



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**  
**CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS E**  
**BIOTECNOLOGIA**

**ESTUDO DA INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE POR DOCKING  
MOLECULAR E MFCC: APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DO ALZHEIMER**

**FRANCISCO CARLOS DE MEDEIROS FILHO**

**CUITÉ-PB**

**2020**

FRANCISCO CARLOS DE MEDEIROS FILHO

**ESTUDO DA INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE POR DOCKING  
MOLECULAR E MFCC: APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DO ALZHEIMER**

Dissertação desenvolvida sob orientação do Prof.<sup>a</sup> Dra Daniele Jovem da Silva Azevedo, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia da Universidade Federal de Campina Grande em complementação aos requisitos à obtenção do título de Mestre.

**CUITÉ-PB**

**2020**

M488e

Medeiros Filho, Francisco Carlos de.

Estudo da inibição da acetilcolinesterase por docking molecular e mfc: aplicação no tratamento do Alzheimer. / Francisco Carlos de Medeiros Filho. – Cuité: CES, 2020.

147 fl.

Dissertação (Curso de Pós-graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia) – Centro de Educação e Saúde / CES, 2020.

Orientadora: Dra. Daniele Jovem da Silva Azevedo.  
Coorientador: Dr. Nilton Ferreira Frazão.

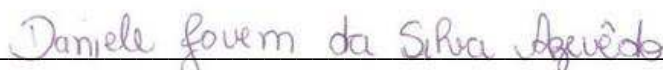
1. Alzheimer - tratamento. 2. Acetilcolinesterase - inibidores. 3. Alzheimer - métodos computacionais. I. Título. II. Frazão, Nilton Ferreira.

CDU 616.894(043)

**ESTUDO DA INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE POR DOCKING  
MOLECULAR E MFCC: APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DO ALZHEIMER**

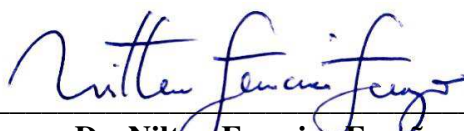
**FRANCISCO CARLOS DE MEDEIROS FILHO**

Dissertação Aprovada em 10/11/2020 pela Banca Examinadora constituída dos seguintes  
membros:



**Dra. Daniele Jovem da Silva Azevedo**

Orientadora  
PPGCNBIOTEC/UFMG



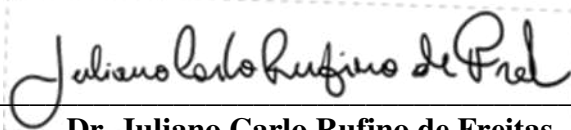
**Dr. Nilton Ferreira Frazão**

Coorientador  
UAFM/CES/UFMG



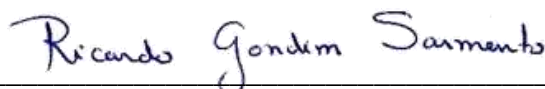
**Dra. Magnólia de Araújo Campos Pfenning**

Coorientadora  
UABQ/CES/UFMG



**Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas**

Examinador Interno  
UABQ/CES/UFMG



**Dr. Ricardo Gondim Sarmento**

Examinador Externo  
UFPI

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sem Ele não seria, Tudo vem dEle e toda Glória a Ele.

Aos meus pais, Francisco e Ione, por sempre acreditarem no meu potencial e investirem nos meus estudos com muito sacrifício.

A minha esposa Jária, dedico, com todo amor, mais uma conquista que podemos compartilhar juntos, meu porto seguro nos momentos difíceis, obrigado por toda compreensão, motivação, amor e paciência comigo.

A minha irmã que sempre me ajudou com os seus conselhos, amor e compreensão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Nilton Ferreira Frazão, que sempre acreditou no meu potencial. Obrigado por todo suporte e ajuda. Não tenho palavras para expressar minha gratidão. Se fosse para escolher de novo, eu o escolheria novamente como meu orientador.

Agradeço à comissão avaliadora pelas ricas considerações feitas ao meu trabalho. Muito obrigado ao Prof. Dr. Ricardo Gondim Sarmiento e ao Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas.

Aos meus amigos Rafael e Ketly, meus parceiros de Laboratório que tive o prazer de desenvolver laços de amizade, sem eles, nada disso teria sido possível. Serei grato por todos os ensinamentos que aprendemos juntos.

Aos meus amigos de pós-graduação, Alana, Letícia e Rodrigo, que me ajudaram muito em tempos difíceis. Seguiremos juntos e torcendo uns pelos outros, pois quero levar a amizade de vocês para sempre. Eu serei extremamente grato por tudo.

Aos parceiros de Laboratório e amigos que tanto me apoiaram nessa trajetória, Professora Denise, Professor Carlos Leon, Jaqueline, Lorena, Willian e Ana Maria.

Ao secretário Herbert, por todo suporte, ajuda na elaboração de documentos e palavras de ânimos. Você é um profissional de verdade.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia, que me abraçou mesmo em tempos difíceis.

À Universidade Federal de Campina Grande – Campus Cuité, que tive o prazer de desenvolver a minha formação de Graduação e Mestrado durante seis anos.

A todos que me ajudaram de forma direta ou indireta, em tempos de pandemia do coronavírus, sintam-se abraçados.

Mais uma vez, obrigado a todos!

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Acetil CoA** Acetil coenzima A

**Ach** Acetilcolina

**AchE** Acetilcolinesterase

**ADAS-Cog** *Alzheimer's Disease Assessment Scale – Cognitive section* (Escala de Avaliação da Doença de Alzheimer – Subscore cognitivo)

**ChAT** Colina Acetiltransferase

**DA** Doença de Alzheimer

**DFT** *Density Functional Theory* (Teoria do Funcional da Densidade)

**DOS** *Density of States* (Densidade de Estados)

**GGA** *Generalized Gradient Approximation* (Aproximação do Gradiente Generalizado)

**HOMO** *Highest Occupied Molecular Orbital*

**IR** *Infrared* (Infravermelho)

**LDA** *Local Density Approximation* (Aproximação da Densidade Local)

**LUMO** *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*

**MEEM** Mini-exame do Estado Mental

**PDOS** *Partial Density of States* (Densidade Parcial de Estados)

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	186
OBJETIVO GERAL.....	222
OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	22
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	23
DOENÇA DO ALZHEIMER.....	23
ACETILCOLINESTERASE (AChE) .....	24
BIOQUÍMICA COMPUTACIONAL .....	25
DOCKING MOLECULAR.....	26
TEORIA DO FUNCIONAL DA DENSIDADE .....	27
DENSIDADE ELETRÔNICA .....	28
OPERADOR DE DENSIDADE .....	28
TEOREMAS DE HOHENBERG-KOHN.....	28
O GRANDE ANSATZ E O FORMALISMO DE KOHN-SHAM .....	29
EQUAÇÃO DE KOHN-SHAM.....	29
FUNCIONAL DE TROCA E CORRELAÇÃO.....	30
MÉTODO AB INITIO .....	32
MÉTODO DE FRACIONAMENTO MOLECULAR COM CAPS CONJUGADOS (MFCC) .....	32
METODOLOGIA.....	33
ESTRUTURA DA ACETILCOLINESTERASE 1EA5 .....	33
ESTRUTURA DA ACETILCOLINESTERASE 1GQR .....	34
SELEÇÃO DE MOLÉCULAS .....	35
DRUGBANK .....	36
PROTEIN DATA BANK.....	37
DISCOVERY STUDIO.....	38

ARGUSLAB®.....	39
MATERIALS STUDIO.....	40
OTIMIZAÇÕES CLÁSSICAS E QUÂNTICAS .....	41
DOCKING MOLECULAR.....	43
FÁRMACOS TESTADOS.....	43
Tacrina .....	43
Rivastigmina.....	44
Galantamina.....	45
Donepezil.....	46
Fisostigmina .....	47
Memantina.....	48
DETERMINAÇÃO ENERGÉTICA DOS COMPLEXOS PROTEÍNA-LIGANTE OBTIDOS ATRAVÉS DO MFCC .....	49
RESULTADOS E DISCUSSÃO DO 1º RECEPTOR 1EA5.....	52
DETERMINAÇÃO ENERGÉTICA DOS AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA-LIGANTE OBTIDA PELO MÉTODO DE FRACIONAMENTO MOLECULAR DE CAPS CONJUGADOS (MFCC).....	77
ENERGIA TOTAL OBTIDA ATRAVÉS DO MÉTODO DE FRACIONAMENTO MOLECULAR DE CAPS E CONJUGADOS (MFCC).....	92
CONCLUSÕES DO 1º RECEPTOR 1EA5 .....	95
RESULTADOS E DISCUSSÕES DO 2º RECEPTOR 1GQR.....	97
ENERGIA TOTAL OBTIDA ATRAVÉS DO MÉTODO DE FRACIONAMENTO DE CAPS E CONJUGADOS (MFCC) .....	120
CONCLUSÕES DO 2º RECEPTOR 1GQR.....	136
REFERÊNCIAS .....	139



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Monômero de acetilcolinesterase: uma proteína que contém 537 aminoácidos .....	24
Figura 2. Representação do modelo proteína-ligante na modelagem molecular.....	277
Figura 3. Visualização da enzima ACETILCOLINESTERASE NATIVA (EC 3.1.1.7) DA TORPEDO CALIFORNICA em resolução 1.8Å.....	34
Figura 4. Visualização da enzima ACETILCOLINESTERASE NATIVA (EC 3.1.1.7) DA TORPEDO CALIFORNICA em resolução 2.2Å.....	35
Figura 5. Interface do site DrugBank (disponível em, <a href="http://www.drugbank.ca/">www.drugbank.ca/</a> , acessado em 12 de fevereiro de 2020).....	366
Figura 6. Interface do site Protein Data Bank (disponível em, <a href="http://www.rcsb.org/">www.rcsb.org/</a> , acessado em 13 de Março de 2020).....	377
Figura 7. Interface do software Discovery Studios 2017 R2.....	399
Figura 8. Interface do software ArgusLab® 3.0.....	400
Figura 9. Interface do software Materials Studio 8.0, na região ampliada estão os dois módulos utilizados do programa. ....	41
Figura 10. Modo do software Materials Studio 8.0, na região ampliada estão os dois módulos utilizados do programa. ....	42
Figura 11. Módulo Forcite uma das ferramentas que compõem o programa Materials Studio. ....	42
Figura 12. Módulo Dmol3 uma das ferramentas que compõem o programa Materials Studio. ....	433
Figura 13. Estrutura da Tacrina no software VMD - Visual molecule Dynamics. ....	44
Figura 14. Estrutura da Rivastigmina no software VMD - Visual molecule Dynamics. ....	45
Figura 15. Estrutura da Galantamina no software VMD - Visual molecule Dynamics. ....	46
Figura 16. Estrutura da Donepezil no software VMD - Visual molecule Dynamics. ....	47
Figura 17. Estrutura da Fisostigmina no software VMD - Visual molecule Dynamics.....	488
Figura 18. Estrutura da Memantina no software VMD - Visual molecule Dynamics. ....	499
Figura 19. Método de Fracionamento Molecular com Caps conjugados (MFCC) exemplificado pelo cálculo energético da interação proteína-ligante entre o receptor AChE e o	

ligante Tacrina, onde $EI (L - Ri) = \text{Fragmento 1} - \text{Fragmento 2} - \text{Fragmento 3} + \text{Fragmento 4}$ .....	51
Figura 20. Visualização 2D do composto Tacrina e os resíduos de 1EA5 de maior interação. .....	54
Figura 21. Nuvem eletrostática da interação receptor com Tacrina. ....	55
Figura 22. Visualização 2D do composto Donepezil e os resíduos de 1EA5 de maior interação.....	58
Figura 23. Nuvem eletrostática da interação receptor com Donepezil.....	59
Figura 24. Visualização 2D do composto Rivastigmina e os resíduos de 1EA5 de maior interação.....	633
Figura 25. Nuvem eletrostática da interação receptor com Rivastigmina. ....	64
Figura 26. Visualização 2D do composto Galantamina e os resíduos de 1EA5 de maior interação.....	67
Figura 27. Nuvem eletrostática da interação do Receptor 1EA5 com Galantamina. ....	688
Figura 28. Visualização 2D do composto Fisostigmina e os resíduos de 1EA5 de maior interação.....	70
Figura 29. Nuvem eletrostática da interação receptor com Fisostigmina.....	71
Figura 30. Visualização 2D do composto Memantina e os resíduos de 1EA5 de maior interação.....	754
Figura 31. Nuvem eletrostática da interação receptor com Memantina. ....	76
Figura 32. Visualização 2D do composto Tacrina e os resíduos de 1GQR de maior interação. .....	99
Figura 33. Nuvem eletrostática da interação receptor com Tacrina. ....	1009
Figura 34. Visualização 2D do composto Donepezil e os resíduos de 1GQR de maior interação.....	102
Figura 35. Nuvem eletrostática da interação receptor com Donepezil.....	104103
Figura 36. Visualização 2D do composto Rivastigmina e os resíduos de 1GQR de maior interação.....	106
Figura 37. Nuvem eletrostática da interação receptor com Rivastigmina. ....	108
Figura 38. Visualização 2D do composto Galantamina e os resíduos de 1GQR de maior interação.....	11110

Figura 39. Nuvem eletrostática da interação receptor com Galantamina.....	11211
Figura 40. Visualização 2D do composto Fisostigmina e os resíduos de 1GQR de maior interação.....	11514
Figura 41. Nuvem eletrostática da interação receptor com Fisostigmina.....	11615
Figura 42. Visualização 2D do composto Fisostigmina e os resíduos de 1GQR de maior interação.....	11817
Figura 43. Nuvem eletrostática da interação receptor com Memantina. ....	1198

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações básicas a respeito das moléculas testadas .....	17
Tabela 2. Energia de ligação (Kcal/mol) da Tacrina estimada pelo programa <i>ArgusLab</i> .....	52
Tabela 3. Energia de ligação (Kcal/mol) da Donepezil estimada pelo programa <i>ArgusLab</i> ....	56
Tabela 4. Energia de ligação (Kcal/mol) da Rivastigmina estimada pelo programa <i>ArgusLab</i> . .....	61
Tabela 5. Energia de ligação (Kcal/mol) da Galantamina estimada pelo programa <i>ArgusLab</i> . .....	65
Tabela 6. Energia de ligação (Kcal/mol) da Fisostigmina estimada pelo programa <i>ArgusLab</i> . .....	699
Tabela 7. Energia de ligação (Kcal/mol) da Memantina estimada pelo programa <i>ArgusLab</i> ..	72
Tabela 8. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com ligante tacrina, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol. ....	776
Tabela 9. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com ligante Donepezil, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol.....	80
Tabela 10. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com ligante Galantamina, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol.....	80
Tabela 11. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com ligante Rivastigmina, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol. ....	85
Tabela 12. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com ligante Fisostigmina, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol.....	876
Tabela 13. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com ligante Memantina, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol. ....	909
Tabela 14. Energia de ligação (Kcal/mol) da Tacrina estimada pelo programa <i>ArgusLab</i> .....	97
Tabela 15. Energia de ligação (Kcal/mol) da Donepezil estimada pelo programa <i>ArgusLab</i> . .....	101
Tabela 16. Energia de ligação (Kcal/mol) da Rivastigmina estimada pelo programa <i>ArgusLab</i> . .....	104
Tabela 17. Energia de ligação (kcal/mol) da Galantamina estimada pelo programa <i>ArgusLab</i> . .....	11009

Tabela 18. Energia de ligação (Kcal/mol) da Fisostigmina estimada pelo programa ArgusLab. .....	1132
Tabela 19. Energia de ligação (kcal/mol) da Memantina estimada pelo programa <i>ArgusLab</i> . .....	1176
Tabela 20. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1GQR com ligante Donepezil, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol.....	12120
Tabela 21. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1GQR com ligante Tacrina, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol. ....	12322
Tabela 22. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1GQR com ligante Rivastigmina, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol. ...	12524
Tabela 22. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1GQR com ligante Galantamina, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol. ....	12827
Tabela 24. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1GQR com ligante Fisostigmina, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol. ....	13029
Tabela 24. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1GQR com ligante Memantina, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol.	

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com o ligante Tacrina.....	798
Gráfico 2. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com o ligante Donepezil.....	81
Gráfico 3. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com o ligante Galantamina.....	84
Gráfico 4. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com o ligante Rivastigmina.....	86
Gráfico 5. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com o ligante Fisostigmina.....	89
Gráfico 6. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com o ligante Memantina.....	90
Gráfico 7. Compostos testados com os aminoácidos da proteína 1EA5 e sua Energia total (kcal/mol) comparando-se com todos os ligantes.....	94
Gráfico 8. Representação da Energia total (eV) de todos os ligantes ancorados a proteína 1EA5 da AChE.....	943
Gráfico 9. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1QGR com o ligante Donepezil.....	122
Gráfico 10. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1QGR com o ligante Tacrina.....	125
Gráfico 11. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1QGR com o ligante Rivastigmina.....	129
Gráfico 12. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1QGR com o ligante Galantamina.....	1318
Gráfico 13. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1QGR com o ligante Fisostigmina.....	13130
Gráfico 14. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1QGR com o ligante Memantina.....	13433

Gráfico 15. Compostos testados com os aminoácidos da proteína 1GQR e sua energia total (Kcal/mol) comparando-se com todos os ligantes..... 135

Gráfico 16. Representação da Energia total (eV) de todos os ligantes ancorados a proteína 1GQR da AChE..... 13635

## SIGLAS DOS PRINCIPAIS AMINOÁCIDOS

<b>GLY</b>	Glicina
<b>ALA</b>	Alanina
<b>LEU</b>	Leucina
<b>VAL</b>	Valina
<b>ILE</b>	Isoleucina
<b>PRO</b>	Prolina
<b>PHE</b>	Fenilalanina
<b>SER</b>	Serina
<b>THR</b>	Treonina
<b>CYS</b>	Cisteina
<b>TYR</b>	Tirosina
<b>ASN</b>	Asparagina
<b>GLN</b>	Glutamina
<b>ASP</b>	Ácido aspártico
<b>GLU</b>	Ácido glutâmico
<b>ARG</b>	Arginina
<b>LYS</b>	Lisina
<b>HIS</b>	Histidina
<b>TRP</b>	Triptofano
<b>MET</b>	Metionina



## RESUMO

A expectativa de vida do ser humano tem aumentado e as doenças relacionadas com a idade vêm se tornando evidentes, uma delas é a doença de Alzheimer, que é uma enfermidade neurodegenerativa, progressiva, sem cura até o momento, geralmente ocorre com pessoas acima dos 65 anos, é um tipo de demência, de declínio cognitivo crescente e irreversível e com múltiplos déficits cognitivos, dos quais um, obrigatoriamente, é a perda de memória. Esses sintomas são suficientemente intensos para causar impacto nas atividades diárias de uma pessoa. Quanto às possíveis causas da doença, ainda são desconhecidas, porém, os indícios mais comuns são: o avanço da idade e os fatores genéticos. Nesse sentido, o trabalho teve como objetivo geral investigar *in silico* as propriedades de interação de alguns inibidores, dentre eles: Tacrina, Donepezil, Rivastigmina, Galantamina, Fisostigmina e Memantina, com a Acetilcolinesterase. Para isso, metodologicamente, foi realizado o *Docking Molecular* e o *Método de Fracionamento Molecular com Caps Conjugados* (MFCC), considerando estruturas moleculares extraídas de bancos de dados certificados (*DrugBank* e *Protein Data Bank*). Dessa forma, realizou-se os cálculos quânticos e, através desses, foi possível proceder uma análise quantitativa, por meio *ab initio*. Diante disso, os resultados apontaram que todos os seis fármacos apresentaram atividade inibitória frente a Acetilcolinesterase (AChE), uma energia livre de ligação de todos os complexos foram expressivamente negativos, podendo afirmar que, de forma termodinâmica, os valores de gastos energéticos foram favoráveis. Por meio de estudos *in silico*, ou seja, através de métodos computacionais, a interação dos fármacos com a enzima AChE obtiveram resultados significativos de problemas farmacológicos relacionados à doença neurodegenerativa em estudo. Em virtude disso, a pesquisa é relevante, pois consiste em obter as melhores conformações de menor energia por meio do *docking molecular* e *MFCC*, que foram comprovadas por conceitos teóricos, físico-químicos e termodinâmicos.

**Palavras-chave:** doença do Alzheimer, métodos computacionais, inibidores da acetilcolinesterase.

## ABSTRACT

Life Human life expectancy has increased and age-related diseases are becoming evident, one of which is Alzheimer's disease, which is a progressive, neurodegenerative disease, with no cure so far, usually occurs with people over 65 years, it is a type of dementia, of increasing and irreversible cognitive decline and with multiple cognitive deficits, of which one, necessarily, is memory loss. These symptoms are severe enough to impact a person's daily activities. As for the possible causes of the disease, they are still unknown, however, the most common signs are: advancing age and genetic factors. In this sense, the work had as general objective to investigate *in silico* the interaction properties of some inhibitors, among them: Tacrine, Donepezil, Rivastigmine, Galantamine, Fisostigmine and Memantine, with Acetylcholinesterase. For this, methodologically, the *Molecular Docking* and the *Fractionation Method Molecule with Conjugated Hoods (MFCC)* were performed, considering molecular structures extracted from certified databases (*DrugBank* and *Protein Data Bank*). In this way, quantum calculations were performed and, through these, it was possible to carry out a quantitative analysis, through *ab initio*. In view of this, the results showed that all six drugs showed inhibitory activity against Acetylcholinesterase (AChE), a free energy of binding of all complexes, which were expressively negative, which can affirm that, in a thermodynamic way, the values of energy expenditure were favorable. Through *in silico* studies, that is, through computational methods, the interaction of drugs with the AChE enzyme obtained significant results from pharmacological problems related to the neurodegenerative disease under study. As a result, the research is relevant, as it consists of obtaining the best conformations of lower energy through molecular docking and MFCC, which were proven by theoretical, physical-chemical and thermodynamic concepts.

**Keywords:** Alzheimer's disease, computational methods, acetylcholinesterase inhibitors

## INTRODUÇÃO

A expectativa de vida do ser humano tem aumentado e as doenças relacionadas com a idade vêm se tornando mais evidentes, como comprova uma matéria publicada no G1 em 2019. Nessa notícia, a Organização Mundial de Saúde (OMS) apontava que os casos de demência vão triplicar e chegar até 152 milhões de pessoas até 2050. Dentre as doenças que causam demência, destaca-se a doença de Alzheimer, que afeta a população mais idosa, causando uma problemática a nível mundial.

A doença de Alzheimer foi descrita em 1906 por um psiquiatra alemão, Alois Alzheimer, que estudou os sintomas em uma paciente chamado August Deter. De acordo com Inouye, Pedrazzani e Pavarini (2010), a doença de Alzheimer é um tipo de demência, de declínio cognitivo crescente e irreversível, com múltiplos déficits cognitivos, dos quais um, obrigatoriamente, é a perda de memória. Esses sintomas são suficientemente intensos para causar impacto nas atividades diárias de uma pessoa. A causa da doença ainda é desconhecida e não se tem a cura até o presente momento, porém, os indícios da doença são: o avanço da idade e fatores genéticos.

Além disso, existem estágios da doença que podem ser destacados. Segundo Petersen (2006) a doença possui três estágios: **Estágio inicial:** leve esquecimento de fatos recentes, dificuldade de realizar tarefas simples, como, utilizar utensílios domésticos, vestir a roupa, higienização e alimentação. **Estágio intermediária:** dificuldade de reconhecer pessoas, incapacidade de aprendizado, incontinência urinária e fecal. **Estágio final:** distúrbios graves de linguagem, perda da autonomia, restrito ao leito, irritação extrema, etc.

Almeida (1997) destaca que a doença de Alzheimer pode causar diversas alterações neurofisiológicas. Nesse sentido, diversos pesquisadores, ao analisarem essas alterações, perceberam algumas anormalidades no sistema nervoso, quando pacientes portadores apresentavam mudanças na produção da acetilcolina. Tais como: redução desproporcional de acetilcolina (NORDBERG, 1992); alteração no número e sensibilidade de receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais Newhouse (1997) e Schröder (1998) e sensibilidade aumentada aos efeitos de fármacos anticolinérgicas, como a escopolamina Newhouse (1997).

A estratégia na terapia dessa doença é de melhorar a hipofunção colinérgica. Nessa perspectiva, até o momento, a que se mostrou mais viável foi a inibição da acetilcolinesterase (AChE) - enzima responsável por degradar a acetilcolina (Ach).

A acetilcolinesterase é uma enzima pertencente à família colinesterases, sendo responsável por romper a comunicação neurotransmissora da acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas. Durante esse processo, a acetilcolina efetua a transmissão de informações de um neurônio a outro (WESTFALL; WESTFALL, 2006).

As sinapses colinérgicas apresentam diversas funções fisiológicas no indivíduo na região do sistema nervoso central e periférico. O sistema nervoso central é responsável pelo controle motor, cognição e memória, já o sistema nervoso periférico tem a função de modular os impulsos nervosos que controlam os batimentos cardíacos. (VENTURA e col., 2009).

A acetilcolina ACh é um neurotransmissor que se constitui no espaço terminal dos neurônios chamado de axônio terminal, que se integra em vesículas sinápticas e, quando chega um impulso nervoso no axônio terminal, é liberada pelo neurônio na região sináptica, que é atraído pelos receptores colinérgicos que estão localizados próximos aos neurônios (STANDAERT, D. G.; YOUNG, 2006).

O ACh, quando entra em contato com esses receptores, regenera um impulso nervoso no neurônio, levando assim as informações cognitivas. Para aumentar a função da ACh, é necessário inibir a função da enzima acetilcolinesterase. Já existe alguns fármacos inibidores da AChE que são utilizadas no tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer leve e moderada, sendo eles, Tacrina, Donepezil, Rivastigmina e Galantamina.

Existem diversos fármacos que atuam como alvo às sinapses colinérgicas, podendo ativar na enzima AChE, inibindo-a ou reativando-a, como também manifestar em receptores de ACh como agonista ou antagonista. Esses fármacos que apresentam atividade de inibição são considerados anticolinérgicos. A seguir mais informações sobre os fármacos em estudo.

## Tacrina

O primeiro fármaco dessa classe a ser testado em seres humanos foi a Tacrina. Os primeiros testes foram bastante satisfatórios, não seguindo adiante o melhoramento deste, pois houve a identificação de possíveis efeitos colaterais. De acordo com Watkins *et al.*, (1994) foi abordado um estudo preocupante desse fármaco sobre a hepatotoxicidade. A pesquisa que levou aprovação da Tacrina demonstrava uma comparação entre o grupo placebo e entre o grupo de doses que variava em 80 mg/dia, 120 mg/dia e 160 mg/dia. A pesquisa desenvolvida por Knapp e *et al.*, (1994) apresentava uma relação entre as doses diárias e os índices do Mini Exame do

Estado Mental (MEEM) que inclui basicamente em testes que mapeavam perdas cognitivas e demência, e da Escala de Avaliação da Doença de Alzheimer – Subscore Cognitivo (*Alzheimer's Disease Assessment Scale – cognitive section – ADAS-Cog*), mesmo demonstrando um resultado semelhante ao MEEM, era analisado de forma mais precisa e completa. Essa pesquisa durou em média 30 semanas, sendo que os pacientes em teste que apresentavam melhoras cognitivas, eram aqueles que ingeriram doses maiores. No entanto, foi destacado abandono ao tratamento antes das 30 semanas na maioria dos pacientes que tomaram doses maiores. Mesmo apresentando um resultado positivo no início do tratamento, os efeitos colaterais foram maiores, evidenciando o abandono a esse fármaco.

De acordo com Qizilbash (1998), dosagens maiores desse fármaco podem causar efeitos colaterais, caracterizada por náusea, vômito grave, salivação, sudorese, bradicardia, hipotensão, colapso e convulsões. O aumento da fraqueza muscular é uma possibilidade e pode resultar em morte se os músculos respiratórios estiverem envolvidos. Dessa forma, percebeu a necessidade de utilizar doses menores para controle do tratamento da doença de Alzheimer leve e moderada. Por outro lado, Minett e Bertolucci (2000) afirmam que a inibição pode acontecer de forma reversível, levando a necessidade de doses altas diariamente no período do tratamento da doença.

## Donepezil

O Donepezil foi o segundo fármaco aprovada no tratamento da doença de Alzheimer, é um inibidor reversível da AChE em 1996. (MINETT E BERTOLUCCI, 2000) O desenvolvimento desse medicamento se deu por Rogers e col. (1996). A pesquisa publicada demonstrava características melhores que a Tacrina, como: o tempo de meia-vida 70 horas comparando-se a Tacrina (3,5 horas) e doses entre 5 e 10 mg por dia. Esse medicamento anticolinesterases, mostrando-se eficiente no tratamento da doença, tornando-se mais confiante com o passar dos anos, devido às novas pesquisas que eram desenvolvidas por Rogers e col (1998).

A pesquisa realizada por Rogers e col (1998) foi no período de 24 semanas com pacientes que tomavam da dose do placebo do fármaco Donepezil (entre 5 e 10 mg por dia) e observaram a evolução desse medicamento através dos índices de Escala de Avaliação da doença de Alzheimer – Subscore Cognitivo (*Alzheimer's Disease Assessment Scale – cognitive*

*section* – ADAS-Cog e MEEM. Os estudiosos perceberam que, mesmo os pacientes apresentando melhoras comparado ao placebo, as mudanças eram mínimas entre as doses diárias que eram aplicadas.

Ademais, eles mostraram que o medicamento não tem capacidade de diminuir a evolução da doença. Os efeitos colaterais foram identificados em pacientes que tomaram a maior dosagem no período de estudo, apresentando sintomas, como: diarreia, náuseas, vômito, câimbras e entre outros que são aceitáveis no início do tratamento. Posteriormente, esses sintomas são minimizados com o progresso no tratamento. Esse fármaco apresentou aceitação dos pacientes, comparado a Tacrina no período de análise. A melhor dosagem é de 5 mg/dia considerando que de 10 mg/dia regride os efeitos da doença num período maior de 40 semanas.

### Rivastigmina

Considerada como uma pseudo-irreversível, a Rivastigmina é um fármaco que pode trazer resultados significativos no tratamento da doença de Alzheimer. Estudos realizados por Higgins e Flicker (2000) apontam que há resultados significativos entre doses de 6mg/dia à 12mg/dia no período de 26 semanas de análises. Essa comprovação realizada por Higgins e Flicker demonstrou que o índices de ADAS-cog apresentava bons resultados comparado ao grupo placebo.

No entanto, a pesquisa demonstrava um aumento de pacientes que apresentavam efeitos colaterais, sendo eles: náusea, diarreia, vômito, anorexia, dores abdominais, tonturas e entre outros sintomas que eram identificados principalmente em pessoas que ingeriam uma dosagem maior do medicamento, comparando-se com o grupo placebo, de acordo com Flicker (2000). Por outro lado, já existem evidências que doses menores podem influenciar no efeito colateral.

### Galantamina

A Galantamina é o fármaco com atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase, caracterizada por ser competitiva e rapidamente reversível durante o tratamento da doença de Alzheimer, segundo Wallin *et al.*, (2011). Essa pesquisa foi desenvolvida no período de 6 meses com pacientes que apresentavam a doença como principal sintoma.

Vale e colaboradores (2011) detalham a Galantamina como um fármaco que beneficia o paciente com a doença, pois se caracteriza por apresentar melhorias na atividade cognitiva utilizando doses diárias de 16mg a 24mg - mesmo apresentando variação dessas doses no organismo - conforme estudos relacionados por índices ADAS-Cog e MEEM, com tempo de meia-vida de 7 horas.

### Fisostigmina

A Fisostigmina é um inibidor da AChE podendo ser considerado reversível e tem apresentado bons resultados no tratamento da demência, de conformidade com Coelho (2008). Esse pesquisador percebeu uma relação de melhora cognitiva em pacientes com a doença. No entanto, apresenta alguns efeitos negativos como náuseas, vômitos e diarreia.

Em um estudo realizado por Christopher (2000), são apresentados resultados de que a Fisostigmina potencializa efeitos de inibição a AChE, num período de 6 semanas com doses de 18 mg/dia, 24 mg/dia e 30 mg/dia comparando-se ao grupo placebo. Mesmo potencializando o efeito do fármaco, segundo o índice ADAS-Cog e MEEM, grandes quantidades podem ocasionar efeitos colaterais, isso é provado principalmente em pacientes que recebem maior dosagem desse medicamento.

### Memantina

A Memantina é um fármaco utilizado para tratamento da doença de Alzheimer em estágio mais avançado, demonstrando eficácia a partir de ensaios clínicos aleatórios. Esse medicamento tem como função bloquear os receptores específicos no estágio de repouso e, em condições fisiológicas, é deslocada pelo glutamato do seu local de ligação. Porém, em situações patológicas, Memantina permanece ligada aos receptores, evitando a ativação excitotóxica glutamatérgica e prevenindo o influxo excessivo de cálcio para o neurônio. (FORLENZA, 2005).

A Memantina é absorvida de forma completa por via oral e sua meia-vida é considerada longa, entre o período de 60 – 80 horas. Como a sua eliminação é renal e a metabolização hepática é mínima, ocorre pouca interação medicamentosa e apresenta boa tolerabilidade

quanto aos efeitos colaterais, como: agitação, diarreia, ansiedade, insônia, desorientação, alucinações, vômito, cansaço, hipertonia e tontura.

Um corte prospectivo demonstrou que a associação de Memantina com AChE é mais eficaz em pacientes com a doença moderada à grave do que a monoterapia com os inibidores das colinesterases. Na DA leve à moderada, o uso de Memantina em monoterapia ou em associação com os AChE revelam resultados conflitantes, portanto, não há base científica para a terapia com Memantina nos estágios iniciais da doença (VALE et al., 2011).

A dosagem recomendada para a Memantina é 10 mg duas vezes ao dia. Alguns estudos já comprovaram a segurança e a tolerabilidade da administração de 20 mg uma vez ao dia contribuindo para a adesão do paciente ao tratamento. (ARAÚJO, PONDÉ, 2006). Em Junho de 2010, a FDA aprovou nos EUA a Memantina ER, que fornece uma única dose de 28 mg ação prolongada.



## **OBJETIVO GERAL**

Quantificar o grau energético na interação *in silico* as propriedades de interação dos inibidores, Tacrina, Donepezil, Rivastigmina, Galantamina, Fisostigmina e Memantina, com a Acetilcolinesterase.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Analisar as estruturas tridimensionais de dois receptores da Acetilcolinesterase (AChE) 1EA5 e 1GQR e seu sítio ativo.
- Verificar, na literatura, possíveis receptores para modelagem molecular;
- Executar simulações de ancoragem molecular e gerar complexos proteína-ligantes e/ou proteína-proteína.
- Analisar os resultados dos *dockings* com auxílio do programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD) e o *Discovery Studio* (DS);
- Quantificar as energias individuais de cada aminoácido da 1EA5 e 1GQR em interação com os ligantes propostos;
- Quantificar as energias de interações a nível quântico, entre os possíveis inibidores e os resíduos do sítio ativo da proteína.

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A doença de Alzheimer (DA) é complexa e crescente com o passar dos anos, em virtude do aumento do aumento da idade e a hereditariedade/genética.

### DOENÇA DO ALZHEIMER

A população mundial tem crescido absurdamente, a expectativa de vida tem aumentado e, conseqüentemente, o número de pessoas com idade avançada também. Com relação a *World Alzheimer Report*, em 2010, em todo mundo foram gastos aproximadamente US\$ 604 bilhões com cuidados a pacientes com demência. Os gastos com cuidados informais (cuidados familiares e perda de oportunidade de trabalho) contribuem com grande parcela desse valor, enquanto os gastos relativos a cuidados médicos são bem menos expressivos (WIMO & PRINCE, 2010).

No Brasil, o envelhecimento populacional vem crescente nos últimos anos. No ano de 2010, especificamente, 7,4% da população brasileira estava entre 65 anos e/ou acima dessa idade, ou seja, mais de 14 milhões de pessoas estão dentro dessa faixa etária (IBGE, 2011). Estudos realizados pelo Viegas e colaboradores (2009) afirma que a probabilidade é de crescimento de 30% até 2030, já em 2050, a probabilidade é que o número de pessoas idosas aumente o dobro do esperado, o que destaca aproximadamente 64 milhões de brasileiros idosos.

Estudos realizados por Ferri e colaboradores (2005) e Prince (2007) afirmaram que 24 milhões de pessoas apresentaram alguma demência por todo o mundo, sendo a doença do Alzheimer a mais característica e comum nesse período. Por isso, a importância de terapias no tratamento de pacientes com doenças neurodegenerativas é encontrar um fator neuroprotetor, com intuito de reduzir ou inativar a proliferação da enzima AChE, resultando no avanço do tratamento da doença DA. A intenção de melhorar a inibição dessa enzima AChE é o desenvolvimento de processos sobre melhoramento dos fármacos, inovando, diminuindo os efeitos colaterais, reduzir os custos nos pacientes portadores dessa doença.

## ACETILCOLINESTERASE (AChE)

A acetilcolinesterase é uma enzima pertencente as colinesterases, estando envolvida na transmissão colinérgica e sua deficiência é considerada uma das principais hipóteses da patogênese da DA. (FALCO et al., 2016) Por causa disso, o tratamento da DA é baseado principalmente na monoterapia com fármacos anticolinérgicos com seletividade para AChE (ex.: Donezepila e Galantamina). (NAJAFI et al., 2017)

Com a resolução da estrutura tridimensional da AChE de *Torpedo California* em 1991 por Sussman e seus colaboradores (SUSSMAN, J.L. et al., 1991) (Figura 1), novos horizontes em pesquisa com esta enzima foram abertos e desde então a AChE tem sido alvo de intensas investigações.

Figura 1. Monômero de acetilcolinesterase: uma proteína que contém 537 aminoácidos.



Fonte: (SUSSMAN, J.L. et al., 1991)

Estruturas cristalográficas da acetilcolinesterase são derivadas de 5 espécies, dessas, existem 97 estruturas, até o presente momento. São elas: Humana, *Drosophila*, hérguia elétrica, *torpedo californica*, e Rato;

As 97 estruturas das AChE, 55 são do *Torpedo californica*, a maioria dos fármacos que são aprovados no tratamento da doença do alzheimer (DA) e que estão relacionadas a AChE utilizam a enzima do *torpedo californica*. (KAMAU; MUSTATA, 2007)

A enzima AChE tem como função catálise rápida e o rompimento da acetilcolina. Conseqüentemente, a ACh é destruída, desativando o neurotransmissor após sua ligação com o receptor, inibindo a produção de estímulos contínuos por interações repetitivas. (ALMEIDA, 2011)

O sítio ativo AChE é composto por dois subsítios, sendo um esteárico e outro de ligação de colina que se ligam ao grupo carbonílico e amônia quartenário da ACh. Existe ainda um segundo sítio ativo de colina, chamado de periférico, assim por está distante do sítio ativo. A estrutura tridimensional do AChE de *Torpedo californica* (Tc) o sítio ativo está localizado na porção interior na cavidade estreita e profunda, denominada cavidade aromática, composta por mais de 50% do volume por anéis aromáticos de resíduos de aminoácidos. (ALMEIDA, 2011)

No sítio ativo da enzima AChE os aminoácidos Ser200, His440 e Glu327 são destacados como essenciais para atividade catalítica enzimática, sendo considerada a tríade catalítica da AChE. (HAREL et al., 1993)

O sítio ativo desta enzima está “enterrado” próximo de uma profunda e estreita cavidade, o que era imprevisível dado à alta velocidade de reação da mesma. Esta cavidade é cercada por 14 resíduos aromáticos conservados, onde os anéis de cada um deles compõem, aproximadamente, 70% da superfície da cavidade, com Trp84 e Phe330 contribuindo para o chamado sítio catalítico aniônico e Tyr70, Tyr121 e Trp279 contribuindo para o sítio periférico aniônico.

## **BIOQUÍMICA COMPUTACIONAL**

A bioquímica computacional pode ser considerada uma ferramenta que se aplica as diversas áreas das ciências, como: Física, Química, Biologia e Matemática. Essa ferramenta prevê através de cálculos estatísticos simulações *in silico* a partir de sistemas biológicos que

são de extrema importância para compreensão de problemáticas envolvendo áreas da saúde, farmacologia, agricultura e entre outros sistemas bioquímicos.

Os softwares que são utilizados para análises desses sistemas, são baseados em equações físicas e químicas envolvendo principalmente física clássica e quântica com intuito de investigar as melhores estruturas moleculares para desenvolvimento de uma simulação que indique ação positivo no meio ambiente.

Em conformidade com Matta (2010) e Mota (2016) é possível gerar um modelo molecular de um meio fisiológico e a partir disso gerar resultados e receber informações acerca da geometria (Ângulos de torção e ligação, Comprimento de ligação), energia (Energia de ligação), propriedades espectroscópicas (modo de agitação), propriedades eletrônicas (afinidade eletrônica, potencial de ionização, momento dipolo), além de outras informações como volume, superfície, densidade, ionização.

O estudo entre as interações de proteína-ligante ou proteína-proteína fazem parte da bioquímica computacional. A necessidade de analisar os sítios ativos e observar a energia de interação com os possíveis ligantes (fármacos) e a proteína (receptor) pode-se caracterizar-se uma análise teórica por modelagem molecular. Sabendo a contribuição de softwares que podem auxiliar e gerar resultados economicamente viáveis, a partir da compreensão dos sistemas biológicos, como também o planejamento de novas drogas farmacológicas. (VERLI; BARREIRO, 2005) Nesse contexto, o estudo de novas drogas por intermédio de estruturas tridimensionais podem ser caracterizadas por diferentes métodos: Ressonância magnética nuclear, difração de raio-x ou por modelagem molecular. (HENNING; SATTLER, 2014) As categorias que estão no método de docking molecular são: métodos semi-empíricos, *ab initio* - *Método de Francionamento Molecular de Caps conjugados* (MFCC) ou modelagem molecular (Docking molecular). (MOTA, 2016)

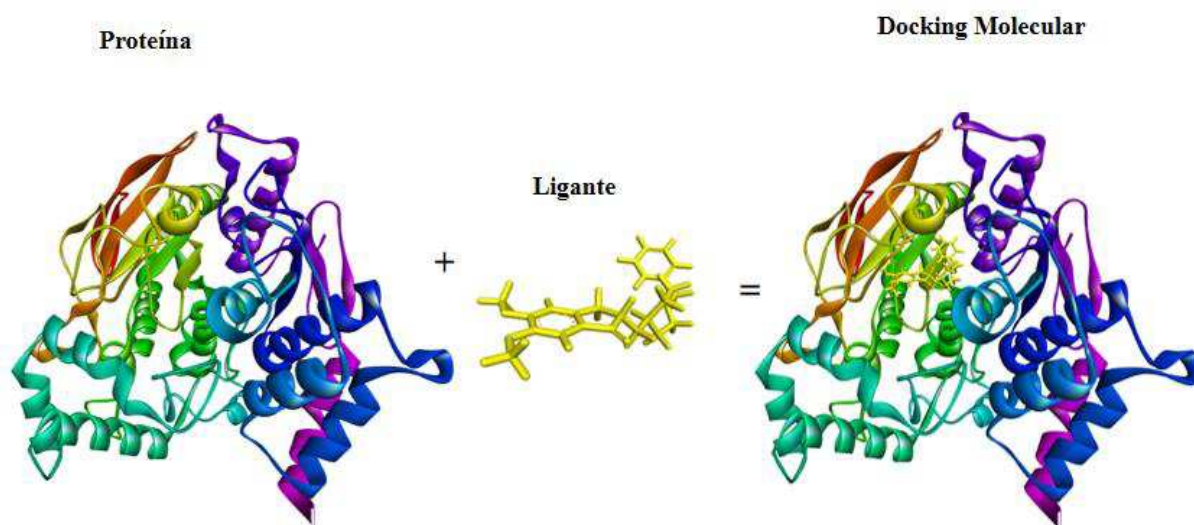
## **DOCKING MOLECULAR**

O Docking Molecular ou ancoragem molecular ou também conhecido como atracamento molecular é conhecido por ser um procedimento *in silico*, um análise teórica a respeito de simulação entre a interação de duas moléculas resultando em uma interação de proteína-ligante ou proteína-proteína. (VERLI, 2014)

Emil Fischer 1984 descreveu o *docking molecular* como um modelo chave-fechadura. Nesse modelo, o receptor (proteína) é considerada como “fechadura” e o sítio ativo é idealizado como o “buraco da fechadura” e o ligante a “chave” da fechadura.

O modelo de complexo molecular permite compreensão acerca das propriedades físico-químicas e suas interações energéticas, além disso, considera características de afinidade eletrônica, interações intermoleculares entre o ligante e a proteína e suas especificidades como complexo.

Figura 2. Representação do modelo proteína-ligante na modelagem molecular.



