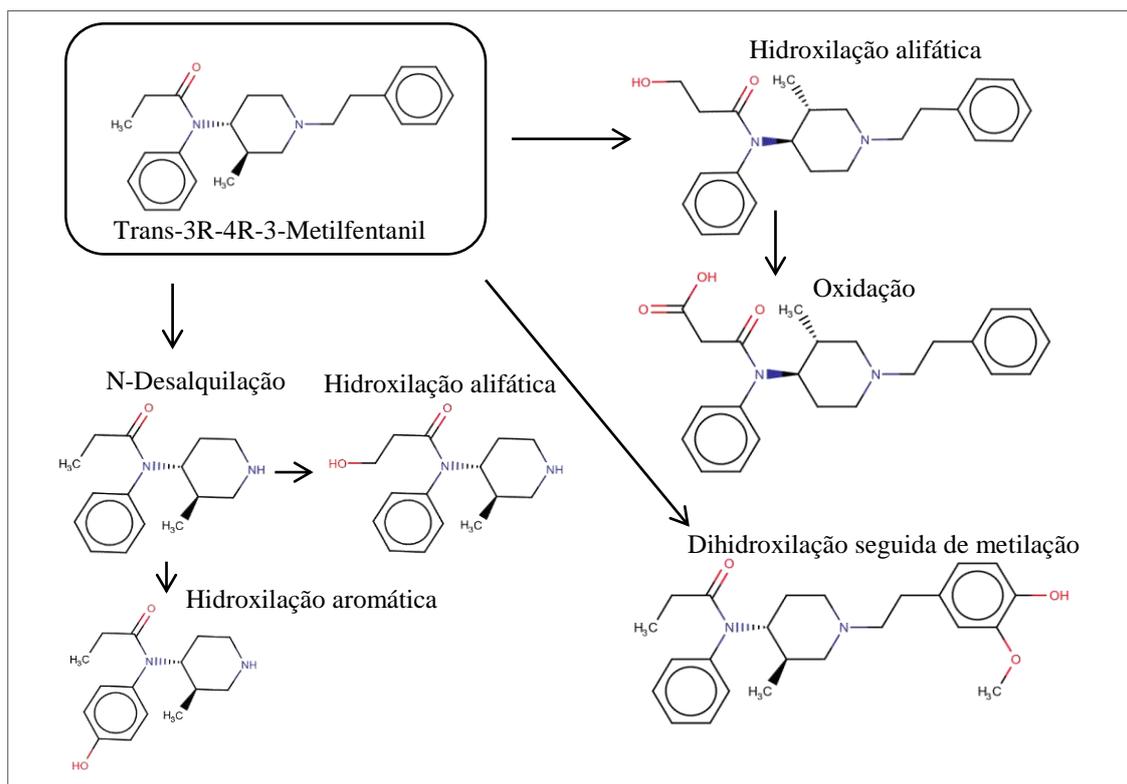


Figura 127. Principais metabólitos do trans-3R-4R-3-metilfentaniil

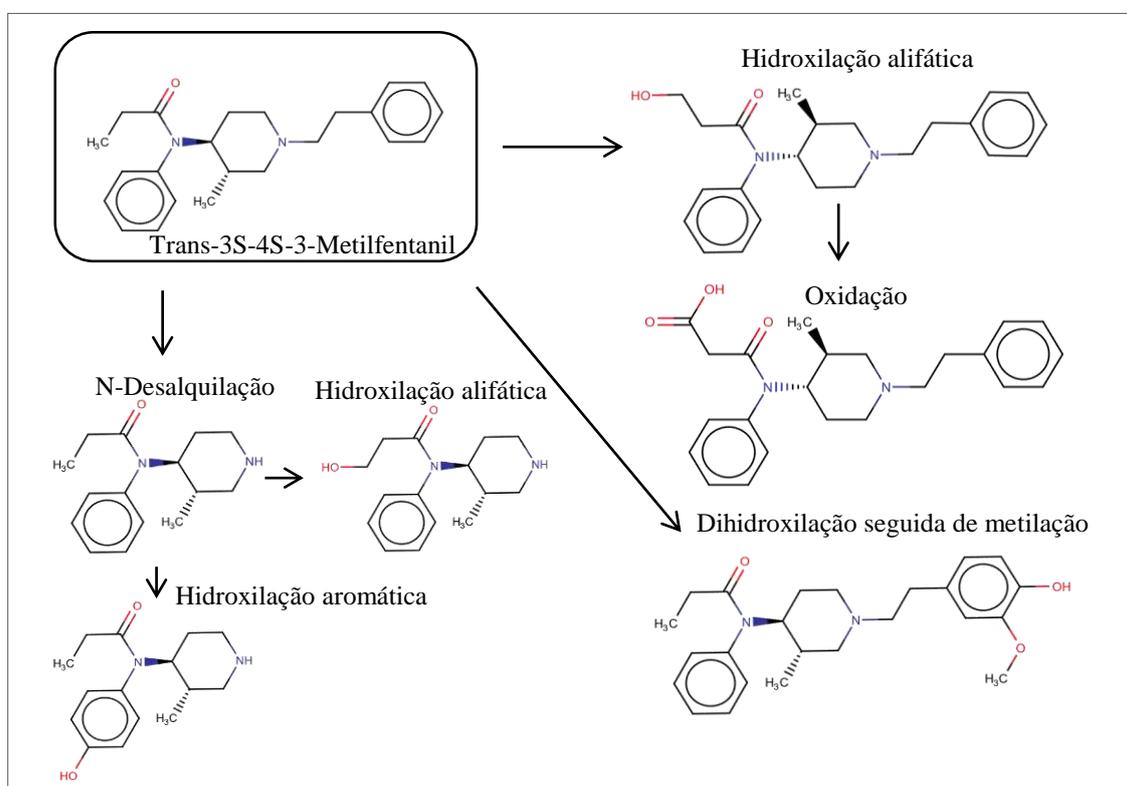


Figura 128. Principais metabólitos do trans-3S-4S-3-metilfentaniil

BETA-HIDROXIFENTANIL

