



Universidade Federal de Alagoas

Instituto de Química e Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia
PPGQB



IQB

**ESTUDO QUÍMICO-TEÓRICO NA DIFERENCIAÇÃO DA
PSICOATIVIDADE E PSICOINATIVIDADE EM CANABINÓIDES
BIOLOGICAMENTE ATIVOS E SEU METABÓLITOS**

Tânia Maria de Brito e Silva

**Maceió
2009**

TÂNIA MARIA DE BRITO E SILVA

**ESTUDO QUÍMICO-TEÓRICO NA DIFERENCIAÇÃO DA
PSICOATIVIDADE E PSICOINATIVIDADE EM CANABINÓIDES
BIOLOGICAMENTE ATIVOS E SEU METABÓLITOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Mariano Alves Pereira

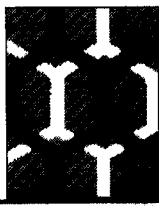
**Maceió – AL.
2010**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- S586e Silva, Tânia Maria de Brito e.
Estudo químico-teórico na diferenciação da psicoatividade e psicoatividade de em canabinóides biologicamente ativos e seu metabólitos / Tânia Maria de Brito e Silva, 2009.
240 f. : il., grafs. e tabs.
- Orientador: Mariano Alves Pereira.
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2009.
- Bibliografia. f. 214-240.
1. Canabinóides. 2. Quimiometria. 3. Cálculos semi-empíricos. 4. Densidade funcional. 5. Descritores moleculares. 6. SAR

CDU: 544



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

Instituto de Química e Biotecnologia
Universidade Federal de Alagoas
Tel. 55 82 3214-1384 Fax. 55 82 3214-1389
www.cpgqb@qui.ufal.br

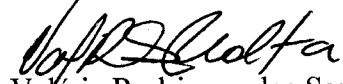
Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57072-970
Maceió-AL
Brasil

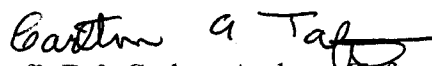
Membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutorado de Tânia Maria Brito e Silva intitulada: **“Estudo Químico-Teórico na Diferenciação da Psicoatividade e Psicoinatividade em Canabinóides Biologicamente Ativos e seus Metabólitos”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 15 de maio de 2009, às 14h na sala de reuniões do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL.

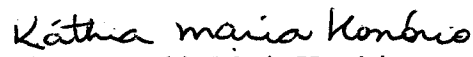
COMISSÃO JULGADORA

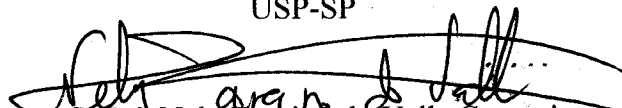

Prof. Dr. Mariano Alves Pereira

Orientador - PPGQB/IQB/UFAL


Prof. Dr. Valéria Rodrigues dos Santos Malta
PPGQB/IQB/UFAL


Prof. Dr. Carlton Anthony Taft
CBPF-RJ


Prof. Dr. Kathia Maria Honório
USP-SP


Prof. Dr. Nely Targino do Valle Cerqueira
UNEAL

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus
pais Nailza e Luiz que sempre
incentivaram e apoiaram os meus
estudos e ao meu filho Rafael por
estar presente para sempre em
minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a execução e termino deste trabalho:

- Primeiramente a Deus.
- A toda a minha família em especial os meus pais, Nailza e Luiz pelos ensinamentos e pelo amor em todos os momentos e por ter me direcionado desde o inicio a esta formação acadêmica.
- Ao meu filho Rafael por todo amor e dedicação.
- Ao professor e orientador Mariano Alves pela amizade e confiança na realização deste trabalho.
- A professora Valéria Malta pela colaboração em alguns momentos.
- A todo o pessoal do grupo de cristalografia da UFAL pelo ambiente de trabalho, especialmente ao professor Carlos Simone e as colegas Nely Targino e Tatiane e a todos os outros que por ali passaram.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da UFAL pela oportunidade de uma interação científica maior.
- Aos funcionários do Instituto de Química e Biotecnologia pelo auxílio.
- Ao Professor Albérico Borges por ter disponibilizado seu laboratório para realizar algumas análises e a professora Katia Honório pela ajuda.
- Ao Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas – CBPF - em especial ao professor Antony Taft por ter permitido a realização de alguns trabalhos.
- A todos os colegas e amigos da Pós-graduação que permitiram esta passagem de minha vida ser mais agradável.
- A àqueles que têm me dado tanta força e contribuíram para desenvolver este trabalho, especialmente as amigas de longas datas Silvânia Rodrigues e Roberta Zioli.
- Ao meu companheiro Maurício Cunha pelo carinho, amor e companheirismo em todos os momentos, especialmente na escrita da tese.
- Aos meus irmãos Sandra, Sônia, Cirlene, Solange e Marcelo pelo amor dispensado e por fazerem parte da minha vida.
- Finalmente ao CNPQ

*A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...*

Portanto, devemos:

*Fazer da interrupção um novo caminho novo...
Da queda um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...*

Fernando Pessoa

RESUMO

Diferentes metabólitos canabinóides foram investigados por cálculos quânticos e métodos quimiométricos para estabelecer as correlações entre a estrutura química e a psicoatividade. Otimizações de geometria e diversas propriedades físico-químicas foram obtidas através de cálculos semi-empíricos (AM1, PM3 e PM5) e teoria de densidade funcional (DFT). Diversos descritores moleculares foram calculados a partir das propriedades e submetidos aos métodos quimiométricos para tratamento multivariado dos dados, incluindo a análise de componente principal (PCA), a análise hierárquica de agrupamentos (HCA) a análise de cluster não hierárquica (K-Means), o método do vizinho mais próximo (KNN) e redes neurais artificiais (RNAs). Dentre todos os descritores moleculares calculados, os mais relevantes para discriminar a psicoatividade são aqueles relacionados às propriedades eletrônicas, lipofílicas e estereo-geométricas (LUMO, T2 e Log P). Os compostos foram classificados em grupos psicoativos (A1) moderadamente psicoativos (A2) e psicoativos(B). Os modelos obtidos foram usados para estudar outros 22 compostos canabinóides e as previsões relacionadas à psicoatividade estão de acordo com as evidências experimentais.

Palavras de chaves - Cálculos teóricos; Quimiometria; Descritores moleculares; Canabinoides, SAR

ABSTRACT

Different cannabinoids metabolites have been investigated from quantum calculations and chemometric methods to establish correlations between chemical structure and psychoactivities. Geometry optimizations and several physical-chemical properties were obtained from calculations semi-empirical (AM1, PM3 e PM5) and theory density functional calculations (DFT). Several molecular descriptors were obtained these properties for multivariate treatment and some chemometric methods were applied including principal component analysis (PCA), hierarchical cluster analysis (HCA), nonhierarchical cluster analysis (K-means), nearest neighbor (KNN) and artificial neural networks (RNAs). Among all the molecular descriptors calculated, the most relevant ones to discriminate according to their psychoactivity were those related to electronic, lipophilic and stereo-geometric properties (LUMO, T2 e Log P). Thus, the compounds were classified into psychoactive (A1), moderately psychoactive (A2) and psychoinactive (B) groups. The models obtained were used to study additional 22 cannabinoids compounds, and our predictions related to the psychoactivity were in good agreement with the experimental evidences.

Keys Words – Theoretical calculations; Chemometric; Molecular descriptors; Cannabinoids. SAR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- <i>Cannabis sativa</i>	28
Figura 2	- Tipos de folhagem de espécies do gênero <i>Cannabis</i>	29
Figura 3	- Estrutura de 09 canabinóides naturais: (Δ^9 -THC), (Δ^8 -THC), (CBD), (CBN), (CBG), (CBC) (Δ^9 -THCV), (CBE) e (CBT).....	35
Figura 4a	- Sistema de numeração monoterpreno, benzopirano e THC..	40
Figura 4b	- Sistema de numeração dibenzopirano.....	41
Figura 5	- Enantiômeros do Δ^9 -THC.....	42
Figura 6	- Canabinóides sintéticos comercializados.....	44
Figura 7	- Botão terminal e sinapse microscópica.....	45
Figura 8	- Principais estruturas do sistema límbico onde atuam os canabinóides.....	47
Figura 9a	- Receptores canabinóides CB1 e CB2.....	49
Figura 9b	- Relação entre os resíduos de aminoácidos (F3.36 e W6.48) e (R3.50 e D6.30) nos estados inativos (R) e ativos (R*) de CB1 por modelagem molecular.....	53
Figura 10	- Transdução do sinal dos receptores CB1/ CB2 pela presença do Δ^9 -THC.....	54
Figura 11	- Estrutura de alguns endocanabinóides mais estudados: Anandamida, 2-Araquidonoilglicerol (2-AG), 2-Araquidonoildopamina e Virodamina.....	56
Figura 12	- Biosíntese de endocanabinóides.....	57
Figura 13	- Principais vias de biotransformação do Δ^9 -THC.....	63
Figura 14	- Biosíntese de canabinóides clássicos e não clássicos.....	67
Figura 15	- Reações de descarboxilação aos ácidos canabinóides.....	69
Figura 16a	- Biosíntese dos ácidos canabinóides.....	71
Figura 16b	- Principais oxidações primárias na cadeia do THC.....	72
Figura 17a	- Estrutura geral dos metabólitos canabinóides (1-16).....	74
Figura 17b	- Estrutura geral dos metabólitos canabinóides (17-30).....	75
Figura 18a	- Interações (diedrais impróprias e torção).....	94
Figura 18b	- Ângulo diedro formado por dois planos concorrentes.....	94

Figura 19a -	Representação gráfica da somatória dos produtos dos vetores "scores" e "loadings".....	110
Figura 19b -	Uma componente principal PC para duas variáveis.....	110
Figura 20 -	Imagens 2D do funcionamento do algoritmo K-means para 3 pontos.....	115
Figura 21 -	Classificação feita pelo KNN para um padrão desconhecido	117
Figura 22 -	Modelo de um neurônio biológico.....	122
Figura 23 -	Modelo de um neurônio artificial.....	123
Figura 24 -	As três distâncias da U-matriz.....	125
Figura 25 -	Estrutura geral e sistema THC para canabinóides.....	130
Figura 26 -	Conformação do Δ^9 -THC determinada por mecânica molecular MM2.....	133
Figura 27 -	Curvas de energia potencial do método do gradiente conjugado.....	135
Figura 28 -	Gráfico dos escores PC1 x PC2 e separação entre os compostos canabinóides carboxilados utilizando o conjunto total de 17 descritores.....	156
Figura 29 -	Gráfico dos "loadings" PC1 x PC2 para o conjunto de 30 metabólitos e o THC utilizando as 17 variáveis separadas em 03 clusters distintos.....	158
Figura 30 -	Distribuição dos 03 clusters para todas as 17 variáveis.....	159
Figura 31 -	Gráfico dos "escores" PC1 x PC2 para o conjunto de 6 descritores (Log P, E.H. e M, LUMO, T2 e μ).....	162
Figura 32 -	Gráfico dos "loadings" PC1 x PC2 para o novo conjunto de seis descritores (Log P, E.H., M, LUMO, T2 e μ).....	163
Figura 33 -	Gráfico dos "loadings" PC1xPC2 para os descritores (LUMO, T2 e Log P).....	165
Figura 34 -	Gráfico do "scores" PC1xPC2 para os descritores (LUMO, T2 e Log P). Separação em A1 (psicoativos), A2 (moderadamente psicoativos) e B (psicoinativos).....	166

Figura 35	- Dendrograma mostrando a separação entre candidatos a canabinóides psicoativos (B), psicoativos (A1) e moderadamente psicoativos (A2).....	171
Figura 36	- Diferentes topologias (retangular e hexagonal) para uma rede SOM.....	176
Figura 37	- Mapas auto organizáveis (SOM) para a rede neural formada pelos METs1-30 e THC. Os eixos X e Y representam as distâncias euclidianas.....	177
Figura 38a	- Estrutura de alguns canabinóides psicoativos [IC(1-11) derivados do THC.....	179
Figura 38b	- Estrutura de alguns canabinóides psicoativos (AC) derivados do THC.....	180
Figura 39	- Gráfico dos “scores” para o conjunto de 53 canabinóides (30 do conjunto de treinamento + 22 do conjunto de predição + THC).....	181
Figura 40	- Gráfico dos “loadings” para os descritores LUMO, T2 e Log P do conjunto de 53 canabinóides (30 do conjunto de treinamento + 22 do conjunto de predição + THC).....	183
Figura 41	- Dendrograma para o conjunto de 53 canabinóides (30 do conjunto de treinamento + 22 do conjunto de predição + THC).....	185
Figura 42	- Geometrias otimizadas dos compostos canabinóides de reconhecida propriedade psicoterapêuticas na literatura.....	187
Figura 43	- Visualização do Δ^9 -THC e 11-carbóxi- Δ^9 -THC (MET 1) mostrando o anel benzopirano BC no plano.....	189
Figura 44	- Geometrias otimizadas dos derivados 9-COOH- Δ^9 -THC.....	191
Figura 45	- Metabólitos canabinóides derivados 11-OH- Δ^9 -THC e sistema de numeração utilizado para os compostos.....	194
Figura 46	- Estrutura e representação dos grupos R1, R2 e R3 para os METs 1-30.....	195
Figura 47-	Geometria dos metabólitos 3-pentil- 8- <i>axial</i> -hidróxil- Δ^9 -THC (MET 27) e 3-pentil- 8- <i>equatorial</i> -hidróxil- Δ^9 -THC (MET 29) respectivamente.....	197

Figura 48	- Geometria molecular do derivado 3-pentil-8-ceto- Δ^9 -THC (MET10).....	198
Figura 49	- Geometria otimizada do metabólito canabinóide 3-pentil-11-hidróxi- Δ^9 -THC (MET28).....	199
Figura 50	- Geometrias dos metabólitos 3-pentil-8,11- <i>axial, equatorial</i> -dihidróxi- Δ^9 -THC (MET11) e 3-pentil-8,11- <i>axial, equatorial</i> -dihidróxi-2'-hidróxi- Δ^9 -THC (MET12).....	199
Figura 51	- Potencial eletrostático dos metabólitos 3-pentil-8,11- <i>axial, equatorial</i> -dihidroxi- Δ^9 -THC (MET11) e 3-pentil-8,11- <i>axial, equatorial</i> -dihidroxi-2'-hidróxi- Δ^9 -THC (MET12).....	202
Figura 52	- Geometria dos metabólitos canabinóides 3-(2'-carbóxi-1-etil)-9-carbóxi- Δ^9 -THC e 3-(2'-carbóxi-vinil)-9-carbóxi- Δ^9 -THC.....	203
Figura 53	- Geometria dos metabólitos canabinóides 3-(2'-carbóxi-1-etil)-9-carbóxi- Δ^9 -THC (MET7) e 3-(2'-carbóxi-vinil)-9-carbóxi- Δ^9 -THC (MET 9) (I) perspectiva frontal (II) perspectiva no plano.....	204
Figura 54	- Orbitais LUMO dos metabólitos canabinóides 3-(2'-carbóxi-1-etil)-9-carbóxi- Δ^9 -THC (MET 7) e 3-(2'-carbóxi-vinil)-9-carbóxi- Δ^9 -THC (MET 9).....	205
Figura 55	- Geometrias dos metabólitos canabinóides 3-(3'-carbóxi-1-propil)-8-hidróxil- Δ^9 -THC (MET 24) e 3-(3'-carbóxi-2'-propenil)-8-hidróxil- Δ^9 -THC (MET25).....	206
Figura 56	- O ácido aJulênico (AJA) um potente analgésico e antiinflamatório sintético.....	207

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	- Efeito fisiológico do Δ^9 -THC no sistema cardiovascular.....	36
Gráfico 2	- Relação dose/concentração de THC médio.....	61
Gráfico 3	- Níveis plasmáticos de metabólitos canabinóides.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Classe de compostos encontrados na <i>Cannabis sativa</i>	34
Tabela 2	- Estruturas de agonistas e antagonistas dos receptores canabinóides.....	59
Tabela 3	- Alguns metabolitos canabinóides com atividade biológica	69
Tabela 4	- Nomes dos 30 metabólitos canabinóides estudados.....	129
Tabela 5	- Siglas e definições das propriedades atômicas e moleculares..	145
Tabela 6	- Descritores moleculares que representam os orbitais de fronteira (H, L, H-1 e L+1).....	146
Tabela 7	- Valores de refratividade molar, polarizabilidade e momento dipolar.....	148
Tabela 8	- Valores da área, volume e massa.....	150
Tabela 9	- Valores de ângulos diedros calculados.....	152
Tabela 10	- Matriz de correlação para 17 descritores calculados.....	155
Tabela 11	- Variância do conjunto de dados considerando 6 PCs.....	157
Tabela 12	- Membros de cada cluster e distâncias euclidianas aos respectivos centróides.....	160
Tabela 13	- Variância do conjunto de dados considerando 2 PCs.....	168
Tabela 14	- Valores de “loadings” das 3 variáveis (LUMO, T2 e Log P) para PC1 e PC2 responsáveis pela separação dos compostos canabinóides estudados.....	169
Tabela 15a	- Matriz de dissimilaridade entre o THC e os MEts 1-15 utilizando o cálculo pela distância euclidiana.....	173
Tabela 15b	- Matriz de dissimilaridade entre o THC e os MEts 16-30 utilizando o cálculo pela distância euclidiana.....	174
Tabela 16	- Valores das variáveis E_{LUMO} (eV), Log P e T2 do conjunto de predição [AC(1-11) e IC1-11].....	178

LISTA DE SIGLAS

AM1	Austin Model 1
AF	Análise Fatorial
LDA	Local Density Approximation
ACP	Análise de Componentes Principais
BGCI	Botanic Garden Conservation International
BHE	Barreira Hematoencefálica
CNDO	Complete Neglect of Differential Overlap
CEBRID	Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
CB1	Receptor canabinóide tipo 1
CB2	Receptor canabinóide tipo 2
CBC	Canabicromeno
CBD	Canabidiol
CBE	Canabielsoin
CBG	Canabigerol
CBNG	Canabinodiol
CBN	Canabinol
CBT	Canabitriol
CCD	Cromatografia em camada delgada
CEH	Circulação Enterohepática
CEBRID	Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas
CICAD/OEA	Comissão Interamericana para o Controle de Drogas
CONAMA	Comissão Nacional do Meio Ambiente
CP55-940	Canabinóide sintético 55-940
CP450	Citocromo P450
EM	Esclerose Múltipla
FDA	Food and Drug Administration
GGTP	Gama Glutamil Transpeptidase
GPCRs	Receptor acoplado a proteína G

HCA	Análise Hierárquica de Agrupamentos
HF	Hartree-Fock
HFR	Hartree-Fock-Roothaan
HU-210	Dexabinol
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IA	Inteligência Artificial
INDO	Intermediate Neglect of Differential Overlap
KNN	K-Nearest Neighbor
MINDO	Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap
MDMA	Metilendioximetanfetamina
MNDO	Modified Neglect of Diatomic Overlap
LSD	Dietilamida do ácido lisérgico
NEIP	Núcleo de Estudos Interdisciplinares sobre Psicoativos
NDDO	Neglect of Diatomic Differential Overlap
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
PCA	Principal Component Analysis
PM3	Parametric Method 3
QSARs	Quantitative Structure-Activity Relationships
RBG	Royal Botanic Gardens
RM1	Recife Model 1
RNAs	Redes Neurais Artificiais
RP	Reconhecimento de Padrões
SISNAD	Sistema Nacional de Políticas Públicas Sobre Drogas
SAR	Structure-Activity Relationships
SNC	Sistema Nervoso Central
SECB	Sistema Endocanabinóide
SISNAD	Sistema Nacional de Políticas Públicas Sobre Drogas
SPAs	Substâncias Psicoativas
TFD	Thomas-Fermi-Dirac
OMS	Organização Mundial da Saúde
UNODC	Escritório das Nações Unidas Contra Drogas e Crimes
ZDO	Zero Differential Overlap

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	OBJETIVOS.....	21
2.1	Objetivo geral.....	21
2.2	Objetivos específicos.....	21
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	23
3.1	Introdução.....	23
3.2	Classificação das substâncias psicoativas.....	24
3.2.1	Classificação pela ação no sistema nervoso central (SNC)....	26
3.2.1.1	Depressores da atividade do SNC (psicolépticas).....	26
3.2.1.2	Estimulantes da atividade do SNC (psicoanalépticas).....	26
3.2.1.3	Perturbadores da atividade do SNC (psicodislépticas, psicodélicas, psicoticomiméticas e alucinógenas).....	27
3.3	<i>Cannabis sativa</i>	27
3.3.1	Propriedades botânicas	27
3.3.2	<i>Cannabis indica</i>	30
3.3.3	<i>Cannabis ruderalis</i>	30
3.3.4	Aspectos históricos do uso da <i>Cannabis</i>	30
3.3.5	Efeitos fisiológicos e farmacológicos da <i>Cannabis</i>	32
3.3.6	Compostos canabinóides naturais.....	33
3.3.7	Potencial terapêutico dos canabinóides.....	37
3.4	Os Canabinóides.....	40
3.4.1	Sistema de numeração para os canabinóides estudados.....	40
3.4.2	Isômeros do (Δ^9 -THC).....	42
3.4.3	Canabinóides sintéticos.....	43
3.4.3.1	Cesamet (Nabilone).....	43
3.4.3.2	Marino (Dronabinol).....	43
3.4.3.3	Sativex.....	43
3.4.3.4	Rimonabant [®] (SR141716).....	43
3.4.4	Mecanismo de atuação dos canabinóides.....	45
3.4.5	Receptores canabinóides.....	48
3.4.6	O sistema endocanabinóide.....	55

3.4.7	Agonistas e antagonistas dos receptores CB1 e CB2.....	58
3.4.8	Metabolismo dos canabinóides no organismo.....	61
3.4.8.1	Administração e dosagem.....	61
3.4.8.2	Excreção e biotransformação dos canabinóides.....	62
3.4.8.3	Biossíntese dos canabinóides.....	66
3.5	Metabólitos canabinóides.....	68
3.5.1	Definição de metabólito.....	68
3.5.2	Eliminação dos metabólitos canabinóides.....	68
3.5.3	Alterações químicas nos canabinóides.....	70
3.5.3.1	Descarboxilação.....	70
3.5.3.2	Isomerização e oxidação.	71
3.6	Metabólitos alvos deste estudo.....	73
4	FUNDAMENTOS DOS MÉTODOS UTILIZADOS.....	76
4.1	Estudo da relação estrutura-atividade.....	76
4.1.1	Descritores moleculares calculados.....	78
4.1.1.1	Descritores eletrônicos empíricos.....	78
4.1.1.1.1	Momento dipolar.....	78
4.1.1.1.2	Polarizabilidade	79
4.1.1.1.3	Refratividade molar.....	81
4.1.1.2	Descritores eletrônicos não empíricos.....	83
4.1.1.2.1	Energia eletrônica.....	83
4.1.1.2.2	Energia total.....	84
4.1.1.2.3	Energia dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO.....	84
4.1.1.2.4	Dureza e moleza.....	85
4.1.1.2.5	Eletronegatividade.....	86
4.1.1.2.6	Potencial de ionização.....	87
4.1.1.2.7	Afinidade eletrônica.....	87
4.1.1.2.8	Energia de hidratação.....	87
4.1.1.3	Descritores hidrofóbicos.....	88
4.1.1.3.1	Coeficiente de partição, Log P.....	89
4.1.1.4	Descritores estéreos e geométricos.....	92
4.1.1.4.1	Volume molar.....	93
4.1.1.4.2	Massa molar	93

4.1.1.4.3	Área de superfície.....	93
4.1.1.4.4	Ângulo diedral.....	94
4.2	Métodos de química teórica.....	95
4.2.1	Métodos de mecânica molecular.....	95
4.2.2	Métodos de mecânica quântica.....	98
4.2.2.1	Métodos semi-empíricos e <i>ab initio</i>	100
4.2.2.1.1	Método <i>Austin Model 1</i> (AM1).....	104
4.2.2.2	Teoria da funcional densidade (DFT).....	104
4.3	Métodos estatísticos de análises.....	108
4.3.1	Análise de componentes principais (PCA).....	109
4.3.2	Análise hierárquica de agrupamentos (HCA).....	112
4.3.3	Análise de agrupamentos pela média (K-MEANS).....	114
4.3.4	Métodos dos vizinhos mais próximos (KNN).....	116
4.3.5	Redes neurais artificiais (RNAs).....	118
4.3.5.1	Uma abordagem sobre redes neurais.....	118
4.3.5.2	Breve histórico sobre redes neurais artificiais.....	119
4.3.5.3	Princípios do funcionamento das redes neurais.....	122
4.3.5.4	Processo de aprendizado de uma rede neural.....	124
4.3.5.4.1	Aprendizado não supervisionado.....	124
5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	127
5.1	Introdução.....	127
5.2	Nomenclatura dos compostos estudados.....	129
5.3	Sistema de numeração THC para os canabinóides estudados.....	130
5.4	Estudos da relação estrutura <i>versus</i> atividade biológica em canabinóides.....	130
5.5	Modelagem Molecular dos canabinóides.....	134
5.5.1	Otimização das geometrias dos compostos.....	134
5.5.2	Cálculos das propriedades moleculares.....	136
5.6	Métodos quimiométricos de análises.....	137
5.6.1	Preprocessamento.....	138
5.6.2	Redução do número de variáveis.....	139
5.6.3	Métodos de reconhecimento de padrões e classificação.....	142

5.6.4	Métodos de inteligência artificial.....	143
5.6.4.1	Redes neurais artificiais (RNAs).....	143
6.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	145
6.1	Apresentação dos resultados.....	145
6.1.1	Siglas e definições dos descritores moleculares.....	145
6.1.2	Dados dos descritores e estudos das propriedades dos descritores.....	146
6.2	Resultados das análises quimiométricas.....	153
6.2.1	Análise de PCA.....	155
6.2.2	Análise K-means.....	158
6.2.3	Análise de PCA para o novo conjunto de 6 descritores.....	162
6.2.4	Análise de HCA.....	170
6.2.5	Análise de KNN.....	172
6.2.6	Análise de redes neurais artificiais – RNA.....	175
6.3	Validação dos resultados obtidos para os 30 metabólitos canabinóides com outros 22 canabinóides psicoativos e psicoativos.....	178
6.3.1	Resultados e discussão das análises PCA e HCA para o conjunto de validação formado por 53 compostos.....	181
6.3.1.1	Análise de PCA para o conjunto de 53 compostos canabinóides.....	181
6.3.1.2	Análise de HCA para o conjunto de 53 compostos canabinóides.....	185
6.4.	Estudo das geometrias dos compostos estudados e relações entre psicoatividade e psicoinatividade.....	186
6.4.1	Considerações finais obtidas acerca dos resultados das geometrias.....	197
7.	CONCLUSÕES.....	209
8.	PROPOSTAS DE TRABALHOS FUTUROS.....	213
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	214

1. INTRODUÇÃO

O que motivou o presente estudo foi a condição inédita de realizar cálculos teóricos com alguns metabólitos canabinóides. Nos últimos 14 anos, pesquisadores brasileiros (SILVA et al., 2008; HONÓRIO, 2006; 2004; ARROIO, 2004; Da SILVA; TRSIC, 1995) publicam trabalhos a respeito da relação estrutura química *versus* atividade biológica de compostos canabinóides e ainda formularam modelos convincentes para descrever esta correlação. Estes trabalhos, certamente, contribuirão para o planejamento racional de canabinóides potencialmente ativos e de aplicação terapêutica.

É evidente a relevância da classe de compostos canabinóides em virtude do elenco considerável de propriedades terapêuticas descritas na pesquisa bibliográfica atualizada e mostradas no capítulo Considerações Gerais.

Os canabinóides são constituintes químicos da *Cannabis sativa* (planta conhecida popularmente como maconha), tendo como canabinóide mais psicoativo o Tetrahydrocannabinol, conhecido como THC. As evidências terapêuticas do uso da *Cannabis* não só dizem respeito às propriedades farmacológicas do THC, mas de outros canabinóides clássicos e não clássicos e seus metabólitos. Russo (2003) em seu trabalho intitulado “*Cannabis is more than simply tetrahydrocannabinol*” deixa clara a importância destes compostos como arsenal terapêutico.

Os metabólitos canabinóides são formados a partir de reações de biotransformações no organismo após a ingestão e inalação da *Cannabis sativa*. Segundo Rang (2004) estes bioprodutos podem ser farmacologicamente inativos, menos ativos ou, às vezes, mais ativos que a molécula original. Cálculos teóricos para metabólitos canabinóides são poucos citados na literatura, sendo assim, torna-se promissor estudos de exploração destas espécies de canabinóides.

O acervo atualizado e disponível de literatura relacionada aos metabólitos canabinóides serviu de base para o estudo e entendimento acerca do comportamento destes compostos no organismo e das propriedades calculadas para 30 metabólitos canabinóides.

As relações entre fatores (eletrônicos, estéreo e geométricos, lipofílicos e topológicos, dentre outros) e estudos realizados de SAR ("Structure-Activity-Relationship") e QSAR ("Quantitative Structure-Activity Relationship") quando esclarecidas para diferenciar a psicoatividade dos metabólitos canabinóides, permitirão avaliar com mais clareza o comportamento destes no organismo, o que incluem mudanças moleculares e estruturais, trazendo, assim, validação às pesquisas de com canabinóides.

Para organização, validação e processamento dos dados obtidos dos descritores calculados foram empregados métodos quimiométricos na intenção de descobrir quais os fatores que mais contribuiriam para a distinção entre a psicoatividade e psicoinatividade nos canabinóides. Ou seja, as análises quimiométricas foram realizadas para esclarecer as relações existentes entre as variáveis e os compostos e que se identificassem os agrupamentos entre as variáveis, e ainda quais conjuntos de compostos permitiriam uma correlação QSAR.

As técnicas utilizadas foram aquelas que fazem uso de análise multivariada e exploratória de dados: Análise Fatorial (AF), Análise de Componentes Principais (PCA), Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA) e técnicas de inteligência artificial por redes neurais (RNAs). Os resultados da análise exploratória e classificatória permitiram estabelecer o conjunto de variáveis relevantes para descrever a psicoatividade.

A proposta principal deste trabalho está fundamentada na avaliação da atividade psicofarmacológica para uma série de 30 metabólitos canabinóides, e na proposição de um modelo teórico consistente e estatisticamente aceitável com base nos cálculos de química quântica e técnicas quimiométricas para esclarecer as variáveis relevantes na diferenciação da psicoatividade e psicoinatividade para os metabólitos canabinóides.

Mesmo tratando-se de uma tese na área de química, fez-se necessário adentrar numa perspectiva que englobe não só os aspectos físico-químicos, biológicos e farmacológicos, mas também o psicológico, histórico, sociocultural e antropológico desta temática.

Portanto, o presente estudo tem sua importância porque vêm somar esforços as pesquisas com canabinóides e pelo caráter inédito desta proposta.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem por objetivo geral contribuir para o esclarecimento dos parâmetros moleculares e estruturais que podem influenciar a psicoatividade de compostos canabinóides clássicos e não clássicos e seus metabólitos, assim como estabelecer as correlações entre as propriedades e os parâmetros estruturais e moleculares que permitam descrever a relação estrutura química *versus* atividade biológica das moléculas em estudo.

2.2 Objetivos específicos

1. Construir as moléculas em estudo e realizar cálculos de mecânica molecular, sem-empíricos e DFT para obtenção das geometrias otimizadas;
2. Calcular e avaliar todos os parâmetros moleculares (eletrônico, estereo, lipofílico e topológico dentre outras propriedades correlacionadas), obtidos por métodos de química teórica, e selecionar, utilizando técnicas estatísticas, os mais relevantes para discriminar compostos psicoativos e psicoativos;
3. Classificar em relação a psicoatividade e psicoatividade os compostos em estudo tomando como parâmetros os canabinóides clássicos e não clássicos de reconhecida psicoatividade;
4. Propor um modelo consistente, satisfatório e estatisticamente aceitável de correlação que possa ser capaz de diferenciar os compostos em relação à psicoatividade e psicoatividade;
5. Verificar se um conjunto de predição (formado por 22 canabinóides com psicoatividade descrita) pode ser correlacionado ao conjunto de treinamento (30 metabólitos estudados) e se o modelo sugerido pode ser aplicado para classificar todos os compostos em estudo, dando assim convalidação às equações propostas;

6. Estudar de forma particularizada a geometria e algumas regiões de interesse das moléculas canabinóides que sejam importantes para descrever a psicoatividade;
7. Fornecer uma explicação racional para a distinção entre a atividade psicoativa e psicoinativa dos metabólitos canabinóides em estudo.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

3.1 Introdução

O consumo de substâncias que possuem a capacidade de alterar estados da consciência (autoconsciência, sentiência, sapiência) e modificar o comportamento do indivíduo, alterando a capacidade de perceber a relação entre si e um ambiente parece ter um domínio universal na humanidade. Nos dias atuais convivemos com um crescimento significativo no consumo de substâncias psicoativas (SPAs) para estes fins (AZEVEDO, 2000).

Historicamente, as plantas psicoativas têm sido utilizadas há 5 mil anos pela humanidade, em diferentes culturas e épocas, e para as mais diversas finalidades, segundo relata a antropóloga Beatriz Labate, uma das pesquisadoras fundadoras do Núcleo de Estudos Interdisciplinares sobre Psicoativos (NEIP). O uso de psicoativos tem sido associado a sacramentos; à transmissão de valores culturais; à produção artística; ao autoconhecimento; a expansão da consciência e como afrodisíacos, dentre outros (LABATE & GOULART, 2005).

A sociedade como um todo tem se questionado sobre as motivações do uso de substâncias psicoativas. Parte das justificativas apóia-se no contexto sócio político que reforça os valores baseados no consumismo e prazer imediatista (ARAUJO, 2004).

O Escritório das Nações Unidas Contra Drogas e Crime (UNODC) e a Comissão Interamericana para o Controle de Drogas (CICAD/OEA) publicaram em 2008 um estudo sobre os padrões de consumo de *Cannabis* (droga popularmente conhecida como maconha). Estes estudos esclarecem que a média de consumo em seis países da América do Sul (Argentina, Bolívia, Chile, Equador, Peru e Uruguai) é de 4,8%, superior a média mundial de 3,9%.

A *Cannabis* é hoje a droga ilícita mais comumente produzida, traficada e consumida em todo o mundo (UNODC, 2008). Em média, entre 2005-2006, 3,8% da população mundial na faixa etária de 15 a 65 anos usavam *Cannabis* na forma de erva (maconha) ou resina (haxixe). O consumo de outras drogas (anfetaminas, Ecstasy, cocaína, ópio e heroína) manteve-se estável (UNODC, 2006).

Apesar de ser utilizada há séculos para fins recreativos e medicinais e ser amplamente consumida em todo o mundo, nenhuma droga de abuso provoca mais controvérsia do que a *Cannabis*.

Um levantamento do Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) atesta que em 2001, 6,9% da população brasileira havia tido algum contato com a *Cannabis*. Em 2005, essa fatia subiu para 8,8%. Apesar do aumento, o percentual é bem inferior ao consumo em países desenvolvidos. Nos Estados Unidos, por exemplo, 40,2% da população já tiveram contato com a *Cannabis*, o Reino Unido (30,8%), França e Itália (26,2%), (22,4%), respectivamente (CARLINI et al., 2005, 2007).

No Brasil, as primeiras intervenções do governo para controlar o uso de drogas ilícitas só ocorreram no século XX, a partir da década de 1970, pela lei nº 6.368/76 que regia as normas contra o tráfico de drogas. Vinte e seis anos depois, a lei 10.409, de 11 de janeiro de 2002, dispunha sobre a prevenção, o tratamento, a fiscalização, o controle e a repressão à produção, ao uso e ao tráfico ilícitos de produtos, substâncias ou drogas que causem dependência física ou psíquica. Em 2006, a lei nº 11.343, de 23 de agosto de 2006, instituiu o Sistema Nacional de Políticas Públicas Sobre Drogas (SISNAD). Atualmente, a legislação brasileira sobre o tema passou também a receber contribuições da medicina, dando subsídios tecnocientíficos para a legitimação do controle do uso de drogas (FIORE, 2005).

