



MICHELLE BITENCOURT

**MODELAGEM MIA-QSAR DE INIBIDORES
DE ACETILCOLINESTERASE**

***MIA-QSAR MODELING OF INHIBITORS
ACTYLCHOLINESTERASE***

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

Michelle Bitencourt

MODELAGEM MIA-QSAR DE INIBIDORES DE ACETILCOLINESTERASE

Orientador: Prof. Dr. Roberto Rittner Neto

MIA-QSAR MODELING OF INHIBITORS ACTYLCHOLINESTERASE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestra em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

Dissertation presented to the Medical Sciences Postgraduation Programme of the School of Medical Sciences of University of Campinas to obtain title of Master in Medical Sciences, a major in Biomedical Sciences.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA MICHELLE BITENCOURT E ORIENTADA PELO PROF. DR. ROBERTO RITTNER NETO

**Campinas
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

B546m Bitencourt, Michelle, 1985-
Modelagem MIA-QSAR de inibidores de
acetilcolinesterase / Michelle Bitencourt. -- Campinas, SP :
[s.n.], 2012.

Orientador : Roberto Rittner Neto.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Inibidores da colinesterase. 2. Carbamatos. 3.
Método MIA-QSAR. 4. Doença de Alzheimer. I. Rittner
Neto, Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: MIA-QSAR modeling of inhibitors actylcholinesterase.

Palavras-chave em inglês:

Cholinesterase Inhibitors

Carbamates

MIA-QSAR method

Alzheimer disease

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestra em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Roberto Rittner Neto [Orientador]

Elaine Fontes Ferreira da Cunha

Nelci Fenalti Hoehr

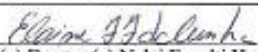
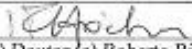

Data da defesa: 04-09-2012

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Michelle Bitencourt

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Roberto Rittner Neto

Membros:
Professor (a) Doutor (a) Elaine Fontes Ferreira da Cunha

Professor (a) Doutor (a) Nelci Fenalti Hoehr

Professor (a) Doutor (a) Roberto Rittner Neto


Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 04/09/2012

Dedicatória

Dedico esta conquista, de forma muito especial, à minha querida mãe, que sempre esteve ao meu lado nos bons e maus momentos, sempre me estendendo a mão, sendo o meu pilar de sustentação, na qual tenho minha inteira confiança e amor eterno.

Agradecimentos

À Deus, por ter sido meu grande confidente em momentos de solidão e dificuldade.

À minha mãe, por ser aquela que sempre me fez prosseguir e não desistir jamais. Aos amigos e familiares de Ipatinga, que mesmo longe sempre se fizeram presentes.

Ao Prof. Dr. Roberto Rittner por ter sido mais do que um orientador, foi também, um grande e verdadeiro amigo, sempre muito atencioso e prestativo, não me abandonando nunca.

Ao Prof. Dr. Matheus Puggina de Freitas, pela orientação em toda graduação, por ter me iniciado nesta caminhada e me mostrado o caminho a seguir.

Aos amigos e companheiros de laboratório, pelos momentos de estudo, alegria e cumplicidade. Em especial, o Caio e a Denize, que me acompanharam por toda esta caminhada, sendo sempre parceiros e companheiros, Amigos para a vida. Ao Chicó pelas implicâncias diárias, mas por ter sido tão bom amigo como sempre foi.

À Lea, por ter sido tão doce e ter oferecido linda amizade.

Ao Lucas, Jana, Kátia, Theta, Gláucia, Thiago, Cleverson, Thaís, Porno, Karen, Pedrão e todos aqueles com os quais trabalhei.

Aos amigos de Lavras que sempre me auxiliaram quando precisei, especialmente o Rodrigo, que acabou por tornar-se um companheiro no laboratório.

Ao meu amor mais lindo, Victor Hugo, por quem termino o que comecei, na esperança de um futuro promissor.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

**“Grandes batalhas só são dadas a
grandes guerreiros”**

Mahatma Gandhi

RESUMO

O presente trabalho trata de um estudo sobre compostos que se comportam como inibidores da acetilcolinesterase, uma importante enzima do processo de cognição. A acetilcolinesterase atua na hidrólise da acetilcolina, responsável pela comunicação entre os neurônios. Uma das modalidades para o design racional de fármacos é a estimativa de propriedades biológicas de novas moléculas utilizando métodos computacionais. Análise quantitativa entre estrutura química e atividade biológica (QSAR) é uma dessas técnicas. No presente trabalho, análise multivariada de imagens aplicada em QSAR (MIA-QSAR) foi utilizada para se construir modelos QSAR preditivos para uma série congênere de carbamatos com atividade anticolinesterásica. Os bons resultados estatísticos da modelagem credenciaram o modelo MIA-QSAR construído a predizer a atividade biológica de alguns novos derivados, potencialmente úteis para o tratamento do Mal de Alzheimer.

ABSTRACT

The present work describes the study of some compounds which act as acetylcholinesterase inhibitors a very important enzyme in the cognitive process. Acetylcholinesterase is responsible by the hydrolysis of acetylcholine, which accounts for the communication among the neurons. One of the approaches for the rational pharmaceuticals design is the estimation of the biological properties of new molecules using computational methods. The quantitative analysis between chemical structure and biological activity (QSAR) is one of these techniques. In the present work, the multivariate analysis of images applied in QSAR (MIA-QSAR) was employed for building predictable QSAR models for a congenial series of carbamates which exhibit anticholinesterase activity. The significant statistical results from this treatment enabled the MIA-QSAR model thus obtained to reliably predict the biological activity of some new derivatives, as potentially useful for the Alzheimer Disease treatment.

Lista de Abreviaturas

DA – Doença de Alzheimer

CERAD – Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease

CAMDEX – Cambridge Examination for Mental Disorders of the Elderly

NMDA – N-metil-D-aspartato

FDA – Food and Drug Administration

QSAR – Quantitative Structure-Activity Relationship

CoMFA – Comparative Molecular Field Analysis

CoMSIA – Comparative Molecular Similarity Indices Analysis

MIA – Multivariate Image Analysis

LOO CV – Validação cruzada *leave-on-out*

L-20%-O CV – Validação cruzada *leave-20%-out*

PLS – Partial Least Squares

N-PLS – Multilinear Partial Least Squares

RMSEC – Erro quadrado médio da calibração

RMSECV – Erro quadrado médio da validação cruzada *leave-on-out*

RMSECV_{20%-O} – Erro quadrado médio da validação cruzada *leave-20%-out*

RMSEP – Erro quadrado médio da validação externa

R^2 – Coeficiente de correlação ao quadrado da calibração

Q^2_{cv} – Coeficiente de correlação ao quadrado da validação cruzada *leave-on-out*

$Q^2_{20\%-O}$ – Coeficiente de correlação ao quadrado da validação cruzada *leave-20%-out*

Q^2 – Coeficiente de correlação ao quadrado da validação externa

R^2_{rand} – Coeficiente de correlação ao quadrado da randomização

LV – Variáveis latentes

ADME-Tox – Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade

TPSA – Topological Polar Surface Area

IC_{50} – Concentração necessária para a atividade diminuir 50%

Lista de Tabelas

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1. Características gerais dos inibidores da acetilcolinesterase.....	25
Tabela 2. Estruturas pertencentes à matriz X.....	35
Tabela 3. Estruturas pertencentes à matriz X.....	37
Tabela 4. Estruturas pertencentes à matriz X.....	38
Tabela 5. Estruturas pertencentes à matriz X.....	38
Tabela 6. Estruturas pertencentes à matriz X.....	38
Tabela 7. Estruturas de compostos com atividade anticolinesterásica conhecida.	39
Tabela 8. Valores de pIC_{50} encontrados para PLS MIA-QSAR.....	44
Tabela 9. Resultados finais obtidos nas análises.	46
Tabela 10. Compostos pertencentes aos grupos <i>Xtreino</i> e <i>Xteste</i>	51
Tabela 11. Compostos pertencentes aos grupos <i>Xtreino</i> e <i>Xteste</i>	52
Tabela 12. Compostos pertencentes aos grupos <i>Xtreino</i> e <i>Xteste</i>	52
Tabela 13. Composto pertencente ao grupo <i>Xtreino</i>	53
Tabela 14. Valores de pIC_{50} encontrados para PLS MIA-QSAR.....	60
Tabela 15. Resultados finais obtidos nas análises.....	61
Tabela 16. Parâmetros da regra dos cinco de Lipinski e TPSA para os compostos propostos A-C.....	65

Lista de Esquemas

PÁG.

Esquema 1. Etapas do processo de desenvolvimento de novo fármaco..... 26

Lista de Figuras

	<i>PÁG.</i>
Figura 1. Pirâmide etária da população residente no Brasil.....	18
Figura 2. Transmissão dos impulsos nervosos nas fendas sinápticas.....	21
Figura 3. Estrutura química do N-metil-D-aspartato (NMDA).....	22
Figura 4. Estrutura química da acetilcolina.....	23
Figura 5. Hidrólise da acetilcolina catalisada pela acetilcolinesterase.....	23
Figura 6. Inibidores de acetilcolinesterase comercialmente disponíveis.....	24
Figura 7. Coordenada fixa nas estruturas utilizadas.	33
Figura 8. Estruturas básicas para os compostos da Tabela 2.....	34
Figura 9. Estruturas básicas para os compostos das Tabelas 3 a 6.	37
Figura 10. Superposição e desdobramentos das imagens 2D.....	40
Figura 11. Gráfico de RMSEC/RMSECV <i>versus</i> número de variáveis latentes (LV) para PLS.....	41
Figura 12. Gráfico da calibração.....	42
Figura 13. Gráfico da validação cruzada LOO.....	43
Figura 14. Gráfico da validação cruzada L-20%-O.....	43
Figura 15. Coordenada fixa nas estruturas utilizadas (pixel em destaque).....	50
Figura 16. Esqueleto básico para as estruturas da Tabela 10.....	51
Figura 17. Esqueleto básico para as estruturas da Tabela 11.....	52
Figura 18. Esqueleto básico para as estruturas da Tabela 12.....	52
Figura 19. Superposição e desdobramentos das imagens 2D.....	54
Figura 20. Gráfico de RMSEC/RMSECV <i>versus</i> número de variáveis latentes (LV) para PLS.....	55
Figura 21. Gráfico da calibração.	56
Figura 22. Gráfico da validação cruzada LOO.....	56
Figura 23. Gráfico da validação cruzada 20%-O.....	57
Figura 24. Gráfico de RMSEC/RMSECV <i>versus</i> número de variáveis latentes (LV) para PLS.....	58

Figura 25. Gráfico de p/C_{50} experimental values vs. estimado/predito para o Grupo 2.....	59
Figura 26. Compostos preditos à partir do método MIA-QSAR.....	62
Figura 27. Compostos preditos a partir das análises finais.....	63

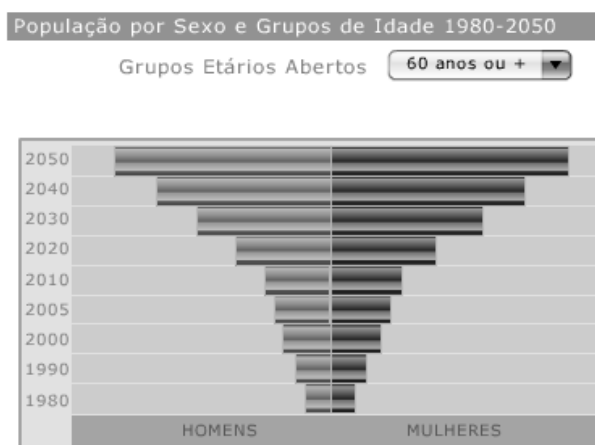
Sumário

	PÁG.
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
1 – Introdução.....	17
1.1 – A Doença de Alzheimer.....	19
1.2 – Farmacologia.....	25
1.3 – Cálculos Teóricos.....	27
2 – Objetivos.....	30
3 – Estudos Preliminares.....	32
3.1 – Metodologia.....	33
3.2 – Resultados e Discussão.....	40
4- Estudos Posteriores.....	48
4.1 – Metodologia.....	49
4.2 – Resultados e Discussão.....	53
5 – Conclusões.....	66
6 – Referências Bibliográficas.....	68

INTRODUÇÃO

1 – Introdução

Durante as últimas décadas, a pirâmide etária no Brasil sofreu algumas modificações, sendo que a população acima dos 60 anos cresce a cada ano¹ (**Figura 1**). Juntamente com o envelhecimento populacional, aumenta-se a prevalência de doenças intimamente relacionadas à senescência, como as coronariopatias, as neoplasias, a osteoporose e as demências.



Fonte: IBGE – Censo demográfico de 1980 a 2050

Figura 1. Pirâmide etária da população residente no Brasil

A demência é uma síndrome adquirida com declínio de memória, juntamente com outro déficit em domínio cognitivo, como linguagem, visuoespacial ou executivo, suficiente para interferir socialmente com o indivíduo. A demência ocasiona um grande sofrimento para os pacientes, produzindo incapacidade e dependência, e para os familiares, gerando ansiedade, depressão e grande tempo gasto com cuidados.²⁻⁵

1.1 – A Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) foi descrita pela primeira vez por *Alois Alzheimer* no início do século XX, sendo a principal causa de declínio cognitivo em adultos, sobretudo idosos, representando mais da metade dos casos de demência. Milhões de pessoas pelo mundo sofrem com Alzheimer – 1 milhão apenas no Brasil. A prevalência da demência aumenta progressivamente com o envelhecimento, sendo a idade o maior fator de risco para a doença.⁶ A partir dos 65 anos, sua prevalência dobra a cada cinco anos. Entre 60 e 64 apresenta prevalência de 0,7%, passando para 5,6% entre 70 e 79 anos, e chegando a 38,6% nos nonagenários.⁷ A incidência parece não diminuir, mesmo na faixa etária acima dos 95 anos.^{8,9} Isso revela a magnitude do problema no Brasil, onde vivem quase 20 milhões de indivíduos com mais de 60 anos.

A DA é uma desordem neurodegenerativa crônica e progressiva, que se caracteriza por distúrbio progressivo da memória e outras funções cognitivas, afetando o funcionamento ocupacional e social. Seus sintomas estão associados a alterações ocorridas em certas regiões do cérebro envolvidas nos processos cognitivos. Os transtornos da memória afetam os processos de aprendizado e evocação. Ocorre diminuição na aquisição de novas informações com piora progressiva até que não haja mais nenhum aprendizado novo. Embora haja certa preservação da memória remota, em estágios iniciais, a perda de memória é total na evolução da doença. O indivíduo torna-se progressivamente incapaz de desempenhar atividades da vida diária (trabalho, lazer, vida social) e cuidar de si mesmo (cuidar do próprio asseio, vestir-se, alimentar-se) passando a depender de um cuidador.