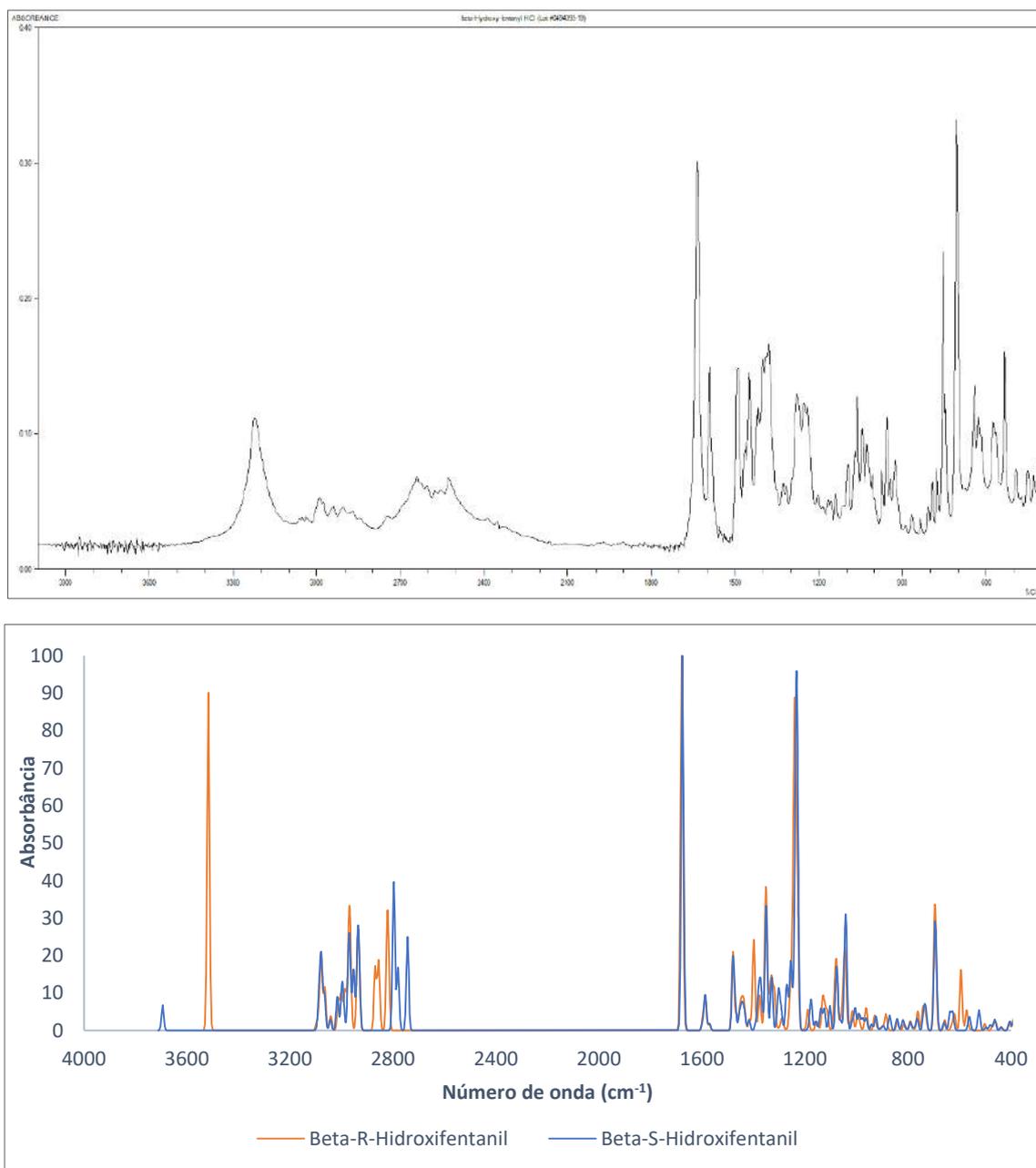


Figura 129. Espectro Infravermelho do beta-R-hidroxfentanil (laranja) e beta-S-hidroxfentanil (azul): (a) SWGDRUG experimental⁸⁸ (beta-hidroxfentanil, sem especificação) e (b) teórico