3.2 Classificação das substâncias psicoativas

Há muita controvérsia ao classificar as substâncias psicoativas (CARNEIRO, 2002). As classificações mais atuais devem muito ao trabalho pioneiro do farmacólogo alemão Louis Lewin dividindo as substâncias psicoativas em cinco classes: sedativos, euforizantes, inebriantes, excitantes e fantásticos (LEWIN, 1932).

Esta taxonomia evoluiu posteriormente para o modelo de três categorias: os psicolépticos, psicoanalépticos e os psicodislépticos, englobando, respectivamente, os depressores, os estimulantes e os alteradores de consciência (KRIPPNER, 1973; CARNEIRO, 2002). A classificação mais consensualmente aceita para tal classe de substâncias psicoativas foi proposta por Jean Delay que as classifica como: Dislépticas (modificadoras), Lépticas (estimulantes) e Analépticas (depressores) (DELAY, 1979).

A classificação mais utilizada é que os psicoativos são alucinógenos, ou seja, substâncias que provocam alucinações artificiais e/ou estados eufóricos.

Para muitos autores o termo alucinógeno também seria um exagero porque a alucinação e o delírio não causam aumento da atividade ou capacidade mental, e estes também são efeitos característicos das psicoses (LABATE & GOULART, 2005). Outros pesquisadores já criticam este termo por sugerir uma falsa consciência da realidade, meramente ilusória.

De acordo com o CEBRID, alucinação significa, em linguagem médica, percepção sem objetivo; isto é, a pessoa que está em processo de alucinação percebe coisas sem que elas existam. “Isto porque a alucinação e o delírio nada têm de aumento da capacidade mental: ao contrário, são aberrações, perturbações do perfeito funcionamento do cérebro, característicos das doenças chamadas psicoses” (DYCK, 2005).

Outros autores para nomear as substâncias psicoativas utilizam o termo “psicodélico” do grego (*psico* = alma, mente + *delos* = manifestação, evidência) criado pelo psiquiatra Humphry Osmond, em 1953, para designar “algo com a capacidade de ampliar ou manifestar a mente” (OSMOND, 1957).

Já os autores Carlini et. al. (2001), Labate e Goulart (2005) preferem classificar como psicoticomiméticas - por "imitarem" ou "mimetizarem os estados de alucinações. Para Carlini (2001), drogas psicoticomiméticas são “drogas perturbadoras” que produzem mudanças qualitativas do funcionamento do Sistema Nervoso Central (SNC). Assim, alterações mentais que não fazem parte da normalidade como, por exemplo, delírios, ilusões e alucinações, são produzidos por estas drogas.

Não há um consenso entre os diversos estudiosos da área. Existem aqueles que classificam os psicoativos como enteógeno - um neologismo derivado do inglês “entheogen” que vem do grego “entheos” + “genesthe”, que significa “Deus interior” + “que gera”. O significado literal é algo como: “Que gera Deus interior”. A palavra “entheos” também é a raiz da palavra “entusiasmo”, cujo sentido original dizia respeito à “inspiração divina” (HALL, 2007). Há os que dizem que enteógeno é um mero sinônimo de alucinógeno ou psicodélico. Há autores que consideram que tal fato não se verifica, já que nem todas as substâncias usadas num contexto sagrado provocam alucinações.

Há uma distinção que se apóia em dois contextos: (1) dentro de uma realidade religiosa, sagrada e tradicional a experiência onde estas substâncias são consideradas enteogênicas; (2) para fins recreativo, utilizado por cientistas de gerações mais recentes, onde elas são consideradas psicodélicas.

Por outro lado, a exata denotação do termo alucinógeno e psicodélico também é ambígua. A farmacologia ainda não chegou a um acordo sobre o termo para descrever as suas ações farmacológicas. Assim, o termo alucinógeno continua sendo a designação predominante entre os cientistas mais tradicionais, apesar da maioria das substâncias não provocar alucinações no sentido clínico mais extenso (CARLINI, 2002). O termo psicodélico continua muito utilizado por cientistas de gerações mais recentes, em geral, referindo-se apenas a substâncias cujos efeitos são semelhantes aos do ácido lisérgico dietilamida (LSD) ou da mescalina sintetizado por Albert Hoffman (HOFMANN, 1981).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2004) “substâncias psicoativas” são aquelas que ao entrarem em contato com o organismo, sob diversas vias de administração, atuam no sistema nervoso central produzindo alterações de comportamento, humor e cognição, possuindo grande propriedade reforçadora, sendo, portanto, passíveis de auto-administração (OMS, 2001).

3.2.1 Classificação pela ação no Sistema Nervoso Central (SNC)

3.2.1.1 Depressores da atividade do SNC (psicolépticos)

São as substâncias que tendem a produzir diminuição da atividade motora, da reatividade à dor e da ansiedade, sendo comum um efeito euforizante inicial (diminuição das inibições, da crítica) e um aumento da sonolência, posteriormente.

São exemplos desta classe: álcool, ansiolíticos benzodiazepínicos, hipnóticos barbitúricos, narcóticos (analgésicos opióides) e solventes inalantes.

3.2.1.2 Estimulantes da atividade do SNC (psicoanalépticos)

São substâncias que levam a um aumento do estado clínico de alerta, insônia e aceleração dos processos psíquicos.

São exemplos desta classe: cocaína, anfetaminas, nicotina e cafeína.

3.2.1.3 Perturbadores da atividade do SNC (psicodislépticos, psicodélicas, psicoticomiméticas e alucinógenas)

Substâncias que provocam o surgimento de diversos fenômenos psíquicos anormais (dentre os quais alucinações e delírios), sem que haja inibição ou estimulação global do SNC.

São exemplos desta classe: *Cannabis* e derivados, LSD25, ecstasy, droga conhecida como metilenodioximetanfetamina (MDMA) e anticolinérgicos.

3.3 *Cannabis sativa*

3.3.1 Propriedades botânicas

A *Cannabis* é uma herbácea¹ de grande tamanho tendo como espécie mais conhecida a *Cannabis sativa* L. (figura 1) classificada por Linnaeus, em 1753 (LORENZI, 2001). Segundo o CONAMA (Comissão Nacional do Meio Ambiente), a *Cannabis* pode ser chamada de uma espécie herbácea/arbustiva. De acordo com a base de dados do Botanic Garden Conservation International (BGCI), a *Cannabis sativa* pertence à família das *Cannabaceae* (KARL, 2003). *Cannabis* e *Humulus* são os dois únicos gêneros desta família pertencente à classe das Dicotiledoneas, segundo o Royal Botanic Gardens (RBG, 2008).

¹ **Herbáceas** - São plantas de caule maleável, flexível e frágil, sem a presença de *lignina*. Os arbustos são definidos como material lenhoso, ramificado, lignificado em toda a sua extensão (ORMOND, 2006). Uma classificação mais completa sugere que arbustos podem ter estrutura lenhosa, semi-lenhosa ou herbácea (LORENZI, 2001). Considerando o disposto no §1º, do artigo 1º, da Resolução CONAMA Nº 006, de 04 de maio de 1994 que determinam que a fisionomia **herbácea/arbustiva** é uma cobertura vegetal aberta ou fechada, com a presença de espécies predominantemente heliófilas, utilizaremos neste trabalho a denominação de planta herbácea/arbustiva para a *Cannabis sativa*.

Esta classificação é atribuída nos trabalhos dos autores Jiang (2006), Hillig (2004, 2005), Russo e Mcpartland (2003) e Sytsma et. al. (2002), dentre vários outros, apesar de ser classificada como *Moraceae* pelos autores Schultes et al. (1974), Lersten e Curtis (1991), Arroio (2004), Honório (2005), dentre outros. Neste trabalho consideraremos a classificação botânica da planta como pertencente a família *Cannabaceae*.



Figura 1 – *Cannabis sativa*

Fonte: <http://botany.cs.tamu.edu/FLORA/schoepke/can-sa-2.jpg>

A *Cannabis sativa* cresce em todas as zonas temperadas e quentes, exceto as florestas tropicais úmidas. O plantio desta espécie é anual e seu ciclo de vida dura alguns meses. Cresce em torno de 1,5 m de altura possuindo folhagem ramificada. É recoberta com pelos pequenos de onde é excretada de forma mais abundante a resina (Haxixe), cujo princípio ativo é encontrado na concentração média de 8%. A planta têm um caule fino não (RUSSO, 2003). Fatores genéticos e ambientais tais como variações do solo, clima, estação do ano, época de colheita, tempo de cultivo (maturação da planta) e tratamento da amostra (secagem, estocagem, extração e condições de análise), podem influenciar o teor e o potencial psicoativo da planta, (NAHAS, 1984).

Por ser uma planta dióica é composta de espécimes masculinos e femininos (RUSSO, 2003). Há relatos que apenas a planta fêmea possui o princípio ativo, porém estudos recentes consideram que as plantas (macho e fêmea), produzem, aproximadamente, as mesmas quantidades de canabinóides e mesmo grau de atividade (NAHAS, 1984). Além da espécie *sativa*, duas outras espécies são conhecidas: a *Cannabis indica* e *Cannabis ruderalis*, como ilustra a figura 2.



Figura 2 – Tipos de folhagem de espécies do gênero *Cannabis*.

Fonte: http://www.weedfarmer.com/growing_guide/cannabis_indica_sativa.php

Alguns autores propõem outras classificações mais abrangentes: Uma dessas definem 4 espécies distintas: *sativa*, *indica*, *ruderalis* e *afghanica* de acordo com (MC PARTLAND et. al., 2002), e outra classificação indicam 7 espécies distintas: *ruderalis*, *sativa ssp. sativa*, *sativa ssp. spontanea*, *indica ssp. kafiristanica*, *indica ssp. indica*, *indica ssp. afghanica* e *indica ssp. Chinensis* (HILLIG, 2005). A seguir, trataremos das duas espécies mais comuns: *indica* e *ruderalis*.

3.3.2 *Cannabis indica*

Desenvolvem gomos grandes e densos de onde se produz principalmente o *haxixe* (*resina* seca e compactada, extraída das flores e das inflorescências femininas, contendo de 10-20% de princípios ativos). Esta resina é normalmente chamada apenas de *haxixe* nos países ocidentais e *charas* na Índia (MCPARTLAND, 2002).

3.3.3 *Cannabis ruderalis*

É uma variedade de maconha que cresce selvagem em algumas partes da Europa Oriental e da Rússia. É caracterizada pelo seu florescimento precoce, menor tamanho em relação às outras *Cannabis*, de onde se retira a fibra, chamada de cânhamo (SCHULTS, 1974). Não possui ingredientes psicoativos e tem baixos teores de canabinóides (compostos presentes na planta *Cannabis*) (HILLIG, 2005; 2004).

Algumas outras variedades de *Cannabis*, proveniente do cruzamento entre espécies *sativa* e *indica* são conhecidas como *Skunk* e apresentam teores que chegam entre 30-35 % de THC.

3.3.4 Aspectos históricos do uso da *Cannabis*

A planta *Cannabis* é consumida pela humanidade há 10.000 anos, com a descoberta da agricultura. É uma das primeiras plantas a ser cultivada pelo homem. A planta era utilizada para obtenção de fibras, óleo, sementes e consumidas como alimento e por suas propriedades alucinógenas (SARTON, 1952).

Os primeiros cultivos botânicos da *Cannabis* são atribuídos a Ásia Central, e seu uso foram espalhados pelo mundo inteiro pelo homem desde milhares de anos, como uma fonte de alimento, energia, fibra e preparações medicinais ou narcóticas (JIANG; ZHAO, 2006; RUSSO, 2003; LI, 1975).

Os primeiros registros escritos do uso de *Cannabis* datam 2.737 a.C., pelo imperador chinês Shen Nung para tratamento de gota, de malária, de dores reumáticas e de doenças femininas. A primeira farmacopéia escrita - O Pen Tsao Ching - em 100 d.C., baseada nas compilações de plantas com propriedades farmacológicas do imperador Shen Nung, mostrava que os chineses já conheciam há alguns milênios as propriedades alucinógenas da *Cannabis*, (Li, 1974). Nesses períodos a utilização da planta estava ligada ao misticismo e ao curandeirismo.

Quando os europeus chegaram à China, no século XIII, tal hábito havia declinado e caído em desuso, permanecendo apenas o cultivo da planta para a obtenção de fibras têxteis.

O primeiro escritor a mencionar o seu uso para fabricação de cordas e tecidos a partir do cânhamo é Heródoto deixando inscrições narrativas da utilização da *Cannabis* pelos povos daquela época. Para Schultes (1974), a evidência da utilização como fibra é de 6000 anos, e vem da existência de um tecido de cânhamo encontrado num dos mais antigos sítios arqueológicos habitados por humanos na Ásia naquela época.

No século XII, os árabes lutavam ferozmente e matavam cruelmente sob o efeito do haxixe. Eram os “haschicins”, termo que deu origem à palavra assassino. Os gregos e romanos não tiveram por hábito utilizar a maconha com propósitos alucinógenos, apesar de conhecerem tais propriedades. A medicina ocidental, iniciada pelos filósofos Hipócrates, Galeno e Dioscórides, utilizava a *Cannabis* como medicamento para alguns tumores e observaram que o uso continuado era capaz de causar esterilidade masculina e inibir a produção de leite na mulher, (ALMEIDA, 2008; 2002).

No início da Idade Média a planta foi praticamente esquecida. Já o Império Islâmico conviveu com a planta e a espalhou pelas regiões conquistadas. Somente a partir das Cruzadas (séculos XI - XIII) e das grandes navegações européias que a maconha voltou a ser conhecida no continente, trazida da China, Índia e Oriente Médio onde era mais usada como parte de rituais religiosos.

A erva foi trazida para a América do Sul pelos colonizadores e as primeiras plantações foram realizadas no Chile, pelos espanhóis. No Brasil, a planta chegou durante o século XVI, trazida pelos escravos africanos que a utilizavam em rituais de candomblé, e também foi incorporada aos rituais de algumas tribos indígenas.

No final do século XIX, a *Cannabis* passou a ser um medicamento utilizado por muitos laboratórios farmacêuticos americanos para produzir analgésicos, evitar convulsões e dilatar os brônquios (RUSSO, 2003). Naquela época a Europa estava voltada aos seus movimentos culturais, e o consumo de haxixe foi marcante. O interesse da medicina pela erva reduziu-se no século seguinte dando lugar a outras drogas como a morfina e barbitúricos, que apresentavam melhores resultados.

No início do século XX o uso medicinal da *Cannabis* se deparou com pressões sócio-políticas importantes que levaram ao declínio do seu uso e, nos Estados Unidos da América (EUA), as pesquisas foram cessadas quase que completamente no início dos anos 90. Logo depois, o congresso americano instituiu o Decreto de Proibição da Maconha (Marijuana Tax Act) proibindo o cultivo, comercialização e uso dos derivados da planta (CHALSMA, BOYURN, 1994). Apesar da ilegalidade, na Europa, especificamente na Inglaterra, continuou sendo utilizada em novas pesquisas que comprovassem seus benefícios terapêuticos (BAKER et al., 2003).

3.3.5 Efeitos fisiológicos e farmacológicos da *Cannabis*

A *Cannabis sativa* L. era considerada a principal droga da farmacopéia durante séculos e utilizada em rituais religiosos pelos povos Assírios (HENSEN, 2005). Entretanto, a utilização desta planta para finalidades medicinais foi limitada por causa dos efeitos psicoativos de alguns canabinóides (KALANT, 2004; GROTENHERMEN, 2003; TANDA, 2003).

A aplicação da *Cannabis* para fins terapêuticos só evoluiu após a descoberta, caracterização e elucidação da estrutura do princípio ativo responsável pelos efeitos nocivos da planta, o Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), por Gaoni e Mechoulan (1964). O isômero Δ^8 - THC, presente em pequena porcentagem na planta, produz efeito farmacológico similar ao Δ^9 -THC, porém, numa potência menor.

Esta descoberta abriu as portas para a investigação científica a respeito das propriedades biológicas e médicas dos canabinóides e serviu para o desenvolvimento de diversos derivados com capacidade terapêutica e também contribuiu para esclarecer os efeitos psicoativos da planta. Somente em 1991 a *Cannabis* foi reconhecida pela OMS como medicamento (GODOY - MATOS, 2005).

Nos últimos anos, o interesse acerca do uso terapêutico dos canabinóides cresceu e várias aplicações farmacêuticas têm sido relatadas, tais como distúrbios de motricidade e dores neuropáticas em pessoas portadoras de esclerose múltipla² (BARNES, 2006; AMTMANN et al., 2004); antiemético no tratamento dos espasmos musculares, náusea e vômito causado por quimioterapias (WILLIAMSON; EVANS, 2000; TRAMER et al., 2001); reduz a perda de apetite em pacientes terminais de AIDS/HIV (RUSSO, 2003). Também no tratamento de doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer; o mal de Parkinson's e a perturbação cerebral relacionada com HIV ou AIDS (DESAI; GROSSBERG, 2005); na diminuição da pressão intraocular em portadores de glaucoma e doenças cardiovasculares (WILLIAMSON; EVANS, 2000) e diminuição da propagação de células cancerígenas pelo vírus do herpes *simplex* (CABRAL, 1993). Outras propriedades terapêuticas foram também citadas na literatura, tais como: anticancer (GUZMAN, 2003), antitumoral (ZHU et al. 2000), anestésico (SYMONS, 2002), analgésico e antiinflamatório (DE MEDICIS; TETRAUT, 2007; BURNS, 2006; PERTWEE, 2006; 2004; ZUARDI, 2006; BURSTEINS et al., 1998; FORMUKONG, et al. 1988; MECHOULAM, 2005,1970) e antiepilético (CARLINI, 1981).

3.3.6 Compostos canabinóides naturais

São mais de quatrocentos produtos químicos ativos, destes, 61 são canabinóides, contudo, nem todos são psicoativos. Um total de 421 compostos químicos de diversas classes foram já encontrado na planta *Cannabis sativa* e estão mostrados na tabela 1.

² A **esclerose múltipla** é um distúrbio no qual ocorre desmielinização de áreas isoladas dos nervos dos olhos, do cérebro e da medula espinhal. O termo esclerose múltipla é decorrente das múltiplas áreas de cicatrização (esclerose) que representam muitos focos de desmielinização no sistema nervoso. É uma doença progressiva que se caracteriza por espasmos musculares, dores, tremores, problemas de equilíbrio, cansaço e incontinência.

Tabela 1 – Classes e quantidades de compostos encontrados na *Cannabis sativa*

Classes	Quantidades	Classes	Quantidades
<u>Canabinóides</u>	61	<u>Cetonas simples</u>	13
Canabigerol (CBG)	6	<u>Ácidos simples</u>	20
Canabicromeno (CBC)	4	<u>Ácidos Graxos</u>	12
Canabidiól (CBD)	7	<u>Ésteres e Lactonas simples</u>	13
Δ^9 – THC	9	<u>Esteróides</u>	11
Δ^8 – THC	2	<u>Açúcares e análogos</u>	34
Canabicitol (CBL)	3		
Canabielsoin (CBE)	3	Monossacarídeos	13
Canabinol (CBN)	6	Dissacarídeos	2
Canabinodiol (CBND)	2	Polissacarídeos	5
Canabitriol (CBT)	6	Ciclitóis	12
Outros canabinóides	13	Amino- açúcares	2
<u>Compostos Nitrogenados</u>	20	<u>Terpenos</u>	103
Bases quaternárias	5	Monoterpenos	58
Amidas	1	Sesquiterpenos	38
Aminas	12	Diterpenos	1
Alcalóides espermidinas	2	Triterpenos	2
		Misturas de terpenóides	4
<u>Aminoácidos</u>	18		
<u>Proteínas, Glicoproteínas e enzimas</u>	9	<u>Fenóis não-cannabinóides</u>	16
<u>Hidrocarbonetos</u>	50	<u>Glicosídeos Flavonóides</u>	19
<u>Álcoois simples</u>	7	<u>Vitaminas</u>	1
<u>Aldeídos Simples</u>	12	<u>Pigmentos</u>	2
		<u>Total de compostos</u>	421

Fonte: adaptada de Honório et al. (2006)

Na figura 3 são mostrados 09 canabinóides encontrados na natureza, sendo alguns deles produtos de degradação e/ou precursores de outros canabinóides.

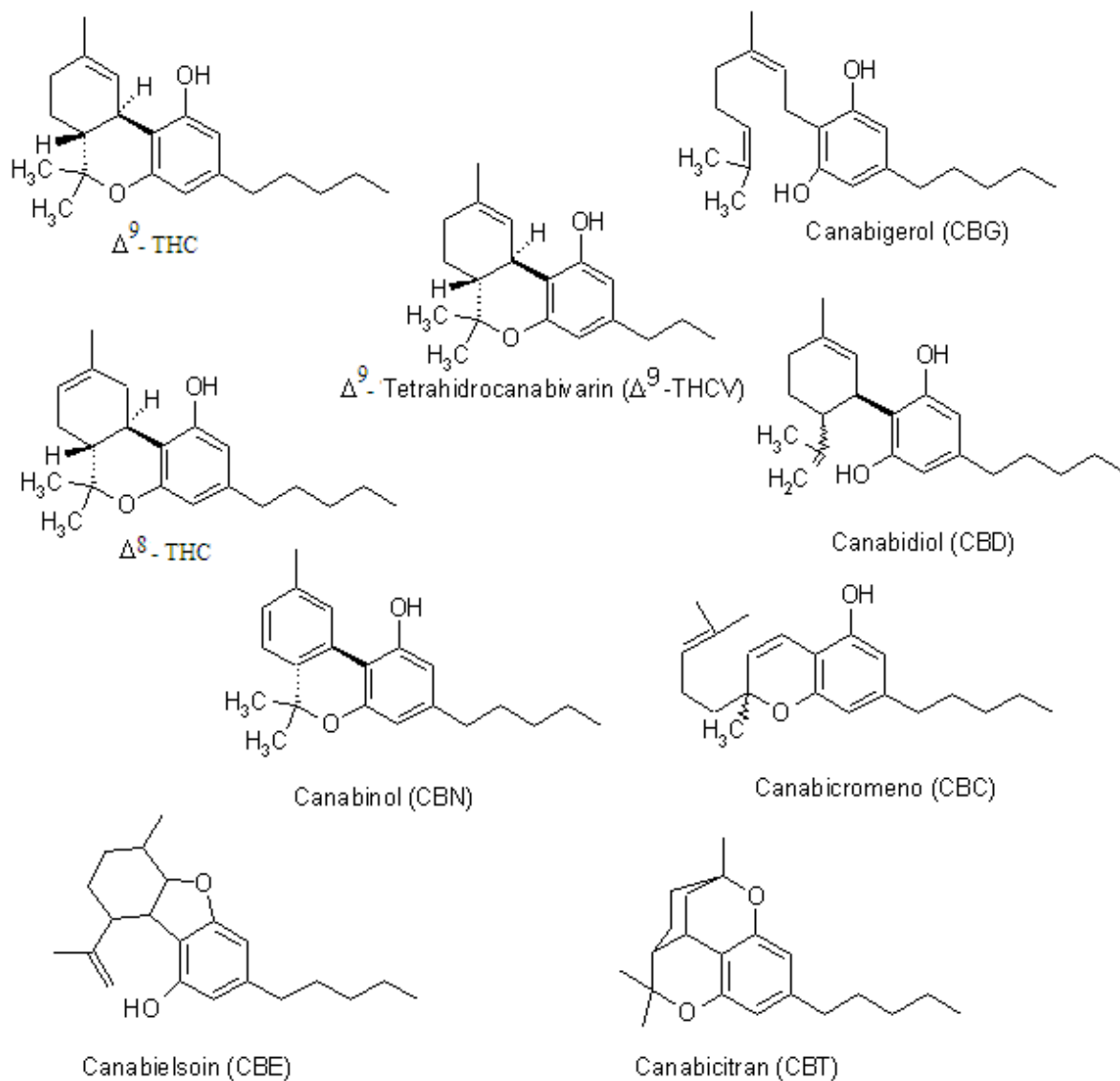


Figura 3 – Estrutura de 09 canabinóides naturais: Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), Δ^8 -tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC) Canabidiol (CBD), Canabinol (CBN), Canabigerol (CBG), Canabicromeno (CBC), Δ^9 -tetrahidrocanabivarin (Δ^9 -THCV), Canabielsoin (CBE) e Canabicitran (CBT). Moléculas desenhadas no editor de estruturas e equações químicas Isis Drawn 2.4.

O primeiro químico a ter sucesso na obtenção de um extrato ativo da planta *Cannabis* foi Wood (1896) obtendo um óleo vermelho que apresentava atividade biológica. Vários canabinóides foram obtidos a partir desta época até a preparação de novos compostos por Adams e colaboradores (1949). Uma das rotas levou a um composto com intensa atividade biológica, sendo o mais ativo, dentre os vários derivados preparados – era o Tetrahidrocannabinol, Δ^9 -THC, mais conhecido como THC (figura 3). Poucos anos depois, Adams, Harfenist e Loewe prepararam novos análogos Tetrahidrocannabinol, contudo não conseguiram identificar o THC, (ADAMS et al., 1949).

Foi somente em 1964 que um salto foi dado no sentido de obter o THC na forma pura, extraído a partir da *Cannabis*. Os químicos Gaoni e Mechoulam obtiveram o extrato hexânico de *Cannabis* e utilizando o método de cromatografia em camada delgada conseguiram separar e posteriormente identificaram vários canabinóides descritos a seguir: Δ^9 -THC (THC); canabicitolol (CBL); canabidiol (CBD); canabinol (CBN); canabicromeno (CBC); canabigerol (CBG); substâncias não canabinóides; graxas de produtos apolares; compostos polares e polímeros (GAONI; MECHOULAM, 1964). Todos os compostos estão mostrados na tabela 1 e figura 3.

A descoberta do Δ^9 -THC marca o início de avanços importantes para os estudos que até então vinham sendo desenvolvidos nesta área. Diante disto, mais pesquisas para isolar, caracterizar e sintetizar outros canabinóides despertaram o interesse dos diversos pesquisadores e algumas das principais rotas sintéticas foram sugeridas e o metabolismo dos canabinóides, bem como as rotas biossintéticas, que até então eram desconhecidas, foram esclarecidas. Os aspectos relevantes destes trabalhos foram descritos por autores em artigos de revisão nos últimos anos (PERTWEE, 2006; MECHOULAM; HANUS, 2001).

Dos canabinóides encontrados na planta, o CBN e o CBD, figura 3, não apresentaram psicoatividade (ZUARDI, 1991), sendo que o CBN é um produto da degradação da *Cannabis* e não é encontrado na planta *in natura* (DRUMMER; ODELL, 2001). O CBD tem também propriedades anticonvulsante como o Δ^9 -THC, também sendo eficaz em reduzir danos neurológicos pós-trauma (ZUARDI, 2006).

O Canabidiol (CBD) está presente na maior parte dos preparativos de *Cannabis* e estes são conhecidos pelos seguintes nomes: a) Haxixe, Hashish ou Hasheesh, é uma resina com aspecto de uma pasta semi-sólida; b) “Fumo da Angola”; c) “Hemp”; d) “Ganja”: são partes superiores das plantas femininas que são

secadas antes de serem consumidas; e) “Dagga”; f) “Sinsemilla”; g) “Bhang” ou “Banguê”: são as partes das plantas, principalmente as florescências das plantas femininas não fecundadas, que contém as menores concentrações de THC (1 a 2%); h) “Kanaba”; i) “Chasra” ou “Chasra”: são as resinas extraídas das flores das plantas; j) “Hash Oil”: é o óleo obtido das florescências, que contém a maior concentração de THC; k) “Maconha” ou “marijuana”: é a mistura de várias partes da planta, principalmente as florescências, as sementes, os talos e as folhas das partes superiores, que são preparadas e secadas. Este último é a preparação de maior consumo nos países ocidentais (CORBETT, 1982).

O potencial terapêutico da *Cannabis* está ligado ao grande número de substâncias químicas já encontradas em amostras da planta, sendo os canabinóides a principal classe responsável por estes efeitos.

3.3.7 Potencial terapêutico dos canabinóides

O potencial antioxidante de uma mistura de THC com o CBD, os dois canabinóides mais abundantes na planta *Cannabis sativa*, foi relatado por Hampson (2000) para o tratamento de patologias associadas a processos oxidativos levando as respostas auto-imunes. O stress oxidativo encontra-se ligado a diversas doenças, tais como: arterosclerose múltipla (MECHOULAM, 2001), doença de Parkinson e a doença de Alzheimer, todas estas foram discutidas por Lastres e Fernandez (2006) utilizando canabinóides para o tratamento dos doentes.

Os efeitos de analgesia e as propriedades antiinflamatórias dos canabinóides são notadamente as mais estudadas ao longo dos anos. Recentemente estudos do uso de canabinóides na dor crônica e em cuidados paliativos foram realizados por Bonfá et al. (2008).

Pertwee (2006) em seu artigo intitulado “*Cannabinoid pharmacology: The first 66 years*” descreve os primeiros 66 anos de estudos das propriedades terapêuticas da *Cannabis*. As propriedades analgésicas e antiinflamatórias atribuídas à planta não se limitam apenas ao THC.

Ultimamente, estudos realizados por Gertsch et al. (2008) indicaram outro constituinte potente para o tratamento de inflamações e dores: o (E)- β -cariofileno, (E)-BCP) – um sesquiterpeno aromático – encontrado nos óleos essenciais das plantas *Cannabis* que contém em média 35% de (E)-BCP. Alimentos como pimenta-

do-reino, orégano, manjeriço, limão, canela, cenouras e aipo contêm alto teor desse componente. Os pesquisadores comprovaram que o (E)-BCP tem potencial atividade antiinflamatória ao interagir com receptores cerebrais chamados CB2, (cujo funcionamento em geral não tem relação com o sistema nervoso), podendo ser considerado um potente antiinflamatório não psicoativo.

Embora os canabinóides exerçam efeitos diretos sobre um determinado número de órgãos do corpo humano, incluindo o sistema imunológico e reprodutivo, os principais efeitos farmacológicos observados estão relacionados ao SNC (IVERSEN, 2003).

Em contrapartida, o uso da *Cannabis* também causa riscos para a saúde e dependência, provocando mudanças físicas, mentais, emocionais, cardiovasculares e respiratórias (BONFÁ, 2008; WEINSTEIN, 2008; MOORE, 2007; DEGENHARDT et al., 2003; POPE, 2001) e comportamentos adversos, e, ao contrário à opinião popular, estes efeitos podem ser aumentados com o uso prolongado da droga.

Fumar cigarros de maconha prejudica os pulmões e as vias respiratórias e aumenta o risco de desenvolver bronquite crônica ou câncer de pulmão em usuários crônicos (BONFÁ et al., 2008); os preparos de maconha destroem interligações entre neurônios influenciando a memória instantânea e os processos cognitivos conscientes (HEISHMAN et al. 1997); perturba as habilidades verbais (BLOCK; GHONEIM, 1993) e o julgamento (GRAHAM et al., 1998) e distorce também a percepção (AMERI, 1999).

Outras investigações de possíveis prejuízos cognitivos residuais decorrentes do uso crônico da maconha também foram relatadas mais recentemente (NIDA, 2007; KALANT, 2004).

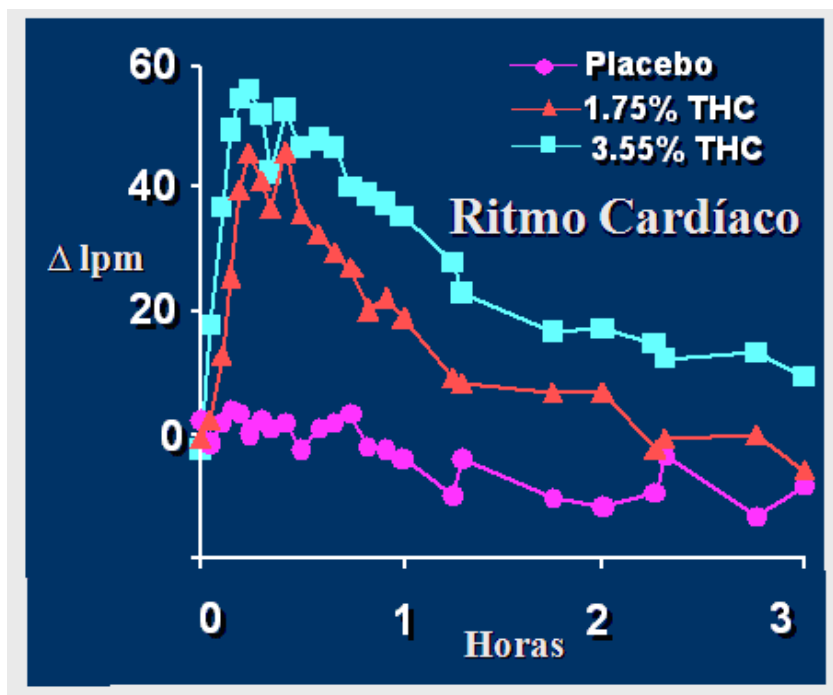
O uso de canabinóides também enfraquece o sistema imune (ZHU et al. 2000), ou seja, a proteção do organismo contra as doenças é diminuída e a proliferação de vírus, bactérias, fungos, células cancerosas etc., pode acontecer com mais frequência (GUZMAN, 2003).

A diminuição do ritmo respiratório é um dos efeitos fisiológicos típicos da ingestão de *Cannabis* e isto reflete no sistema cardiovascular ocasionando taquicardia e vasodilatação, segundo relatos (KALANT, 2004).

O efeito fisiológico do Δ^9 -THC no sistema cardiovascular mostrado no gráfico 1, a seguir, indica o aumento do ritmo cardíaco como reflexo da maior concentração de THC, sendo o pico máximo entre 15-30 minutos após a ingestão.

Gráfico 1 – Efeito fisiológico do Δ^9 -THC no sistema cardiovascular

Fonte: ABRAHAM, 2007



Para os que já consomem a *Cannabis* a um longo tempo, quando submetidos a tratamento, há casos de ocorrência da síndrome de abstinência. Estudos realizados por Almeida, (2008) mostram prejuízos significativos no período inicial do tratamento por não poder demonstrar os déficits residuais do uso da *Cannabis*.

Além disso, evidenciou-se que diante da cessação abrupta de altas doses de tetrahydrocannabinol (THC) produzia-se uma síndrome de abstinência semelhante àquela produzida por drogas sedativas de longa duração (COMPTON et al., 1990).

Mais recentemente, Gonzáles et al. (2008) demonstraram nos estudos outras ocorrências de síndrome de abstinência a derivados canabinóides naturais e sintéticos.

Nem todos os efeitos observados podem ser atribuídos ao THC sozinho. O CBD (canabidiol) (mostrado anteriormente na figura 3) pode modular a ação do THC como, por exemplo: doses de CBD/THC reduzem dores neuropáticas periféricas e apresentam propriedades ansiolíticas (medicamentos que têm a propriedade de atuar sobre a ansiedade e tensão) (CRIPPA et al., 2005); auxiliam em processos de aprendizagem/memória (ZUARDI, 2006), dentre outras.

Nos últimos 30 anos vários cientistas brasileiros desenvolvem estudos pioneiros com os canabinóides, e muitos destes estão realizando pesquisas recentes em áreas distintas, são elas: averiguações epidemiológicas no uso da *Cannabis* (CARLINI, 1981, 1970); estudos das propriedades terapêuticas de compostos da planta *Cannabis sativa* (HONORIO, 2006; ZUARDI, 2006; ALMEIDA et al., 2008); comprovação dos efeitos neurológicos pelo uso da *Cannabis* (GUIMARAES, 2008); síntese de canabinóides endógenos (DI MARZO, 2008); mapeamento do sistema canabinóide endógeno e seus receptor (MOREIRA, 2008) canabinóides antagonistas (TAKAHASHI et al., 2005) e também estudos teóricos para esclarecer correlações entre a estrutura química e a atividade biológica dos canabinóides (SILVA, 2008; ARROIO, 2006; HONORIO, 2006, 2004; DA SILVA, 1995).