O envelhecimento cerebral está associado a uma diminuição de grupamentos neurais de áreas do córtex e subcórtex, contribuindo para os sintomas da demência.¹⁰ Alterações genéticas também podem ser responsáveis por aumentar o risco da DA, mesmo que em menor incidência.¹¹ As mutações do gene da proteína precursora do amilóide (cromossomo 21), dos genes das pré-

senilinas 1 e 2 (cromossomos 14 e 1, respectivamente), assim como o polimorfismo da apolipoproteína E (cromossomo 19) são exemplos de alterações genéticas que podem aumentar o risco para a DA. A importância da influência genética na expressão fisiopatológica e fenotípica da DA podem ser identificadas em outros exemplos, além das mutações genéticas e polimorfismos. A história familiar é um fator de risco para a demência. As vias neurais pertencentes ao sistema colinérgico e suas conexões são preferencialmente atingidas na DA. As alterações cerebrais características da DA são as placas senis (ou neuríticas) e os emaranhados neurofibrilares. Existem outros fatores associados para maior risco da DA, apesar da sua evidência na literatura ainda ser questionável. Como exemplos destes fatores, podemos citar o trauma cranioencefálico, o sexo feminino, a etnia caucasiana, o alumínio e a aterosclerose.¹² Porém estes fatores não serão priorizados neste trabalho.

Assim como fatores de risco para a doença, existe o que chamamos de fatores protetores, ou seja, aqueles que aparentemente são capazes de ajudar a prevenir o aparecimento da doença. Atividades como ler, escrever e jogar cartas mantêm o cérebro ativo e retardam os problemas da memória. Estudos realizados com pessoas entre 75 e 85 anos mostram que cada nova atividade praticada retarda a perda de memória em 0,18 anos ou cerca de nove semanas, podendo chegar a até 1,29 anos.¹³ A escolaridade também é definida em inúmeros estudos, provavelmente pelo conseqüente aumento da transmissão sináptica (**Figura 2**) em regiões corticais e pela maior capacidade de compensação de deficiências intelectuais dos indivíduos com maior escolaridade.¹⁰ A transmissão sináptica é o processo pelo qual a informação gerada ou processada por um neurônio é transmitida a outro neurônio ou célula efetora.

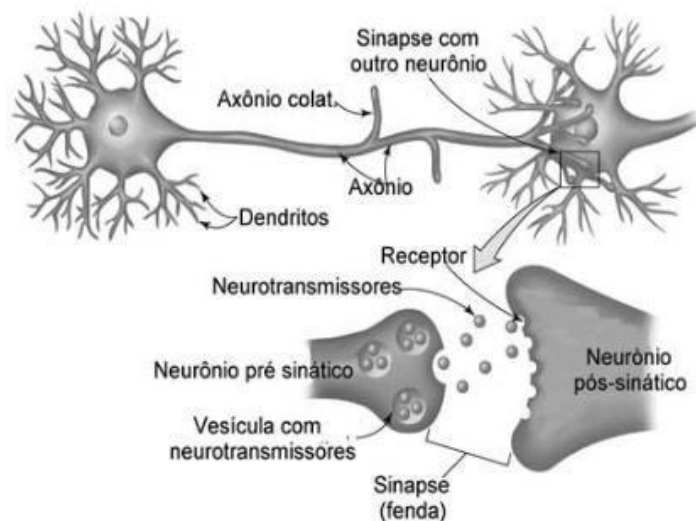


Figura 2. Transmissão dos impulsos nervosos nas fendas sinápticas

O diagnóstico da doença é feito fundamentalmente através de critérios clínicos preestabelecidos juntamente com a exclusão de outras possíveis causas para a demência.¹⁴⁻¹⁸ A avaliação cognitiva desde o rastreio da doença até testes neuropsicológicos específicos é recomendada em Consenso.¹⁸ Os testes de rastreio cognitivo como o Mini-Exame do Estado Mental,¹⁹ o teste do Desenho do Relógio²⁰ o Teste de Fluência Verbal²¹ para categorias e a Escala de Demência de *Blessed*²² são exemplos de testes utilizados para a avaliação inicial de pacientes com suspeita de comprometimento cognitivo.¹⁷ O diagnóstico deve ser confirmado por avaliação neuropsicológica, havendo a necessidade de déficit progressivo de memória e de pelo menos uma outra função cognitiva. A exemplo destes, existem exames como o *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease* (CERAD),^{23,24} a *Mattis Dementia Rating Scale*²⁵ e o CAMDEX.²⁶

Apesar de as demências irreversíveis representarem 80 a 90% de todas as demências, 10 a 20 % destas são potencialmente reversíveis ou no mínimo passíveis de serem tratadas. É fundamental que essas demências sejam prontamente diagnosticadas e tratadas, pois à medida que o tempo passa, o potencial de recuperação diminui e acabam por se tornarem irreversíveis.

O tratamento farmacológico da DA pode ser definido em quatro níveis: 1) terapêutica específica, que tem como objetivo reverter processos patofisiológicos que conduzem à morte neuronal e à demência; 2) abordagem profilática, que visa a retardar o início da demência ou prevenir declínio cognitivo adicional, uma vez deflagrado o processo; 3) tratamento sintomático, que visa amenizar, ainda que parcial ou provisoriamente, as capacidades cognitivas, as habilidades funcionais e o comportamento dos pacientes portadores de demência; e 4) terapêutica complementar, que busca o tratamento das manifestações não-cognitivas da demência, tais como depressão, psicose, agitação psicomotora, agressividade e distúrbio do sono.

O tratamento da DA envolve estratégias farmacológicas e intervenções psicossociais para o paciente e seus familiares. No campo do tratamento farmacológico, inúmeras substâncias psicoativas têm sido propostas para preservar ou restabelecer a cognição, o comportamento e as habilidades funcionais do paciente com demência. Existem duas classes principais de medicamentos para o tratamento da DA. Uma é representada pelos medicamentos denominados de anticolinesterásicos ou inibidores da colinesterase, que receberão enfoque neste trabalho, e a outra, até o momento representada por um único medicamento, é a do antagonista dependente de voltagem dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (**Figura 3**).

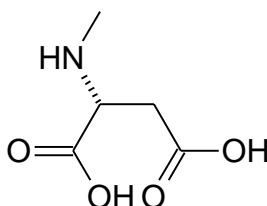


Figura 3. Estrutura química do N-metil-D-aspartato (NMDA).

Na fase inicial da doença, ocorre principalmente a diminuição de neurônios que usam como mensageiro a acetilcolina (**Figura 4**), uma substância importante no processo de memória e aprendizado. A acetilcolina é produzida no

cérebro a partir da colina, presente em alimentos da dieta do dia-a-dia. Depois de utilizada como mensageiro químico entre os neurônios, a acetilcolina é degradada pela enzima acetilcolinesterase, transformando-se novamente em colina (**Figura 5**).

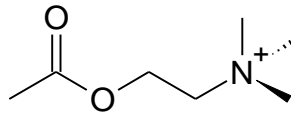


Figura 4. Estrutura química da acetilcolina

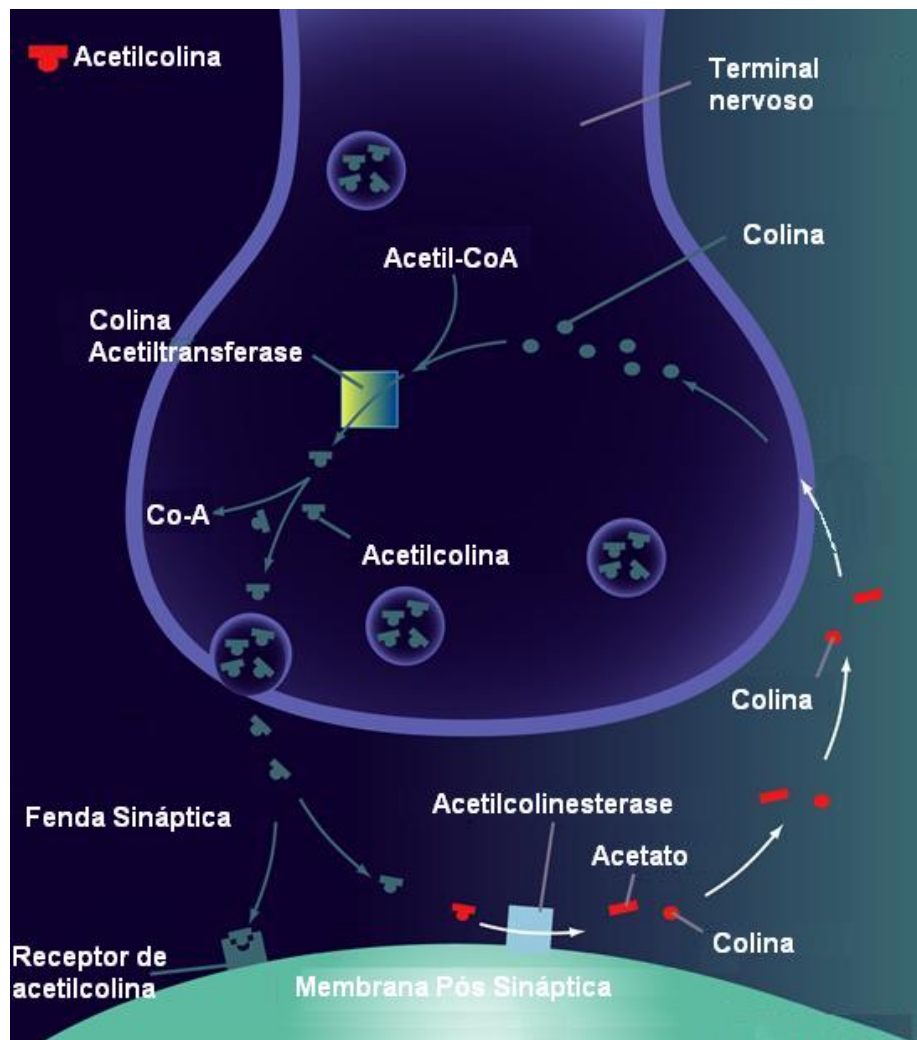


Figura 5. Hidrólise da acetilcolina catalisada pela acetilcolinesterase

Se existe uma deficiência na produção de acetilcolina, um modo de controlar o problema é evitar que a pouca acetilcolina produzida seja degradada, impedindo a ação da enzima através dos inibidores da acetilcolinesterase, ou seja, os anticolinesterásicos. Os inibidores de acetilcolinesterase são hoje as principais drogas licenciadas para o tratamento específico da DA. Seu uso baseia-se no pressuposto déficit colinérgico que ocorre na doença, e visa o aumento da disponibilidade sináptica de acetilcolina, através da inibição da enzima catalítica, a acetilcolinesterase. Tem efeito sintomático discreto sobre a cognição, algumas vezes beneficiando também certas alterações não-cognitivas da demência. Nas últimas duas décadas foram descobertos diversos destes compostos, mas apenas quatro foram liberados para comercialização pela *Food and Drug Administration* (FDA) (**Figura 6**).

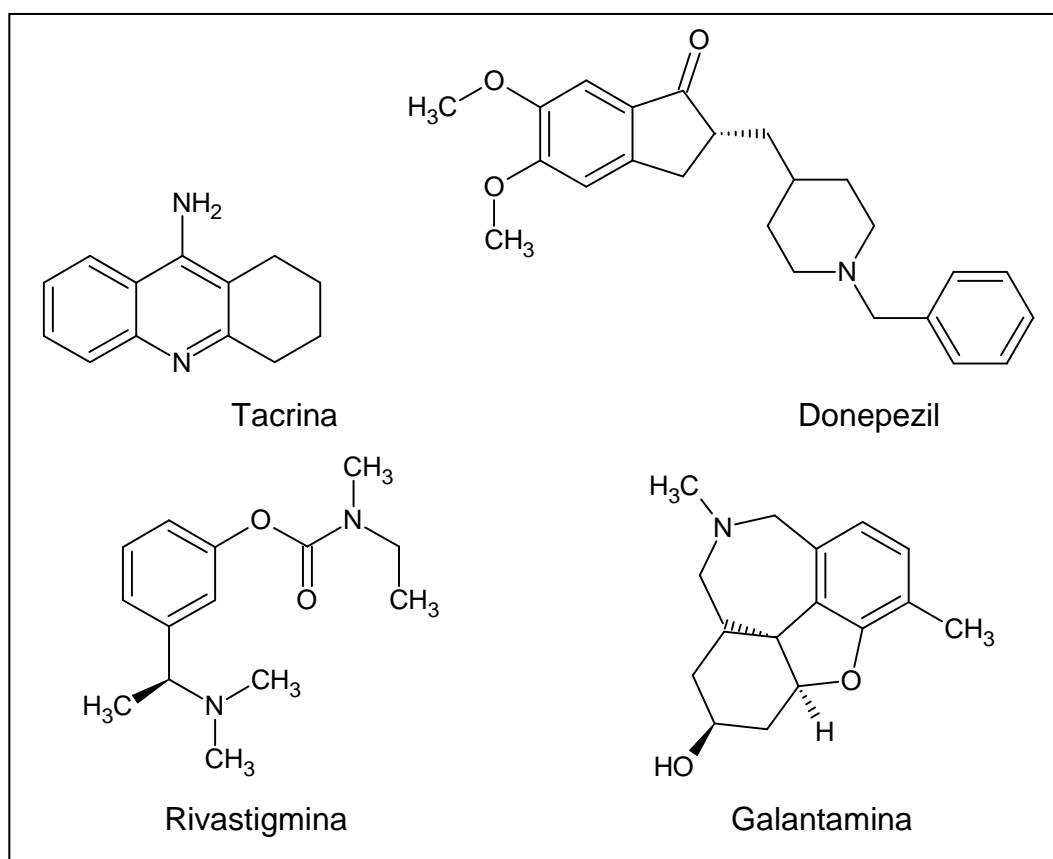


Figura 6. Inibidores de acetilcolinesterase comercialmente disponíveis

Os inibidores podem ser classificados com base na reversibilidade e duração da inibição (**Tabela 1**).²⁷ Tacrina, galantamina e donepezil são inibidores reversíveis da acetilcolinesterase, de duração curta, intermediária e longa, respectivamente. A inibição da enzima tem duração intermediária para o inibidor pseudo-irreversível (ou lentamente reversível) rivastigmina.

Tabela 1. Características gerais dos inibidores da acetilcolinesterase.