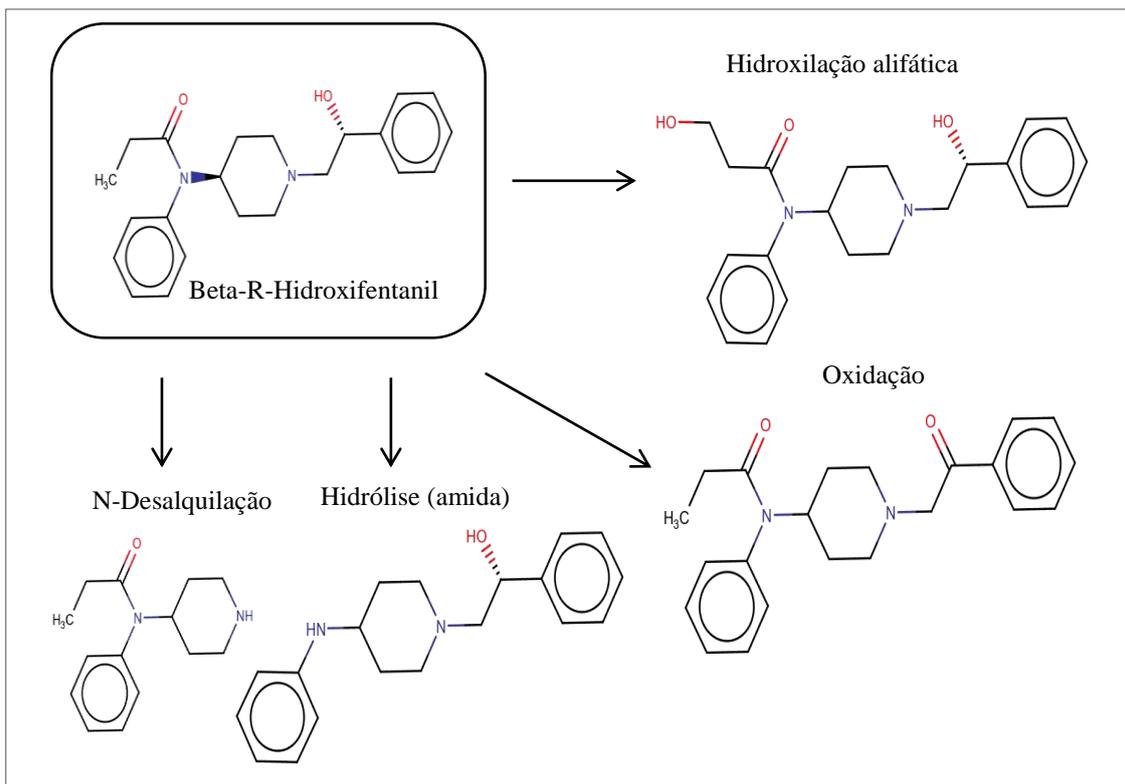


Figura 132. Principais metabólitos do beta-R-hidroxifentanil

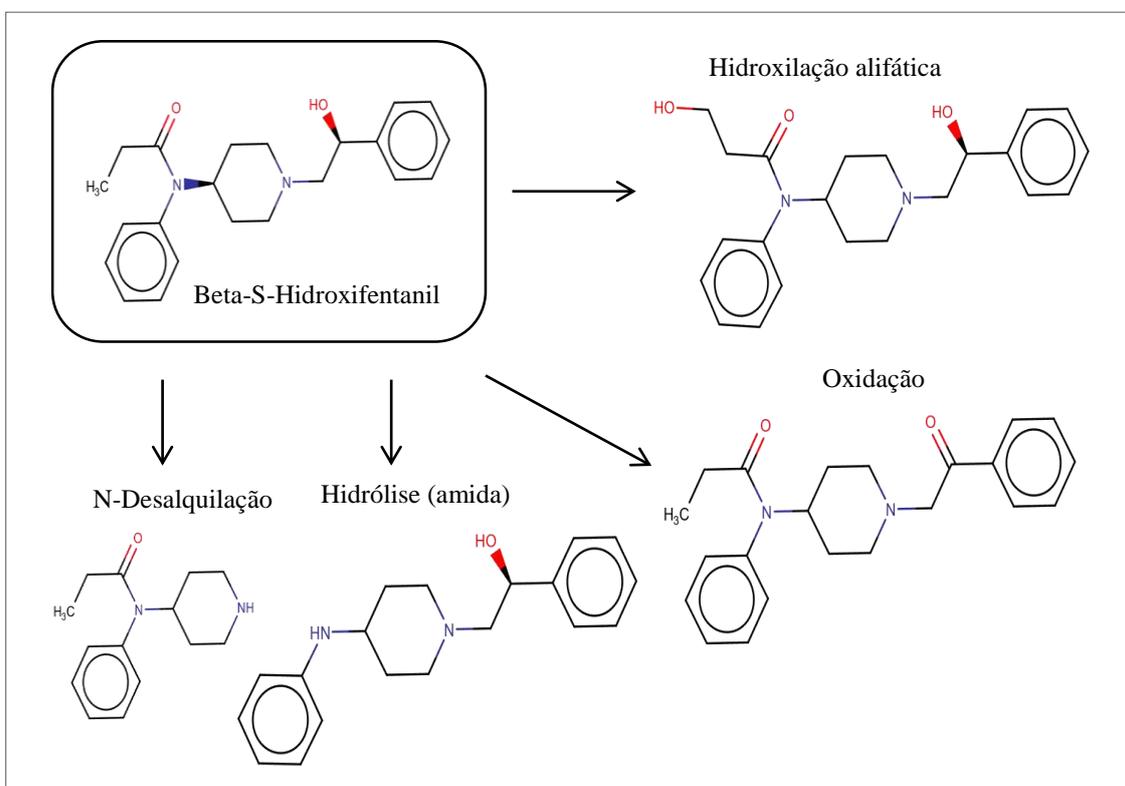
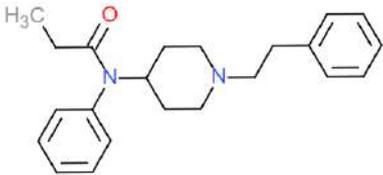
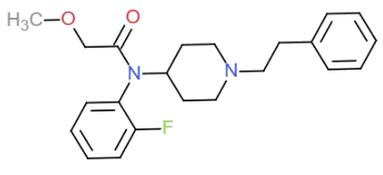
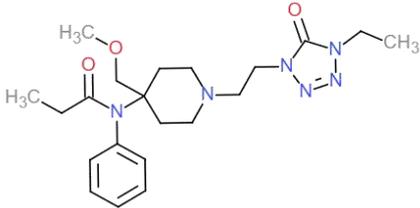