**Fonte:** Dados da pesquisa, *Software Discovery Studio* 2020.

## TEORIA DO FUNCIONAL DA DENSIDADE

Os métodos aproximados de Hartree-Fock, demonstra solução na equação de Schrödinger para sistemas de muitos corpos independente do tempo que retorna da função da onda total com coordenadas espaciais ( $3N_e$ ) e coordenadas de spins ( $N_e$ ). Com isso, depende muito da quantidade de elétrons da molécula a ser estudada, podendo-se obter maior tempo e demanda computacional. Levando em consideração a alta demanda de informações desses dados, interpretando-os fisicamente grande dificuldade. (OLIVEIRA, 2018)

Com intuito de resolver essa problemática os pesquisadores Walter Kohn e Pierre Hohenberg no século XX desenvolveram a Teoria do Funcional da Densidade (do inglês, *Density Functional Theory*, ou simplesmente DFT) faz parte da mecânica quântica que estuda sistemas de elétrons interagentes no estado fundamental por meio da densidade eletrônica na

química quântica e na física no estado sólido.(SOUSA, 2015) A eficiência desse método tem como base o baixo custo computacional atrelado as aproximações comparadas a experimentação. (DIAS, 2015)

## **DENSIDADE ELETRÔNICA**

Na mecânica quântica, a densidade eletrônica é uma medida da probabilidade de um elétron ocupar um elemento infinitesimal do espaço ao redor de qualquer ponto. (BATISTA; GRANATO; ANGELOTTI, 2016; FRAZÃO et al., 2012). Essa densidade é definida com a função de onda. A densidade determina o módulo da função de onda como um fator de fase, fornecendo a base formal da teoria do funcional da densidade (DUARTE, 2001; KATO, 1957).

## **OPERADOR DE DENSIDADE**

Nos postulados da mecânica quântica são evidenciados para os estados puros tratados em sistemas fechados. Por outro lado, em sistemas abertos os estados são mistos refere-se aos estados quânticos por superposição não-linear. Para medição do  $\hat{O}$  qualquer não é possível determinar o estado específico que o sistema adquire, mas a probabilidade  $\pi$  dele encontrar uma função de onda. Os valores determinados serão calculados pela média ponderada das probabilidades  $\pi$ . (HUANG, 1963)

## **TEOREMAS DE HOHENBERG-KOHN**

Thomas e Fermi foram os primeiros estudiosos que trataram sistemas multieletrônicos através da densidade eletrônica. Esse modelo (Thomas-Fermi) apesar de não conseguir explicar de forma satisfatória as moléculas, desconsidera a energia de troca e de correlação. A solução dessa problemática foi solucionada quando Hohenberg e Kohn apresentaram dois teoremas, no ano de 1964, que destacava a energia do estado fundamental é um funcional da densidade eletrônica. (HOHENBERG; KOHN, 1964)

**1° Teorema de Hohenberg-Kohn:** *O potencial externo  $V_{ext}(\vec{r})$  de um sistema de partículas interagentes é determinado univocamente pela densidade do estado fundamental  $\rho_0(\vec{r})$  do sistema, a menos de uma constante (HOHENBERG; KOHN, 1964).*

Esse primeiro teorema deixa estabelecido que a densidade de carga do estado fundamental de um sistema multieletrônico é determinado de maneira unívoca, a menos de uma constante aditiva, a partir do potencial externo.

**2° Teorema de Hohenberg-Kohn:** *Um funcional universal para a energia  $E[\rho(\vec{r})]$  em termos da densidade  $\rho(\vec{r})$  pode ser definido, valendo para qualquer potencial externo  $V_{ext}(\vec{r})$  particular, como a energia exata do estado fundamental, quando o valor mínimo global desse funcional e também a densidade  $\rho(\vec{r})$  que minimiza o funcional é a densidade exata do estado fundamental (HOHENBERG; KOHN, 1964).*

A energia do estado fundamental de um sistema de vários elétrons sob um determinado potencial externo  $V_{ext}(\vec{r})$ , pode ser descrita com

$$E[\rho(\vec{r})] = \int V_{ext}(\vec{r}) \rho(\vec{r}) d\vec{r} + F[\rho] \quad (1.0)$$

Onde  $F[\rho]$  é o funcional universal de  $\rho$ , que independe do potencial externo.

Com este teorema tornasse possível o uso do princípio variacional para determinar a densidade do estado fundamental. Embora existam várias possibilidades para a densidade eletrônica, a determinação ocorre por minimização, onde ao encontrar a densidade para qual a energia é mínima, encontra-se a densidade do estado fundamental (BATISTA; GRANATO; ANGELOTTI, 2016; DUARTE, 2001).

## O GRANDE ANSATZ E O FORMALISMO DE KOHN-SHAM

Hohenberg e Kohn consideravam que os elétrons eram partículas que interagem entre si de forma natural. Por outro lado, no ano de 1965, dois estudiosos chamados Walter Kohn e Lu Jeu Sham. O grande Ansatz por eles, afirmava que a densidade eletrônica para o estado fundamental em um sistema não-interagente é exatamente a mesma em um sistema interagente que é denominado o grande ansatz de Kohn-Sham. (GOMES, 2018; SOUSA, 2015)

## EQUAÇÃO DE KOHN-SHAM

A equação de Kohn-Sham pode ser vista como sendo a equação de Schrödinger para um sistema fictício composto de partículas não interagentes, gerando uma densidade eletrônica semelhante à do sistema real, originalmente composto pelas partículas reais interagentes



(KOHN; SHAM, 1965; STEINMANN, 1960; HAOYU, 2016). Para que isso ocorra é necessário inserirmos um potencial externo  $v_s(\vec{r})$ . Partindo do ponto que a densidade resultante deve ser igual a densidade do estado fundamental, chegamos as equações 1.1 e 1.2, denominado de equações de Kohn-Sham:

$$\left( -\frac{1}{2}\nabla^2 + \left[ v(\vec{r}) + \int \frac{\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d^3r' + \frac{\delta E_{xc}[\rho]}{\delta \rho} \right] \right) \psi_i = \epsilon_i \psi_i \quad (1.1)$$

Ou

$$\left( -\frac{1}{2}\nabla^2 + v_{ef}(\vec{r}) \right) \psi_i = \epsilon_i \psi_i \quad i = 1, 2, \dots, N. \quad (1.2)$$

Os orbitais de Kohn-Sham descrevem as funções de ondas espaciais do sistema auxiliar não interagente e portanto, não possui significado físico intrínseco, pois formam ferramenta capaz de determinar o estado fundamental do sistema real. No entanto, tais orbitais apresentam semelhanças com os de Hatree-Fock tornando-se possível considerar qualitativas sobre as propriedades moleculares. (CAETANO, 2005)

## FUNCIONAL DE TROCA E CORRELAÇÃO

Para a utilização das equações do Kohn-Sham, se faz necessário determinamos um funcional que determine os termos de troca e correlação. O funcional de troca e correlação está associado as interações entre elétrons. Existem algumas aproximações para encontramos esse potencial, como: Aproximação da Densidade Local (LDA) (do inglês, *Local Density Approximation*), Aproximação do Gradiente Generalizado (GGA) (do inglês, *Generalized Gradient Approximation*). Nesse trabalho utilizaremos o LDA por apresentar melhor resultado em pequenas estruturas biológicas (DA COSTA et al., 2012).

**Aproximação da Densidade Local:** O LDA é a aproximação mais fundamental e simples, no qual a energia depende da densidade da região avaliada. Dentro dessa aproximação é considerado a energia de troca e correlação de um sistema como sendo de um gás de elétrons

uniformes de igual densidade (KOHN; SHAM, 1965; PERDEW; ZUNGER, 1981). Essa aproximação é conhecida na literatura como LDA-PWC (PEDROZA, 2016).

**Aproximação do Gradiente Generalizado:** O GGA usa um tipo de abordagem mais complexa que o LDA, pois faz uso do gradiente incorporado a densidade. Sendo assim, a densidade eletrônica não é mais constante (PERDEW; BURKE; ERNZERHOF, 1996, 1998).

## MÉTODO AB INITIO

O método *ab initio* significa “*a partir do início*” no latim, tem como base a mecânica quântica com alta precisão e especificidade, determinando massas e cargas de elétrons, núcleos atômicos, considerando que mesmo apresentando resultados teóricos, podem ser comparados com os dados experimentais, devido sua excelente análise. Esse estudo verifica a estrutura tridimensional de uma proteína a partir de uma sequência de aminoácidos ligados a um estado mínimo de energia, ou seja, seguindo a tendência de estabilidade, por isso, é necessário encontra-se no nível mínimo de interação energética total.

## MÉTODO DE FRACIONAMENTO MOLECULAR COM CAPS CONJUGADOS (MFCC)

A necessidade de desenvolver técnicas com alta precisão e eficácia considerando o sistema biológico é de suma importância, considerando a grande quantidade de átomos é possível afirmar que apenas a mecânica quântica torna-se inacessível para análise detalhada sobre a interação de energias em sistemas proteicos (MOTA, 2016). O estudo de MFCC permite demonstrar a interação dos resíduos de aminoácidos com o receptor, observando-se o grau energético entre um complexo estável.

Em consonância com Mota e colaboradores (2016) cálculos de primeiro princípios desenvolvem técnicas *ab initio* com eficácia e precisão para energias de interação entre uma proteína em uma molécula. Esse método considera a divisão da estrutura tridimensional da molécula em grupos de aminoácidos, resultando em calcular a interação de energia entre duas moléculas sendo uma proteína e outro composto (ligante pequeno).

O complexo (proteína-ligante) é subdividido em partes menores, mantendo-se a molécula sem alterações estruturais, alguns aminoácidos vizinhos (CAPS) e suas ligações peptídicas são mantidas no complexo. (ZHANG, 2003) Essas pequenas partes (fragmentos) podem ser otimizados e analisados, processando um cálculo de métodos quânticos de alta precisão e eficácia nos resultados de energia proteína-ligante por intermédio de pequenos fragmentos analisados e o nível de energia de cada aminoácido interagindo com o complexo.

$$E_i(R_i \rightarrow L) = (R_{i-1}R_iR_{i+1} + L) - (R_{i-1}R_iR_{i+1}) - (R_{i-1}R_{i+1} + L) + (R_{i-1}R_{i+1}) \quad (1.3)$$

## **METODOLOGIA**

Metodologicamente, foi realizado o *Docking Molecular* e o Método de Fracionamento com Capuzes Conjugados (MFCC), considerando estruturas moleculares extraídas de bancos de dados certificados (*DrugBank* e *Protein Data Bank*)

## **ESTRUTURA DA ACETILCOLINESTERASE 1EA5**

A estrutura da enzima acetilcolinesterase foram obtidas no banco de dados PDB - *Protein Data Bank* por meio do código de acesso 1EA5 (DVIR, H. et al., 2000). A estrutura (Figura 3) foi analisada a partir da visualização pelo ACETILCOLINESTERASE NATIVA (EC 3.1.1.7) DA *TORPEDO CALIFORNICA* em resolução 1.8 Å.

Figura 3. Visualização da enzima ACETILCOLINESTERASE NATIVA (EC 3.1.1.7) DA TORPEDO CALIFORNICA em resolução 1.8 Å.



Fonte: *Protein Data Bank* - PDB.

### **ESTRUTURA DA ACETILCOLINESTERASE 1GQR**

A estrutura da enzima acetilcolinesterase foram obtidas no banco de dados PDB - Protein Data Bank por meio do código de acesso 1GQR (BAR-ON et al., 2002). A estrutura foi analisada a partir da visualização desse receptor, com classificação: *Hydrolase*; Organismo: *Tretornace Californica*; sem mutações; ACETILCOLINESTERASE NATIVA (EC 3.1.1.7) DA *TORPEDO CALIFORNICA* em resolução 2.2Å. Ano 2002. Depositada: 04.12.2001 e Lançada: 15.03.2002.

Figura 4. Visualização da enzima ACETILCOLINESTERASE NATIVA (EC 3.1.1.7) DA TORPEDO CALIFORNICA em resolução 2.2 Å.



Fonte: *Protein Data Bank*, 2020.

## SELEÇÃO DE MOLÉCULAS

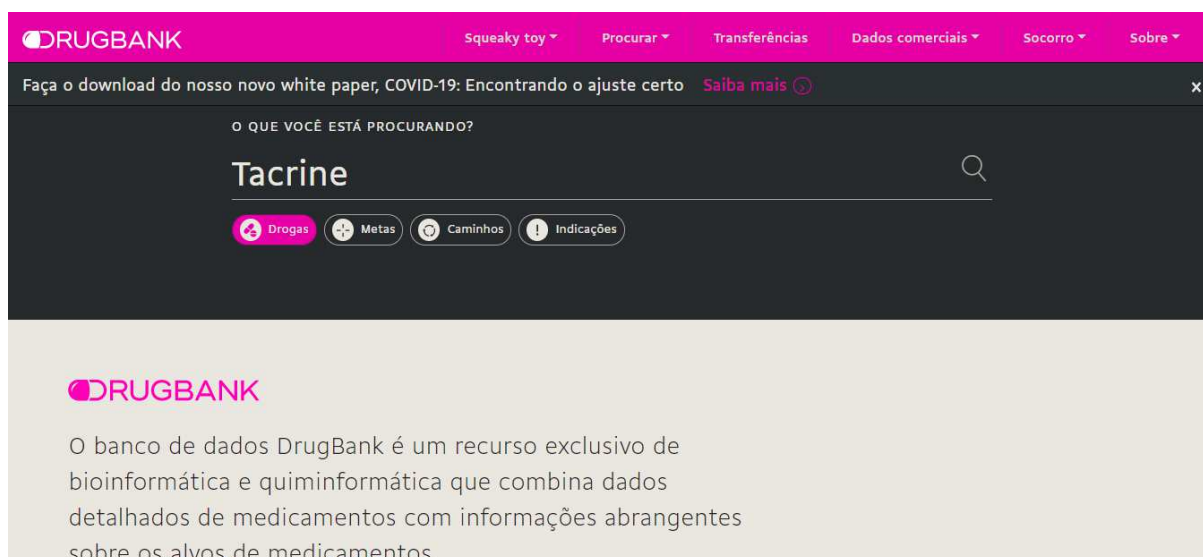
As moléculas foram obtidas a partir de uma pesquisa bibliográfica entre os principais fármacos que podem a vir demonstrar a melhores conformações geométricas e bons resultados por meio da simulação computacional dos ligantes dessas moléculas.

No que se refere a estrutura da molécula, foram realizadas análises em um banco de pesquisa de pequenas moléculas a serem analisadas e testadas visualmente pelo programa *Discovery Studio*.

## DRUGBANK

O *DrugBank* é uma plataforma da bioinformática que fornece informações detalhadas das estruturas de moléculas tridimensionais. Esses fármacos apresentam características de modo geral a respeito da droga, sejam elas informações químicas, físicas, farmacêuticas ou farmacológica. Os arquivos de entrada utilizados no *DMol<sup>3</sup>* (arquivos extensão.mol) que efetuamos os cálculos com as moléculas foram extraídos do *DrugBank* (<http://www.drugbank.ca>). Cada entrada de dados no *DrugBank* contém mais de 200 campos de dados a serem editados, com metade da informação dedicada a dados de drogas/química e a outra metade dedicada a droga alvo ou dados de proteína. A última versão do *DrugBank* (versão 5.1.5, lançada em 2020-01-03) contém 13.528 entradas de medicamentos, incluindo 2.632 medicamentos aprovados para pequenas moléculas, 1.371 produtos biológicos aprovados (proteínas, peptídeos, vacinas e alergênicos). (DRUGBANK, 2020).

Figura 5. Interface do site DrugBank (disponível em, [www.drugbank.ca/](http://www.drugbank.ca/), acessado em 12 de fevereiro de 2020).



Fonte: *DrugBank*, 2020.

Tabela 1. Informações básicas a respeito das moléculas testadas

Droga	Número de acesso	Fórmula	Massa g/mol	Meia-vida
<b>Tacrina</b>	<b>DB00382</b> (APRD00690)	$C_{13}H_{14}N_2$	198,26	2-4 horas
<b>Rivastigmina</b>	<b>DB00989</b> (APRD00321)	$C_{14}H_{22}N_2O_2$	250,33	1,5 horas
<b>Galantamina</b>	<b>DB00674</b> (APRD00206)	$C_{17}H_{21}NO_3$	287,35	7 horas
<b>Fisostigmina</b>	<b>DB00981</b> (APRD00406)	$C_{15}H_{21}N_3O_2$	275,34	0,5 horas
<b>Donepezil</b>	<b>DB00843</b> (APRD00039)	$C_{24}H_{29}NO_3$	379,49	70 horas
<b>Memantina</b>	<b>DB001043</b> (APRB001517)	$C_{12}H_{24}N$	179,30	60 horas

Fonte: *DrugBank*, 2020.

## PROTEIN DATA BANK

O *Protein Data Bank* é um banco de dados que fornece estruturas de moléculas tridimensionais juntamente com diversas informações acerca das características físico-químicas. A estrutura da molécula da acetilcolinesterase (receptor) 1EA5 do gênero *Californica torpedo*. Essa plataforma oferece diversas informações acerca de proteínas estruturais para obtenção de pesquisas *in silico*.

Figura 6. Interface do site *Protein Data Bank* (disponível em, [www.rcsb.org/](http://www.rcsb.org/), acessado em 13 de Março de 2020).

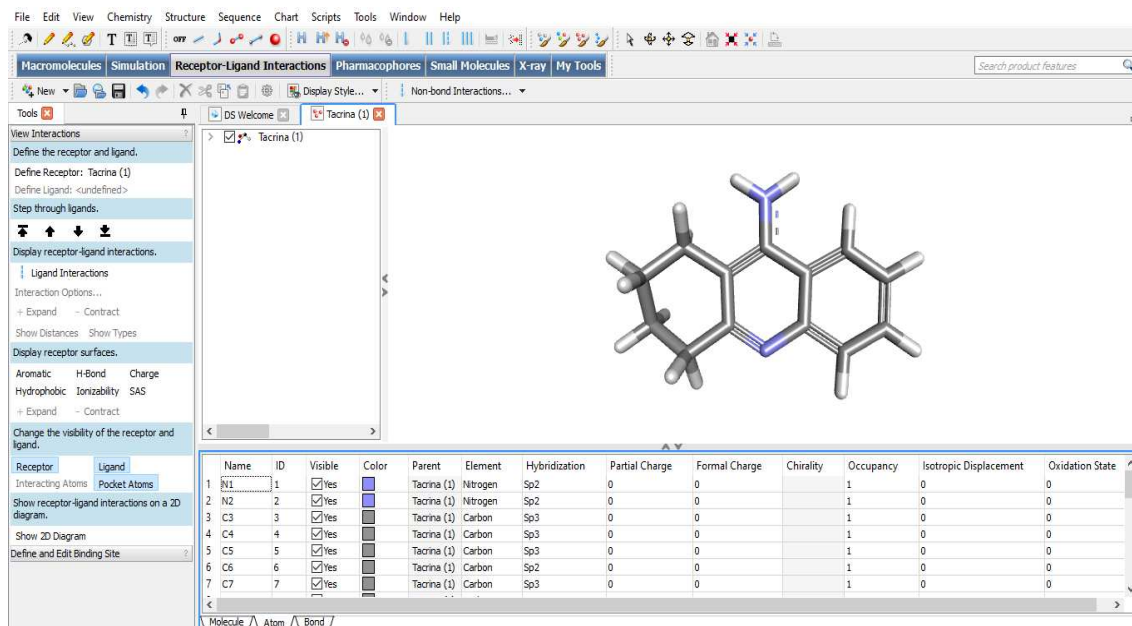
Fonte: Acesso em <<https://www.rcsb.org/>> Disponível: 13 de março de 2020.



## DISCOVERY STUDIO

O *Discovery Studio* é um software com várias funções, ferramenta que permite fazer simulação de sistemas de pequenas moléculas e macromoléculas (Figura 6). Foi desenvolvido pela *Accelrys* e sua última versão (versão 2017 R2, lançada em 30/08/2016) conta com várias ferramentas, como: *macromolecules tools* (trabalha com sequências e estruturas de proteínas, bem como sequências e estruturas de nucleotídeos), *simulation tools* (prepara e executa simulações em sistemas moleculares e analisar os resultados, podendo ser aplicado na molécula trabalhos com campos de força), *receptor-ligand interaction tools* (prepara e analisa os locais de ligação do receptor, ligantes e fragmentos de docking e análise dos resultados do docking), *pharmacophores tools* (as várias ferramentas que compõem podem ser usadas para construir modelos de farmacóforo a partir de um ligante, receptor ou complexo receptor-ligante, também pode ser utilizado para analisar as interações farmacóforo-ligante, construindo e editando características do farmacóforo), *small molecules tools* (é utilizado em tarefas envolvidas no trabalho com dados de ligantes, essa ferramenta também pode ser utilizada para esboçar ligantes, ionizar ligantes, minimizar energia, gerar e analisar conformações), *X-ray tools* (essa ferramenta constrói, edita e refina estruturas proteínas a parti do mapa de densidade eletrônica, determinado por experimentos de difração de *raio-X*, esse ferramental também é utilizado para verificar se existe alguma anomalia na estrutura proteica) (LIPINSKI; LOMBARDO; W. DOMINY, 1997; *Discovery Studios*, 2016).

Figura 7. Interface do software *Discovery Studios 2017 R2*.



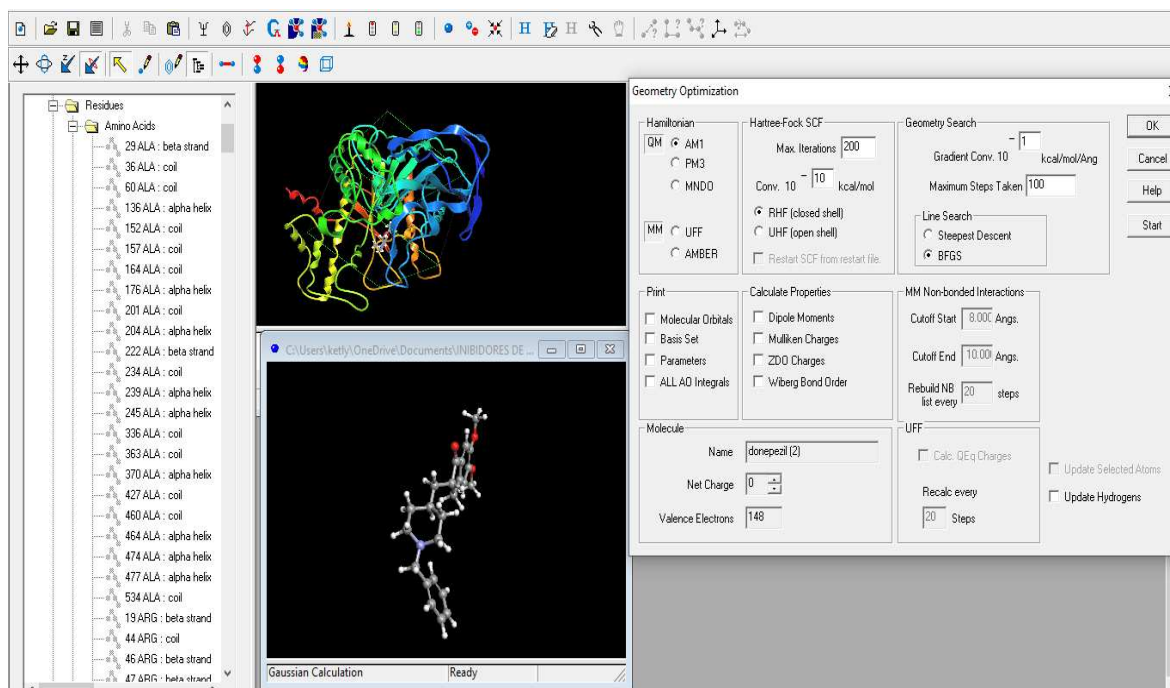
Fonte: *Discovery Studios*, 2020.

## ARGUSLAB®

O *ArgusLab* é um software gratuito, permite fazer visualização e análises de estruturas químicas (compostos). Para isso, utiliza-se algoritmo genérico para explorar a simulação (*in silico*) da interação de proteína-ligante ou proteína-proteína. Dessa forma, a modelagem molecular utiliza-se *input* dos arquivos no formato .PDB e conformações estruturais de menor energia de ligação (kcal/mol). (THOMPSON; MARK A., 1996).

A última versão (*ArgusLab*)® 3.0, lançada em 18/06/1997) apresenta um kit ferramental, como: *molecule builder* (permite construir novas moléculas e modificar as moléculas existentes, com essa ferramenta é possível adicionar, excluir e ocultar hidrogênios, cortar, copiar, colar, adicionar fragmentos de compostos uma sua biblioteca, alterar as propriedades de um átomo, como modo de renderização, ordem de ligação), *calculations* (uma das partes mais importante do software, com essa ferramenta é possível realizar cálculos de: *single-point energy*, *electronic spectra*, *optimize geometry*, *gaussian*, *docking*, além de poder analisar todos os input) (HUMKEY, PURVIS; THOMPSON; RICHARDS, 2005; *ArgusLab*®, 1999).

Figura 8. Interface do software ArgusLab® 3.0



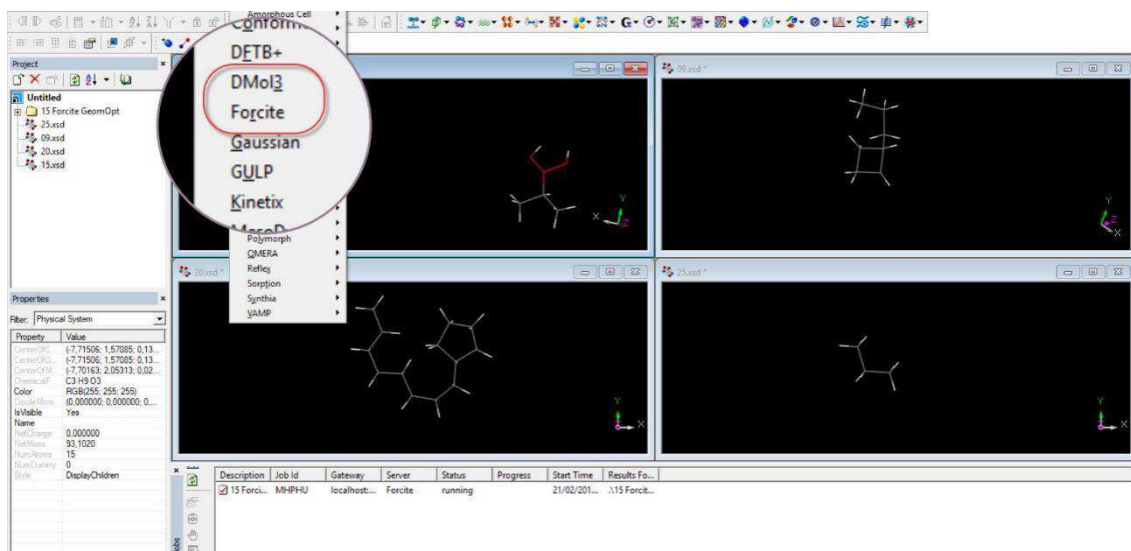
Fonte: ArgusLab®, 2020.

## MATERIALS STUDIO

O *Materials Studio 8.0* é utilizado para realização de cálculos de maior precisão, os cálculos realizados foram das propriedades, como: eletrônicas, ópticas, vibracionais e energia de absorção. Nesse software é possível encontrar diversos módulos, como: *amorphous cell* (esse módulo fornece diversas ferramentas para a construção de estruturas periódicas tridimensionais de líquidos moleculares e sistemas poliméricos), *blends* (essa ferramenta é utilizada para estimar a energia livre de misturas entre os componentes, como: solventes-solvente, polímero-solvente, entre outros), *CASTEP* (é um módulo baseado em mecânica quântica, projetado para pesquisadores da área de ciência dos materiais em estado sólido), *gaussian®* (esse módulo permite acesso ao servidor Gaussian 03 ou Gaussian 09 para modelar a estrutura e a energia das moléculas usando métodos Hartree-Fock e Teoria do Funcional de Densidade(DFT)), *forcite* (um ferramental que permite analisar um ampla quantidade de sistemas, a sua principal aproximação é que a superfície de energia potencial no qual os núcleos atômicos se movem, podem ser descritos por um campo de força clássico), *Dmol3* (Figura 10) (esse módulo permite modelar a estrutura eletrônica e energética das moléculas, fazendo uso da DFT, resultando em

resultados altamente precisos, reduzindo os custos computacionais). Decorrente das necessidades esse trabalho fez uso dos últimos dois módulos listados (CLARK et al, 2005; *Materials Studio 8.0 online help*, 2014).

Figura 9. Interface do software Materials Studio 8.0, na região ampliada estão os dois módulos utilizados do programa.



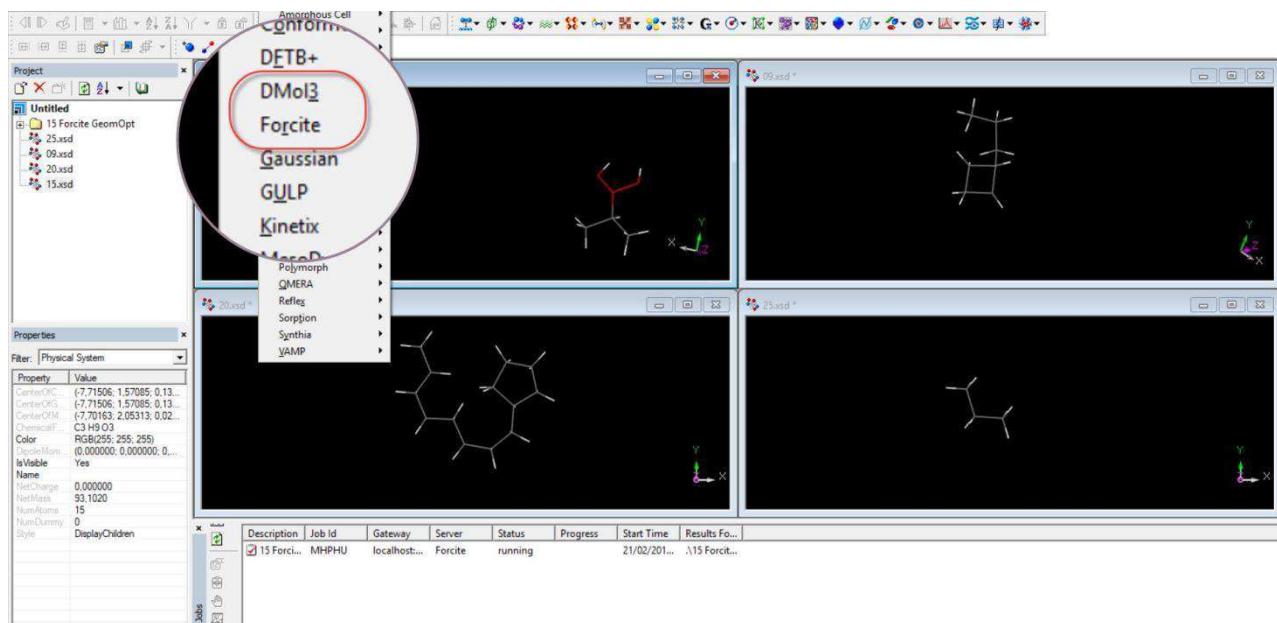
Fonte: *Materials Studio*, 2020.

## OTIMIZAÇÕES CLÁSSICAS E QUÂNTICAS

Na otimização geométrica clássica, inicialmente, o modo *FORCITE*, incorporado no programa *Materials Studio Modeling*, foi utilizado na execução de um procedimento clássico para minimização de energias, baseado no algoritmo gradiente conjugado (LGA).

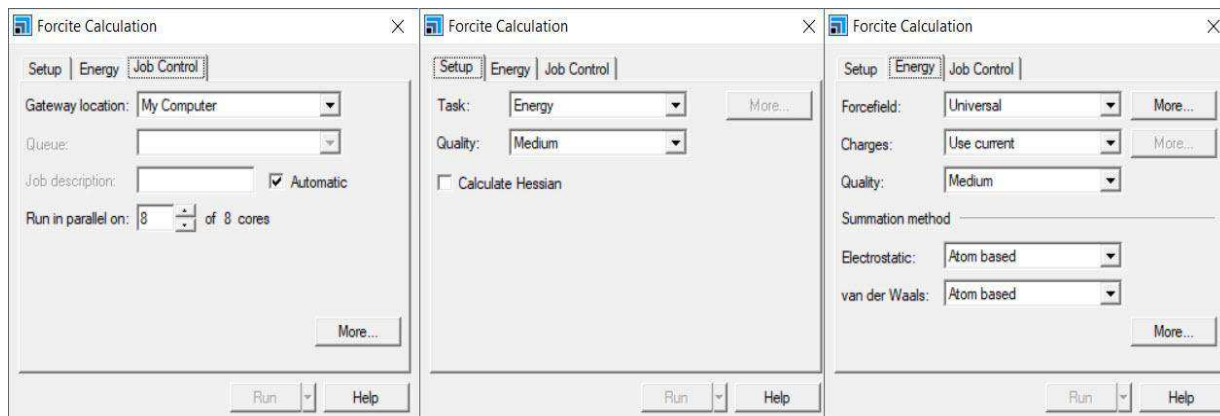
Em um segundo momento, foi realizado os processos de otimização geométrica quântica baseado na Teoria Funcional da Densidade (DFT) que foram executados a partir do módulo DMOL3.

Figura 10. Modo do software Materials Studio 8.0, na região ampliada estão os dois módulos utilizados do programa.



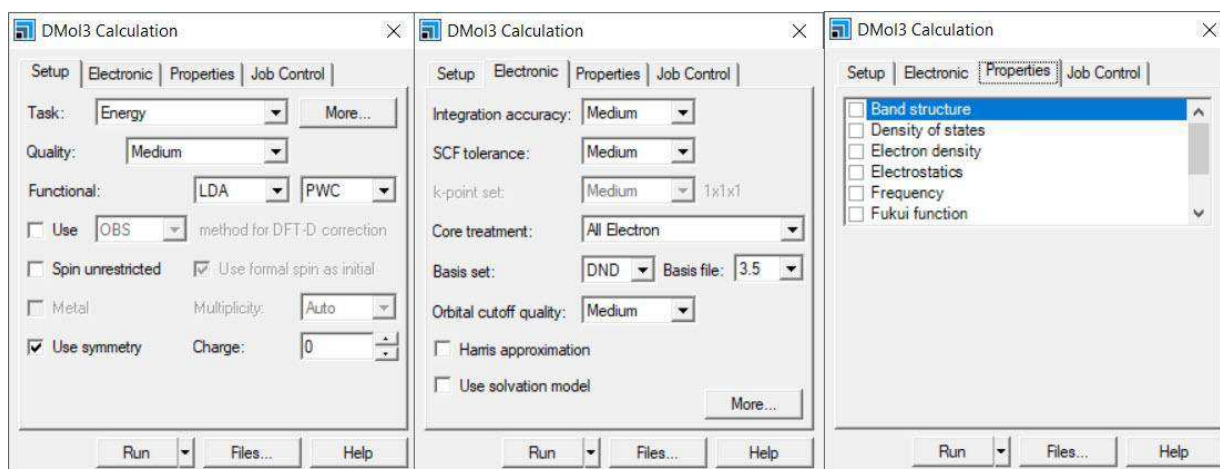
Fonte: *Materials Studio*, 2020.

Figura 11. Módulo Forcite uma das ferramentas que compõem o programa Materials Studio.



Fonte: *Materials Studio*, 2020.

Figura 12. Módulo *Dmol3* uma das ferramentas que compõem o programa Materials Studio.



Fonte: *Materials Studio*, 2020.

## DOCKING MOLECULAR

As experiências realizadas de *docking*/ancoramento molecular de proteína-ligante foram gerados pelo programa *Argus Lab 4.0.1*. Tendo em vista, que ocorreu um pré-tratamento da grade cúbica do volume energético que foi centrada no receptor. Foram onze conformações obtidas a partir de dados gerados para cada complexo ligante-proteína, posteriormente, foram realizadas análise.

## FÁRMACOS TESTADOS

Os fármacos escolhidos foram: Rivastigmina, Donepezil, Fisostigmina, Galantamina, Tacrina e Memantina. Esses, são utilizados no tratamento da doença Alzheimer. No entanto, mesmo sendo aplicado ao tratamento da doença neurodegenerativa, não tem estudo sobre esse tipo de pesquisa aplicada a simulação computacional desses fármacos anteriormente escolhidos.

### Tacrina

A Tacrina é um colinérgico, tem uma atividade inibitória reversível da colinesterase, geralmente indicada para o tratamento leve e moderado da doença Alzheimer. Algumas

características precoce da doença são perda gradual da memória e déficits cognitivos, ou seja é uma deficiência da acetilcolina na degradação seletiva de neurônios colinérgicos no córtex cerebral, basal e hipocampo. A Tacrina exerce seu efeito terapêutico melhorando a função colinérgica através da inibição reversível de sua hidrólise pela acetilcolinesterase. Caso o mecanismo da ação proposta esteja atuando, o efeito da tacrina é diminuir a progressão da doença a medida que os neurônios colinérgicos percam a comunicação. Esse fármaco é um agente anticolinesterásico que se liga de forma reversível e inativar as colinesterases. (*DrugBank*, 2020)

Figura 13. Estrutura da Tacrina no software VMD - *Visual molecule Dynamics*.



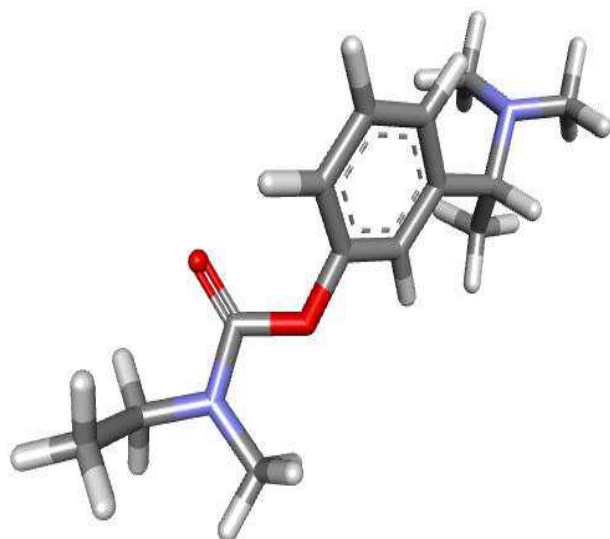
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

### Rivastigmina

A Rivastigmina é derivado do carbamato, estrutura que pode ser relacionada a outros fármacos que atua na contra demências. O mecanismo de ação da Rivastigmina não foi definitivo, mas sugere-se que esse fármaco interaja de forma reversível e inativa a colinesterase impedindo a hidrólise da acetilcolina nas sinapses colinérgicas. (DRUGBANK, 2019) A Rivastigmina adesivo transdérmico (substância ativa) interage com suas enzimas-alvos pela formação de uma ligação covalente complexa que inativa temporariamente as enzimas. Isso

indica, que a Rivastigmina pode aumentar seletivamente a disponibilidade da acetilcolina no hipocampo e no córtex, que estão associados no tratamento da doença Alzheimer. (MATHIAS, 2019)

Figura 14. Estrutura da Rivastigmina no software VMD - *Visual molecule Dynamics*.



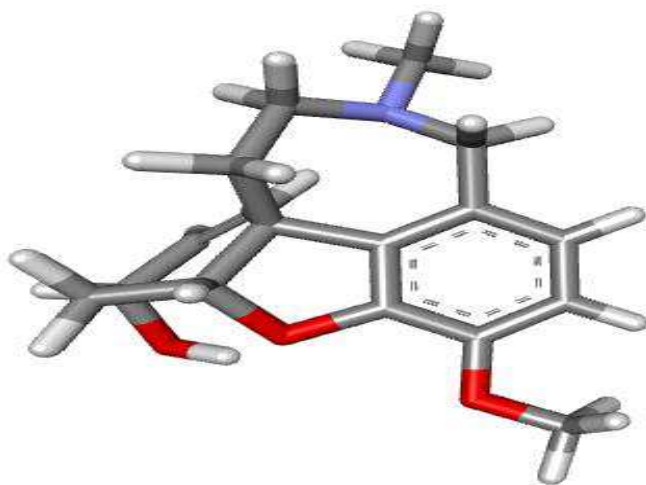
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

### Galantamina

A galantamina é um alcalóide terciário e inibidor competitivo da enzima acetilcolinesterase, que é um alvo terapêutico no tratamento da doença de Alzheimer. (SCOTT; GOA, 2000) O medicamento foi aprovado pela FDA em 2001 para o tratamento leve e moderado do tipo Alzheimer. A função desse fármaco é trabalhar para bloquear a enzima responsável por quebrar a comunicação da fenda sináptica da acetilcolina, aumentando assim a função a sinalização dos neurônios colinérgicos.



Figura 15. Estrutura da Galantamina no software VMD - *Visual molecule Dynamics*.

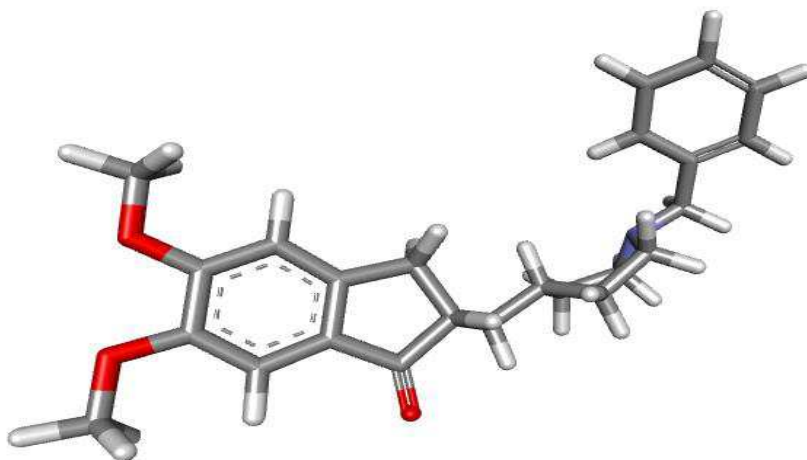


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

### Donepezil

O Donepezil atua na inibição parcial e reversível a enzima acetilcolinesterase que possivelmente degrada a acetilcolina. Alguns autores acreditam que as principais ações farmacológicas desse medicamento é atuar na inibição dessa enzima, melhorando a comunicação sináptica, conseqüentemente, aliviando os sintomas da doença Alzheimer (Drugbank, 2019). Outros alvos para o Donepezil pode ter funções de inibir várias vias de sinalização inflamatória, tornando efeitos neuroprotetores.

Figura 16. Estrutura da Donepezil no software VMD - *Visual molecule Dynamics*.

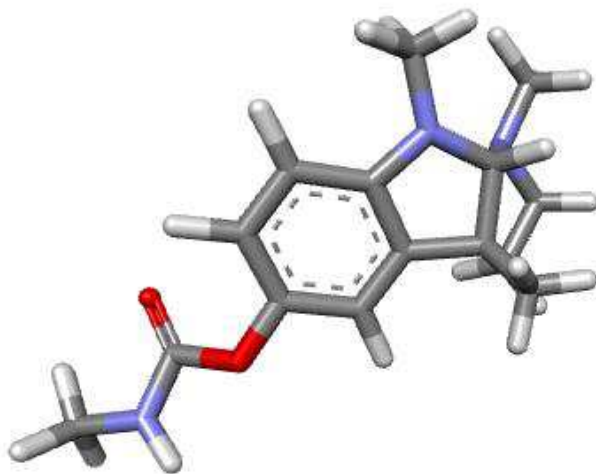


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

### Fisostigmina

A Fisostigmina é um inibidor que pode ser considerado reversível na colinesterase que pode aumentar a concentração de acetilcolina nas sinapses colinérgicas. Segundo alguns autores, a Fisostigmina pode também ser utilizada no tratamento do glaucoma, overdose, utilizando fármacos anticolinérgicos, que podem atuar nas regiões centrais e periféricas do sistema nervoso (DrugBank, 2020).

Figura 17. Estrutura da Fisostigmina no software VMD - *Visual molecule Dynamics*.

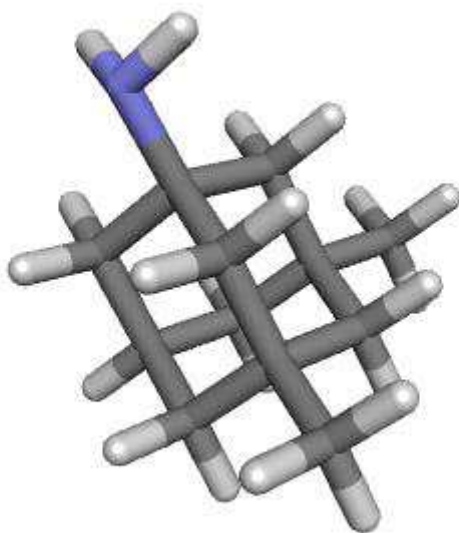


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

### Memantina

A Memantina é um antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) usado no tratamento da doença de Alzheimer (DA). É diferente de muitos outros medicamentos para a doença de Alzheimer, pois atua por um mecanismo diferente do dos inibidores da enzima colinesterase normalmente empregados no tratamento da doença de Alzheimer. (ROGAWSKI, MA; WENK, 2003)

Figura 18. Estrutura da Memantina no software VMD - *Visual molecule Dynamics*.