	Tacrina	Donepezil	Rivastigmina	Galantamina
Disponível no ano:	1993	1997	1998	2000
Nome da droga	Cognex			
Classe química	Acridina	Piperidina	Carbamato	Alcalóide fenantreno
Seletividade cerebral	Não	Sim	Sim	Sim
Tipo de inibição	Reversível	Reversível	Pseudo-reversível	Reversível

Fonte: FDA – FDA Approved Drug Products

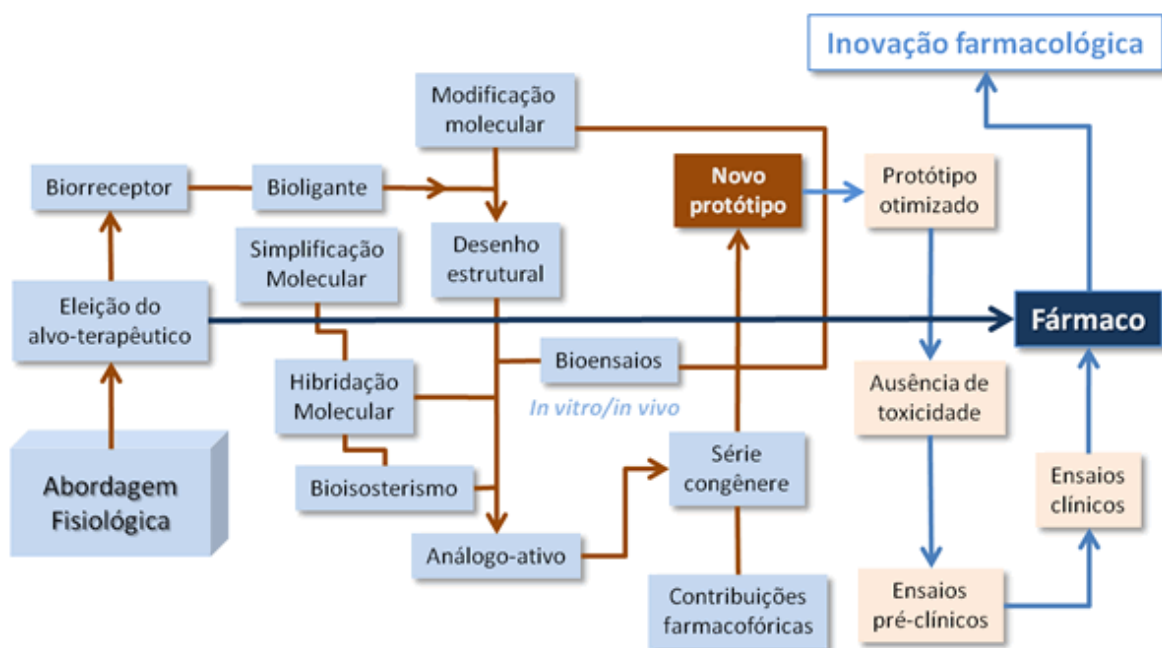
A resposta aos inibidores é heterogênea, sendo que alguns pacientes beneficiam-se muito, enquanto outros, muito pouco.

1.2 – Farmacologia

O desenvolvimento de novos medicamentos une esforços de diversas áreas do conhecimento como farmacologia, medicina, computação, química medicinal, entre outros, e este período de pesquisa pode se arrastar por longos anos e consumir milhões²⁸.

Dentre tantas áreas da Medicina, a Farmacologia é aquela ciência que se preocupa com o estudo dos medicamentos e suas inúmeras aplicações. Estes medicamentos, ou fármacos, são definidos como substâncias químicas usadas na prevenção ou cura de doenças que atacam homens, animais e plantas. Quando se descobre um novo composto com propriedades farmacológicas, ficamos diante daquilo que se considera como sendo um protótipo, porém,

análogos devem ser preparados para que se possa avaliar a relação estrutura-atividade dos mesmos.



Esquema 1. Etapas do processo de desenvolvimento de novo fármaco²⁹

As pesquisas na área de fármacos crescem cada vez mais, pois busca-se encontrar novos compostos com características capazes de auxiliar no tratamento de diversas doenças. A ação terapêutica destes fármacos resulta de interações dos mesmos com os sistemas biológicos nos quais estão inseridos e é dependente de fatores relacionados com sua estrutura química e, conseqüentemente, de suas propriedades físico-químicas. As propriedades físico-químicas de compostos bioativos podem ser descritas quantitativamente se forem expressas por meio de parâmetros físico-químicos ou descritores estruturais adequados.

As interações de ligantes com determinados receptores biológicos são tratados como processos de reconhecimento molecular, sendo que as mesmas podem ser do tipo eletrostáticas, ligações de hidrogênio e forças de *Van der Waals*. Desta forma, podemos distinguir dois tipos de abordagens para se caracterizar novos ligantes:

- *Screening* experimental, que envolve testes in vitro e in vivo de um enorme número de compostos selecionados à partir de um banco de dados de estruturas bioativas;
- *Design* molecular, que está baseado na racionalização das informações concernentes à estrutura do alvo biológico e dos ligantes já caracterizados.

O design molecular envolve planejamento e visa maximizar as interações existentes entre ligantes e receptores. Uma das formas de se propor uma nova substância bioativa é através de analogias estruturais com o substrato natural ou com um protótipo já existente, assim mantêm-se os grupos responsáveis pela atividade e fazem-se modificações nos ligantes.

A utilização desta abordagem vai muito além do conhecimento prévio da estrutura tridimensional do alvo biológico, pois também se pode avaliar a relação estrutura-atividade (QSAR) existente, possibilitando assim a predição de novos fármacos provavelmente ativos.

1.3 – Cálculos Teóricos

A descoberta de novos fármacos implica em grande gasto de tempo e recursos. Algumas pesquisas podem levar mais de 10 anos para serem finalizadas e demandam longas e caras rotas sintéticas, além da fase de testes. Desta forma, novas rotas de estudo estão sendo utilizadas para minimizar estes fatores tão preciosos. Uma opção é a utilização dos cálculos teóricos.

A existência e disponibilidade de uma grande gama de programas computacionais relacionados à área de Química e de bancos de dados criados com o passar do tempo tornaram-se hoje uma grande ferramenta para a descoberta de novos fármacos.³⁰ Uma opção é o uso da Química Computacional, que utiliza cálculos teóricos para proposição de novas estruturas. As vantagens de sua utilização são inúmeras, pois se tem a oportunidade de manipular grande quantidade de informação sem a necessidade imediata de testes laboratoriais. Com base neste conceito, as pesquisas na área de QSAR (*Quantitative Structure-*

Activity Relationship) vem sendo desenvolvidas, progressivamente, durante os últimos 40 anos. São baseadas na construção de modelos matemáticos que sejam capazes de relacionar a estrutura química e a atividade biológica de uma série de compostos análogos, normalmente compostos que tem mesmo esqueleto carbônico básico, mas que diferem entre si pela presença de um ou mais grupos substituintes em posições definidas da estrutura química comum.

Em estudos de QSAR, o significado estatístico das correlações obtidas será tanto maior quanto mais precisas e exatas forem as medidas de atividade biológica, uma vez que os descritores estruturais, em geral, podem ser medidos com alto grau de precisão. Os parâmetros biológicos expressam, geralmente, a atividade de compostos biologicamente ativos em termos de potência. Esta, por sua vez, pode ser definida como sendo o inverso da dose ou concentração necessária para a obtenção de uma determinada resposta biológica. Desta forma, quanto menor for a dose necessária para a obtenção de determinada resposta biológica, maior será a potência do composto analisado.

O planejamento adequando as variações na estrutura de um composto bioativo pode resultar em derivados com maior interesse terapêutico, seja por apresentar maior atividade, menor toxicidade ou, ainda, por adquirir características farmacotecnicamente mais adequadas. Assim, a análise das correlações entre descritores estruturais e a atividade biológica desempenhada em uma série de compostos análogos permite, dentro de certos limites, a previsão da atividade biológica de análogos ainda não disponíveis por meio da interpolação ou extrapolação de valores na correlação obtida.

Os mais refinados métodos de design de medicamentos são baseados em aproximações 3D. As mais reconhecidas e aplicadas metodologias em QSAR-3D são os métodos CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*),³¹⁻³⁵ CoMSIA (*Comparative Molecular Similarity Indices Analysis*)³⁶ e GRID,³⁷ comumente utilizados para compostos de interesse biológico específico. Porém, estes métodos apresentam alguns inconvenientes, como o exaustivo tratamento conformacional necessário, a complexidade de se alinhar os ligantes e interpretar alguns descritores e o custo para a aquisição de tais softwares.

A estratégia denominada MIA (*Multivariate Image Analysis*) visa evitar tais inconvenientes, sendo uma alternativa ao custo e tempo utilizados nas análises. Foi primeiramente elaborada e aplicada por Geladi *et al.*, para tratar dados de sensoriamento remoto, espectroscópicos, etc.³⁸⁻⁴⁰ Segundo a estratégia criada por eles, “imagens (as estruturas químicas) são matrizes especiais que consistem de linhas e colunas (como em uma TV e uma tela de computador) onde cada par de coordenada (pixel) corresponde a um valor. Essas imagens são matrizes de números, logo operações e transformações espaciais podem ser aplicadas a elas.” Esta técnica baseada em uma análise multivariada de imagens tem sido aplicado para resolver uma grande variedade de problemas, desde sensoriamento remoto a análises clínicas.⁴¹ Assim como no presente trabalho, o método MIA tem sido aplicado em QSAR em outros estudos e tem se mostrado confiável, pois seus resultados se mostram comparáveis aos das metodologias mais sofisticadas utilizadas atualmente. Na análise MIA-QSAR, os descritores são pixels de imagens 2D correspondentes às estruturas químicas desenhadas por meio de algum programa que se destine a essa finalidade (por exemplo, ChemDraw ou ChemSketch), e tais descritores (que, numericamente, são números binários) se correlacionam com as atividades biológicas dos compostos. O método tem se mostrado barato, rápido e fácil para a manipulação de grande quantidade de informação, já se mostrando eficiente para a predição de novas moléculas.⁴²

OBJETIVOS

2 – Objetivos

O presente estudo tem como objetivo utilizar o método MIA-QSAR para a predição da atividade anticolinesterásica de compostos com atividades previamente conhecidas e propor novos compostos com consideráveis valores de p/C_{50} que tenham as características equivalentes aos fármacos anticolinesterásicos conhecidos.

ESTUDOS

PRELIMINARES

3 – Estudos Preliminares

3.1 – Metodologia

Uma série de 107 estruturas^{43,44} foi selecionada na literatura. Foram considerados também os quatro compostos utilizados comercialmente em medicamentos, já citados anteriormente (**Figura 6**), totalizando 111 estruturas neste estudo. As estruturas foram devidamente desenhadas utilizando-se o programa *ChemSketch*.⁴⁵ Atenção especial foi dada ao posicionamento dos ligantes das moléculas, pois os mesmos são muito volumosos, o que pode ocasionar um mau recobrimento das estruturas.

Em seguida, as estruturas foram convertidas para o formato *bitmap* através do programa Paint Brush (Microsoft Windows). A configuração das janelas foi igualmente mantida para todas as imagens, mantendo-se uma resolução de 102x102 pontos por polegadas, tamanho de 260x230 *pixels* e em cores, sendo que as mesmas foram fixadas padronizadamente na coordenada 150,90 (que corresponde a um carbono do anel comum a todas as estruturas, **Figura 7**).

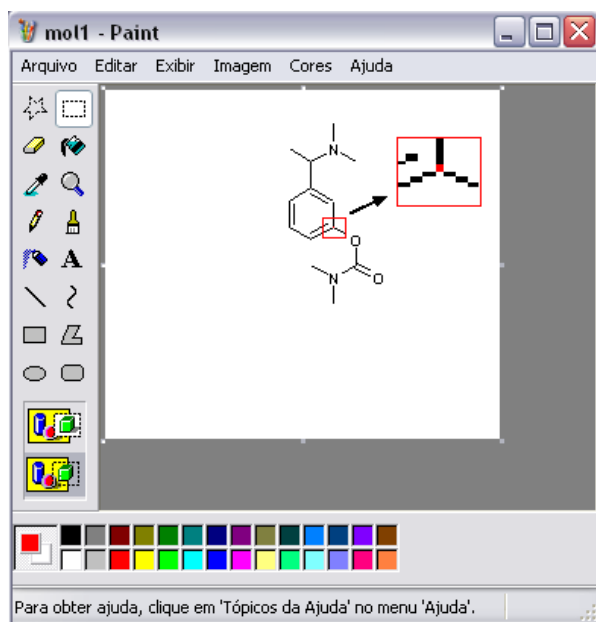


Figura 7. Coordenada fixa nas estruturas utilizadas

As imagens 2D obtidas foram lidas e convertidas para o formato *double array* por meio do programa *Matlab*⁴⁶ e em seguida foram agrupadas para formarem uma matriz X (variáveis independentes) correspondente a um conjunto de calibração. As atividades biológicas correspondentes, valores em *pIC*₅₀ de cada composto, foram agrupadas em um outro bloco, denominado bloco Y (variáveis dependentes).

Os cálculos realizados foram calibração, validação cruzada *leave-one-out* (LOO CV) e *leave-20%-out* (20%-O CV), através do algoritmo PLS (*Partial Least Squares*). A habilidade preditiva do modelo foi avaliada através da análise do erro quadrado médio da calibração, da LOO CV e 20%-O CV (RMSEC, RMSECV E RMSECV_{20%-O}, respectivamente).

As moléculas utilizadas são apresentadas nas tabelas e figuras que seguem.

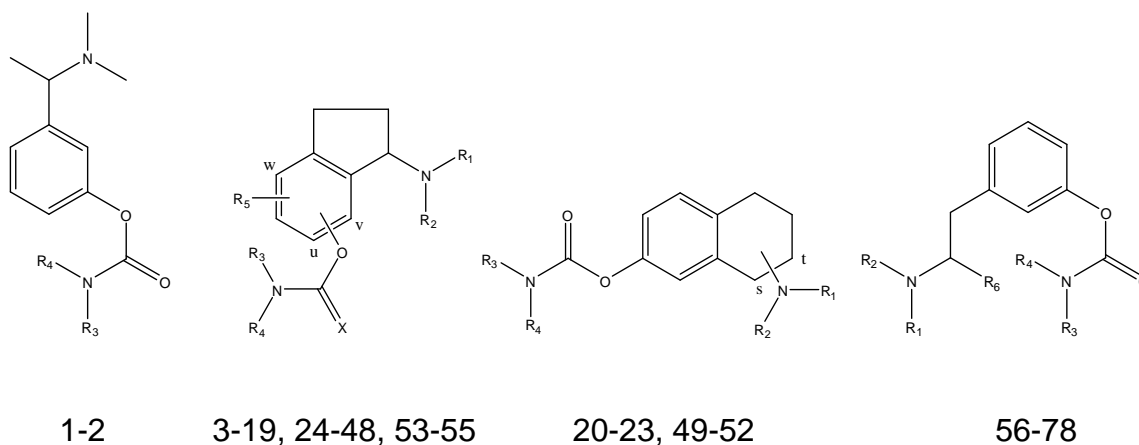


Figura 8. Estruturas básicas para os compostos da Tabela 2

Tabela 2. Estruturas pertencentes à matriz X.