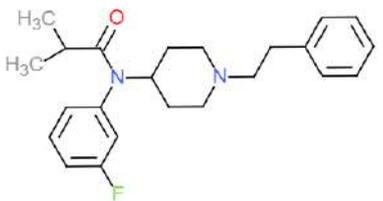
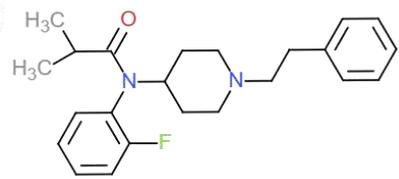
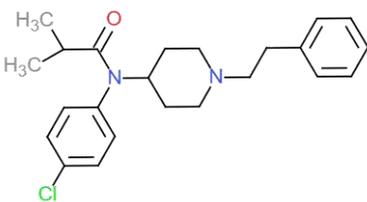
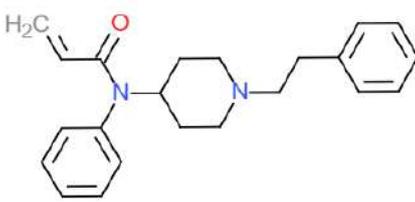
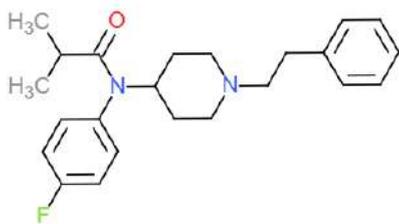
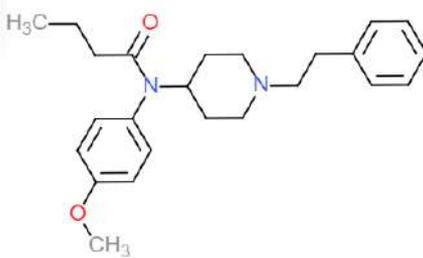