Fonte: *DrugBank*, 2020.

## **DETERMINAÇÃO ENERGÉTICA DOS COMPLEXOS PROTEÍNA-LIGANTE OBTIDOS ATRAVÉS DO MFCC**

O cálculo de interação entre o ligante e os resíduos de aminoácidos do receptor AChE foram realizados por meio do MFCC. Essa técnica é uma ferramenta essencial para realização de cálculos de proteínas, macromoléculas biológicas e DNA, seu maior objetivo é obter informações no que diz respeito a interações energéticas dos complexos. (ZHANG 2003; MOTA, 2016).

Na realização de cálculos de energia de interação utilizou-se o software *Materials Studio*, empregando o código *Dmol3*, bem como o funcional troca e correlação: Aproximação de Gradiente Generalizado (GGA). Calculadas através do MFCC. No software *Discovery Studio* utilizou-se para analisar os resíduos de aminoácidos do receptor, já o ligante, por meio dos monitores do centroid que marca o centro geométrico dos átomos selecionados. (BIOVA DISCOVERY STUDIO, 2018) O raio de corte atribuído ao software foi  $R= 12 \text{ \AA}$ , levar em conta todos os resíduos de potencial interação. A otimização das estruturas foram realizadas através do mesmo software com adição de hidrogênios por meio da opção chemistry -hydrogens – add, isto foi necessário, para fechar todas as camadas de valência nas estruturas obtidas

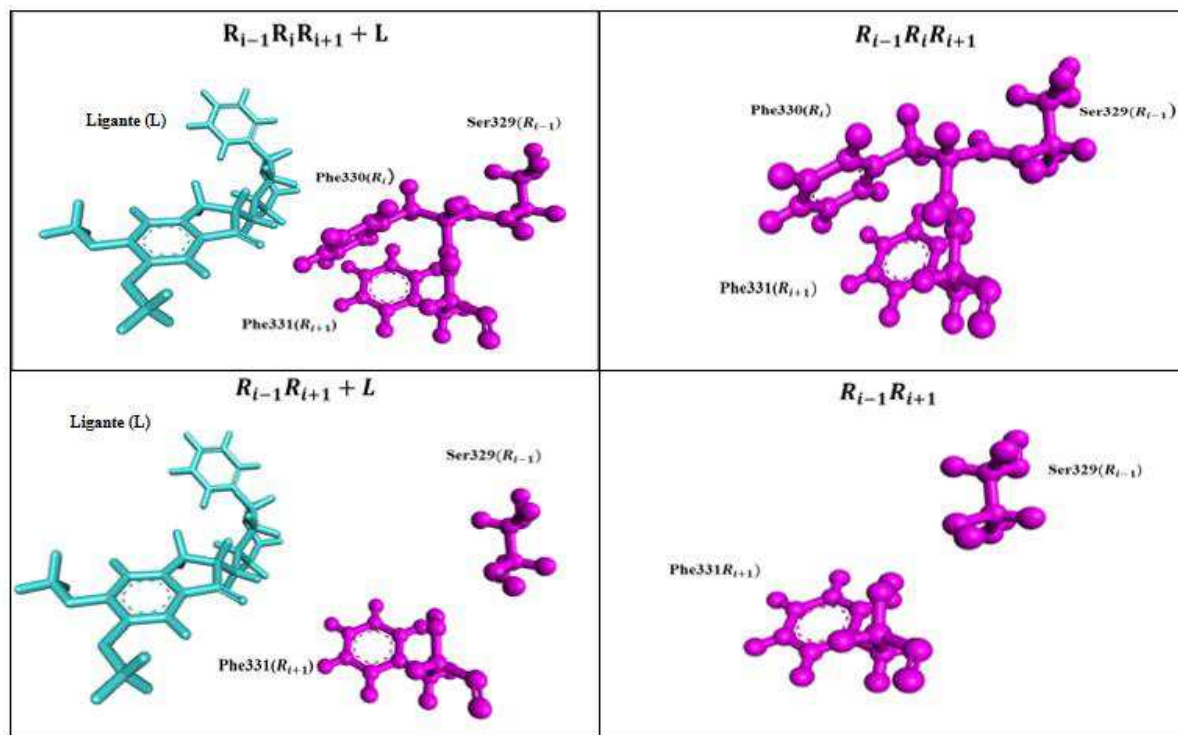
inicialmente por Difração de raio X ou Ressonância nuclear, isso ocorre geralmente por causa da falta de resolução da imagem, que seria necessário 1,2 Å metodologia similar à adotada por Mota (2016).

Determinou-se a molécula do ligante como L e o resíduo de aminoácidos que interage com o ligante como R<sup>i</sup>. O cap C<sup>i-1</sup> (C<sup>i+1</sup>) é formado a partir dos resíduos vizinhos do resíduo R<sup>i</sup> ao longo da cadeia de proteína. Empregou-se a linha de investigação em que os dois fragmentos de aminoácidos mais próximos de cada lado do resíduo R<sup>i</sup> foram usados para construir o cap C<sup>i-1</sup> e C<sup>i+1</sup>, proporcionando uma melhor exposição do ambiente eletrônico. Para estas estruturas fragmentadas, a energia de interação entre o ligante e os fragmentos individuais é calculado de acordo com a seguinte equação:

$$EI(L - R^i) = E(L + C^{i-1} R^i C^{i+1}) - E(C^{i-1} R^i C^{i+1}) - E(L + C^{i-1} C^{i+1}) + E(C^{i-1} C^{i+1}) \text{ Eq. (1)}$$

O EI (L – R<sup>i</sup>) representa a energia quântica total do sistema, que será igual a E (L + C<sup>i-1</sup> R<sup>i</sup> C<sup>i+1</sup>) energia do ligante mais o resíduo R<sup>i</sup> junto a seus Caps conjugados (Fragmento 1), menos, E (C<sup>i-1</sup> R<sup>i</sup> C<sup>i+1</sup>) que equivale ao R<sup>i</sup> mais os aminoácidos Caps (Fragmento 2), menos, E (L + C<sup>i-1</sup> C<sup>i+1</sup>) que será o ligante mais os Caps conjugados (Fragmento 3) e por fim, soma-se E (C<sup>i-1</sup> C<sup>i+1</sup>) apenas os aminoácidos conjugados, Caps (Fragmento 4) da Figura 19. O cálculo de energia de interação EI (L – RI) expressa-se em kcal/mol.

Figura 19. Método de Fracionamento Molecular com Caps conjugados (MFCC) exemplificado pelo cálculo energético da interação proteína-ligante entre o receptor AChE e o ligante Tacrina, onde  $EI(L-R_i) = \text{Fragmento 1} - \text{Fragmento 2} - \text{Fragmento 3} + \text{Fragmento 4}$ .



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO DO 1º RECEPTOR 1EA5

De acordo com os dados da pesquisa, energias obtidas com relação ao cálculo de *Docking Molecular* foram realizadas a partir da amplitude total do receptor-ligante com dimensões específicas. Na posição X (60.0000), Y(60.0000) e Z (60.0000) considerando toda dimensão do receptor para cálculos clássicos, sendo necessário a escolha do algoritmo Lamarckiano para melhores conformações de menor energia, favorecendo o atracamento da proteína-ligante e da formação de complexo estável, No algoritmo foram considerados três casos, sendo eles: Flexível, Rígido e Torção.

Tacrina

Na Tabela 2 os três complexos apresentaram energias mínimas de interação proteína-ligante, no ligante Flexível variou de -7.05 a -5.43 kcal/mol, já no complexo Rígido apresentou grau energético de -7.22 a -5.86 kcal/mol, considerando especificamente, o complexo Torção que apresentou energia menores e mais negativas comparadas às outras estruturas entre -8.69 a -6.36 kcal/mol, devido apresentar melhores conformações de menor energia.

No geral, considerando apenas onze conformações de cada interação entre proteína-ligante que foram previamente testados a partir desse *software*. As energias interações de ligações consideram que quanto menor o grau energético, melhor será a estabilidade entre o receptor e o ligante (fármaco) de acordo com o estado fundamental, quando um corpo tenderá a estabilidade sempre de menor energia.

Tabela 2. Energia de ligação (Kcal/mol) da Tacrina estimada pelo programa *ArgusLab*.

Complexo Flexível	Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)	Complexo Rígido	Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)	Complexo Torção	Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)
1	- 7.05	1	- 7.22	1	- 8.69
2	- 6.72	2	- 7.20	2	- 8.09

<b>3</b>	- 6.16	<b>3</b>	- 7.14	<b>3</b>	- 7.55
<b>4</b>	-6.11	<b>4</b>	- 6.96	<b>4</b>	- 7.20
<b>5</b>	- 5.75	<b>5</b>	- 6.82	<b>5</b>	- 7.09
<b>6</b>	- 5.73	<b>6</b>	- 6.59	<b>6</b>	- 6.88
<b>7</b>	- 5.73	<b>7</b>	- 6.45	<b>7</b>	- 6.85
<b>8</b>	- 5.63	<b>8</b>	- 6.37	<b>8</b>	- 6.84
<b>9</b>	- 5.61	<b>9</b>	- 6.10	<b>9</b>	- 6.58
<b>10</b>	- 5.57	<b>10</b>	- 5.95	<b>10</b>	- 6.42
<b>11</b>	- 5.43	<b>11</b>	- 5.86	<b>11</b>	- 6.36

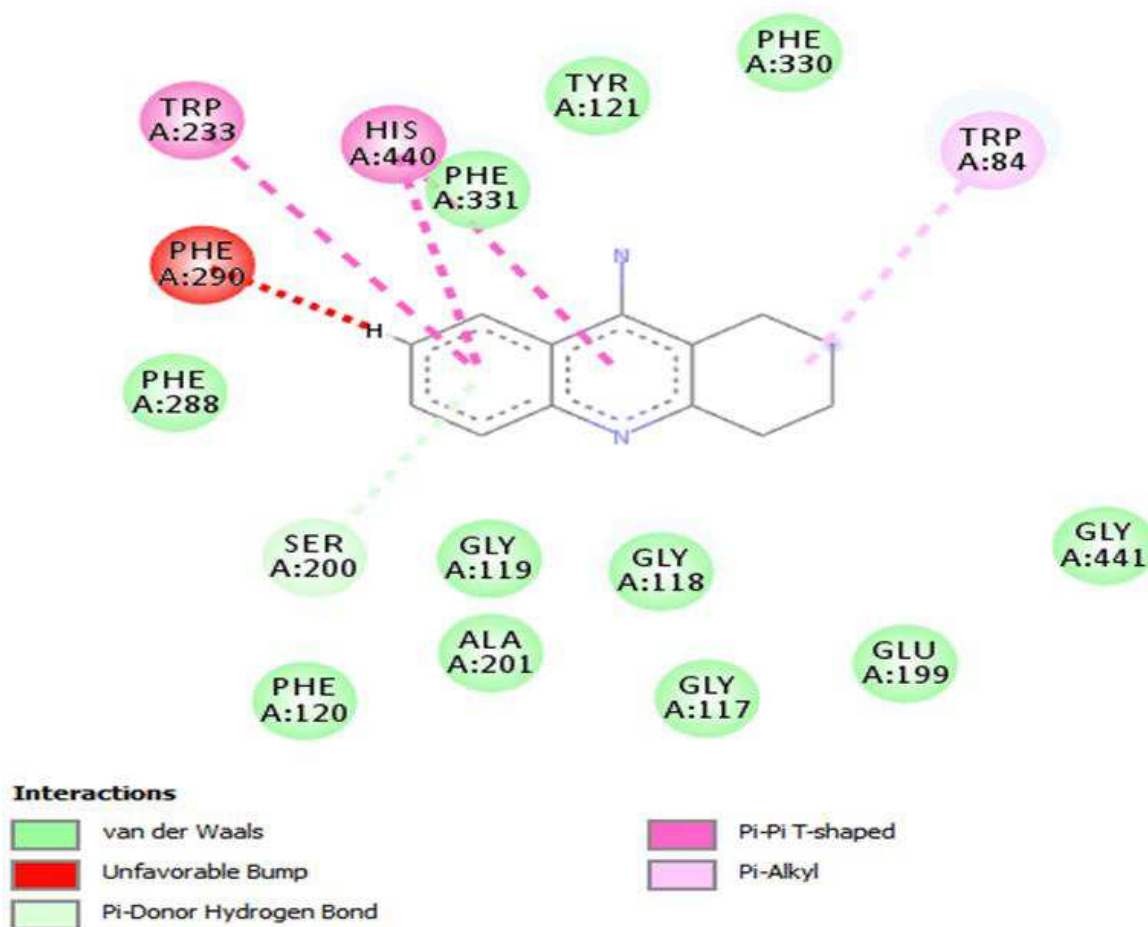
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Os aminoácidos mostraram diferentes interações e repulsões eletrostáticas presentes na estrutura do fármaco. Houve ligações de Van der Waals em diversas porções ao redor do ligante, sendo eles: Tyr121, Phe330, Phe288, Gly118, Gly119, Gly441, e entre outros resíduos de aminoácidos. Realizar ligação do tipo  $\pi$ - $\pi$  no anel aromático na porção Trp233 e His440, como também repulsão eletrostática com o hidrogênio da porção Phe290. Realiza interação do tipo pi-Alquil no ciclohexil na porção Trp84.

De acordo com Almeida (2011) a Tacrina estabelece fortes interações de ligação com o sítio de ligação colina AChE considerando os resíduos His440, Ser200 e Glu327 como resíduos de aminoácidos âncoras, no entanto, não possui interação com o sítio periférico. (ALMEIDA, 2011).



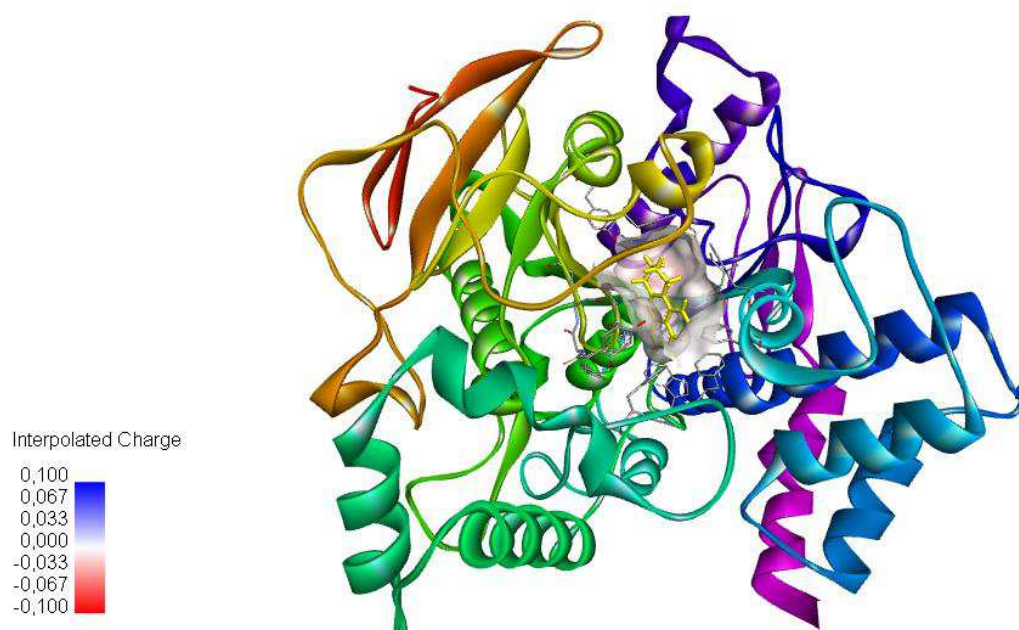
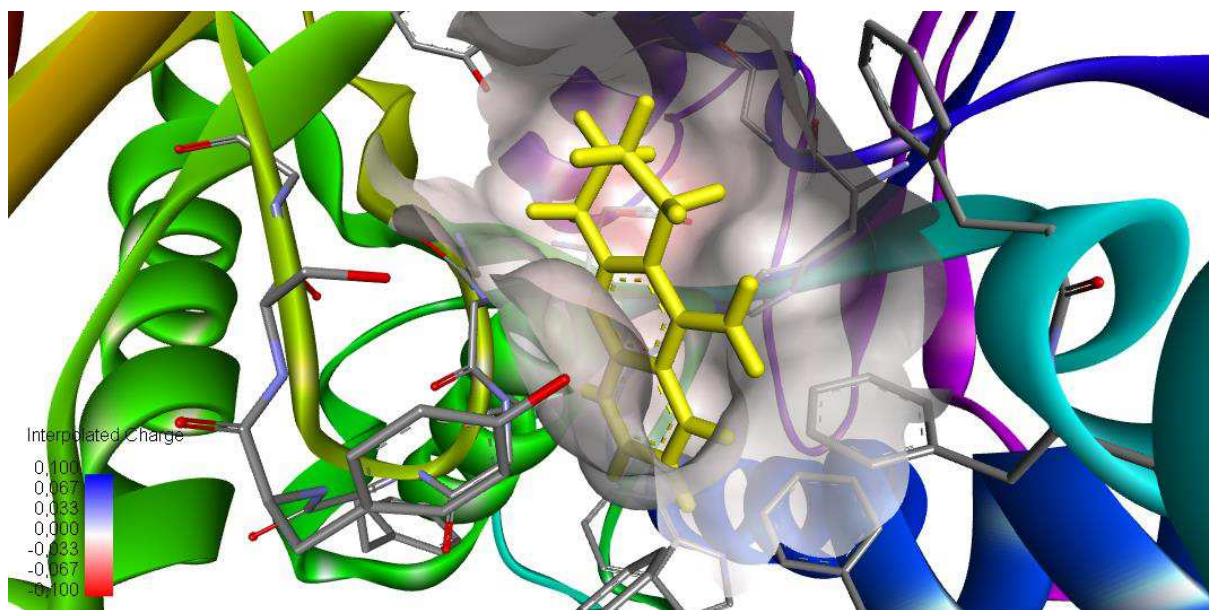
Figura 20. Visualização 2D do composto Tacrina e os resíduos de 1EA5 de maior interação.



Fonte: *Discovery Studio*, 2020.

No uso do *Discovery Studio* (BIOVIA DISCOVERY STUDIO VISUALIZER, 2014), foi possível analisar a nuvem eletrostática do receptor 1EA5 com a Tacrina. Os aminoácidos que participam dessa interação na região de maior interação (cor vermelha) nuvem eletrostática foram: Tyr84, Tyr121, e Phe288.

Figura 21. Nuvem eletrostática da interação receptor com Tacrina.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

## Donepezil

O fármaco Donepezil apresentou resultados do *docking* bastante expressivos, suas energias livres de ligação apresentaram resultados significativos na interação proteína-ligante em todos os onze complexos.

Em todas as onze posições, os complexos apresentaram uma energia livre de ligação. Na Tabela 3 destaca-se a variação dos diferentes casos. No complexo flexível a energia livre de ligação variou de -8.80 a -5.13 kcal/mol, no complexo rígido a interação energética ficou entre -10.10 a -5.78 kcal/mol.

Considerando a melhor variação do complexo entre os casos, foi a torção -11.37 a -8.57 kcal/mol apropriada na interação de proteína-ligante. Esses resultados foram mais eficientes comparados com a energia livre de ligação da Rivastigmina, que variou entre -7.38 a -5.70 kcal/mol. Considerando que o Donepezil apresentou-se como excelente ligante na obtenção dos complexos. Comparando ao fármaco Tacrina, o Donepezil obteve valores mais negativos e também, no entanto, apresentou mesmo complexo realizando torção.

Vale salientar, que todos os valores de energia livre de ligação (kcal/mol) estão entre uma média de 11 posições em cada complexo, mesmo apresentando ainda valores expressivamente negativos. Por outro lado, as posições que não aparecem valores negativos, é devido, o complexo se limitar apenas as posições já mencionadas.

Tabela 3. Energia de ligação (kcal/mol) da Donepezil estimada pelo programa *ArgusLab*.

<b>Complexo Flexível</b>	<b>Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)</b>	<b>Complexo Rígido</b>	<b>Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)</b>	<b>Complexo Torção</b>	<b>Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)</b>
<b>1</b>	- 8.80	<b>1</b>	- 10.10	<b>1</b>	- 11.37
<b>2</b>	- 6.60	<b>2</b>	- 8.66	<b>2</b>	- 11.26
<b>3</b>	- 6.12	<b>3</b>	- 7.73	<b>3</b>	- 10.40

<b>4</b>	- 6.11	<b>4</b>	-7.76	<b>4</b>	- 10.32
<b>5</b>	- 6.04	<b>5</b>	- 6.67	<b>5</b>	- 10.23
<b>6</b>	- 5.98	<b>6</b>	- 6.64	<b>6</b>	- 9.89
<b>7</b>	- 5.82	<b>7</b>	- 6.37	<b>7</b>	- 9.34
<b>8</b>	- 5.61	<b>8</b>	- 6.18	<b>8</b>	- 8.57
<b>9</b>	- 5.25	<b>9</b>	- 6.06	<b>9</b>	-
<b>10</b>	- 5.20	<b>10</b>	- 6.00	<b>10</b>	-
<b>11</b>	- 5.13	<b>11</b>	- 5.78	<b>11</b>	-

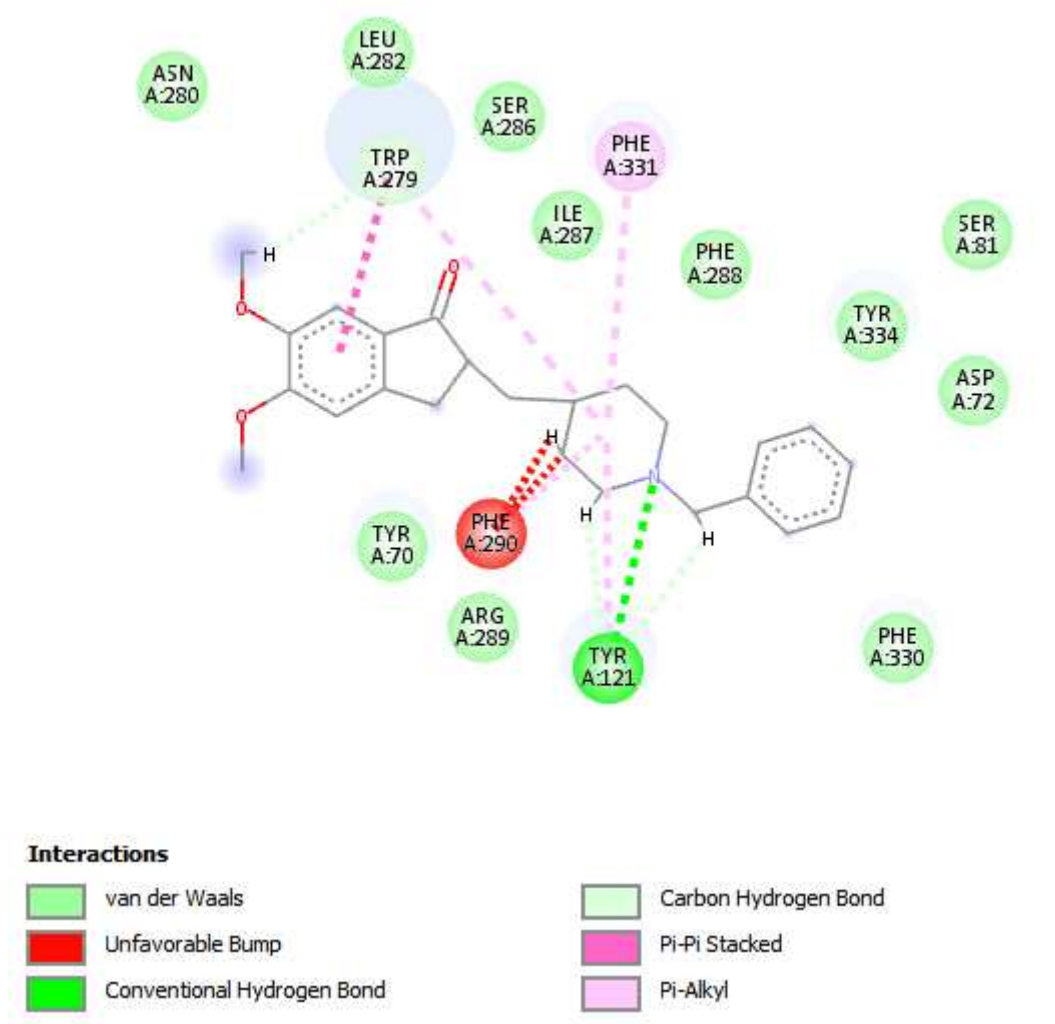
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Com os cálculos de *docking molecular* do Donepezil, utilizando o *Discovery Studio*, foi possível identificar as ligações ocorridas entre os aminoácidos de maior proximidade apresentando ligações de hidrogênio como a Tyr121.

Na Figura 22, é possível notar as regiões de maior interação do composto com o ligante evidenciando os resíduos de 1EA5. Os aminoácidos Ser81, Phe288, Tyr334, Ser286, Phe330, Leu282 e entre outros apresentando ligação fraca associada a de Van der Waals. No entanto, o Phe290 apresentou repulsão eletrostática, considerando certo grau de impermeabilidade entre o receptor-ligante.

O Donepezil apresenta interações do tipo ligação de hidrogênio entre o nitrogênio da função amina e a Tyr121, interações do tipo empilhamento  $\pi$ - $\pi$  e  $\pi$ -alquil entre o anel aromático e a porção Trp279, e interação  $\pi$ -alquil com a porção Phe331, além disso, apresenta interações do tipo carbono-hidrogênio entre o próton da metila da função éter e Trp279, além disso a molécula apresenta alta estabilização por interações de Van der Waals com diversas porções da enzima.

Figura 22. Visualização 2D do composto Donepezil e os resíduos de 1EA5 de maior interação.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

A interação do receptor-ligante ocorreu a partir da ligações  $\pi$  e ligações fracas associadas às forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio, considerando também o antagonista (cor vermelha) que tem a função de repulsão entre as ligações com os resíduos de aminoácidos interagindo ao mesmo tempo e se afastando do ligante ao sítio ativo.

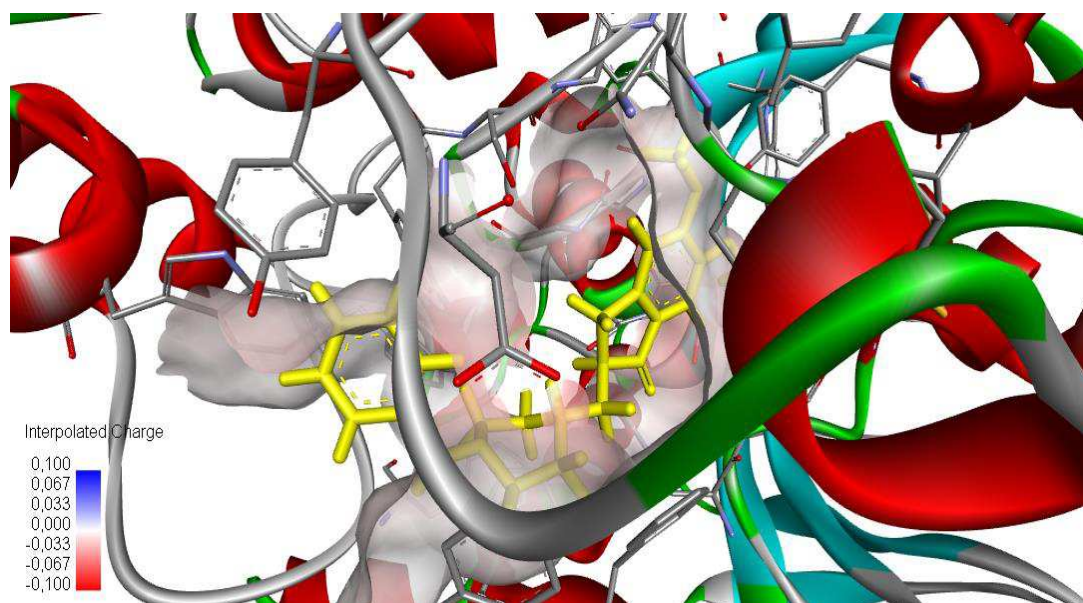
Segundo Almeida (2015) o Donepezil não interage com a tríade catalítica (Ser200, His440 e Glu327) a não ser por intermédio de moléculas de água. Na região mediana na cavidade enzimática, localizada entre o sítio de ligação da colina e o sítio periférico, o átomo

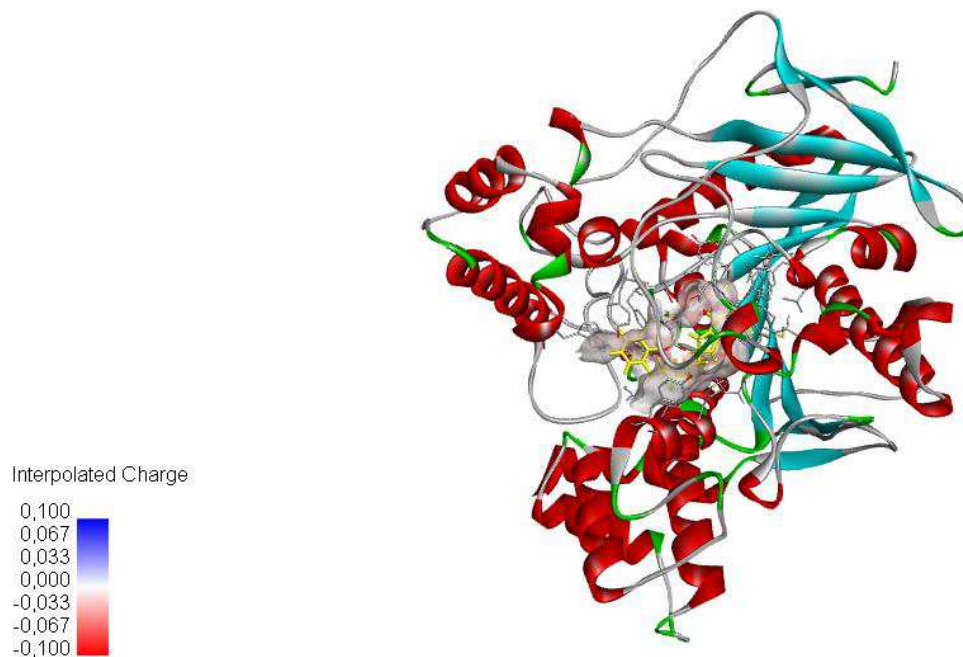
de nitrogênio piperidínico do ligante, contendo carga positiva, estabelece uma interação cátion- $\pi$  Phe331 da cavidade enzimática. O resíduo Tyr334 forma com Phe330 um distanciamento entre a ligação com a droga, associada a pouca interação.

O aminoácido Phe330 representa um sítio adicional de ligação quaternária, de significância funcional, na região mediana na cavidade do sítio ativo. No sítio periférico, o anel de indanona interage com o grupo indólico do aminoácido Trp279 através de uma clássica interação de empilhamento- $\pi$ . (ALMEIDA, 2015)

Os inibidores das colinesterases de segunda geração (donepezil, rivastigmina, galantamina) apresentam propriedades farmacológicas semelhantes, muito embora algumas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas os diferenciem entre si. Os efeitos dos inibidores das colinesterases ocorrem em uma janela terapêutica de 30% a 60% de inibição da enzima, promovendo aumento da disponibilidade sináptica de acetilcolina (FORLENZA, 2005).

Figura 23. Nuvem eletrostática da interação receptor com Donepezil.





Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

O fármaco Donepezil apresenta interações do tipo ligação de hidrogênio entre o nitrogênio da função amina e a Tyr121, interações do tipo empilhamento  $\pi$ - $\pi$  e  $\pi$ -alquil entre o anel aromático e a porção Trp279, e interação  $\pi$ -alquil com a porção Phe331, além disso, apresenta interações do tipo carbono-hidrogênio entre o próton da metila da função éter e Trp279, além disso a molécula apresenta alta estabilização por interações de van der Waals com diversas porções da enzima.

Com auxílio do *Discovery Studio* podemos visualizar a nuvem eletrostática entre o receptor 1EA5 e o ligante Donepezil (Figura 23), podemos notar que o local de atracamento localiza-se em uma região neutra, no qual a maioria das interações são  $\pi$ . Na extremidade da nuvem eletrônica há uma região de maior eletronegatividade, destacando uma região levemente interativa (cor vermelha).

Segundo Kryger e colaboradores (1998) a ligação do Donepezil com acetilcolinesterase se deve ao fato da dependência de interação com os resíduos de aminoácidos Trp279 e Phe330, isso explica a alta relação com a enzima AChE e não com BChE.

## Rivastigmina

Os resultados de *docking molecular* da Rivastigmina com o receptor 1EA5 demonstraram que os parâmetros podem mudar com relação às conformações do complexo utilizado durante o ancoramento molecular.

Com relação a energia livre de ligação (kcal/mol) em todos os complexos considerados (onze posições) apresentaram energia livre de ligação, considerando que por meio do docking molecular, a interação de proteína-ligante ocorreu de forma eficiente devido os valores de energia considerando o espaço total do receptor. Nos três complexos houve variação de energia. No complexo Flexível variou de -5.86 a -4.76 kcal/mol. Já no complexo torção os valores energéticos ficaram entre -6.50 a -4.81 kcal/mol. A posição mais favorável de menor energia foi do tipo rígido, pois estas apresentaram melhores resultados para as energias livres de ligação com valores de -7.80 a -5.22 kcal/mol.

Na Tabela 4 apresenta-se os resultados dos cálculos de *docking* da Rivastigmina a partir das estruturas obtidas neste estudo.

Tabela 4. Energia de ligação (Kcal/mol) da Rivastigmina estimada pelo programa *ArgusLab*.

Complexo Flexível	Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)	Complexo Rígido	Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)	Complexo Torção	Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)
1	- 5.86	1	- 7.80	1	- 6.50
2	- 5.34	2	- 7.19	2	- 6.29
3	- 5.30	3	- 6.60	3	- 6.20
4	- 5.19	4	- 6.39	4	- 6.03
5	- 5.18	5	- 6.38	5	- 5.75
6	- 5.03	6	- 6.17	6	- 5.48



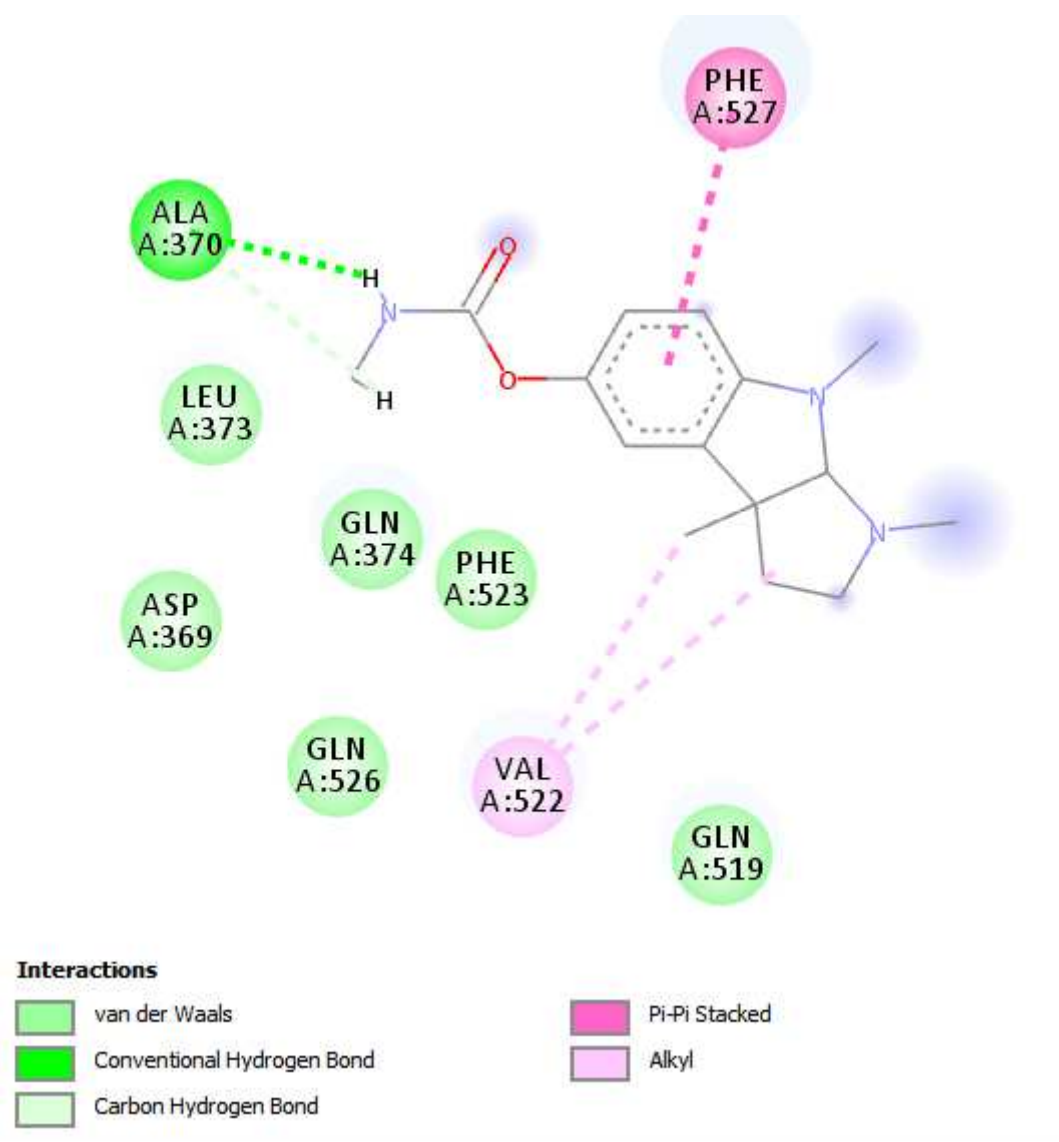
7	- 5.01	7	- 6.14	7	- 5.47
8	- 5.00	8	- 5.89	8	- 5.26
9	- 4.82	9	- 5.82	9	- 4.99
10	- 4.79	10	- 5.29	10	- 4.82
11	- 4.76	11	- 5.22	11	- 4.81

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Com as posições relacionadas ao *docking*, através do *software Discovery Studio*, foi possível obter as informações dos tipos ligações, dentre elas estão: Ligações de hidrogênio, Van der Waals e ligações  $\pi$  envolvendo a Rivastigmina e os aminoácidos de maior proximidade.

Na Figura 24 observa-se, através de um diagrama 2D, ligações entre o ligante e os chamados aminoácidos âncoras, que apresentam ligações hidrogênio com o aminoácido Ala370 de maior interação. Os aminoácidos que realizam ligações de Van der Waals nos aminoácidos Leu373, Gln374, Phe522, Asp369 e entre outros. Apesar do aminoácido Phe527 realizar ligações  $\pi$ , apresenta baixa atração a droga. No aminoácido Val522 se apresenta livremente como radical monovalente.

Figura 24. Visualização 2D do composto Rivastigmina e os resíduos de 1EA5 de maior interação.



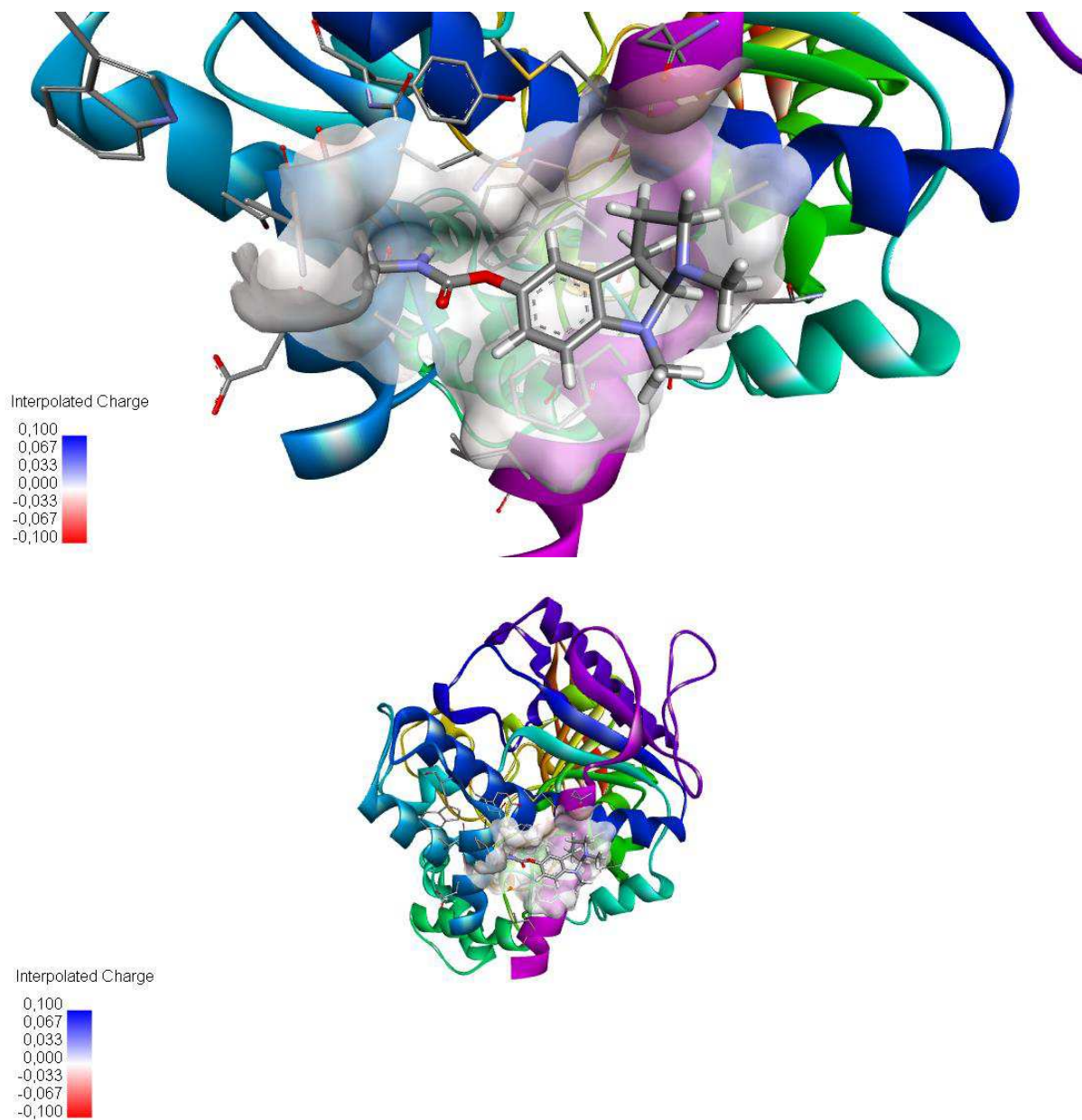
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

A Rivastigmina apresenta interações do tipo ligação de hidrogênio entre o nitrogênio da amida e o hidrogênio da metila ligada a mesma função e a porção Ala370 além de interação do tipo empilhamento  $\pi$ - $\pi$  com o anel aromático e interações do tipo alquil entre metilas e a porção Val-522.

Com o *Discovery Studio* podemos analisar a nuvem eletrostática, como consta a Figura 24. A região (nuvem) de coloração vermelha apresenta certo grau de eletronegatividade, ou seja, onde há maior interação dessas ligações entre os resíduos de aminoácidos com a estrutura

da Rivastigmina sendo a Ala370, um dos aminoácidos responsáveis. Já a nuvem de coloração azul, apresenta menor eletronegatividade, quando ocorre poucas interações com o fármaco. Já na região neutra não ocorre interações nenhuma entre proteína-ligante.

Figura 25. Nuvem eletrostática da interação receptor com Rivastigmina.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Na análise da nuvem eletrostática do receptor 1EA5 foi possível demonstrar o local de ancoramento está localizado em uma região entre a interação neutra.

É possível identificar uma pequena região eletronegativa, mas o único aminoácido que aparece interagindo de forma mais atrativa foi o Ala370, realizando ligações de hidrogênio. Essa região se encontra distante do sítio ativo da proteína mas identifica vários aminoácidos que poderiam interagir de forma efetiva no complexo.

#### Galantamina

Na Galantamina houve formação de complexo mais estável, com isso, foram considerados três casos, sendo eles: Flexível, Rígido e Torção.

Com relação a Tabela 5 os três complexos apresentaram energias mínimas de interação proteína-ligante, no ligante Flexível variou de -6.96 a -5.41 kcal/mol, já no complexo torção apresentou grau energético de -7.21 a -5.88 kcal/mol, considerando especificamente, o complexo Rígido apresentou energia menores e mais negativas comparadas as outras estruturas entre -8.16 a -5.21 kcal/mol.

Tabela 5. Energia de ligação (Kcal/mol) da Galantamina estimada pelo programa *ArgusLab*.