Composto	R₁	R₂	R₃	R₄	R₅	R₆	X	O	N	pIC₅₀ (μM)
1	-	-	Me	Me	-	-	-	-	-	7,52
2	-	-	Me	Et	-	-	-	-	-	6,04
3	H	H	Me	Me	H	-	O	u	-	6,12
4	H	H	Me	Et	H	-	O	u	-	4,72
5	H	H	Me	<i>n</i> -Pro	H	-	O	u	-	5,14
6	H	H	Me	<i>n</i> -Hexil	H	-	O	u	-	6,28
7	H	H	Me	Ciclohexil	H	-	O	u	-	5,40
8	H	H	Me	<i>p</i> -MeOPh	H	-	O	u	-	6,52
9	H	H	H	Et	H	-	O	u	-	4,75
10	H	H	H	<i>n</i> -Pro	H	-	O	u	-	5,83
11	H	Me	Me	Me	H	-	O	u	-	5,97
12	H	Me	Me	Et	H	-	O	u	-	4,41
13	H	Et	Me	Me	H	-	O	u	-	4,61
14	H	<i>n</i> -Pro	Me	Et	H	-	O	u	-	5,44
15	H	H	Me	Me	H	-	O	v	-	6,34
16	H	H	Me	Et	H	-	O	v	-	4,98
17	H	Me	Me	Me	H	-	O	v	-	6,30
18	H	H	Me	Me	H	-	O	w	-	8,05
19	H	H	Me	Et	H	-	O	w	-	7,58
20	H	H	Me	Me	-	-	-	-	s	5,83
21	H	H	Me	Et	-	-	-	-	s	5,21
22	H	H	Me	Me	H	-	-	-	t	5,49
23	H	H	Me	Et	H	-	-	-	t	4,10
24	H	Pg	Me	Me	H	-	O	u	-	5,54
25	H	Pg	Me	Et	H	-	O	u	-	4,33
26	H	Pg	Me	<i>n</i> -Pro	H	-	O	u	-	4,84
27	H	Pg	Me	<i>n</i> -hexil	H	-	O	u	-	4,80
28	H	Pg	Me	Ciclohexil	H	-	O	u	-	4,38
29	H	Pg	Me	<i>p</i> -MeOPh	H	-	O	u	-	6,06
30	H	Pg	H	Et	H	-	O	u	-	4,86
31	H	Pg	H	<i>n</i> -Pro	H	-	O	u	-	5,62
32	H	Pg	Me	<i>n</i> -Bu	H	-	O	u	-	4,95
33	H	Pg	Et	<i>n</i> -Bu	H	-	O	u	-	4,14
34	H	Pg	Me	Ciclohexil	H	-	O	u	-	4,75
35	H	Pg	Me	Bn	H	-	O	u	-	5,75
36	H	Pg	Me	Ph	H	-	O	u	-	6,26
37	Me	Pg	Me	Me	H	-	O	u	-	4,89
38	Et	Pg	Me	Me	H	-	O	u	-	4,75
39	H	Pg	Me	Me	H	-	O	v	-	5,60
40	H	Pg	Me	Et	H	-	O	v	-	3,28
41	H	Pg	Me	<i>n</i> -Pro	H	-	O	v	-	4,34
42	Me	Pg	Me	Me	H	-	O	v	-	5,15

43	Me	Pg	Me	Et	H	-	O	v	-	3,36
44	H	Pg	Me	Me	H	-	O	w	-	7,28
45	H	Pg	Me	Et	H	-	O	w	-	5,67
46	H	Pg	Me	Et	5-Cl	-	O	u	-	4,59
47	H	Pg	Me	<i>n</i> -Pr	5-Cl	-	O	u	-	4,36
48	H	1-MePg	Me	Me	H	-	O	u	-	5,74
49	H	Pg	Me	Me	H	-	-	-	s	5,40
50	H	Pg	Me	Et	H	-	-	-	s	4,28
51	H	Pg	Me	Me	H	-	-	-	t	5,39
52	H	Pg	Me	Et	H	-	-	-	t	3,69
53	Me	Pg	Me	Et	H	-	O	w	-	4,83
54	Me	Me	Me	Me	H	-	O	u	-	5,67
55	Me	Me	Me	Me	H	-	O	w	-	7,89
56	H	H	Me	Me	-	H	-	-	-	5,36
57	H	H	Me	Et	-	H	-	-	-	4,45
58	H	H	Me	<i>n</i> -Pro	-	H	-	-	-	5,11
59	H	Me	Me	Me	-	H	-	-	-	6,55
60	H	Me	Me	Et	-	H	-	-	-	4,65
61	Me	Me	Me	Me	-	H	-	-	-	6,80
62	H	Pg	Me	Me	-	H	-	-	-	6,66
63	H	Pg	Me	Et	-	H	-	-	-	4,52
64	H	Pg	Me	<i>n</i> -Pro	-	H	-	-	-	4,81
65	Me	Pg	Me	Me	-	H	-	-	-	6,07
66	Me	Pg	Me	Et	-	H	-	-	-	4,78
67	H	Pg	Me	Me	-	Me	-	-	-	6,27
68	H	Pg	Me	Et	-	Me	-	-	-	4,47
69	H	Pg	Me	<i>n</i> -Pro	-	Me	-	-	-	4,72
70	H	Pg	Me	Ciclohexil	-	Me	-	-	-	5,44
71	H	Pg	Me	<i>n</i> -Bu	-	Me	-	-	-	4,91
72	Me	Pg	Me	Me	-	Me	-	-	-	5,78
73	Me	Pg	Me	Et	-	Me	-	-	-	3,63
74	Me	Pg	Me	<i>n</i> -Pro	-	Me	-	-	-	4,48
75	Me	Pg	Me	<i>n</i> -Hexil	-	Me	-	-	-	5,51
76	Me	Pg	Me	Ciclohexil	-	Me	-	-	-	5,06
77	H	1-MePg	Me	Me	-	H	-	-	-	6,77
78	H	1-MePg	Me	Et	-	H	-	-	-	4,86

Obs.: Entenda-se: Pg = propargil; *n*-Pro = *N*-propil; c-Hexyl = ciclohexil; 1-MePg = 1-metil-2-propinil; Bn = benzil; Me = metil; Et = etil; *n*-Bu = *n*-butil; *p*-MeOPh = *p*-metoxifenil; Ph = fenil

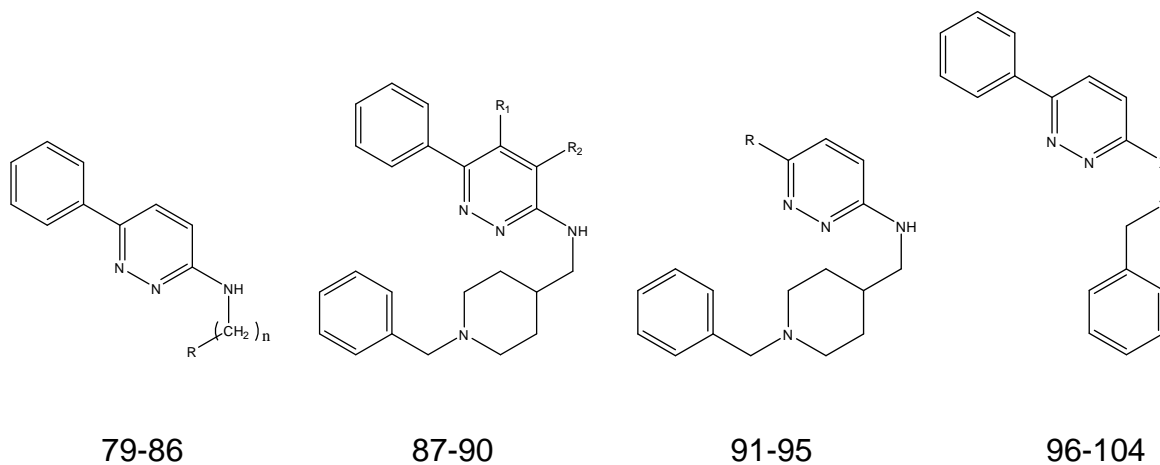


Figura 9. Estruturas básicas para os compostos das Tabelas 3 a 6.

Tabela 3. Estruturas pertencentes à matriz X.

Composto	<i>n</i>	<i>R</i>	<i>pIC₅₀</i>(μM)
79	2		3,10
80	3		3,39
81	2		4,19
82	2		4,08
83	3		4,46
84	2		3,77
85	3		4,89
86	0		4,19

Tabela 4. Estruturas pertencentes à matriz X.

Composto	R₁	R₂	pIC₅₀(μM)
87	H	Me	6,49
88	Me	H	7,68
89	Et	H	7,57
90	Pr	H	7,21

Tabela 5. Estruturas pertencentes à matriz X.

Composto	R	pIC₅₀(μM)
91	2-MePh	7,05
92	2-EtPh	7,06
93	2-MeOPh	6,96
94	2-CIPh	7,10
95	2-tiofenil	7,01

Tabela 6. Estruturas pertencentes à matriz X.

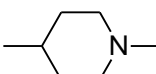
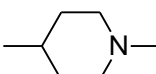
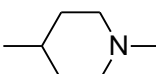
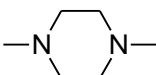
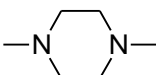
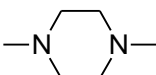
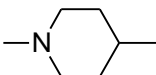
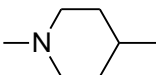
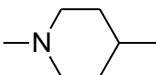
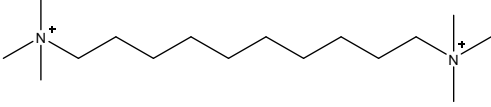
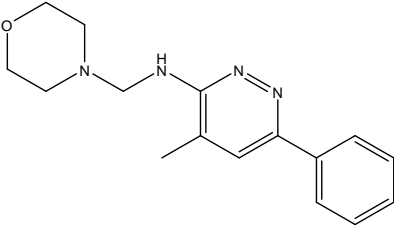
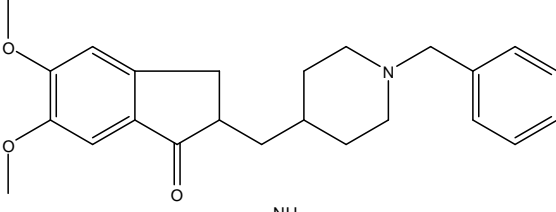
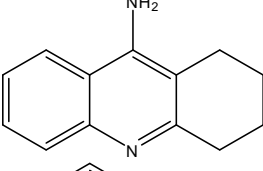
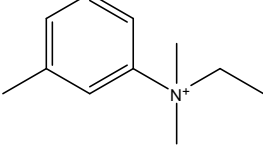
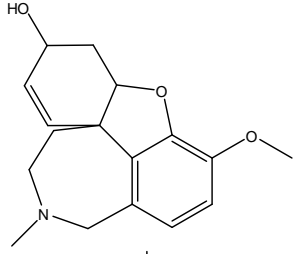
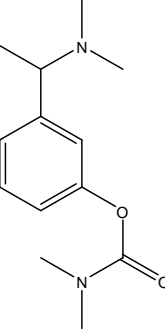
Composto	X	Y	pIC₅₀(μM)
96	OCH ₂ CH ₂		6,85
97	SCH ₂ CH ₂		7,20
98	NHCOCH ₂		5,38
99	NHCH ₂ CH ₂		5,82
100	NHCOCH ₂		4,77
101	NHCH ₂ CO		4,82
102	NHCH ₂ CH ₂		4,62
103	NHCOCH ₂		4,74
104	NHCH ₂ CO		3,92

Tabela 7. Estruturas de compostos com atividade anticolinesterásica conhecida

Composto	Estrutura	pIC₅₀(μM)
105		5,82
106		4,07
107		8,00
108		6,78
109		5,00
110		5,74
111		3,77

3.2 – Resultados e Discussão

As moléculas propostas neste estudo foram construídas no programa *ChemSketch*, mantendo-se o alinhamento entre os substituintes (alinhamento 2D), de forma a manter a congruência entre as partes comuns das moléculas quando as mesmas fossem convertidas para o formato bitmap.

Para os cálculos utilizando o método de regressão *PLS*, cada imagem 2D foi lida e convertida para o formato *double array* (conversão para uma matriz numérica: pixels para binários) utilizando-se o programa *Matlab* (**Figura 10**). A matriz foi construída agrupando as imagens propostas, sendo que as colunas com variância zero (pixels comuns entre as estruturas e espaços em branco) foram excluídas para diminuir a quantidade de dados utilizados, tendo a matriz as dimensões de 111x5109, o que permitiu que se fizesse correlação da matriz X com o bloco Y rapidamente.

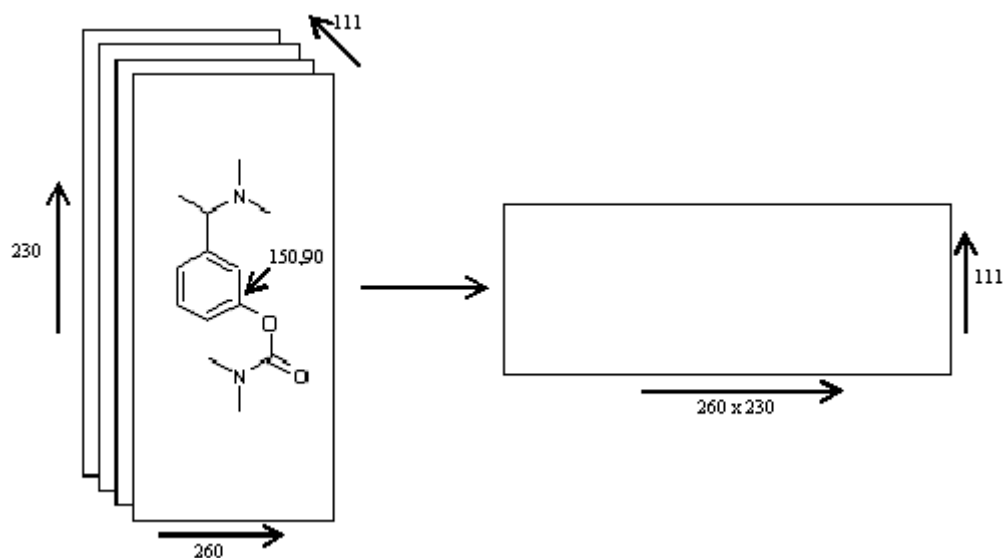


Figura 10. Superposição e desdobramentos das imagens 2D

Uma calibração juntamente com uma validação cruzada foram realizadas e o número ótimo de variáveis latentes (LV's) foi estimado analisando-se o erro quadrado médio da calibração (RMSEC) e da validação cruzada (RMSECV). Para o método analisado, sete LV's explicam uma variância significativa dos dados (**Figura 11**). É importante ressaltar que variáveis latentes são combinações lineares das variáveis independentes originais e, em métodos de compressão como PLS, a primeira variável latente explica a maior variância nos dados, a segunda variável latente explica a segunda maior variância nos dados, e assim sucessivamente; existem tantas variáveis latentes quantas variáveis independentes originais, mas o uso excessivo de variáveis latentes remete à tentativa de explicação de dados aleatórios, como ruídos. Portanto, somente um número razoavelmente pequeno de LV's é geralmente necessário. Após este número de variáveis latentes ideal, RMSEC e RMSECV não são melhorados significativamente. Além disso, o uso de uma LV maior pode levar à realização de uma calibração excessiva do modelo (*over fitting*).