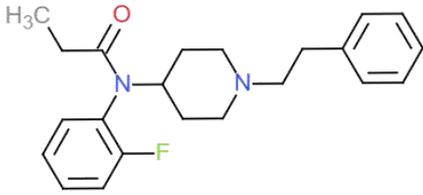
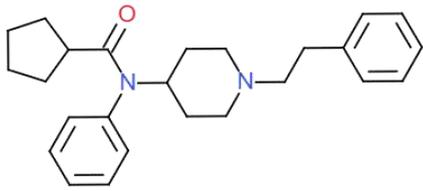
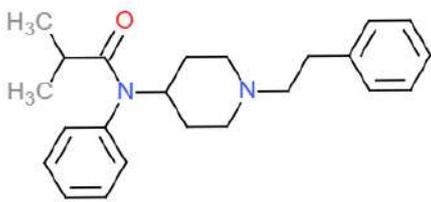
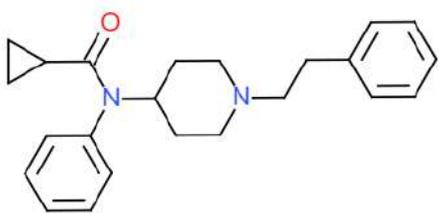
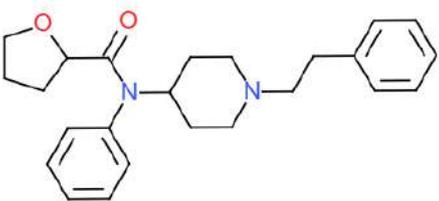
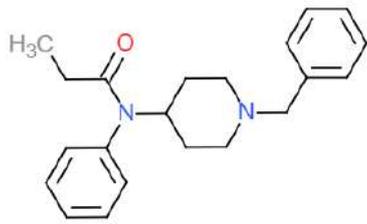
Figura 133. Principais metabólitos do beta-S-hidroxifentanil

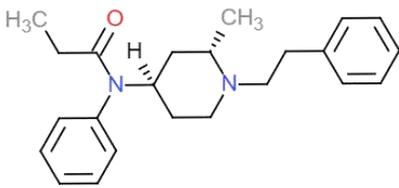
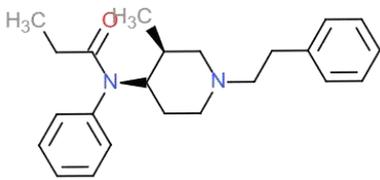
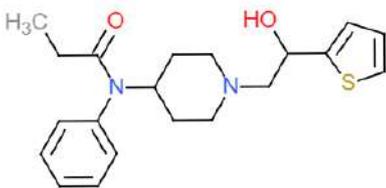
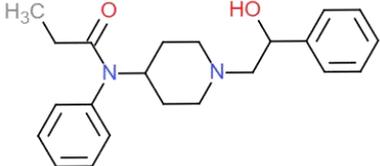
Análise dos espectros de Infravermelho por modificação estrutural