3.4. Os Canabinóides

Canabinóides é uma classe de compostos contendo 21 átomos de carbono, além de seus produtos de transformação e análogos. Estes compostos são nomeados utilizando diferentes sistemas de numeração em função da classificação dada e todos estão mostrados a seguir.

3.4.1 Sistema de numeração para os canabinóides estudados

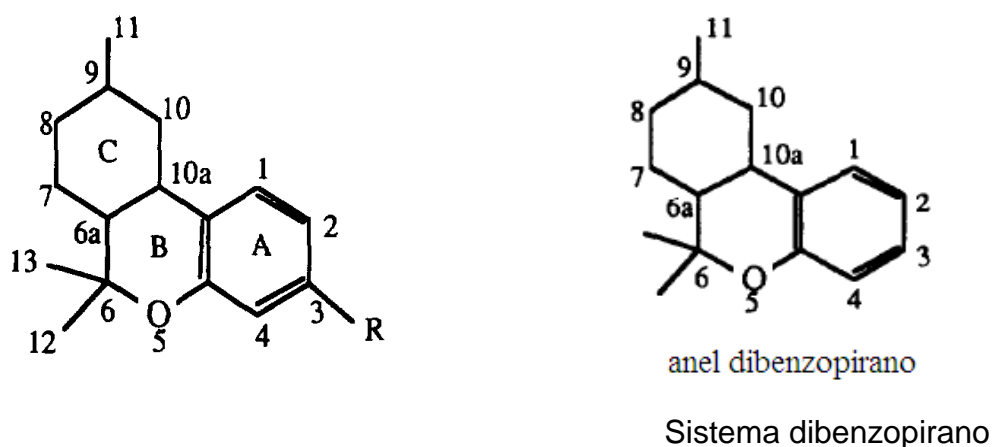


Figura 4a - Sistema de numeração dibenzopirano. Fonte (Razdan, 1979)

A ilustração na figura 4a mostra o sistema dibenzopirano utilizado por alguns autores (RAZDAN, 1979). Observa-se que a ordem do anel ABC é dada partindo-se do anel com a numeração C-1. Assim, o anel A, neste sistema é o anel que tem o grupo R ligado no carbono de número 3, sendo diferente do sistema THC que classifica o anel A para o anel alicíclico (figura 4b).

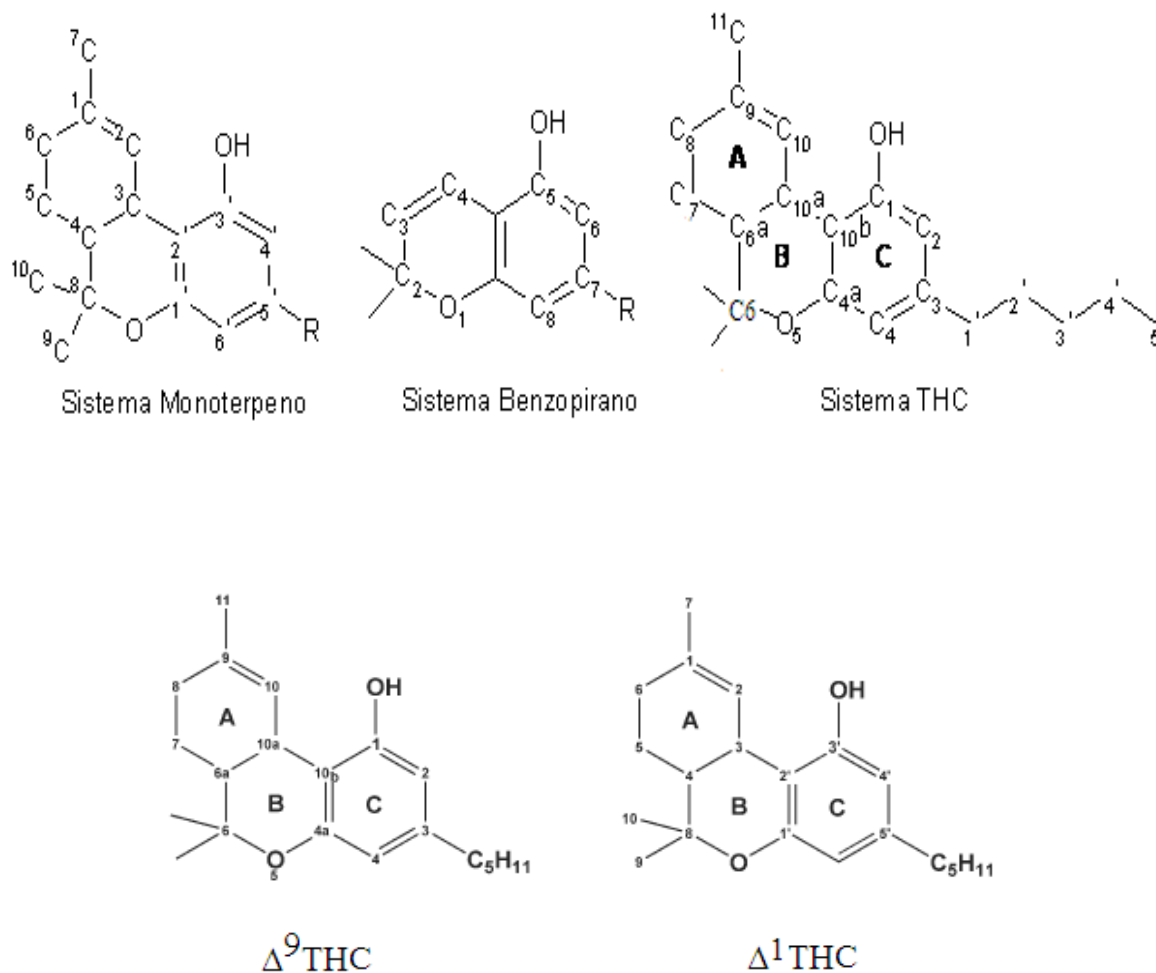


Figura 4b – Sistema de numeração monoterpene, benzopirano e THC. As moléculas foram desenhadas no editor de estruturas e equações químicas Isis Drawn 2.4. Fonte: adaptada de Reggio, (1987) e Honório, (2006).

Os sistemas de numeração mais utilizados estão mostrados nas figuras 4b: o sistema monoterpene (MECHOULAM, 1970), dibenzopirano (RAZDAN, 1979) e o sistema THC (Reggio, 1987). O sistema THC é o mais utilizado atualmente e permite mostrar que a numeração Δ^9 -THC e Δ^1 -THC podem ser justificados igualmente (figura 4b).

3.4.2 Isômeros do Δ^9 -THC

A estereoquímica absoluta do Δ^9 -THC foi determinada por Mechoulam e Gaoni (1967) e em seguida Petrzilka et al., (1969) sintetizou o Δ^9 -THC na sua forma racêmica.

Os isômeros Δ^9 -THC e Δ^8 -THC, figura 5, apresentam propriedades psicoativas, mas em proporção distintas. Destes isômeros o menos psicoativo é o Δ^8 -THC, porém também é encontrado na planta na forma in natura.

O enantiômero (Δ^9 -THC) de nome oficial (6 α R,10 α R)-6 α ,7,8,10 α -Tetrahydro-6,6,9-trimetil-3-pentil-6H-dibenzo(b,d)-piran-1-ol foi isolado e identificado a partir da resina da planta *Cannabis* e vem sendo reconhecido como o constituinte majoritário e principal responsável pelos efeitos psicoativos desta planta (GAONI; MECHOULAM, 1964).

Segundo Mechoulam, (1980) são os isômeros *trans* os que apresentam afinidade por receptores canabinóides e mostram atividade psicoativa. Na figura 5 estão representados os dois enantiômeros: RR (-)-*trans*- Δ^9 -THC e o SS (+)-*trans*- Δ^9 -THC. Destes enantiômeros os RR (-) (-) são 10-100 vezes mais potentes do que os SS (+) (-) (MECHOULAM, et al. 1980).

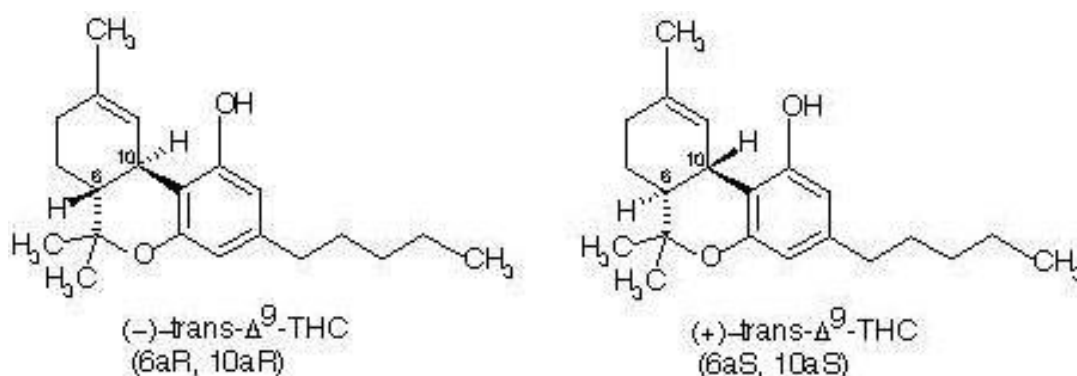


Figura 5 – moléculas enantioméricas do Δ^9 -THC.

3.4.3 Canabinóides sintéticos

Nos Estados Unidos, atualmente, são produzidos medicamentos canabinóides sintéticos aprovados no Food and Drug Administration (FDA - U.S) (FDA, 2008) para alívio das náuseas e vômitos causados pelo tratamento de quimioterapias, e para estimulação do apetite nos doentes terminais de AIDS, e são os seguintes :

3.4.3.1 Cesamet™ (Nabilone) – Um fármaco sintético de administração oral composto de Nabilone, (\pm)-*trans*-3-(1,1-dimetilheptil)-6,6 α ,7,8,10,10 α -hexahidro-1-hidróxi-6,6-dimetil-9H-dibenzo[b,d]piran-9-one (figura 6) comercializado pelo nome de Cesamet, por “Valeant Pharmaceuticals International” e também desenvolvido pelo laboratório “Eli Lilly” (Indianápolis - EUA). O comitê do *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN, 2006) divulga os efeitos e tolerabilidade do Nabilone no tratamento das neuropatias auxiliares (BARNES, 2006).

3.4.3.2 Marinol® (Dronabinol) – Medicamento sintético composto de Dronabinol, (6 α R-*trans*)-6 α ,7,8,10 α -tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-pentil-6H-dibenzo[b,d]piran-1-ol - (THC sintético) (figura 6). Um ingrediente ativo comercialmente conhecido por Marinol. Primeiramente desenvolvido pelo laboratório Roxane (Columbus – EUA) de 1987 até 1992, quando a Unimed Pharmaceuticals, Inc. (FDA, 2008), assume a responsabilidade por toda fabricação, distribuição e comercialização deste fármaco. Outros medicamentos canabinóides também são produzidos na Europa e Canadá.

3.4.3.3 Sativex® – Medicamento composto de *Cannabis* aprovado para comercialização no Canadá pelo laboratório GW Pharmaceuticals PLC e a Bayer AG. É um pulverizador de boca sublingual para o alívio da dor em tratamento de esclerose múltipla (EM) e também como coadjuvante analgésico no tratamento do câncer.

3.4.3.4 Rimonabant® (SR141716) – Uma equipe francesa, a Sanofi-Synthelabo desenvolveu uma droga antagonista CB1, um medicamento que impede a ligação do THC ao receptor CB1, para tratar a obesidade através da redução do apetite.

Sua estrutura está mostrada na figura 6. Para os cientistas, se os efeitos psicoativos surgem quando o Δ^9 -THC liga-se a neuroreceptores canabinóides (CB1), no cérebro, um medicamento que impeça a ligação do THC no CB1 teria, por sua vez, propriedade psicoativa (inativo a psicoatividade).

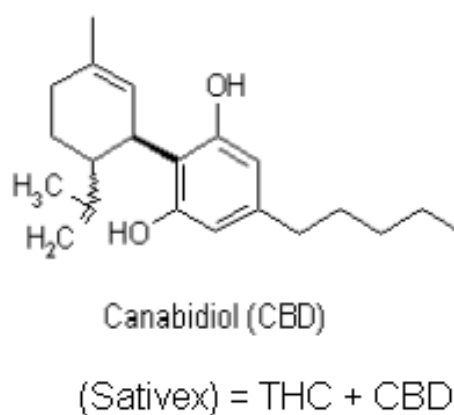
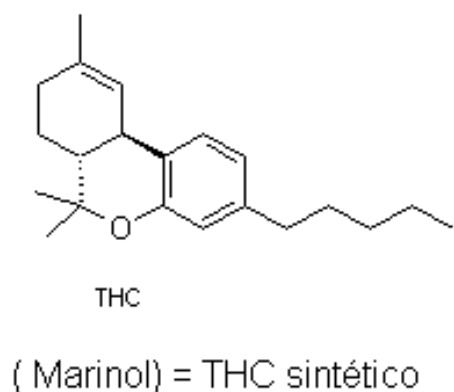
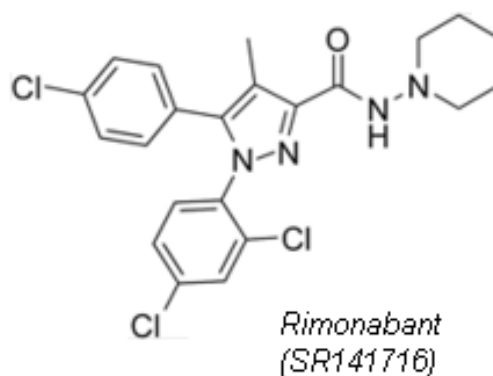
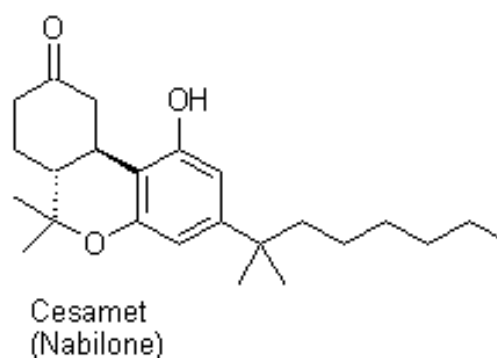


Figura 6 – Canabinóides sintéticos comercializados

3.4.4 Mecanismo de atuação dos canabinóides

As drogas psicoativas influenciam diretamente a liberação, captação e interligação de componentes dentro da fenda sináptica (espaço livre entre um neurônio e outro), conforme mostrado na figura 7. Estes componentes são mediadores químicos (neurotransmissores) que agem sobre os mecanismos de transmissão dos estímulos entre neurônios (CARLINI, 2005).

Os neurotransmissores são moléculas pequenas que na sua maioria são derivados de precursores de proteínas e promovem respostas excitatórias ou inibitórias entre neurônios que se interligam por sinapses químicas.

A sinapse microscópica na figura 7 mostra a função normal de liberação de neurotransmissores dentro da fenda sináptica. O potencial de ação ao chegar ao terminal nervoso da célula pré-sináptica desencadeia a entrada de íons Ca^{2+} que vão motivar a liberação de neurotransmissores contidos em vesículas que se fundem à membrana pré-sináptica.

Segundo a OMS (2004), as substâncias psicoativas têm a propriedade de simular os efeitos de neurotransmissores naturais ou endógenos (aqueles que são produzidos naturalmente pelo organismo), ou de interferir na função normal do cérebro bloqueando uma função ou alteando os processos normais de acumulação, liberação e eliminação de neurotransmissores.

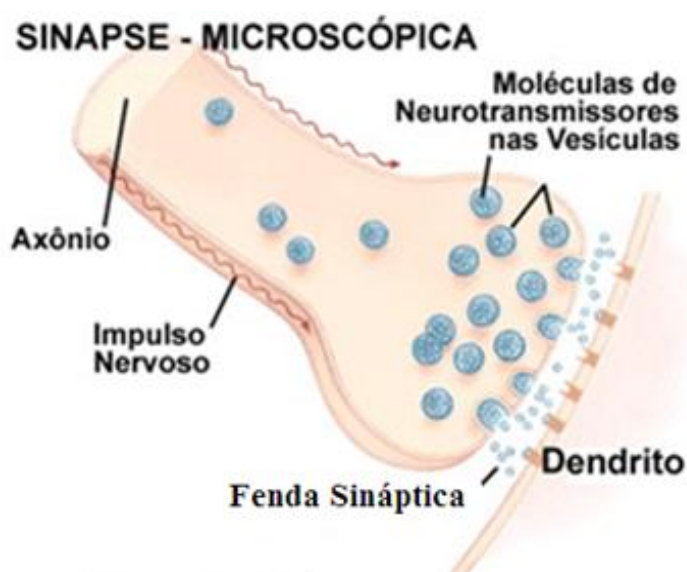


Figura 7 – Botão terminal e sinapse microscópica

Fonte: <http://www.psiqweb.med.br>

O sistema canabinóide influencia a intensidade da atividade de outros sistemas sobre o cérebro. A atividade do sistema canabinóide é capaz de inibir tanto o sistema GABA, quanto o sistema glutamato. O sistema GABA é considerado o sistema inibitório do SNC, ou seja, diminui a ação das outras estruturas do cérebro. O sistema glutamato é excitatório, isto é, sua ação estimula o SNC. Ambos, sistema inibitório e excitatório, trabalham sincronizados. Nos momentos de relaxamento, despreocupação e sono prevalecem o sistema GABA, enquanto o sistema glutamato predomina nas ações que requerem atenção e vigília (BAMBICO; 2007). Dessa forma, o sistema canabinóide parece ser responsável pela modulação da atividade inibitória e excitatória do cérebro. Assim, em períodos de maior atividade (trabalho, estudo, jogos que requeiram atenção e concentração), o sistema canabinóide exerce inibição sobre o sistema GABA. Já em períodos marcados pela tranquilidade e pela despreocupação, a ação canabinóide recai sobre o sistema glutamato.

Relatos de Volkow (2001) esclarecem que os canabinóides afetam a motivação e o aprendizado. Estes estudos indicam haver diversos neurotransmissores envolvidos nestes processos e um dos sistemas que sofre regulação após a liberação destes neurotransmissores é o sistema endócrino (BEAR, 2002).

O processo motivacional de um indivíduo depende de interações de vários sistemas de neurotransmissores centrais. Dentre esses neurotransmissores, a dopamina³, serotonina⁴ e noradrenalina⁵ parecem ser os mais envolvidos no mecanismo de resposta no organismo pelo consumo de canabinóides (DI CHIARA, 1997; 1997; BEAR, 2002). Relatos de Volkow (2001) esclarecem que os canabinóides fazem aumentar a atividade da dopamina na passagem mesolímbica (passagem pelas vias dopaminérgicas). Os neurônios que produzem a serotonina têm sua atividade aumentada promovendo um efeito antidepressivo pelo uso de canabinóides, contudo, em doses mais altas o efeito é contrário (BAMBICO; 2007). O efeito de analgesia dos canabinóides está associado à noradrenalina.

³ **Dopamina:** Controla níveis de estimulação (humor, apetite, sexualidade e sono) e regulação motoras em muitas partes do cérebro.

⁴ **Serotonina:** No sistema nervoso central está envolvida no controle do estado de sono ou vigília, consciência, agressividade e humor.

⁵ **Noradrenalina:** possui ação depressora sobre o SNC. A liberação de noradrenalina produz aumento no estado de alerta, sentimentos positivos de recompensa e analgesia e pode também estar envolvida em comportamentos instintivos básicos como fome, sede, emoções e sexo.

O sistema GABA e glutamato estão espalhados por todo o cérebro. Já o sistema canabinóide, apesar de difuso, está mais concentrado no córtex frontal, núcleos da base, cerebelo e sistema límbico. Essas estruturas estão intrinsecamente relacionadas às funções psíquicas superiores, à motricidade e ao comportamento emocional. As funções desempenhadas por estas estruturas são diretamente influenciadas pelos sistemas GABA e glutamato e moduladas pelo sistema canabinóide.

A via neurológica mais envolvida nas dependências por drogas é o chamado sistema límbico de recompensa, mostrado na figura 8. Este sistema é acionado após a liberação de neurotransmissores para restabelecer a sensação de prazer e bem estar por ocasião do consumo do psicoativo. Estudos indicam haver diversos neurotransmissores envolvidos na sensação de prazer, além da liberação da dopamina (MOREAU, 1996; BEAR, 2002). A função mais conhecida do sistema límbico é o de regular os processos emocionais. Sabe-se também que alguns componentes do sistema límbico estão ligados diretamente ao mecanismo da memória e aprendizagem e participam da regulação do sistema endócrino.

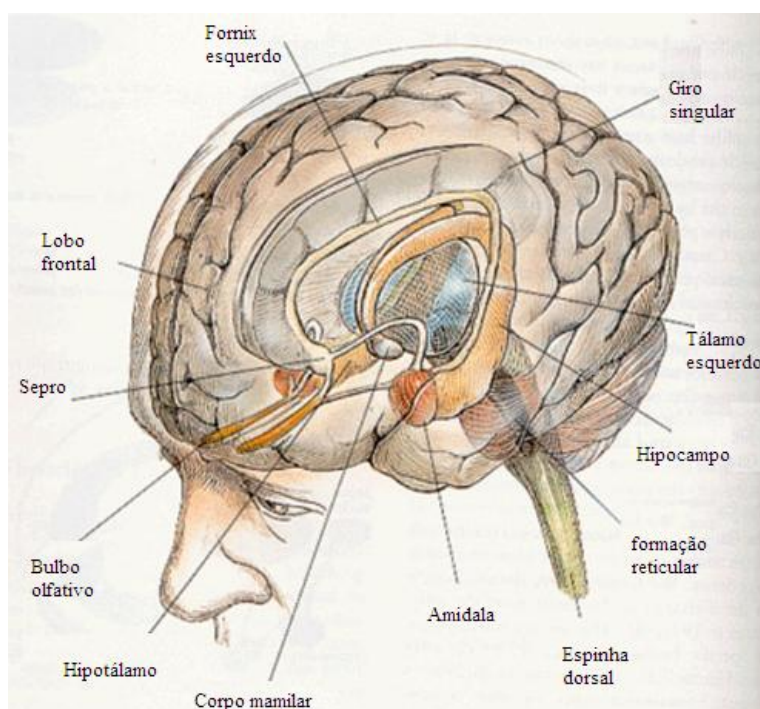


Figura 8 – Principais estruturas do sistema límbico onde atuam os canabinóides (sistema dopamínico)

Para o desenvolvimento da dependência é necessário que se recorra aos efeitos prazerosos da droga. Esse efeito prazeroso chama-se Reforço Positivo. O reforço positivo refere-se ao mecanismo de busca de prazer quando há uma sensação agradável (RANG, 2001; DI CHIARA, 1995).

Estudos associam a liberação de dopamina no cérebro às ações de reforço positivo do tetraidrocanabinol (THC), presente na planta *Cannabis* (CARLINI et al. 2005). THC e outros canabinóides modulam a atividade neuronal e a liberação de neurotransmissores dopamina (BEAR, 2002), noradrenalina (TRENDELENBURG et al., 2000) e serotonina (NAKAZI et al., 2000).

Segundo Mechoulam et al. (1980) os canabinóides agem como agonistas (compostos que produzem uma resposta positiva ou negativa) no sistema de receptores canabinóides. O tópico dos receptores canabinóides será tratado a seguir.

3.4.5 Receptores canabinóides

Acreditava-se que os canabinóides ao tentar interligar-se com as membranas lipídicas no SNC, acarretariam mudanças nas propriedades das moléculas durante o transporte dentro da região de interligação, devido a baixa estereoseletividade e alta lipossolubilidade dos canabinóides (GILL, 1976).

Para esclarecer este fato, Howlett e Fleming (1984) em suas pesquisas demonstraram que na verdade os canabinóides inibiam a ativação de uma enzima intracelular chamada de adenilato ciclase (AC) dentro da membrana. A enzima adenilato ciclase é uma proteína transmembranar (proteína integralmente de membrana que atravessa a camada lipídica bilateral e possui uma porção exposta em ambos os lados da membrana). A enzima AC atravessa a membrana plasmática até 12 vezes, capta sinais extracelulares e ativa vias de transdução de sinal no interior da célula.

Howlett et al., (1986) demonstraram que a inibição da enzima AC só ocorria na presença de um complexo de proteínas-G. A enzima AC não é estimulada diretamente pelos receptores canabinóides, ao invés disso, o receptor estimula uma proteína G, que por sua vez, estimula a adenilato ciclase.

Para melhores esclarecimentos desta demonstração, dados consistentes em bioensaios utilizando canabinóides, tratados por Devane et al., (1988) permitiu que

fosse caracterizado um sítio de ligação no cérebro de ratos para o CP55-940 (um canabinóide sintético 40 vezes mais potente que o THC). A seguinte ordem de potência foi mostrada neste artigo: CP55-940 \geq Δ^9 -THC > CBN. Logo depois, Herkenham et al. (1990) demonstraram que sítios de ligação com alta afinidade para o CP55-940, no cérebro, eram mais densos no gânglio basal, no hipocampo e no cerebelo, sugerindo papéis para os canabinóides na cognição e no movimento.

Neste mesmo ano um receptor designado CB1, foi clonado por Matsuda et al. (1990) e Gerard et al. (1991), a partir de uma biblioteca de cDNA do tronco encefálico humano. Logo em seguida um segundo receptor, o CB2, com 48% de homologia com o receptor CB1, foi clonado por Munro et al. (1993).

Ambos receptores CB1 e CB2 são polipeptídeos com sete α -hélices transmembranar, constituída de fosfolipídios (moléculas anfipáticas que possuem regiões hidrofílicas e regiões hidrofóbicas) e possuem (N-terminais) extracelulares e (C-terminais) intracelulares, segundo McPartland e Glass (2003). O modelo para CB1 e CB2 é mostrado na figura 9a. Os pontos escuros representam o arranjo em hélice dos 472-473 aminoácidos do CB1 e os pontos claros representam os 360 aminoácidos do CB2. A faixa central representa a membrana celular.

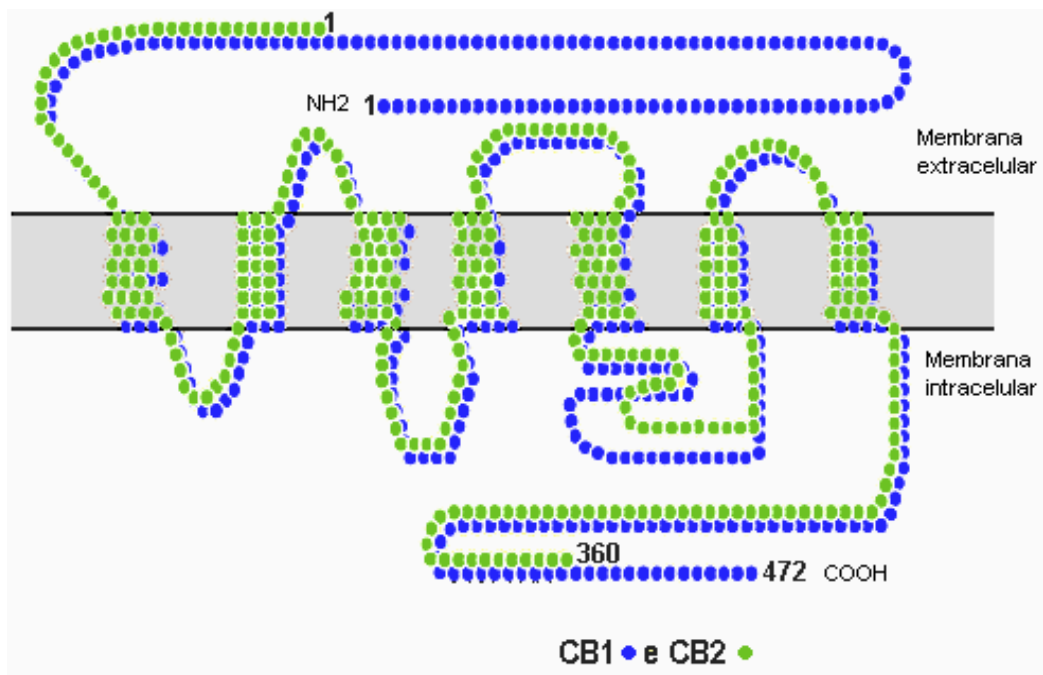


Figura 9a – Receptores canabinóides
CB1 e CB2. (MUNRO, 1993).

Os receptores canabinóides CB1 e CB2 regulam a atividade das enzimas adenilato ciclases as quais são inibidas. Os receptores também atuam na enzima *MAPK* (do inglês - *mitogen-activated protein kinases*), sendo que neste caso, esta enzima é estimulada (FRANCISCHETTI; ABREU, 2006).

Tanto o receptor CB1 quanto o receptor CB2 são receptores acoplados à proteína G (GPCR's) (HOWLETT et al., 1986). Desse modo, ambos são capazes de inibir a adenilato ciclase ligada à membrana.

Os receptores CB1 pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G inibitória (G_i), comumente chamados de receptores de membrana ligados a proteína-G (GPCR) (do inglês - G-Protein-Coupled-Receptor) e possuem sítio de ligação extracelular (para o ligante) e intracelular (para a proteína G acoplada) (DI MARZO et al., 2004). O receptor CB1 é maior do que o receptor CB2 nas regiões intra e extracelular, como pode ser verificado na figura 9a. O CB1 é o receptor GPCR canabinóide mais abundante no cérebro, predominantemente nos neurônios pré-sinápticos, mas também se encontra presente no sistema nervoso periférico (DI MARZO et al., 2004).

Várias evidências indicam que receptores acoplados à proteína G podem adotar múltiplas conformações induzidas e/ou estabilizadas pela interação do receptor com agonistas (substâncias que ativam os receptores canabinóides) ou antagonistas (as que bloqueiam os receptores biológicos) endógenos, bem como compostos alostéricos (que se liga a outros sítios no receptor) (HOWLETT et al., 2002).

Os receptores CB1 acoplados à proteína G podem existir em estados "on" ou "off", segundo descreve Pertwee (2005), em diversos experimentos. O estado "on" pode ser representado como o receptor acoplado a uma forma ativa da proteína G (R^*GGTP) (gama-glutamato-transpeptidase ativa) e o estado "off" como o receptor acoplado a uma forma inativa da proteína G ($RGGTP$) (gama-glutamato-transpeptidase inativa).

Estudos moleculares e farmacológicos demonstraram que a ativação dos receptores canabinóides pode levar à inibição ou ativação da adenilato ciclase (dependendo do tipo de proteína G acoplado ao receptor), sendo que a ativação de CB1 também leva à modulação do funcionamento de canais iônicos. (HOWLETT et al., 2004; DE PETROCELLIS et al., 2004).

Após as descobertas e evidências experimentais a respeito dos receptores canabinóides, vários estudos foram realizados para esclarecer o mecanismo de atuação do conjunto destes receptores. Os cientistas Wilson (2002), Alger (2002) e Howlett (2004; 2002) descobriram que o receptor CB1 é um dos mais abundantes receptores associados à proteína-G existentes no SNC. Ele está presente em maior densidade no córtex cerebral, hipocampo, hipotálamo, cerebelo, gânglios da base, tronco encefálico, medula espinhal e amígdala.

Para Wilson & Nuroll (2002) e Alger (2002), as funções neurológicas das áreas com maior concentração de receptores canabinóides correspondem a alguns dos efeitos específicos da droga, como por exemplo, a experiência mental e o pensamento desorganizado vêm de sua ação no córtex cerebral; as dificuldades de memória resultam de sua atividade no hipocampo; a disfunção e descoordenação motora estão relacionadas ao efeito nos gânglios da base e cerebelo. Estes pesquisadores ainda comentam que na medula espinhal o THC reduz as dores; no tronco encefálico controla o reflexo do vômito; no hipotálamo regula o apetite e a amígdala atua nas reações emocionais. Alguns dos efeitos do THC ocorrem pela interação com o sistema opióide endógeno, que por sua vez, interage com o sistema dopaminérgico.

Além da predominância dos receptores CB1 nos terminais pré-sinápticos do SNC, estudos recentes realizados por Kunos et al. (2002), Batkai et al. (2001), Salio et al. (2001) e Pertwee (1997) confirmam a presença destes receptores no sistema imune, endotélio vascular, sinapses nervosas periféricas, testículos, intestino delgado e fígado.

Os receptores CB2 parece ser o mediador chave na regulação do sistema imune e inflamações, e até a realização dos trabalhos de Lynn e Herkenham (1994) e Munro et al. (1993) as evidências eram de que os receptores CB2 assumiam papel de moduladores em células do sistema imune, mas no SNC não haviam relatado da presença do CB2.

Contradizendo esta afirmação Griffin et al. (1997) relataram evidências da existência de receptores CB2 na medula óssea, pâncreas, retina e em terminais nervosos periféricos de camundongos adultos.

Mesmo com as afirmações até então de que CB2 era ausente no Sistema Nervoso Central, Skaper et al. (1996) sugeriram o contrário, e afirmaram que o mRNA (ácido ribonucléico mensageiro) para o receptor CB2 haviam sido detectado em células granulares cerebelares.

Recentemente Benito et al. (2008) também verificaram uma expressão aumentada de CB2 no tecido nervoso após estímulo inflamatório.

Outras evidências da existência de receptores CB2 no sistema nervoso central foram citadas por Van Sickle et al. (2005), especialmente em regiões do tronco cefálico, e também por Gong et al. (2006), onde afirmam ter encontrado CB2 difundido em camadas neuronal do SNC.

Contrariando estas últimas evidências, Ashton e Glass (2007) foram incapazes de reproduzir estes resultados, e ainda esclarecem que as únicas comprovações são da ausência de CB2.

O estudo mais recente a este respeito realizado por Bonfá (2008) sugere que a existência de receptores CB2 no encéfalo implicaria que alguma substância endógena (produzida no organismo) se ligaria a eles.

Logo, ainda há muitas controvérsias em relação à seletividade do receptor CB2.

Na região transmembrana, os dois receptores, CB1 e CB2, tem 68% de similaridade com relação às sete regiões transmembrana e cerca 44% de afinidade entre a seqüência de aminoácidos (MUNRO et al., 1993).

Estudos de modelagem molecular no CB1 realizados por Reggio (2006), figura 9b, mostra a vista do segmento transmembrana TM3/TM6 nos estados inativo e ativo, R e R*. No estado R, os grupos W6.48 e F3.36 estão empilhados causando torção em TM6. Contudo, estes grupos quando acoplados por uma interação estabiliza o estado R*. O estado de CB1 inativo (R) é caracterizado também por uma ponte entre R3.50 e D6.30 no lado intracelular de CB1 que mantém TM3 e TM6 próximos. As pontes entre D6.30 e R3.50 são quebradas, e a torção em TM6 passa a ser moderada no estado R* ativo.