Complexo Flexível	Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)	Complexo Rígido	Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)	Complexo Torção	Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)
1	- 6.96	1	- 8.16	1	- 7.21
2	- 6.59	2	- 7.74	2	- 7.09
3	- 6.39	3	- 6.58	3	- 6.75
4	- 6.20	4	- 6.05	4	- 6.74
5	- 6.14	5	- 5.90	5	- 6.60
6	- 6.00	6	- 5.85	6	- 6.47

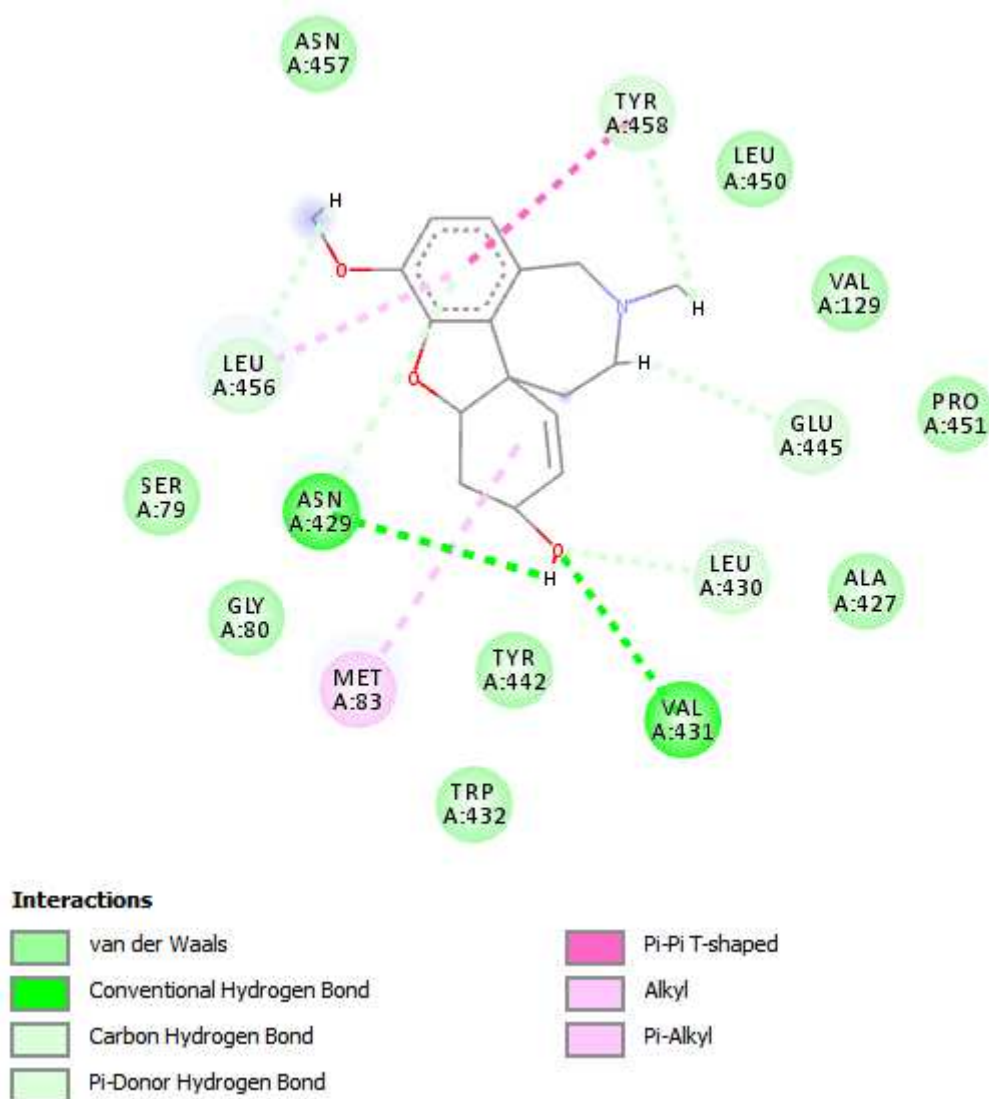
7	- 5.93	7	- 5.55	7	- 6.25
8	- 5.73	8	- 5.52	8	- 6.22
9	- 5.54	9	- 5.40	9	- 6.19
10	- 5.50	10	- 5.26	10	- 6.05
11	- 5.41	11	- 5.21	11	- 5.88

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

No *Discovery Studio* evidenciou em sua análise visual as interações diretas dos aminoácidos do receptor 1AE5 que mais interagiam com o ligante (Galantamina). A análise obteve como resultado, ligações de hidrogênio com os aminoácidos Asn429 e Val431, além disso, apresentou ligações de Van der Waals com Ser79, Gly80, Trp432, Tyr442, Pro451, Leu450 e entre outros ao redor do composto. O aminoácido Met83 foi o único aminoácido que apresentou ligação  $\pi$  e sua representação é citada como parte do sítio ativo da proteína da AChE.

A Galantamina apresenta interações do tipo ligação de hidrogênio entre o hidrogênio da hidroxila e as porções Asn429 e Val431 interações do tipo empilhamento  $\pi$ - $\pi$  entre o anel aromático e a porção Tyr458 e do tipo  $\pi$ -alquil com a porção Leu456. Além disso, a dupla ligação presente do anel de seis membros realiza interação do tipo  $\pi$ -alquil com a porção Met83 além de interações do tipo  $\pi$ -doador de hidrogênio com as porções Leu456, LEU-430, Glu445 e Tyr458.

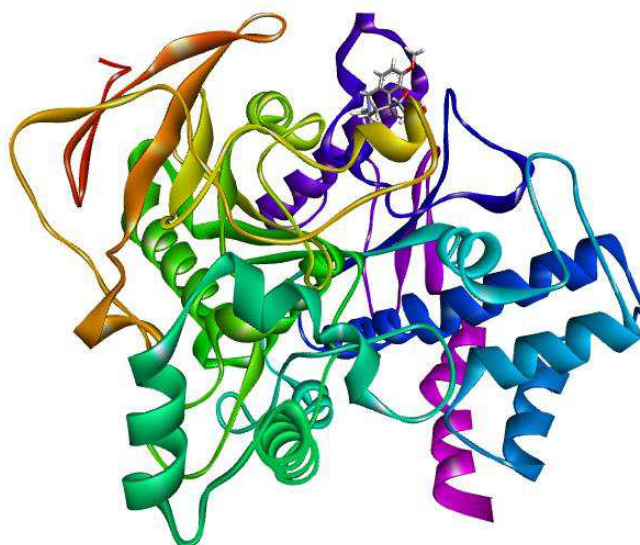
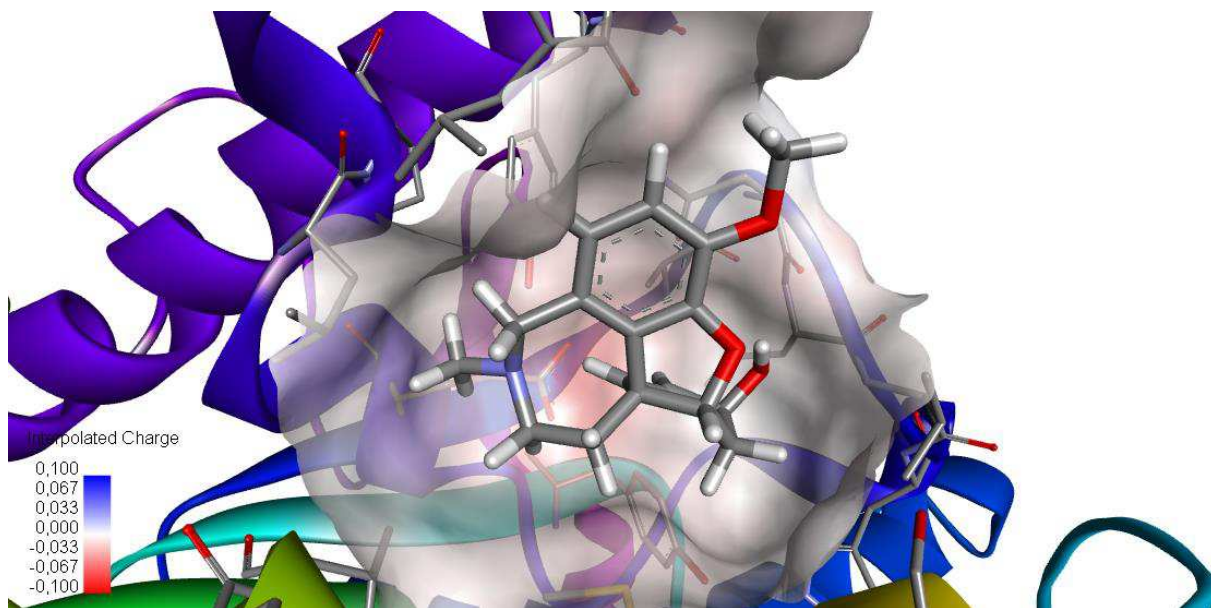
Figura 26. Visualização 2D do composto Galantamina e os resíduos de 1EA5 de maior interação.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Na Figura 27 evidenciou a análise da nuvem eletrostática do receptor 1EA5 realizada a partir do DS, permitindo-se analisar o atracamento eletrostático na região neutra. A região mais próxima mostra-se positivas e neutras, o Asn429 e Val431 e Met83 são os aminoácidos responsáveis por essa interação.

Figura 27. Nuvem eletrostática da interação do Receptor 1EA5 com Galantamina.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

### Fisostigmina

O complexo Fisostigmina demonstrou boa interação proteína-ligante, como podemos ver na Tabela 6, tendo em vista que todos os onze complexos apresentaram energias negativas.

A melhor interação de energia livre de ligação no complexo rígido, entre -6.74 a -4.97 Kcal/mol da Fisostigmina. Esses valores foram favoráveis e demonstraram os melhores níveis de variação de energia relacionada a esse fármaco. No entanto, o complexo flexível e rígido obteve energias que variaram de -6.62 a -4.31 kcal/mol.

Tabela 6. Energia de ligação (Kcal/mol) da Fisostigmina estimada pelo programa *ArgusLab*.

<b>Complexo Flexível</b>	<b>Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)</b>	<b>Complexo Rígido</b>	<b>Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)</b>	<b>Complexo Torção</b>	<b>Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)</b>
<b>1</b>	- 6.09	<b>1</b>	- 6.62	<b>1</b>	-7.09
<b>2</b>	- 5.52	<b>2</b>	- 6.47	<b>2</b>	- 6.61
<b>3</b>	- 5.03	<b>3</b>	- 6.39	<b>3</b>	- 6.37
<b>4</b>	- 4.98	<b>4</b>	- 6.34	<b>4</b>	- 6.28
<b>5</b>	- 4.57	<b>5</b>	- 6.08	<b>5</b>	- 6.17
<b>6</b>	- 4.50	<b>6</b>	- 5.97	<b>6</b>	- 6.13
<b>7</b>	- 4.44	<b>7</b>	- 5.68	<b>7</b>	- 5.83
<b>8</b>	- 4.34	<b>8</b>	- 5.66	<b>8</b>	- 5.69
<b>9</b>	- 4.33	<b>9</b>	- 5.55	<b>9</b>	- 5.59
<b>10</b>	- 4.31	<b>10</b>	- 5.54	<b>10</b>	- 5.56
<b>11</b>	- 4.31	<b>11</b>	- 5.51	<b>11</b>	- 5.46

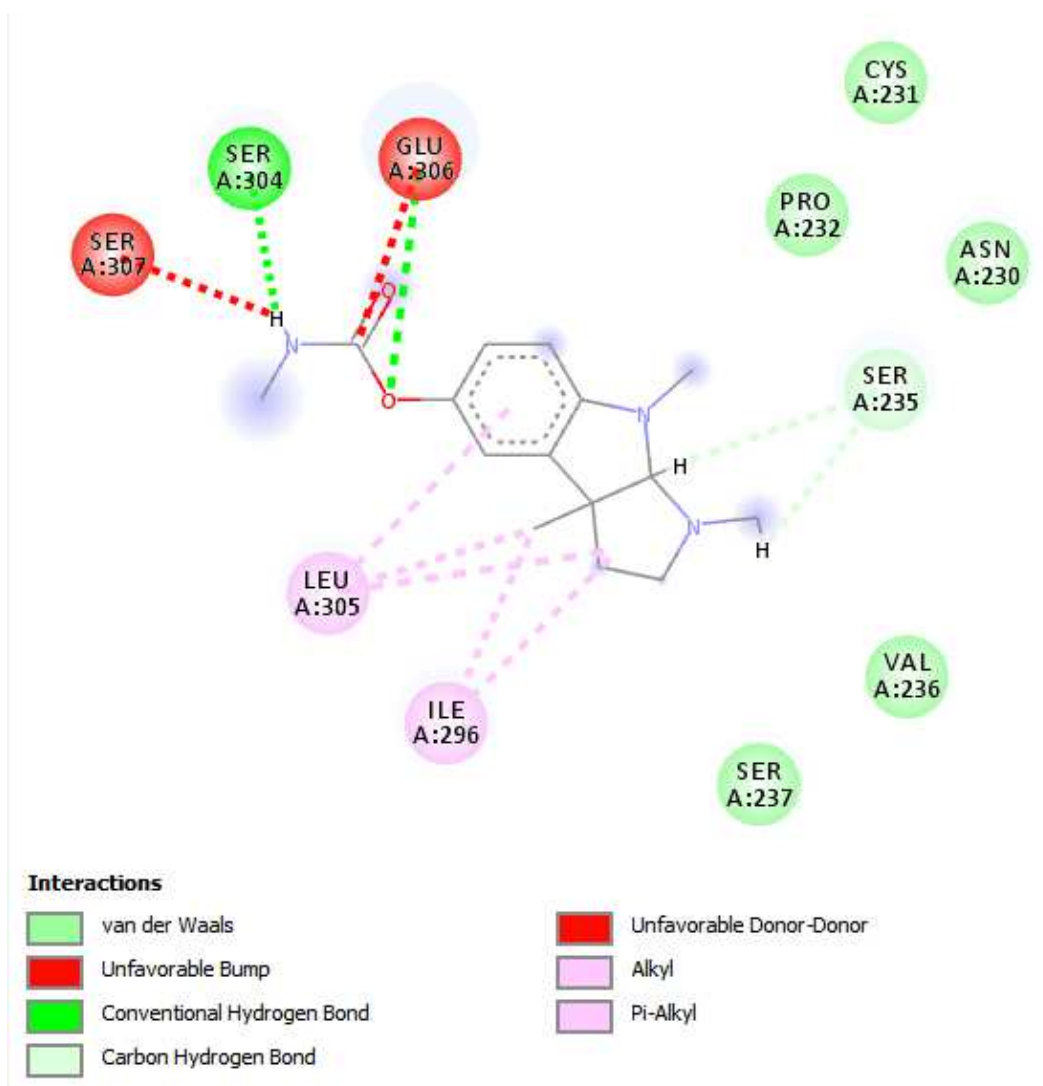
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.



Na visualização 2D da Fisostigmina dada pelo *Discovery Studios* (Figura 28), onde é perceptível as interações do ligante e seus aminoácidos âncoras, no qual podemos destacar ligações de hidrogênio com o aminoácido Ser304. Os aminoácidos mesmo distantes de forma livre ao redor da droga, realiza interação fraca, associada a ligações de Van der Waals, dentre elas: Cys231, Pro232, Asn230, Ser237, Val236. ligações  $\pi$  com Leu305 e Ile296. No entanto a um aminoácido antagonista, o Ser307 e Glu306, que está afastando o composto do sítio de ligação interagindo de forma repulsiva com o ligante.

A Fisostigmina apresenta interações do tipo convencional de hidrogênio entre o hidrogênio do nitrogênio do carbamato e a porção Ser304 e entre o oxigênio e a porção Glu306. Além disso, a molécula apresenta interações do tipo  $\pi$ -alquil entre o anel aromático e a porção Leu305 e interações do tipo alquil entre as metilas e a porção Ile296 e Leu305.

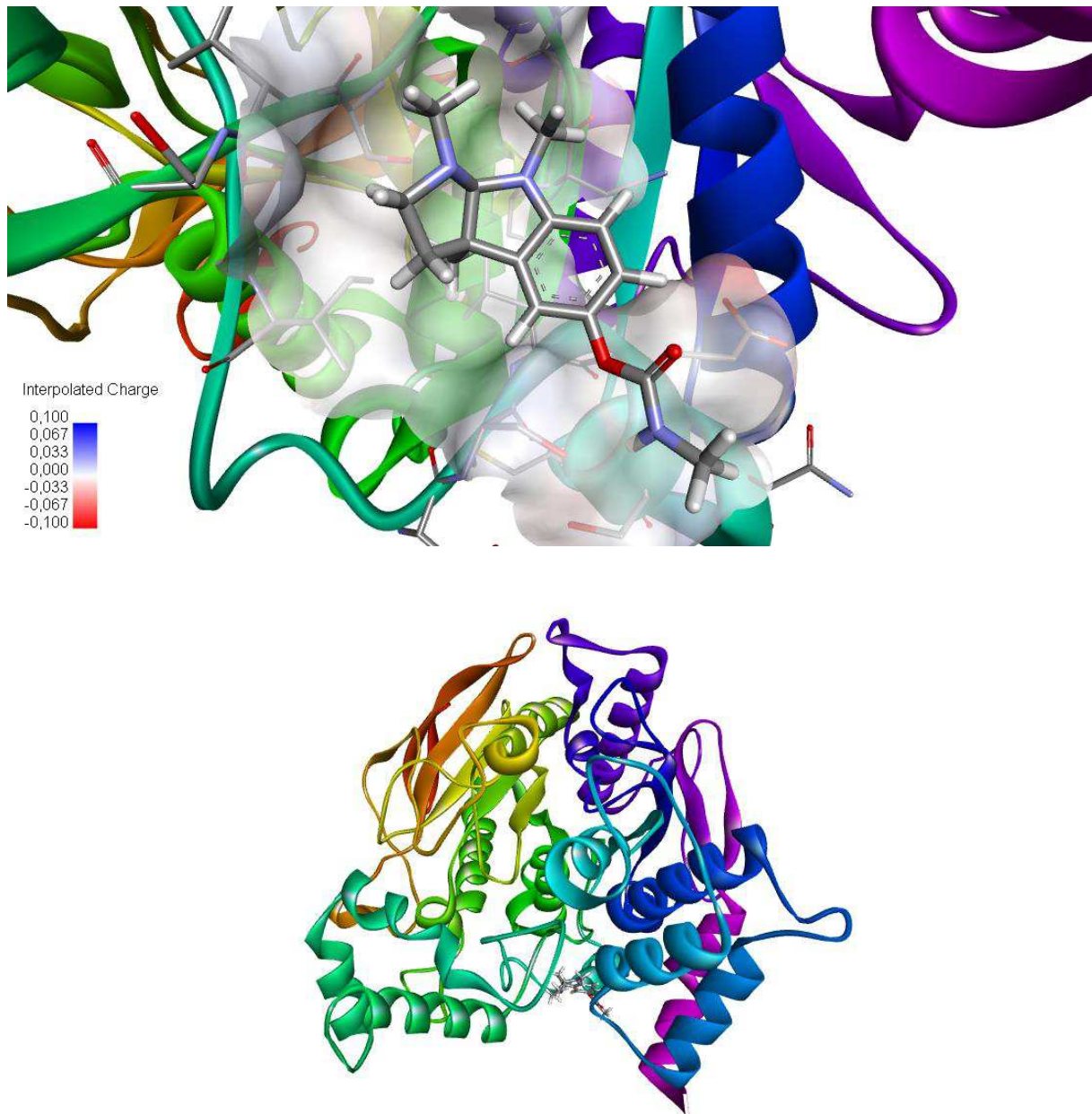
Figura 28. Visualização 2D do composto Fisostigmina e os resíduos de 1EA5 de maior interação.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Com a utilização do *Discovery Studio* pode-se verificar a nuvem eletrostática entre o receptor 1EA5 e o fármaco de Fisostigmina. Nota-se que o local de ancoramento localiza-se em uma região positiva e zonas com picos eletrostáticos, alguns dos aminoácidos responsáveis por essa variação, são eles: Glu73 e o Pro76, como apresenta a Figura 29.

Figura 29. Nuvem eletrostática da interação receptor com Fisostigmina.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Estudo realizados por Marques e colaboradores (2011) evidenciaram que a Fisostigmina também considerado como Eserina foi o primeiro inibidor da AChE investigado no tratamento da doença do Alzheimer (DA) Sua função, mesmo que reversível é inibir a enzima AChE, testado no tratamento DA sendo capaz de atravessar a barreira hematoencefálica com tempo de meia vida curta e um pequeno índice terapêutico, também é utilizado no tratamento da glaucoma.

## Memantina

Na Tabela 7 demonstra a energia livre de ligação dos diferentes complexos, entre eles: Flexível, Rígido e Torção. O complexo Flexível apresentou energia de -10.23 a -7.74 kcal/mol. No complexo torção de -9.88 a -8.08 kcal/mol. Já o Rígido apresentou energia livre de ligação melhor, comparado aos outros valores. Isso mostra que a Memantina se mostra como um dos fármacos que se destacam em energia livre de ligação com valores negativos (-10.48 a -8.16 Kcal/mol).

Tabela 7. Energia de ligação (Kcal/mol) da Memantina estimada pelo programa ArgusLab.

<b>Complexo Flexível</b>	<b>Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)</b>	<b>Complexo Rígido</b>	<b>Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)</b>	<b>Complexo Torção</b>	<b>Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)</b>
<b>1</b>	- 10.23	<b>1</b>	- 10.48	<b>1</b>	- 9.88
<b>2</b>	- 8.97	<b>2</b>	- 10.18	<b>2</b>	- 9.30
<b>3</b>	- 8.87	<b>3</b>	- 9.32	<b>3</b>	- 9.10
<b>4</b>	- 8.85	<b>4</b>	- 9.18	<b>4</b>	- 8.97
<b>5</b>	- 8.79	<b>5</b>	- 9.08	<b>5</b>	- 8.82
<b>6</b>	- 8.75	<b>6</b>	- 9.07	<b>6</b>	- 8.80
<b>7</b>	- 8.53	<b>7</b>	- 9.02	<b>7</b>	- 8.62
<b>8</b>	- 8.49	<b>8</b>	- 8.75	<b>8</b>	- 8.39
<b>9</b>	- 8.15	<b>9</b>	- 8.59	<b>9</b>	- 8.16

<b>10</b>	- 8.10	<b>10</b>	- 8.50	<b>10</b>	- 8.09
<b>11</b>	- 7.74	<b>11</b>	- 8.16	<b>11</b>	- 8.08

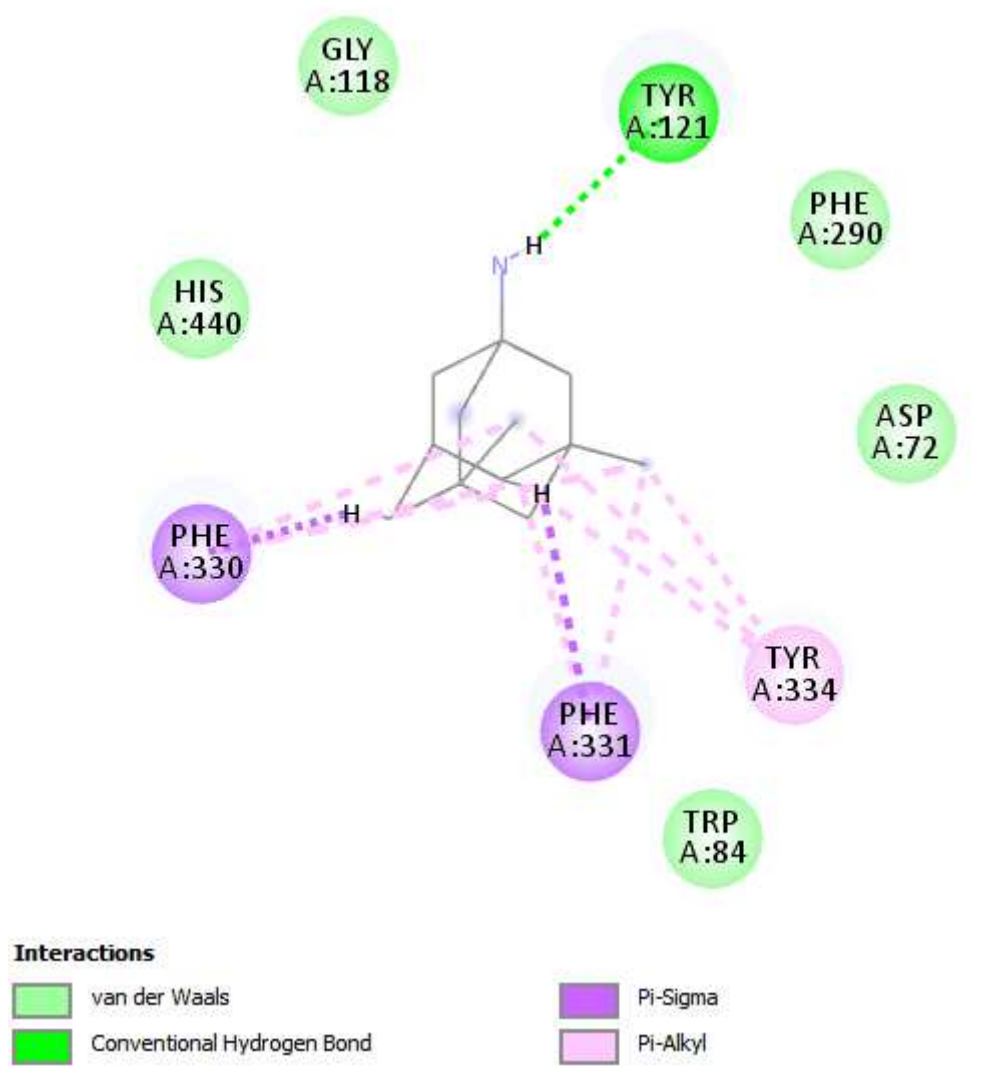
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

A interação do receptor-ligante ocorreu a partir das ligações  $\pi$  e ligações fracas associadas às forças de Van der Waals e Ligações de hidrogênio, considerando também o antagonista (cor vermelha) que tem a função de repulsão entre as ligações com os resíduos de aminoácidos interagindo ao mesmo tempo e se afastando do ligante ao sítio ativo.

O aminoácido Tyr121 se destaca apresentando pontes de hidrogênio, uma força mais intensa na região do ligante. É considerado um dos aminoácidos que estão participando do sítio ativo da proteína. O Trp84, Asp72, His440 apesar de participar também do sítio ativo da proteína, nessa região apresenta ligação de Van der Waals e estão livremente ao redor da droga.

O Phe330 e Phe331 desenvolvem ligação  $\pi$  na região central do ligante exercendo também interação a ligação covalente.

Figura 30. Visualização 2D do composto Memantina e os resíduos de 1EA5 de maior interação.



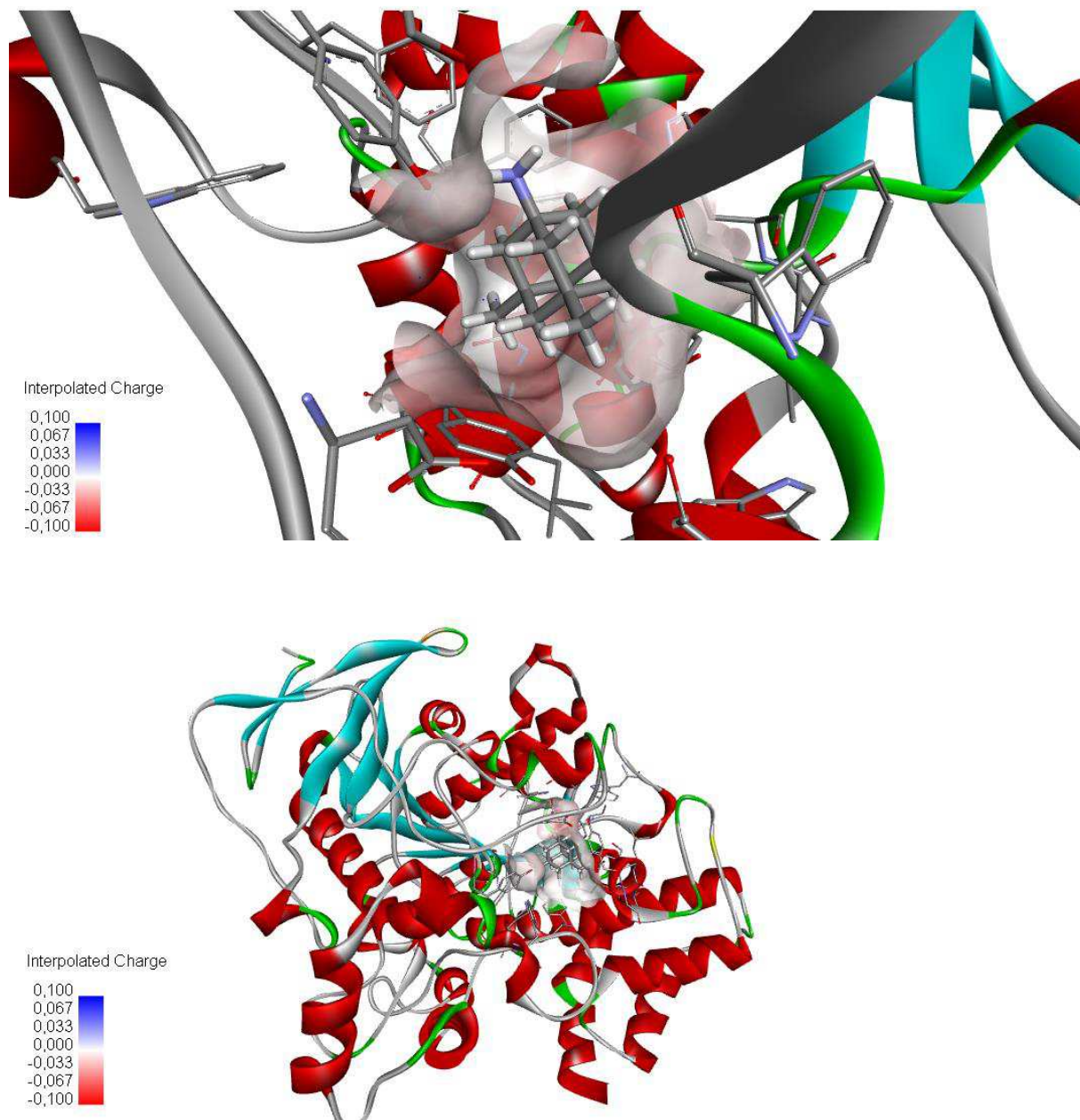
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

A Memantina apresenta interações do tipo  $\pi$ -sigma entre os hidrogênios do biciclo e as porções Phe330 e Phe331 além de interações do tipo convencional de hidrogênio entre o hidrogênio da função amina e a porção Tyr121, além de interações  $\pi$ -alquil com porções de Tyr334 e Phe330.

Na visualização da nuvem eletrostática da interação da AChE-Memantina, se obteve uma região eletronegativa sendo elas: Tyr121, Phe330 e Phe331. Na região neutra os aminoácidos Phe290, Asp72, Trp84, His440. Sendo assim, apesar de demonstrar pouca

eletronegatividade, os aminoácidos do sítio ativo estão participando da interação e também podem ser considerados essenciais no processo.

Figura 31. Nuvem eletrostática da interação receptor com Memantina.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

## DETERMINAÇÃO ENERGÉTICA DOS AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA-LIGANTE OBTIDA PELO MÉTODO DE FRACIONAMENTO MOLECULAR DE CAPS CONJUGADOS (MFCC)

Os aminoácidos que apresentaram distância maior de 12 Å foram desconsiderados para a etapa de realização dos cálculos utilizando MFCC. Através dos cálculos de Mecânica do MFCC, as energias de interação entre o receptor 1EA5 da acetilcolinesterase e os ligantes foram determinados.

### Tacrina

Com a simulação de docking molecular entre a Tacrina e o receptor 1EA5 é possível notar na Tabela 8, um sistema a nível quântico em todas as possíveis conformações de menor energia onde o atracamento molecular está complexado a um raio de 12 Å, essa afirmação é evidenciada nos valores negativos de cada resíduo de aminoácido fracionado. A partir desses resultados, o valor energético ou Energia livre de ligação foi de -0.10 kcal/mol.

Utilizando o sistema AchE-Tacrina foi possível calcular as distâncias entre o centro geométrico dos resíduos de aminoácidos até o centro geométrico do ligante, para definir quem seriam os aminoácidos que estariam dentro da esfera do complexo num raio de corte de 12Å.

Com somatório da energia de interação obtida em cada uma das ligações, têm a energia total da interação da Tacrina com a AChE por intermédio de propriedades quânticas, essa energia total é - 0,10 eV.

Tabela 8. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com ligante tacrina, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol.

$R_i$	$R_{i-1} R_i R_{i+1} +L$	$R_{i-1} R_i R_{i+1}$	$R_{i-1} R_{i+1} +L$	$R_{i-1} R_{i+1}$	$E_i (R_i \rightarrow L)$
<b>ALA201</b>	-1.39E+03	-7.78E+02	-1.14E+03	-5.32E+02	<b>0,36</b>
<b>GLU199</b>	-1,62E+03	-1,01E+03	-1,14E+03	-5,32E+02	<b>-1,31</b>
<b>GLU327</b>	-1,77E+03	-1,16E+03	-1,30E+03	-6,88E+02	<b>-2,68</b>

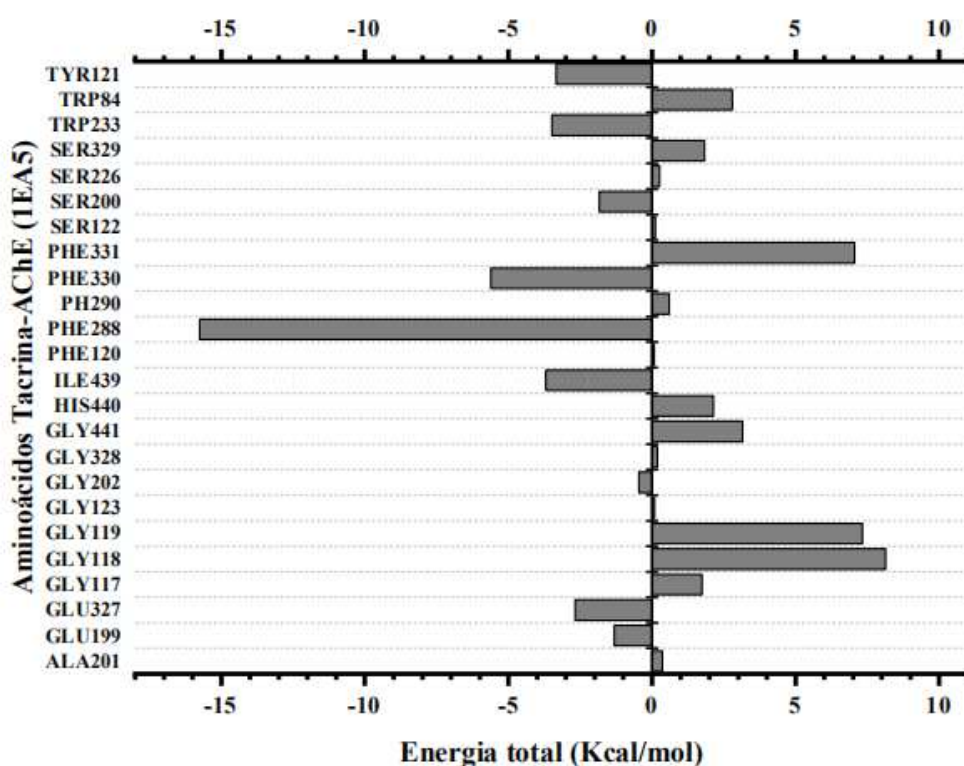


<b>GLY117</b>	-1,64E+03	-1,03E+03	-1,43E+03	-8,19E+02	<b>1,74</b>
<b>GLY118</b>	-1,24E+03	-6,24E+02	-1,03E+03	-4,18E+02	<b>8,13</b>
<b>GLY119</b>	-1,51E+03	-8,94E+02	-1,30E+03	-6,88E+02	<b>7,32</b>
<b>GLY123</b>	-1,62E+03	-1,01E+03	-1,41E+03	-7,98E+02	<b>0,09</b>
<b>GLY202</b>	-1,39E+03	-7,79E+02	-1,18E+03	-5,71E+02	<b>-0,46</b>
<b>GLY328</b>	-1,62E+03	-1,00E+03	-1,41E+03	-7,98E+02	<b>0,18</b>
<b>GLY441</b>	-1,85E+03	-1,23E+03	-1,64E+03	-1,03E+03	<b>3,15</b>
<b>HIS440</b>	-1,66E+03	-1,05E+03	-1,19E+03	-5,75E+02	<b>2,13</b>
<b>ILE439</b>	-1,93E+03	-1,32E+03	-1,56E+03	-9,52E+02	<b>-3,70</b>
<b>PHE120</b>	-1,85E+03	-1,24E+03	-1,38E+03	-7,63E+02	<b>0,08</b>
<b>PHE288</b>	-2,18E+03	-1,57E+03	-1,70E+03	-1,09E+03	<b>-15,75</b>
<b>PHE290</b>	-2,04E+03	-1,43E+03	-1,57E+03	-9,54E+02	<b>0,59</b>
<b>PHE330</b>	-1,89E+03	-1,28E+03	-1,41E+03	-8,02E+02	<b>-5,61</b>
<b>PHE331</b>	-1,93E+03	-1,32E+03	-1,46E+03	-8,45E+02	<b>7,05</b>
<b>SER122</b>	-1,70E+03	-1,08E+03	-1,38E+03	-7,63E+02	<b>0,12</b>
<b>SER200</b>	-1,66E+03	-1,04E+03	-1,34E+03	-7,23E+02	<b>-1,83</b>
<b>SER226</b>	-1,75E+03	-1,14E+03	-1,43E+03	-8,19E+02	<b>0,27</b>
<b>SER329</b>	-1,62E+03	-1,01E+03	-1,30E+03	-6,88E+02	<b>1,82</b>
<b>TRP233</b>	-2,02E+03	-1,41E+03	-1,41E+03	-8,02E+02	<b>-3,49</b>
<b>TRP84</b>	-2,15E+03	-1,54E+03	-1,55E+03	-9,33E+02	<b>2,79</b>
<b>TYR121</b>	-1,97E+03	-1,35E+03	-1,41E+03	-8,02E+02	<b>-3,34</b>

Fonte: dados da pesquisa, 2020.

Esse resultado demonstra interação energética dos aminoácidos presentes na acetilcolinesterase dentro da esfera de corte, obtendo valor energético em cada um dos fragmentos. Os resíduos apresentam maior ligação e maior afinidade ao sistema, como também, apresenta o quanto um aminoácido contribui para realização da ligação. Os aminoácidos que participam da ligação demonstra melhor atração energética, se destacando os aminoácidos Phe330, Ile439, Trp233 e Tyr121 e entre outros.

Gráfico 1. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com o ligante Tacrina.



Fonte: dados da pesquisa, 2020.

O Gráfico 1 demonstra todos os aminoácidos que se destacam na importância de interação com o receptor da acetilcolinesterase (1EA5) e o composto Tacrina, estes foram: Trp233, Ser329, Ser226, Ser200, Ser122, Phe331, Phe330, Phe290, Phe288, Phe120, Ile439, His440, Gly441, Gly328, Gly202, Gly123, Gly119, Gly118, Gly117, Glu327, Glu199 e Ala201.

De acordo com as análises, os aminoácidos que menos interagiram foram Gly118, Gly119 e Phe331, que obtiveram energia total de 8,13 Kcal/mol, 7,32 Kcal/mol, 7,05 Kcal/mol, respectivamente evidenciando repulsão eletrostática pelo ligante, isso mostra, que mesmo dentro de um raio de 12 Å do centro do ligante, indica que essa variável de distância nem sempre é primordial para atratividade das moléculas. Por outro lado, os que mais se destacaram apresentando melhor interação com a Tacrina foram Phe288 com -15,75 Kcal/mol , Phe330 com -5,61 Kcal/mol e Ile439 com -3,70 Kcal/mol.

O aminoácido que teve melhor atração eletrostática foi o Phe288 com -15,75 Kcal/mol. Com a realização de cálculos quânticos foi possível perceber a influência de cada resíduo de aminoácido na ligação, sendo elas: Phe288 contribui com 664,5%, Phe330 com 236,7%, Ile439 com 156%, Trp233 com 147% e Tyr121 com 141%.

#### Donepezil

Após a realização somatória da energia de interação em cada uma das ligações destacadas, têm a energia total da interação do Donepezil com a AChE por meio de propriedades quânticas, essa energia total é - 1,20 eV. Com a realização de cálculos quânticos foi possível perceber a influência de cada resíduo de aminoácido na ligação, sendo elas:

Tabela 9. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com ligante Donepezil, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol.

<b>R<sub>i</sub></b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i</sub> R<sub>i+1</sub> +L</b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i</sub> R<sub>i+1</sub></b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i+1</sub> +L</b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i+1</sub></b>	<b>E<sub>i</sub> (R<sub>i</sub>→ L)</b>
<b>ASN85</b>	-2,44E+03	-1,23E+03	-2,03E+03	-8,19E+02	<b>-8,20</b>
<b>ASP72</b>	-2,44E+03	-1,23E+03	-2,01E+03	-7,99E+02	<b>-6,85</b>
<b>GLY117</b>	-2,04E+03	-8,33E+02	-1,84E+03	-6,25E+02	<b>-0,91</b>
<b>GLY118</b>	-1,83E+03	-6,24E+02	-1,63E+03	-4,18E+02	<b>-9,14</b>
<b>GLY119</b>	-2,18E+03	-9,70E+02	-1,97E+03	-7,63E+02	<b>-5,16</b>
<b>GLY328</b>	-2,22E+03	-1,01E+03	-2,01E+03	-8,02E+02	<b>-0,62</b>
<b>GLY441</b>	-2,44E+03	-1,23E+03	-2,24E+03	-1,03E+03	<b>-3,15</b>
<b>GLY80</b>	-2,44E+03	-1,23E+03	-2,03E+03	-8,19E+02	<b>-6,10</b>

<b>HIS440</b>	-2,25E+03	-1,04E+03	-1,78E+03	-5,72E+02	<b>-0,42</b>
<b>MET83</b>	-3,02E+03	-1,81E+03	-2,29E+03	-1,08E+03	<b>-18,27</b>
<b>PHE288</b>	-2,58E+03	-1,37E+03	-2,11E+03	-8,94E+02	<b>-0,34</b>
<b>PHE330</b>	-2,49E+03	-1,28E+03	-2,01E+03	-8,00E+02	<b>12,77</b>
<b>PHE331</b>	-2,72E+03	-1,51E+03	-2,24E+03	-1,03E+03	<b>-4,41</b>
<b>SER122</b>	-2,29E+03	-1,08E+03	-1,97E+03	-7,63E+02	<b>-2,65</b>
<b>SER123</b>	-2,06E+03	-8,54E+02	-1,86E+03	-6,46E+02	<b>3,51</b>
<b>SER200</b>	-2,22E+03	-1,01E+03	-1,90E+03	-6,88E+02	<b>-3,99</b>
<b>SER329</b>	-2,22E+03	-1,01E+03	-1,90E+03	-6,88E+02	<b>-2,84</b>
<b>SER81</b>	-2,47E+03	-1,26E+03	-2,14E+03	-9,33E+02	<b>-3,24</b>
<b>TRP84</b>	-2,96E+03	-1,75E+03	-2,35E+03	-1,14E+03	<b>0,00</b>
<b>TYR121</b>	-2,30E+03	-1,08E+03	-1,74E+03	-5,32E+02	<b>16,26</b>
<b>TYR334</b>	-2,72E+03	-1,51E+03	-2,16E+03	-9,52E+02	<b>7,97</b>
<b>TYR70</b>	-2,54E+03	-1,33E+03	-1,99E+03	-7,82E+02	<b>8,34</b>
<b>VAL71</b>	-2,52E+03	-1,31E+03	-2,20E+03	-9,90E+02	<b>-0,46</b>

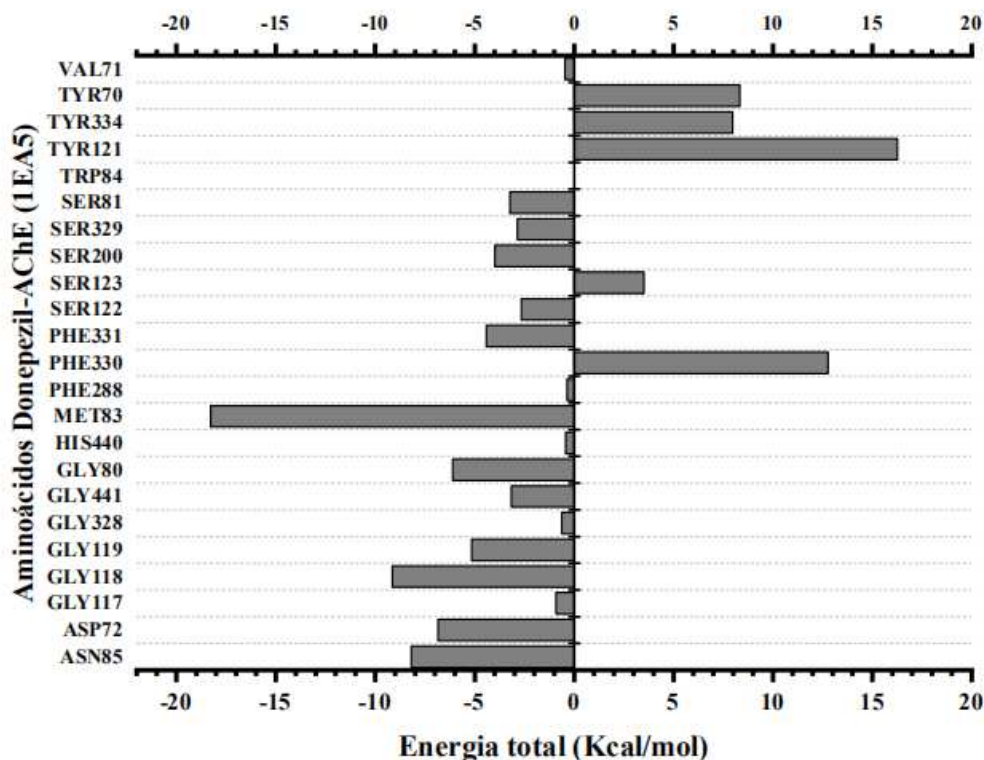
Fonte: dados da pesquisa, 2020.