Tabela 1. Análise dos espectros de Infravermelho por modificação estrutural

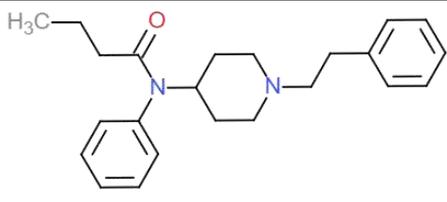
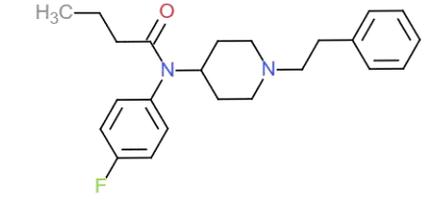
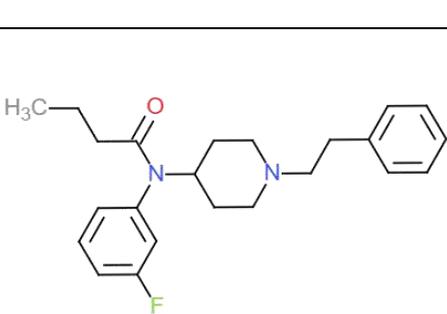
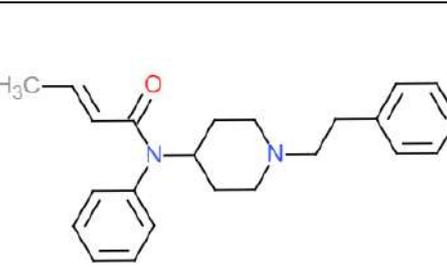
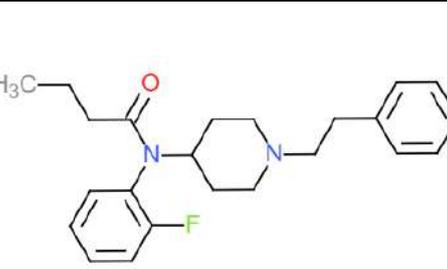
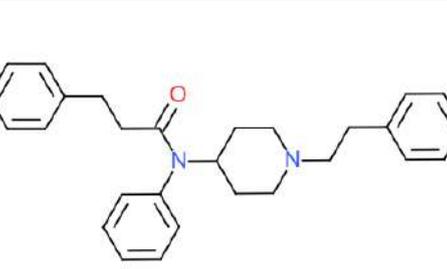
Nome do Composto	Fórmula Estrutural	Classe	Observações sobre as Frequências Vibracionais
(1) Fentanil		I	-Espectro IV já comentado e usado como padrão para as análises dos espectros dos outros análogos
(3) Ocfentanil		I	-Deslocamento do pico de estiramento C=O -Aparecimento dos picos de estiramento C-O e C-F -Redução de intensidade do pico de estiramento C-N -Divisão do pico de estiramento C=C em dois picos menores
(4) Alfentanil		I	-Aparecimento dos picos de estiramento C-O e C=O do anel tetrazol -Redução da intensidade do pico de dobramento fora do plano C-H -Redução da intensidade dos picos de estiramento C=O e C-N -Aumento de intensidade do pico de dobramento C-H
(6) m-Fluoroisobutirfentanil		I	-Aumento de intensidade dos picos de estiramento e dobramento (alcano) C-H -Redução de intensidade do pico de dobramento fora do plano C-H -Aparecimento do pico de estiramento C-F e outro C=C
(7) o-Fluoroisobutirfentanil		I	-Aumento de intensidade dos picos de estiramento e dobramento (alcano) C-H

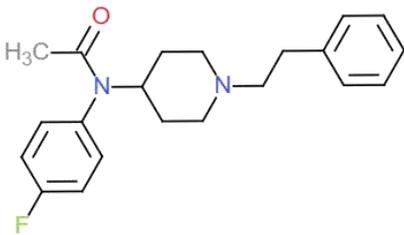
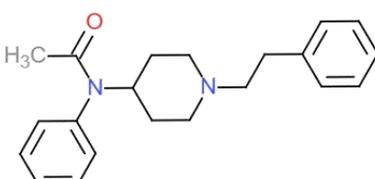
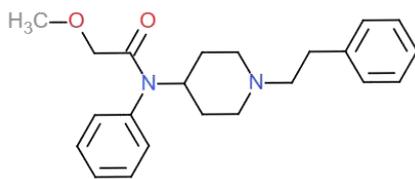
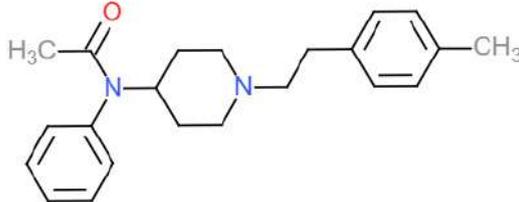
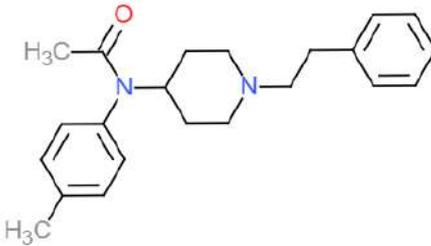
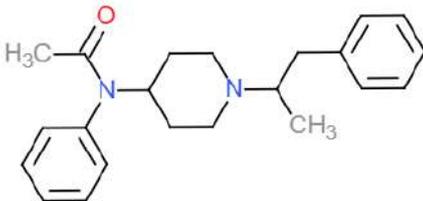
			-Redução de intensidade do pico de dobramento fora do plano C-H -Aparecimento do pico de estiramento C-F e outro C=C
(8) p-Cloroisobutirfentanil		I	-Aumento de intensidade dos picos de estiramento e dobramento (alceno) C-H -Redução de intensidade do pico de dobramento fora do plano C-H -Aparecimento do pico de estiramento C-Cl e outro C=C
(11) Carfentanil		I	-Aparecimento de picos de estiramento C=O éster e C-O -Aumento de intensidade dos picos de estiramento C-C e dobramento C-H
(12) Acriloilfentanil		I	-Redução de intensidade do pico de estiramento C=O -Aparecimento do pico de estiramento alceno C=C -Aumento de intensidade dos picos de dobramento alceno e alceno C-H
(16) p-Fluoroisobutirfentanil		I	-Aumento de intensidade dos picos de estiramento e dobramento (alceno) C-H -Redução de intensidade do pico de dobramento fora do plano C-H -Aparecimento do pico de estiramento C-F e outro C=C
(21) 4-Metoxibutirfentanil		I	-Aumento de intensidade dos picos de estiramento e dobramento alceno C-H -Redução de intensidade do pico de dobramento fora do plano C-H -Aparecimento do pico de estiramento C-O
(23) o-Fluorofentanil		I	-Aparecimento do pico de estiramento C-F e outro C=C