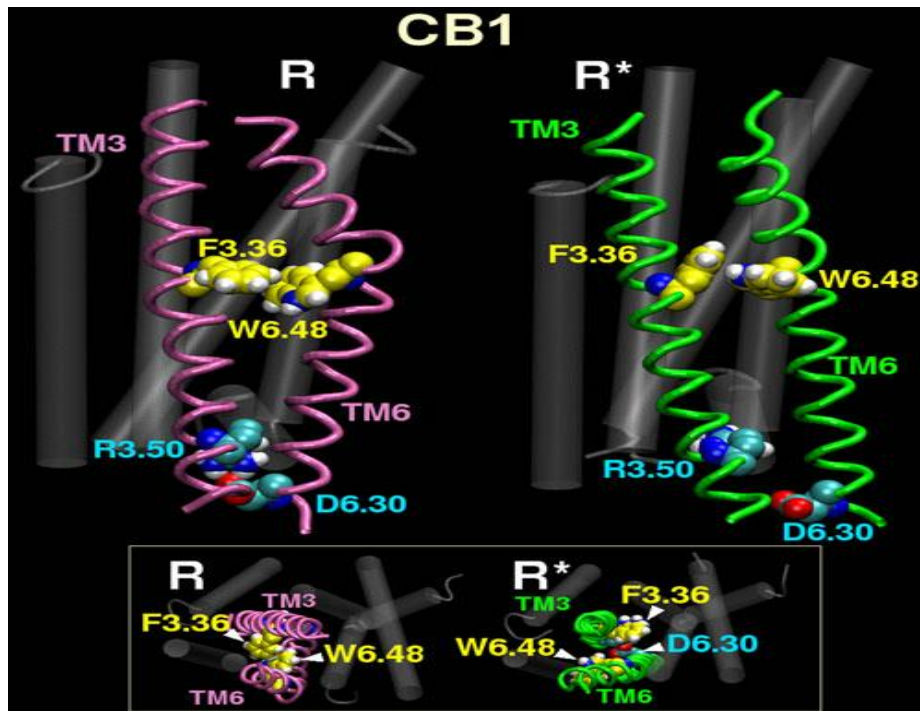


Figura 9b - Relação entre os resíduos de aminoácidos (F3.36 e W6.48) e (R3.50 e D6.30) nos estados inativos (R) e ativos (R*) de CB1 por modelagem molecular. TM é o segmento transmembranar. (REGGIO, 2006).

Verificando a figura 10 a seguir, percebe-se que os receptores CB1 e CB2 inicialmente ativam a proteína Gi e inibem a adenilato ciclase (AC) para reduzir a formação do monofosfato de adenosina cíclica (cAMP) (que regulam as atividades celulares).

Na figura 10 os receptores são ativados quando interagem com canabinóides ou endocanabinóides (canabinóides endógenos, que se formam dentro do próprio organismo) e a partir desta interação, uma séria de reações ocorre, incluindo inibição da AC, o que diminui a produção de cAMP (as atividades celulares dependem da enzima adenosina monofosfato cíclica - cAMP); abertura dos canais de potássio (K^+), diminuindo a transmissão de sinais e fechamento dos canais de cálcio (Ca^{+2}), levando a um decréscimo na liberação de neurotransmissores. A membrana hiperpolarizada, estimula a produção da enzima quinase “mitogen-activated protein kinase (MAPK)”, figura 10.

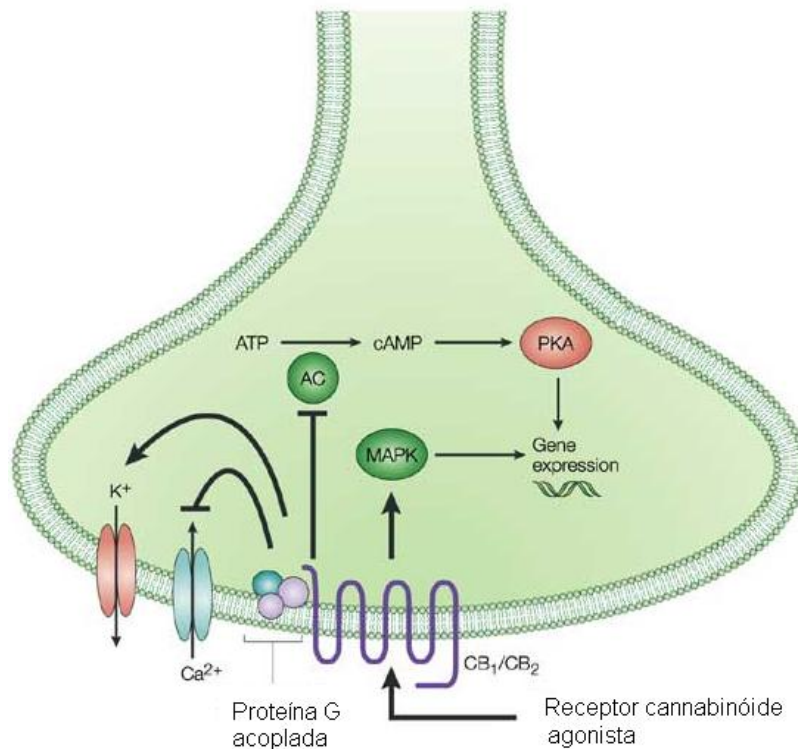


Figura 10 – Transdução do sinal dos receptores CB₁/ CB₂ pela presença do Δ^9 -THC
 Fonte: Di Marzo et al., 2004

Até o momento os dois únicos subtipos de receptores canabinóides reconhecidos são CB1 e CB2. Contudo, evidências farmacológicas e fisiológicas apontam outros subtipos de CB1 ainda não clonados, os “receptores CB1a e CB1b”, detectados no pulmão e cérebro humanos, respectivamente, e estudados por Ryberg et al. (2005). Dois novos receptores canabinóides, o GPR55 e GPR119, que se ligam seletivamente a ligantes canabinóides já conhecidos, foram recentemente descrito por Baker et al. (2006) e os resultados ainda não são consistentes e não foram clonados para que possa classificá-los como pertencentes à família de receptores canabinóides.

Mesmo havendo as proporções de similaridade e afinidade entre a sequência de aminoácidos na região transmembranar, a transdução de sinal, dentro da célula, acontece com a ajuda de uma variedade de moléculas chamadas ligantes. Alguns desses ligantes são moléculas lipossolúveis, portanto, atravessam as membranas.

Outros ligantes não são capazes de atravessar a barreira. Eles necessitam interagir com proteínas presentes nas biomembranas, assim, interligam-se com os receptores nos três domínios: extracelular, transmembranar e citoplasmático.

Vários ligantes não são capazes de distinguir entre os receptores CB1 e CB2. No caso específico dos receptores CB1, a modulação do sinal se faz nos canais de Ca^{2+} ativados por voltagem (os quais inibem a liberação dos íons) e canais de K^+ (os quais estimulam). Os ligantes estão presentes no sistema endocanabinóide tratado a seguir.

3.4.6 O sistema endocanabinóide

Os primeiros ligantes endógenos (formados no organismo) dos receptores canabinóides, os endocanabinóides, foram isolados no início dos anos 90. Em 1992 foi descoberta a anandamida (*N*-araquidonoil etanolamina) (DEVANE et al., 1992) e alguns anos mais tarde o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (MECHOULAM et al., 1995) e as estruturas deles estão mostradas na figura 11.

Além da Anandamida (A) e do 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (B), outros dois endocanabinóides mais estudados e caracterizados por sua importância são a *N*-araquidonoildopamina (C) e a Virodamina (D) (PORTER et al., 2002; HUANG et al., 2002; HANUS et al., 2001) também estão mostrados na figura 11.

A anandamida e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) são derivados de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, principalmente do ácido aracdônico, sendo os dois agonistas endógenos dos receptores CB₁ e CB₂. Os níveis celulares e teciduais do 2-AG são mais elevados que os da anandamida por conta de seu maior envolvimento em várias vias metabólicas.

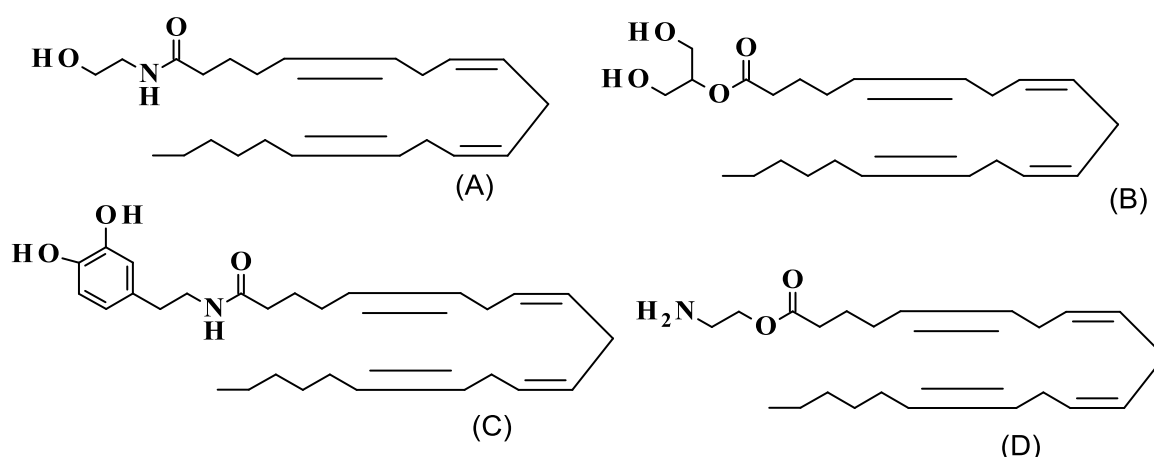


Figura 11 – Estrutura de alguns endocanabinóides mais estudados:

(A): Anandamida (B): 2-Araquidonoilglicerol (2-AG)

(C): 2-Araquidonoildopamina (D): Virodamina.

No cérebro, os níveis de 2-AG são, na sua maioria, de uma a duas ordens de magnitude superiores as enandamidas, mesmo assim, não está ainda esclarecida com precisão a relevância desta diferença de concentração, nem a seletividade da relação neurotransmissor específico *versus* receptor canabinóide, tão pouco a localização das proteínas envolvidas na síntese e degradação da molécula transmissora e as concentrações próximas aos receptores podem estar bem definidas neste caso (BRITO, 2007).

Em geral, os endocanabinóides agem como mensageiros cerebrais retrógrados e mediadores locais em muitos outros tecidos, não estando confinados apenas no SNC, sendo produzidos por demanda, iniciando assim a sua síntese. Nestes casos, diferentemente da organização usual, o estímulo começa no neurônio pós-sináptico.

A excitação neuronal leva à despolarização e ao influxo de íons cálcio que estimulam várias fosfolipases, dando início a produção dos endocanabinóides que se difundem na fenda sináptica podendo atuar estimulando o receptor canabinóide que se encontra nos terminais pré-sináptico, conforme figura 12.

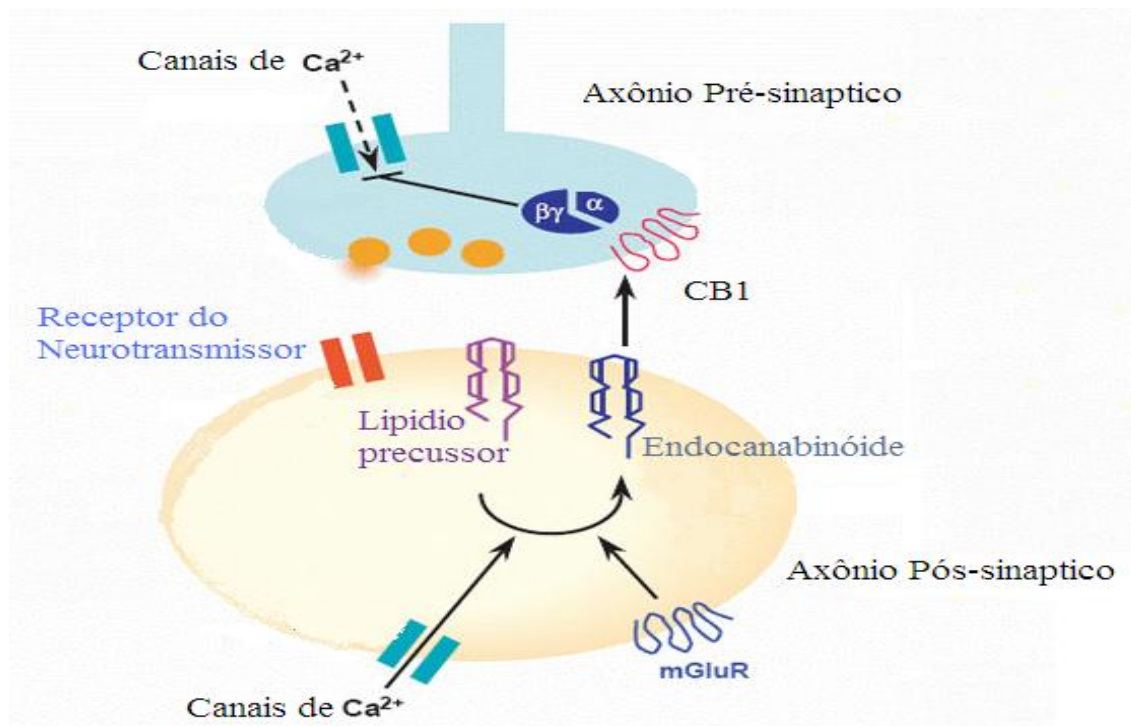


Figura 12 – Biosíntese de endocanabinóides

Fonte: Wilson e Nicoll, 2002.

A biossíntese de endocanabinóides é promovida pela entrada de cálcio na cavidade onde se encontra o neurônio pós-sináptico. Após a síntese, os endocanabinóides se difundem e podem atuar nos receptores CB1 promovendo bloqueio da entrada de cálcio nas terminações pré-sinápticas (WILSON; NICOLL, 2002).

A soma das influências excitatórias e inibitórias determinará o ajuste gradual da função neural. A contínua atividade excitatória e inibitória no neurônio pós-sináptico produz flutuações no potencial da membrana. O efeito do neurotransmissor liberado não é necessariamente excitar a célula pós-sináptica gerando potenciais de ação, podendo haver inibição da célula que recebe o transmissor químico.

Segundo Di Marzo et al. (2004), os endocanabinóides e seus receptores envolvidos e as enzimas catalisadoras nas biotransformações evoluíram juntos como parte de um sistema inteligente de comunicação neuronal. Para Francischetti, (2004), os endocanabinóides e a ativação concomitante de seus receptores CB1 causam uma abundância de efeitos. Di Marzo et al., (2004) ainda comenta que o sistema endocanabinóide reduz a sensação de dor, controla o movimento, a memória, o sono, o apetite e atua no sistema imunológico.

3.4.7 Agonistas e antagonistas dos receptores CB1 e CB2

São cinco os grupos de canabinóides agonistas e antagonistas (tabela 2) separados por estrutura: os que apresentam na sua maioria a cadeia eicosanóide – endocanabinóides são derivados de ácidos graxos e encontrados em animais; os canabinóides “clássicos” (dibenzopirenos tricíclicos); os canabinóides “não-clássicos” (análogos bicíclicos e tricíclicos do (Δ^9 -THC)); os aminoalquilindóis e por último os antagonistas sintéticos do CB1 e CB2 (BRITO, 2007).

Os endocanabinóides anandamina e 2-AG são provenientes de animais, desde moluscos até mamíferos.

São chamados de canabinóides “clássicos” os extraídos das plantas e análogos do THC, onde se incluem os Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, 11-OH- Δ^9 -THC. Os análogos sintéticos do THC o dronabinol, o nabilone, o HU-210 ou (-)-11-hidróxi- Δ^8 -THC-dimetil-heptil, agônista do CB1 que possui uma potência de 100-800 vezes maior que o THC (HILEY; FORD, 2004), sendo o mais potente canabinóide sintético conhecido.

Todos estes compostos são ativos totais ou parciais tanto nos receptores CB1 como CB2 e antagonista somente em alguns receptores CB2 (BAYEWITCH et al. 1996). Recentemente, Mechoulam (2005) evidenciou que da planta *Cannabis*, pode ser obtido o canabinóide Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCV), um potente antagonista da anandamida. Para este autor, por conta disto, é possível que muitos dos canabinóides não psicoativos tenham também interesse biológico.

Os chamados canabinóides “não clássicos” são compostos bi ou tricíclicos ausentes do anel di-hidropireno típico dos compostos “clássicos” análogos do THC. O CP55-940 é o mais abundante e possui afinidade por ambos os receptores e os diastereoisômeros (dextro) e (levo) do nantradol.

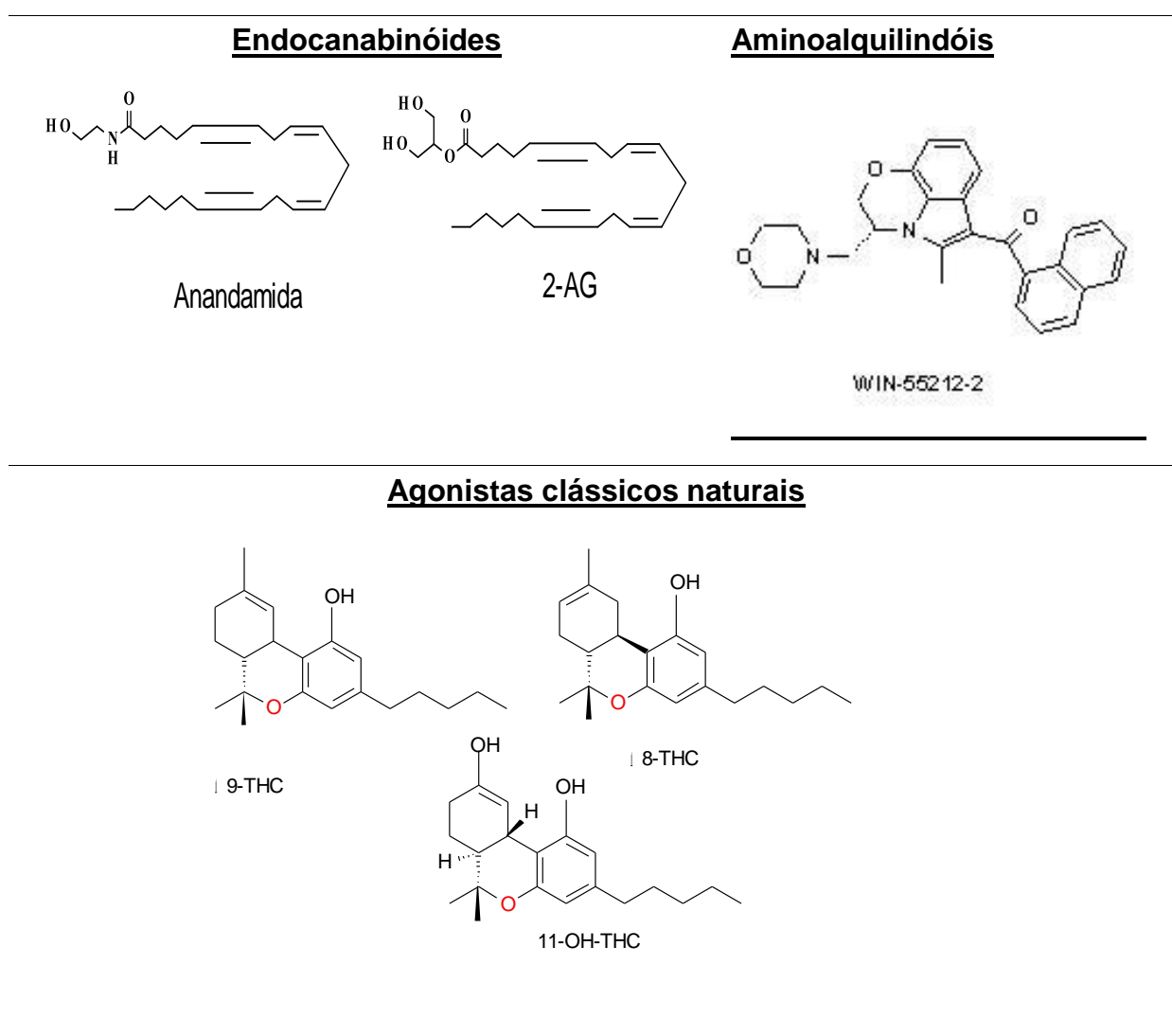
Dos aminoalquilindóis, o WIN 55, 212-2 é o mais comumente utilizado, sendo um potente agonistas sintético misto em CB1 e CB2. O enantiômero *R*(+) do WIN 55,212-2 é o mais potente agonistas CB1/CB2, embora mostre maior seletividade para CB2 (FELDER et al., 1995).

O primeiro antagonista endocanabinóide específico do receptor CB1 foi descoberto em 1994, sendo denominado SR141716 ou rimonabant (tabela 2).

Esta substância vem sendo estudada como modulador do apetite e como agente para o controle do tabagismo e, principalmente, para o controle dos fatores de risco ligados à obesidade visceral.

O antagonista específico do receptor CB2, SR144528 (tabela 2) foi descoberto em 1997, utilizado para controlar respostas no sistema imune. Temos ainda outros antagonistas do CB1 e CB2 citados recentemente por Brito (2007), o AM 521, AM 281, LY320-135 e O-2050 (bloqueia CB1) (ver continuação tabela 2).

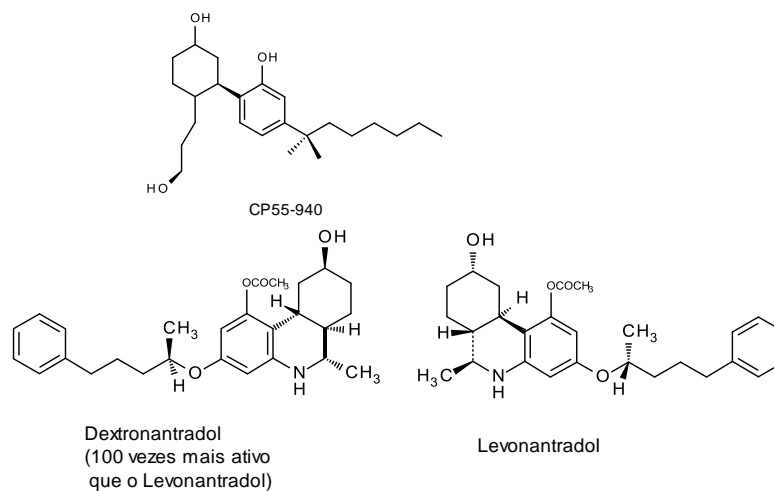
Tabela 2 – Estruturas de agonistas e antagonistas dos receptores canabinóides



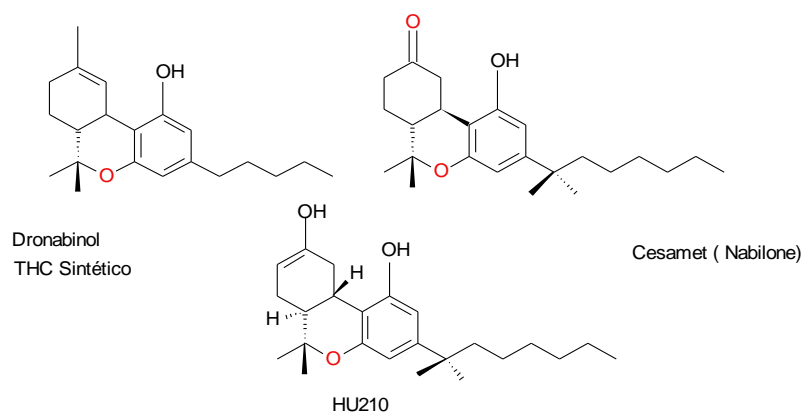
Fonte: Adaptado Godoy-Matos, (2006)

Tabela 2 – Estruturas de agonistas e antagonistas dos receptores canabinóides
 Continuação

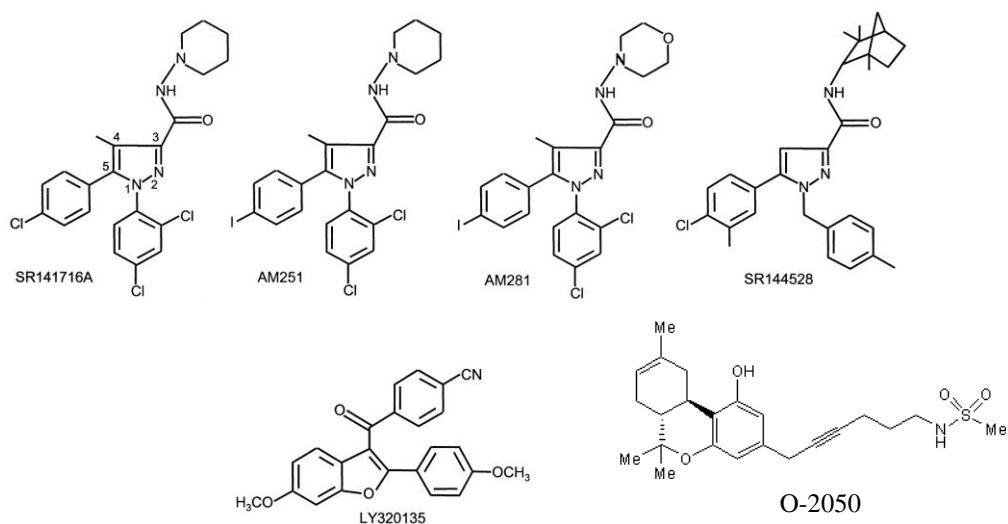
Agonistas não clássicos



Agonistas clássicos sintéticos e Análogos ao THC



Antagonistas (bloqueiam CB1 E CB2)

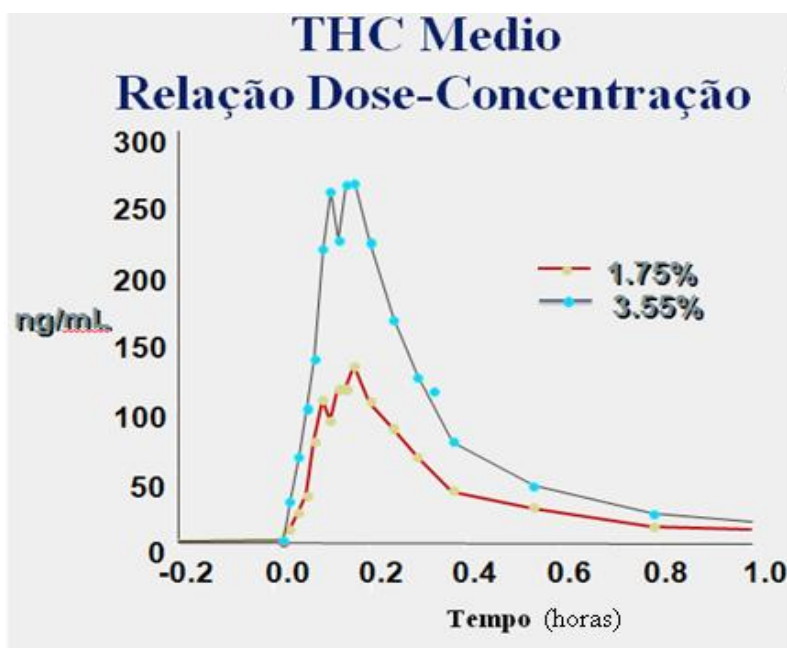


3.4.8 Metabolismo dos canabinóides no organismo

3.4.8.1 Administração e dosagem

No corpo humano, há duas importantes vias de administração utilizadas ao ingerir maconha: as vias oral e inalatória (YONAMINE, 2004). Pela via oral, a absorção do Δ^9 -THC é lenta e incompleta e os efeitos, geralmente, têm início de 30 a 60 minutos, com sua máxima intensidade ocorrendo de 2 a 3 horas após a ingestão (JULIEN, 1997). Pela via inalatória (pulmonar), a mais popular e mais efetiva em relação à absorção do Δ^9 -THC, seus efeitos subjetivos são imediatos, alcançando o máximo de 20 a 30 minutos após seu uso, podendo durar de 2 a 3 horas (CERRO, 1998). Um cigarro de maconha contendo 16mg de Δ^9 -THC fornece uma concentração plasmática de pico de aproximadamente 80 ng/mL, com uma variação de 50 a 130 ng/mL em 15 minutos (DRUMMER; ODELL, 2001). A relação dose/concentração de THC, mostrada no gráfico 2, deixa claro que independente da concentração, o pico máximo ocorre nos 15-20 minutos iniciais após a ingestão. Doses de 1,75% e 3,55% apresentaram picos de concentração máxima entre 15-20 minutos após o consumo.

Gráfico 2 – Relação dose/concentração de THC Médio. (HUESTIS et al.,1996).



3.4.8.2 Excreção e biotransformação dos canabinóides

Biotransformação é uma transformação enzimática que acontece nos organismos vivos. As enzimas são as responsáveis pelas reações de biotransformação e estão presentes em diversos órgãos (rins, pulmões, intestino delgado e fígado), na pele, no tecido nervoso e no sangue (FRANCO & FRANCO, 2003).

Embora as enzimas estejam distribuídas em todo o organismo, o fígado é, sem dúvida, o órgão que mais as concentra (KOROLKOVAS, BURCKHALTER, 1992). Os fármacos, quando ingeridos no organismo podem ser biotransformado à metabólitos com características mais hidrofílicas, e conseqüentemente, mais fáceis de serem absorvidos e excretados pelo organismo. O caráter lipofílico dos fármacos (a maioria é solúvel em lipídios e permanecem não ionizados ou parcialmente ionizados em pH fisiológico) faz com que eles permaneçam no organismo. Estas substâncias de caráter exógeno para serem eliminadas pelo organismo, podem lançar mão de sistemas enzimáticos utilizados normalmente para a degradação de substâncias endógenas.

No caso do Δ^9 -THC, ao ser inalado, passa para a corrente sanguínea, onde é redistribuído para alguns órgãos do corpo. É rapidamente biotransformado por enzimas hepáticas, pulmonares e cerebrais do sistema citocromo P450 (CYP) (WATKINS, 1992), a partir de reações de hidroxilação, oxidação e conjugação com ácido glicurônico (CERRO, 1998). Os metabólitos resultantes podem ser farmacologicamente inativos, menos ativos ou, às vezes, mais ativos que a molécula original (RANG, 2004). O Δ^9 -THC é convertido por reações de hidroxilação a um metabólito mais polar, o 11-hidróxitetrahydrocannabinol (11-OH-THC), (MATSUNAGA et al., 2001).

O 11-hidróxitetrahydrocannabinol, figura 13, é mais potente e mais lipofílico que o Δ^9 -THC e atravessa rapidamente a barreira hematoencefálica (BHE), (YONAMINE; 2004). Por ser uma barreira semipermeável, a BHC permite que algumas substâncias atravessem e outras não. Yonamine (2004) ainda comenta que a habilidade dos canabinóides de atravessar a barreira BHE depende do tamanho molecular do metabólito, do grau de ionização, lipossolubilidade e do grau de ligação nas camadas lipoprotéicas.

No fígado, o 11-OH-THC se transforma em outros metabólitos inativos, dos quais se destaca o 11-nor-carbóxi- Δ^9 -THC (THCCOOH) (figura 13), o metabólito mais abundante no plasma e na urina (JULIEN, 1997; DRUMMER, ODELL, 2001) obtido pela oxidação do THC por enzimas do citocromo P450 (MATSUNAGA, 2001).

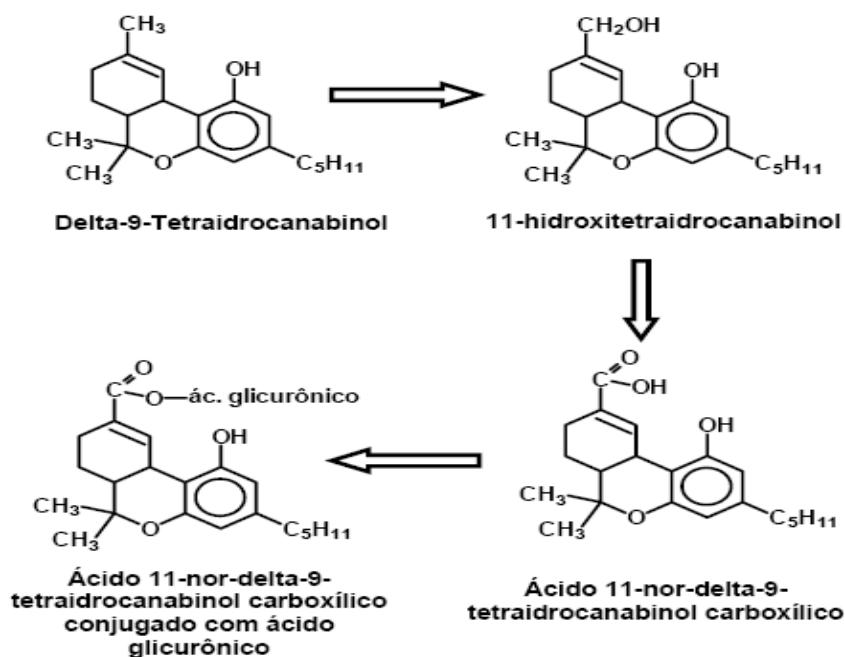


Figura 13 – Principais vias de biotransformação do Δ^9 -THC

Fonte: Yonamine, 2004.

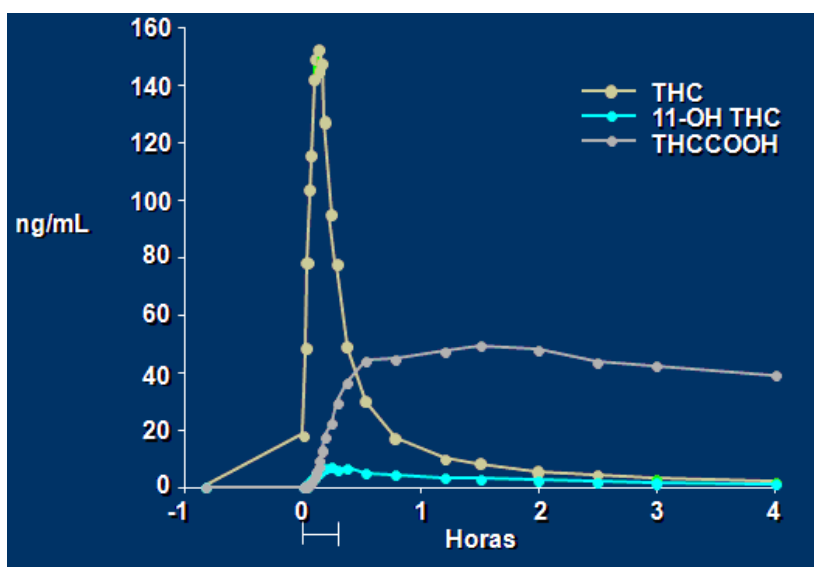
Os mecanismos farmacocinéticos envolvidos nestas biotransformações consistem principalmente em mudanças no complexo enzimático citocromo P450 que pode ser inibido ou induzido por algumas moléculas, afetando assim a biotransformação. O entendimento destes mecanismos é extremamente importante para a escolha de um regime terapêutico específico de cada medicamento. Os metabólitos canabinóides são conduzidos pela circulação enterohepática (CEH), a circulação que ocorre entre o intestino e o fígado. São excretados (65%) nas fezes ou encaminhados pela circulação renal e excretados na urina (35%) (YONAMINE, 2004).

Métodos analíticos foram desenvolvidos por Oliveira (2007) para a determinação - qualitativa e quantitativa - de canabinóides em várias matrizes biológicas, como a saliva, o sangue, o cabelo, a urina, o leite materno e gorduras corporais.

Dentre as substâncias analisadas, destacam-se, além do próprio THC, o CBD, CBN e mais dois metabólitos (OH-THC) e (COOH-THC). No sangue, as substâncias mais abundantes são o THC e THC-COOH, segundo Oliveira, (2007). A detecção de canabinóides em níveis sanguíneos oferece um método útil para avaliar o uso contínuo de maconha: concentrações de THC-COOH (principal metabólito do TCH) acima de 75 ng/mL em geral significam consumo regular da droga, ao passo que concentrações abaixo de 5 ng/mL estão associadas ao consumo ocasional. O THC-COOH pode ser detectado no sangue em até 36 horas (HUETIS, et al. 1996). A meia vida do THC é de cerca de 1 (um) dia para uso ocasional e de 3 a 5 dias quando do uso crônico.