O Gráfico 2 demonstra todos os aminoácidos que se destacam na importância de interação com o receptor da acetilcolinesterase (1EA5) e o composto Donepezil, estes foram: Asn85, Asp72, Gly117, Gly118, Gly119, Gly328, Gly441, Gly80, His440, Met83, Phe288, Phe330, Phe331, Ser122, Ser123, Ser200, Ser329, Ser81, Trp84, Tyr121, Tyr334, Tyr70, Val71.

As análises dos aminoácidos que menos interagiram foram Tyr121, Tyr334, Tyr70, Phe330, Ser123, que obtiveram energia total de 16,26 kcal/mol, 7,97 kcal/mol, 12,77 kcal/mol, 3,51 Kcal/mol respectivamente,

Os que mais se destacaram apresentando melhor interação com a Donepezil foram Met83 com -18,27 kcal/mol, Gly118 com -9,32 kcal/mol e kcal/mol, Gly80 -6,10 Kcal/mol e Gly119 com -4,53 kcal/mol.

Gráfico 2. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com o ligante Donepezil.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Baseando-se nesta evidência, podemos salientar que o Met83 (Metionina) foi o aminoácido com maior energia de atratividade com o ligante, sua representação foi de 81,60% na ligação entre a proteína AChE e o Donepezil, o segundo aminoácido de maior participação foi a Gly8 (glicina) com 31%, Asp72 (ácido aspártico) com 22,33%.

Galantamina

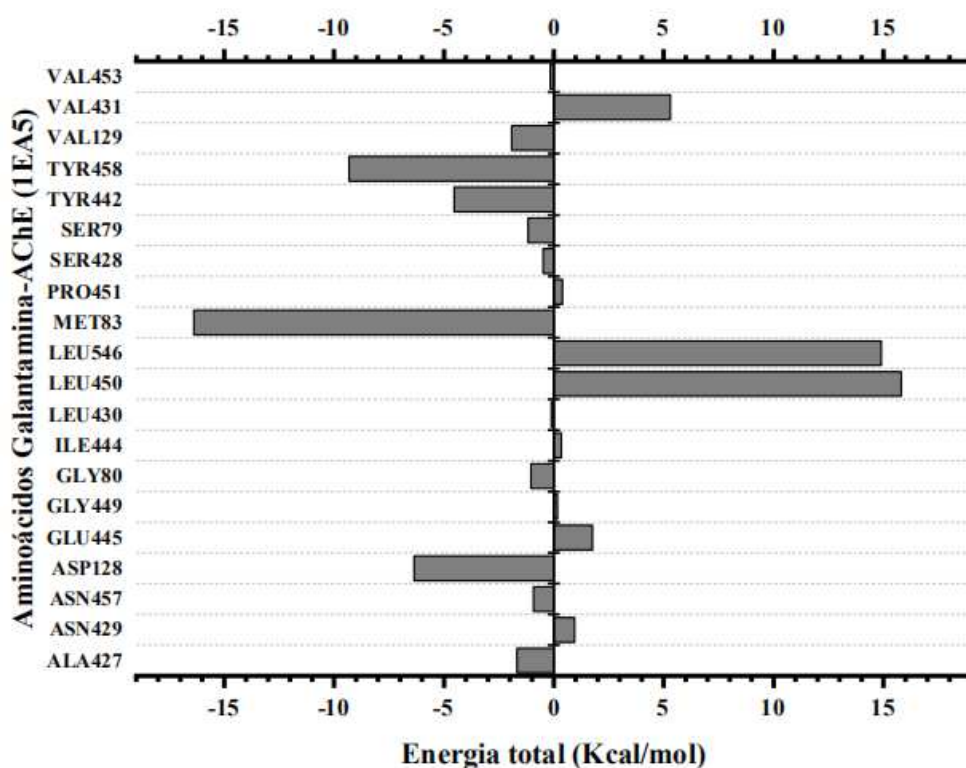
Após o fracionamento energético em cada uma das ligações, obteve-se a energia total da interação da galantamina-AChE por meio de propriedades quânticas desse complexo, essa energia total é -0,19 eV. Com a realização de cálculos quânticos foi possível notar a influência de cada resíduo de aminoácido na ligação, sendo elas:

Tabela 10. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com ligante Galantamina, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol.

<b>R<sub>i</sub></b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i</sub> R<sub>i+1</sub> +L</b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i</sub> R<sub>i+1</sub></b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i+1</sub> +L</b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i+1</sub></b>	<b>E<sub>i</sub> (R<sub>i</sub>→ L)</b>
<b>ALA427</b>	-2,04E+03	-1,10E+03	-1,79E+03	-8,53E+02	<b>-1,86</b>
<b>ASN429</b>	-2,04E+03	-1,10E+03	-1,63E+03	-6,89E+02	<b>0,94</b>
<b>ASN457</b>	-2,27E+03	-1,33E+03	-1,86E+03	-9,20E+02	<b>0,92</b>
<b>ASP128</b>	-2,07E+03	-1,13E+03	-1,63E+03	-6,93E+02	<b>-6,38</b>
<b>GLU445</b>	-2,26E+03	-1,32E+03	-1,78E+03	-8,45E+02	<b>1,76</b>
<b>GLY449</b>	-1,99E+03	-1,05E+03	-1,78E+03	-8,45E+02	<b>0,16</b>
<b>GLY80</b>	-1,79E+03	-8,53E+02	-1,59E+03	-6,47E+02	<b>-1,03</b>
<b>ILE444</b>	-2,25E+03	-1,31E+03	-1,89E+03	-9,50E+02	<b>0,34</b>
<b>LEU430</b>	-2,05E+03	-1,11E+03	-1,68E+03	-7,43E+02	<b>-0,11</b>
<b>LEU450</b>	-1,84E+03	-8,98E+02	-1,47E+03	-5,34E+02	<b>15,81</b>
<b>LEU456</b>	-2,19E+03	-1,26E+03	-1,83E+03	-8,92E+02	<b>14,90</b>
<b>MET83</b>	-2,75E+03	-1,81E+03	-2,03E+03	-1,09E+03	<b>-16,38</b>
<b>PRO451</b>	-1,99E+03	-1,05E+03	-1,67E+03	-7,32E+02	<b>0,39</b>
<b>SER428</b>	-1,93E+03	-9,86E+02	-1,60E+03	-6,65E+02	<b>-0,49</b>
<b>SER79</b>	-1,95E+03	-1,01E+03	-1,63E+03	-6,88E+02	<b>-1,18</b>
<b>TYR442</b>	-2,18E+03	-1,24E+03	-1,62E+03	-6,84E+02	<b>-4,53</b>
<b>TYR458</b>	-2,27E+03	-1,33E+03	-1,72E+03	-7,79E+02	<b>-9,32</b>
<b>VAL129</b>	-2,25E+03	-1,31E+03	-1,93E+03	-9,90E+02	<b>-1,92</b>
<b>VAL431</b>	-2,24E+03	-1,30E+03	-1,92E+03	-9,76E+02	<b>5,30</b>
<b>VAL453</b>	-1,92E+03	-9,78E+02	-1,59E+03	-6,53E+02	<b>-0,16</b>

Fonte: dados da pesquisa, 2020.

Gráfico 3. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com o ligante Galantamina.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Os aminoácidos que mais apresentaram atividade na interação com o receptor 1EA5 da AChE e o composto Galantamina de acordo com o Gráfico 3, são: Val543, Val431, Val129, Tyr458, Tyr442, Ser79, Ser428, Pro451, Met83, Leu546, Leu450, Leu430, Ile444, Gly80, Gly449, Glu445, Asp128, Asn457, Asn429 e Ala427.

Os aminoácidos que menos interagiram foram Leu546, Leu450 e Val431 que obtiveram energia total de 15,81 Kcal/mol, 14,90 Kcal/mol, 5,30 Kcal/mol, respectivamente evidenciando repulsão eletrostática pelo ligante. Por outro lado, os que mais se destacaram apresentando melhor interação com a Donepezil foram Met83 com -16,38 Kcal/mol, Tyr458 com -9,32 Kcal/mol e Asp128 com -6,38 Kcal/mol e Tyr442 com -4,53 Kcal/mol.

O aminoácido que teve melhor atração eletrostática foi o Met83 (metionina) com -16,38 Kcal/mol, sendo responsável por 365,6% entre a interação do receptor 1EA5 da AChE com o Galantamina. Seguindo Tyr458 com 208%, Asp128 com 142% E Tyr442 com 101,1%.

## Rivastigmina

Após o fracionamento energético em cada uma das ligações, obteve-se a energia total da interação da Rivastigmina-AChE por meio de propriedades quânticas desse complexo, essa energia total é - 1,57 eV. Com a realização de cálculos quânticos foi possível notar a influência de cada resíduo de aminoácido na ligação, sendo elas:

Tabela 11. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com ligante Rivastigmina, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol.

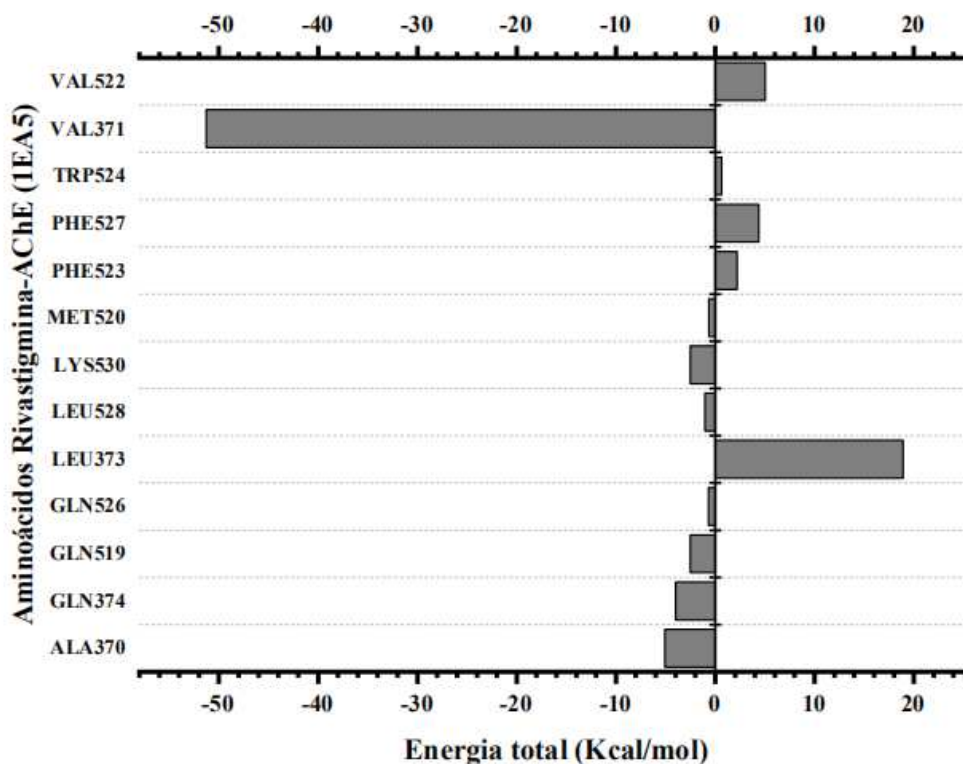
<b>R<sub>I</sub></b>	<b>R<sub>I-1</sub> R<sub>I</sub> R<sub>I+1</sub> +L</b>	<b>R<sub>I-1</sub> R<sub>I</sub> R<sub>I+1</sub></b>	<b>R<sub>I-1</sub> R<sub>I+1</sub> +L</b>	<b>R<sub>I-1</sub> R<sub>I+1</sub></b>	<b>E<sub>I</sub> (R<sub>I</sub>→ L)</b>
<b>ALA370</b>	-1,91E+03	-1,01E+03	-1,66E+03	-7,62E+02	<b>-5,08</b>
<b>GLN374</b>	-2,27E+03	-1,37E+03	-1,82E+03	-9,20E+02	<b>-4,00</b>
<b>GLN519</b>	-2,40E+03	-1,50E+03	-1,95E+03	-1,05E+03	<b>-2,52</b>
<b>GLN526</b>	-2,25E+03	-1,35E+03	-1,79E+03	-8,96E+02	<b>-0,69</b>
<b>LEU373</b>	-2,08E+03	-1,18E+03	-1,72E+03	-8,18E+02	<b>18,90</b>
<b>LEU528</b>	-2,07E+03	-1,17E+03	-1,70E+03	-8,04E+02	<b>-1,04</b>
<b>LYS530</b>	-1,91E+03	-1,02E+03	-1,59E+03	-6,91E+02	<b>-2,50</b>
<b>MET520</b>	-2,72E+03	-1,82E+03	-2,00E+03	-1,10E+03	<b>-0,63</b>
<b>PHE523</b>	-2,31E+03	-1,41E+03	-1,83E+03	-9,37E+02	<b>2,18</b>
<b>PHE527</b>	-2,20E+03	-1,30E+03	-1,72E+03	-8,22E+02	<b>4,40</b>
<b>TRP524</b>	-2,40E+03	-1,50E+03	-1,79E+03	-8,96E+02	<b>0,65</b>
<b>VAL371</b>	-1,83E+03	-9,35E+02	-1,51E+03	-6,11E+02	<b>-51,29</b>
<b>VAL522</b>	-2,35E+03	-1,45E+03	-2,02E+03	-1,12E+03	<b>5,04</b>

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Em termos de porcentagem, os três aminoácidos mais importantes para a ligação entre a AChE e a Rivastigmina é o Val371 (valina) com 140%, seguido da Ala370 (alanina) 13,80% e Gln526 (glutamina) com 1,88% de energia.



Gráfico 4. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com o ligante Rivastigmina.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Na interação com o receptor 1EA5 da AChE e o composto Rivastigmina demonstra os aminoácidos que mais apresentaram atividade, que são: Val522, Val371, Trp524, Phe527, Phe523, Met520, Lys530, Leu528, Leu373, Gln526, Gln519, Gln374 e Ala370.

Os aminoácidos que menos interagiram foram Leu373, Val522 e Phe527 que obtiveram energia total de 18,90 Kcal/mol, 5,04 Kcal/mol, 4,40 Kcal/mol, respectivamente, Isso indicou repulsão eletrostática pelo ligante. Por outro lado, os que mais se destacaram apresentando melhor interação com a Rivastigmina foram Val371 com -51,29 Kcal/mol, Ala370 com -5,08 Kcal/mol e Gln374 com -4,00 Kcal/mol e Gln519 com -2,52 Kcal/mol.

#### Fisostigmina

Após o fracionamento energético em cada uma das ligações, obteve-se a energia total da interação da Fisostigmina-AChE por meio de propriedades quânticas desse complexo, essa

energia total é -1,21 eV. Com a realização de cálculos quânticos se percebeu influência de cada resíduo de aminoácido na ligação.

Tabela 12. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com ligante Fisostigmina, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol.

<b>R<sub>i</sub></b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i</sub> R<sub>i+1</sub> +L</b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i</sub> R<sub>i+1</sub></b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i+1</sub> +L</b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i+1</sub></b>	<b>E<sub>i</sub> (R<sub>i</sub> → L)</b>
<b>ASP72</b>	-2,10E+03	-1,20E+03	-1,66E+03	-7,63E+02	<b>-9,50</b>
<b>GLY117</b>	-1,92E+03	-1,03E+03	-1,72E+03	-8,19E+02	<b>-2,87</b>
<b>GLY118</b>	-1,52E+03	-6,24E+02	-1,32E+03	-4,18E+02	<b>-2,30</b>
<b>GLY119</b>	-1,87E+03	-9,70E+02	-1,66E+03	-7,63E+02	<b>-1,35</b>
<b>GLY328</b>	-1,91E+03	-1,01E+03	-1,70E+03	-8,02E+02	<b>0,21</b>
<b>GLY441</b>	-2,13E+03	-1,23E+03	-1,92E+03	-1,03E+03	<b>16,38</b>
<b>HIS440</b>	-1,94E+03	-1,05E+03	-1,47E+03	-5,75E+02	<b>10,95</b>
<b>ILE287</b>	-2,06E+03	-1,17E+03	-1,70E+03	-8,02E+02	<b>-1,53</b>
<b>ILE439</b>	-2,29E+03	-1,39E+03	-1,92E+03	-1,03E+03	<b>5,04</b>
<b>LEU333</b>	-2,29E+03	-1,40E+03	-1,93E+03	-1,03E+03	<b>2,52</b>
<b>MET83</b>	-2,55E+03	-1,66E+03	-1,83E+03	-9,33E+02	<b>-19,37</b>
<b>PHE288</b>	-2,22E+03	-1,32E+03	-1,74E+03	-8,45E+02	<b>-22,95</b>
<b>PHE330</b>	-2,33E+03	-1,44E+03	-1,86E+03	-9,58E+02	<b>-2,91</b>
<b>PHE331</b>	-2,22E+03	-1,32E+03	-1,74E+03	-8,45E+02	<b>-1,05</b>
<b>SER122</b>	-2,10E+03	-1,20E+03	-1,77E+03	-8,77E+02	<b>-1,25</b>
<b>SER200</b>	-1,91E+03	-1,01E+03	-1,59E+03	-6,89E+02	<b>-1,16</b>
<b>SER329</b>	-1,91E+03	-1,01E+03	-1,59E+03	-6,88E+02	<b>-3,02</b>
<b>SER81</b>	-2,38E+03	-1,48E+03	-2,06E+03	-1,16E+03	<b>-0,63</b>
<b>TRP84</b>	-2,44E+03	-1,54E+03	-1,83E+03	-9,33E+02	<b>1,23</b>
<b>TYR121</b>	-1,98E+03	-1,08E+03	-1,43E+03	-5,32E+02	<b>6,05</b>

<b>TYR334</b>	-2,18E+03	-1,28E+03	-1,63E+03	-7,32E+02	<b>0,30</b>
<b>TYR70</b>	-2,23E+03	-1,33E+03	-1,68E+03	-7,82E+02	<b>-1,65</b>

Fonte: dados da pesquisa, 2020.

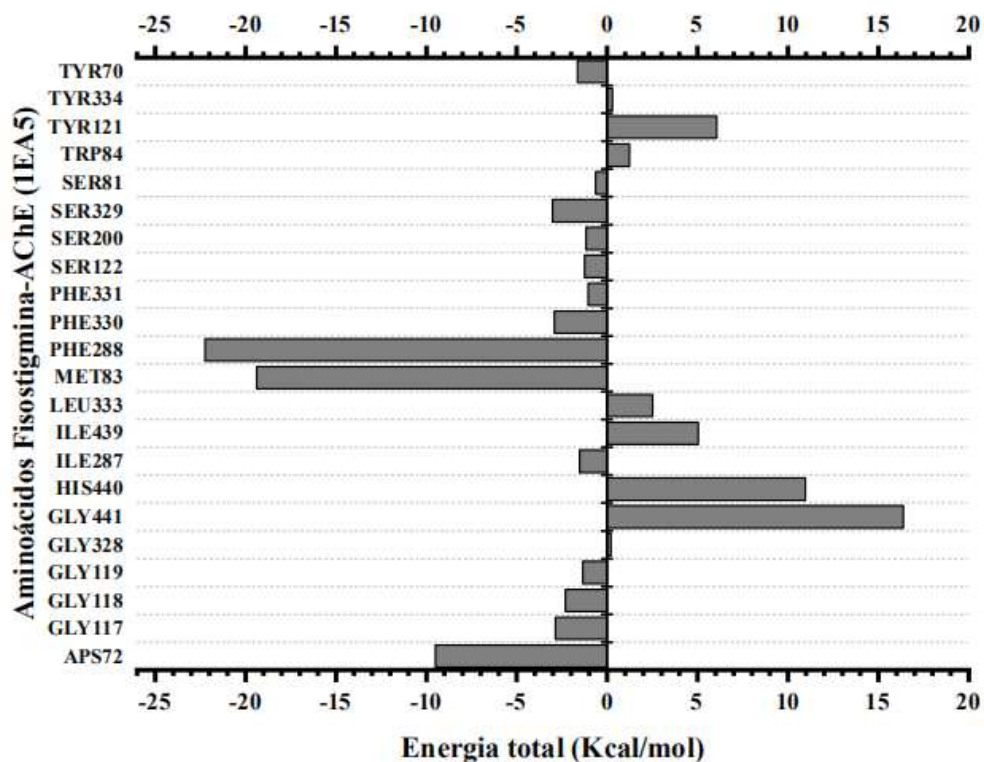
De acordo com a Tabela 12 os aminoácidos que apresentaram interações atrativas e repulsivas com relação ao ligante Fisostigmina pelo receptor 1EA5. Esses dados demonstram uma alta especificidade no sítio ativo do receptor e os principais aminoácidos que participam dessa interação energética total (Kcal/mol).

Na interação com o receptor 1EA5 da AChE e o composto Fisostigmina no Gráfico 5 os aminoácidos que mais apresentaram atividade, que são: Tyr70, Tyr334, Tyr121, Trp84, Ser81, Ser329, Ser200, Ser122, Phe331, Phe330, Phe288, Met83, Leu333, Ile439, Ile287, His440, Gly441, Gly328, Gly119, Gly118, Gly117 e Asp72.

Os aminoácidos que menos interagiram foram Leu373, Val522 e Phe527 que obtiveram energia total de 18,90 Kcal/mol, 5,04 Kcal/mol, 4,40 Kcal/mol, respectivamente evidenciando repulsão eletrostática pelo ligante, isso implica, que mesmo dentro de um raio de 12 Å do centro do ligante, indica que essa variável de distância nem sempre é primordial para atratividade das moléculas. Por outro lado, os que mais se destacaram apresentando melhor interação com a Rivastigmina foram Val371 com -51,29 Kcal/mol, Ala370 com -5,08 Kcal/mol e Gln374 com -4,00 Kcal/mol.

O aminoácido que teve melhor atração eletrostática foi o Val371 (valina) com -51,29 Kcal/mol sendo responsável por 13,08% entre a interação do receptor 1EA5 da AChE com a Fisostigmina. Seguido de Ala370 (alanina) com -5,08 Kcal/mol com 11,0%.

Gráfico 5. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com o ligante Fisostigmina.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

### Memantina

A energia total da interação da Memantina-AChE, após o fracionamento do complexo, por intermédio de propriedades quânticas, essa energia total é - 0,24 eV. Com a realização de cálculos quânticos foi possível notar a influência de cada resíduo de aminoácido na ligação.

Na interação com o receptor 1EA5 da AChE e o composto Memantina no Gráfico 6 demonstra os aminoácidos que mais apresentaram atividade de inibição e repulsão, que são: Tyr334, Tyr121, Trp84, Ser81, Ser329, Ser122, Phe330, Phe331, Phe288, Met83, Leu333, Leu332, Ile439, Ile287, His440, Gly80, Gly441, Gly335, Gly328, Gly119, Gly118, Gly117 e Asp72.

Tabela 13. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com ligante Memantina, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol.

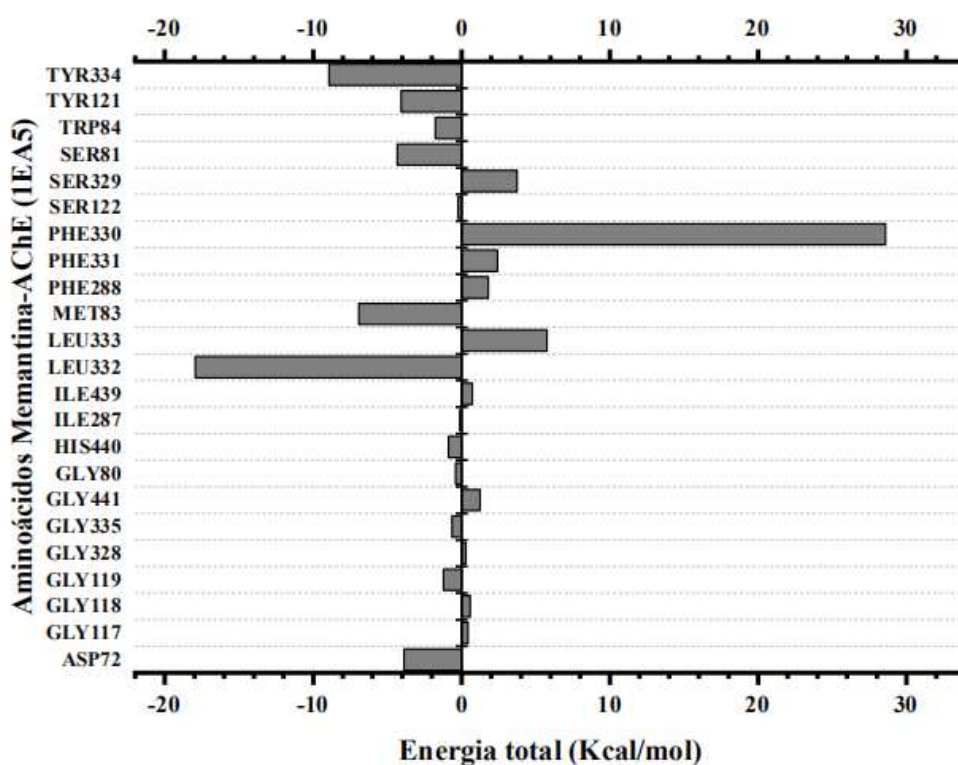
<b>R<sub>i</sub></b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i</sub> R<sub>i+1</sub> +L</b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i</sub> R<sub>i+1</sub></b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i+1</sub> +L</b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i+1</sub></b>	<b>E<sub>i</sub> (R<sub>i</sub>→ L)</b>
<b>ASP72</b>	-1,49E+03	-9,70E+02	-1,06E+03	-5,35E+02	<b>-3,88</b>
<b>GLY117</b>	-1,55E+03	-1,03E+03	-1,34E+03	-8,19E+02	<b>0,44</b>
<b>GLY118</b>	-1,15E+03	-6,24E+02	-9,42E+02	-4,18E+02	<b>0,59</b>
<b>GLY119</b>	-1,49E+03	-9,70E+02	-1,29E+03	-7,63E+02	<b>-1,22</b>
<b>GLY328</b>	-1,53E+03	-1,01E+03	-1,33E+03	-8,02E+02	<b>0,29</b>
<b>GLY335</b>	-1,65E+03	-1,13E+03	-1,44E+03	-9,20E+02	<b>-0,64</b>
<b>GLY441</b>	-1,76E+03	-1,23E+03	-1,55E+03	-1,03E+03	<b>1,26</b>
<b>GLY80</b>	-1,49E+03	-9,67E+02	-1,28E+03	-7,59E+02	<b>-0,39</b>
<b>HIS440</b>	-1,57E+03	-1,05E+03	-1,10E+03	-5,75E+02	<b>-0,89</b>
<b>ILE287</b>	-1,69E+03	-1,17E+03	-1,33E+03	-8,02E+02	<b>-0,11</b>
<b>ILE439</b>	-1,57E+03	-1,05E+03	-1,21E+03	-6,82E+02	<b>0,73</b>
<b>LEU332</b>	-1,73E+03	-1,21E+03	-1,37E+03	-8,45E+02	<b>-17,32</b>
<b>LEU333</b>	-1,81E+03	-1,28E+03	-1,44E+03	-9,20E+02	<b>5,75</b>
<b>MET83</b>	-2,18E+03	-1,66E+03	-1,46E+03	-9,33E+02	<b>-6,93</b>
<b>PHE288</b>	-1,58E+03	-1,05E+03	-1,10E+03	-5,75E+02	<b>1,81</b>
<b>PHE331</b>	-1,84E+03	-1,32E+03	-1,37E+03	-8,45E+02	<b>2,42</b>
<b>PHE330</b>	-1,80E+03	-1,28E+03	-1,33E+03	-8,02E+02	<b>28,59</b>
<b>SER122</b>	-1,77E+03	-1,24E+03	-1,44E+03	-9,20E+02	<b>-0,23</b>
<b>SER329</b>	-1,53E+03	-1,01E+03	-1,21E+03	-6,88E+02	<b>3,75</b>
<b>SER81</b>	-1,78E+03	-1,26E+03	-1,46E+03	-9,33E+02	<b>-4,33</b>
<b>TRP84</b>	-2,07E+03	-1,54E+03	-1,46E+03	-9,33E+02	<b>-1,76</b>
<b>TYR121</b>	-1,61E+03	-1,08E+03	-1,06E+03	-5,32E+02	<b>-4,06</b>

<b>TYR334</b>	-1,65E+03	-1,13E+03	-1,10E+03	-5,75E+02	<b>-8,94</b>
---------------	-----------	-----------	-----------	-----------	--------------

Fonte: dados da pesquisa, 2020.

Os aminoácidos que menos interagiram foram Phe330, Leu333, Ser329 e Phe331 que obtiveram energia total de 28,59 Kcal/mol, 5,75 Kcal/mol, 3,75 Kcal/mol e 2,42 Kcal/mol, respectivamente evidenciando repulsão eletrostática pelo ligante, Por outro lado, os que mais se destacaram apresentando melhor interação com a Memantina foram Leu332 com -17,32 kcal/mol, Met83 com -6,93 kcal/mol e Tyr334 com -8,94 Kkcal/mol.

Gráfico 6. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1EA5 com o ligante Memantina.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Como foi visto, o Leu332 (leucina) foi o aminoácido com maior participação efetiva na atratividade entre o complexo formado pela AChE e o composto Memantina, representando 316% da energia do sistema, os outros dois aminoácidos de maior interação foram o Met83 (metionina) com 122,2% e a Tyr334 (tirosina) com 157,6%.

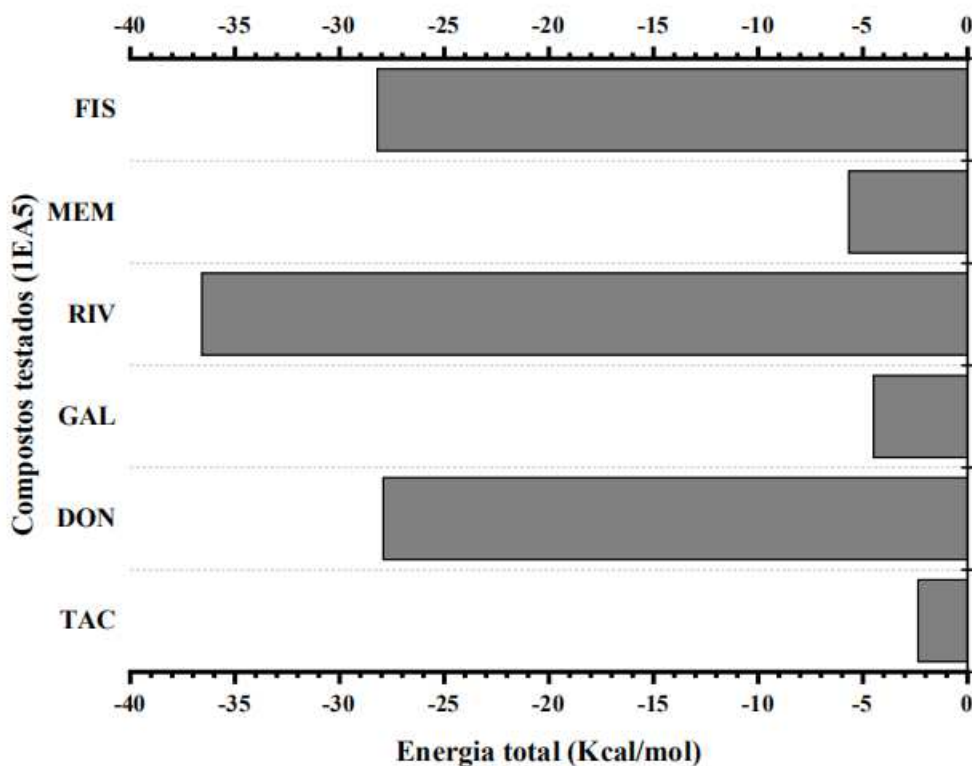
## ENERGIA TOTAL OBTIDA ATRAVÉS DO MÉTODO DE FRACIONAMENTO MOLECULAR DE CAPS E CONJUGADOS (MFCC)

Os cálculos *ab initio* descreve propriedades de transporte eletrônico de junções moleculares (ALBUQUERQUE et al., 2014) A disposição do balanço de energia final  $(E_i(L - R_i) = E(L + C_{1-i} R_i C_{i+1}) - E(C_{1-i} R_i C_{i+1}) - E(L + C_{1-i} C_{i+1}) + E(C_{1-i} C_{i+1}))$  está em evidência no gráfico x, e refletem a contribuição individual de cada aminoácido na interação entre a o receptor da acetilcolinesterase (AChE) e os ligantes (Tacrina, Donepezil, Rivastigmina, Fisostigmina, Galantamina e Memantina).

Como pode ser visto, no gráfico 7, todos os ligantes mostraram eficientes na ligação com receptor, tendo em vista valores negativos satisfatórios em sua energia quântica de ligação. De acordo com os cálculos realizados no balanço energético total a Tacrina obteve -2,37 Kcal/mol, já o Donepezil demonstrou -27,67 Kcal/mol, a Rivastigmina apresentou -36,60 Kcal/mol, Galantamina com -4,38 Kcal/mol, Fisostigmina com -27,90 Kcal/mol.

Logo, o composto que apresentou melhor inibição na interação de energia total (Kcal/mol) com AChE foi o composto da Fisostigmina com -27,90 Kcal/mol e em seguida o Donepezil com -27,67 Kcal/mol com relação ao receptor 1AE5.

Gráfico 7. Compostos testados com os aminoácidos da proteína 1EA5 e sua energia total (Kcal/mol) comparando-se com todos os ligantes.



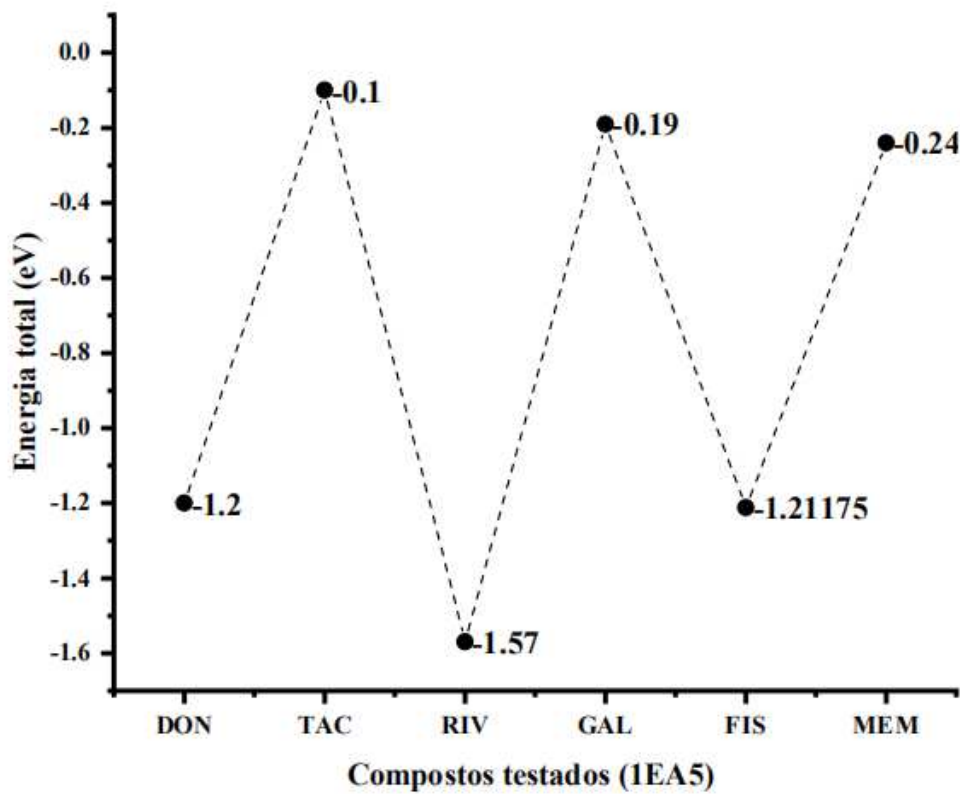
**Fonte:** Dados da pesquisa, 2020.

De acordo com o Gráfico 8 a representação energia total (BFE) em Eletrovolts (eV) demonstra balanço energético. No estudo das ligações químicas entre as moléculas, a partir de -1eV a ligação entre as moléculas pode ser considerada do tipo covalente (JAURIS et. Al, 2015).

O composto da Rivastigmina obteve melhor desempenho com -1,57 eV, já a Fisostigmina com -1,21 eV, o Donepezil com -1,20 eV. Por outro lado, os outros compostos apresentaram valores menores quando comparados aos que tiveram melhor energia, como: Memantina com -0,24 eV, Galantamina com -0,19 eV e Tacrina com 0,10 eV. Com isso, pode-se perceber que todos os compostos demonstraram valores negativamente expressivos, sendo demonstrado quanticamente que os ligantes têm alta afinidade pela proteína.



Gráfico 8. Representação da Energia total (eV) de todos os ligantes ancorados a proteína 1EA5 da AChE.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

## CONCLUSÕES DO 1º RECEPTOR 1EA5

Os resultados dessa pesquisa são promissores, indicando que os seis fármacos apresentaram um potencial anti-Alzheimer para inibição da proteína da acetilcolinesterase (1EA5), tendo em vista, as evidências apresentadas a partir do *Docking Molecular* e o *Fracionamento de Capuzes Conjugados*. Logo, esses compostos podem atuar no tratamento da Doença do Alzheimer e contribuindo de forma efetiva.

Estes estudos, demonstram que a farmacologia sempre esteve contida apenas as análises experimentais para viabilizar altos custos experimentais e um maior de tempo com relação aos resultados esperados. Por outro lado, as técnicas e recursos computacionais possibilitou predição desses estudos com relação a pesquisa de novos fármacos até a forma de elucidar o comportamento em sistemas biológicos identificando o seu comportamento no sítio ativo da proteína desejada.

O conhecimento a respeito da interação da proteína-ligante (candidato a fármaco) são essenciais para demonstração do seu comportamento no sítio ativo e função. Através dessa pesquisa, foi possível caracterizar as interações no sítio de ligação, podendo-se identificar grupos de aminoácidos funcionais que foram responsáveis pela criação de ligações favoráveis e por meio disso, pensar em ajustes para potencializar a estrutura do fármaco (ligante) para melhor inibição da proteína (receptor).

A partir da análise dos dados obtidos, considerando os aspectos da metodologia utilizada e do sistema em estudo, pode ser concluído:

### *Docking Molecular*

- A metodologia proposta foi alcançada, capaz de selecionar e testar os compostos para elucidar os compostos com potencial Anti-Alzheimer.
- Todos os seis fármacos apresentaram atividade inibitória frente a AChE, uma energia livre de ligação de todos os complexos foram expressivamente negativos, podendo afirmar que de forma termodinâmica os valores de gastos energéticos são favoráveis, quando comparado a uma proteína isolada.
- O aminoácido Met83, His441 e Tyr121 foram os que mais se destacaram em todos os fármacos na interação de proteína-ligante. Destacando a região do sítio ativo.

- É perceptível a influência do resíduo Met83 como aminoácido aparece como forte interação com todos os ligantes do docking molecular, podendo ser considerado o aminoácido âncora.

### ***Fracionamento Molecular de Capuzes Conjugados (MFCC)***

- A técnica se mostrou altamente eficiente e eficaz, através desse método quântico, foi possível identificar a energia quântica de cada resíduo de aminoácido do receptor em todas as simulações ancoradas aos ligantes, demonstrando atração eletrostática em vários aminoácidos do receptor 1EA5.
- O balanço energético apresenta três compostos realizando ligações de hidrogênio, sendo eles: Donepezil, Rivastigmina e Fisostigmina, apresentando energia total em eletrovolts (eV) negativos acima de -1 eV.
- Os aminoácidos His440, Met83, Tyr121 determinou possíveis regiões âncoras do sítio ativo de ligação.

Portanto, demonstrou-se por meio de estudos *in silico* através de métodos computacionais a interação dos fármacos com a enzima acetilcolinesterase, obtendo-se resultados significativos de problemas farmacológicos relacionados a doenças neurodegenerativas. Pode-se obter as melhores conformações de menor energia por meio do *docking* molecular, unindo conceitos teóricos, físico-químicos, termodinâmicos e química quântica.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES DO 2º RECEPTOR 1GQR

As energias obtidas de interação que fazem relação ao cálculo de modelagem molecular foi a partir das dimensões do sítio ativo nas posições X, Y e Z. Na posição X (15.0000), Y(25.0000) e Z (30.0000) do receptor com ligante, sendo necessário a escolha do algoritmo Lamarckiano para melhores conformações de menor energia, favorecendo o acoplamento do proteína-ligante e formação de complexo mais estável, foram considerados três casos, sendo eles: Flexível, Rígido e Torção do método GaDock.

Com relação a tabela 13 os três complexos apresentaram energias mínimas de interação proteína-ligante, no ligante flexível variou de -9.51 a -7.45 kcal/mol, já no complexo torção apresentou grau energético de -9.48 a - 7.51 kcal/mol, considerando especificamente, o complexo rígido que apresentou energia menores e mais negativas comparadas as outras estruturas entre - 10.31 a - 1.85, de nove posições devido apresentar melhores conformações de menor energia, no geral, considerando apenas onze conformações de cada interação entre proteína-ligante que foram previamente testado a partir desse software. As energias interações de ligações consideram que quanto menor o grau energético, melhor será a estabilidade entre o receptor e o ligante (droga).

Tacrina

Tabela 13. Energia de ligação (Kcal/mol) da Tacrina estimada pelo programa *ArgusLab*.