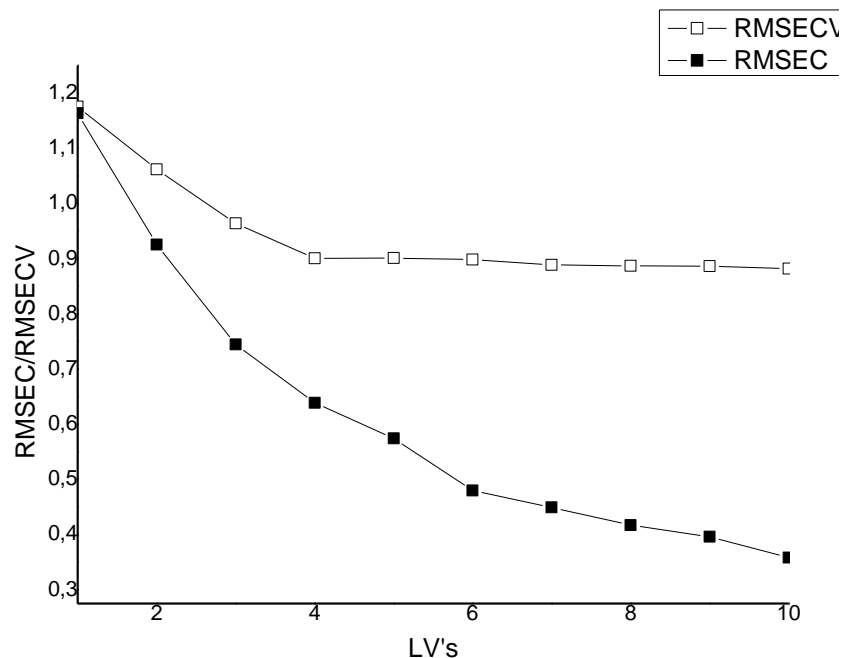


Figura 11. Gráfico de RMSEC/RMSECV *versus* número de variáveis latentes (LV) para PLS.

A calibração (**Figura 12**) forneceu um valor de R^2 de 0,539, considerado muito baixo (R^2 recomendado $\geq 0,8$) e RMSEC de 0,449. A validação cruzada LOO (**Figura 13**) forneceu um coeficiente de regressão Q^2_{cv} de 0,539 e RMSECV igual a 0,889, considerados razoáveis (Q^2_{cv} recomendado $\geq 0,5$). Os valores encontrados para a validação cruzada 20%-O (**Figura 14**) foram de $Q^2_{20\%-o}$ igual a 0,420 e $RMSECV_{20\%-o}$ igual a 0,908.

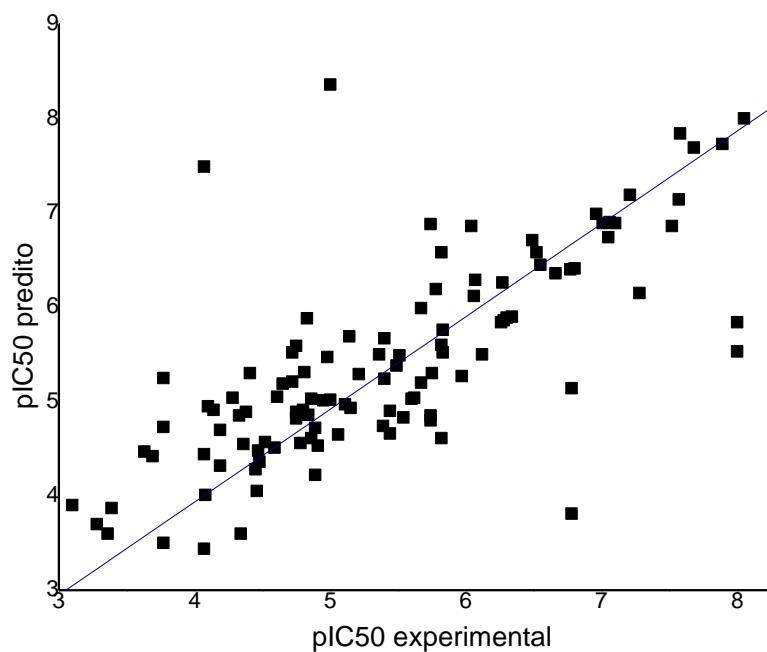


Figura 12. Gráfico da calibração

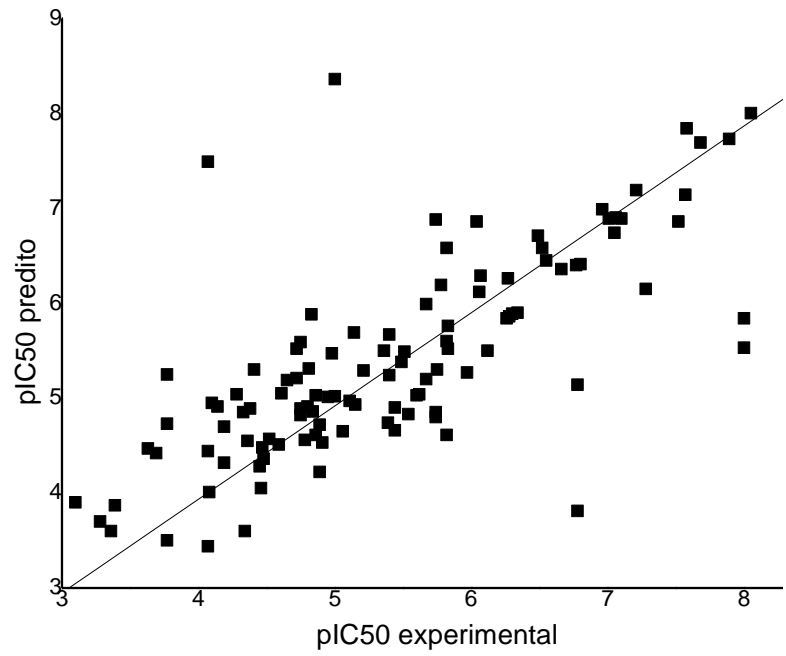


Figura 13. Gráfico da validação cruzada LOO.

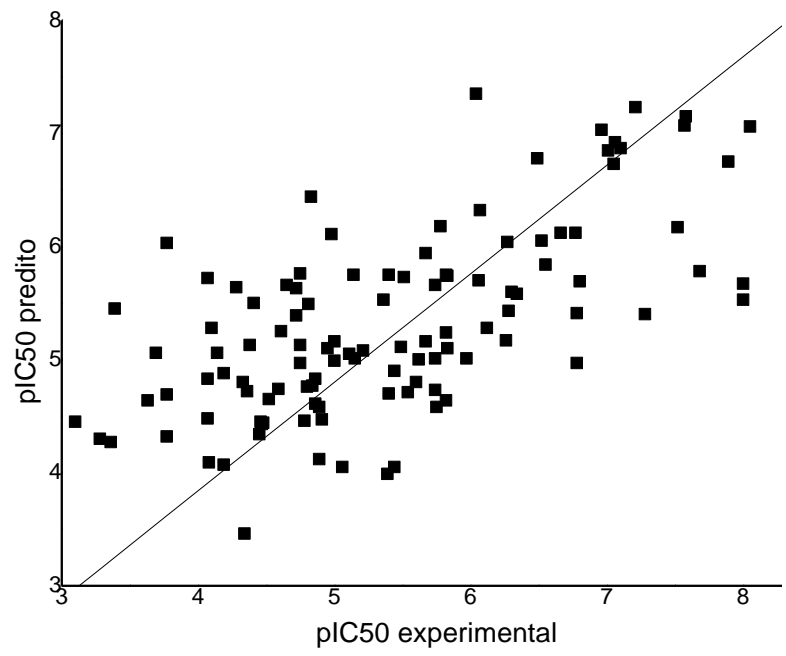


Figura 14. Gráfico da validação cruzada L-20%-O.

Os valores de R^2 , Q^2_{cv} e $Q^2_{20\%-0}$ foram calculados por meio do programa Origin.⁴⁷

Tabela 8. Valores de pIC_{50} encontrados para PLS MIA-QSAR

Composto	pIC_{50} exp.	pIC_{50} calib.	pIC_{50} CV loo	pIC_{50} CV 20%o
1	7,52	6,86	6,15	6,17
2	6,04	6,86	7,25	7,35
3	6,12	5,50	5,37	5,28
4	4,72	5,52	5,74	5,63
5	5,14	5,69	5,82	5,75
6	6,28	5,86	5,54	5,43
7	5,40	5,67	5,79	5,75
8	6,52	6,58	6,15	6,05
9	4,75	5,59	5,91	5,76
10	5,83	5,76	5,73	5,74
11	5,97	5,27	5,14	5,01
12	4,41	5,30	5,59	5,50
13	4,61	5,05	5,28	5,25
14	5,44	4,90	4,82	4,90
15	6,34	5,90	5,64	5,58
16	4,98	5,47	6,07	6,11
17	6,30	5,89	5,62	5,60
18	8,05	8,00	7,71	7,06
19	7,58	7,84	7,84	7,15
20	5,83	5,52	5,18	5,10
21	5,21	5,29	5,18	5,08
22	5,49	5,38	5,15	5,11
23	4,10	4,95	5,33	5,28
24	5,54	4,83	4,72	4,71
25	4,33	4,85	4,98	4,80
26	4,84	4,86	4,85	4,77
27	4,80	4,91	4,91	4,76
28	4,38	4,89	5,10	5,13
29	6,06	6,12	5,71	5,70
30	4,86	5,03	5,09	4,83
31	5,62	5,04	4,85	5,00
32	4,95	5,01	5,00	5,10
33	4,14	4,91	5,12	5,06
34	4,75	4,89	4,94	4,97
35	5,75	5,30	4,58	4,58

36	6,26	5,84	4,98	5,17
37	4,89	4,72	4,72	4,58
38	4,75	4,82	5,14	5,13
39	5,60	5,03	4,84	4,80
40	3,28	3,70	4,03	4,30
41	4,34	3,60	3,49	3,46
42	5,15	4,93	4,94	5,01
43	3,36	3,60	3,92	4,27
44	7,28	6,15	5,57	5,40
45	5,67	5,99	6,13	5,94
46	4,59	4,51	4,63	4,74
47	4,36	4,55	4,74	4,72
48	5,74	4,80	4,58	4,73
49	5,40	5,24	5,19	4,70
50	4,28	5,04	5,77	5,64
51	5,39	4,74	4,08	3,99
52	3,69	4,42	4,89	5,06
53	4,83	5,88	6,50	6,44
54	5,67	5,20	5,14	5,16
55	7,89	7,73	6,70	6,75
56	5,36	5,50	5,60	5,53
57	4,45	4,28	4,37	4,34
58	5,11	4,97	5,02	5,05
59	6,55	6,45	6,19	5,84
60	4,68	5,19	5,51	5,66
61	6,80	6,41	6,04	5,69
62	6,66	6,36	6,25	6,12
63	4,52	4,57	4,58	4,65
64	4,81	5,31	5,47	5,49
65	6,07	6,29	6,37	6,32
66	4,78	4,56	4,53	4,46
67	6,27	6,26	6,25	6,04
68	4,47	4,48	4,48	4,43
69	4,72	5,21	5,38	5,39
70	5,44	4,66	4,19	4,05
71	4,91	4,53	4,41	4,47
72	5,78	6,19	6,34	6,18
73	3,63	4,47	4,67	4,64
74	4,48	4,36	4,37	4,44
75	5,51	5,49	5,64	5,73
76	5,06	4,65	4,34	4,05
77	6,77	6,40	6,20	6,12
78	4,86	4,61	4,54	4,61
79	3,10	3,90	4,44	4,45
80	3,39	3,87	5,51	5,45

81	4,19	4,32	4,39	4,07
82	4,08	4,01	3,88	4,09
83	4,46	4,05	3,77	4,45
84	3,77	3,50	4,12	4,32
85	4,89	4,22	3,71	4,12
86	4,19	4,70	4,96	4,88
87	6,49	6,71	6,80	6,78
88	7,68	7,69	5,77	5,78
89	7,57	7,14	7,01	7,07
90	7,21	7,19	7,16	7,23
91	7,05	6,74	6,70	6,73
92	7,06	6,90	6,88	6,92
93	6,96	6,99	7,01	7,03
94	7,10	6,89	6,86	6,87
95	7,01	6,89	6,87	6,85
96	6,85	6,58	5,38	5,24
97	7,20	7,49	4,66	4,48
98	5,38	5,53	5,50	5,53
99	5,82	5,14	4,92	4,97
100	4,77	5,02	5,11	5,16
101	4,82	4,85	4,90	5,01
102	4,62	4,73	4,83	4,69
103	4,74	4,61	4,63	4,64
104	3,92	4,44	4,84	4,83
105	5,82	5,84	5,91	5,67
106	4,07	3,81	5,58	5,41
107	8,00	8,36	4,86	4,99
108	6,78	6,88	5,66	5,66
109	5,00	5,25	6,05	6,03
110	5,74	5,60	5,86	5,75
111	3,77	3,44	5,87	5,72

Tabela 9. Resultados finais obtidos nas análises.

	<i>LV</i>	<i>R²</i>	<i>RMSEC</i>	<i>Q²_{CV}</i>	<i>RMSECV</i>	<i>Q²_{20%-O}</i>	<i>RMSECV_{20%-O}</i>
PLS	7	0,539	0,449	0,539	0,889	0,420	0,908

Houve uma tentativa, ao se realizar cálculos, de utilizar o método de regressão N-PLS (Multilinear Partial Least Squares). Neste tipo de método de regressão, as imagens são lidas da mesma forma que no PLS, porém o tratamento dos descritores utilizando o Matlab é diferente. Exige-se que a matriz

esteja no formato $XxYxZ$, e não XxY , não sendo possível a exclusão de pixels com variância zero. Isto faz com que a mesma tenha tamanho considerável, o que dificulta a realização do experimento, já que exige mais tempo para execução dos cálculos. Com isto, não foi possível determinar o número ótimo de variáveis latentes pra finalização dos mesmos.

Os resultados acima apresentados, de forma geral, não foram tão satisfatórios quanto esperado. Os valores dos coeficientes de correlação ao quadrado se mostraram mais baixos do que o aceitável e os valores dos erros quadrados, significativamente altos.