Os metabólitos podem ser detectados no sangue até 6 dias após o último uso, sendo que traços podem persistir por mais de 4 semanas (YONAMINE, 2004). O gráfico 3 mostra os níveis de THC, 11-OH-THC e THCCOOH no plasma sanguíneo. Em níveis plasmáticos o Δ^9 -THC tem seu pico de máxima absorção entre 15-20 minutos. Neste tempo o metabólito THC-COOH é produzido pela biotransformação dos compostos 11-OH-THC e Δ^9 -THC.

Gráfico 3 – Níveis plasmáticos do THC, 11-OH-THC, THCCOOH.
Fonte: (HUETIS, et al. 1996).



A velocidade de excreção dos canabinóides no organismo humano é lenta, isso porque o THC é lipofílico (afinidade por gorduras) e pode se acumular nos tecidos ricos em gorduras. Os metabólitos canabinóides podem ser eliminados durante várias semanas após a interrupção do uso de maconha.

Na urina humana, podem ser encontrados canabinóides no período de 3 a 10 dias após o consumo, em usuários ocasionais, alargando-se este período até 1-2 meses nos consumidores crônicos (YONAMINE, 2004).

Em usuários crônicos em processo de abstinência o Δ^9 -THC pode ser detectado na urina de 20 a 60 dias após ausência do consumo da droga. Para *Cannabis* fumada nas concentrações de 1,75% e 3,5%, o tempo de detecção do Δ^9 -THC na urina é de 34 e 87 horas, respectivamente (HUETIS et al., 1996).

No cabelo, o THC é a espécie mais abundante e o derivado carboxílico THC-COOH é detectável em baixas concentrações. Os canabinóides CBN e CBD também são encontrados em quantidades relativamente altas no cabelo (CAMPOS, YONAMINE & MOREAU, 2003).

De acordo com Yonamine (2004), a presença do Δ^9 -THC na saliva parece ser devida principalmente à contaminação da cavidade oral após o ato de fumar maconha ou ingerir produtos da *Cannabis*, fato também comprovado nos trabalhos de Niebdala et al. (2001).

O Δ^9 -THC liga-se amplamente às proteínas plasmáticas e não ultrapassa prontamente do sangue para a saliva. Entretanto, para Menkes et al. (1991) apesar das concentrações de Δ^9 -THC não se correlacionarem muito bem com as concentrações plasmáticas, a presença deste canabinóide na saliva ainda pode ser razoavelmente interpretada como uso recente da erva.

Até o ano de 2000, não haviam sido publicados trabalhos da ocorrência de produtos de biotransformação do Δ^9 -THC na saliva (KINTZ et al., 2000). Porém, mais recentemente, métodos de detecção de Δ^9 -THC e seus produtos biotransformados em amostras de saliva, foram descritas na literatura (YONAMINE et al., 2004, 2003; CAMPORA et al., 2003; WOOD et al., 2003).

No suor, somente o THC pode ser encontrado numa concentração muito baixa. Nenhum trabalho conseguiu ainda estabelecer um método eficaz para a utilização desta matriz na detecção de canabinóides (RANG et al., 2004).

A dose absorvida após se ter fumado *Cannabis* varia entre 05 e 30mg com tempo de meia-vida de 30 minutos.

O metabólito THC-COOH apresenta meia-vida longa, cerca de 20 a 57 horas em usuários ocasionais e 03 a 13 dias em usuários regulares (RANG et al., 2004), por isso, este metabólito carboxílico pode ser uma fonte de confirmação do uso de *Cannabis* em certas matrizes biológicas, tais como sangue, urina, suor e cabelo.

3.4.8.3 Biossíntese dos canabinóides

De acordo com Sanchez e Verpoorte (2008), a biossíntese mostrada na figura 14 para uma série de canabinóides típicos parte por dois caminhos. Um deles a partir de polipeptídeos que estimulam a hexanoil-CoA e Malonil CoA produzindo o ácido olivetólico. O outro caminho é a partir do deoxi-xilose fosfato/metil-eritrol fosfato (DOXP/MEP) fornecendo o geranyl difosfato (GPP) (FELLERMEIER, et al., 2004). a partir dos dois caminhos os produtos são condensados pela fenilase geranyl difosfato olivetolato de geranyltransferase (GOT) para formar o ácido canabigerol (CBGA) como um substrato comum para três oxidações subsequentes, produzindo os ácidos canabidiólico (CBDA), tetrahydrocanabinólico (Δ^9 -THCA) e canabicromeno (CBCA), respectivamente, através de reação enzimática em presença das sintases.

As preniltransferases podem condensar unidades de isoprenos ou moléculas não isoprenóides para difosfato alílico e dependendo da especificidade destas preniltransferases produzem *cis* e *trans* prenildifosfatos (CONCEPCIÓN, 2006). O GOT, obtido pela isomerase, é o substrato para formar o ácido canabigerólico (*Trans*-CBGA). Este isômero pode ser transformado para CBDA por uma sintase, mostrado por Taura, et al. (1996) a partir da *Cannabis* e sugerem que provavelmente mais de uma forma isomorfa coexistem, dependendo do grau de conectividade da enzima com os metabólitos produzidos, pois algumas enzimas preservam a estereoespecificidade em função da mutarrotação (SANCHEZ; VERPOORTE, 2008).

A diferença nos dois mecanismos de reação para THCA e CBDA é a ciclização pela transferência de um hidrogênio, onde o CBDA sintase remove o H terminal do grupo metil do CBGA, segundo Taura et al., (1996). Por outro lado, THCA sintase promove o ataque do grupo OH a insaturação do CBGA.

A transformação do CBDA para CBEA numa suspensão de *Cannabis* em cultura de *Saccharum Ifficinarun* L. foi detectada utilizando enzimas epoxidase ou citocromo P-450 que produzem peróxidos e promovem a oxidação do radical livre do oxigênio reativo, conforme Sanchez e Verpoorte (2008). A transformação do CBCA para CBLA ocorre por oxidação branda sem que ocorra descarboxilação nos produtos de biotransformação. O CBNA é obtido pela oxidação do THCA (figura 14).

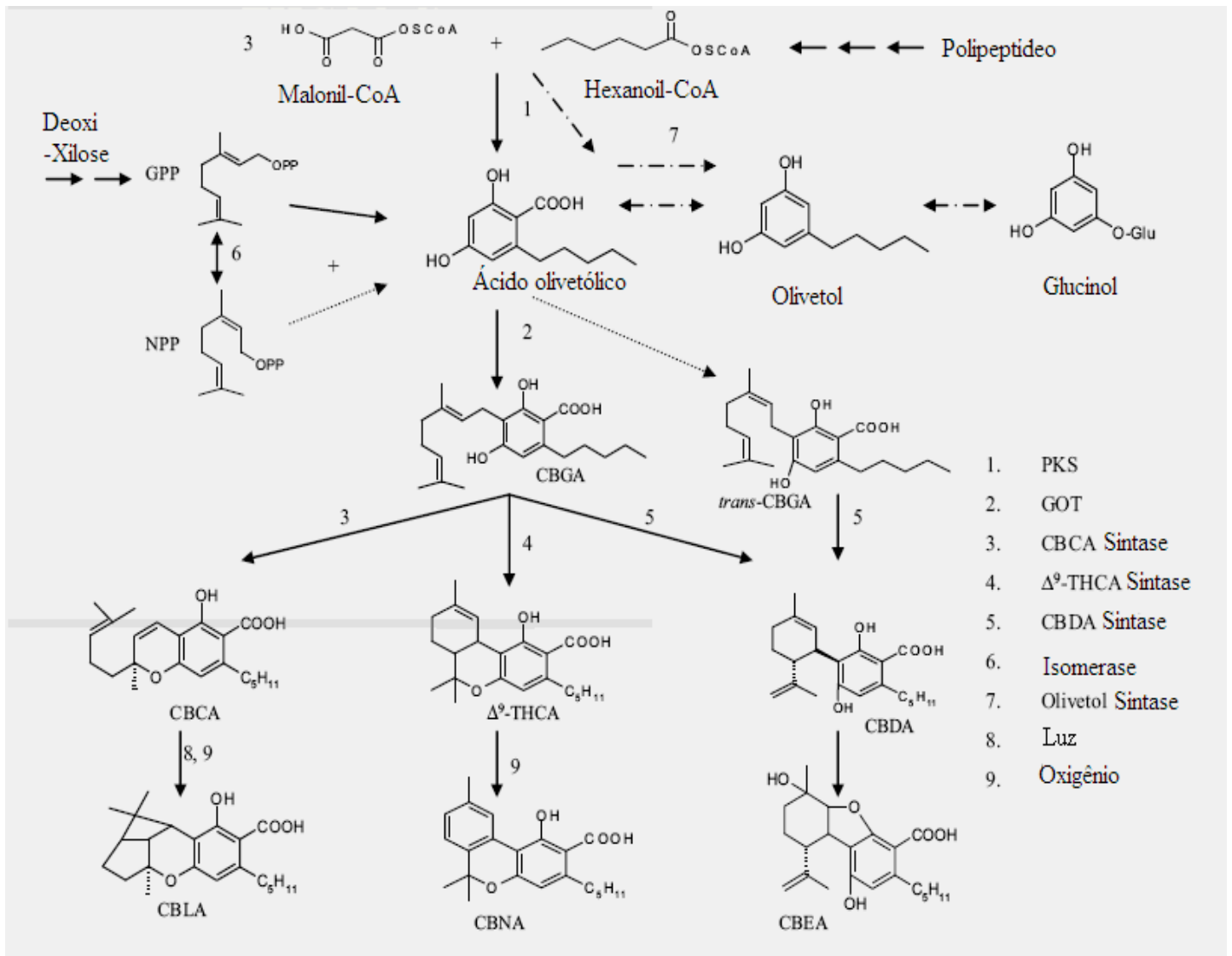


Figura 14 – Biossíntese de canabinóides clássicos e não clássicos

Fonte: Sanchez, Verpoorter, 2008

3.5 Metabólitos canabinóides

3.5.1 Definição de metabólito

Metabólito é um produto de uma reação de biotransformação. Os metabólitos canabinóides são obtidos por metabolismo secundário ocorrido na *Cannabis* (RADWAN et al., 2008). A fitoquímica da planta é muito complexa; mais de 480 compostos já foram identificados e representam diferentes classes químicas (RADWAN et al., 2008). Os metabólitos possuem propriedades diferentes das substâncias originais. Geralmente, apresentam atividade farmacológica reduzida e são compostos mais hidrofílicos, portanto, mais facilmente eliminados. Em alguns casos, podem apresentar alta atividade biológica e/ou propriedades tóxicas (WATANABLE et al. 2005).

3.5.2 Eliminação dos metabólitos canabinóides

A eliminação de um composto no organismo pode acontecer por mecanismos de excreção ou biotransformação. A excreção é a retirada do fármaco do organismo na forma inalterada e ocorre por diferentes vias e varia conforme as características físico-químicas da substância a ser excretada. Na excreção, o metabólito é eliminado inalterado do organismo.

Nas reações de biotransformações, há uma transformação na estrutura química da molécula, que por reações químicas, em etapas sucessivas, fornecem metabólitos destas moléculas que podem ser ativos e/ou inativos, (BENET et al., 1996). Na biotransformação o metabólito é formado por alterações químicas e permanece no organismo por um tempo e depois é excretado.

Atualmente, mais de 80 produtos de biotransformação do Δ^9 -THC já foram identificados. Os principais são: o 11-hidróxitetraidrocanabinol (11-OH-THC) e o ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol (COOH- Δ^9 -THC), e este último, quando conjugado com ácido glicurônico, fornece o (COOH- Δ^9 -THC-glicu). O derivado carboxilado é o principal produto de biotransformação comumente encontrado na urina (DRUMMER; ODELL, 2001).

Na tabela 3 são mostrados alguns metabólitos obtidos do Δ^9 -THC, Δ^8 -THC e CBN. Observa-se que dos 19 metabólitos totais, oito sofreram hidroxilação no carbono C₁₁, na porção terpenofenol da cadeia.

Os metabólitos do Δ^9 -THC também sofrem significativos ataques no carbono C₈. O ataque na posição C₇ também ocorre com certa frequência. Observa-se que os carbonos C₁₁, C₈ e C₇ são as posições mais susceptíveis ao ataque nucleofílico por hidroxilação.

Tabela 3 – Alguns metabólitos canabinóides clássicos com atividades biológicas.

Metabólitos Canabinóides	
<u>Metabólitos do Δ^9-THC</u>	
11-Hidróxi- Δ^9 -THC	8 β -Hidróxi- Δ^9 -THC
8 α -Hidróxi- Δ^9 -THC	8 α , 11-Dihidróxi- Δ^9 -THC
8-ceto- Δ^9 -THC	9,10-Epóxido do Δ^9 -THC
11-Carbóxi-1'-hidroxi- Δ^9 -THC	11-Carbóxi-2'-hidróxi- Δ^9 -THC
<u>Metabólitos do Δ^8-THC</u>	
11-Hidróxi- Δ^8 -THC	7 β -Hidróxi- Δ^8 -THC
7-Hidróxi- Δ^8 -THC	1'-Hidróxi- Δ^8 -THC
7 α ,11- Dihidróxi- Δ^8 -THC	7 β -Hidróxi- Δ^8 -THC
7-ceto- Δ^8 -THC	3'-Hidróxi- Δ^8 -THC
<u>Metabólitos do CBN</u>	
11-Hidróxi-CBN	11,2'-Dihidróxi-CBN
2'-Hidróxi-CBN	

Fonte: Drummer e Odell, 2001

3.5.3 Alterações químicas nos canabinóides

As alterações químicas provenientes das biotransformações ocorridas no organismo, comumente sob ação das enzimas, e dependente das condições físico-químicas, é um processo alternativo, em que os metabólitos formados possuem propriedades diferentes das moléculas originais, comumente com características mais hidrofílicas (MEYER, 1996). Em laboratório a conversão do canabinóide CBD para THC foi inicialmente proposta por Gaoni e Mechoulam, (1966). Algumas das alterações químicas mais importantes sofridas nas biotransformações dos canabinóides são descritas a seguir:

3.5.3.1 Descarboxilação

O calor pode produzir diversos metabólitos ácidos, que pela perda do dióxido de carbono (CO_2) converte-os em um canabinóide neutro (por exemplo, transforma a THCA em THC). As reações de biotransformações, no geral, acontecem aos compostos carboxilados. Os ácidos compõem até 40% do teor de canabinóides das plantas jovens. O stress oxidativo na *Cannabis* pode ser induzido por fatores severos (invasões patogênicas, stress UV (raios ultravioletas), herbicidas, dentre outros), segundo Sanchez e Verpoorter (2008). Na figura 15 é mostrado um diagrama esquemático de descarboxilação para alguns canabinóides.

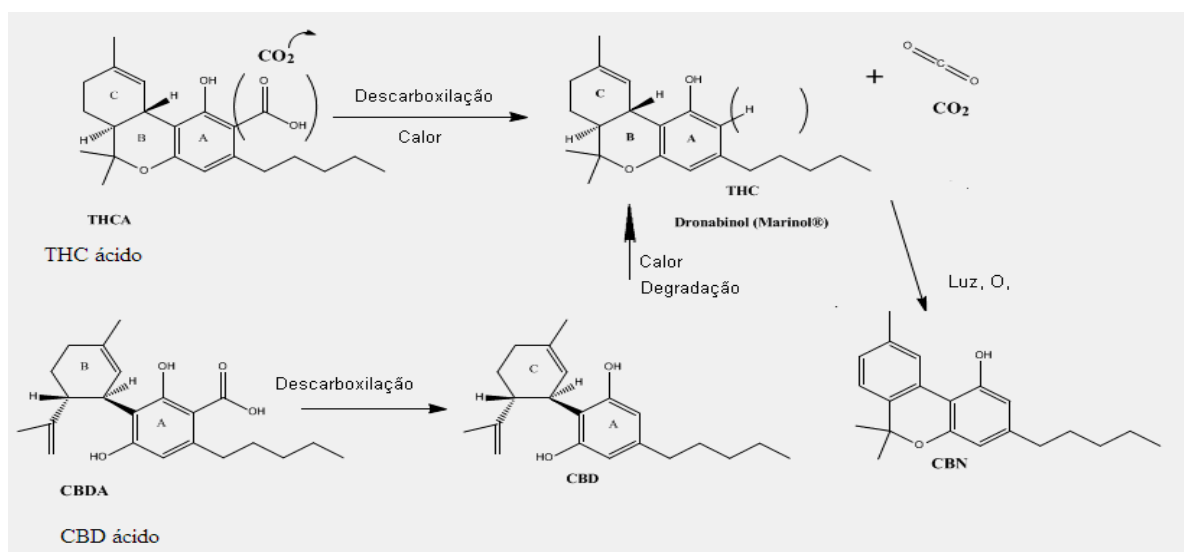


Figura 15 - Reações de descarboxilação aos ácidos canabinóides

Fonte: <http://cannabis-science.com/glossary.html>, acessado em novembro 2007.

3.5.3.2 Isomerização e oxidação

A isomerização pode ser um processo natural, sendo também influenciado por calor, luz e pH. As ciclizações estereoespecíficas e isomerização de canabinóides naturais de cadeia aberta a análogos THC foram descritas inicialmente por Yagen e Mechoulam, (1969). O THC é produzido pela biossíntese do canabidiol (CBD), sendo este último um derivado do canabigerol (CBG), obtido a partir de precursores não canabinóides (HAMMOND e MAHLBERG, 1994). O CBG é também o precursor do canabicromeno (CBC), figura 16a. Alguns outros canabinóides, (canabielsoin, canabinol e canabiciclol) são produzidos enzimaticamente.

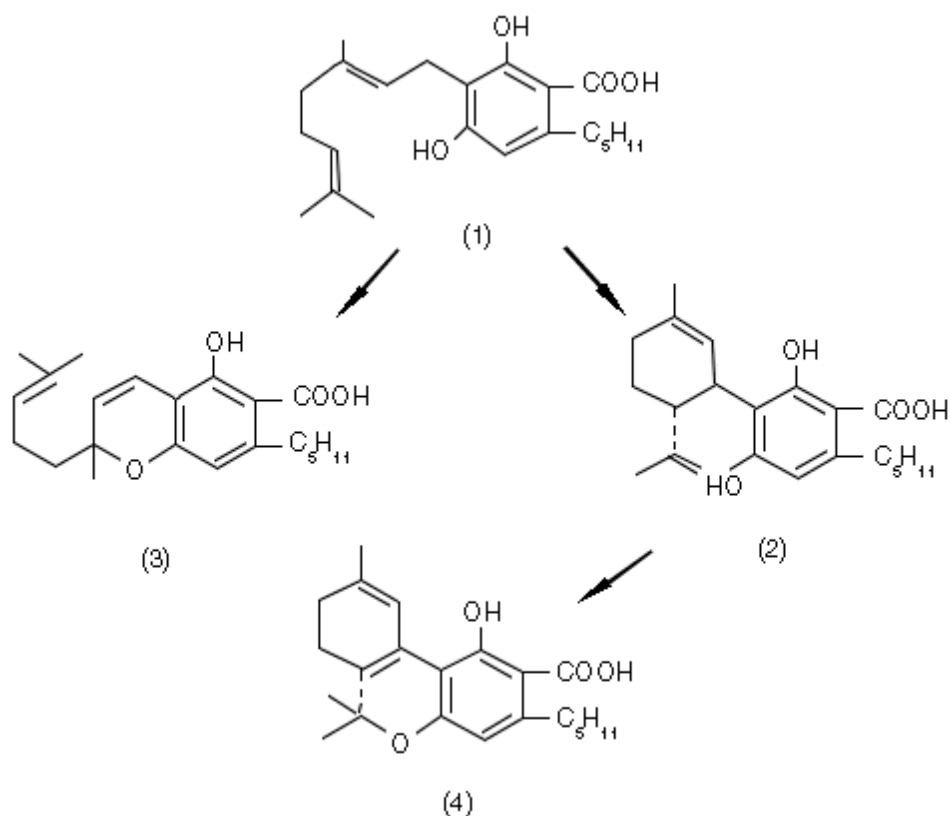


Figura 16a. Biossíntese dos ácidos canabinóides (Shoyama et al. 1975):
 1 = canabigerol (CBG), 2 = o canabidiol (CBD), 3 = canabicromeno (CBC),
 4 = Δ^9 - tetrahydrocannabinol (THC).

Fonte: Chemical ecology of Cannabis. David W. Pate International Hemp Association, Postbus 75007,1070 AA Amsterdam, The Netherlands.

<http://www.hempfood.com/lha/iha01201.html>

Recentemente a isomerização térmica de canabinóides foi descrita conforme o mecanismo representado na figura 16b. Estudos por cálculos teóricos confirmam ser este o mecanismo mais viável (GARCIA; 2009).

As reações de oxidação nos canabinóides podem ocorrer em regiões distintas na molécula: na ligação dupla, no próton alílico e na ramificação pentila (figura 16b), segundo Potter (2004), Sanchez e Verpoorter, (2008). A oxidação acontece na fase inicial, onde são formados os metabólitos 11-OH-THC, 8 α e 8 β -OH-THC e 11-COOH-THC. Outras reações como dehidrogenação, oxidações seletivas e reciclações resultam em baixa atividade biológica segundo Pertwee (2005).

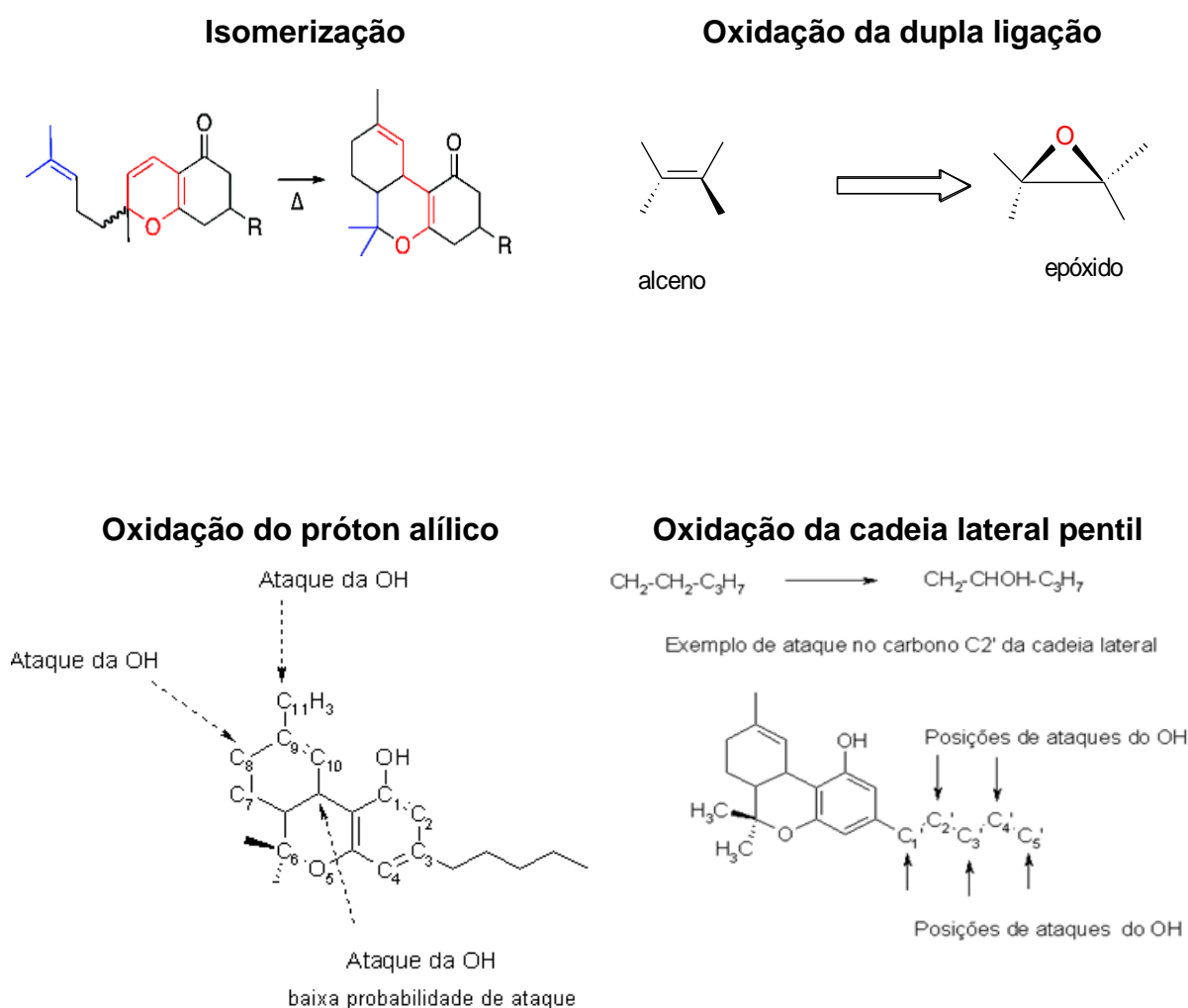


Figura 16b – Principais reações de oxidações primárias na cadeia do THC.

Fonte: http://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/bulletin/bulleti01_3_page005.html

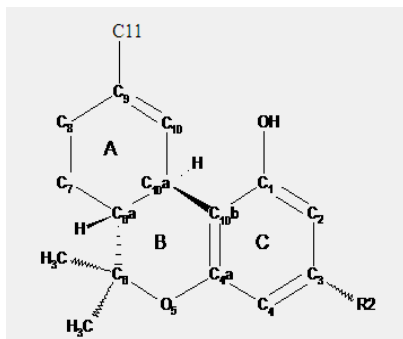
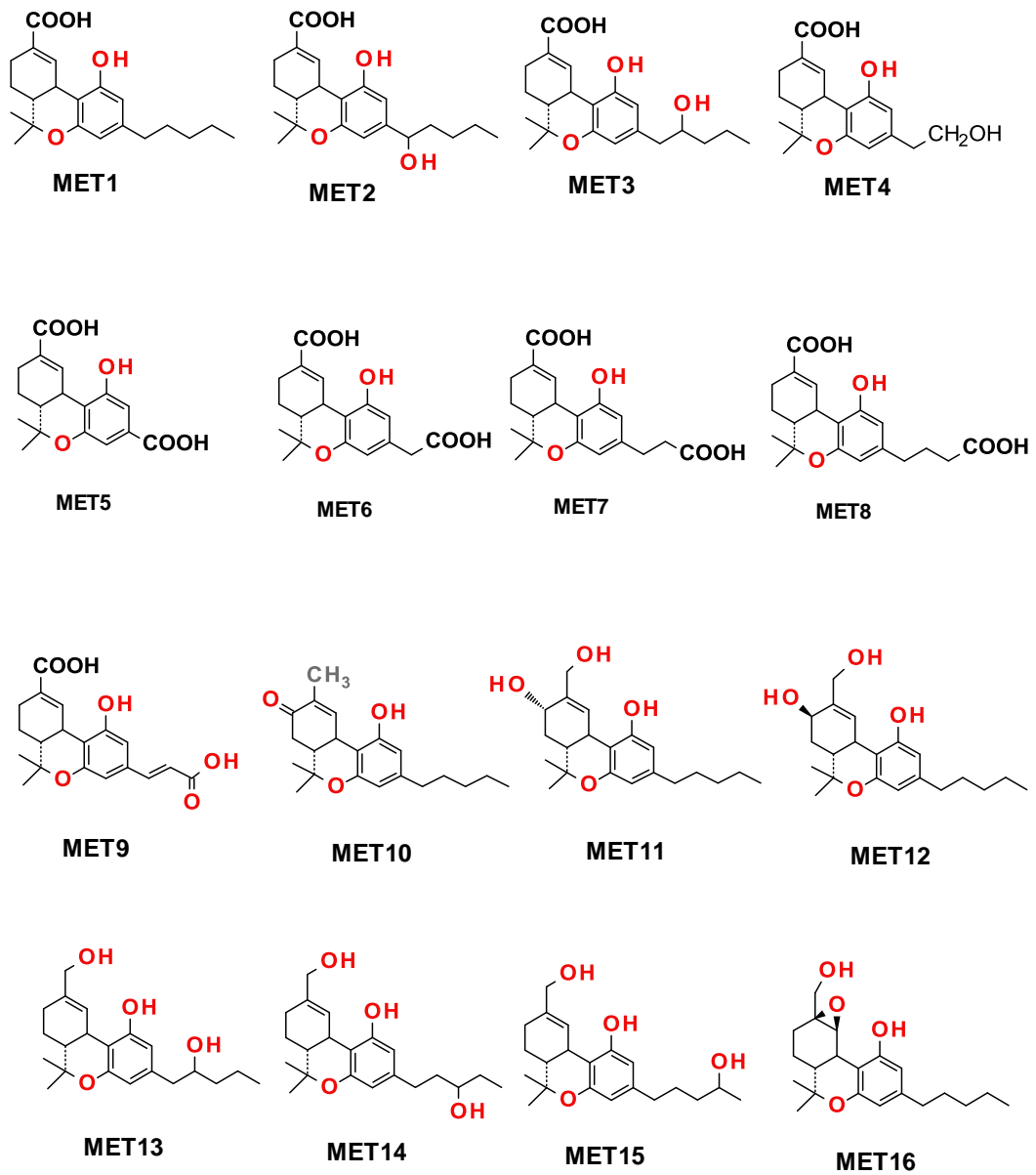
3.6 Metabólitos alvos deste estudo

Todos os metabólitos mostrados de forma aleatória nas figuras 17a e 17b, a seguir, foram utilizados neste estudo para efeitos de cálculos computacionais e técnicas quimiométricas e os fundamentos destes métodos serão descritos no capítulo 4 e os resultados, bem como a discussão destes, serão tratadas no capítulo 5. Todos os metabólitos ácidos e produtos de hidroxilação, citados nas figuras 17a e 17 b, são comumente encontrados na urina humana e os outros metabólitos não ácidos estão presentes no fígado (WAAL et al., 1979).

Selecionou-se para este trabalho os metabólitos canabinóides que apresentam grupos funcionais COOH e CH₂OH nas posições C-9 e OH em C-8, posições típicas de hidroxilações (DRUMMER; ODELL, 2001), e na cadeia lateral pentil, onde são susceptíveis à reações de oxidação, descrito por Cook et. al. (1982).

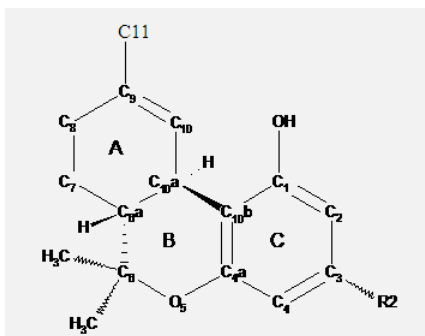
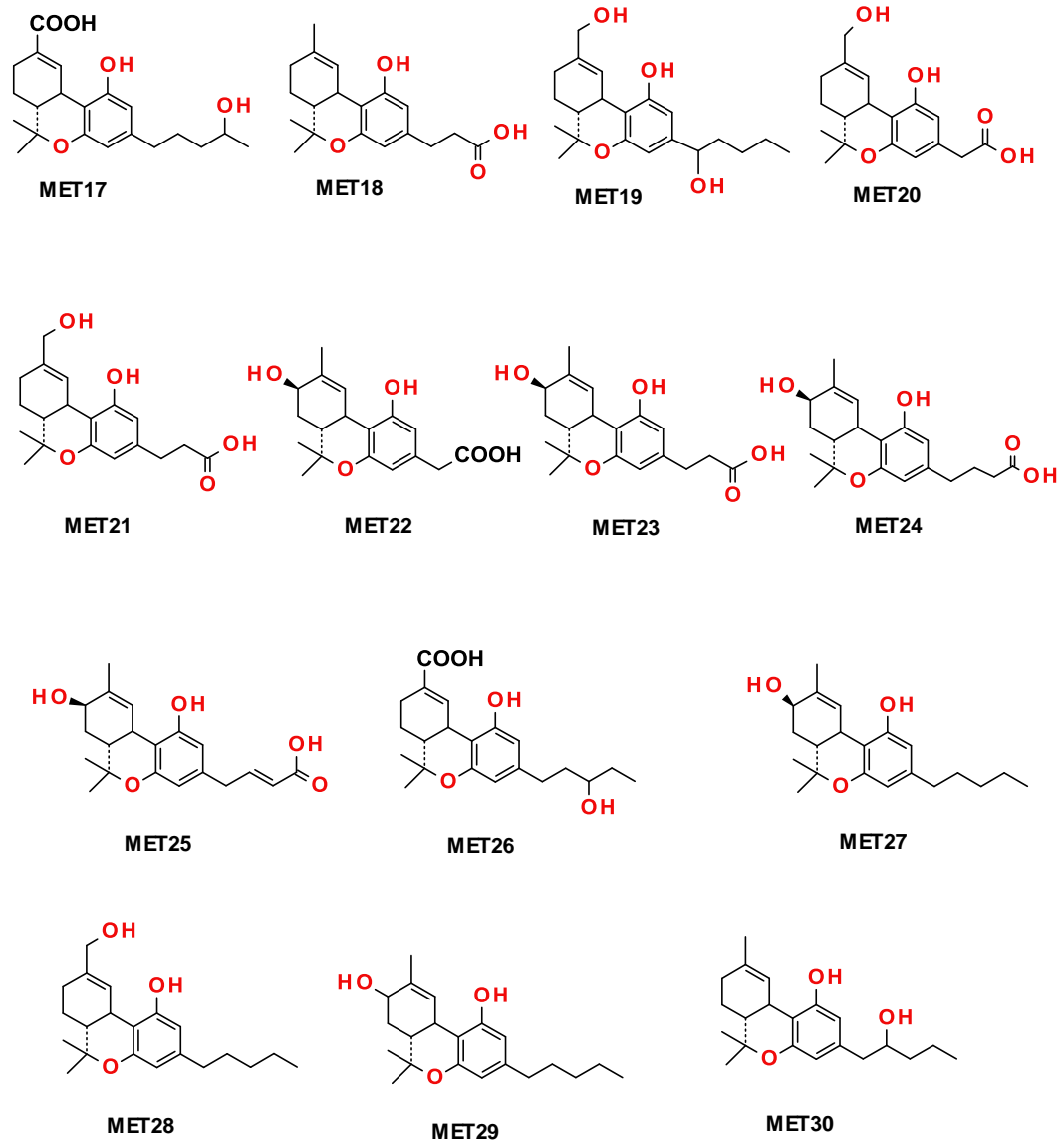
Na literatura, ensaios para detectar metabólitos canabinóides na urina foram realizados e alguns dos metabólitos presentes na figura 17a e 17b, especialmente aqueles que apresentam substituintes nas posições de interesse C-8, C-11 e cadeia lateral, seguiram o protocolo destes imunoenaios utilizando a técnica de especificidade/reatividade cruzada (definida como a concentração necessária para produzir uma resposta no ensaio equivalente ao corte de 20 ng / ml de ácido THC) (COOK et al., 1982).

Vários dos metabólitos hidroxilados apresentam alguma atividade segundo Perez-Reyes (1973), em contrapartida, o 9-COOH-THC apresentou pouca ou nenhuma atividade. Já o 11-OH-THC, demonstrou ter atividade igual ou maior do que o THC (PEREZ-REYES et al., 1972). Segundo William e Moffat (1980), mesmo que os metabólitos ácidos não apresentem psicoatividade, outros tipos de efeitos tóxicos não podem ser excluídos.



Sistema de numeração adotado no trabalho

Figura 17a – Estrutura geral dos metabólitos canabinóides (1-16)



Sistema de numeração adotado no trabalho

Figura 17b – Estrutura geral dos metabólitos canabinóides (17-30)

4. FUNDAMENTOS DOS MÉTODOS UTILIZADOS

4.1 Estudos da Relação Estrutura-Atividade

O planejamento racional de compostos biologicamente ativos, não é de fácil compreensão, tendo em vista que o mecanismo de ação biológica no organismo não será uma tarefa fácil de ser descrita, pois o resultado dos efeitos que estes exercem é um conjunto complexo de processos.