Complexo Flexível	Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)	Complexo Rígido	Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)	Complexo Torção	Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)
1	- 9.51	1	- 10.31	1	- 9.48
2	- 9.38	2	- 9.99	2	- 8.53
3	- 8.97	3	- 9.66	3	- 8.44

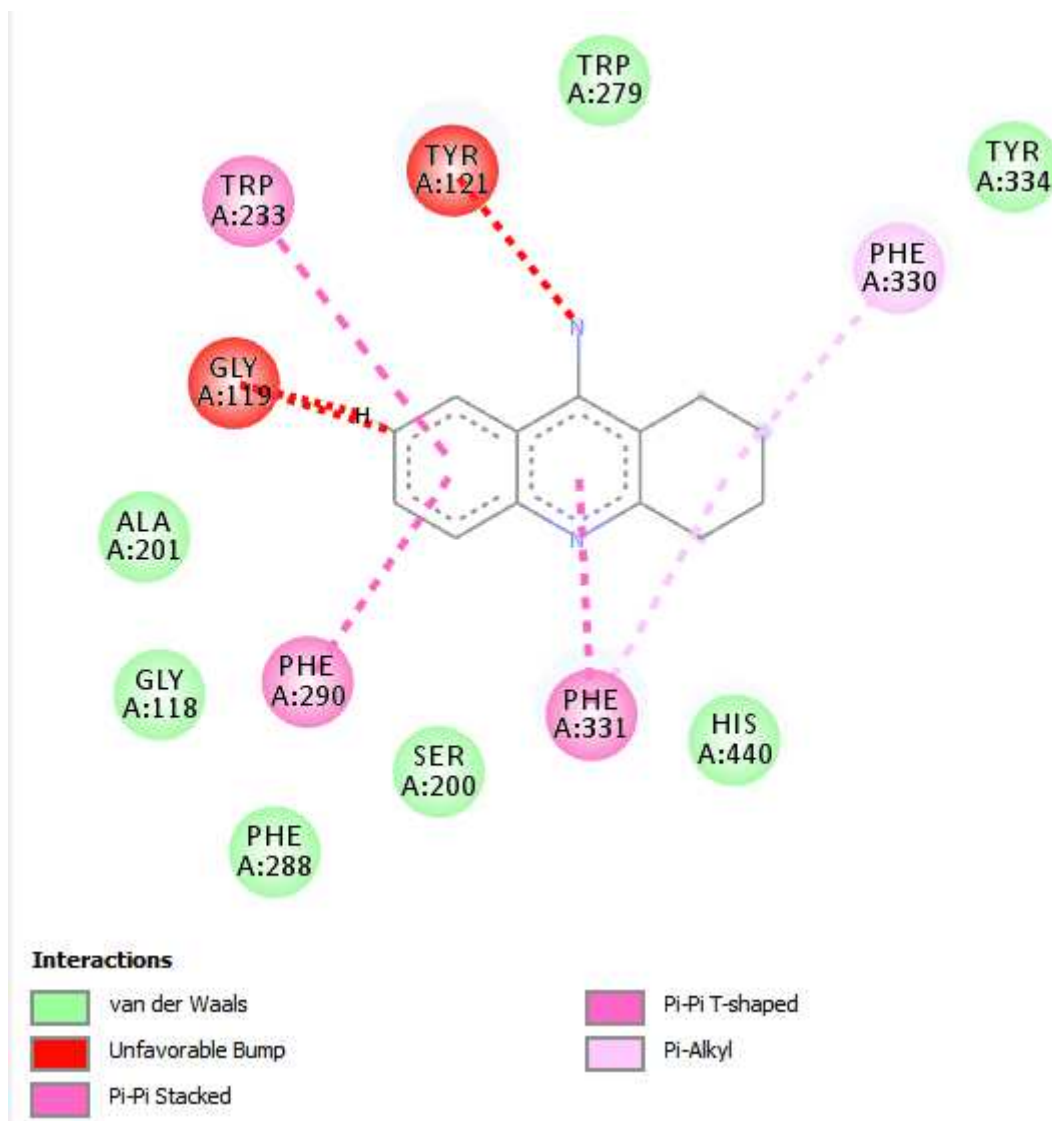
<b>4</b>	- 8.69	<b>4</b>	- 8.68	<b>4</b>	- 7.88
<b>5</b>	- 8.34	<b>5</b>	- 8.57	<b>5</b>	- 7.86
<b>6</b>	- 8.10	<b>6</b>	- 7.24	<b>6</b>	- 7.84
<b>7</b>	- 7.97	<b>7</b>	- 7.01	<b>7</b>	- 7.82
<b>8</b>	- 7.84	<b>8</b>	- 6.95	<b>8</b>	- 7.70
<b>9</b>	- 7.71	<b>9</b>	- 1.85	<b>9</b>	- 7.69
<b>10</b>	- 7.45	<b>10</b>	-	<b>10</b>	- 7.53
<b>11</b>	-	<b>11</b>	-	<b>11</b>	- 7.51

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

No programa Discovery Studio (BIOVIA DISCOVERY STUDIO VISUALIZER, 2014), foi possível identificar os resíduos de aminoácidos presente na interação receptor-ligante Figura 31 de maior interação apresentando ligações de van der waals com aminoácidos, como: Ser200, His440, Tyr334, Trp279, Ala201, Phe288 e Gly118. Os aminoácidos presente no sítio ativo estão presente nessa estrutura.

Já os aminoácidos que mostram diferentes interações e repulsões presente na estrutura da (droga). Os aminoácidos Gly119 e Tyr121 apresentaram certo grau de impermeabilidade reagindo de forma repulsiva ao composto. A interação com o ligante ocorreu a partir da ligações  $\pi$  com o aminoácido Trp233, Phe290, Phe330, Phe331. Essas interações consideram todo o complexo receptor-ligante e os resíduos de maior interação com o fármaco.

Figura 32. Visualização 2D do composto Tacrina e os resíduos de 1GQR de maior interação.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

A interação da Tacrina envolve forte ligação com o sítio ativo de ligação da colina da AChE, empilhamento- $\pi$  com aminoácidos Phe331, Phe330, Trp233 e Phe290.

Em conformidade com Almeida (2011) a Tacrina (1,2,3,4-tetrahidroacridina) estabelece fortes interações com o sítio de ligação de colina da AChE, porém não estabelece interações com o sítio periférico. Existe uma interação do tipo empilhamento- $\pi$  entre o anel quinolínico da Tacrina e o anel indólico do aminoácido Trp84.

Os aminoácidos envolvidos na ligação com a Tacrina apresenta vários tipos de ligações e aminoácidos envolvidos na região do sítio ativo da proteína.

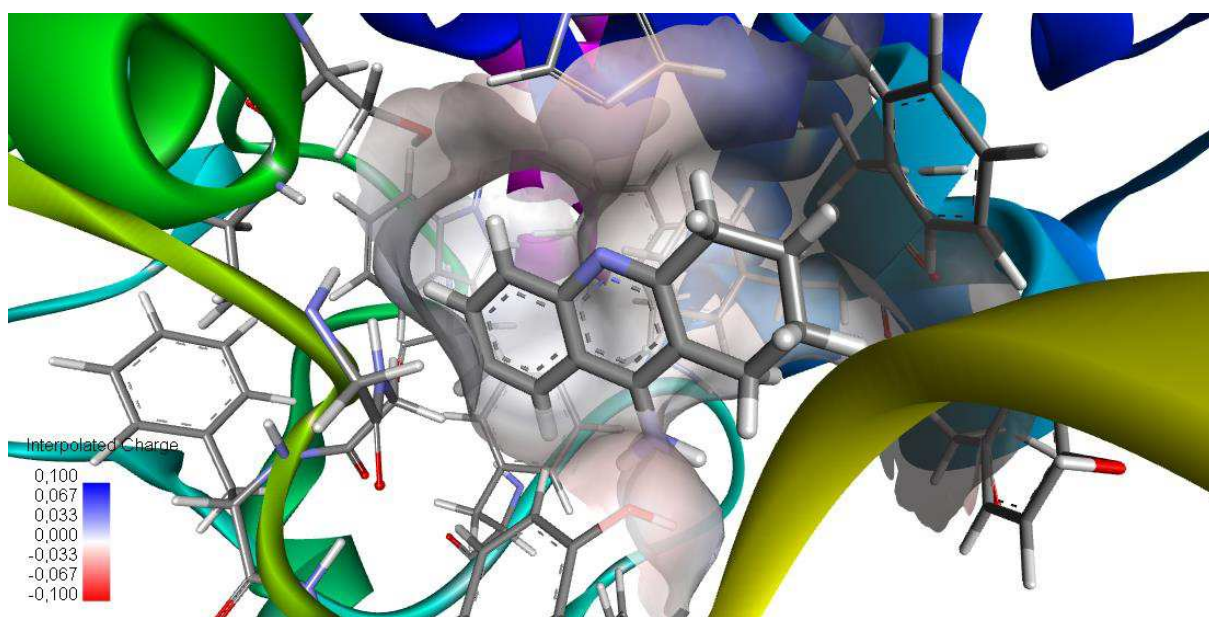
Segundo Almeida (2011) o átomo de nitrogênio protonado do anel quinolínico do tautômero da Tacrina estabelece ligação de hidrogênio diretamente com a carbonila da cadeia principal do aminoácido His440, componente da tríade catalítica, e ainda, o anel quinolínico dispõe-se paralelamente e em contato com o grupo fenil do aminoácido Phe330.

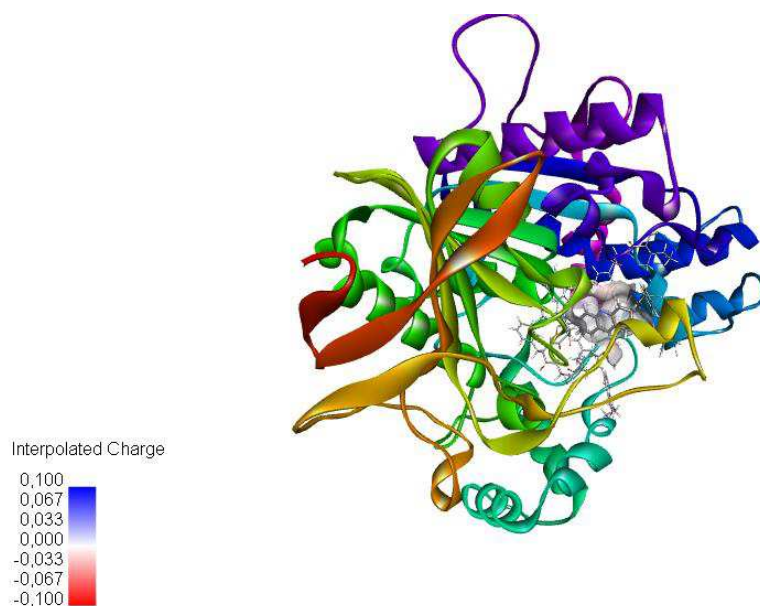
A Tacrina apresenta interações do tipo empilhamento  $\pi$  entre os anéis aromáticos da estrutura e as porções Phe290, Phe331 e Trp233 e interações  $\pi$ -alquil entre o anel e a porção Phe330.

No uso do Discovery Studio (BIOVIA DISCOVERY STUDIO VISUALIZER, 2014), foi possível analisar a nuvem eletrostática do receptor 1GQR com a Tacrina. É possível notar o local de atracamento que encontra-se em uma região neutra. Próximo ao local, é possível visualizar uma região eletronegativa, um dos aminoácidos são responsáveis.

A região da nuvem eletrostática e sua interação com receptor-ligante aponta uma local neutro e uma região próxima do sítio ativo da proteína. Essa interação encontra-se levemente positiva na extremidade do ligante.

Figura 33. Nuvem eletrostática da interação receptor com Tacrina.





Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

## Donepezil

O ligante Donepezil com o receptor 1GQR apresentou resultados do *docking* bastante expressivos, suas energias livres de ligação apresentaram resultados significativos na interação proteína-ligante em todas posições de complexos.

Em todas as cinco posições, os complexos apresentaram uma energia Livre de ligação, na tabela 14 destaca-se a variação dos diferentes casos. No complexo flexível a energia livre de ligação variou de - 5.21 a - 2.85 kcal/mol, no complexo rígido a interação energética ficou entre - 9.72 a - 0.80 kcal/mol. Considerando a melhor variação do complexo entre os casos, foi a torção - 11.81 a - 6.89 kcal/mol apropriada na interação de proteína-ligante. Considerando que o complexo torção obteve melhor e menor energia comparando-se aos outros casos, esse, será utilizado para visualização dos resíduos de aminoácidos essenciais que estão inseridos no sítio ativo da proteína.

Tabela 15. Energia de ligação (Kcal/mol) da Donepezil estimada pelo programa ArgusLab.

Complexo	Energia Livre de	Complexo	Energia Livre de	Complexo	Energia Livre de
----------	------------------	----------	------------------	----------	------------------



Flexível	Ligação (Kcal/mol)	Rígido	Ligação (Kcal/mol)	Torção	Ligação (Kcal/mol)
1	- 5.21	1	- 9.72	1	- 11.81
2	- 3.16	2	- 6.65	2	- 8.46
3	- 2.85	3	- 3.75	3	- 7.60
4	-	4	- 2.15	4	- 6.89
5	-	5	- 0.80	5	-

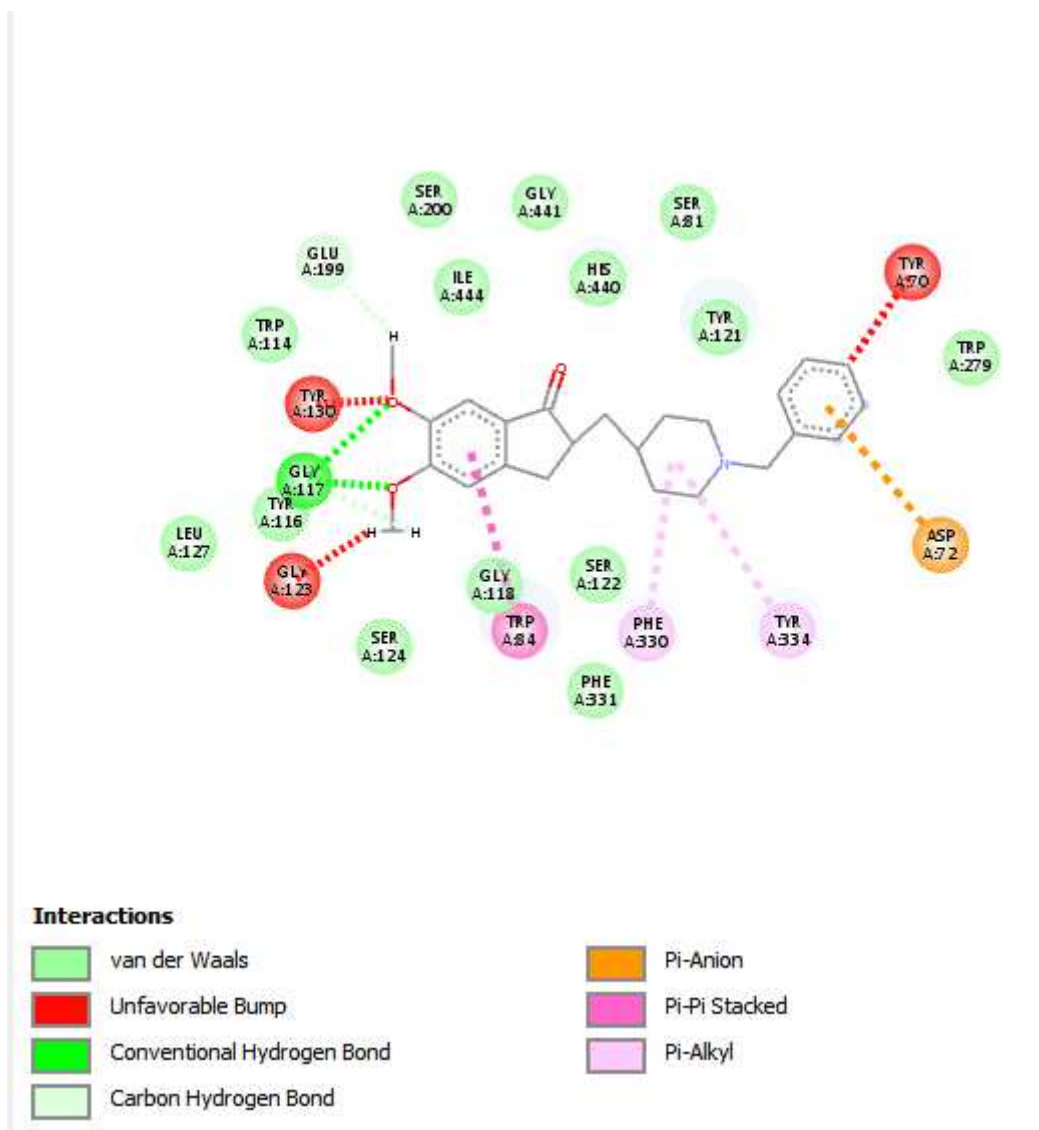
Fonte: ArgusLab, 2020.

Com os cálculos de *docking molecular* do Donepezil, utilizando o *Discovery Studio*, foi possível identificar as ligações ocorridas entre os aminoácidos de maior proximidade apresentando ligações de hidrogênio como a Gly117. Na Figura 33, é possível notar as regiões de maior interação do composto com o ligante evidenciando os resíduos de 1GQR. OS aminoácidos Ser200, Phe331, Trp279, Ile444, Ser81 e entre outros aminoácidos apresentando ligações de Van der Walls. Já os aminoácidos Trp84, Phe330 e Tyr334 demonstraram ligações covalentes ao redor da estrutura benzeno e fenol. No entanto, o Tyr130, Gly123 e Tyr70 apresentou repulsão eletrostática ao benzeno, considerando certo grau de impermeabilidade entre o receptor-ligante.

O fato da ligação de Donepezil com a enzima AChE ser extremamente dependente da interação com os resíduos Trp279 e Phe330, ausentes na enzima butirilcolinesterase (BChE), explica a alta seletividade de Donepezil para a AChE e não para a BChE (KRYGER, G. et al, 1998).

O Donepezil apresenta interações do tipo ligação entre os oxigênios ligados ao anel aromático e a porção Gly117, do tipo ligação carbono hidrogênio entre o próton ligado ao oxigênio e a porção Glu199, ligação do tipo  $\pi$ -anion entre o anel aromático e a porção ASP72, do tipo empilhamento  $\pi$ - $\pi$  entre o aromático e a porção TRP-84 e  $\pi$ -alquil entre o anel piperidil e as porções PHE330 e TYR334.

Figura 34. Visualização 2D do composto Donepezil e os resíduos de 1GQR de maior interação.

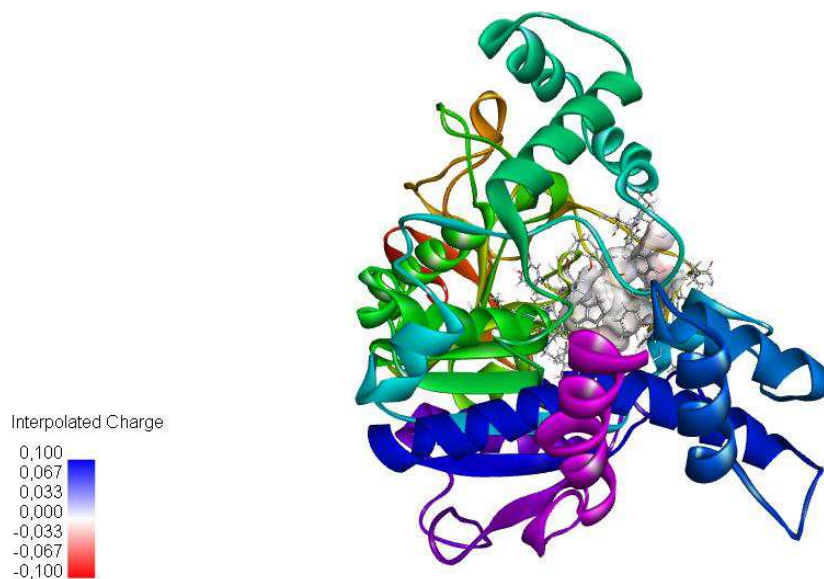
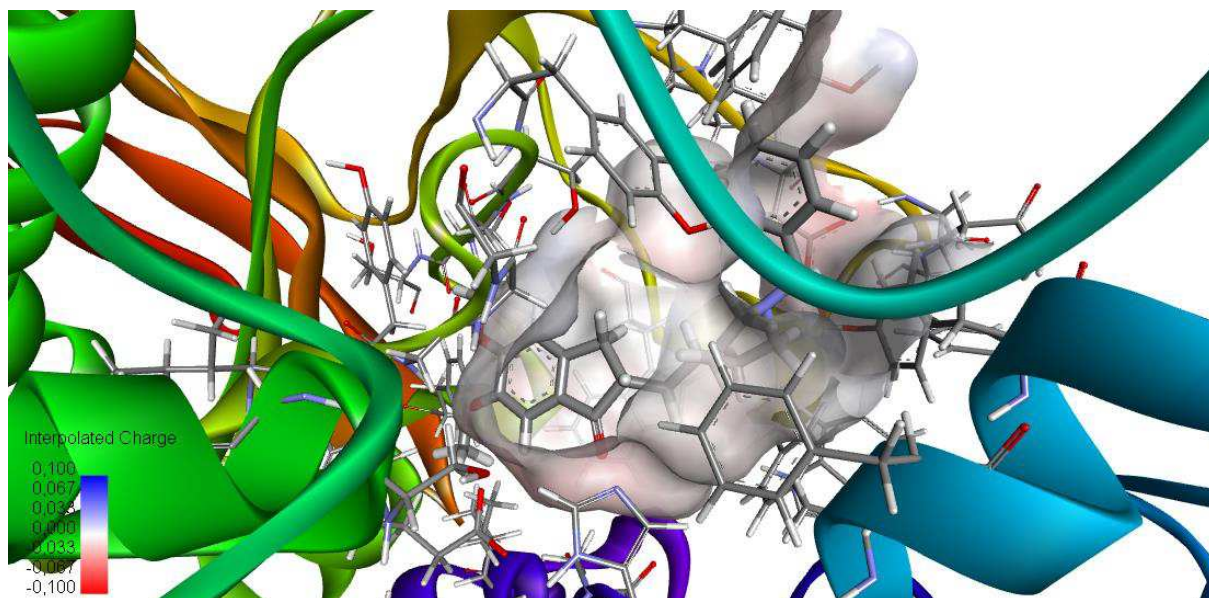


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

O receptor 1GQR com o Donepezil no uso do Discovery Studio (BIOVIA DISCOVERY STUDIO VISUALIZER, 2014), foi possível analisar a nuvem eletrostática. É possível notar o local de atracamento que encontra-se em uma região neutra em sua maior parte. Próximo ao local, é possível visualizar uma região eletronegativa, um dos aminoácidos são responsáveis.

A região da nuvem eletrostática e sua interação com receptor-ligante aponta uma local neutro e uma região próxima do sítio ativo da proteína. Essa interação encontra-se levemente positiva e negativa na extremidade do ligante.

Figura 35. Nuvem eletrostática da interação receptor com Donezepil.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

### Rivastigmina

Com relação a Tabela 15 apresenta-se os resultados dos cálculos de *docking* molecular da Rivastigmina a partir das estruturas obtidas neste estudo. A energia livre de ligação demonstra diferentes energias em Kcal/mol. Considerados três casos, sendo eles: flexível, rígido e torção do método GaDock.

No complexo flexível, onze posições são consideradas interação de menor energia que variou-se de - 8.76 a - 6.64 kcal/mol. Essa posição, foi considerada a melhor conformação do complexo comparada às outras estruturas de receptor-ligante. No complexo rígido a energia obteve variação de - 8.65 a - 0.19 kcal/mol e na estrutura no formato torção apresentou posições entre - 9.48 a - 7.51 kcal/mol.

Essa variação de energia comparando-se a todas posições e estruturas, a que mais se adequa para obtenção da visualização do sítio ativo, foi na posição torção, pois é considerado a posição de melhor e menor energia, pois, quanto menor a energia livre de ligação, melhor a estrutura tenderá a estabilidade, ou seja, ao seu estado Fundamental.

Tabela 16. Energia de ligação (Kcal/mol) da Rivastigmina estimada pelo programa *ArgusLab*.

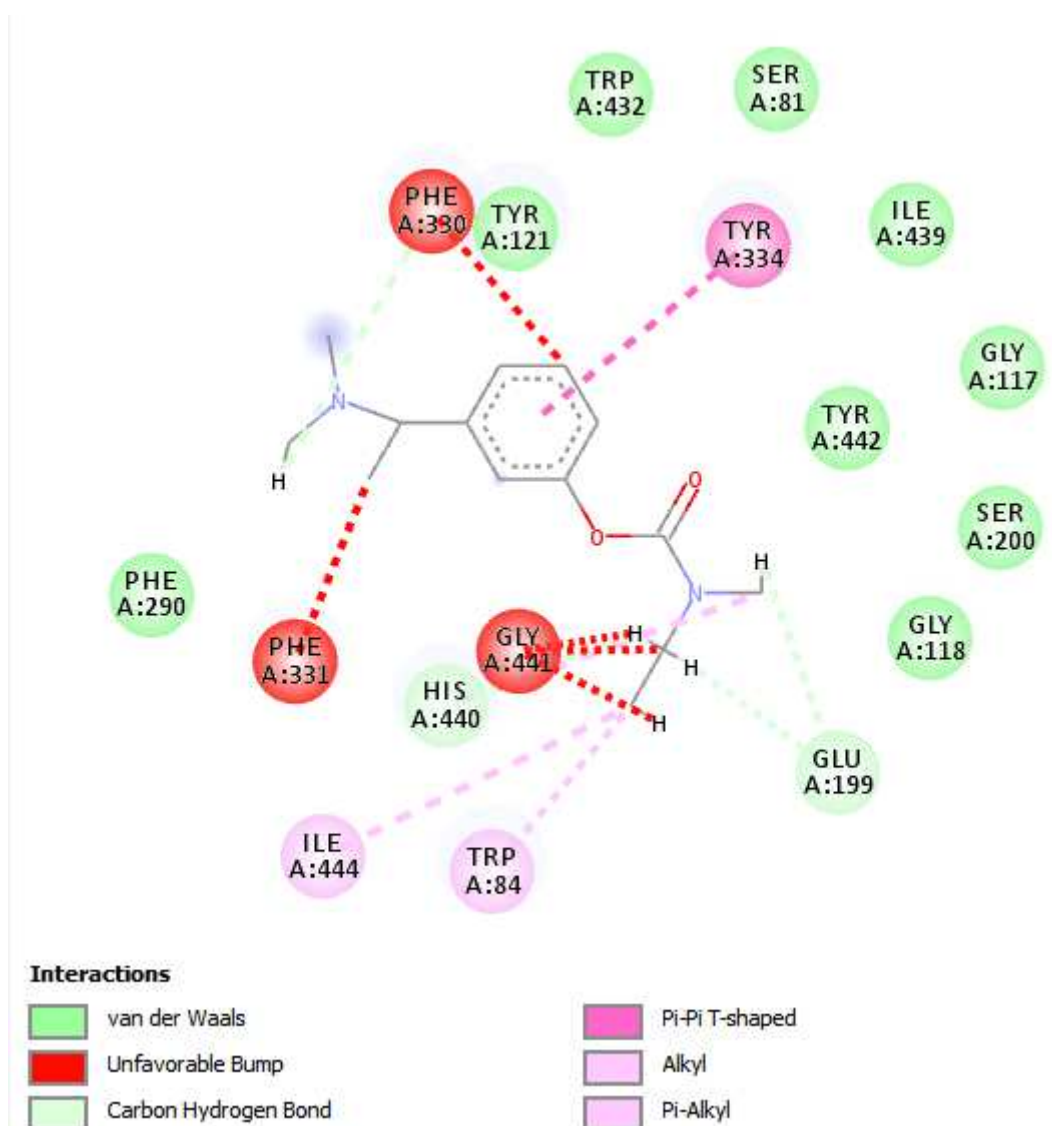
Complexo Flexível	Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)	Complexo Rígido	Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)	Complexo Torção	Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)
1	- 8.76	1	- 8.65	1	- 9.48
2	- 8.31	2	- 7.38	2	- 8.53
3	- 8.23	3	- 6.41	3	- 8.44
4	- 8.21	4	- 6.03	4	- 7.88
5	- 8.06	5	- 2.02	5	- 7.86
6	- 7.71	6	- 1.84	6	- 7.84
7	- 7.69	7	- 1.01	7	- 7.82
8	- 7.34	8	- 0.94	8	- 7.70
9	- 7.21	9	- 0.19	9	- 7.69
10	- 7.05	10	-	10	- 7.53

<b>11</b>	- 6.64	<b>11</b>	-	<b>11</b>	- 7.51
-----------	--------	-----------	---	-----------	--------

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Os resultados de *docking molecular* (Tabela 14) apresenta diferentes complexos e energias obtidas. No que se refere ao complexo flexível variou-se de - 9.36 a - 4.70 kca/mol. Já no complexo rígido a energia livre de ligação ficou entre - 9.11 a - 3.39 kcal/mol. Por outro lado, o complexo que obteve melhor energia, foi o complexo no formato torção entre - 9.73 a - 7.29 kcal/mol. A estrutura do complexo torção é o mais adequado para obtenção da nuvem eletrostática e resíduos do aminoácido presente no ligante.

Figura 36. Visualização 2D do composto Rivastigmina e os resíduos de 1GQR de maior interação.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Após a utilização de cálculos de *docking molecular* do Rivastigmina com o receptor 1GQR, utilizando o *Discovery Studio*, foi possível identificar as ligações ocorridas entre os aminoácidos de maior proximidade apresentando ligações de van der Waals os aminoácidos Ser81, Tyr121, Phe290 e entre outros aminoácidos. Por outro lado, os aminoácidos Trp84, Ile444 e Tyr334 demonstraram ligações covalentes. No entanto, o Phe330, Phe331 e Gly441 apresentaram repulsão eletrostática ao benzeno, considerando certo grau de impermeabilidade entre o receptor-ligante.

Bar-On, P. e seus colaboradores (BAR-ON, P. et al., 2002), a maior densidade de picos positivos foi observada na parte inferior da cavidade do sítio ativo. Esses picos devem-se a interação feita pelos resíduos de aminoácidos numa posição próxima a Ser200 e outra na proximidade dos aminoácidos Trp84 e Phe330. Esse estudo confirma os aminoácidos citados no sítio ativo, realizando diferentes interações.

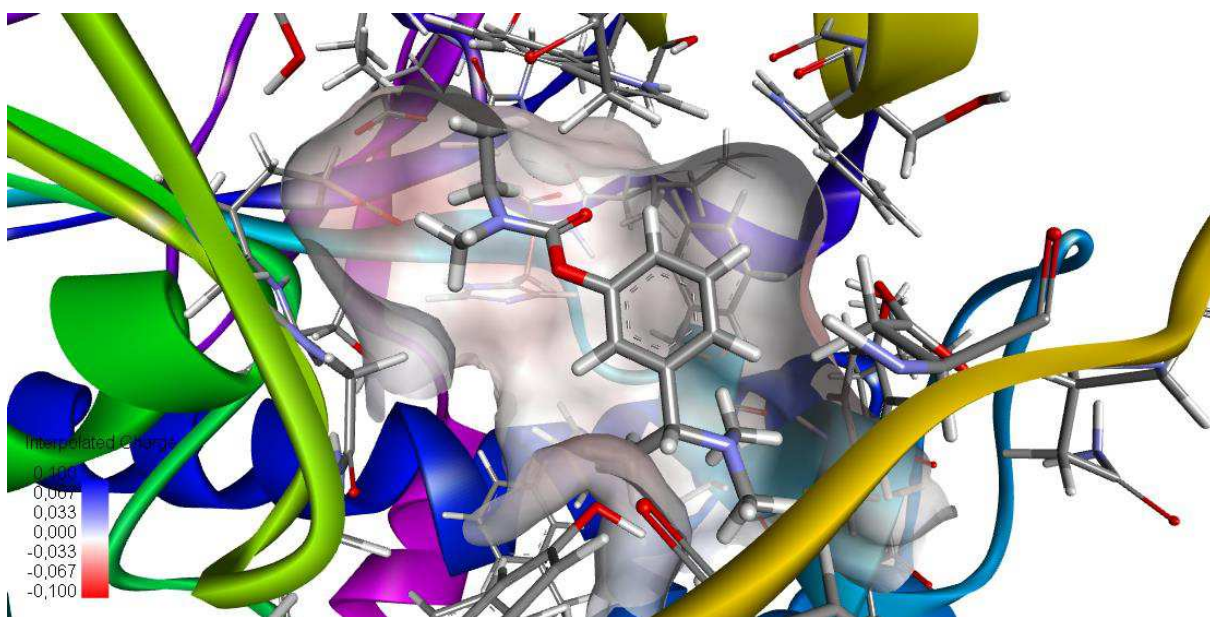
Comparações com a estrutura da AChE nativa com o complexo AChE-rivastigmina revelaram uma mudança substancial na posição do anel imidazol do resíduo de histidina na tríade catalítica, His440. (BAR-ON, P. et al., 2002)

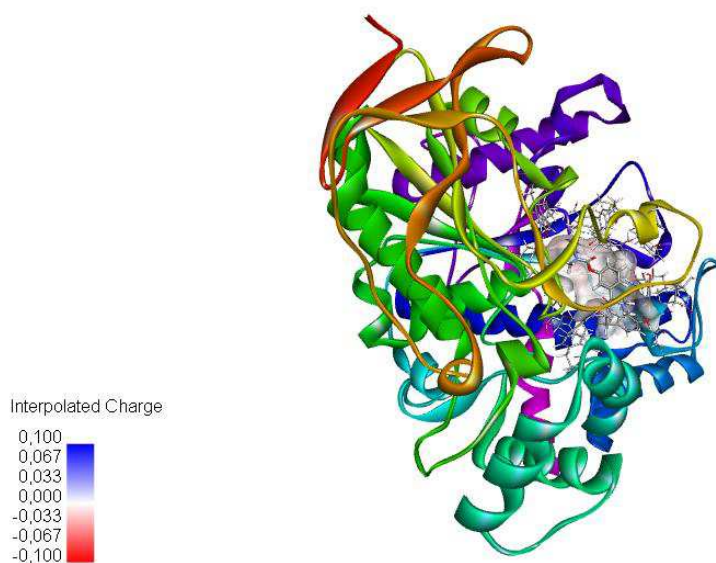
Almeida (2015) afirma que a Rivastigmina-AChE após se ligar o sítio ativo é metabolizada em duas partes, uma chamada carbamil e a outra NAP. A carbamil na rivastigmina é posicionada para fazer duas ligações de hidrogênio com os nitrogênios da amida dos resíduos Ala201 e Gly119. Assim como fazem ligações de van der Waals com os resíduos Phe288 e Phe290. O Nap, a segunda parte da Rivastigmina faz ligações de hidrogênio com três moléculas de água e com o nitrogênio da amida do resíduo da Gly118, assim como fazem contato de van der Waals com Trp84 e com a Phe330. (ALMEIDA, 2015).

A Rivastigmina apresentou interações do tipo empilhamento  $\pi$ - $\pi$  da anel benzílico e a porção Tyr-334, do tipo alquil e  $\pi$ -alquil entre parte da função carbamato com as porções Ile-444 e Trp-84 e interações do tipo carbono-hidrogênio entre o carbamato e a porção Glu-199.

Na Figura 36 apresenta-se a nuvem eletrostática de interação da enzima AChE-Rivastigmina. Nota-se que a nuvem apresenta-se mais carregada negativamente.

Figura 37. Nuvem eletrostática da interação receptor com Rivastigmina.





Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

O receptor 1GQR com a Rivastigmina no uso do *Discovery Studio* (BIOVIA DISCOVERY STUDIO VISUALIZER, 2014), foi possível analisar a nuvem eletrostática. É possível notar o local de atracamento que encontra-se em uma região neutra em sua maior parte. Próximo ao local, é possível visualizar uma região eletronegativa, um dos aminoácidos são responsáveis.

A região da nuvem eletrostática e sua interação com receptor-ligante aponta uma local neutro e uma região próxima do sítio ativo da proteína. Essa interação encontra-se levemente positiva e negativa na extremidade do ligante.

#### Galantamina

Com relação a Tabela 16 apresenta-se os resultados dos cálculos de *docking molecular* da Galantamina a partir das estruturas obtidas neste estudo. A energia livre de ligação demonstra diferentes energias em kcal/mol. Considerados três casos, sendo eles: flexível, rígido e torção do método GaDock.

No complexo flexível, as dez posições são consideradas interação de menor energia que variou-se de - 9.36 a - 4.70 kcal/mol. Já no ligante rígido a energia livre de ligação ficou entre - 9.11 a - 3.39 kcal/mol. O complexo torção obteve melhor interação receptor-ligante considerando seu estado de menor energia comparado aos outros complexos estáveis, com valores de energia entre - 9.73 a - 7.29 kcal/mol. Todas as posições complexadas variaram até



aproximadamente dez posições de menor energia, devido, todas as outras, estarem acima do que não se recomenda na literatura, ou seja, energias livre de ligação positivas e maiores.

Tabela 17. Energia de ligação (kcal/mol) da Galantamina estimada pelo programa ArgusLab.

<b>Complexo Flexível</b>	<b>Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)</b>	<b>Complexo Rígido</b>	<b>Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)</b>	<b>Complexo Torção</b>	<b>Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)</b>
<b>1</b>	- 9.36	<b>1</b>	- 9.11	<b>1</b>	- 9.73
<b>2</b>	- 9.13	<b>2</b>	- 8.27	<b>2</b>	- 9.15
<b>3</b>	- 7.76	<b>3</b>	- 8.17	<b>3</b>	- 8.71
<b>4</b>	- 7.31	<b>4</b>	- 8.17	<b>4</b>	- 8.49
<b>5</b>	- 7.27	<b>5</b>	- 7.81	<b>5</b>	- 8.31
<b>6</b>	- 5.79	<b>6</b>	- 7.80	<b>6</b>	- 7.29
<b>7</b>	- 5.62	<b>7</b>	- 7.04	<b>7</b>	-
<b>8</b>	- 5.20	<b>8</b>	- 3.39	<b>8</b>	-
<b>9</b>	- 4.70	<b>9</b>	-	<b>9</b>	-
<b>10</b>	- 4.70	<b>10</b>	-	<b>10</b>	-

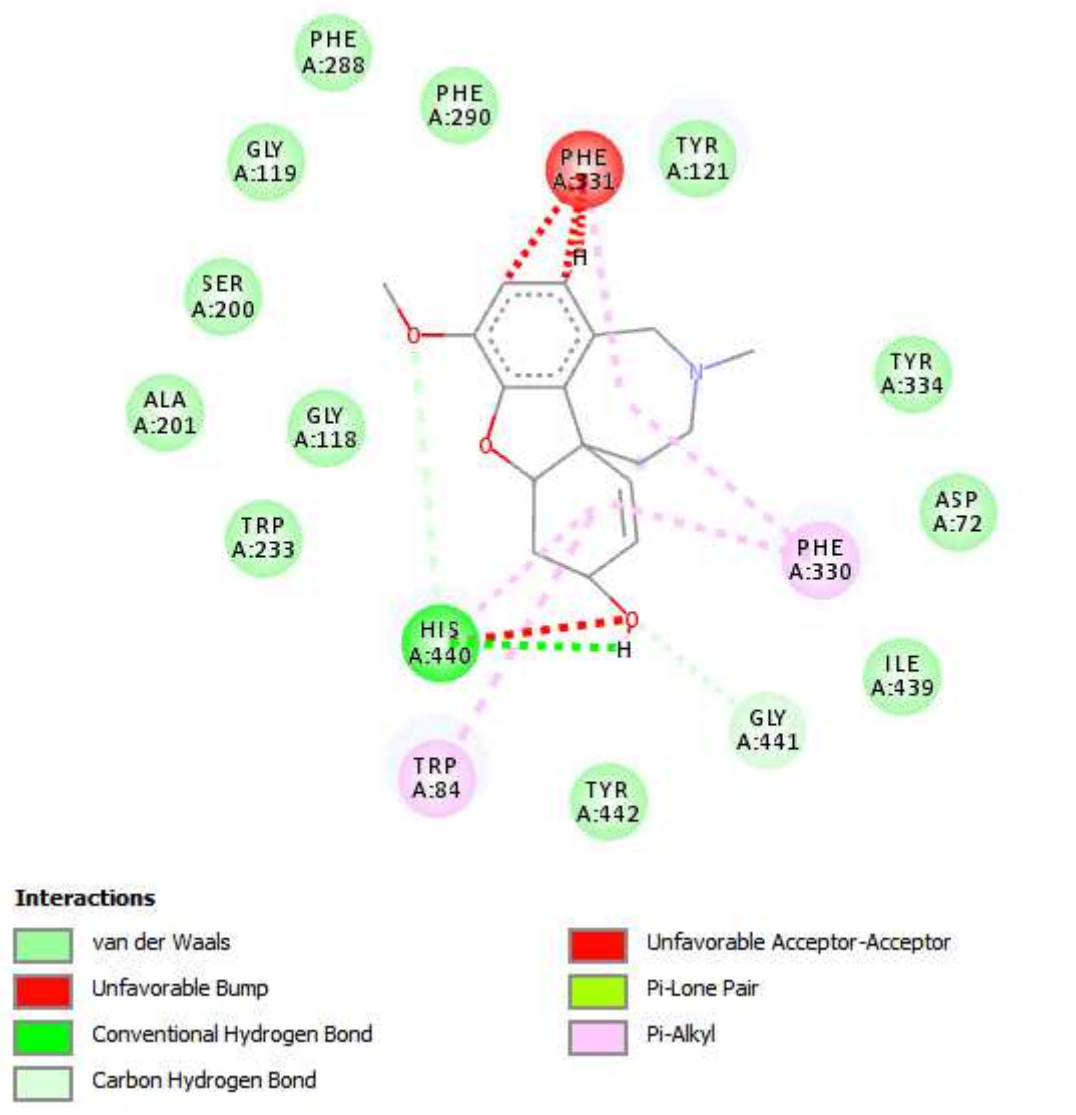
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Após a utilização de cálculos de *docking molecular* do Donepezil com o receptor 1GQR, utilizando o *Discovery Studio*, foi possível identificar as ligações ocorridas entre os aminoácidos de maior proximidade apresentando ligações.

Os aminoácidos (Figura 37) Asp71, Tyr121, Ser200, Phe288, Phe290 apresentaram interações de Van der Waals. Já os aminoácidos Trp84 e Phe330 demonstraram ligações covalentes. O aminoácido His440 apresentou pontes de hidrogênio com o hidrogênio e repulsão no oxigênio. No entanto, o Phe84 apresentou repulsão eletrostática ao benzeno e ao oxigênio na extremidade do fenil, considerando certo grau de impermeabilidade entre o receptor-ligante.

A Galantamina apresenta interações de hidrogênio entre o hidrogênio da hidroxila e a porção His440 e interações do tipo  $\pi$ -alquil entre o anel aromático e o sistema  $\pi$  da ligação dupla com as porções Phe330, Trp84 e Phe331.

Figura 38. Visualização 2D do composto Galantamina e os resíduos de 1GQR de maior interação.



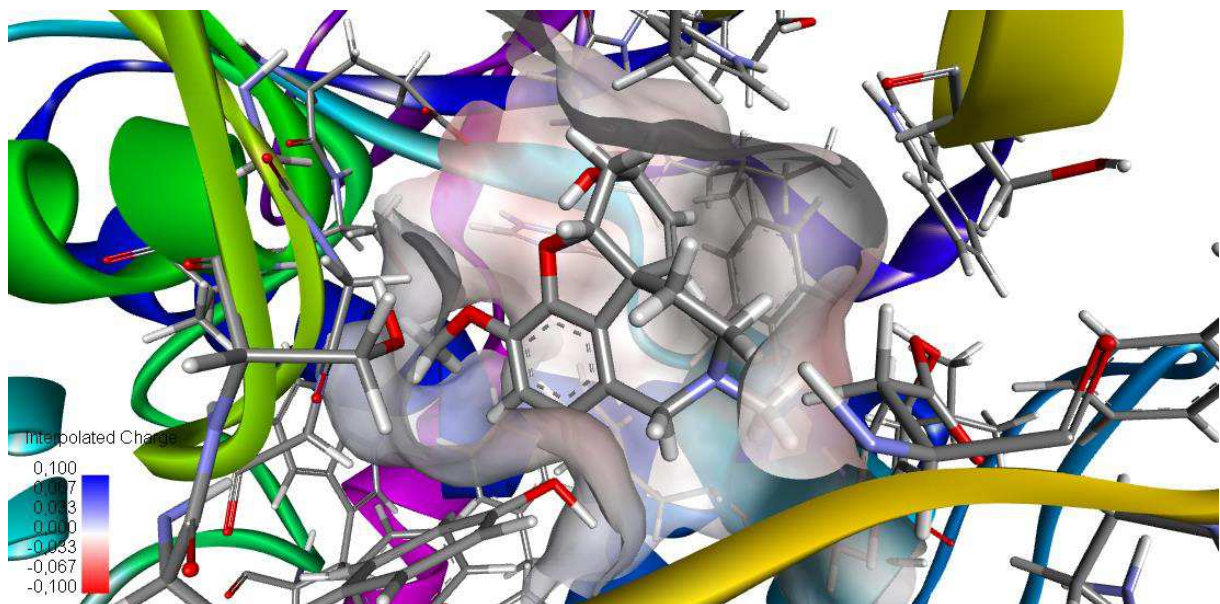
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

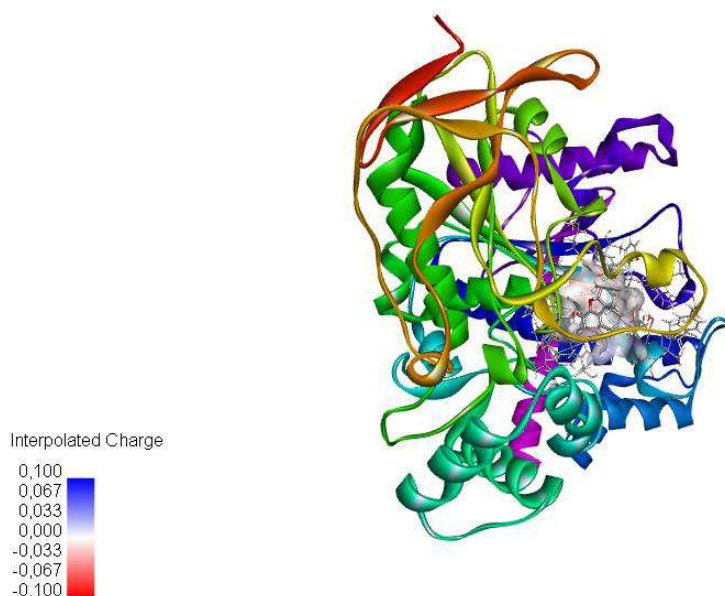
Em conformidade com Bartolucci, C. e colaboradores (2001) e Greenblatt, H.M. e colaboradores (1999) a estrutura cristalográfica do receptor-ligante AChE-Galantamina demonstra que o inibidor está inserido no interior da cavidade do sítio ativo da enzima que interage com aminoácido Trp84 realizando interações pi-pi associado a ligações covalentes e apolares. Os pesquisadores afirmam ainda que apenas uma ligação de hidrogênio direta é formada entre o inibidor e a cadeia lateral de um dos resíduos, e essa ligação ocorre entre o grupo hidroxila do inibidor e o Glu199.