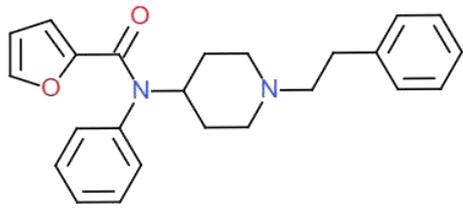
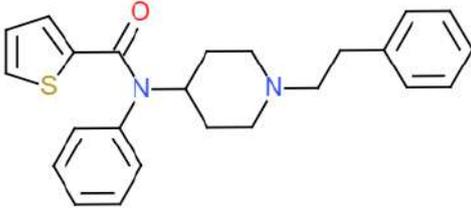
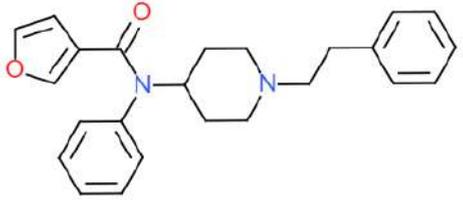
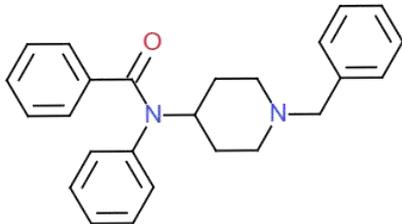
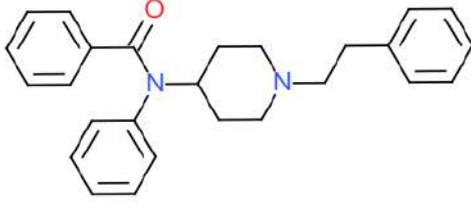
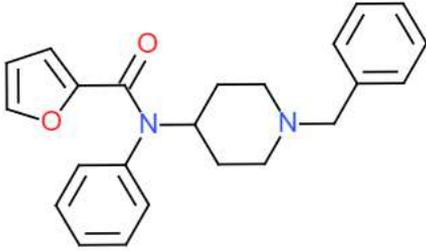
			
(26) Ciclopentanoilfentanil		I	-Aumento de intensidade do pico de estiramento alcano C-H -Deslocamento do pico de estiramento C-N
(28) Isobutirfentanil		I	-Aumento de intensidade dos picos de estiramento e dobramento (alceno) C-H -Redução de intensidade do pico de dobramento fora do plano C-H
(29) Ciclopropilfentanil		I	-Redução de intensidade e deslocamento do pico de estiramento C=O -Deslocamento dos picos de dobramento C-H
(32) Tetrahidrofuranilfentanil		I	-Aumento de intensidade dos picos de dobramento (alceno e alceno) C-H -Aparecimento do pico de estiramento C-O
(34) Benzilfentanil		I	-Similar ao fentanil -Redução de intensidade do pico de estiramento alcano C-H -Aumento de intensidade do pico de estiramento C-H dos carbonos ligados ao nitrogênio
(36) 2R-4S-2-Metilfentanil		I	-Similar ao fentanil

			
(38) Cis-3R-4S-3-Metilfentanil		I	-Similar ao fentanil -Redução de intensidade do pico de estiramento C=O
(39) Beta-R-Hidroxitiofentanil		I	-Aparecimento do pico de estiramento e dobramento O-H e estiramento C-S
(40) p-Metoxifentanil		I	-Aumento de intensidade do pico de dobramento alcano C-H -Redução de intensidade do pico de dobramento fora do plano C-H -Aparecimento do pico de estiramento C-O
(42) Trans-3R-4R-3-Metilfentanil		I	-Similar ao fentanil
(43) Beta-R-Hidroxfentanil		I	-Aparecimento do pico de estiramento e dobramento O-H
(44) Cis-3S-4R-3-Metilfentanil		I	-Similar ao fentanil -Aumento de intensidade dos picos de estiramento e dobramento alcano C-H