Segundo Martin (1978), o que se pode determinar, de maneira relativamente simples, é se a ação do fármaco se deve diretamente às suas propriedades físico-químicas ou à sua estrutura química.

A correlação de que a estrutura química de um determinado composto está interligada com a resposta biológica, é bem antiga, conforme esclareceu Korolkovas e Burckhalter (1982). O primeiro trabalho de QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) e SAR (Structure-Activity-Relationship) surgiu em 1869 com Crum-Brown e Fraser (1869), onde eles esclarecem que há uma relação entre a resposta biológica e a estrutura química. Os resultados quantitativos desta relação só vieram surgir e ser publicado, tempos depois, nos trabalhos de Taft (1960). Para Hansch (1995), as propriedades físico-químicas de compostos bioativos, reflexo de sua estrutura química, podem ser descritas quantitativamente se forem expressas por meio de parâmetros físico-químicos ou descritores estruturais adequados.

Estes conceitos fizeram desenvolver nova área do conhecimento: o estudo das relações entre a estrutura química e a atividade biológica, estudada nos anos 90 por Kubinyi (1995), Hansch (1995a, 1995b), Van der Waterbeend (1992) e Rekker (1992). Estas relações são estabelecidas a partir de estudos quantitativos ou qualitativos da estrutura molecular dos compostos *versus* a atividade biológica que estes exercem no organismo e são expressas por modelos matemáticos, que correlacionam descritores moleculares estruturais e eletrônicos de compostos análogos com a atividade biológica por eles desempenhada (HANSH, 1995). Os estudos de SARs e QSARs permitem racionalizar os principais fatores que governam a interação do composto ao receptor biológico.

No momento da interligação molécula – receptor, pode haver uma mudança na estrutura de ambas as espécies, uma vez que esta interação está diretamente relacionada às forças intermoleculares, à forma do transporte no interior da membrana e a distribuição da substância nos tecidos biológicos para alcançar seus respectivos sítios de ação. Desta forma, um conjunto extenso de propriedades moleculares e físico-químicas relacionadas deve ser considerado no estudo.

Conforme esclarece Fichera et al. (2000), são várias as propriedades, parâmetros e descritores moleculares que influenciam a atividade biológica de um composto no organismo, e fornecem informações acerca do formato, tamanho, simetria e distribuição dos átomos e são frequentemente utilizadas em estudos de estrutura-atividade. Barreiro (2001) acrescenta que além destas propriedades moleculares, há também aquelas propriedades que estão diretamente relacionadas às forças intermoleculares e as propriedades de transporte e distribuição.

Para Tavares (2004), entre as propriedades físico-químicas mais importantes para o estabelecimento da atividade biológica de fármacos, a distribuição eletrônica, a hidrofobicidade e a estereoquímica da molécula são as mais relevantes. De certa forma, cada uma das propriedades contribui com maior ou menor intensidade para o estabelecimento da resposta biológica, podendo ser representadas por descritores estruturais, que expressam de forma qualitativa e quantitativa a sua influência na bioatividade de compostos químicos.

Segundo Montanari & Montanari (2002), as validações em QSARs baseadas em sistemas biológicos incluem mudanças estruturais complexas em termos de fatores (i) eletrônicos, (ii) estéreo, (iii) lipofílicos e (iv) topológicos. Como não é o objetivo deste trabalho a discussão de todos os descritores é sim os mais relevantes para descrever psicoatividade, iremos nos ater apenas a alguns descritores que serão citados no texto que se segue.

Os estudos anteriores de SAR para canabinóides realizados por Arroio (2004) e Honório (2004) permitiram selecionar algumas propriedades eletrônicas, geométricas e hidrofóbicas que melhor descreveram o comportamento dos canabinóides a níveis moleculares. Os metabólitos canabinóides, *a priori*, devem seguir mecanismos de atuação similares de compostos chaves no organismo. Em função disto, neste trabalho, foram calculadas propriedades de descritores similares aos descritos nos trabalhos de Arroio (2004) e Honório (2004) para estudar a psicoatividade e analgesia de canabinóides.

4.1.1 Descritores moleculares calculados

4.1.1.1 Descritores eletrônicos empíricos

Estes parâmetros medem o efeito eletrônico de um substituinte sobre a variação da energia livre no momento da interação molécula–receptor, segundo Korolkovas e Burckhalter (1982). De acordo com Arroio (2004), desta categoria tem-se informações de que modo eventuais alterações nos substituintes de uma molécula podem modificar a sua distribuição de carga como um todo. Estes descritores medem as propriedades de polarizabilidade de uma molécula. Três descritores podem fornecer estas informações: momento dipolar $\vec{\mu}$, polarizabilidade α e refratividade molar (MR) e todos eles foram calculados neste estudo e estão descritos a seguir.

4.1.1.1.1 Momento dipolar

O momento dipolar $\vec{\mu}$ mede a magnitude da carga deslocada numa molécula. É um parâmetro relacionado à distribuição de cargas quando átomos de eletronegatividades diferentes estão ligados. O momento dipolar elétrico $\vec{\mu}$ é o produto da carga q_1 pelo vetor distancia \vec{d} , fornecendo a expressão mostrada na equação 1 a seguir.

$$\vec{\mu} = \vec{d} * q_1 \quad (1)$$

A direção do momento dipolar de uma molécula é baseada na eletronegatividade relativa dos átomos que a compõem. O valor é obtido pelo vetor resultante dos momentos de dipolo de cada ligação presente na molécula.

O momento dipolar é uma medida da assimetria da distribuição de carga, onde seu vetor é um valor numérico nas três dimensões expresso em unidades de Debye (D) e é estimado em função da geometria molecular.

Sendo assim, pode fornecer informações a cerca da reatividade ou das forças intermoleculares existente entre os átomos agregados.

Para Arroio (2004) e Honório (2004), a presença de substituintes com eletronegatividades diferentes altera propriedades moleculares como acidez e basicidade de um composto, de forma que os momentos dipolares podem esclarecer dúvidas sobre a reatividade do mesmo.

4.1.1.1.2 Polarizabilidade

Polarizabilidade é uma propriedade que mede a tendência com que uma nuvem eletrônica sobre um átomo ou molécula se deforma na presença de um campo elétrico. De acordo com Allinger (1977), quanto mais polarizável for uma molécula, maior será sua tendência a unir-se a outras moléculas, pois será maior a força de van der Waals entre elas. Como consequência, há a distorção na geometria molecular e a polarizabilidade é a medida da magnitude de quanto à molécula pode polarizar-se nos seus dipolos para suportar esta distorção, sendo estimada pela constante de proporcionalidade representada pela letra (α).

Allinger (1977) ainda comenta que em relação aos átomos ligados, pode-se dizer que o tamanho influencia a polarizabilidade. Átomos grandes serão mais polarizáveis do que átomos pequenos, devido ao maior número de elétrons de ligação, e estes por estarem mais distantes dos núcleos atômicos estão mais livres para se moverem. Contudo, os elétrons de ligação, por pertencerem aos dois núcleos dos dois átomos, são menos polarizáveis se compararmos aos pares de elétrons livres. Sendo assim, moléculas que contêm heteroátomos, tais como oxigênio e nitrogênio, são mais polarizáveis do que as que possuem átomos de carbono e hidrogênio.

Para o cálculo da polarizabilidade foi utilizado o método elaborado por Miller (1990). Segundo ele a polarizabilidade atômica efetiva (α_d) é definida como:

$$\alpha_d = \frac{N - n_i}{d} \sum \tau_i \quad (2)$$

Sendo que: α_d - polarizabilidade efetiva; N - número total de elétrons excluindo do átomo central A; n_i - é o menor número de ligações entre o átomo central A; d - constante com valor 0,75, e τ_i - contribuição em polarizabilidade de cada átomo

Existe uma relação do momento dipolar induzido e o campo elétrico já que a polarizabilidade avalia a facilidade com que uma molécula tem em mudar sua configuração ao interagir com a radiação eletromagnética, podendo ser avaliada pela razão entre o momento de dipolo induzido, μ , e o campo responsável pelo momento, ε_0 , de forma que:

$$\alpha = \frac{\mu_{0k}}{\varepsilon_{0k}} \quad (3)$$

α = polarizabilidade, μ_{0k} = momento de dipolo elétrico induzido do sistema;

ε_{0k} = campo elétrico aplicado.

Uma molécula com um momento dipolar igual a zero e localizada num campo elétrico externo faz o campo deslocar os centros das cargas positiva e negativa, ocorrendo assim uma polarização da molécula e gerando um momento dipolar induzido. A polarização (P) de uma substância está relacionada a sua densidade e momento de dipolo elétrico. O vetor da densidade de carga D é a soma do efeito do campo aplicado e da polarização, $D = \varepsilon_0 E + P$, mas $D = \varepsilon E$, $\varepsilon_r = \frac{D}{\varepsilon_0 E}$, $P = (\varepsilon_r - 1) \varepsilon_0 E$.

A permissividade dielétrica no vácuo (ε_r) está relacionada a polarizabilidade molar no meio P_m usando a equação de Debye e temos que:

$$\frac{\varepsilon_r - 1}{\varepsilon_r + 2} = \frac{\rho P_m}{M} \quad (4)$$

Sendo que ρ é a densidade de massa (kg m^{-3}), e M é a massa molar (kg). O termo $(\varepsilon_r + 2)$ vem da relação entre o campo local (E') e o campo aplicado (E), então $E = (E/3) (\varepsilon_r + 2)$.

A polarizabilidade da molécula é a constante de proporcionalidade entre o momento de dipolo induzido μ^* e o campo de força E , ($\mu^* = \alpha E$). N_A é o número de Avogadro, K é a constante de Boltzmann ($=R/N_A$), T é a temperatura absoluta e μ é o momento de dipolo permanente. A polarizabilidade molar média é definida pela equação 5.

$$P_m = \frac{N_A}{3\epsilon_0} \left(\alpha + \frac{\mu^2}{3KT} \right) \quad (5)$$

A polarizabilidade pode ser dada em volume (α') frequentemente expressa pela equação 6.

$$\alpha' = \frac{\alpha}{4\pi\epsilon_0} \quad (6)$$

4.1.1.1.3 Refratividade molar

A refratividade molar MR é uma propriedade de grande importância no estudo da relação estrutura-atividade, segundo Verma e Hansch (2005).

Charton & Charton mostraram que os volumes de van der Waals são, em geral, muito correlacionados com a MR , que também pode representar fatores de polarizabilidade ao invés de fatores estéreos. Esta observação é claramente estabelecida já que a MR está relacionada com o volume molar pela equação de Lorenz-Lorentz, onde $MR = (n^2 - 1/n^2 + 2) MW/\rho$. O intervalo de variação do índice de refração é pequeno e, conseqüentemente, MR é, em essência, o volume molar ajustado que contém uma contribuição eletrônica.

A polarização de uma substância é mostrada na equação 7, pois quando a relação de Maxwell $n^2 = \epsilon$ é estabelecida, a refratividade molar iguala-se à polarização molar, $P_m = (\epsilon - 1) (\epsilon + 2) \times MW/d$, onde ϵ representa a constante dielétrica (MONTANARI et. al., 2002).

A refratividade molar também pode ser representada por (η_r) se está relacionada a velocidade da luz no vácuo (c) e no meio (c'); $\eta_r = c/c'$.

Relacionam-se também a permissividade relativa (ϵ_r), o coeficiente de absorção (α) e o comprimento de onda (λ), todos mostrados na equação 7, (GONÇALVES et al., 2006).

$$n_r^2 = E_r + \left(\frac{\lambda\alpha}{4\pi} \right)^2 \quad (7)$$

Domine et al. (1994) acrescentou que a refratividade molar também sofre influência da polarizabilidade molar. Para estes autores o intervalo de variação do índice de refração é pequeno e, conseqüentemente, MR é, em essência, o volume molar ajustado que contém uma contribuição eletrônica. Cammarata (1971) mostrou a dependência da refratividade molar com o parâmetro lipofílico log P (BUSTAMANTE; 1971).

Montanari et al. (2002) comentam que há dependência da MR com o parâmetro lipofílico Log P e uma consequência natural é que MR também pode ser dependente de P, já que ambos dependem do volume molar. A refratividade molar é uma medida que permite informações a cerca do encaixe da molécula com seu respectivo receptor, pois está correlacionada com a conformação tridimensional da estrutura molecular do fármaco (DUNN, 1980, 1977).

Para Tavares (2004), o valor de MR de um determinado grupo substituinte também pode ser relacionado com a sua lipofilicidade, sendo assim, os valores de MR também podem expressar o caráter lipofílico de grupos substituintes e deles depender diretamente, sendo possível haver colinearidade ou ortogonalidade entre eles. Nos cálculos computacionais, a refração molar de uma substância é aproximadamente a soma das refrações dos grupos eletrônicos.

Os valores de refratividade crescem em função da carga nuclear para um grupo particular de elétrons – os elétrons internos – que estão fortemente ligados ao núcleo. Portanto, é menos susceptível de deformação por um campo externo aplicado, como também contribuem muito menos para a refração de um composto. Sendo assim, quanto maior a parte polar de uma molécula, maior o valor da refratividade molar (DUNN, 1997).

De acordo com Tavares (2004), vários outros descritores estruturais de caráter eletrônico podem ser definidos por meio da observação de variações em propriedades físico-químicas de compostos químicos sensíveis ao efeito eletrônico de grupos substituintes.

O método utilizado neste trabalho para estimar o valor da refratividade molar para os compostos estudados foi o método de Ghose e Crippen (1987) usando-se a expressão: $MR_{\text{calc}} = \sum n_i a_i$. Sendo que: n_i é o número de átomos do tipo i ; e a_i é a contribuição correspondente.

4.1.1.2 Descritores eletrônicos não empíricos

São descritores que servem para descrever o sítio da molécula e a distribuição de carga para cada átomo (LABUTE, 2000). São aqueles que se baseiam nos cálculos dos orbitais de fronteira e podem ter de uma a várias quantidades para cada molécula. Como são descritores provenientes de parâmetros eletrônicos, o objetivo é descrever o comportamento das propriedades eletrônicas das moléculas influenciada pela presença de certos grupos funcionais na densidade de distribuição de cargas.

Os parâmetros eletrônicos não empíricos, ou semi-empíricos, são calculados em geral para cada átomo ou grupo de átomos e mostram informações específicas tais como: energia eletrônica, energia total, calor de formação, energia dos orbitais ocupados de maior energia (HOMO), energia dos orbitais desocupados de menor energia (LUMO), dureza molecular, eletronegatividade, moleza molecular e potencial de ionização e estão descritos a seguir.

4.1.1.2.1 Energia eletrônica

Utiliza-se a aproximação de Born-Oppenheimer para determinar a energia eletrônica dos átomos pela resolução da equação eletrônica de Schrödinger para os núcleos em posições fixas. Repete-se o procedimento para diversas configurações de núcleos fixos. Obtido o valor mínimo de energia eletrônica, tem-se a configuração nuclear correspondente a geometria de equilíbrio da molécula (ARROIO, 2004; HONORIO, 2004).

A energia obtida é a energia eletrônica do sistema, calculada através de uma série de equações, chamadas equações de Hartree-Fock, onde se assume que cada elétron se move no campo médio produzido pelos demais elétrons e pelos núcleos.

4.1.1.2.2 Energia total

É medida pelo somatório das energias de repulsão internuclear e energias eletrônicas das moléculas (ARROIO, 2004). Na prática, as posições dos núcleos são modificadas por meio de algum algoritmo adequado, resolvendo-se a equação de Schrödinger para os elétrons a cada conjunto de posições nucleares.

As energias totais correspondentes a cada conjunto são comparadas até que a energia não varie entre duas estruturas consecutivas, dentro de um limite pré-determinado. Além disso, a primeira e a segunda derivadas da energia em função dos parâmetros da estrutura podem ser calculadas para se verificar se a energia da estrutura é um mínimo real da superfície de energia potencial.

4.1.1.2.3 Energia dos orbitais de fronteira (HOMO) e (LUMO)

Os orbitais moleculares definidos como orbital molecular ocupado de mais alta energia – *Highest Occupied Molecular Orbital* (HOMO) e orbital molecular desocupado de mais baixa energia – *Lowest Unoccupied Molecular Orbital* (LUMO) são bem utilizados nos estudos de diversos parâmetros de interesse farmacológico e para avaliação da relação estrutura-atividade (DEWAR, 1990).

Uma molécula pode exibir vários estados vibracionais e conseqüentemente existem níveis rotacionais relacionados a este estado vibracional, com separação energética muito pequena. O espectro eletrônico envolve transições entre estados vibracionais e rotacionais do estado eletrônico fundamental para um estado eletrônico excitado. Sendo assim, podem existir transições entre qualquer estado vibracional do estado eletrônico fundamental a qualquer outro nível adequado do estado excitado. Portanto, pode-se calcular teoricamente a probabilidade total de um sistema estar num determinado estado. Uma das formas de realizar estes cálculos é através dos orbitais de fronteira, HOMO e LUMO.

Se a energia do HOMO é alta, maior a capacidade doadora da molécula; por outro lado se a energia do LUMO é baixa, maior a capacidade aceptora da molécula.

Logo, a partir dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO, pode-se determinar o caráter eletroaceptor e eletrodoador dos compostos canabinóides com seus respectivos receptores cerebrais.

A relevância do estudo dos orbitais HOMO e LUMO com os canabinóides foram abordados por Honório et al., (2006), Arroio (2004) e Da Silva (1995). Nestes trabalhos os autores comentam que a energia do LUMO é importante para entender o comportamento da psicoatividade de um conjunto de canabinóides. Nestes trabalhos foram realizados cálculos com os orbitais HOMO, HOMO-1, HOMO-2, LUMO, LUMO+1, LUMO+2.

4.1.1.2.4 Dureza e moleza

A dureza absoluta representa a resistência da molécula à deformação ou à mudança (PEARSON; PALKE, 1992). Moleza representa a facilidade com que uma molécula se deforma, e dureza a resistência à deformação (PARR; CHATTARAJ, 1991). Estes conceitos de “mole” e “duro” foram formulados de acordo com o conceito de ácidos e bases de Lewis.

Para uma base “mole”, o átomo doador tem alta polarizabilidade e baixa eletronegatividade e está associado a orbitais vazios de alta energia e estes são inacessíveis.

Para os ácidos, os “moles” são aqueles que o átomo aceptor é de grande tamanho e têm pequena carga positiva e seus elétrons externos estão mais soltos e facilmente excitáveis. Nos ácidos “duros”, o átomo que recebe elétrons possui elevada carga positiva e tem tamanho pequeno e não possui elétrons facilmente excitáveis.

Conforme comentam Arroio e Honório (2004), os cálculos de dureza (η) e moleza (S) se baseiam nestas características citadas acima, mas por questões de quantificação utilizam medidas do potencial de ionização (PI) e afinidade eletrônica (AE) ou até das energias do HOMO e LUMO conforme equações 8 e 9.

Moléculas com elevados potenciais de ionização e eletronegatividades (baixa afinidade eletrônica) possuem elevada dureza absoluta. A equação 10 representa a relação entre a dureza e a moleza.

$$(\eta) = \frac{1}{2} (PI - AE) \quad (8)$$

$$\eta = \frac{1}{2} (E_{LUMO} - E_{HOMO}) \quad (9)$$

$$S = 1/\eta \quad (10)$$

Neste trabalho, para efeito de cálculos, só foram obtidos valores de dureza pois buscou-se obter informações acerca da resistência à deformação nas moléculas canabinóides (PEARSON; PALKE, 1992; PARR; PEARSON, 1991).

4.1.1.2.5 Eletronegatividade

A eletronegatividade (χ) pode ser usada como parâmetro para estimar a capacidade que uma molécula tem de atrair elétrons de outra molécula quando elas se aproximam (PARR; PEARSON, 1991). Segundo Mulliken (1934), a eletronegatividade é definida pela equação 11. A transferência de elétrons entre duas moléculas é dirigida pelas diferenças do potencial químico.

Sanderson (1954) propôs o princípio da igualação da eletronegatividade: "quando dois ou mais átomos, inicialmente possuindo eletronegatividades diferentes, ligam-se para formar um composto, suas eletronegatividades tornam-se ajustadas a um valor intermediário dentro do composto", ou seja, o potencial químico em um sistema em equilíbrio é igual em toda a parte. Quando duas moléculas se aproximam, o potencial químico deve ser igualado para os dois sistemas em equilíbrio. Neste caso, o potencial químico (eletronegatividade) será uma propriedade de estado do sistema (DUARTE, 2001).

$$\chi = \frac{1}{2} (PI + AE) = \frac{1}{2} (E_{HOMO} - E_{LUMO}) \quad (11)$$

Sendo que AE - é a afinidade eletrônica; e PI - o potencial de ionização.

4.1.1.2.6 Potencial de ionização

O Potencial de ionização (PI) de um átomo é a força com que um elétron está ligado a um átomo. Representa a energia necessária para retirar um elétron do orbital molecular mais alto ocupado. Este parâmetro é calculado segundo o teorema de Koopmans (1934), como sendo o valor negativo da energia do HOMO, ou seja:

$$PI = - E_{\text{HOMO}} \quad (12)$$

Quando o composto é ativo na sua forma iônica o potencial de ionização é um descritor importante. Altos graus de ionização acarretam aumento da atividade biológica de uma molécula. Por outro lado, se a molécula é ativa na forma não dissociada, o aumento do grau de ionização reduzirá a atividade biológica (KOROLKOVAS, 1982).

4.1.1.2.7 Afinidade eletrônica

Em relação aos valores de afinidade eletrônica (AE), são por sua vez iguais aos dos correspondentes primeiros orbitais não ocupados (LUMO), ou seja:

$$AE = - E_{\text{LUMO}} \quad (13)$$

4.1.1.2.8 Energia de hidratação

A energia de hidratação ($E.H.$) permite avaliar a estabilidade de diferentes conformações moleculares e pode estar relacionada com o transporte da molécula nas biofases (local de ação do fármaco) aquosas. Maiores energias de hidratação são conseqüências de maiores absorções de energia ao entrar em contato com moléculas de água, sendo característica de uma reação endotérmica (ARROIO, 2004). Em contrapartida, os compostos que apresentam os menores valores de energia de hidratação são os que ao entrar em contato com moléculas de água, liberam certa quantidade de energia, tipicamente de uma reação exotérmica. Esta propriedade mede o calor de hidratação em kcal/mol (HONORIO, 2004).

Devido à natureza parcialmente lipídica das membranas celulares o caráter hidrofílico (facilidade de se locomover em água) e lipofílico (facilidade de se locomover em lipídios) dos fármacos é parâmetro importante para prever a passagem de um fármaco através das camadas, sendo aqueles mais lipofílicos os que possuem maior facilidades em atravessar as camadas lipídicas(TAYLOR, 1990).

4.1.1.3 Descritores hidrofóbicos

Estes descritores medem o grau de atração do fármaco pelos lipídios e pelas regiões hidrofóbicas das macromoléculas, segundo Korokolvas (1982). Estão relacionados, de um lado, com o transporte do fármaco desde a exobiofase (região que antecede a fase de ação do fármaco) até o compartimento do receptor, e, de outro, com a possibilidade de atração e interação entre regiões hidrofóbicas do fármaco e do receptor.

Kubinyi (1995), Hansch et al. (1995) e Tavares (2004) correlacionaram que a resposta biológica produzida por compostos bioativos está diretamente relacionada com os mecanismos de absorção, distribuição e transporte nas biofases.

Os processos de absorção e distribuição de fármacos são regulados basicamente pela sua hidrofobicidade e para que haja o transporte é necessário permeabilidade nas interfases das membranas biológicas e nos respectivos sítios de ação dos fármacos.

Os descritores hidrofóbicos apresentam estas propriedades por estarem relacionados à solubilidade e transporte nas fases orgânicas e aquosas (WERMUTH, 2000).

Inúmeras correlações encontradas entre a atividade biológica e a hidrofobicidade de compostos bioativos, tratadas por Tavares (2004), demonstraram que esta propriedade desempenha papel fundamental na bioatividade, embora seja apenas uma das várias propriedades físico-químicas que, atuando conjuntamente, determinam a expressão da atividade biológica de alguns compostos.

Para Tavares (2004), é importante reconhecer que a hidrofobicidade de um fármaco determina a extensão e velocidade de sua absorção e distribuição, a sua capacidade de ligação ao sítio receptor, bem como a sua biotransformação e excreção.

O entendimento destas etapas envolve, por um lado, o conhecimento da estrutura, função e propriedades das membranas biológicas e, por outro, o conhecimento da estrutura e das propriedades físico-químicas do fármaco, como tamanho e forma da molécula, seu grau de ionização e lipossolubilidade relativa de suas formas neutra e ionizada.

Os descritores hidrofóbicos medem as propriedades de lipofilicidade (ou hidrofobicidade) e o grau de atração do fármaco nas membranas lipídicas e pelas regiões hidrofóbicas dentro das biofases e exobiofases: O coeficiente de partição da substância na fase orgânica e fase aquosa e os parâmetros cromatográficos são os descritores mais utilizados para estes fins. Neste trabalho o coeficiente de partição foi o descritor estudado para descrever as propriedades de hidrofobicidade.

4.1.1.3.1 Coeficiente de partição – Log P

O coeficiente de partição (Log P) de uma determinada espécie química é um parâmetro que mede a hidrofobicidade de um composto nas biofases aquosa ou orgânica no interior das células (WERMUTH, 2000). Portanto, é a razão entre as concentrações que se estabelecem nas condições de equilíbrio de uma substância química, quando dissolvida em sistema constituído por uma fase orgânica e uma fase aquosa, e está associado à mudança da energia livre provocada pela substância sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema (TAVARES, 2004).

Esta relação pode ser expressa pela equação:

$$P = [\text{orgânica}]/[\text{aquosa}] \quad (14)$$

Sendo P o coeficiente de partição do composto analisado; [orgânica] é a concentração do composto na fase orgânica nas condições de equilíbrio; e [aquosa] é a concentração da substância na fase aquosa nas condições de equilíbrio.

Em geral, a fase orgânica é medida numa solução de n-octanol. Os valores obtidos são pequenos e na forma logaritimada (Log P). Valores de P maiores que a unidade, ($P > 1$), são obtidos para os compostos hidrofóbicos (ou lipofílicos). Os compostos hidrofílicos (ou lipofóbicos) apresentam valores de P menores que 1 ($P < 1$) (TAVARES 2004).

Nos casos dos substratos, o mecanismo de transporte é medido nas membranas biológicas. O sistema n-octanol/água é vantajoso devido a membrana ser constituída de lipídeos, que por ter maior carácter lipofílico, dissolve mais o composto orgânico (DUNN, 1977). Embora existam diferentes métodos para cálculos de Log P, utilizou-se neste trabalho o método de Villar (ALKORTA, VILLAR, 1992).

Considerando-se que o coeficiente de partição é um dos parâmetros físico/químicos mais amplamente utilizados em estudos de QSAR e amplamente pesquisados por Hansch (1990), Kubinyi (1995), Martin (1981), Wermuth (2000) e que sua determinação é frequentemente necessária, especialistas optaram por definir outros sistemas de solventes. Assim, o sistema n-octanol/tampão fosfato pH 7,4 é considerado também um sistema para a determinação do coeficiente de partição visando a aplicação em estudo de QSAR e foi estudado por Martin (1981) e Wermuth (2000) e Leo (1990).

Em 1965, Boyce and Milborrow observaram uma correlação entre o coeficiente de partição das substâncias e os respectivos valores do parâmetro cromatográfico R_m . Estes autores encontraram que a diferença dos valores de R_m de substâncias de estrutura R_x e outra substância de estrutura R_h . A constante hidrofóbica do substituinte X (π) será:

$$\pi = R_{R_x} - R_{R_h} \quad (15)$$

O valor de R_m é calculado com base no valor de R_f em cromatografia em camada delgada em fase reversa (fase estacionária hidrofóbica, fase móvel polar; as substâncias menos polares interagem mais efetivamente com a fase estacionária, portanto, as substâncias menos polares permanecem mais retidas, apresentando R_f menor que as mais polares). Kubinyi (1995) verificou que o valor R_f se relaciona com R_m pela equação 16 e R_m se relaciona com o coeficiente de partição ($\text{Log } P$) por meio da equação 17.

$$R_m = L \left(\frac{1}{R_f} - 1 \right) \quad (16)$$

$$\text{Log } P = R_m \quad (17)$$

Sendo que R_m mede a distância percorrida em relação a um composto considerado como padrão “ a ”; R_f é a razão entre a distância percorrida pelo composto e a distância percorrida pelo eluente; $\text{Log}P$ é o coeficiente de partição do composto analisado; e “ b ” é o coeficiente linear da equação. Para Kubinyi (1995), o tempo de retenção em HPLC é quantitativamente descrito pelo fator de capacidade (k') dado pelo tempo de retenção normalizado, ou seja:

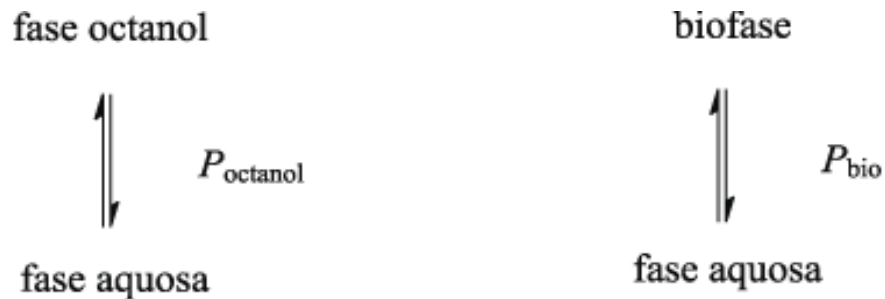
$$k' = (T_R - T_0) / T_0 \quad (18)$$

Sendo que k' é o fator de capacidade; T_R é o tempo de retenção e T_0 é o tempo de eluição do solvente. A Relação entre $\text{Log}k'$ e $\text{Log}P$ (n -octanol/tampão) é possível ser observada aplicando-se a equação de Collander (1961).

A hidrofobicidade expressa em termos de k' é de natureza relativa, uma vez que é necessária a utilização de compostos de referência. Tavares (2004) comenta que determinações do coeficiente de partição utilizando ensaios cromatográficos, como CCD ou HPLC, permitem certo grau de impureza no soluto, enquanto que o método tradicional (DUNN, 1977) exige substâncias puras para determinação confiável do respectivo coeficiente de partição.

A lipofilia é considerada a partir das mudanças na energia livre de solvatação de um composto no seu movimento da fase aquosa para a biofase.

Montanari et. al (2002) realizaram a modelagem do $\text{Log}P$ em octanol e biofase e demonstram a correlação entre $\text{Log}P_{\text{bio}}$ e $\text{Log}P_{\text{oct}}$. Estes autores verificaram a existência de correlações extra termodinâmicas entre as potências de acilidrazinas e os coeficientes de partição obtidos do sistema octanol-água, utilizando um postulado semelhante ao de Hammett (COLLANDER, 1960) utilizando a expressão $\text{Log} p_{\text{bio}} = a \text{Log} p_{\text{oct}} + b$, conforme esquema 1, mostrando que a partição na biofase é mimetizada pelo sistema octanol-água.



Esquema 1- Modelagem de Log P em octanol e biofase com a fase aquosa. Fonte: Montanari et al., 2002

4.1.1.4 Descritores estéreo e geométricos

Segundo Tavares (2004), o aspecto tridimensional de compostos bioativos e de seus receptores envolvidos é, muitas vezes, decisivo para a compreensão dos mecanismos envolvidos no estabelecimento da atividade biológica desempenhada por estes compostos. Para Hansch (1995), a estereoquímica do composto bioativo governa os princípios de reconhecimento e discriminação molecular, assunto também tratado por Wermut (2000). Especificamente ao canabinóides, Mechoulam et. al (1980) realizou um estudo abrangente a respeito da estereoquímica requerida para o potencial psicoativo destes compostos.

Os efeitos estéreo e geométricos, exercidos por grupos químicos presentes ou introduzidos num fármaco afetam diretamente a estereoseletividade e são importantes para manifestação de determinada atividade biológica, em razão de sua reatividade química (KOROLKOVAS, 1982).

Estes fatores também podem modificar a intensidade de determinada ação biológica. Fármacos muito reativos podem reagir facilmente com vários constituintes celulares. Os fármacos com pouca reatividade podem tornar desprezível a atividade biológica do fármaco matriz. Portanto, a atividade biológica requer reatividade química e propriedades físico-químicas adequadas (ARROIO, 2004). Os descritores que reproduzem estas respostas podem ser: volume molar, área da superfície, massa molar e ângulos diedros (HANSCH, 1995). A reatividade molecular foi calculada para os metabólitos canabinóides e os psicoativos mostram valores significantes segundo, Watanabe et al. (2005).

4.1.1.4.1 Volume molar

O volume molar de uma molécula é estimado pela soma das contribuições de átomos individuais, subtraindo-se a região caracterizada pela intersecção entre duas esferas a partir do raio de van der Waals. A técnica foi desenvolvida por Pearlman onde a molécula é vista como um conjunto de esferas atômicas particularmente sobrepostas (MONTANARI et al., 2002). Os volumes molares foram obtidos neste trabalho utilizando as geometrias otimizadas no nível semi-empírico de cálculos computacionais. É importante reconhecer que as coordenadas tridimensionais que definem determinada região da molécula podem ser alteradas em função de seu estado físico, resultando, portanto, em restrição no emprego deste parâmetro em estudos de QSAR (TAVARES, 2004; KUBINY, 1995).

4.1.1.4.2 Massa molar (MM)

Por ser uma propriedade relacionada à forma e estar diretamente ligada ao tamanho dos substituintes, a massa molar é uma propriedade importante para entendimento das diversas propriedades físico-químicas e atividades biológicas dos compostos.

De um modo geral, de acordo com Tavares (2004), a massa molar (MM), embora seja indiretamente relacionado com o volume da molécula, não expressa convenientemente o seu perfil tridimensional. Contudo, pode ser também empregada como parâmetro estéreo em estudos de QSAR. O método para cálculo de massa molar foi descrito por Labute, (2000) e os valores foram obtidos neste trabalho partindo das geometrias otimizadas do calculo semi empíricos AM1.

4.1.1.4.3 Área de superfície

Considerando cada átomo numa molécula como uma esfera de raio igual aos raios de van der Waals, a área da superfície molecular poderá ser calculada pela soma das áreas de cada átomo em particular. O método computacional utilizado é o descrito por Bordor, utilizando os raios atômicos de Gavessotti (LABUTE, 2000).

4.1.1.4.4 Ângulo diedral

Na química, o ângulo diedral é o ângulo de rotação em torno do eixo da ligação necessário para alinhar interações entre átomos adjacentes. A figura 18(a) esquematiza duas dessas interações empregadas na função energia potencial $V(R)$.

A planaridade dos grupos (isto é, os planos das moléculas) também pode ser descritas por potenciais harmônicos conhecidos como diedrais impróprios (improper dihedrals) descritas por ω . As Rotações em torno de ligações simples (torções) são governadas por energias senoidais descritas por φ . Na geometria o ângulo diedral pode ser definido como o ângulo entre faces de dois semiplanos de mesma origem, não contidos num mesmo plano, ou seja, o ângulo formado por dois planos concorrentes. Para obter o ângulo diedral, basta tomar o ângulo formado por quaisquer duas retas perpendiculares aos planos concorrentes. A figura 18(b) abaixo mostra a geometria deste ângulo.

No caso particular dos canabinóides, Mechoulam (1980) mostrou que o diedro é uma variável importante para estudar fatores estereoeletrônicos que interferem nas atividades analgésicas e psicoativas de alguns compostos canabinóides. Os valores dos diedros foram calculados a partir das geometrias otimizadas obtidas do método de cálculo DFT.