Na Figura 39 é possível visualizar a interação do aminoácido His440 realizando ligações com o Hidrogênio ao mesmo tempo realizando repulsões com o oxigênio.

De acordo com Doucet-Personeni e colaboradores (2001) a estrutura cristalográfica do complexo AChE-Galantamina revelou que esse inibidor está situado no fundo da cavidade do sítio ativo da enzima e interage com o Trp84. Apenas uma ligação de hidrogênio direta é formada entre o inibidor e a cadeia lateral de um dos resíduos, e está ligação ocorre entre o grupo hidroxila do inibidor e o Glu199. Uma segunda interação é possível entre o hidrogênio da Ser200 e do grupo O-metoxi da galantamina, mas a melhor ligação seria uma ligação bifurcada com a His440 da tríade catalítica.

Figura 39. Nuvem eletrostática da interação receptor com Galantamina.





Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

### Fisostigmina

A Tabela 17 os resultados de *docking molecular* e suas posições apresentaram diferentes energias livre de ligação entre os três diferentes complexos: flexível, rígido e torção. Foram escolhidas posições realizando torções, onde foi tido os melhores resultados no ancoramento.

A energia livre de ligação que melhor se adequa a estrutura tridimensional apresentando valores melhores e menores de energia variou entre - 9.48 a - 7.51Kcal/mol da Fisostigmina. Esses valores foram favoráveis e demonstraram os melhores níveis de variação de energia relacionado a esse fármaco.

Tabela 18. Energia de ligação (Kcal/mol) da Fisostigmina estimada pelo programa *ArgusLab*.

Complexo Flexível	Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)	Complexo Rígido	Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)	Complexo Torção	Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)
1	- 8.76	1	- 8.65	1	- 9.48
2	- 8.31	2	- 7.38	2	- 8.53

<b>3</b>	- 8.23	<b>3</b>	- 6.41	<b>3</b>	- 8.44
<b>4</b>	- 8.21	<b>4</b>	- 6.03	<b>4</b>	- 7.88
<b>5</b>	- 8.06	<b>5</b>	- 2.02	<b>5</b>	- 7.86
<b>6</b>	- 7.71	<b>6</b>	- 1.84	<b>6</b>	- 7.84
<b>7</b>	- 7.69	<b>7</b>	- 1.01	<b>7</b>	- 7.82
<b>8</b>	- 7.34	<b>8</b>	- 0.94	<b>8</b>	- 7.70
<b>9</b>	- 7.21	<b>9</b>	- 0.19	<b>9</b>	- 7.69
<b>10</b>	- 7.05	<b>10</b>	-	<b>10</b>	- 7.53
<b>11</b>	- 6.64	<b>11</b>	-	<b>11</b>	- 7.51

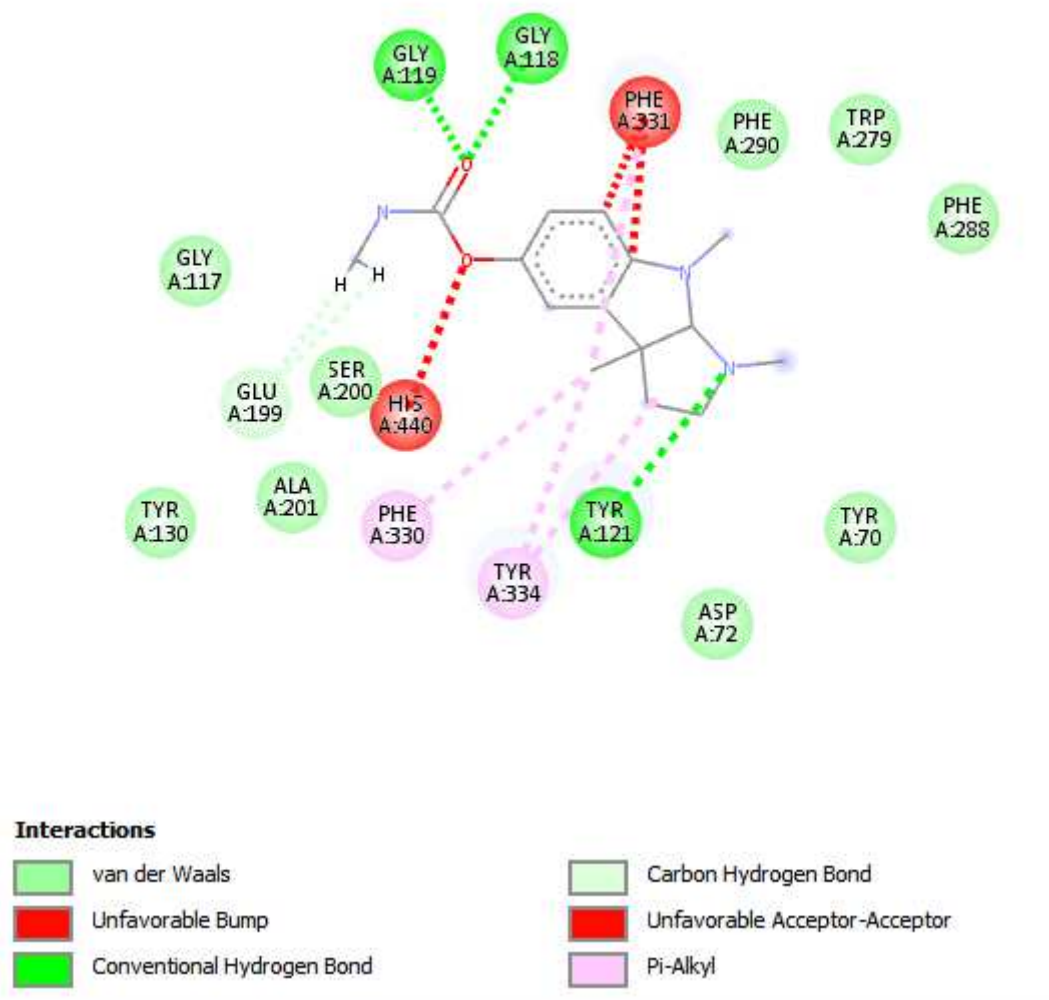
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

As interações energéticas obtidas pelo *docking molecular* foi vista em cada complexo, após essa análise, possível identificar as ligações ocorridas entre os aminoácidos de maior proximidade apresentando ligações no software *Discovery Studio*.

Os aminoácidos (Figura 37) Gly118, Gly119 e Tyr121 apresentaram interações do tipo pontes de hidrogênio. Já Asp72, Ser200, Phe288, Phe290 e entre outros aminoácidos apresentaram interações de van der Waals associada a ligações fracas ao redor da estrutura do ligante. No entanto, aminoácidos His440 e Phe331 demonstraram ligações repulsivas.

A Fisostigmina apresenta interações do tipo ligação de hidrogênio entre o nitrogênio e a porção Tyr121 e o oxigênio carbonílico da porção carbamato com a Gly118 e Gly119. Além disso, a molécula apresentou interações do tipo  $\pi$ -alquil e as porções Phe330, Tyr334 e Phe331 e ligações carbono-hidrogênio com a porção carbamato e Glu199.

Figura 40. Visualização 2D do composto Fisostigmina e os resíduos de 1GQR de maior interação.

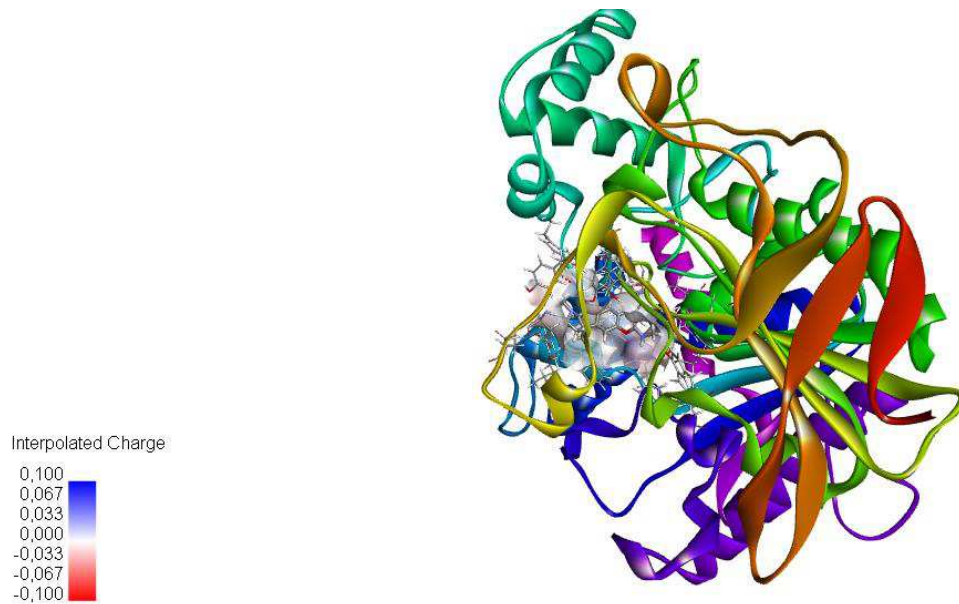
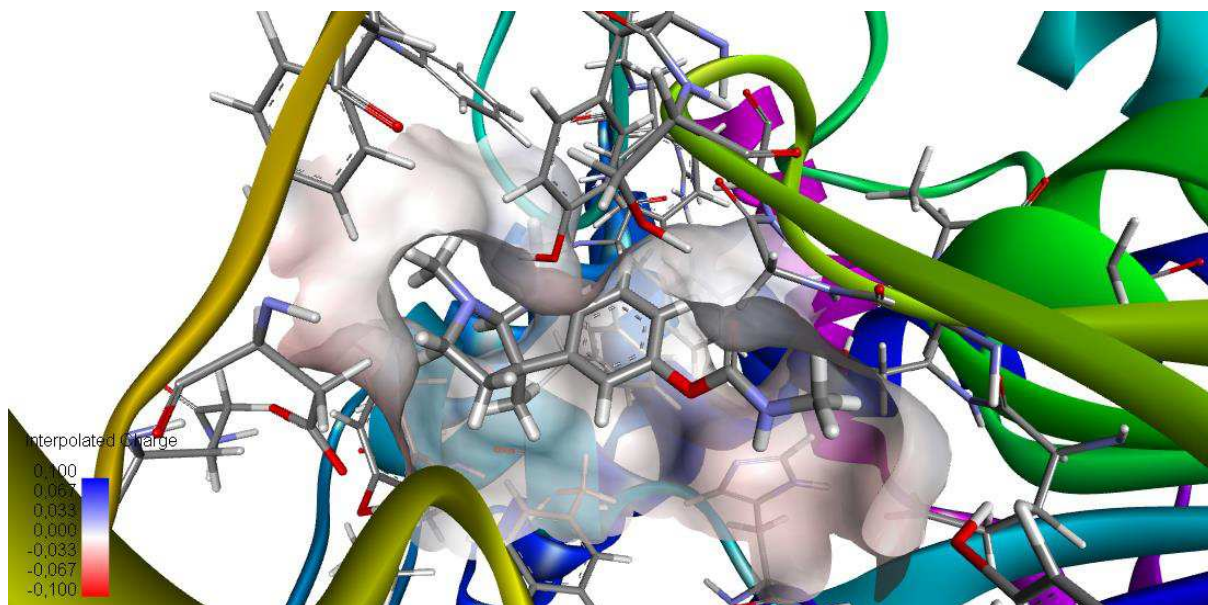


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Após a realização do *docking molecular*, observando as conformações de menor energia, foi possível visualizar o receptor 1GQR com a Fisostigmina na utilização do *Discovery Studio* (BIOVIA DISCOVERY STUDIO VISUALIZER, 2014), analisando a nuvem eletrostática. Nota-se o local de atracamento que encontra-se em uma região neutra em sua maior parte. Próximo ao local, é possível visualizar uma região eletronegativa, um dos aminoácidos são responsáveis.

A região da nuvem eletrostática e sua interação com receptor-ligante aponta uma local neutro e uma região próxima do sítio ativo da proteína. Essa interação encontra-se levemente positiva e negativa na extremidade do ligante.

Figura 41. Nuvem eletrostática da interação receptor com Fisostigmina.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

## Memantina

A energia livre de ligação dos diferentes complexos, entre eles: Flexível, Rígido e Torção. O complexo Flexível apresentou energia de -10.23 a -7.74 kcal/mol. No complexo torção de -9.88 a -8.08 kcal/mol. Já o Rígido apresentou energia livre de ligação melhor, comparado aos outros valores. Isso mostra que a Memantina se mostra como um dos fármacos que se destacam em energia livre de ligação com valores negativos (-10.48 a -8.16 kcal/mol).

Tabela 19. Energia de ligação (kcal/mol) da Memantina estimada pelo programa *ArgusLab*.

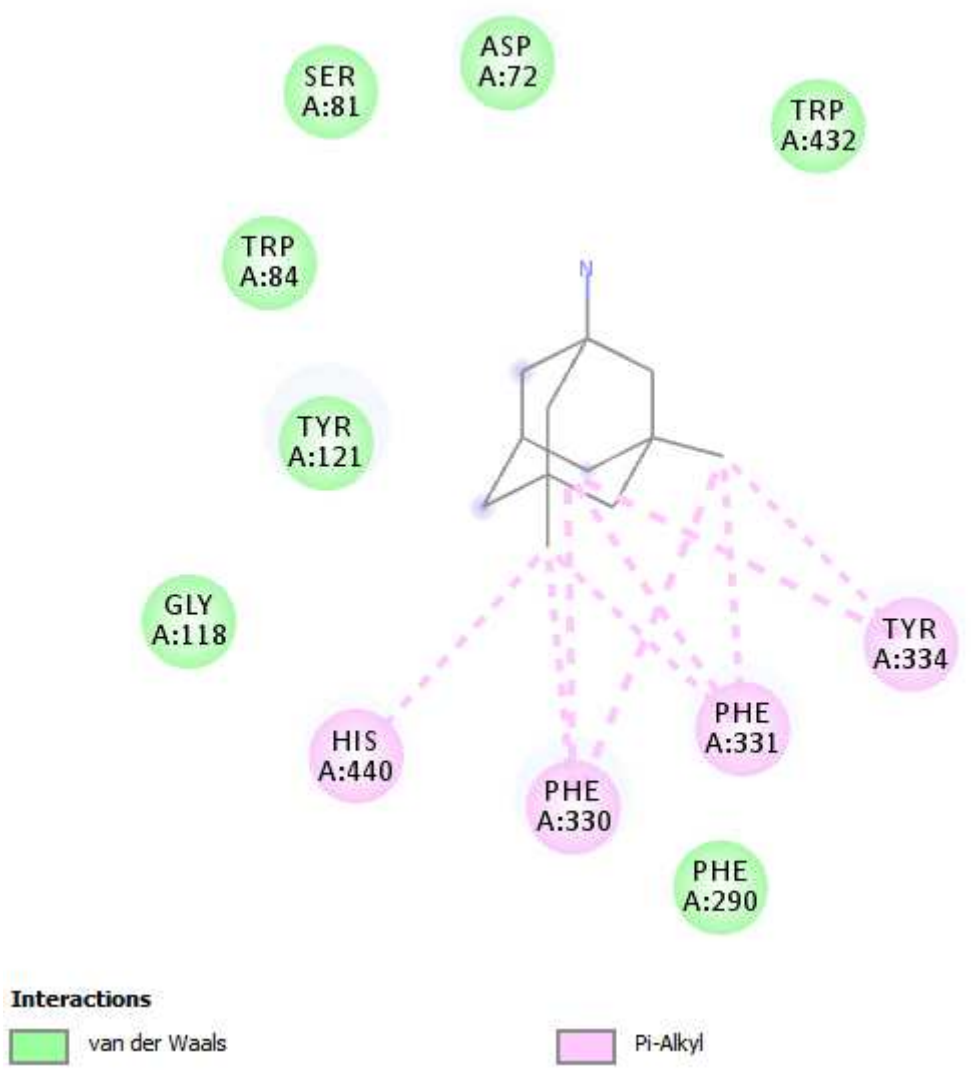
<b>Complexo Flexível</b>	<b>Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)</b>	<b>Complexo Rígido</b>	<b>Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)</b>	<b>Complexo Torção</b>	<b>Energia Livre de Ligação (Kcal/mol)</b>
<b>1</b>	- 10.63	<b>1</b>	- 10.38	<b>1</b>	- 10.53
<b>2</b>	- 10.15	<b>2</b>	- 9.95	<b>2</b>	- 9.62
<b>3</b>	- 9.50	<b>3</b>	- 9.64	<b>3</b>	- 9.11
<b>4</b>	- 9.08	<b>4</b>	- 9.26	<b>4</b>	- 8.81
<b>5</b>	- 8.36	<b>5</b>	- 8.97	<b>5</b>	- 8.72
<b>6</b>	- 8.20	<b>6</b>	- 8.75	<b>6</b>	- 8.71
<b>7</b>	- 7.85	<b>7</b>	- 8.70	<b>7</b>	- 8.64
<b>8</b>	-	<b>8</b>	- 8.66	<b>8</b>	- 8.34
<b>9</b>	-	<b>9</b>	- 8.63	<b>9</b>	- 8.33
<b>10</b>	-	<b>10</b>	- 8.38	<b>10</b>	- 8.24
<b>11</b>	-	<b>11</b>	- 8.35	<b>11</b>	- 7.95



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Na Figura 42 observa-se os aminoácidos que estão ligados ao redor do fármaco. Mesmo não fazendo interações com ligações de hidrogênio, houve interações de Van der Waals e ligações Os aminoácidos que se envolveram na ligação de Van der Waals foram: Asp72, Trp84, Ser81, Tyr121, e Gly118. Já por ligações pi o Phe330, Phe331, His440 e Tyr334 aparecem interagindo de forma mais fraca. Já o Phe290 aparece livremente, distante da droga.

Figura 42. Visualização 2D do composto Fisostigmina e os resíduos de 1GQR de maior interação.

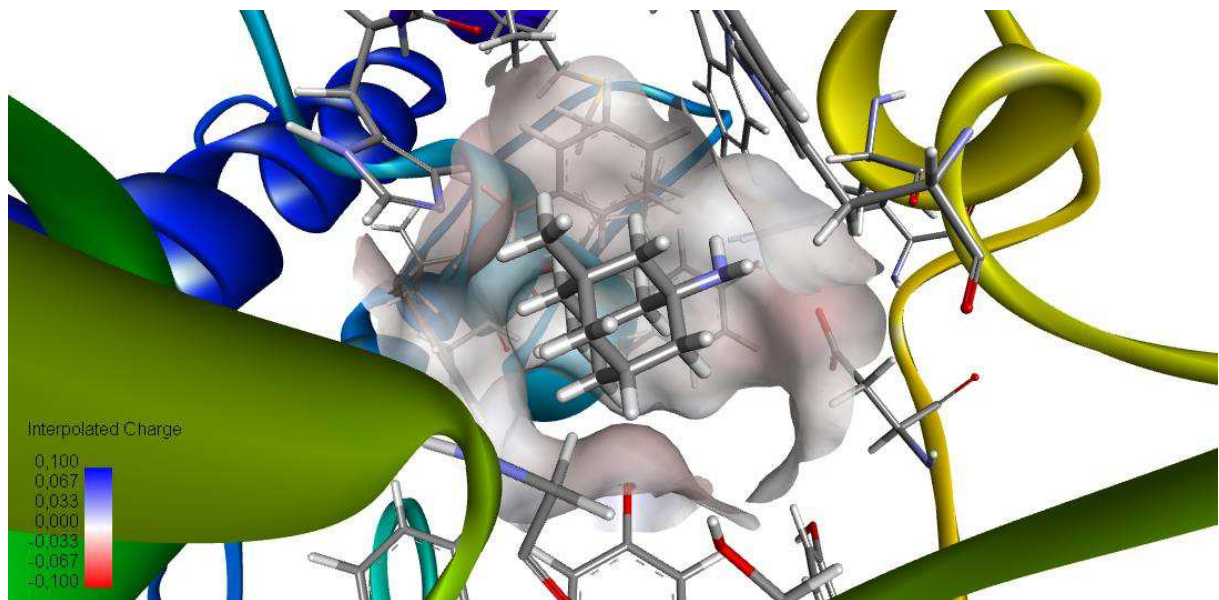


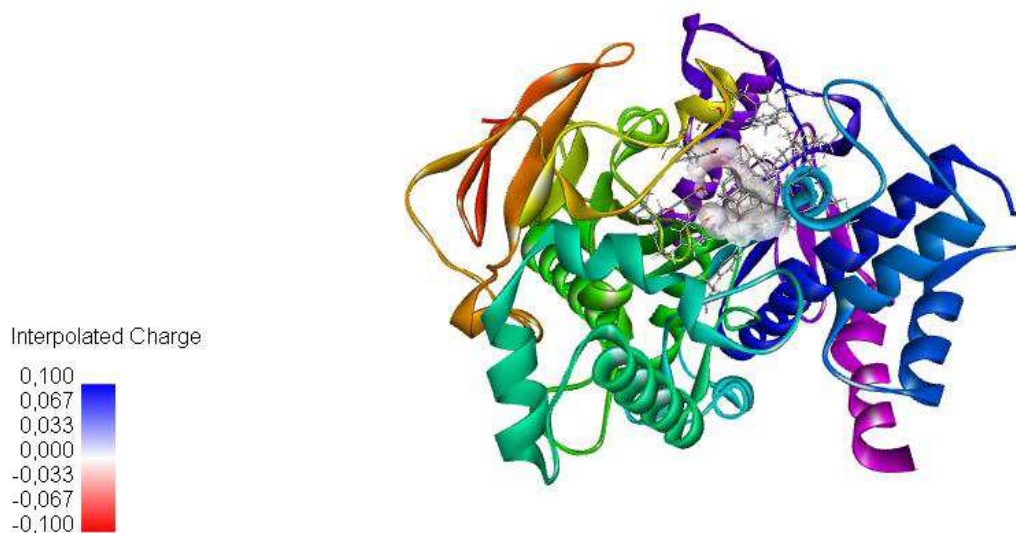
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

A utilização do *docking molecular*, permite identificar as conformações de menor energia, em seguida, visualizou o receptor 1GQR com a Memantina na utilização do *Discovery Studio*, analisando a nuvem eletrostática. A ancoragem aparece uma região bastante eletronegativa (cor vermelha) ou seja, está ocorrendo interação da memantina com o receptor. A forma como AChE reage é notável e aparente. A representação se dá pela Figura 43.

A Fisostigmina apresenta interações do tipo  $\pi$ -alquil com as porções His440, Phe330, Phe331, Tyr334.

Figura 43. Nuvem eletrostática da interação receptor com Memantina.





Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

## ENERGIA TOTAL OBTIDA ATRAVÉS DO MÉTODO DE FRACIONAMENTO DE CAPS E CONJUGADOS (MFCC)

Os cálculos *ab initio* descreve propriedades de transporte eletrônico de junções moleculares (ALBUQUERQUE et al., 2014) A disposição do balanço de energia final  $(E_i(L - R_i) = E(L + C_{1-i} R_i C_{i+1}) - E(C_{1-i} R_i C_{i+1}) - E(L + C_{1-i} C_{i+1}) + E(C_{1-i} C_{i+1}))$  está em evidência no gráfico x, e refletem a contribuição individual de cada aminoácido na interação entre a o receptor da AChE e os ligantes (Tacrina, Donepezil, Rivastigmina, Fisostigmina, Galantamina e Memantina).

### Donepezil

No complexo AChE-Donepezil foi possível perceber as distâncias entre o centro geométrico dos resíduos de aminoácidos até o centro geométrico do ligante, para definir quem seriam os aminoácidos que estariam dentro da esfera do complexo num raio de corte de 12 Å.

Com somatório da energia de interação obtida em cada uma das ligações, têm a energia total da interação do Donepezil com a AChE por intermédio de propriedades quânticas, essa energia total é - 2.32 eV. Com a realização de cálculos quânticos foi possível perceber a influência de cada resíduo de aminoácido na ligação, sendo elas: MET83, ASP72, GLY441, TRP84, TYR121, SER200 e entre outros aminoácidos.

Tabela 20. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1GQR com ligante Donepezil, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol.

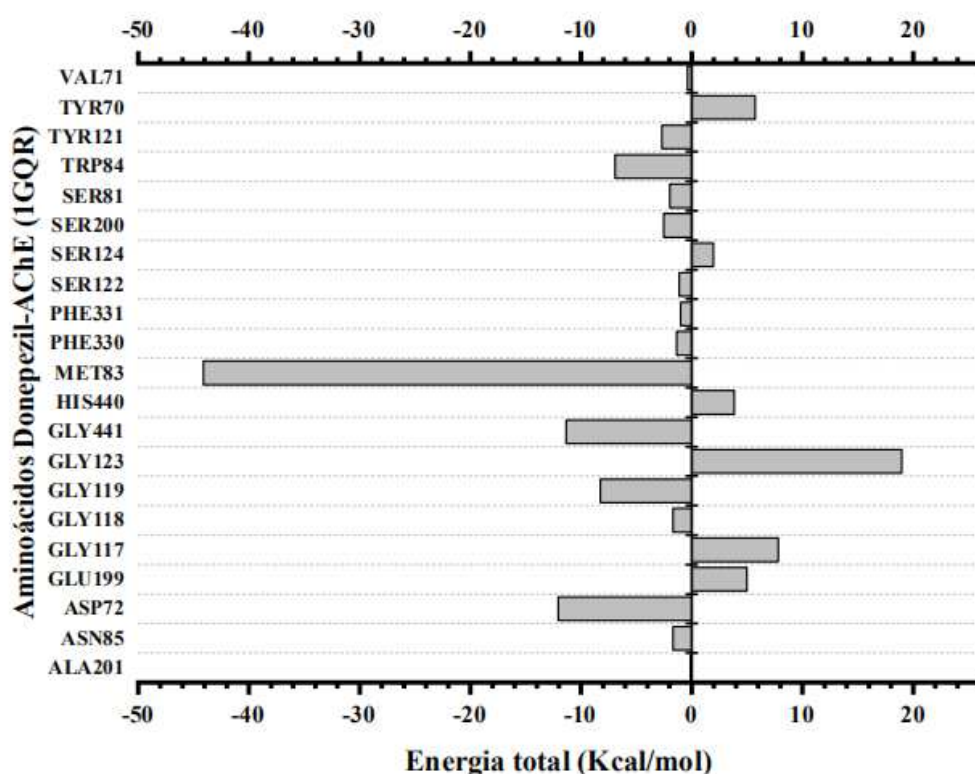
<b>R<sub>i</sub></b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i</sub> R<sub>i+1</sub> +L</b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i</sub> R<sub>i+1</sub></b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i+1</sub> +L</b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i+1</sub></b>	<b>E<sub>i</sub> (R<sub>i</sub>→ L)</b>
<b>ALA201</b>	-1,99E+03	-7,78E+02	-1,74E+03	-5,32E+02	<b>-0,12</b>
<b>ASN85</b>	-2,56E+03	-1,35E+03	-2,15E+03	-9,36E+02	<b>-1,69</b>
<b>ASP72</b>	-2,45E+03	-1,24E+03	-2,01E+03	-8,02E+02	<b>-12,06</b>
<b>GLU199</b>	-2,22E+03	-1,01E+03	-1,74E+03	-5,32E+02	<b>4,97</b>
<b>GLY117</b>	-2,18E+03	-9,70E+02	-1,97E+03	-7,63E+02	<b>7,81</b>
<b>GLY118</b>	-1,84E+03	-6,24E+02	-1,63E+03	-4,18E+02	<b>-1,67</b>
<b>GLY119</b>	-2,10E+03	-8,94E+02	-1,90E+03	-6,88E+02	<b>-8,27</b>
<b>GLY123</b>	-2,06E+03	-8,53E+02	-1,86E+03	-6,46E+02	<b>18,99</b>
<b>GLY441</b>	-2,44E+03	-1,23E+03	-2,24E+03	-1,03E+03	<b>-11,34</b>
<b>HIS440</b>	-2,26E+03	-1,05E+03	-1,79E+03	-5,75E+02	<b>3,83</b>
<b>MET83</b>	-3,02E+03	-1,81E+03	-2,30E+03	-1,09E+03	<b>-44,10</b>
<b>PHE330</b>	-2,49E+03	-1,28E+03	-2,01E+03	-8,02E+02	<b>-1,37</b>
<b>PHE331</b>	-2,53E+03	-1,32E+03	-2,06E+03	-8,45E+02	<b>-1,01</b>
<b>SER122</b>	-2,29E+03	-1,08E+03	-1,97E+03	-7,63E+02	<b>-1,14</b>
<b>SER124</b>	-2,06E+03	-8,53E+02	-1,74E+03	-5,32E+02	<b>1,97</b>
<b>SER200</b>	-2,25E+03	-1,04E+03	-1,93E+03	-7,23E+02	<b>-2,55</b>
<b>SER81</b>	-2,22E+03	-1,01E+03	-1,89E+03	-6,84E+02	<b>-1,99</b>

<b>TRP84</b>	-2,96E+03	-1,75E+03	-2,35E+03	-1,14E+03	<b>-6,93</b>
<b>TYR121</b>	-2,56E+03	-1,35E+03	-2,01E+03	-8,02E+02	<b>-2,69</b>
<b>TYR70</b>	-2,54E+03	-1,33E+03	-1,99E+03	-7,82E+02	<b>5,72</b>
<b>VAL71</b>	-2,53E+03	-1,31E+03	-2,20E+03	-9,90E+02	<b>-0,40</b>

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Baseando-se nesta evidência, podemos salientar que o Asp72 (ácido aspártico) mais uma vez foi o aminoácido com maior energia de atratividade com o ligante, sua representação foi de 22,33% na ligação entre a proteína AChE e o Donepezil, o outro aminoácido de maior participação foi a Trp84 (triptofano) com 128,3% e o Ser200 (serina) com 47,2%, Tyr121 (tirosina) com 50% e Gly441 (glicina) 21%.

Gráfico 9. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1QGR com o ligante Donepezil.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

## Tacrina

No fracionamento dos resíduos de aminoácidos até o centro geométrico do ligante, foi definido todos os aminoácidos que estariam dentro da esfera do complexo num raio de corte de 12Å.

A energia total da interação da Tacrina com a AChE por métodos quânticos, essa energia total é - 0,36 eV. A influência de cada resíduo de aminoácido na ligação, sendo eles: Ala201, Asp72, Gly117, Gly118, Gly119, Gly328, Gly441, His440, Ile287, Phe288, Phe290, Phe330, Phe331, Ser122, Trp233, Ser200, Tyr121, Phe288 e Ser329.

Os aminoácidos que menos interagiram foram Phe330, Phe331, Phe290, Ser329, Tyr121 que tiveram energia total de 14,39 kcal/mol, 6,30 kcal/mol, 5,10 kcal/mol, 5,73 Kcal/mol e 10,54 kcal/mol, respectivamente a repulsão eletrostática pelo ligante.

Tabela 21. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1GQR com ligante Tacrina, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol.

<b>R<sub>i</sub></b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i</sub> R<sub>i+1</sub> +L</b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i</sub> R<sub>i+1</sub></b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i+1</sub> +L</b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i+1</sub></b>	<b>E<sub>i</sub> (R<sub>i</sub>→ L)</b>
<b>ALA201</b>	-2.00E+03	-7.78E+02	-1.75E+03	-5.32E+02	<b>-5,88</b>
<b>ASP72</b>	-1.85E+03	-1.24E+03	-1.41E+03	-8.02E+02	<b>-5,76</b>
<b>GLY117</b>	-1.64E+03	-1.03E+03	-1.43E+03	-8.19E+02	<b>-0,53</b>
<b>GLY118</b>	-1.24E+03	-6.24E+02	-1.03E+03	-4.18E+02	<b>0,41</b>
<b>GLY119</b>	-1.58E+03	-9.70E+02	-1.38E+03	-7.63E+02	<b>-1,47</b>
<b>GLY328</b>	-2.23E+03	-1.00E+03	-2.02E+03	-7.98E+02	<b>-19,28</b>
<b>GLY441</b>	-1.85E+03	-1.23E+03	-1.64E+03	-1.03E+03	<b>-5,67</b>
<b>HIS440</b>	-2.27E+03	-1.05E+03	-1.80E+03	-5.75E+02	<b>-2,09</b>
<b>ILE287</b>	-2.39E+03	-1.17E+03	-2.02E+03	-8.02E+02	<b>-12,30</b>
<b>PHE288</b>	-1.93E+03	-1.32E+03	-1.46E+03	-8.45E+02	<b>1,04</b>

<b>PHE290</b>	-1.78E+03	-1.17E+03	-1.30E+03	-6.88E+02	<b>5,10</b>
<b>PHE330</b>	-1.89E+03	-1.28E+03	-1.41E+03	-8.02E+02	<b>14,59</b>
<b>PHE331</b>	-2.12E+03	-1.51E+03	-1.65E+03	-1.03E+03	<b>6,30</b>
<b>SER122</b>	-1.81E+03	-1.20E+03	-1.49E+03	-8.77E+02	<b>3,60</b>
<b>SER200</b>	-1.51E+03	-8.93E+02	-1.18E+03	-5.71E+02	<b>0,63</b>
<b>SER329</b>	-1.62E+03	-1.01E+03	-1.30E+03	-6.88E+02	<b>5,73</b>
<b>TRP233</b>	-1.84E+03	-1.22E+03	-1.23E+03	-6.14E+02	<b>1,90</b>
<b>TRP84</b>	-1.87E+03	-1.25E+03	-1.26E+03	-6.45E+02	<b>2,08</b>
<b>TYR121</b>	-2.58E+03	-1.35E+03	-2.02E+03	-8.02E+02	<b>10,54</b>
<b>TYR334</b>	-2.12E+03	-1.51E+03	-1.56E+03	-9.52E+02	<b>-7,18</b>

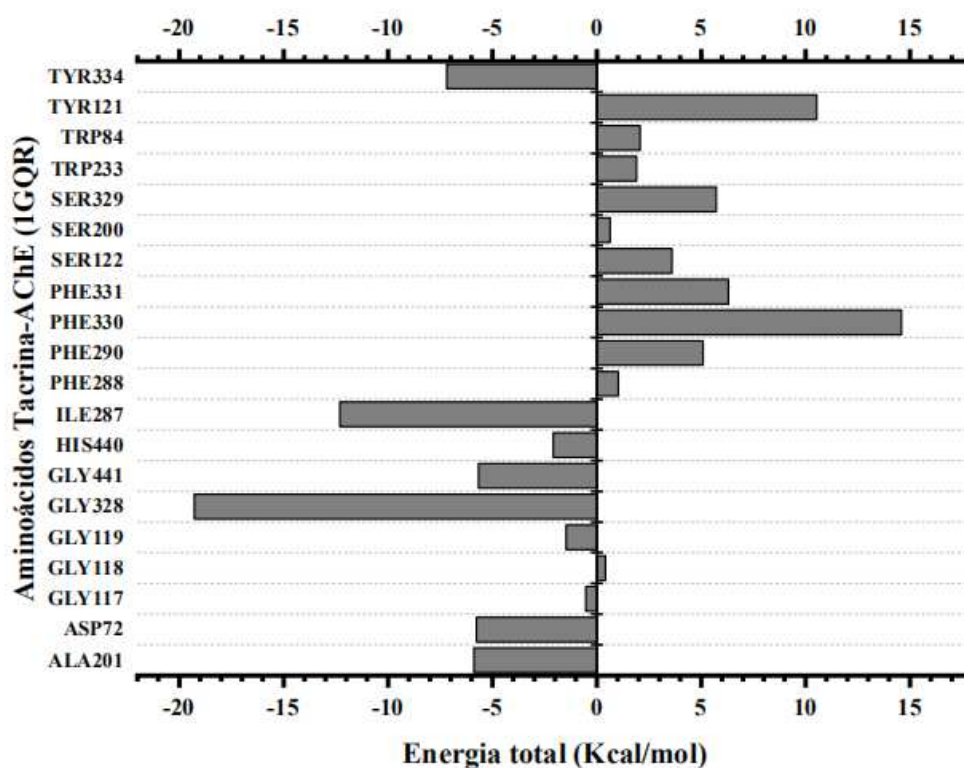
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Por outro lado, os que mais se destacaram apresentando melhor interação com a Tacrina foram Gly328 com -19.28 kcal/mol Ile287 com -17,32 kcal/mol, Ala201 com -5,88 kcal/mol, Tyr334 com -7,18 kcal/mol e Asp73 com -5,76 kcal/mol.

Em termos de porcentagem, os cinco aminoácidos mais importantes para a ligação entre a AChE e a Tacrina é o Gly328 (glicina) com 233%, seguido da Ile287 (isoleucina) 227,7% e Tyr334 (lisina) com 133%, Ala201 (alanina) 109% e Asp72 (ácido aspártico) com 106,6% de energia.

No Gráfico 10 demonstra os principais resíduos de aminoácidos que influenciaram diretamente na inibição da proteína AChE.

Gráfico 10. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1QGR com o ligante Tacrina.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Rivastigmina

Tabela 22. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1GQR com ligante Rivastigmina, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol.

$R_i$	$R_{i-1} R_i R_{i+1} +L$	$R_{i-1} R_i R_{i+1}$	$R_{i-1} R_{i+1} +L$	$R_{i-1} R_{i+1}$	$E_i (R_i \rightarrow L)$
<b>ASN85</b>	-2,16E+03	-1,35E+03	-1,74E+03	-9,36E+02	<b>-0,47</b>
<b>ASP72</b>	-2,04E+03	-1,24E+03	-1,61E+03	-8,02E+02	<b>-6,85</b>
<b>GLU327</b>	-1,92E+03	-1,12E+03	-1,45E+03	-6,45E+02	<b>-6,47</b>
<b>GLY117</b>	-1,77E+03	-9,69E+02	-1,57E+03	-7,63E+02	<b>0,12</b>
<b>GLY118</b>	-1,43E+03	-6,24E+02	-1,22E+03	-4,18E+02	<b>-0,57</b>
<b>GLY119</b>	-1,70E+03	-8,94E+02	-1,49E+03	-6,88E+02	<b>0,19</b>



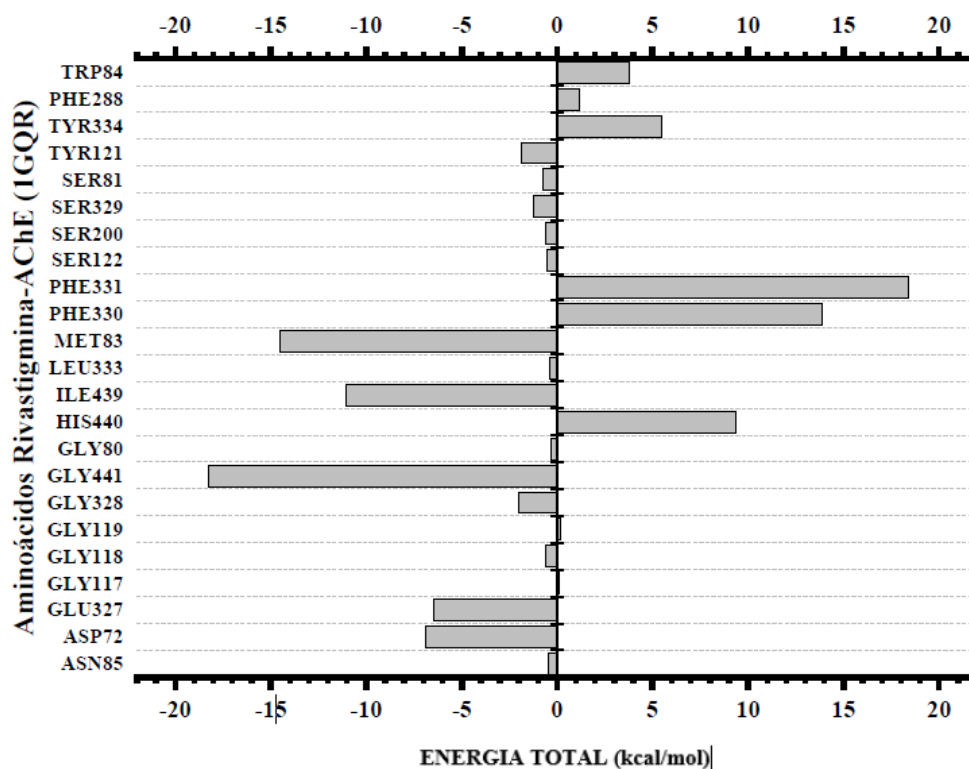
<b>GLY328</b>	-1,81E+03	-1,01E+03	-1,60E+03	-7,98E+02	<b>-2,02</b>
<b>GLY441</b>	-2,04E+03	-1,23E+03	-1,83E+03	-1,03E+03	<b>-18,27</b>
<b>GLY80</b>	-1,66E+03	-8,53E+02	-1,45E+03	-6,47E+02	<b>-0,29</b>
<b>HIS440</b>	-1,85E+03	-1,05E+03	-1,38E+03	-5,75E+02	<b>9,32</b>
<b>ILE439</b>	-1,97E+03	-1,16E+03	-1,60E+03	-7,99E+02	<b>-11,05</b>
<b>LEU333</b>	-2,09E+03	-1,28E+03	-1,73E+03	-9,20E+02	<b>-0,38</b>
<b>MET83</b>	-2,61E+03	-1,81E+03	-1,89E+03	-1,09E+03	<b>-14,49</b>
<b>PHE330</b>	-2,08E+03	-1,28E+03	-1,61E+03	-8,02E+02	<b>13,86</b>
<b>PHE331</b>	-2,13E+03	-1,32E+03	-1,65E+03	-8,45E+02	<b>18,40</b>
<b>SER122</b>	-1,89E+03	-1,08E+03	-1,57E+03	-7,63E+02	<b>-0,51</b>
<b>SER200</b>	-1,85E+03	-1,04E+03	-1,53E+03	-7,23E+02	<b>-0,61</b>
<b>SER329</b>	-1,81E+03	-1,01E+03	-1,49E+03	-6,88E+02	<b>-1,22</b>
<b>SER81</b>	-1,81E+03	-1,01E+03	-1,49E+03	-6,84E+02	<b>-0,73</b>
<b>TYR121</b>	-2,16E+03	-1,35E+03	-1,61E+03	-8,02E+02	<b>-1,84</b>
<b>TYR334</b>	-1,93E+03	-1,13E+03	-1,38E+03	-5,75E+02	<b>5,47</b>
<b>PHE288</b>	-2,08E+03	-1,28E+03	-1,60E+03	-7,98E+02	<b>1,16</b>
<b>TRP84</b>	-2,55E+03	-1,75E+03	-1,95E+03	-1,14E+03	<b>3,78</b>

Fonte: dados da pesquisa, 2020.

Os resultados da Tabela 19, indicam os principais aminoácidos que fizeram parte do raio de corte de 12 Å. Todos esses resíduos, participam de uma região específica de dimensões pré-estabelecidas. Vários dentre eles tiveram função de inibição da proteína alvo, como também repulsão do ligante.

Os aminoácidos que mais apresentam repulsão foram: Phe330, Phe331, His440, Trp84 Tyr334 e entre outros. No entanto, outros resíduos tiveram valores negativos favoráveis, como: Met83 com -14,49 kcal/mol, Gly441 com -18,27 Kcal/mol, Asp72 com 6,85 kcal/mol, Tyr121 com -1,84 kcal/mol, Ile439 com -11,05 kcal/mol e entre outros que fazer parte da região do sítio ativo da proteína alvo.

Gráfico 11. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1QGR com o ligante Rivastigmina.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

De forma clara o Gly441 (glicina) 135,3%, o aminoácido Met83 (metionina), aparecendo em todas as estruturas com valores negativos, obteve maior nível de atratividade, sendo responsável por 122% da interação entre a AChE com Rivastigmina. Seguido da Ile439 (isoleucina) com 82% e a Asp72 (ácido aspártico) com 50,7%.

#### Galantamina

A energia total de acordo com as propriedades quânticas é -4.86 eV. Logo, foi possível verificar cada resíduo de aminoácido na ligação e sua influência.

Os aminoácidos que mais apresentaram valores positivos e que não favoreceram o processo de interação energética, foram: Tyr334, Phe330, e entre outros.

Os aminoácidos que favoreçam o processo de inibição foram: Phe331 com -90,01 kcal/mol, Asp72 com -9,54 Kcal/mol, Met83 com -19,53 kcal/mol, Gly441 com -6,30 Kcal/mol, Phe331 com -36,26 kcal/mol, Ser329 com -23,34 kcal/mol e entre outros.

Tabela 23. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1GQR com ligante Galantamina, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol.