ESTUDOS

POSTERIORES

4- Estudos Posteriores

Visando melhorar os resultados acima apresentados, uma nova seleção de compostos foi feita e os cálculos foram repetidos.

4.1 – Metodologia

Uma nova série de 34 compostos^{43,48} (entre eles carbamatos e aminas quaternárias, compostos com reconhecida atividade anticolinestérica) foi selecionada da literatura. Em seguida, as estruturas foram devidamente desenhadas utilizando-se o programa *ChemSketch*. Atenção especial foi dada ao posicionamento dos ligantes das moléculas, pelo fato dos mesmos serem muito volumosos, o que poderia prejudicar o recobrimento das estruturas.

A seguir, as estruturas foram convertidas para o formato *bitmap* através do programa Paint Brush (Microsoft Windows). A configuração das janelas foi igualmente mantida para todas as imagens, mantendo-se uma resolução de 72x72 pontos por polegadas, tamanho de 150x170 *pixels* e em cores, sendo que as mesmas foram fixadas padronizadamente na coordenada 60,60 (que corresponde a um carbono do anel presente em todas estruturas – alinhamento 2D, **Figura 15**).

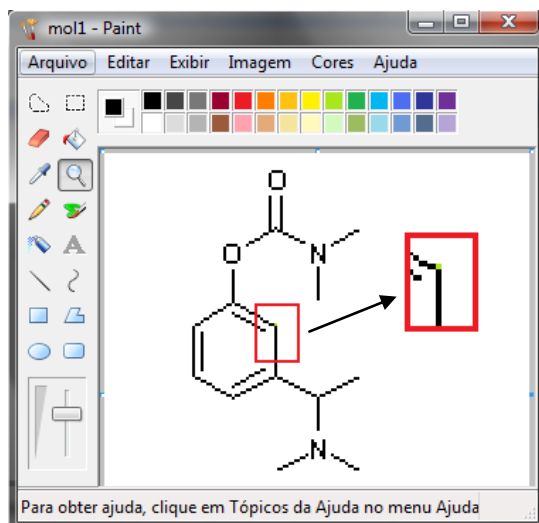


Figura 15. Coordenada fixa nas estruturas utilizadas (pixel em destaque).

As imagens 2D obtidas foram lidas e convertidas para o formato *double array* por meio do programa *Matlab*. Dois grupos de estruturas foram montados independentemente. O primeiro, denominado Grupo 1, continha todas as 34 estruturas, que foram agrupadas para formarem uma matriz X (variáveis independentes) correspondentes ao conjunto de calibração. As atividades biológicas correspondentes, valores de pIC_{50} de cada composto, foram agrupadas em um bloco, denominado bloco Y (variáveis dependentes). Para este grupo, realizaram-se cálculos de calibração, validação cruzada *leave-one-out* (LOO CV) e *leave-20%-out* (20%-O CV), através do algoritmo PLS (*Partial Least Squares*). A habilidade preditiva do modelo foi avaliada através da análise do erro quadrado médio da calibração, da LOO CV e 20%-O CV (RMSEC, RMSECV e $RMSECV_{20\%-o}$, respectivamente), além dos coeficientes de correlação ao quadrado, R^2 (calibração), Q^2_{cv} (LOO CV) e $Q^2_{20\%-o}$ (20%-O CV).

O segundo grupo, denominado Grupo 2, foi dividido em duas partes. A primeira matriz construída continha 26 das 34 estruturas e foi nomeada de *Xtreino* (utilizada para calibração do modelo) e as estruturas restantes foram agrupadas na matriz *Xteste* (utilizada para validação externa). Obedecendo a mesma ordem da divisão citada anteriormente, as atividades biológicas correspondentes foram

agrupadas em blocos chamados respectivamente de *Ytreino* e *Yteste*. Para o Grupo 2, os seguintes cálculos foram aplicados: calibração, validação cruzada *leave-one-out* (LOO CV) e *leave-20%-out* (20%-O CV), além de uma validação externa, todos através do algoritmo PLS (*Partial Least Squares*). A habilidade preditiva do modelo foi avaliada levando-se em conta a análise do erro quadrado médio da calibração, da LOO CV, 20%-O CV e da validação externa (RMSEC, RMSECV, RMSECV_{20%-O} e RMSEP, respectivamente).

As moléculas utilizadas são apresentadas nas tabelas e figuras que se seguem.

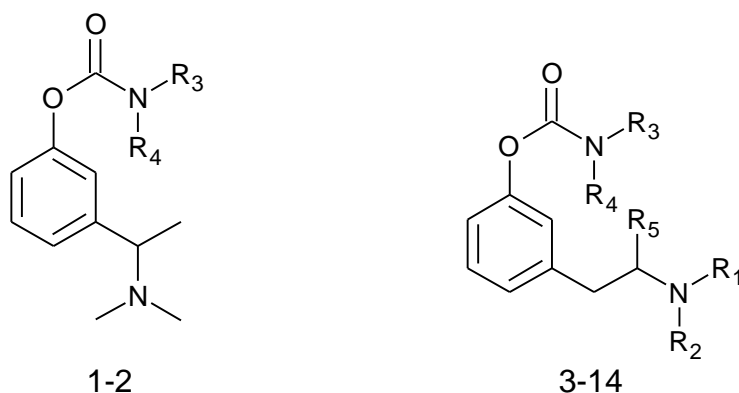


Figura 16. Esqueleto básico para as estruturas da Tabela 10

Tabela 10. Compostos pertencentes aos grupos *Xtreino* e *Xteste* (*)

Composto	R₁	R₂	R₃	R₄	R₅	pIC₅₀
1	-	-	Me	Me	-	7,523
2*	-	-	Me	Et	-	6,036
3	H	H	Me	Me	H	6,638
4*	H	H	Me	Et	H	4,450
5	H	H	Me	<i>n</i> -Pro	H	5,108
6	H	Me	Me	Me	H	6,553
7	H	Me	Me	Et	H	4,684
8	Me	Me	Me	Me	H	6,796
9	H	Pg	Me	Me	H	6,658
10	H	Pg	Me	Et	H	4,520
11	H	Pg	Me	<i>n</i> -Pro	H	4,812
12*	Me	Pg	Me	Me	H	6,071
13	Me	Pg	Me	Et	H	4,780
14*	H	1-MePg	Me	Me	Me	6,769

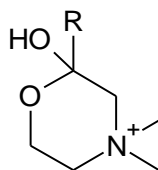


Figura 17. Esqueleto básico para as estruturas da Tabela 11

Tabela 11. Compostos pertencentes aos grupos *Xtreino* e *Xteste* (*)

Composto	R	pIC₅₀
15	H	2,754
16*	CH ₃	2,762
17	C(CH ₃) ₃	2,431
18	CF ₃	2,417

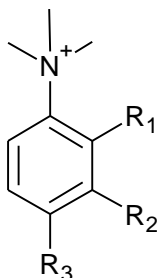


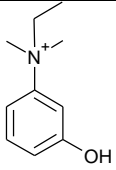
Figura 18. Esqueleto básico para as estruturas da Tabela 12

Tabela 12. Compostos pertencentes aos grupos *Xtreino* e *Xteste* (*)

Composto	R₁	R₂	R₃	pIC₅₀
19*	-	NO ₂	-	3,202
20	-	NHCOCH ₃	-	3,000
21	-	NH ⁺ ₃	-	3,717
22	-	OH	-	6,012
23*	CH ₃	OH	-	3,851
24	-	OH	CH ₃	5,507
25	-	OCOCH ₃	-	5,521
26	CH ₃	OCOCH ₃	-	4,389
27	-	OCOCH ₃	CH ₃	6,181
28	-	OCOC ₂ H ₅	-	5,224

29	CH ₃	OCOC ₂ H ₅	-	3,123
30*	-	OCOC ₂ H ₅	CH ₃	5,424
31	-	OCH ₃	-	3,224
32	CH ₃	OCH ₃	-	3,462
33	-	OCH ₃	CH ₃	3,914

Tabela 13. Composto **34** pertencente ao grupo *Xtreino*.

Composto 34	pIC₅₀
	6,108

4.2 – Resultados e Discussão

Seguindo o que anteriormente foi feito, o novo conjunto de moléculas deste estudo foram igualmente construídas no programa *ChemSketch*, mantendo-se também o alinhamento entre os substituintes (alinhamento 2D), de forma a manter a congruência entre as partes comuns das moléculas quando as mesmas fossem convertidas para o formato *bitmap* (**Figura 19**).

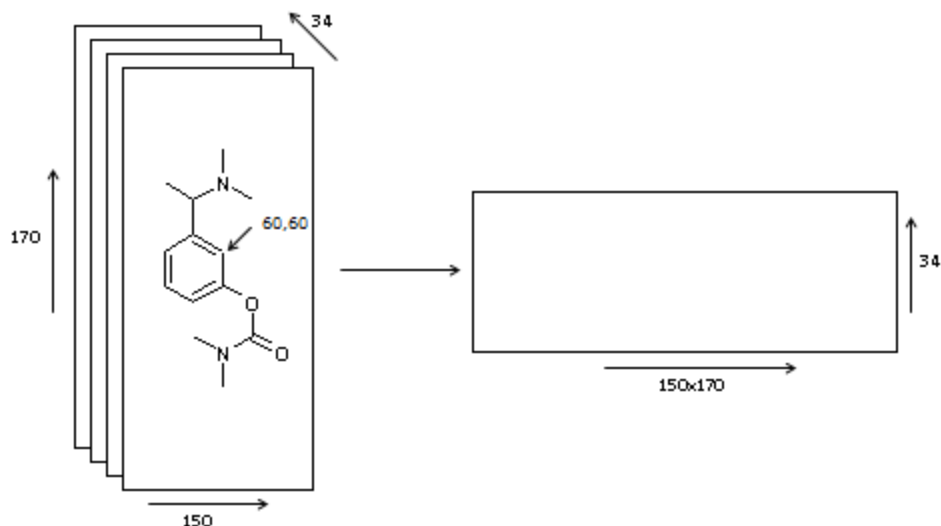


Figura 19. Superposição e desdobramentos das imagens 2D.

Para os cálculos utilizando o método de regressão PLS, cada imagem 2D foi lida e convertida para o formato *double array* utilizando-se o programa Matlab. A matriz foi construída agrupando as imagens propostas, sendo que as colunas com variância zero (pixels comuns e brancos) foram excluídas para diminuir a quantidade de dados utilizada, fazendo-se desta forma a correlação da matriz X com o bloco Y. Neste tipo de cálculo, a não exclusão das colunas com variância zero não mudaria os resultados obtidos; o que se observaria seria uma maior demanda computacional e tempo de cálculo.

Para o Grupo 1, uma calibração juntamente com duas validações cruzadas (LOO e 20%-O CV) foram realizadas e o número ótimo de variáveis latentes (LV's) foi estimado analisando-se o erro quadrado médio da calibração (RMSEC) e da validação cruzada LOO (RMSECV). Para o método analisado, seis LV's explicam uma variância significativa dos dados (**Figura 20**). Importante ressaltar que variáveis latentes são combinações lineares das variáveis independentes e, em métodos de compressão como PLS, a primeira variável latente explica a maior variância nos dados, a segunda variável latente explica a segunda maior variância nos dados, e assim sucessivamente; existem tantas variáveis latentes quantas variáveis independentes originais, mas o uso excessivo

de variáveis latentes remete à tentativa de explicação de dados aleatórios, como ruídos. Portanto, somente um número razoavelmente pequeno de LV's é geralmente necessário. Após este número de variáveis latentes ideal, RMSEC e RMSECV não são melhorados significativamente. Além disso, o uso de uma LV maior pode levar à realização de uma calibração excessiva do modelo (*over fitting*) dando peso muito grande às variáveis correspondentes ao ruído.

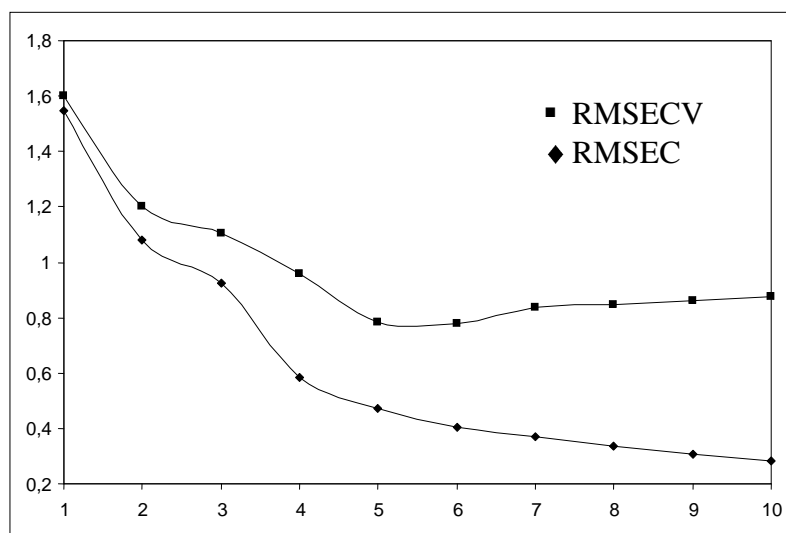


Figura 20. Gráfico de RMSEC/RMSECV *versus* número de variáveis latentes (LV) para PLS

A calibração (**Figura 21**) forneceu um valor de R^2 de 0,922, que se encontra dentro dos padrões de aceitação para um modelo QSAR (que deve ser maior do que 0,80), e RMSEC de 0,449, considerado bom. A validação cruzada LOO (**Figura 22**) forneceu um coeficiente de regressão Q^2_{cv} de 0,712 (o senso comum em QSAR considera valores acima de 0,50 aceitáveis) e RMSECV igual a 0,778. Os valores encontrados para a validação cruzada 20%-O (**Figura 23**) foram de $Q^2_{20\%-O}$ igual a 0,695 e $RMSECV_{20\%-O}$ igual a 0,878.