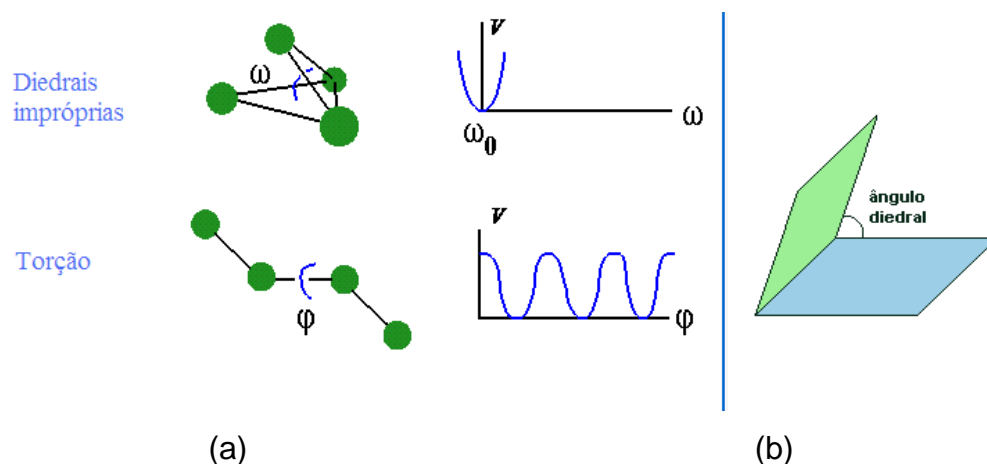


Figura 18(a) - Interações (diedrais impróprias e torção) – Estão incluídas na função energia potencial para efeitos de simulação computacional;

Figura 18(b) - ângulo diedro formado por dois planos concorrentes.

Fonte: <http://www.fisica.uel.br/atomol/classica.html>

4.2 Métodos de química teórica

Com a introdução de modelos matemáticos multiparamétricos tornou-se possível descrever dependências complexas da atividade biológica em relação às propriedades físico-químicas de compostos bioativos. Segundo Tavares (2004), nas últimas três décadas a atividade biológica de muitos desses compostos tem sido correlacionada, com sucesso, com diversas combinações de descritores.

Os estudos químico-teóricos de canabinóides que tratam das correlações entre a estrutura química e a atividade biológica vêm sendo estabelecidos em função das técnicas de SAR e QSAR (HANSCH, 1995), desenvolvidas com a intenção de compreender e criar relações entre a estrutura das moléculas canabinóides clássicas e não clássicas e suas propriedades terapêuticas.

Esta relação já vem sendo feita para a classe de compostos canabinóides por muitos autores brasileiros (SILVA; 2008, HONORIO, 2006, 2004, 2000, 2001; ARROIO, 2006, 2004; Da SILVA, 1995, 1985) e internacionais (REGGIO, 2003 1992, 1987, 1989; MECHOULAM, 1973, 1999; RAZDAN, 1986).

Os métodos teóricos mais tradicionais são classificados a seguir.

4.2.1 Métodos de mecânica molecular

A Mecânica Molecular aplica as leis da física clássica, ou seja, trata a molécula como um aglomerado de partículas ligadas entre si por forças elásticas e movimentos harmônicos, e calcula as geometrias e energias conformacionais a núcleos moleculares, usando uma combinação de campos de força empíricos.

Segundo Allinger (1992), o campo de força é um conjunto de funções de potencial que definem as energias de estiramento de ligação e de deformação de ângulo de ligação (tanto de valência quanto diedro) de uma molécula, quando comparadas com a sua conformação não tensionada (aquela caracterizada pelos valores padrões de comprimento e de ângulos de ligação) (ALLINGER, 1992). Os potenciais empíricos se forem usados e parametrizados apropriadamente, fornecem resultados confiáveis.

A mecânica molecular tem a vantagem de ser rápida, mas não proporciona informações seguras sobre as propriedades eletrônicas. Nos casos onde os efeitos

eletrônicos são predominantes, um tratamento mecânico-quântico é mais indicado (JESEN, 2003).

A metodologia da mecânica molecular, também conhecido como campo de força empírico – *Empirical Force Field* (EFF) (LEACH, 2001) está baseada na aproximação de Born-Oppenheimer (BORN-OPPENHEIMER, 1927).

A superfície de Born-Oppenheimer, conhecida na mecânica molecular como superfície de energia potencial, é multidimensional e descreve a energia de uma molécula em termos das posições nucleares. Esta superfície possui mínimos locais em relação a uma ou algumas conformações moleculares estáveis e, em uma primeira aproximação, a molécula é descrita pela estrutura correspondente ao mínimo global da superfície potencial.

Dentro da aproximação de Born-Oppenheimer, os movimentos dos núcleos e dos elétrons podem ser tratados separadamente (HELGAKER, 1990). Neste contexto, conforme esclarece Grant e Richards (1995), a mecânica molecular é caracterizada por considerar os movimentos nucleares e por tratar os elétrons indiretamente.

Os métodos de mecânica molecular consideram as contribuições da energia potencial (V) para o movimento interno dos núcleos por estiramento de ligações (V_s), deformações angulares (V_0), interações eletrostáticas originadas das ligações polares (V_{el}), interações de van der Waals (V_{vdW}) e rotação interna ao redor das ligações simples (V_w), fornecendo uma expressão de energia potencial mostrada na equação abaixo:

$$V = V_s + V_0 + V_{el} + V_{vdW} + V_w \quad (19)$$

O campo de força também representa a energia potencial molecular em relação a uma geometria de referência, em um determinado sistema de coordenadas (COELHO et al., 1999).

Estas forças são descritas pelas funções de energia potencial das contribuições estruturais, e.g. comprimentos de ligação (r), ângulos de ligação (θ), ângulos diedros (φ) e interações não ligadas (d) (COELHO et al., 1999). O conjunto destas funções é conhecido como campo de força empírico.

O campo de força representa a energia potencial molecular em relação a uma geometria de referência, em um determinado sistema de coordenadas:

$$U = \sum U(r) + \sum U(\theta) + \sum U(\varphi) + \sum U(d) + \dots \quad (20)$$

A energia, U de uma molécula, dentro do campo de força é a soma de todas as contribuições de energia. Temos ainda que: U_r é ação do campo no comprimento da ligação a seu valor ideal; U_θ é a energia de deformação do ângulo de ligação em relação a seu valor ideal; U_φ é a energia devido a torção em torno de uma ligação; e U_d é a energia da interação entre átomos não ligados.

O método de mecânica molecular é um método que demanda menos tempo computacional se comparado aos outros métodos (JENSEN, 2003).

No geral, os métodos de mecânica molecular incluem estudos de minimização de energia de moléculas, análise conformacional, simulações de dinâmica molecular, entre outros, e são aplicáveis desde átomos isolados até moléculas e fornecem informações importantes para o processo de planejamento de fármacos e receptores (ALLINGER, 1992).

Os programas de mecânica molecular são capazes de desenhar estruturas moleculares e realizar cálculos de otimização de geometrias e estudos conformacionais. Os arquivos de saída dos programas podem servir de entrada em outros programas mais avançados.

O programa de mecânica molecular reconhece as mudanças que conduzem a estruturas mais estáveis, de menor energia estérea e os cálculos são interrompidos quando as modificações da estrutura mais estável, em relação à molécula original, não resultam em alteração considerável de energia. O objetivo da mecânica molecular é prever a energia associada com determinada conformação de uma molécula. Em relação a energia estérea, obtida por métodos de mecânica molecular, pode-se dizer que esta propriedade não expressa quantidades absolutas, apenas diferenças de energia entre duas ou mais conformações (CARVALHO et al. 2003).

Os métodos de cálculos teóricos contidos nestes programas, no geral, diferem no conjunto de funções de energia e parâmetros numéricos associados e estão relacionados à natureza do campo de forças.

A estrutura molecular, em princípio pode ser deduzida mediante o experimento ou a teoria. Existem algumas categorias de cálculos teóricos de química utilizados para estes fins.

O processo de mecânica molecular promove a modificação dos ângulos e comprimentos das ligações dos átomos originais e fornece novas conformações com os correspondentes cálculos de energia.

As técnicas que tratam destes cálculos estão incluídas nos “softwares” de química computacional. Esta área atualmente é chamada de quimioinformática, do inglês chemoinformatics (WILLETT, 2008).

4.2.2 Métodos de mecânica quântica

O objetivo da química quântica é fornecer soluções para a equação de Shhrödinger que permita respostas mais precisas, o quanto possível, sobre as propriedades de sistemas atômicos e moleculares (KOHN, 1999). Para tal, a mecânica de sistemas quânticos considera uma espécie química como um conjunto de núcleos e elétrons descritos por funções de onda, ψ_i (autofunções), e por suas respectivas energias, E_i .

Em 1926, Erwin Schrödinger propôs uma equação para descrever o caráter ondulatório das partículas. A função de onda é obtida a partir da resolução da equação de Schrödinger independente do tempo (SCHRODINGER, 1926; EISBERG, RESNICK; 1994).

$$\hat{H} \psi(\vec{r}, \vec{R}) = E_i \psi(\vec{r}, \vec{R}) \quad (21)$$

Sendo: Ψ a função de onda do sistema; E a energia total do sistema; \hat{H} o operador Hamiltoniano; e \vec{R} e \vec{r} simbolizam vetores de todas as coordenadas dos núcleos e dos elétrons respectivamente.

A expressão do operador Hamiltoniano em unidade atômica é:

$$\hat{H} = -\sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \sum_{\mu=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{|\vec{r}_\mu - \vec{R}_A|} + \sum_{\mu=1}^N \sum_{\nu < \mu}^N \frac{1}{|\vec{r}_\mu - \vec{r}_\nu|} + \sum_{A=1}^M \sum_{B < A}^M \frac{Z_A Z_B}{|\vec{R}_A - \vec{R}_B|} \quad (22)$$

Para um sistema contendo um conjunto de núcleos (**N**) e elétrons (**e⁻**), que interagem entre si, a expressão do hamiltoniano é dada por:

$$\hat{H} = T_N + T_e + V_{NN} + V_{ee} + V_{ne} \quad (23)$$

Nas equações 22 e 23 temos que M_A é a massa do núcleo A; Z_A é a carga do núcleo A; Z_B é a carga do núcleo B; T_N operador de energia cinética dos núcleos; T_e operador de energia cinética dos elétrons; V_{NN} operador de energia potencial de repulsão entre núcleos; V_{ee} operador de energia potencial de repulsão entre elétrons; e, V_{Ne} operador de energia potencial de atração núcleo-elétron.

No entanto, a equação 22 só possui solução analítica para sistemas relacionados a um único elétron. Assim, devemos recorrer a métodos aproximativos para resolvê-la.

A primeira aproximação diz respeito à separação das coordenadas dos núcleos e dos elétrons – uma aproximação conhecida como aproximação de Born-Oppenheimer (1927) – que considera o fato de que a diferença das massas entre elétrons e núcleos é grande, onde os núcleos movem-se devagar quando comparados ao movimento dos elétrons (HELGAKER, 1990).

Contudo, como as forças aplicadas nas partículas são as mesmas, pode-se sugerir que se os elétrons se reajustam instantaneamente a cada movimento dos núcleos, pode-se pensar que os núcleos estão fixos a certa distância (d) e, então, pode-se resolver a equação de Schrödinger para uma função de onda que depende apenas da posição dos elétrons. Assim, o hamiltoniano para a energia eletrônica pode ser escrito como:

$$\hat{H}_{el} = T_e + V_{Ne} + V_{ee} \quad (24)$$

E a equação de Schrödinger pode ser escrita como:

$$\hat{H}_{el} \Psi(1, 2, \dots, n) = E_{el} \Psi(1, 2, \dots, n) \quad (25)$$

Muito embora a aproximação de Born-Oppenheimer simplifique o problema tratando as coordenadas eletrônicas e nucleares separadamente, ainda há o problema de separar as coordenadas entre os elétrons.

Assim, para resolver a equação 21 ainda se fazem necessárias outras aproximações. Os métodos semi-empíricos, onde as aproximações adicionais são incluídas com o propósito de reduzir o custo computacional das aproximações de Hartree-Fock (HF) e de Hartree-Fock-Roothaan (SIMAS E ROCHA, 2007) foram os utilizados neste trabalho e serão discutidos a seguir.

4.2.2.1 Métodos semi-empíricos e *ab initio*

Todas as funções de onda são aproximadas, no entanto, algumas são mais aproximadas que outras. Devido a esta diferenciação nos métodos, Levine (1975) sugeriu a divisão dos métodos mecânico-quânticos em função destas aproximações. Os métodos foram divididos em *ab initio* e semi-empíricos.

De forma geral, os métodos *ab initio* resolvem a equação de Schrödinger sem aproximações, enquanto os semi-empíricos levam em conta alguns parâmetros obtidos, em geral, de resultados experimentais.

Os métodos mecânico-quânticos *ab initio* são baseados no uso da equação de Schrödinger completa para tratar todos os elétrons de um sistema químico. Na prática, aproximações são necessárias para restringir a complexidade da função de onda eletrônica e tornar seu cálculo possível. Embora estes métodos forneçam informação relativamente mais precisa sobre o comportamento eletrônico, ele é, em termos operacionais, mais lentos e caros. Para resolver isto, têm sido desenvolvidos vários métodos semi-empíricos.

O método semi-empírico surgiu na tentativa de combinar termodinâmica, cinética química, mecânica quântica e teoria da ligação de elétrons de valência com o objetivo de mesclar teoria com experimento (por isto o nome semi-empírico) (SIMAS; ROCHA, 2007). Nye (2007) em seu recente artigo de revisão aborda a evolução dos métodos semi-empíricos nos últimos 70 anos.

Até meados da década de 90, os métodos semi-empíricos de estrutura eletrônica eram aplicados a sistemas moleculares que continham até 100 átomos. No final da década de 90, ocasionado pelos avanços dos computadores e o surgimento de novos métodos numéricos de análises e suas implementações, estes sistemas passaram a ser domínio dos métodos baseados na teoria do funcional da densidade (DFT) (POPLE, 1967; ATKINS, 2001).

Atualmente, os cálculos semi-empíricos têm seu espaço garantido para algumas situações típicas: (i) para o cálculo de um número muito grande de moléculas pequenas, como o estudo das propriedades eletrônicas de uma dada molécula ou fármaco pela mudança dos substituintes na estrutura molecular; (ii) para inúmeros e repetidos cálculos de um mesmo tipo de sistema, e (iii) para o cálculo de moléculas grandes (SIMAS; ROCHA, 2007).

Com relação ao tempo computacional, os métodos semi-empíricos são muito mais lentos que os métodos de mecânica molecular, mas quando comparados aos métodos *ab initio* apresentam uma grande eficiência.

Com respeito à abordagem teórica empregada, os métodos semi-empíricos tentam resolver, de forma autoconsistente, aproximações às equações de Hartree-Fock-Roothaan (ROOTHAAN, 1960), e para isto utilizam parâmetros oriundos de dados experimentais. A simplificação nos métodos semi-empíricos pode ocorrer no hamiltoniano, na função de onda e na avaliação aproximada de certas integrais moleculares. Estes métodos utilizam o mesmo formalismo matemático que os métodos *ab initio*, contudo, realizam uma série de aproximações a partir de parâmetros experimentais e ajustáveis que são otimizados para reproduzir propriedades químicas de interesse.

Dentre as aproximações, uma das que têm impacto no custo computacional é conhecida como aproximação *Zero Differential Overlap* (ZDO), que considera como sendo nulo o produto de dois orbitais atômicos diferentes, simplificando as equações de Hartree-Fock-Roothaan, segundo comenta Simas e Rocha (2007). Para conseguir aproximações que tratassem de mais tipos de moléculas e sistemas não planos, Pople et al. (1967) criaram novos métodos como o *Complete Neglect of Differential Overlap* (CNDO), o *Intermediate Neglect of Differential Overlap* (INDO) e o *Neglect of Diatomic Differential Overlap* (NDDO), as quais têm níveis de aproximações integrais diferentes e leva em consideração todos os elétrons de valência.

Algumas propriedades de interesse (tais como: energia de ligação, momento de dipolo, calor de formação, barreiras rotacionais, dentre outras) para que fossem calculadas mais próximas dos valores experimentais quanto possível, levaram Dewar e Haselbach (1970) a proposição do método *Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap Version1* (MINDO/1). Cinco anos depois, as versões MINDO/2 e MINDO/3 surgiram após inclusão das geometrias das moléculas por Bingham et al. (1975).

Para corrigir a falha de não reproduzir bons valores dos calores de formação para sistemas aromáticos e pela dificuldade de conseguir reproduzir parâmetros diatômicos para elementos metálicos, Dewar e Thiel (1977) criam um novo sistema semi-empírico - o *Modified Neglect of Diatomic Overlap* (MNDO) - que foi baseado no NDDO. O método MNDO possibilitou a correção de muitos dos problemas que o MINDO/3 apresentava (DEWAR; THIEL, 1977).

Com o método MNDO, pelo conhecimento da matriz de Fock e da matriz densidade, pode-se obter a energia total, e posteriormente, o calor de formação para o sistema molecular. Exatamente este calor de formação que será utilizado como propriedade na parametrização dos métodos baseados no MNDO (SIMAS; ROCHA, 2007).

As funções de base STO formadas por um orbital *s* e três *p* é a utilizada nos cálculos para este método. A falha deste sistema é que as energias de ativação e de repulsão entre átomos eram por demais superestimadas, levando uma quase impossibilidade de descrever a ligação de hidrogênio, mesmo que este seja um problema da maioria dos métodos computacionais existentes até hoje e que diversos pesquisadores focalizam esta questão (MAHESHWARY et al., 2000).

Os dois métodos AM1 e PM3 eram idênticos exceto quanto ao conjunto e tipos de parâmetros, sendo esta a diferença crucial entre eles. No PM3, os parâmetros são ajustados de forma a reproduzir dados experimentais, diferentemente do AM1 que utiliza alguns parâmetros intuitivos em função do conhecimento químico. O AM1 e PM3 estão entre os métodos mais utilizados e citados nos artigos de química teórica e seus resultados são quase equivalentes, se comparados entre eles.

Outro método recentemente criado baseado no MNDO é uma extensão do PM3 - chamado PM5 - disponível no programa MOPAC 2002 (STEWART, 1999).

As parametrizações que demandam um elevadíssimo tempo de cálculo são calculadas a partir dos desvios de resultados preditos, e se tornaram base para o surgimento de outros métodos semi-empíricos criados à medida que eram requeridas descrições mais exatas e resultados os mais próximos quanto possível dos dados experimentais para sistemas químicos e biológicos segundo Simas e Rocha (2007).

Um novo método foi proposto para corrigir as falhas do modelo anterior. Este novo método foi inovador devido à inclusão de funções gaussianas esféricas nas integrais de repulsão *caroço-caroço*. A partir desta inclusão, foi possível descrever, entre outras coisas, a ligação de hidrogênio que são importantes para sistemas biológicos. Como os métodos evoluem pelas correções das falhas, um novo método foi introduzido. Assim, em 1985 surge uma versão melhorada do MNDO que foi chamada de *Austin Model 1* por Dewar et al. (1985), mais conhecida como AM1. Mesmo que os erros do AM1 fossem bem menores que os erros do MNDO, haviam falhas remanescentes atribuídas a parametrizações incompletas e defeitos ao fazer predições, como por exemplo, os ângulos entre três átomos que são descritos com 3,3 % de erro (SIMAS; ROCHA, 2007). O aprimoramento das parametrizações fez Stewart (1989) publicar o método *Parametric Method 3* (PM3), proposto na tentativa de achar mínimos de energia que tenham sentido químico, já que existiam centenas de mínimos globais. O método PM3 proposto apresentava erros inferiores ao AM1, principalmente em relação às entalpias de formação.

A insuficiência na qualidade das parametrizações e falhas nos conjuntos de aproximações e nos dados das propriedades que compõem o conjunto de referência, fez pesquisadores elaborarem novos modelos semi-empíricos. Um grupo de Recife criou o Recife Model 1 (RM1)(ROCHA et al. 2006), um método semi-empírico que possui a mesma estrutura algébrica e o mesmo número de parâmetros do AM1, porém, foi reparametrizado com um conjunto de parâmetros estatisticamente testado e reproduz melhores valores de entalpias de formação. O método RM1 está no domínio público, e disponível nos softwares SPARTAN-06, HYPERCHEM 8 e MOPAC 2007(SIMAS; ROCHA, 2007).

Dos vários métodos semi-empíricos mostrados, o método AM1 foi o utilizado neste trabalho para obtenção de muitas das propriedades relevantes e encontra-se descrito no item seguinte.

4.2.2.1.1 O Método AM1

Para corrigir as falhas dos métodos de não reproduzirem bem as repulsões nucleares (principalmente quando forem de longo alcance), o método AM1 surge pela introdução de novos parâmetros e do termo gaussiano na avaliação da energia de repulsão núcleo-núcleo. Por este motivo, o AM1 tornou-se na época o método mais preciso na descrição das propriedades apresentadas pelos sistemas químicos.

Fazendo-se cálculos com o AM1 e comparando-os com os obtidos com o método MNDO, o AM1 apresenta certas vantagens, tais como: não há aumento no tempo de computação; a ligação de hidrogênio é reproduzida; fornece melhor estimativa de energia de ativação para reações; os erros nos ΔH_f são 40% menores que aqueles encontrados no MNDO.

Utilizando-se o método semi-empírico AM1 foi possível calcular neste trabalho as seguintes propriedades: afinidade eletrônica, potencial de ionização, energia do HOMO e do LUMO, refratividade molar, dureza, dentre outras.

4.2.2.2 Teoria da funcional densidade (DFT)

Outra abordagem possível é escrever as componentes da equação 19 em termos da densidade de uma partícula $n(\vec{r})$, pode ser mostrada pela equação 26, ou seja:

$$E [n(\vec{r})] = T [n(\vec{r})] + U [n(\vec{r})] + V [n(\vec{r})] \quad (26)$$

Sendo que o funcional da energia $E [n(\vec{r})]$ é a soma dos funcionais da energia cinética $T [n(\vec{r})]$, da energia de interação coulombiana $U [n(\vec{r})]$ e do potencial externo $V [n(\vec{r})]$.

A proposta de tratar a energia em função da densidade de uma partícula já era conhecida nos trabalhos de Thomas (1927) e Fermi (1928).

Porém, os autores Hohenberg e Kohn (1964) demonstraram que são os funcionais de densidade $n(\vec{r})$ que descrevem as partículas no estado fundamental de um sistema interagente e publicaram os teoremas básicos da teoria do funcional densidade.

Kohn e Shan (1965) definem uma nova função universal $G(n(\vec{r}))$ onde estabeleceram uma forma de encontrar o funcional da energia cinética exato deixando explícita a repulsão elétron-elétron. O método recebeu o nome dos autores Kohn e Shan (KS), que permite assim, realizar cálculos DFT.

Esta teoria é considerada uma teoria de impacto na química quântica, pois alia simplicidade e precisão, permitindo assim estudar sistemas cada vez mais complexos, contribuindo para a compreensão e previsão das propriedades dos átomos, moléculas e sólidos (PARR; YANG, 1989). Os computadores evoluíram, o que permitiu que as equações de Kohn-Sham (1965) fossem resolvidas para sistemas mais complexos.

A teoria DFT é considerada também uma ferramenta fundamental em áreas tão diversas, prova disto é que em 1998, o Comitê Nobel reconheceu a importância dos trabalhos na área da DFT, ao atribuir o Premio Nobel da Química a Walter Kohn e a John Pople (http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1998/).

A seguir trataremos, de forma resumida, o formalismo da DFT.

A equação de Schrödinger independente do tempo que descreve um elétron num campo elétrico criado pelo núcleo de hidrogênio tem a seguinte forma:

$$\left[\frac{\hbar^2 k^2}{2m} - \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 r} \right] \psi = E \psi \quad (27)$$

Para a equação 27, temos que o primeiro termo é a energia cinética e está descrita em função de k , da constante de Planck (\hbar), da massa do elétron (m), e do operador laplaciano ∇ , sendo que k e ∇ são descritos pelas seguintes expressões:

$$\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \quad (28)$$

$$k = 1/4 \pi \epsilon_0 \quad (29)$$

A segunda contribuição descreve os níveis de energia, que podem ser ocupados pelo elétron e a função de onda (ψ) do sistema. Considerando as três dimensões teremos, neste caso, a densidade eletrônica do sistema, isto é, a

probabilidade de se encontrar simultaneamente uma partícula num determinado ponto (\vec{r}), dado pelo quadrado do módulo da função de onda, conforme a equação 30.

$$n(\vec{r}) = |\psi(\vec{r})|^2 \quad (30)$$

Para o átomo seguinte, o átomo de hélio, a descrição será então para dois elétrons e dois prótons e deve-se, então, levar em consideração a interação núcleo-elétron e repulsão colombiana núcleo-núcleo, daí, a equação passa a ser a seguinte:



$$\quad (31)$$

A equação diferencial 31 está determinada em seis dimensões e depende agora das coordenadas dos dois elétrons, logo se considera as duas primeiras contribuições como os termos cinéticos (mesmo procedimento feito para o átomo de hidrogênio). Os dois termos seguintes refletem a interação coulombiana entre os dois elétrons e os dois prótons do núcleo, enquanto o último termo representa a repulsão entre os dois elétrons.

Apesar da aparente simplicidade, este último termo torna impossível a resolução analítica da equação. Contudo, se aumentarmos o número de elétrons do sistema, o número de termos aumenta, a função de onda fica com cada vez mais variáveis, e a dificuldade de resolver a equação de Schrödinger aumenta exponencialmente. Até para sistemas relativamente modestos é impensável tentar resolver.

Com a idéia de Hohenberg e Kohn (1964) pode-se representar a grandeza densidade eletrônica $n(\vec{r})$, por uma simples função tridimensional (um observável), isto é, todas as grandezas físicas que podemos medir num sistema são unicamente determinadas por funcionais da densidade.

Em outras palavras, para conhecermos qualquer propriedade de um átomo, de uma molécula ou de um sólido, só precisamos saber qual é a sua densidade eletrônica. Além disso, o estado fundamental do sistema pode ser encontrado minimizando a energia total em função da densidade.

Este é o equivalente a fazer o seguinte: Como a energia total é um observável, podemos escrevê-la em termos de, $n(\vec{r})$, isto é, $E[n(\vec{r})]$. Minimizando este funcional, obtemos o estado fundamental do sistema e a sua densidade. A partir desta densidade podemos calcular qualquer outra propriedade. No entanto Hohenberg e Kohn (1964) disseram apenas que os funcionais existem e não qual é a sua forma analítica exata.

Há, contudo, aproximações razoáveis para $E[n(\vec{r})]$. A mais conhecida é baseada na teoria de Thomas-Fermi (THOMAS, 1927; FERMI, 1927). Nesta teoria, que curiosamente surgiu muito antes da teoria dos funcionais da densidade, todas as componentes da energia são escritas em função de $n(\vec{r})$.

Embora a teoria de Thomas-Fermi seja capaz de explicar muitas propriedades, ela não é capaz de descrever as camadas atômicas (KOCH; HOLTHAUSEN, 2002). Para conseguir descrever camadas, Kohn e Sham (1965) tiveram a idéia de construir um sistema de elétrons “fictícios”, onde os “elétrons” não interagem uns com os outros, mas cuja densidade é igual à densidade do sistema original. Para isso, consideraram os elétrons fictícios num potencial efetivo, escolhido de forma a que esta condição seja satisfeita. Como este é um sistema de elétrons independentes, eles obedecem a uma equação de Schrödinger, semelhante à equação para o átomo de hidrogênio. A única diferença é que o potencial elétrico criado pelo núcleo do hidrogênio é substituído pelo potencial de Kohn-Sham, um funcional da densidade. Escreve-se normalmente este funcional como a soma de três partes:

$$E[n(\vec{r})] = T[n(\vec{r})] + V_{ext}[n(\vec{r})] + E_{int}[n(\vec{r})] \quad (32)$$

O primeiro termo representa o potencial externo criado pelos núcleos atômicos, neste caso especial numa molécula ou num sólido.

O segundo, o potencial de Hartree, presente na teoria de Thomas-Fermi, leva em conta a interação eletrostática clássica entre os elétrons, isto é, a interação entre elétrons e a densidade média de carga de todos os elétrons do sistema (KOCH; HOLTHAUSEN, 2002). O último termo, denominado potencial de troca e correlação, inclui todos os termos não triviais da interação. O problema agora é encontrar boas aproximações para este último termo.

A aproximação mais simples surgida da primeira geração de funções de bases é chamada de aproximação da densidade local (LDA, de *Local Density Approximation*) foi proposta por Kohn e Sham (1965), e envolve o funcional de troca de Dirac baseado no modelo atômico de Thomas-Fermi-Dirac (TFD). As equações de KS (Kohn e Sham), em princípio, são exatas uma vez que incorporam totalmente os efeitos de correlação - troca e correlação – e as soluções delas resolvem o problema variacional da DFT.

A incorporação da correlação eletrônica nas equações de KS faz surgir o potencial de troca e correlação desconhecido. A partir deste ponto, surgem às gerações dos potenciais de troca e correlação e entre os avanços, ressaltam-se os trabalhos de Becke (1988), Lee & Yang (1988) e Parr & Yang (1989), cujo funcional conhecido como B3LYP tem proporcionado bons resultados para cálculos de química quântica.

Foi possível calcular por este método as seguintes propriedades: coeficiente de partição, massa molecular, momento dipolar, área, volume, dentre outras.

4.3 Métodos estatísticos de análises

Após a obtenção das variáveis por métodos teóricos, faz-se necessário a utilização de métodos estatísticos que permitam uma análise simultânea e multivariada de todos os parâmetros medidos. Desta forma, os métodos estatísticos de análise multivariada são as ferramentas úteis num estudo de sistemas químicos, onde se realiza uma análise de um conjunto de dados que representam um elevado número de propriedades físico-químicas (variáveis, medidas ou descritores) que seriam de difícil interpretação isoladamente, utilizando técnicas quimiométricas.

As técnicas multivariadas mais frequentemente utilizadas são: Análise de Componentes Principais – *Principal Component Analysis* (PCA); Análise de Regressão de Componente Principal – *Principal Component Regression* (PCR); Análise de Fatores – *Factor analysis* (FA); Análise Discriminante por Passos – *Stepwise Discriminant Analysis* (SDA). Análise Hierárquica de Agrupamentos – *Hierarchical Cluster Analysis* (HCA); Método de K-vizinhos mais próximos – *K-Nearest Neighbor* (KNN); Modelos Independentes de Similaridade Utilizando Componentes Principais – *Soft Independent Modeling of Class analogy* (SIMCA) e Redes Neurais – *Artificial Neural Network* (ANN), dentre outras e foram descritos por diversos autores (CORREIA; FERREIRA, 2007; FROSCHE et al. 2005; NETO; et. al. 2003, 2006; FERREIRA, 2002; SENA et. al., 2000; VAN DER WATERBEEMD, 1995, 1992; BRUNS; FAIGLE, 1985).

4.3.1 Análise de componentes principais (PCA)

Análise de componentes principais é um método de redução de dados que usa técnicas matemáticas para identificar padrões em uma matriz de dados. O principal elemento deste método consiste na construção de um pequeno conjunto de novas variáveis ortogonais, ou seja, não correlacionadas, derivadas de uma combinação linear das variáveis originais (CORREIA; FERREIRA, 2007).

A análise dos componentes principais (PCA) é um método para decompor uma matriz de dados X de posto r (ou "rank" r), como uma soma de matrizes de posto igual a 1, onde posto é um número que expressa a dimensão de uma matriz e o posto expressa o número de vetores linearmente independentes de uma matriz (SENA et. al., 2000). Essas novas matrizes identidade são produtos de vetores chamados "scores" t_r e "loadings" p'_r . Estes "scores" e "loadings" podem ser calculados como mostrados na equação 33.

$$X = \sum_{r=1}^r t_r p'_r \quad (33)$$

(33)

Exemplificando $t_r p'_r$, a figura 19a mostra, no plano bidimensional, a representação da matriz de dados X decomposta em matrizes "scores" t_r e "loadings" p'_r .

$$\begin{array}{c} m \\ \square \\ n \end{array} X = \begin{array}{c} 1 \\ \square \\ r \end{array} t_1 \begin{array}{c} m \\ \square \\ 1 \end{array} p'_1 + \begin{array}{c} 1 \\ \square \\ r \end{array} t_2 \begin{array}{c} m \\ \square \\ 1 \end{array} p'_2 + \dots + \begin{array}{c} 1 \\ \square \\ r \end{array} t_r \begin{array}{c} m \\ \square \\ 1 \end{array} p'_r$$

Figura 19a – Representação gráfica da somatória dos produtos dos vetores "scores e" loadings".

Fonte: Sena et. al., 2000.

A figura 19b abaixo mostra uma componente principal (CP), representada pela reta que aponta na direção de maior variabilidade das amostras. Os "loadings" p'_r são os cossenos dos ângulos formados entre a componente principal (CP) e cada variável. Os "scores" t_r representam as projeções das amostras na direção da componente principal (CP).

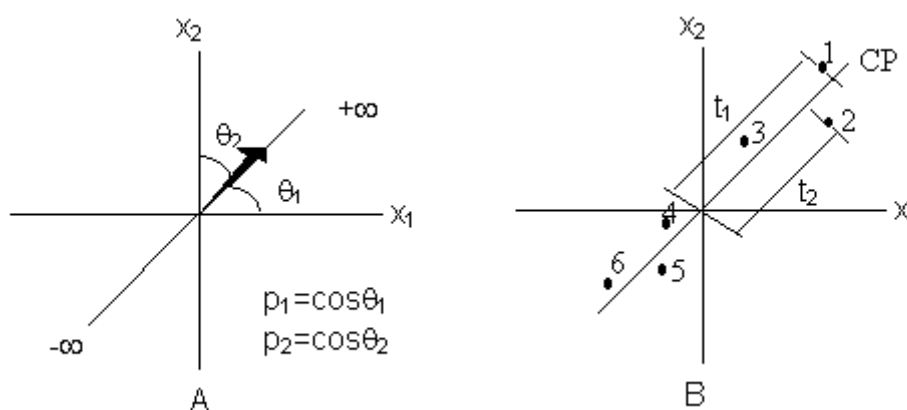


Figura 19b – Componente Principal para duas variáveis:

(A) "loadings" - são os ângulos do vetor direção;

(B) "scores" - são as projeções das amostras na direção da componente principal. Os dados são todos centrados na média.

Fonte: Sena et al., 2000.

Muitos autores adotam a análise de fatores (FA) como um mero sinônimo de PCA. Porém, Joreskog et al. (1976) definiram esses termos como métodos diferentes, com base no modo como os fatores (ou CPs) são definidos. Na PCA, os fatores devem explicar o máximo da variância contida em todas as variáveis observadas, enquanto que na análise de fatores, eles devem explicar o máximo da intercorrelação entre as variáveis.

Os resultados da PCA são visualizados na forma de gráficos, facilitando a identificação de estruturas e agrupamentos existentes no conjunto de dados. A representação gráfica das PC(s) permite a redução da dimensionalidade das amostras, pois embora a informação estatística presente nas “n”-variáveis originais seja a mesma dos “n” componentes principais, é comum obter em apenas 2 ou 3 das primeiras componentes principais em torno de 90% desta informação (NETO et al. 2003).

A primeira PC (PC1) é definida pela direção que descreve a máxima variância dos dados originais. A segunda PC (PC2) tem a direção de máxima variância dos dados no subespaço ortogonal à PC1, e as PCs subseqüentes são ortogonais às anteriores e orientadas de tal maneira que descrevam sempre a máxima variância restante (CORREIA; FERREIRA, 2007).

A maneira como estas novas variáveis são organizadas, pode-se assegurar que quase toda a informação ficará contida utilizando poucas PCs. Isso permite representar as amostras usando um espaço no gráfico de dimensão menor se comparada à dimensão do espaço que seria ocupado com todos os dados originais.