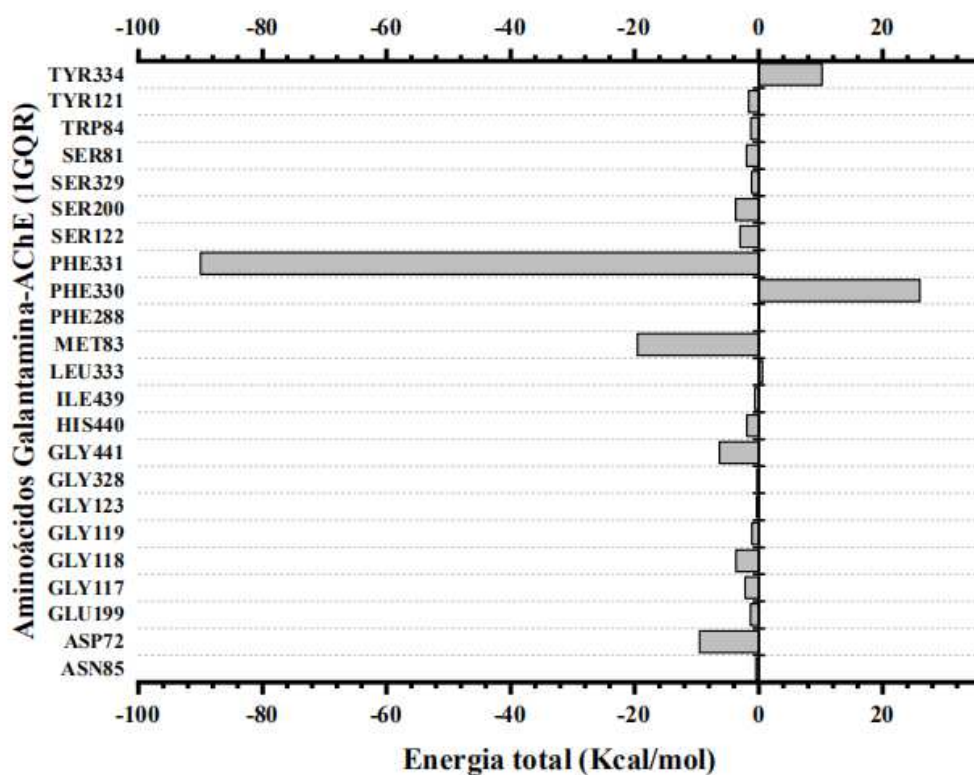
<b>R<sub>i</sub></b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i</sub> R<sub>i+1</sub> +L</b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i</sub> R<sub>i+1</sub></b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i+1</sub> +L</b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i+1</sub></b>	<b>E<sub>i</sub> (R<sub>i</sub>→ L)</b>
<b>ASN85</b>	-2,29E+03	-1,35E+03	-1,88E+03	-9,36E+02	<b>-0,47</b>
<b>ASP72</b>	-2,18E+03	-1,24E+03	-1,74E+03	-8,02E+02	<b>-9,54</b>
<b>GLU199</b>	-1,94E+03	-1,01E+03	-1,47E+03	-5,32E+02	<b>-1,33</b>
<b>GLY117</b>	-1,91E+03	-9,69E+02	-1,70E+03	-7,63E+02	<b>-2,17</b>
<b>GLY118</b>	-1,56E+03	-6,24E+02	-1,36E+03	-4,18E+02	<b>-3,67</b>
<b>GLY119</b>	-1,83E+03	-8,94E+02	-1,63E+03	-6,88E+02	<b>-1,07</b>
<b>GLY123</b>	-1,79E+03	-8,53E+02	-1,59E+03	-6,47E+02	<b>-0,37</b>
<b>GLY328</b>	-1,95E+03	-1,01E+03	-1,74E+03	-8,02E+02	<b>-0,28</b>
<b>GLY441</b>	-2,17E+03	-1,23E+03	-1,97E+03	-1,03E+03	<b>-6,30</b>
<b>HIS440</b>	-1,98E+03	-1,05E+03	-1,51E+03	-5,75E+02	<b>-1,91</b>
<b>ILE439</b>	-2,33E+03	-1,39E+03	-1,97E+03	-1,03E+03	<b>-0,63</b>
<b>LEU333</b>	-2,34E+03	-1,40E+03	-1,97E+03	-1,03E+03	<b>0,63</b>
<b>MET83</b>	-2,75E+03	-1,81E+03	-2,02E+03	-1,09E+03	<b>-19,53</b>
<b>PHE288</b>	-2,31E+03	-1,37E+03	-1,84E+03	-8,96E+02	<b>0,15</b>
<b>PHE330</b>	-2,22E+03	-1,28E+03	-1,74E+03	-8,02E+02	<b>26,00</b>
<b>PHE331</b>	-2,26E+03	-1,32E+03	-1,78E+03	-8,45E+02	<b>-90,01</b>
<b>SER122</b>	-2,02E+03	-1,08E+03	-1,70E+03	-7,63E+02	<b>-3,03</b>
<b>SER200</b>	-1,98E+03	-1,04E+03	-1,66E+03	-7,23E+02	<b>-3,69</b>
<b>SER329</b>	-1,95E+03	-1,01E+03	-1,63E+03	-6,88E+02	<b>-1,14</b>

<b>SER81</b>	-1,94E+03	-1,01E+03	-1,62E+03	-6,84E+02	<b>-1,99</b>
<b>TRP84</b>	-2,69E+03	-1,75E+03	-2,08E+03	-1,14E+03	<b>-1,26</b>
<b>TYR121</b>	-2,29E+03	-1,35E+03	-1,74E+03	-8,02E+02	<b>-1,62</b>
<b>TYR334</b>	-2,22E+03	-1,28E+03	-1,67E+03	-7,32E+02	<b>10,22</b>

Fonte: dados da pesquisa, 2020.

A representação de acordo com o gráfico 12, demonstra que boa parte dos aminoácidos obteve valores negativos. Como Phe331 com -90 kcal/mol, Met83 com -19,53 kcal/mol, Asp72 -9,54 kcal/mol e entre outros que apresentaram valores negativos que favoreceu a energia de interação com cada resíduo de aminoácido. Por outro lado, o Phe330 com 26 kcal/mol, Tyr334 com 10,22 kcal/mol. E entre outros que apresentaram repulsão energética ao fármaco. Todos os resíduos de aminoácidos, considerando o somatório total de energia, foi negativa.

Gráfico 12. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1QGR com o ligante Galantamina.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

### Fisostigmina

De acordo com as propriedades quânticas, a energia total foi - 0,33 eV. A cada resíduo de aminoácido na ligação, os valores de energia variaram de interação atrativa ou repulsiva.

Os aminoácidos que mais apresentaram valores positivos e que não favoreceram o processo de interação energética, foram: Phe331, Leu33 e Gln74. Por outro lado, os aminoácidos que favoreceram o processo de inibição foram: Asp72 com -11,21 kcal/mol, Gly117 -11,09 kcal/mol, Tyr121 -3,95 kcal/mol, Ser81 -1,36 kcal/mol, Tyr70 -1,29 kcal/mol e entre outros.

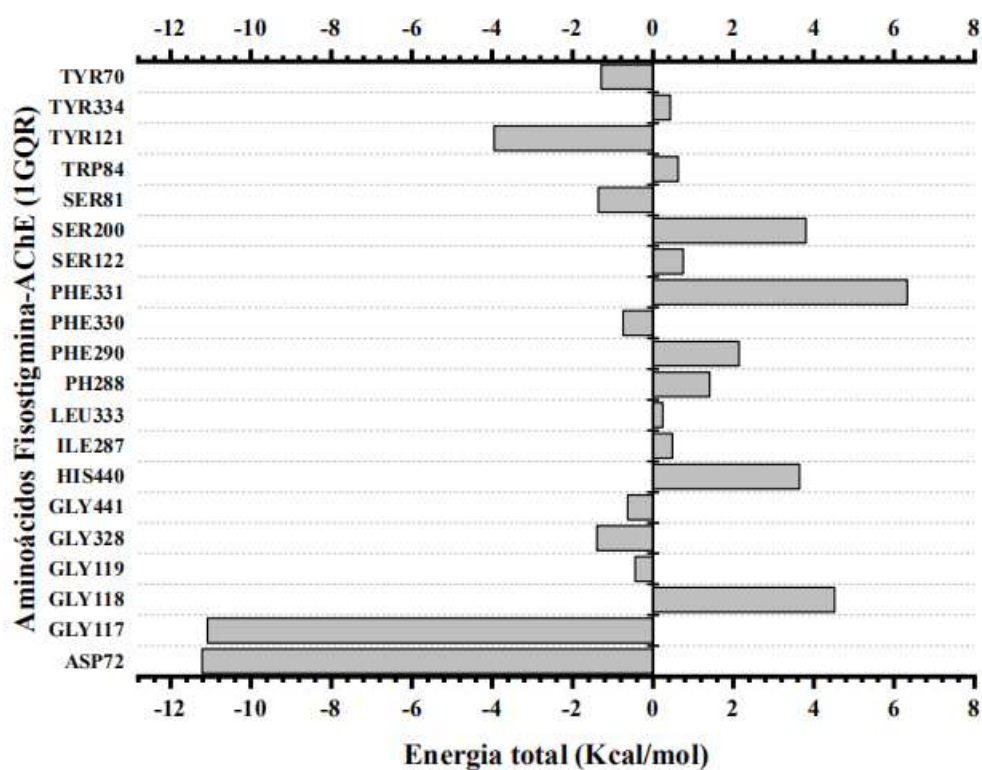
Tabela 24. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1GQR com ligante Fisostigmina, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol.

<b>R<sub>i</sub></b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i</sub> R<sub>i+1</sub> +L</b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i</sub> R<sub>i+1</sub></b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i+1</sub> +L</b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i+1</sub></b>	<b>E<sub>i</sub> (R<sub>i</sub>→ L)</b>
<b>ASP72</b>	-2,13E+03	-1,24E+03	-1,70E+03	-8,02E+02	<b>-11,21</b>
<b>GLY117</b>	-1,87E+03	-9,70E+02	-1,66E+03	-7,63E+02	<b>-11,09</b>
<b>GLY118</b>	-1,52E+03	-6,24E+02	-1,32E+03	-4,18E+02	<b>4,52</b>
<b>GLY119</b>	-1,79E+03	-8,94E+02	-1,59E+03	-6,88E+02	<b>-0,44</b>
<b>GLY328</b>	-1,90E+03	-1,01E+03	-1,70E+03	-7,98E+02	<b>-1,39</b>
<b>GLY441</b>	-2,13E+03	-1,23E+03	-1,92E+03	-1,03E+03	<b>-0,63</b>
<b>HIS440</b>	-1,94E+03	-1,05E+03	-1,47E+03	-5,75E+02	<b>3,65</b>
<b>ILE287</b>	-2,06E+03	-1,17E+03	-1,70E+03	-8,02E+02	<b>0,49</b>
<b>LEU333</b>	-2,18E+03	-1,28E+03	-1,82E+03	-9,20E+02	<b>0,25</b>
<b>PHE288</b>	-2,27E+03	-1,37E+03	-1,79E+03	-8,96E+02	<b>1,41</b>
<b>PHE290</b>	-2,23E+03	-1,33E+03	-1,75E+03	-8,53E+02	<b>2,14</b>
<b>PHE330</b>	-2,18E+03	-1,28E+03	-1,70E+03	-8,02E+02	<b>-0,74</b>
<b>PHE331</b>	-2,22E+03	-1,32E+03	-1,74E+03	-8,45E+02	<b>6,33</b>

<b>SER122</b>	-1,98E+03	-1,08E+03	-1,66E+03	-7,63E+02	<b>0,75</b>
<b>SER200</b>	-1,94E+03	-1,04E+03	-1,62E+03	-7,23E+02	<b>3,80</b>
<b>SER81</b>	-1,90E+03	-1,01E+03	-1,58E+03	-6,84E+02	<b>-1,36</b>
<b>TRP84</b>	-2,65E+03	-1,75E+03	-2,04E+03	-1,14E+03	<b>0,63</b>
<b>TYR121</b>	-2,25E+03	-1,35E+03	-1,70E+03	-8,02E+02	<b>-3,95</b>
<b>TYR334</b>	-2,02E+03	-1,13E+03	-1,47E+03	-5,75E+02	<b>0,43</b>
<b>TYR70</b>	-2,23E+03	-1,33E+03	-1,68E+03	-7,83E+02	<b>-1,29</b>

Dados da pesquisa, 2020.

Gráfico 13. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1QGR com o ligante Fisostigmina.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

## Memantina

Na interação com o receptor 1QGR da AChE e o composto Memantina, os dados apresentaram os aminoácidos dentro do raio de corte, com função de inibição e repulsão, que são: Tyr334, Tyr121, Trp84, Ser81, Ser329, Ser122, Phe330, Phe331, Phe288, Met83, Leu333, Leu332, Ile439, Ile287, His440, Gly80, Gly441, Gly335, Gly328, Gly119, Gly118, Gly117 e Asp72.

Tabela 25. Energia de Ligação dos principais aminoácidos da proteína 1QGR com ligante Memantina, onde os fragmentos estão na unidade Ha e a energia total em Kcal/mol.

<b>R<sub>i</sub></b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i</sub> R<sub>i+1</sub> +L</b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i</sub> R<sub>i+1</sub></b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i+1</sub> +L</b>	<b>R<sub>i-1</sub> R<sub>i+1</sub></b>	<b>E<sub>i</sub> (R<sub>i</sub> → L)</b>
<b>ASP72</b>	-1.74E+03	-1.22E+03	-1.31E+03	-7.82E+02	<b>-4,25</b>
<b>GLN74</b>	-1.62E+03	-1.10E+03	-1.17E+03	-6.45E+02	<b>1.61</b>
<b>GLY80</b>	-1.51E+03	-9.87E+02	-1.30E+03	-7.79E+02	<b>-1,21</b>
<b>GLY117</b>	-1.55E+03	-1.03E+03	-1.34E+03	-8.19E+02	<b>-0.29</b>
<b>GLY118</b>	-1.15E+03	-6.24E+02	-9.42E+02	-4.18E+02	<b>-0.54</b>
<b>GLY119</b>	-1.49E+03	-9.71E+02	-1.29E+03	-7.63E+02	<b>1.08</b>
<b>GLY328</b>	-1.53E+03	-1.01E+03	-1.33E+03	-8.02E+02	<b>0.04</b>
<b>GLY441</b>	-1.76E+03	-1.23E+03	-1.55E+03	-1.03E+03	<b>-6.93</b>
<b>HIS440</b>	-1.57E+03	-1.05E+03	-1.10E+03	-5.75E+02	<b>-5.69</b>
<b>ILE439</b>	-1.92E+03	-1.39E+03	-1.55E+03	-1.03E+03	<b>-5.04</b>
<b>LEU333</b>	-1.92E+03	-1.40E+03	-1.56E+03	-1.03E+03	<b>5.67</b>
<b>PHE288</b>	-1.53E+03	-1.01E+03	-1.06E+03	-5.32E+02	<b>-0.09</b>

<b>PHE330</b>	-1.80E+03	-1.28E+03	-1.33E+03	-8.02E+02	<b>28.04</b>
<b>PHE331</b>	-1.85E+03	-1.32E+03	-1.37E+03	-8.45E+02	<b>-36.26</b>
<b>SER81</b>	-1.67E+03	-1.14E+03	-1.34E+03	-8.19E+02	<b>-1.61</b>
<b>SER122</b>	-1.88E+03	-1.35E+03	-1.56E+03	-1.03E+03	<b>-1.89</b>
<b>SER329</b>	-1.53E+03	-1.01E+03	-1.21E+03	-6.88E+02	<b>-23.34</b>
<b>TRP84</b>	-1.67E+03	-1.14E+03	-1.06E+03	-5.32E+02	<b>-2.15</b>
<b>TYR121</b>	-1.61E+03	-1.08E+03	-1.06E+03	-5.32E+02	<b>-1.09</b>
<b>TYR334</b>	-1.61E+03	-1.08E+03	-1.06E+03	-5.32E+02	<b>-0.68</b>

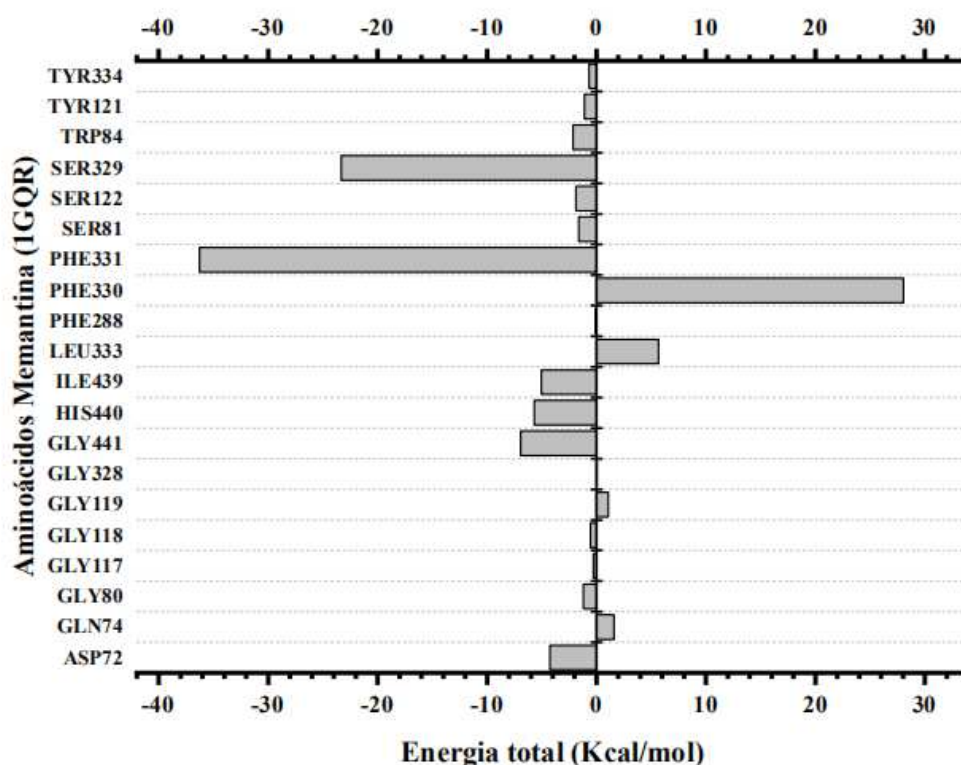
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Por intermédio de propriedades quânticas, essa energia total é -2,35 eV. Com a realização de cálculos quânticos foi possível notar a influência de cada resíduo de aminoácido na ligação.

Os aminoácidos que mais apresentaram valores positivos e que não favoreceram o processo de interação energética, foram: Phe331, Leu33 e Gln74. Em contrapartida, os aminoácidos que favoreceram o processo de inibição foram: Asp72 com -4,25 kcal/mol, His440 -5,69 kcal/mol, Gly441 -6,93 kcal/mol, Phe331 -36,26 kcal/mol, Ser329 com -23,34 kcal/mol e entre outros.



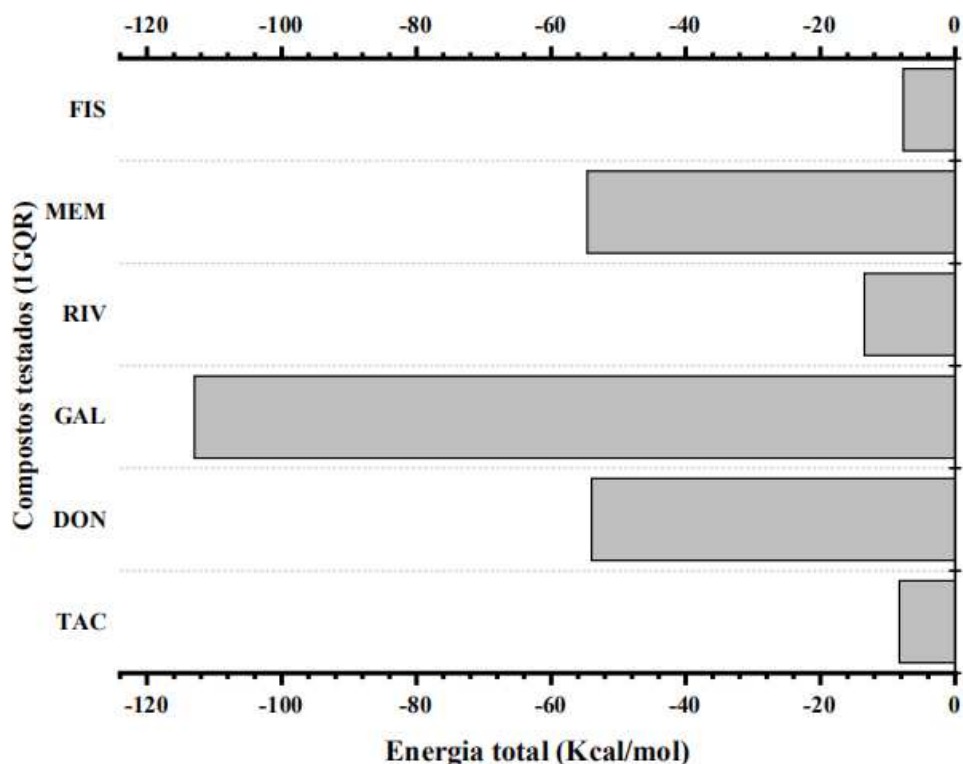
Gráfico 14. Interação de ligação dos principais aminoácidos da proteína 1QGR com o ligante Memantina



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

O gráfico 15 aponta a energia kcal/mol os fármacos que obtiveram melhor atividade energética com valores expressivamente negativos. Quando comparados ao primeiro receptor 1EA5, a Galantamina, Donepezil e Memantina apresentaram energia variando de -110, -65 e -65 kcal/mol aproximadamente. Demonstrando que por meio de dimensões específicas, os valores negativos tendem a aumentar, considerando que houve interação proteína-ligante. Embora todos apresentassem melhores conformações de energia, ligações e resíduos âncoras que facilitou o processo.

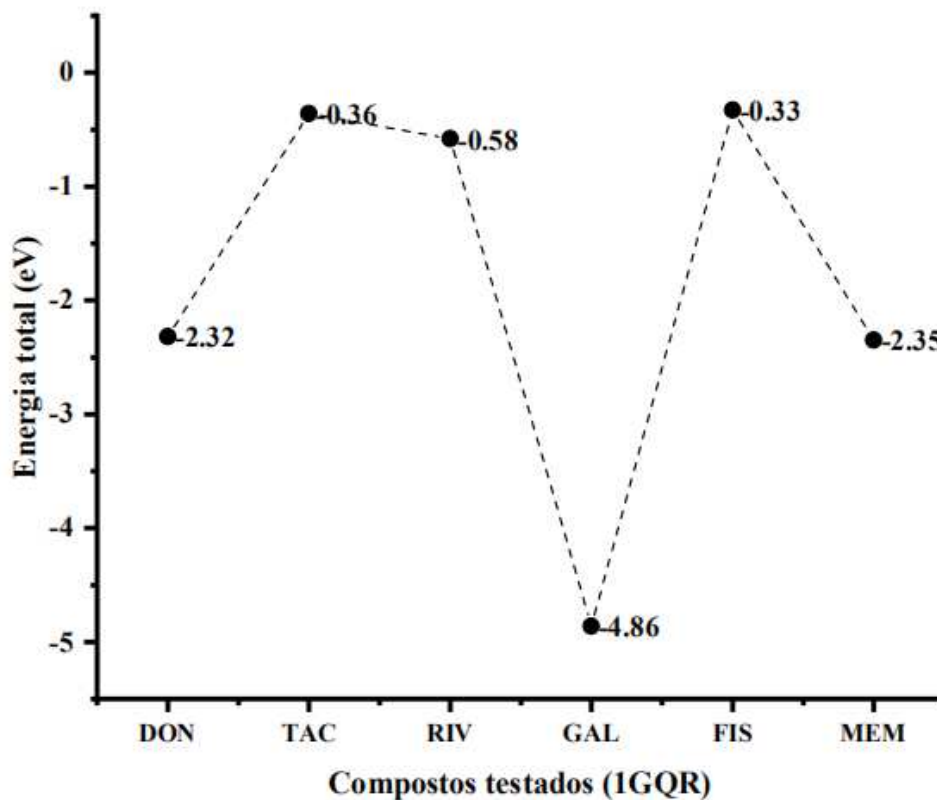
Gráfico 15. Compostos testados com os aminoácidos da proteína 1GQR e sua energia total (Kcal/mol) comparando-se com todos os ligantes.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

De acordo com o Gráfico 16 a representação energia total (BFE) em Eletrovolts (eV) demonstra balanço energético. O fármaco que mais obteve melhor valor energético foi Galantamina com -4,86 eV, a Memantina com -2,35 eV, o Donepezil com -2,32 eV. Por outro lado, os outros compostos apresentaram valores menores quando comparados aos que tiveram melhor energia, foram: Fisostigmina, Rivastigmina e Tacrina com -0,33 eV, -0,58 eV e -0,36 eV. Visto isso, todos os compostos demonstraram valores negativamente expressivos, sendo demonstrados valores melhores na região do sítio ativo da proteína, quando comparados ao receptor 1EA5.

Gráfico 16. Representação da Energia total (eV) de todos os ligantes ancorados a proteína 1GQR da AChE.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

## CONCLUSÕES DO 2º RECEPTOR 1GQR

Portanto, os seis fármacos apresentaram um excelente potencial de inibição da proteína da acetilcolinesterase (1GQR), considerando a região do sítio ativo, os valores energéticos foram altamente promissores, comprovadas pelo *Docking Molecular* e o *Fracionamento de Capuzes Conjugados*. Logo, esses compostos podem contribuir no tratamento da Doença do Alzheimer.

Essa pesquisa, indica a viabilidade de experimentação *in silico* para resolução de problemas farmacológicos, considerando essenciais para elucidação do comportamento de uma proteína e ligante em sistemas biológicos, como também estudar a região do sítio ativo. Por meio desse estudo, pode-se notar interações no sítio de ligação, identificar grupos de

aminoácidos funcionais que foram responsáveis pela criação de ligações favoráveis e por meio disso, pensar em ajustes para potencializar a estrutura do fármaco (ligante) para melhor inibição da proteína (receptor).

A partir da análise dos dados obtidos, considerando os aspectos da metodologia utilizada e do sistema em estudo, pode ser concluído:

### ***Docking Molecular***

- A metodologia proposta foi alcançada, capaz de investigar e testar, elucidar o potencial Anti-Alzheimer com os seis compostos.
- Todos os seis fármacos apresentaram atividade inibitória frente a AChE, uma energia livre de ligação de todos os complexos foram expressivamente negativos, podendo afirmar que de forma termodinâmica os valores de gastos energéticos são favoráveis, quando comparado a uma proteína isolada.
- Os aminoácidos que mais se destacaram em todos os fármacos na interação de proteína-ligante, foram: Asp72, Met83, Tyr121, Ser200, Gly441, Phe331 e entre outros que destacou na região do sítio ativo.
- É perceptível a influência dos resíduos Met83, Asp72 e Gly441 como aminoácido aparece como forte interação com todos os ligantes do docking molecular, podendo serem considerados aminoácidos âncora.

### ***Fracionamento Molecular de Capuzes Conjugados (MFCC)***

- O método quântico apresentou resultados altamente satisfatórios. Essa técnica permitiu observar a energia quântica de cada resíduo de aminoácido do receptor em todas as simulações ancoradas aos ligantes, demonstrando atração eletrostática em vários aminoácidos do receptor 1GQR.
- O balanço energético apresenta três compostos realizando ligações de hidrogênio, sendo eles: Donepezil, Galantamina e Memantina, apresentando energia total em eletrovolts (eV) negativos acima de -1 eV.
- Os aminoácidos His440, Met83, Tyr121, Phe331 e Gly441 determinou possíveis regiões ancoras do sítio ativo de ligação.

Em suma, foi possível investigar utilizando-se de métodos *in silico* a interação no sítio ativo da proteína, os seis fármacos, obtendo-se resultados melhores e específicos do sítio ativo, para resolução de um possível melhoramento deles, com potencial inibitório ainda maior. As melhores conformações de menor energia por meio do *docking molecular* e fracionamento de capuzes conjugados foram evidenciados nessa pesquisa.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA OP. **Biologia molecular da doença de Alzheimer**: Uma luz no fim do túnel? Rev. Assoc. Med. Bras. v. 43, p.77 – 81, 1997.

ALMEIDA OP. **Tratamento da doença de Alzheimer, Avaliação cri-CFF vai disponibilizar um clipping eletrônico com notícias sobre Farmácia e saúde, em geraltica sobre o uso de anticolinesterasicos**. Arq. Neuropsiquiatr. v. 56, p.688-696, 1998.

ALMEIDA, Jonathan Resende de. **Estudos de modelagem molecular e relação estrutura-atividade da acetilcolinesterase e inibidores em Mal de Alzheimer**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ALMEIDA, Jonathan Resende de. **Planejamento, ensaio e otimização in silico de novos protótipos inibidores da enzima acetilcolinesterase**. 2015. PhD Thesis. Universidade de São Paulo.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2011 **Alzheimer's disease facts and figures**. Alzheimer's & Dementia, v. 7, n. 2, p. 208–44, 2011.

ARAÚJO, R. S.; PONDÉ, M. P. **Eficácia da Memantina na doença de Alzheimer em seus estágios moderado à grave**. Jornal Brasileiro de Psiquiatria, v. 55, n.2, p. 148 – 153, 2006.

BAR-ON, P.; MILLARD, C. B.; HAREL, M.; DVIR, H.; ENZ, A.; SUSSMAN, J. L.; SILMAN, I. **Kinetic and Structural Studies on the Interaction of Cholinesterases with the Anti-Alzheimer Drug Rivastigmine**. Biochemistry (2002), 41(11), 3555-3564.

BARTOLUCCI, C.; PEROLA, E.; PILGER, C.; FELS, G.; LAMBA, D. **Three-dimensional structure of a complex of galanthamine (nivalin) with acetylcholinesterase from Torpedo californica**: implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. Proteins: Structure, Function, and Genetics (2001), 42(2), 182-191.

BATISTA, V. H. S. C.; GRANATO, A. C.; ANGELOTTI, W. F. D. **Comparison of density functional in the study of electronic properties of artemisinin derivatives**. Quimica Nova, v. 39, n. 3, p. 298–304, 1 abr. 2016.

**BIOVIA DISCOVERY STUDIO VISUALIZER**. 2014. Disponível em: <http://accelrys.com/products/datasheets/discovery-studio-visualizer.pdf>. Acesso em: Fev. de 2020.

CAETANO, E. W. S. **Cálculo ab initio de propriedades optoeletrônicas da L-Alanina**. 2005. p. 285–482. Tese (Doutorado em Física) - Universidade Federal do Ceará, 2005.

CLARK, S. J.; SEGALL, M. D.; PICKARD, C. J.; HASNIP, P. J.; PROBERT, M. J.; REFSON, K.; PAYNE, M. C. **"First principles methods using CASTEP"**, Zeitschrift fuer Kristallographie, 220 (5-6), 567-570 (2005).

CHRISTOPHER, H. et al. **Extended-Release Physostigmine in Alzheimer Disease**. Arch. Gen. Psychiatry, V. 57, 2000.

COELHO FILHO, J.M.J.M.C., Birks J. **Physostigmine for dementia due to Alzheimer's disease**. Cochrane Database of Systematic Reviews 2008, Issue 2. Art. No.: CD001499. DOI: 10.1002/14651858.CD001499.

DA COSTA, R. F. et al. Explaining statin inhibition effectiveness of HMG-CoA reductase by quantum biochemistry computations. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 4, p. 1389–1398, 28 jan. 2012.

DIAS, M. L. **Investigação por DFT de fios de Fe, Co e Ni dopados**. São Luís-MA: Universidade Federal do Maranhã. Trabalho de Conclusão de Curso, 2015.

**DiscoveryStudio Visualization**. Disponível em: <<https://www.3dsbiovia.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/visualization-download.php>>. Acesso em: 11 nov. 2020.

DO VALE, Francisco de Assis Carvalho, et al. **Tratamento da doença de Alzheimer**. Dementia & Neuropsychologia, 2011, 5.1: 34-48.

DVIR, Irit et al. **Soluble polysaccharide and biomass of red microalga Porphyridium sp.** alter intestinal morphology and reduce serum cholesterol in rats. British journal of Nutrition, v. 84, n. 4, p. 469-476, 2000.

DUARTE, H. A. **Índices de reatividade química a partir da teoria do funcional de densidade: Formalismo e perspectivas**. Quimica Nova, v. 24, n. 4, p. 501–508, jul. 2001.

**DrugBank**. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/>>. Acesso em: 11 nov. 2020.

FALCO, A. de et al. Doença de Alzheimer: **hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento**. Quim. Nova.v. 39.n. 1. p. 63-80, 2016.

FERRI, C. P.; PRINCE, M.; BRAYNE, C.; BRODATY, H.; FRATIGLIONI, L.; GANGULI, M.; HALL, K.; HASEGAWA, K.; HENDRIE, H.; HUANG, Y.; JORM, A.; MATHERS, C.; MENEZES, P. R.; RIMMER, E.; SCAZUFCA, M. **Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study**. Lancet, v. 66, n. 9503, p. 2112-7, 2005.

FLICKER, L. **Efficacy of pharmacological treatment of dementia**. Rev. Bras. Psiquiatria, v.24, suppl. 1, pg. 11-14, São Paulo, 2002.

HIGGINS, Julian PT; FLICKER, Leon. Lecitina para demência e deficiência cognitiva. **Banco de dados de revisões sistemáticas Cochrane**, n. 4, 2000.

FORLENZA, O. V.; **Pharmacological treatment of Alzheimer's disease**. Aging clinical and experimental research, 2005, 18.2: 158-162.

FRAZÃO, N. F. **Bioquímica Quântica de Fármacos Anti-Parkinsonianos**. 2012. Tese (Doutorado em Física) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012.

FRAZÃO, N. F. **Bioquímica Quântica de Fármacos Anti-Parkinsonianos**. 2012. Tese (Doutorado em Física) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012.

GLOBO, G1. **Casos de demência vão triplicar e chegar até 152 milhões de pessoas até 2050**. Saúde e Ciência. 2019. Acesso em: <<https://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2019/05/14/casos-de-demencia-vaio-triplicar-e-chegar-a-152-milhoes-de-pessoas-ate-2050-diz-oms.ghtml>>. Disponível: 11 de nov. de 2020.

GOMES, D. S. **Caracterização Teórica por Simulação Computacional do Antibiótico Tetracíclico C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>: Usando DFT**. Cuité-PB: Universidade Federal de Campina Grande. Trabalho de Conclusão de Curso, 2018.

GREENBLATT, HM, et al. **Estrutura da acetilcolinesterase complexada com (-) galantamina na resolução de 2,3 Å**. Febs Letters, 1999, 463.3: 321-326.

HAOYU, S. Yu et al. MN15: A Kohn–Sham global-hybrid exchange–correlation density functional with broad accuracy for multi-reference and single-reference systems and noncovalent interactions. **Chemical science**, v. 7, n. 8, p. 5032-5051, 2016.

HAREL, M. et al. **Ligação do ligando quaternário a resíduos aromáticos no desfiladeiro do sítio ativo da acetilcolinesterase**. Anais da Academia Nacional de Ciências, v. 90, n. 19, p. 9031-9035, 1993.

HENNIG, Janosch; SATTLER, Michael. **A dupla dinâmica: combinando RMN e espalhamento de pequenos ângulos na biologia estrutural**. Protein Science, 2014, 23.6: 669-682.em: 12 de Dezembro de 2019.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. **Inhomogeneous Electron Gas**. Physical Review, New York, v. 136, n. 1964, p. 864–871, 1964.

HUANG, K. **Statistical Mechanics**. 1. ed. New York: John Wiley & Sons, 1963.

HUMKEY, RN, PURVIS, GD, THOMPSON, MA E NIGEL RICHARDS. “Melhorando a função de pontuação de PMF para acoplamento molecular e triagem virtual” **J. Med. Chem**, 2005.

IBGE. **Sinopse do Censo Demográfico 2010**. Rio de Janeiro: IBGE, 2011.

INOUYE, Keika; PEDRAZZANI, Elisete Silva; PAVARINI, Sofia Cristina Iost. **Influência da doença de Alzheimer na percepção de qualidade de vida do idoso**. Revista da Escola de Enfermagem da USP, 2010, 44.4: 1093-1099.

Jauris, Iuri Medeiros, et al. Adsorção do fármaco nimesulida em nanoestruturas de carbono. **Disciplinarum Sciential Naturais e Tecnológicas**, 2015, 16.2: 245-256.

KAMAU, Edwin; MUSTATA, Gabriela. **Pharmacophore Model Development for the Identification of Novel Acetylcholinesterase Inhibitors**. 2007.



KNAPP, M.J. KNOPMAN, D.S. SOLOMON, P.R. PENDLEBURY, W.W. DAVIS C.S. GACON, S.L. **A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease.** J. Am. Med. Assoc. v.271, p.992-998, 1994.

KATO, T. On the eigenfunctions of many-particle systems in quantum mechanics. **Communications on Pure and Applied Mathematics**, v. 10, n. 2, p. 151–177, 1957.

KOHN, W.; SHAM, L. J. **Self-consistent equations including exchange and correlation effects.** Physical Review, v. 140, n. 4A, 1965.

LIPINSKI, Christopher A., et al. **Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.** Advanced drug delivery reviews, 1997, 23.1-3: 3-25.

MARTIN, R. M. **Electronic structure: basic theory and practical methods.** Cambridge: Cambridge University Press, 2004.

MATHIAS, F.T.; CRF/PR 24612 | **Drogaria On Line Eireli** | Consulta Remédios | CNPJ/MF 08.434.085/0001-28 | Avenida Vicente Machado, 791. Batel. Curitiba. Paraná. | CEP 80420-011.

**Materials Studio Materials Modeling & Simulation Application | Dassault Systèmes BIOVIA.** Disponível em: <<https://www.3dsbiovia.com/products/collaborative-science/biovia-materials-studio/>>. Acesso em: 11 nov. 2020.

MATTA, C. F. **Quantum biochemistry.** Wiley, germany, 2010.

**Medicamentos aprovados pela FDA: RAZADYNE** (bromidrato de galantamina), para uso oral. Acesso em: <[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2015/021615s021lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/021615s021lbl.pdf)> Disponível em: 27 de maio de 2020.

MINETT, Thaís Soares Cianciarullo; BERTOLUCCI, Paulo Henrique Ferreira. **Terapia colinérgica na Doença de Alzheimer.** Revista de Neurociência, v. 8(1), pg. 11-14, 2000.

MOTA, Kyvia Bezerra. **Análise energética in silico das interações:** ER $\alpha$ -Tamoxifeno, ER $\alpha$ -Raloxifeno e Integrina  $\alpha$ V $\beta$ 3-Cilengitide. 2016.

MOTA, K. B; LIMA NETO, J. X; LIMA COSTA, A. H; OLIVEIRA, J. I. N; BEZERRA, K. S; ALBUQUERQUE, E. L; CAETANO, E. W. S; FREIRE, V. N; FULCO, U, L. *A quantum biochemistry model of the interaction between the estrogen receptor and the two antagonists used in breast cancer treatment.* Comp. and Theor. Chem., 1089, 21-27, 2016.

NAJAFI, Z. et al. **Novel tacrine-1,2,3-triazole hybrids:** In vitro, in vivo biological evaluation and docking study of cholinesterase inhibitors. European Journal of Medicinal Chemistry. v. 125. p. 1200-1212, 2017.

NEWHOUSE, Paul A.; POTTER, Alexandra; LEVIN, Edward D. Envolvimento do sistema nicotínico nas doenças de Alzheimer e Parkinson. **Drogas e envelhecimento**, v. 11, n. 3, pág. 206-228, 1997.

NORDBERG A. CARLSON LA, WINBLAD B. **Biological markers and the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease**. Acta Neurol. Scand. v.85, p. 54-58, 1992.P. Hohenberg and W. Kohn, Phys. Rev. 136, B864 (1964).

OLIVEIRA, J. E. D. **Caracterização Quântica da Coenzima Q10 (COQ10) Utilizada no Tratamento da Fibromialgia**. Cuité-PB: Universidade Federal de Campina Grande. Trabalho de Conclusão de Curso, 2018.

PEDROZA, A. C. Teoria do Funcional da Densidade: Uma Possível Solução para o Problema de Muitos Elétrons da Mecânica Quântica. **Physicae Organum**, v. 2, n. 1, p. 14, 28 mar. 2016.

PERDEW, J. P.; BURKE, K.; ERNZERHOF, M. Generalized gradient approximation made simple. **Physical Review Letters**, v. 77, n. 18, p. 3865–3868, 1996.

PERDEW, J. P.; BURKE, K.; ERNZERHOF, M. **Perdew, Burke, and Ernzerhof ReplyPhysical Review Letters**, 1998.

PERDEW, J. P.; ZUNGER, A. Self-interaction correction to density-functional approximations for many-electron systems. **Physical Review B**, v. 23, n. 10, p. 5048–5079, 1981.

PETERSEN, Ronald. **Guia da Clínica Mayo sobre mal de Alzheimer**. Rio de Janeiro: Anima, 2006.

PRINCE, M. **Epidemiology of dementia**. Psychiatry, v. 6, n. 12, p. 488-90, 2007.

Qizilbash N, Whitehead A, Higgins J, Wilcock G, Schneider L, Farlow M: **Inibição da colinesterase para a doença de Alzheimer: uma metanálise dos ensaios com tacrina**. Colaboração dos Trialists da demência. JAMA. 25 de novembro de 1998; 280 (20): 1777-82.  
ROGERS, Joseph, et al. Inflamação e patogênese da doença de Alzheimer. *Neurobiology of age*, 1996, 17.5: 681-686.

ROGAWSKI, MA; WENK, GL: **A base neurofarmacológica para o uso da memantina no tratamento da doença de Alzheimer**. CNS Drug Rev. 2003 Fall; 9 (3): 275-308. (PubMed ID 14530799).

ROGERS, SL, et al. **Um estudo de 24 semanas, duplo-cego e controlado com placebo de donepezil em pacientes com doença de Alzheimer**. Neurology, 1998, 50.1: 136-145.

SCOTT LJ, Goa KL: **Galantamina: uma revisão de seu uso na doença de Alzheimer**. Drogas. Novembro de 2000; 60 (5): 1095-122. (ID do PubMed 11129124).

SILMAN, I. **Kinetic and Structural Studies on the Interaction of Cholinesterases with the Anti-Alzheimer Drug Rivastigmine**. Biochemistry (2002), 41(11), 3555-3564.

SOUSA, J. O. **Caracterização de Nanobiomoléculas usados no tratamento da Doença de Huntington usando métodos ab-initio**. Cuité-PB: Universidade Federal de Campina Grande. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Física), 2015.

STANDAERT, D. G.; YOUNG, A. B. **Em Goodman & Gilman**. As bases farmacológicas da terapêutica, 10a. Ed.; Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L., eds.; Mc Graw Hill, 2006, cap. 20. 27.

SUSSMAN, Joel L. et al. **Estrutura atômica da acetilcolinesterase de Torpedo californica**: uma proteína prototípica de ligação à acetilcolina. *Ciência*, v. 253, n. 5022, p. 872-879, 1991.  
VALE, L. A. C. et al. Tratamento da Doença de Alzheimer. *Dementia & Neuropsychologia*, v. 5, n.(suppl 1), p. 34 – 48, 2011.

STEINMANN, W. *Physical Review Physical Review*. **Physical Review Letters**, v. 5, n. 10, p. 470–472, 1960.

VENTURA, Ana LM et al. **Sistema colinérgico**: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. *Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)*, v. 37, n. 2, p. 66-72, 2010.

VERLI, H.; BARREIRO, E. J. **Um paradigma da química medicinal**: a flexibilidade dos ligantes e receptores. *Química Nova*, 28, 95-102, 2005.

VERLI, Hugo. **Bioinformática**: da biologia à flexibilidade molecular. 2014.  
WALLIN, A.K. WATTMO, C. MINTHON, L. **Galantamine treatment in Alzheimer's disease**: response and long-term outcome in a routine clinical setting. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, v. 7, 2011.

VIEGAS, Karin et al. **Prevalência de diabetes mellitus na população de idosos de Porto Alegre e suas características sociodemográficas e de saúde**. 2009.

WATKINS, P.B. ZIMMERMAN H.J. KNAPP M.J. GRACON S.L. LEWIS K.W. **Hepatotoxic effects os tacrina administration in patients with Alzheimer's disease**. *J. Am. Med. Assoc.* v.271, p.985-991, 1994.

WESTFALL, T. C.; WESTFALL, D. P. **Em Goodman & Gilman**. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 10a. Ed.; Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L., eds.; Mc Graw Hill, 2006, cap. 6.

WIMO, A.; PRINCE, M. **Alzheimer's Disease International**: World Alzheimer Report 2010 - The Global Economic Impact of Dementia. Londres: Alzheimer's Disease International, 2010. Disponível em: Acesso em: 7 ago. 2019.

WOOTTERS, W. K.; ZUREK, W. H. **Complementarity in the double-slit experiment**: Quantum nonseparability and a quantitative statement of Bohr's principle. *Physical Review D*, v. 19, n. 2, p. 473–484, 1979.

ZHANG, D. W.; ZHANG, J. Z. H. Molecular fractionation with conjugate caps for full quantum mechanical calculation of protein-molecule interaction energy. **Journal of Chemical Physics**, 119, 3599-605, 2003.