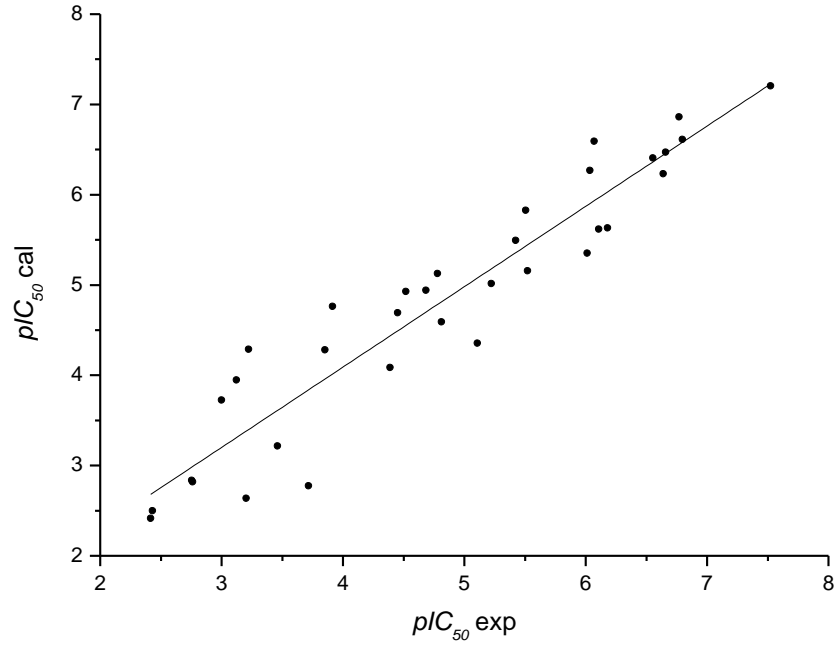


Figura 21. Gráfico da calibração

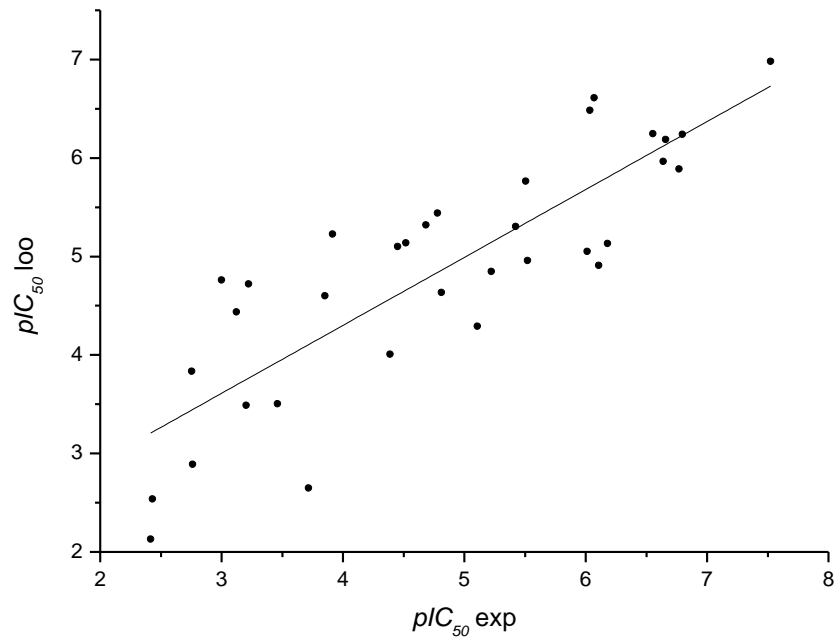


Figura 22. Gráfico da validação cruzada LOO

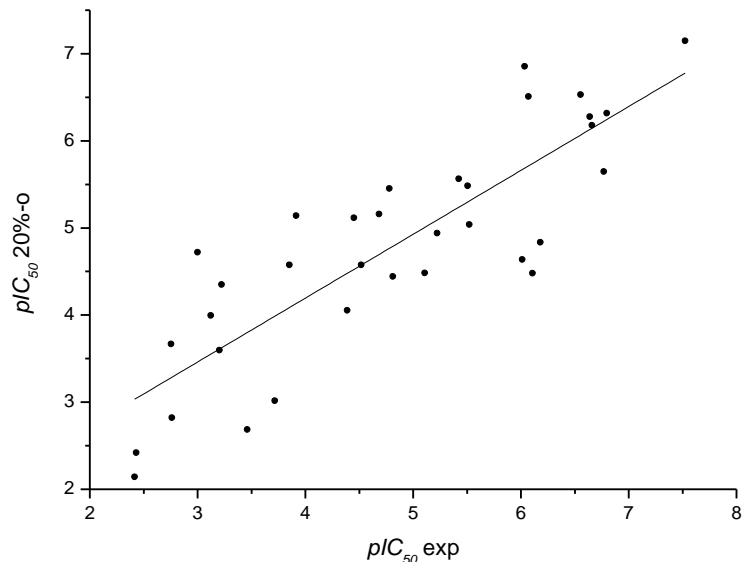


Figura 23. Gráfico da validação cruzada 20%-O

Golbraikh e Tropsha⁴⁹ indicam que a única maneira de se alcançar um modelo QSAR confiável é por meio de uma validação externa. Para essa finalidade, parte dos compostos presente na série de dados foi separada (*Xtest*) e não constaram na etapa de calibração, dando origem ao Grupo 2. Para esse modelo, cinco LV's explicam uma variância significativa dos dados (**Figura 25**). Após este número de variáveis latentes ideal, RMSEC e RMSECV não são melhorados significativamente, sendo que também pode ocorrer o problema de *over fitting* (super ajuste do modelo) já citado.

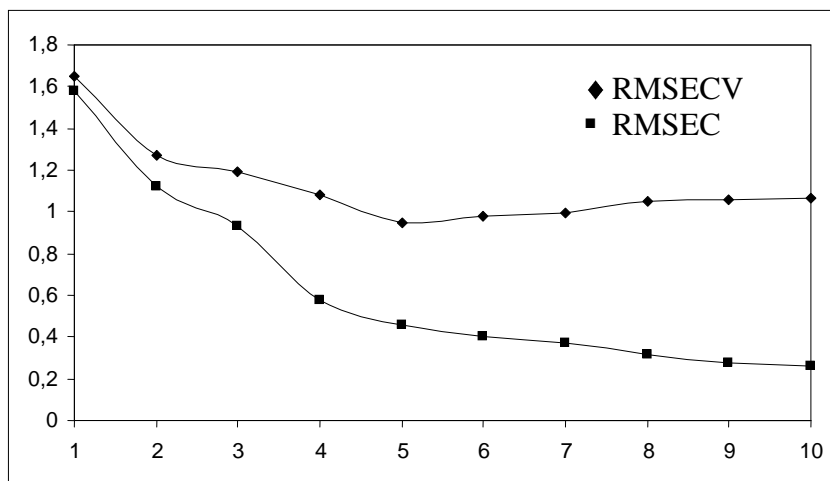


Figura 24. Gráfico de RMSEC/RMSECV *versus* número de variáveis latentes (LV) para PLS

A calibração forneceu um valor de R^2 de 0,897, correspondendo a um valor aceitável, e RMSEC de 0,470. O modelo QSAR foi validado por meio de três diferentes técnicas: validação cruzada LOO (Q^2_{cv} de 0,526 e RMSECV igual a 1,008), validação cruzada 20%-O ($Q^2_{20\%-O}$ igual a 0,523 e RMSECV_{20%-O} igual a 1,039), e validação externa (Q^2 de 0,993 e RMSEP igual a 0,115). Os resultados do modelo (**Figura 25**) sugerem que o mesmo é confiável e o credencia a ser utilizado para a predição da atividade anticolinesterásica de novos compostos congêneres.

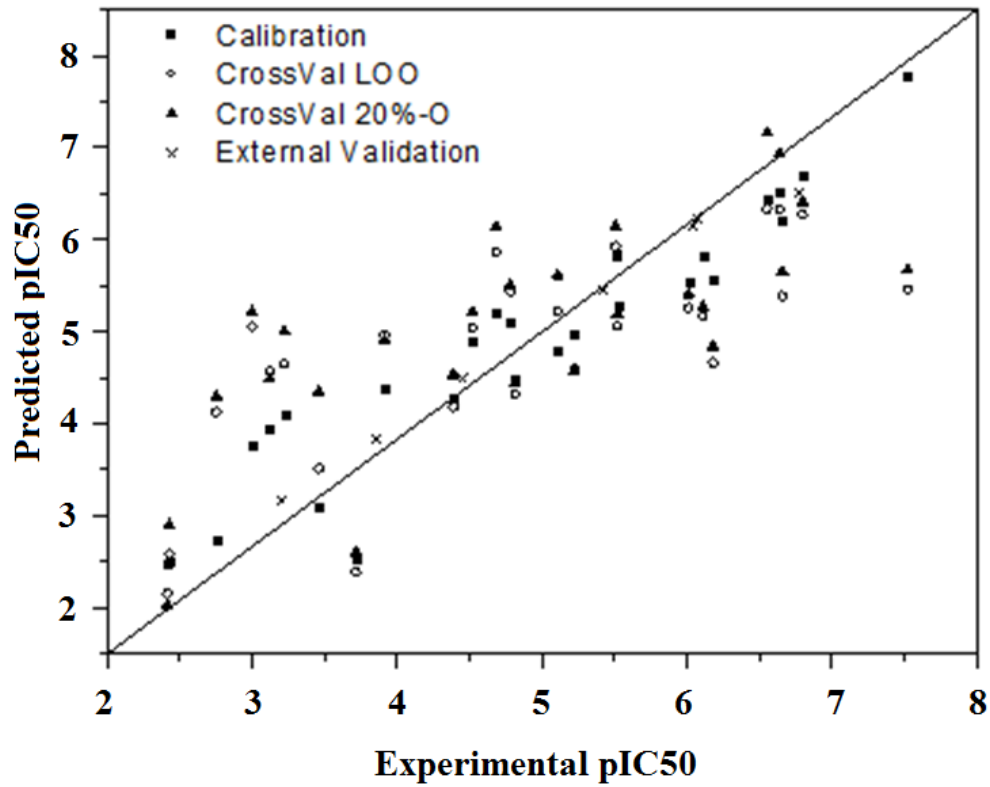


Figura 25. Gráfico de pIC_{50} experimentais vs. estimados/preditos para o Grupo 2

Os valores de R^2 , Q^2_{cv} e $Q^2_{20\%-O}$ foram calculados por meio do programa Origin. Os resultados finais encontrados são apresentados nas tabelas abaixo (**Tabela 14 e 15**).

Tabela 14. Valores de pIC_{50} encontrados para o modelo PLS/MIA-QSAR

Composto	Grupo 1				Grupo 2			
	pIC_{50} exp.	pIC_{50} calib.	pIC_{50} CV loo	pIC_{50} CV 20%o	pIC_{50} calib.	pIC_{50} CV loo	pIC_{50} CV 20%o	pIC_{50} teste
1	7,523	7,204	6,982	7,147	7,781	5,457	5,672	-
2	6,036	6,270	6,483	6,855	-	-	-	6,145
3	6,638	6,233	5,964	6,278	6,525	6,332	6,938	-
4	4,450	4,692	5,100	5,117	-	-	-	4,483
5	5,108	4,355	4,291	4,484	4,805	5,227	5,614	-
6	6,553	6,408	6,246	6,531	6,453	6,336	7,160	-
7	4,684	4,942	5,321	5,160	5,203	5,865	6,137	-
8	6,796	6,613	6,239	6,316	6,698	6,271	6,412	-
9	6,658	6,470	6,189	6,178	6,206	5,389	5,655	-
10	4,520	4,928	5,137	4,574	4,894	5,049	5,216	-
11	4,812	4,591	4,633	4,442	4,486	4,322	4,436	-
12	6,071	6,591	6,612	6,508	-	-	-	6,226
13	4,780	5,125	5,439	5,452	5,117	5,438	5,503	-
14	6,769	6,861	5,889	5,647	-	-	-	6,513
15	2,754	2,836	3,833	3,668	2,728	4,128	4,300	-
16	2,762	2,820	2,889	2,822	-	-	-	2,730
17	2,431	2,500	2,536	2,419	2,510	2,585	2,896	-
18	2,417	2,413	2,130	2,143	2,484	2,153	2,030	-
19	3,202	2,636	3,488	3,598	-	-	-	3,171
20	3,000	3,726	4,762	4,720	3,776	5,056	5,215	-
21	3,717	2,776	2,649	3,016	2,542	2,389	2,600	-
22	6,012	5,351	5,052	4,636	5,546	5,259	5,410	-
23	3,851	4,282	4,599	4,577	-	-	-	3,833
24	5,507	5,827	5,765	5,482	5,837	5,927	6,148	-
25	5,521	5,155	4,958	5,038	5,288	5,064	5,191	-
26	4,389	4,086	4,008	4,053	4,278	4,183	4,536	-
27	6,181	5,631	5,132	4,835	5,579	4,667	4,841	-
28	5,224	5,016	4,847	4,939	4,969	4,596	4,571	-
29	3,123	3,948	4,437	3,996	3,958	4,570	4,483	-
30	5,424	5,493	5,303	5,564	-	-	-	5,449
31	3,224	4,286	4,721	4,350	4,104	4,649	5,002	-
32	3,462	3,217	3,505	2,687	3,093	3,516	4,348	-
33	3,914	4,762	5,226	5,142	4,394	4,968	4,906	-
34	6,108	5,619	4,909	4,481	5,829	5,170	5,273	-

Grupo 1: Matriz com 34 estruturas

Grupo 2: Matriz para validação externa

Xtreino: 26 estruturas

Xteste: 8 estruturas

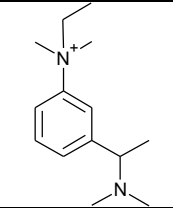
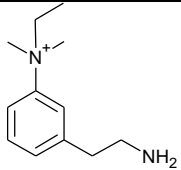
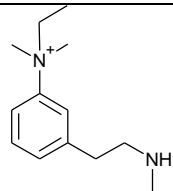
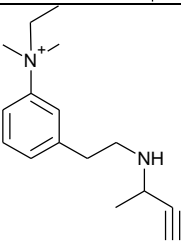
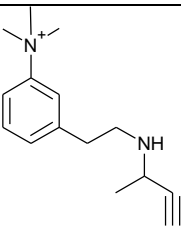
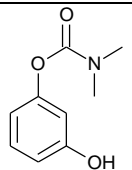
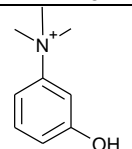
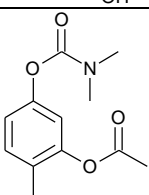
Tabela 15. Resultados finais obtidos nas análises.

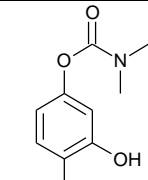
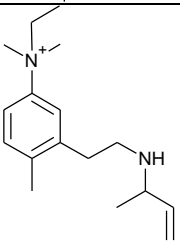
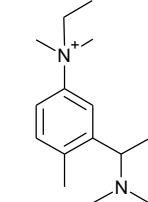
	<i>LV</i>	R^2	<i>RMSEC</i>	<i>F</i>	<i>t</i>	Q^2_{CV}	<i>RMSECV</i>	$Q^2_{20\%o}$	<i>RMSECV</i> 20%o	Q^2
G 1	6	0,922	0,449	363,385	71,262	0,712	0,778	0,695	0,878	-
G 2	5	0,897	0,470	192,815	53,199	0,526	1,008	0,523	1,039	0,993

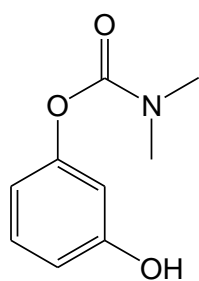
Além dos testes de validação, um teste conhecido como *Y-randomization* foi realizado para avaliar a robustez do modelo. Esse teste consiste em se desorganizar o bloco Y (das atividades biológicas) e se proceder com a calibração; um baixo valor de R^2 é esperado se, de fato, o modelo QSAR real não tenha sido bom devido ao acaso. Um valor médio (10 repetições) de R^2_{rand} foi comparado ao R^2 originalmente encontrado. O baixo valor de R^2_{rand} de 0,013 confirma que o modelo é robusto e indica que a boa correlação obtida na etapa de calibração não foi fortuita.