(45) Beta-S-Hidroxfentanil		I	-Aparecimento do pico de estiramento e dobramento O-H
(46) Trans-3S-4S-3-Metilfentanil		I	-Similar ao fentanil
(2) Heptanoilfentanil		II	-Aumento de intensidade dos picos de estiramento e dobramento alcano C-H -Redução de intensidade e deslocamento do pico de estiramento C-N
(5) Hexanoilfentanil		II	-Aumento de intensidade dos picos de estiramento e dobramento alcano C-H -Redução de intensidade e deslocamento do pico de estiramento C-N
(10) Valerilfentanil		II	-Aumento de intensidade dos picos de estiramento e dobramento alcano C-H -Redução de intensidade e deslocamento do pico de estiramento C-N
(15) Butirfentanil		II	-Aumento de intensidade dos picos de estiramento e dobramento alcano C-H -Redução de intensidade e deslocamento do pico de estiramento C-N

			
(17) p-Fluorobutirfentanil		II	-Aumento de intensidade dos picos de estiramento e dobramento C-H -Redução de intensidade do pico de estiramento C-N -Aparecimento do pico de estiramento C-F e outro C=C
(24) m-Fluorobutirfentanil		II	-Aumento de intensidade dos picos de estiramento e dobramento C-H -Redução de intensidade do pico de estiramento C-N -Aparecimento do pico de estiramento C-F e outro C=C
(25) Crotonilfentanil		II	-Aumento de intensidade da maioria dos picos -Deslocamento do pico de estiramento C-N -Aparecimento do pico de estiramento C=C de alta intensidade
(30) o-Fluorobutirfentanil		II	-Aumento de intensidade dos picos de estiramento e dobramento C-H -Redução de intensidade do pico de estiramento C-N -Aparecimento do pico de estiramento C-F e outro C=C
(41) Beta'-Fenilfentanil		II	-Aumento de intensidade dos picos de estiramento C-H e dobramento fora do plano C-H -Redução de intensidade e deslocamento do pico de estiramento C-N
(9) p-Fluoroacetilfentanil		III	-Deslocamento do pico de estiramento C=O -Redução de intensidade e deslocamento do pico de estiramento C-N

			-Aparecimento do pico de estiramento C-F
(14) Acetilfentanil		III	-Deslocamento do pico de estiramento C=O -Redução de intensidade e deslocamento do pico de estiramento C-N
(22) Metoxiacetilfentanil		III	-Deslocamento do pico de estiramento C=O -Redução de intensidade e deslocamento do pico de estiramento C-N -Aparecimento do pico de estiramento C-O
(31) 4'-Metilacetilfentanil		III	-Deslocamento do pico de estiramento C=O -Redução de intensidade e deslocamento do pico de estiramento C-N
(33) p-Metilacetilfentanil		III	-Deslocamento do pico de estiramento C=O -Redução de intensidade e deslocamento do pico de estiramento C-N
(37) Acetil-alfa-R-Metilfentanil		III	-Deslocamento do pico de estiramento C=O -Redução de intensidade e deslocamento do pico de estiramento C-N
(13) Furanilfentanil		IV	-Aumento de intensidade do pico de dobramento fora do plano C-H

			<ul style="list-style-type: none"> -Aparecimento de outro pico de estiramento C=C aromático -Deslocamento dos picos de estiramento C=O e C-N -Aparecimento do pico de estiramento C-O
(18) 2-Tiofenoilfentanil		IV	<ul style="list-style-type: none"> -Aumento de intensidade do pico de dobramento fora do plano C-H -Aparecimento de outro pico de estiramento C=C aromático -Deslocamento dos picos de estiramento C=O e C-N -Aparecimento do pico de estiramento C-S
(19) 3-Furanilfentanil		IV	<ul style="list-style-type: none"> -Aumento de intensidade do pico de dobramento fora do plano C-H -Aparecimento de outro pico de estiramento C=C aromático -Deslocamento dos picos de estiramento C=O e C-N -Aparecimento do pico de estiramento C-O
(20) Benzoilbenzilfentanil		IV	<ul style="list-style-type: none"> -Aumento de intensidade do pico de dobramento fora do plano C-H -Aparecimento de outro pico de estiramento C=C aromático -Deslocamento dos picos de estiramento C=O e C-N
(27) Benzoilfentanil		IV	<ul style="list-style-type: none"> -Aumento de intensidade do pico de dobramento fora do plano C-H -Aparecimento de outro pico de estiramento C=C aromático -Deslocamento dos picos de estiramento C=O e C-N
(35) 2-Furanilbenzilfentanil		IV	<ul style="list-style-type: none"> -Aumento de intensidade do pico de dobramento fora do plano C-H -Aparecimento de outro pico de estiramento C=C aromático -Deslocamento dos picos de estiramento C=O e C-N -Aparecimento do pico de estiramento C-O