Devido aos bons resultados da análise, novos compostos foram propostos baseando-se nas subestruturas dos compostos mais ativos da série (aqueles que apresentaram valores de pIC_{50} experimentais mais elevados). Esta estratégia para propor novos compostos tem sido aplicada com sucesso na literatura.^{42,50,51} O seguinte procedimento foi adotado: o esqueleto comum a todas as estruturas foi mantido fixo e os ligantes que se diferiam dos demais foram adicionados a estrutura básica, resultando em novos compostos. A combinação das subestruturas forneceu onze novos compostos (**Figura 26**). Desses, três se destacaram por possuírem elevados valores calculados de pIC_{50} (**Figura 27**). Esses elevados valores de bioatividade, se comparados aos valores existentes para os compostos da **Tabela 1**, refletem o efeito sinérgico de se mesclarem as porções mais importantes de cada molécula.

Figura 26. Compostos preditos à partir do método MIA-QSAR

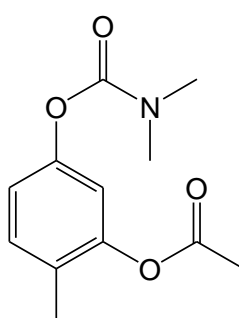
Estrutura	pIC_{50}
	5,326
	4,289
	4,012
	4,303
	4,046
	8,158
	5,614
	8,040

	8,431
	4,615
	5,600



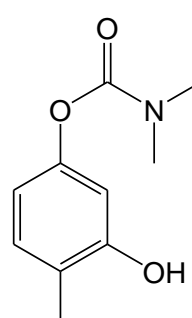
A

8.158



B

8.040



C

8.431

Figura 27. Compostos preditos a partir das análises finais

Tão importante quanto predizer a atividade biológica de um fármaco, é também prever sua segurança e farmacocinética; a determinação de parâmetros ADME-Tox (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) é importante nesse contexto. O perfil adequado de um fármaco pode ser acessado por meio da análise de algumas poucas propriedades baseadas na “regra dos cinco” de Lipinski⁵¹ e na área superficial polar da molécula.⁵³

As regras dos cinco de Lipinski são parâmetros usados para avaliar o potencial que uma molécula apresenta de ser absorvida oralmente. Apesar de terem sido publicadas em 1997, essas regras já eram usadas há muito tempo.

As regras de Lipinski analisam:

- *Doadores e aceptadores de ligação de H*
- *LogP*
- *Massa molecular*

A disponibilidade oral está relacionada à solubilidade e à presença de ligações de hidrogênio. Para um dado composto, é avaliado o número total de átomos que podem estar envolvidos nessas ligações. ADME/Tox (Absorção, Dosagem, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) depende da lipofilicidade do composto, por isso é avaliada nas regras de Lipinski. Definimos a lipofilicidade de um composto como a tendência deste para uma partição numa matriz lipídica apolar contra uma matriz aquosa. Além do número de ligações de hidrogênio e da lipofilicidade, as regras de Lipinski consideram a massa molecular do composto. A idéia atrás de tal avaliação, é que compostos de massa molecular relativamente alta, apresentam maior dificuldade para atravessar a bicamada lipídica. Outra consequência do aumento da massa molecular, é que uma cavidade maior terá que ser formada na água, para que o composto seja solubilizado, ou seja, aumento relativo da massa molecular pode reduzir a solubilidade. Normalmente usamos a unidade Dáton (D) para medir a massa molecular de moléculas biológicas em geral.

Regras de Lipinski. A partir da estrutura de um composto podemos avaliar características da estrutura, tais como ligações de hidrogênio, Log P e MW. Uma absorção e permeabilidade adequadas são esperadas para moléculas que apresentem as seguintes características:

- $HBD \leq 5$
- $HBA \leq 10$
- $Log P \leq 5$
- $MW \leq 500$

Esses dados para as três moléculas propostas foram determinados através do programa Molinspiration⁵⁴ e sugere que nenhuma das proposições apresentariam quaisquer desvantagens relacionadas a farmacocinética, uma vez que nenhuma regra dos cinco ($\log P \leq 5$, peso molecular ≤ 500 , número de aceptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 e número de doadores para ligação de hidrogênio ≤ 5) foi violada, e os valores de TPSA encontram-se dentro da faixa correspondente a elevada absorção após administração oral (**Tabela 16**).^{53,55}

Tabela 16. Parâmetros da regra dos cinco de Lipinski e TPSA para os compostos propostos **A-C**.

Composto	$\log P$	MW	n_{OHNH}	n_{ON}	TPSA
A	1,06	181,2	1	4	49,8
B	1,49	237,2	0	5	55,8
C	1,93	195,2	1	4	49,8

CONCLUSÕES

5 – Conclusões

Os modelos QSAR criados no presente trabalho provaram ser altamente confiáveis para prever a atividade anticolinesterásica de novos inibidores da enzima acetilcolinesterase. Isso foi mostrado pelas estruturas obtidas nos resultados finais, que mostraram valores de pIC_{50} apreciáveis. A análise estrutural de potenciais novos fármacos sugerem a importância de um grupo fenol (ou respectivo análogo acetilado) juntamente com a função carbamato, em posição *meta* no anel benzênico, para aumentar a atividade biológica. Em etapas futuras, isso pode ser averiguado por meio de novas etapas, iniciadas com o design racional de fármacos do presente trabalho: síntese, caracterização e testes biológicos das novas estruturas. Além disso, pode-se ainda realizar estudos de ancoramento molecular (*docking*), a fim de se conhecer o modo de interação entre ligante e receptor.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

6 – Referências Bibliográficas

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), www.ibge.gov.br (consultado em Agosto de 2009).
2. Brodaty H, Moore CM. *The Clock Drawing Test for dementia of the Alzheimer's type: A comparison of three scoring methods in a memory disorders clinic. Int J Geriatr Psychiatry*, **1997**,12, 619-27.
3. Dunkin JJ, Anderson-Hanley C. *Dementia caregiver burden: a review of the literature and guidelines for assessment and intervention. Neurology*. **1998**,51,(Suppl1) S53-S67.
4. Schulz R, O'Brien AT, Bookwala J. et al. *Psychiatric and physical morbidity effects of dementia caregiving: prevalence, correlates, and causes. Gerontologist*, **1995**, 35, 771-91.
5. Hoyert DL, Kochanek KD, Murphy SL. *Deaths: final data for 1997. Natl Vital Stat Rep*, **1999**, 47, 1-104.
6. Ritchie K, Lovestone S. *The dementias. Lancet*, **2002**, 360, 1759-66.
7. Jorm AF, Korten AE, Henderson AS. *The prevalence of dementia: a quantitative integration of the literature. Acta Psychiatr Scand*, **1987**, 76, 465-79.
8. Ott A, Breteler MM, van Harskamp F. et al. *Incidence and risk of dementia. The Rotterdam Study. Am J Epidemiol*, **1998**, 147, 574-80.
9. Jorm AF, Jolley D. *The incidence of dementia: a metaanalysis. Neurology*. **1998**, 51, 728-33.
10. Cummings JL, Vinters HV, Cole GM. et al. *Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. Neurology*, **1998**, 51(Suppl1), S2-S67.
11. Nilsson LG, Adolfsson R, Bäckman L. et al. *The influence of APOE status on episodic and semantic memory: data from a population-based study. Neuropsychology*, **2006**, 20, 645-57.
12. Green RC, Cupples LA, Go R.,et al. *Risk of dementia among white and African American relatives of patients with Alzheimer disease. JAMA*, **2002**, 287, 329-36.

13. McDonald CR, McEvoy LK, Gharapetian L. et al. *Regional rates of neocortical atrophy from normal aging to early Alzheimer disease. Neurology*, **2009**, 73, 457-65.
14. Butler SM, Ashford JW, Snowdon DA. *Age, education, and changes in the Mini-Mental State Exam scores of older women: findings from the Nun Study. J Am Geriatr Soc*, **1996**, 44, 675-81.
15. Bertolucci P. *Instrumentos para o Rastreamento das Demências. In: Forlenza OV, Caramelli P. Neuropsiquiatria Geriátrica. São Paulo, SP: Atheneu, 2000.*
16. Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL. et al. *Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidencebased review). Neurology*, **2001**, 56, 1143-53.
17. Caramelli P, Areza-Fegyveres R. *Doença de Alzheimer. In: Forlenza OV. Psiquiatria Geriátrica. São Paulo, SP: Atheneu, 2007.*
18. Waldemar G, Dubois B, Emre M. et al. *Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. Eur J Neurol*, **2007**, 14, e1-e26.
19. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". *A practical method for grading the cognitive state of patients for clinician. J Psychiatr Res*, **1975**, 12, 189-98.
20. Critchley M. *The parietal lobes. New York, NY: Hafner Publishing Company, 1953.*
21. Blessed G, Tomlinson BE, Roth M. *The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral gray matter of elderly subjects. Br J Psychiatr*, **1968**, 114, 797-811.
22. Brucki SM, Malheiros SM, Okamoto IH. et al. *Normative data on the verbal fluency test in the animal category in our milieu. Arq Neuropsiquiatr*. **1997**, 55, 56-61.
23. Bertolucci PHF, Okamoto IH, Toniolo Neto JT. et al. *Desempenho da população brasileira na bateria neuropsicológica do Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Rev Psiq Clin*. **1998**, 25, 80-3.

24. Bertolucci PH, Okamoto IH, Brucki SM. et al. *Applicability of the CERAD neuropsychological battery to Brazilian elderly. Arq Neuropsiquiatr*, **2001**, 59, 532-6.
25. Porto CS, Fichman HC, Caramelli P. et al. *Brazilian version of the Mattis dementia rating scale: diagnosis of dementia in Alzheimer's disease. Arq Neuropsiquiatr*, **2003**, 61, 339-45.
26. Roth M, Tym E, Mountjoy CQ. et al. *CAMDEX. A standardized instrument for the diagnosis of mental disorder in the elderly with special reference to the early detection of dementia. Br J Psychiatry*, **1986**, 149, 698-709.
27. [U S Food and Drug Administration](http://www.fda.gov) (FDA), www.fda.gov (consultado em Agosto de 2009).
28. Klebe G, Gohke H. *Angew Chem Int Ed*. 2002, 41, 2644-76.
29. Barreiro EJ, Fraga CAM. *Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*, 2ª edição, Editora Art Med Ltda, Porto Alegre, R.S., **2008**.
30. Weinhold F, Landis CR. *Chemistry Education: Research and Practice in Europe*, 2001, 2
31. Cramer III, RD, Patterson D E, Bunce J D. [Comparative molecular field analysis \(CoMFA\). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins.](#) *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 5959-67.
32. Jayatilke P R, Nair A C, Zauhar R, Welsh W J. *Computational Studies on HIV-1 Protease Inhibitors: Influence of Calculated Inhibitor-Enzyme Binding Affinities on the Statistical Quality of 3D-QSAR CoMFA Models.* *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 4446-51.
33. Singh J, van Vlijmen H, Lee WC, Liao Y, Lin KC, Ateeq H et al. [3D QSAR \(COMFA\) of a series of potent and highly selective VLA-4 antagonists.](#) *J. Comp.-Aided Mol. Des.* **2002**, 16, 201-11.
34. Nicolotti O, Pellegrini-Calace M, Altomare C, Carotti A, Carrieri A, Sanz F. *Ligands of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor (nAChR): Inferences from the Hansch and 3-D Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) Models.* *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9, 1-29.

35. Kuo C-L, Assefa H, Kamath S, Brzozowski Z, Slawinski J, Saczewski F, Buolamwini J K, Neamati N. [Application of CoMFA and CoMSIA 3D-QSAR and Docking Studies in Optimization of Mercaptobenzenesulfonamides as HIV-1 Integrase Inhibitors.](#) *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 385-99.
36. Klebe G Abraham U, Mietzner T. *Molecular Similarity Indices in a Comparative Analysis (CoMSIA) of Drug Molecules To Correlate and Predict Their Biological Activity.* *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 4130-46.
37. Goodford PJ. GRID, University of Oxford, Oxford, UK, **1995**.
38. Geladi P, Esbensen K. *J. Chemom.*, **1989**, 3, 419.
39. Geladi P, Sethson B, Nyström J, Lillhonga T, Lestander T, Burger J. *Spectrochim. Acta B*, **2004**, 59, 1347.
40. Esbensen K, Geladi P. *Chemom. Intell. Lab. Sys.*, **1989**, 7, 67.
41. Freitas MP, Martins JÁ, Brown SD. *J. Mol. Struct.* **2005**, 738, 149-154.
42. Pinheiro JR, Bitencourt M, da Cunha EFF, Ramalho TC, Freitas MP. [Novel anti-HIV cyclotriazadisulfonamide derivatives as modeled by ligand- and receptor-based approaches.](#) *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 1683-90.
43. Roy KK, Dixit A, Saxena AK. *An investigation of structurally diverse carbamate for acetylcholinesterase (AChE) inhibition using 3D-QSAR analysis.* *J. Mol. Graph. Mod.* **2008**, 27, 197-208.
44. Sippl W, Contreras JM, Parrot I, Rival YM, Wermuth C. *Structure-based 3D-QSAR and desing of novel acetylcholinesterase inhibitors.* *J. Comp-Aided Mol.* **2001**, 15, 395-410.
45. ACD/ChemSketch Version 10.02, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Ont., Canada, **2006**.
46. Matlab Version 6.5, Mathworks Inc., Natick, MA, **1994-2005**.
47. OriginPro 7.5SRO, OriginLab Corporation, Northampton, MA, **1991-2003**.
48. Cho SJ, Garsia MLS, Bier J, Tropsha A. *Structure-Based Alignment and Comparative Molecular Field Analysis of Acetylcholinesterase Inhibitors.* *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 5064-71.
49. Golbraikh A, Tropsha A. *J. Mol. Graph. Modell.* **2002**, 20, 269-76.

50. Antunes JE, Freitas MP, da Cunha EFF, Ramalho TC, Rittner R. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 7599-606.
51. Goodarzi M, da Cunha EFF, Freitas MP, Ramalho TC. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4879-89.
52. Lipinski CA, Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J.; *Adv. Drug. Delivery Rev.* **1997**, *23*, 4-25.
53. Ertl P, Rohde B, Selzer P. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3714-7.
54. <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>
55. Freitas MP. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1154-9.