Para um estudo químico, a análise de componentes principais também pode ser usada para julgar a importância das próprias variáveis originais escolhidas, ou seja, as variáveis originais com maior peso (*loadings*) na combinação linear dos primeiros componentes principais são as mais importantes do ponto de vista de descrição química e as que mais contribuem para o estudo de um sistema.

Há necessidade de um tratamento prévio de padronização e escalonamento dos dados antes da geração das componentes principais e do agrupamento hierárquico, sendo essa etapa de preparação do conjunto de dados considerada crítica para obter sucesso no tratamento multivariado (NETO, 2003).

4.3.2 Análise hierárquica de agrupamentos (HCA)

As técnicas de agrupamento de amostras mais usuais são as hierárquicas e não-hierárquicas inicialmente classificadas por Cormack (1971). A técnica hierárquica consiste em uma série de sucessivos agrupamentos ou sucessivas divisões de objetos, em que os objetos são agregados ou desagregados, sugerindo a forma de uma árvore. A técnica não-hierárquica foi desenvolvida para agrupar objetos em grupos, sendo a quantidade de grupos definida previamente e se constituem de partições isoladas ou disjuntas, que não possuem relação hierárquica (FERREIRA, 2003; NETO et al., 2003). As duas técnicas hierárquicas e não hierárquicas foram utilizadas neste trabalho.

As técnicas hierárquicas de agrupamentos têm por objetivo agrupar as amostras conforme a similaridade ou características comuns entre duas amostras (NETO et al., 2003). Pode ser expressa como uma função da distância entre os dois pontos representativos destas amostras no espaço n-dimensional em função dos seus vizinhos, buscando mostrar a homogeneidade dentro do grupo e a heterogeneidade entre os grupos (JOHNSON; WICHERN, 1992). Esta técnica se divide em dois grupos: o aglomerativo (aglomeração) e o decisivo (divisão).

O aglomerativo ocorre a partir de fusões sucessivas de grupos de amostras, ou seja, cada amostra é considerada como um grupo e os grupos mais próximos são unidos gradualmente até que finalmente, todas as amostras formem um único grupo. O método decisivo ocorre por um processo de divisão, onde todas as amostras são consideradas um único grupo que vai se dividindo até que cada amostra esteja em um conglomerado separado.

A finalidade preliminar da análise de agrupamentos hierárquicos é indicar os dados de forma descritiva, por isso, torna-se uma técnica interessante, pois seu resultado final, de natureza qualitativa, é apresentado num gráfico de esquema hierárquico denominado dendrograma, também chamado de gráfico em árvore, onde é sintetizado o comportamento das variáveis, visualizadas em um espaço 2D.

A representação gráfica do dendrograma na HCA depende do tipo de distância que é utilizada para o cálculo e do tipo de interligação entre eles – estas distâncias podem ser baseadas em uma única dimensão ou em dimensões múltiplas.

A medida de distância tem como objetivo principal mensurar a distância entre dois objetos e/ou quantificar o quanto estes objetos são parecidos ou diferentes, e é dividida em duas categorias básicas: as medidas de similaridade e as medidas de dissimilaridade.

Geralmente, a distância euclidiana (distância geométrica em um espaço multidimensional) é a mais escolhida pelos autores para análise de grupamentos (BEEBE et al., 1997; JOHNSON; WICHERN, 2002), que por sua vez, é uma medida de dissimilaridade, pois quanto maior for a distância euclidiana entre dois objetos, mais dissimilares eles serão, sendo esta distância a utilizada neste trabalho e sua fórmula é mostrada na equação 34.

$$d_{xy} = \sqrt{(x_1 - y_1)^2 + (x_2 - y_2)^2 + \dots + (x_n - y_n)^2} \quad (34)$$

Sendo que a distância euclidiana d_{xy} é a medida entre dois objetos de coordenadas $X = (X_1, X_2, \dots, X_n)$ e $Y = (Y_1, Y_2, \dots, Y_n)$. X_1 e Y_1 correspondem às coordenadas das amostras X e Y de dimensão i (onde i varia entre 1 e n).

Existem vários métodos de cálculo de distâncias utilizadas para agrupar as amostras, tais como: conexão simples ou método que utiliza a distância do vizinho mais próximo; conexão completa ou método que utiliza a distância do vizinho mais distante; conexão média, que utiliza a distância média entre os grupos de amostras; conexão incremental, a qual se baseia na média ponderada, e é o mais utilizado quando há uma interface entre uma classe de amostras a outra classe, sendo este o método aplicado neste trabalho.

Em geral os dendrogramas são apresentados em função dos valores de similaridade entre os grupos de amostras formados. As distâncias calculadas são auxiliares para cálculos de similaridade entre os grupos das amostras. Um exemplo de medida de similaridade, ou de quanto os objetos são parecidos, é o coeficiente de correlação. O termo similaridade é uma medida bem definida na quimiometria, onde tem a seguinte expressão:

$$S_j = 1 - \frac{d_j}{d_j(m)} \quad (35)$$

Sendo que d_{ij} é a distância entre os pontos i e j ; e $d_{ij}(max)$ é a maior distância na matriz distância.

Dessa forma, os dois pontos mais distantes no conjunto de dados têm $S = 0$, onde pontos idênticos apresentam similaridade máxima igual a 1 (um).

A análise hierárquica de agrupamentos (HCA) tratada neste item, bem como a análise de componentes principais (PCA) do item anterior, são ferramentas quimiométricas bastante utilizadas nos procedimentos multivariados para esclarecer as inter-relações entre as variáveis e permitem a visualização das informações que não seriam observadas utilizando um tratamento univariado.

A análise dos gráficos obtidos por HCA (dendrograma) e PCA (“scores” e pesos) é complementar e, por esse motivo, recomenda-se a utilização dessas 2 ferramentas nos estudos não supervisionados de reconhecimento de padrões. Além de valorizar as interpretações, o entendimento do conjunto de dados é facilitado e as inter-relações entre as variáveis ficam mais evidentes utilizando estas técnicas (CORREIA; FERREIRA, 2007). A HCA, no geral, é realizada com os mesmo programas utilizados para PCA.

4.3.3 Análise de agrupamentos pela média (K-MEANS)

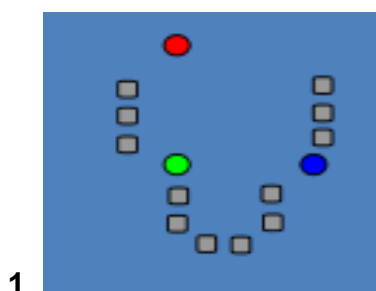
O método *K-Means* foi criado por MacQueen (1967) e utiliza um refinamento aproximativo a partir de um algoritmo heurístico, conhecido como algoritmo de Lloyd (1982) que inicia dividindo pontos de entrada em K grupos iniciais de forma heurística (quantificação de proximidade a um determinado objeto).

Segundo Lourenço (2000), este método de análise é um método de agrupamento não-hierárquico que consiste em dividir os diferentes casos de uma matriz de dados em K grupos mais ou menos homogêneos. O pressuposto neste método é de que há uma escolha antecipada de um número de agrupamentos K que englobarão todos os casos. Procede-se, em seguida, a uma divisão de todos os casos pelos K grupos preestabelecidos e a melhor partição dos n casos será aquela que otimiza o critério escolhido (HAIR, 2005).

Ao aplicar um critério de otimização que divida uma amostra em K grupos homogêneos, pretende-se que dentro de cada grupo, os elementos sejam os mais semelhantes possíveis entre si, ao passo que as semelhanças entre os elementos de grupos distintos sejam as menores possíveis (LOURENÇO, 2000).

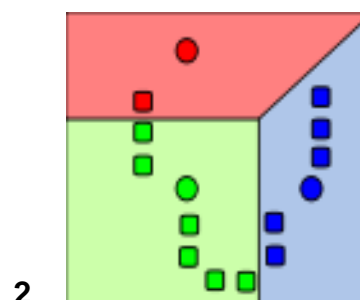
Para Hair (2005), cada grupo é representado por um ponto central - denominado centróide - que está distribuído homogeneamente. Os centróides iniciais são formados através da designação de cada caso ao agrupamento de centro mais próximo. Com a inclusão de cada caso, a média altera-se, alterando assim o centróide. Um processo iterativo é usado para achar os centróides finais de cada grupo. Isto é realizado até convergência, que é obtida quando os pontos já não criam conjuntos.

De acordo com Bussab et al. (1990), o processo é composto das seguintes etapas: (1) - Divisão dos itens em K conjuntos iniciais; (2) - Seguir prosseguimento através da lista de itens, alocando cada item ao grupo cujo centróide é mais próximo (o procedimento geralmente é computado utilizando-se a distância euclidiana entre observações padronizadas ou não padronizadas); (3) - Realização do cálculo do centróide para o grupo que recebe o novo item e do cálculo do centróide para o grupo de onde o item é excluído; (4) - Repetição das etapas 2 e 3 até que o reagrupamento dos itens não seja mais necessário, (figura 20).



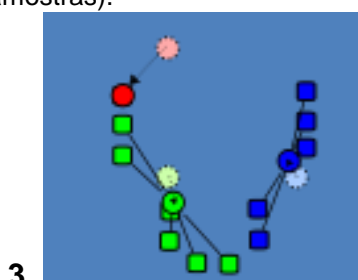
1

Mostra os centróides randomizados iniciais e um número de pontos (amostras).



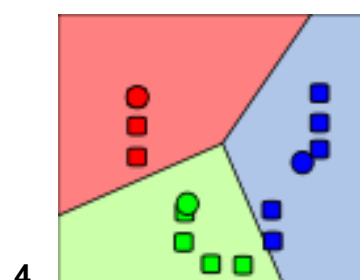
2

Os pontos são associados com o centróide mais próximo.



3

Os centróides são movidos agora para o centro de seus respectivos conjuntos.



4

Etapas 2 e 3 são repetidas até que um nível apropriado da convergência seja alcançado e os pontos se distribuem em clusters (agrupamentos).

Figura 20 - 4 Imagens 2D do funcionamento do algoritmo K-means para 3 pontos
Fonte: Bussab, et al, (1990).

A alocação final dos itens aos agrupamentos é, de certo modo, dependente da divisão inicial ou da seleção inicial de pontos de origem, sendo este um dos pontos inconveniente do k-means, em que o número dos conjuntos k é um parâmetro da entrada. Uma escolha imprópria de k pode render resultados pobres.

O algoritmo supõe também que a variância é uma medida apropriada para descrever o conjunto de agrupamentos.

Ao contrário dos métodos hierárquicos, o K-means não cria uma estrutura de árvore ou dendrograma para descrever os grupos, mas cria um conjunto onde há uma divisória em que os objetos dentro de cada conjunto são classificados o quanto mais perto ou mais longe de outros objetos em outros conjuntos (FERREIRA, 2002).

K-means utiliza um algoritmo iterativo que minimiza a soma das distâncias de cada objeto a seu centróide num conjunto e em relação a todos os outros conjuntos. Este algoritmo move objetos entre conjuntos até que a soma não possa mais ser diminuída. O resultado é um jogo de conjuntos, que são tão compactos e bem-separados quanto possível e alocados em grupos (BUSSAB, 1990).

4.3.4. Métodos dos vizinhos mais próximos (KNN)

É um método de aprendizagem supervisionada baseado na comparação da distância entre amostras, onde uma amostra desconhecida é classificada de acordo com a classe da amostra mais próxima (NETO et al., 2003). Os vizinhos mais próximos assumem um valor que geralmente é atribuída à letra K , significando K -ésimo vizinho calculado pela fórmula da distância euclidiana (equação 26).

De acordo com Webb (2002), o KNN determina um volume V que contém os K -vizinhos mais próximos centrados em um padrão X , o qual se deseja classificar. Por exemplo: se X_k é o K -ésimo vizinho de X , então V será uma esfera centrada em X e com raio igual à distância euclidiana entre X e X_k , ou seja, $\|X - X_k\|$.

O parâmetro K indica o número de vizinhos que serão usados pelo algoritmo KNN durante a fase de teste. O parâmetro K faz com que o algoritmo consiga uma classificação mais refinada, porém o valor ótimo de K varia de um problema para o outro, o que faz com que, para cada base de dados, sejam testados vários valores diferentes de forma a descobrir qual o melhor valor de K para determinado problema.

Um exemplo simples de como funciona a classificação feita pelo algoritmo KNN pode ser visto na Figura 21, onde se pode ver o padrão desconhecido x_d entre padrões da classe 1, e os padrões da classe 2. A tarefa do KNN é classificar o padrão x_d como sendo pertencente a uma das classes exibidas no exemplo. Dependendo do número de K-vizinhos, x_d será classificado da seguinte forma:

Se $K=1$, x_d será classificado como “+”; se $K=3$, x_d será também classificado como “+”; se $K=5$, x_d será classificado como pertencente a classe “*”, figura 21.

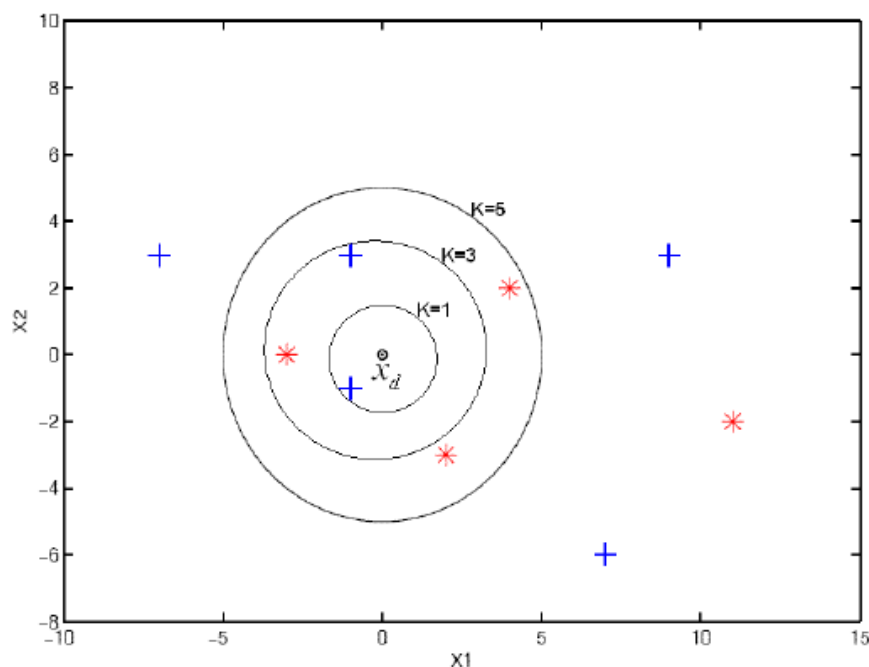


Figura 21. Classificação feita pelo KNN para um padrão desconhecido x_d .

Fonte: Webb, (2002).

Para classificar amostras futuras desconhecidas num modelo já construído, calcula-se a distância entre esta amostra e todas as outras com classe conhecida (conjunto de treinamento). Se as classes estão bem separadas, $K=1$ fornece uma boa classificação da amostra desconhecida, sendo assim, o vizinho mais próximo tem alta probabilidade de pertencer à mesma classe da amostra. Para obter uma classificação mais confiável, recomenda-se considerar uma maior quantidade de vizinhos mais próximos.

Por exemplo: para um valor de $K=6$ onde uma amostra desconhecida apresentou as 4 menores distâncias próximas das amostras da classe A e as duas

outra distâncias correspondentes às amostras da classe B, pode-se considerar que esta amostra desconhecida pertence a classe A.

O método KNN faz a classificação de acordo com a similaridade que a amostra desconhecida apresenta em relação às amostras do conjunto de treinamento. Segundo Neto et al. (2006), quando não se dispõe de informação prévia sobre a classificação das amostras, procura-se identificar no conjunto de treinamento possíveis padrões de agrupamento, usando-se um método de reconhecimento não supervisionado, tais como PCA e HCA. Sendo assim, a análise dos gráficos obtidos por HCA (dendrograma) e PCA (escores e pesos) é complementar ao KNN, pois, além de aumentar a consistência das interpretações, o entendimento do conjunto de dados é facilitado e as inter-relações entre as variáveis ficam mais evidentes.

4.3.5 Redes neurais artificiais (RNAs)

4.3.5.1 Uma abordagem geral sobre redes neurais

O corpo humano é uma máquina e seu funcionamento é dotado de inteligência que vem da mente humana em reproduzir sistemas descritos por funções biológicas que tenham as faculdades humanas como uso da linguagem, aprendizagem, adaptação, criatividade, auto-aperfeiçoamento.

Para Cybenko (1989) as RNAs são na verdade aproximadores universais de funções biológicas e como tal, podem servir para descrever movimentos e criar relações de funcionamento entre objetos de um dado sistema. Por outro lado, Haykin (2001) acrescenta que as características particulares de desempenho das Redes Neurais Artificiais (RNAs) frente a dados incompletos e/ou sua capacidade de estabelecer relações entre os mesmos podem ser uma das alternativas a mais frente às análises estatísticas tradicionais.

Segundo Haykin (2001), os modelos de inteligência artificial (IA) utilizando redes neurais (RN) são alternativos aos modelos tradicionais de predição, classificação ou aglomeração de amostras. Para Leme (2000), há dois paradigmas: as RNAs utilizam-se de inteligência artificial (IA) de dois tipos: a “simbólica” e a “conexionista”.

A inteligência artificial simbólica tenta simular o comportamento inteligente humano desconsiderando os mecanismos responsáveis por tal.

Já a inteligência artificial conexionista acredita que construindo-se um sistema que simule a estrutura do cérebro, este sistema apresentará inteligência, ou seja, será capaz de aprender, assimilar, errar e aprender com seus erros. Entretanto, características de percepção e raciocínio do sistema como um todo, ainda não são satisfatoriamente descritas nestes modelos e representam um conhecimento difuso, inexato, e às vezes de impossível solução. Os algoritmos que procuram se aproximar ao máximo dos sistemas inteligentes é os que propõe simular aspectos do comportamento humano, segundo Vellasco (2006).

De uma forma geral, as RNAs são uma vertente da IA conexionista constituído de sistemas especialistas (SE) de programação, lógica fuzzy e algoritmo genético, dentre outros.

A lógica fuzzy ou difusa trata e representa incertezas entre verdadeiro e falso. Algoritmo genético são algoritmos evolutivos que usam técnicas evolutivas como hereditariedade, mutação, seleção natural e recombinação.

4.3.5.2 Breve histórico sobre redes neurais

As primeiras RNAs concebidas a partir de um modelo de neurônio artificial que utiliza como fundamentos uma modelagem matemática de neurônios biológicos tiveram origem nos trabalhos de McCulloch e Pitts (1943) para implementação das funções booleanas “e” ou “ou”, simples funções de escolhas.

Para Lemes (2000), esta nova função discriminatória arbitrária não é satisfatória se olharmos que muitas variáveis envolvidas estão quase sempre interrelacionadas e fazem parte de um todo dentro do sistema que se quer descrever e o resultado deste implemento simplesmente obedecerá a uma álgebra de Boole, que utiliza-se de funções de escolhas, utilizadas a partir de uma inteligência simbólica com base na representação da lei dos conjuntos. Lemes (2000) comenta que no sistema nervoso os estímulos externos e internos, tanto físicos quanto químicos, desencadeiam as respostas musculares e glandulares, sendo assim, é responsável pela integração do organismo com o seu meio ambiente.

Por isto, a explicação de Lemes (2000) ao definir as RNAs como funções discriminatórias arbitrárias tem seu fundamento.

Como as pesquisas iniciais de redes neurais não consideravam as propriedades fisiológicas dos neurônios biológicos e de suas conexões, o modelo inicial é bem simples quando comparado com o neurônio biológico que possui uma estrutura complexa - esta é a primeira geração de redes neurais- as redes de uma única camada e não descreviam os sistemas eficientemente.

Por outro lado, conforme ainda esclarece Lemes (2000), o modelo integrador do neurônio de McCulloch-Pitts (1943) ainda é uma boa aproximação, pois introduziu o princípio de uma função limiar e o conceito de pesos, ou seja, cada entrada do neurônio terá um valor associado.

A propriedade mais importante das redes neurais é a habilidade de aprender de seu ambiente e com isso melhorar seu desempenho. Isso é alcançado através de um processo iterativo de ajustes aplicado aos seus pesos - o treinamento. O aprendizado ocorre quando a rede neural atinge uma solução generalizada para uma classe de problemas.

As RNAs mesmo que limitadas pela baixa tecnologia computacional existente na época, foram um marco por buscar soluções na própria natureza para fazer emergir comportamentos também inteligentes em máquinas – era o pensamento da época –.

A credibilidade de se reproduzir o sistema como um todo estava ainda longe de ser verdade e novas idéias cresceram a luz de pesquisas desenvolvidas por Donald Hebb (HEBB, 1949), um Neurobiólogo/neuropsicólogo que estudava o comportamento dos animais. Seu livro intitulado "The Organization of Behavior" (A Organização do Comportamento) e teve marco importante nestas novas idéias que surgiam.

Hoje a maioria dos algoritmos de treinamento das redes neurais é inspirada na Lei de Hebb: uma teoria para a organização do comportamento que diz que o condicionamento psicológico clássico está presente em qualquer parte dos animais, sendo uma propriedade de neurônios individuais (HEBB, 1949).

Esta lei de aprendizagem específica para as sinapses dos neurônios é função da intensidade da ligação sináptica e aumenta se os neurônios são excitados simultaneamente na rede. Esta grande rede proporciona uma fabulosa capacidade de processamento e armazenamento de informação.

Rosemblatt (1962) mostrou, em seu livro "Principles of Neurodynamics", o modelo dos "Perceptrons". Nele, os neurônios eram organizados em camada de entrada e saída, onde os pesos das conexões eram adaptados a fim de se atingir a eficiência sináptica.

Em 1969, Minsky e Papert descreveram bem os perceptrons (MINSKY e PAPERT, 1969) e provaram que a rede proposta anteriormente por Rosemblatt não era capaz de distinguir padrões linearmente separáveis. As afirmações de Minsky e Papert (1969) tiveram um efeito negativo sobre o estudo com redes neurais na época. Nestes conflitos surgiram outras abordagens dando flexibilidade aos pesos e maior capacidade à Rede Neural a partir dos neurônios com funções de ativação não-lineares, das arquiteturas com mais de uma camada e algoritmos apropriados para alterar os pesos sinápticos, as pesquisas em inteligência artificial tiveram naquela época o intuito de resolver problemas em domínios restritos.

Houve um período de pesquisa silenciosa que se seguiu de 1969 a 1982 e a publicação dos trabalhos do físico e biólogo Hopfield (1982) relatando a utilização de redes simétricas para otimização, a partir de um algoritmo de aprendizagem que estabilizava uma rede binária simétrica com realimentação.

Esta nova concepção de redes persuadiu cientistas a se reunirem novamente e 13 anos mais tarde ressurgem novas idéias na área, tendo como marco o trabalho de Rumelhart & Chaivin (1995), mostrando o avanço e popularização do "algoritmo de retropropagação do erro", conhecido como Algoritmo *Backpropagation*, desenvolvido na mesma época por vários pesquisadores trabalhando em diferentes áreas de aplicação de RNA(s). Este algoritmo foi utilizado mais recentemente para promover o aprendizado supervisionado dentro da própria rede neural, segundo Vellasco e Pacheco (2006). O algoritmo *Backpropagation* é hoje em dia a técnica de aprendizado supervisionado mais utilizado para redes neurais unidirecionais multicamadas, e foram bastante estudadas pelos autores Rumelhart & Chaivin (1995).

4.3.5.3 Princípios do funcionamento das redes neurais

O objetivo da rede neural é estabelecer uma relação, que pode ser de linearidade ou não, entre dados de entrada (*inputs*) e dados de saída (*outputs*) e para isto são utilizadas transformações matemáticas na entrada, de modo a produzir a saída desejada. Há um aprendizado dentro da rede neural artificial a respeito do sistema em estudo e de como ele se comporta, e então, aplica-se este conhecimento armazenado numa função somatório e novos dados de entrada permitem prever uma saída apropriada.

Num sistema neuronal, as interconexões de entrada (terminal de recepção) correspondem aos dendritos; os cálculos efetuados correspondem ao que ocorre no corpo celular de um neurônio biológico e o sentido da propagação; e as interconexões de saída (terminal de transmissão) correspondem aos axônios. A figura 22 representa o modelo de um neurônio biológico.

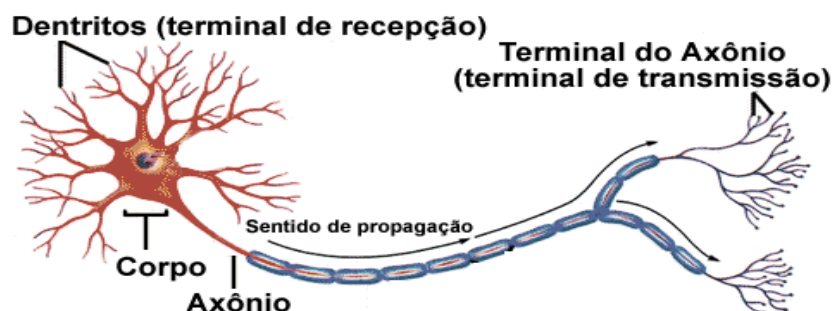


Figura 22 - Modelo de um neurônio biológico

Fonte: <http://www.Incc.br/~labinfo/tutorialRN/imagens/esquemaNeuronio.gif>

Matematicamente, num neurônio artificial os dados de entrada (x) são multiplicados pelos respectivos pesos (w) fornecendo uma função somatória ($\sum x_i w_{ji}$). A saída do neurônio é obtida a partir de uma função de transferência (linear, sigmoideal, etc., dependendo do comportamento dos dados) aplicada sobre a função somatório. A figura 23 representa os componentes de um neurônio artificial.

A saída do neurônio é obtida a partir de uma função de transferência [$f(\cdot)$], (uma função linear, sigmoideal, etc., dependendo do comportamento dos dados) aplicada sobre $\sum (x_i w_{ji})$ por um processo de combinação linear.

A figura 23 representa os componentes de um neurônio artificial de modelo simplificado, compreendido dos seguintes comandos:

Estímulos de entrada (x); ligações sinápticas (w); saída (Y), produzida segundo o valor de ativação alcançado pelo neurônio; função de transferência dada por $f(.)$ e uma combinação linear $\Sigma (x_i w_{ji})$

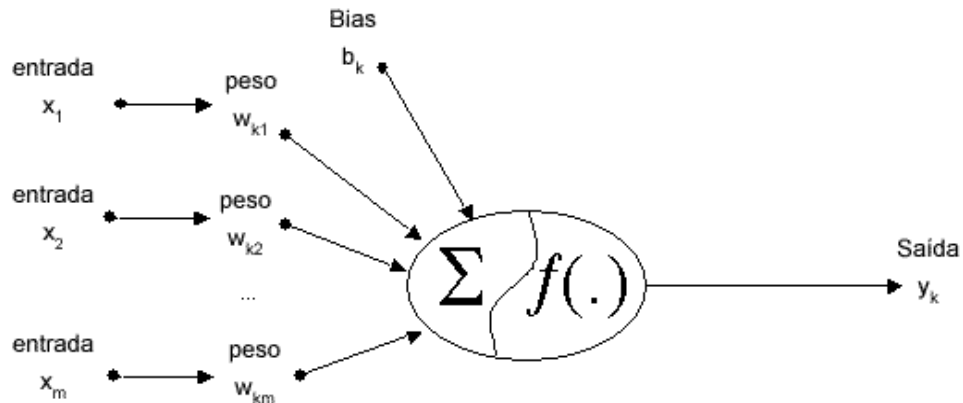


Figura 23 - Modelo de um Neurônio Artificial

Fonte: http://www.Incc.br/~labinfo/tutorialRN/frm1_neuronio.htm

De forma geral, nos neurônios artificiais o conjunto de sinapses (w) representa as ligações entre neurônios. Cada ligação possui um valor (peso), que representa a sua força: os estímulos de entrada são multiplicados pelos respectivos pesos de cada ligação, podendo gerar um sinal tanto positivo (excitatório) quanto negativo (inibitório).

O combinador linear (Σ) executa o somatório dos sinais produzidos pelo produto entre os pesos sinápticos (w_{ji}) e as entradas fornecidas (x_i) ao neurônio. Em outras palavras, é o integrador dos sinais que chega ao neurônio k . A saída do neurônio k é definida pelo seu valor de ativação calculado da seguinte forma:

$$v_j = \sum_{i=1}^m w_{ji} * x_i + b_j \quad (36)$$

Sendo que V é o valor de ativação do neurônio k ; W são os pesos das conexões do neurônio k ; x é o valor de cada um dos m estímulos recebidos que chegam ao neurônio k ; b é o valor do bias que será somado ao valor do combinador linear para compor o valor de ativação. A função de ativação fornece o valor da saída de um neurônio. O número de neurônios, assim como o número de camadas, é determinado por tentativa e erro, de forma a minimizar os erros na saída da rede. O treinamento da rede neural pode ser dividido em duas fases: uma de aprendizagem e outra de validação.

4.3.5.4 Processo de aprendizado de uma rede neural

No processo de aprendizado de uma rede neural, um conjunto conhecido de dados de entrada (X) e saída (Y) é apresentado à rede. Em seguida, os pesos (estabelecidos aleatoriamente no início) entre os neurônios são ajustados até a entrada produzir a saída desejada. Este ajuste é realizado através de métodos de otimização dos pesos em função dos erros, dos quais o mais utilizado é a retropropagação dos erros. Há vários processos de aprendizado, que de forma geral podem ser classificados em:

- Aprendizado Supervisionado – Neste tipo de aprendizado é fornecida uma referência do objetivo a ser alcançado.
- Aprendizado Não-Supervisionado - Neste caso não é fornecida nenhuma referência externa.

4.3.5.4.1 Aprendizado não supervisionado

Um exemplo de aprendizado não supervisionado utiliza como ferramenta a técnica SOM (Self-Organizing Map), conhecido por mapas de Kohonen (KOHONEN, 2001). De acordo com Costa e Netto (2007), o mapa de Kohonen tem sido utilizado como ferramenta para visualização de dados de elevada dimensionalidade. Características importantes da rede SOM incluem a compressão de informação e a tentativa de manutenção da topologia dos dados.

Uma das ferramentas de visualização de um mapa 2-D treinado é U-matriz, mostrada na figura 24, onde são mostradas as relações de distância de pesos entre neurônios vizinhos do espaço de saída (COSTA; NETTO; 2007).

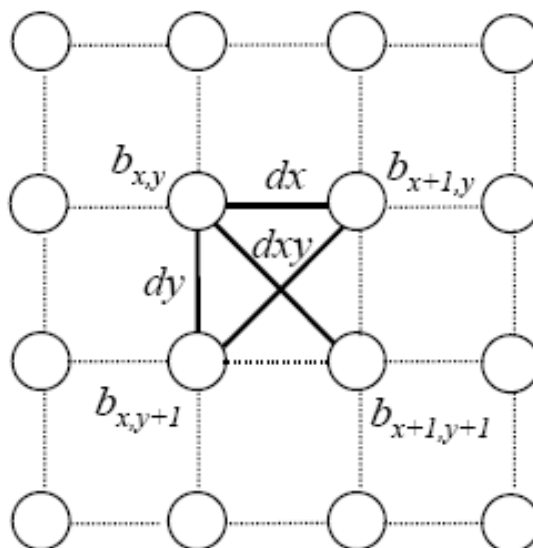


Figura 24 - Três distancias d_x , d_y e d_{xy} da U-Matriz

Fonte: Costa & Netto, (2007).

Considere um mapa cujos neurônios possuem vizinhança retangular de tamanho $X * Y$. Seja $[b_{x,y}]$ a matriz de neurônios e $[W_{x,y}]$ a matriz de pesos. Para cada neurônio em b existem três distancias d_x , d_y e d_{xy} , na U-matriz (figura 24).

Considerando as distâncias euclidianas, no caso da topologia da grade de neurônios serem retangulares, as distâncias d_x , d_y e d_{xy} podem ser definidas pelas equações 37, 38 e 39 a seguir.

$$\|b_{x,y} - b_{x+1,y}\| = \sqrt{(x+1-x)^2 + (y-y)^2} \quad (37)$$

$$\|b_{x,y} - b_{x,y+1}\| = \sqrt{(x-x)^2 + (y+1-y)^2} \quad (38)$$

$$d(x,y) = \frac{1}{2} \left(\frac{\|b_{xy} - b_{x+1,y+1}\|}{\sqrt{2}} + \frac{\|b_{xy+1} - b_{x+1,y}\|}{\sqrt{2}} \right) =$$

$$\frac{1}{2\sqrt{2}} \left[\sqrt{\sum_i (w_{xy}^i - w_{x+1,y+1}^i)^2} + \sqrt{\sum_i (w_{xy+1}^i - w_{x+1,y}^i)^2} \right] \quad (39)$$

Um exemplo de aprendizado supervisionado pode ser obtido utilizando a rede perceptrons que utiliza o algoritmo de retropropagação de erros (*backpropagation*) (RUMELHART, CHAVIN, 1995), porém, este aprendizado não será discutido. Neste trabalho utilizaremos o aprendizado não supervisionado

Finalmente, deve ser considerada a importância das RNAs para o paradigma de aprendizado supervisionado, não supervisionado e competitivo, ou qualquer outro de interesse. Segundo Rumelhart e Chavin (1995) o que qualquer rede particular pode fazer é dependente de sua estrutura e das propriedades computacionais de seus elementos componentes. Aprender é imprescindível nos processos de inteligência, mesmo que artificial, e nenhuma rede pode aprender o que não é capaz de fazer em princípio.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Introdução

Os metabólitos canabinóides são o alvo deste estudo pelo caráter inédito de se fazer correlação estrutura química *versus* atividade biológica em metabólitos canabinóides. Os metabólitos são produtos de biotransformações e as principais reações ocorrem em pontos estratégicos da cadeia canabinóide (como mostrado no item 3.5.3), segundo Potter (2004), Sanchez e Verpoorter (2008).

Os metabólitos escolhidos e submetidos a cálculos neste estudo foram os produtos obtidos a partir de reações de oxidações primárias. Potter (2004) esclarece que reações de dehidrogenação, outras oxidações seletivas e reciclações resultam em baixa atividade psicomimética, por este motivo, escolheu-se trabalhar com metabólitos provenientes destas últimas reações.

Inicialmente, selecionou-se um conjunto de 30 compostos metabólitos canabinóides, mostrados na tabela 04, cujas atividades para muitos deles não foram ainda esclarecidas, sendo assim, assumiu-se realizar um estudo com bases qualitativas. Da série de 30 compostos estudados neste trabalho, apenas 10 tiveram suas atividades descritas na literatura e serão mostrados no texto que se segue.

Como a proposta inicial deste trabalho é a de realizar um estudo químico-teórico com metabólitos canabinóides e estabelecer a relação entre as propriedades e os parâmetros estruturais e moleculares que permitem descrever a correlação estrutura química e atividade biológica, decidiu-se inicialmente não dividir os compostos em classes já que não tínhamos, *a priori*, esclarecimentos da psicoatividade de todos os metabólitos. Contudo, no decorrer da análise resolveu-se ajustar o conjunto de 30 metabólitos em três classes: psicoativos, moderadamente psicoativos e psicoinativos.

Esta escolha deveu-se ao fato de que estes metabólitos depois de realizados todos os cálculos e classificados por técnicas quimiométricas se organizavam em 3 blocos distintos: um bloco ao redor do Δ^9 -THC (psicoativo), outro bloco ao redor do COOH-THC (psicoinativo) e um terceiro grupo, distribuído numa faixa intermediária.

Como o potencial fisiológico referente à psicoatividade dos canabinóides é importante para a aplicação dos canabinóides na química medicinal e na indústria farmacêutica, uma das propostas deste trabalho foi selecionar quais dentre os parâmetros moleculares são mais importantes para separar psicoatividade.

Para esta tarefa fez-se necessário lançar mão de métodos teóricos de cálculos de mecânica molecular MM, métodos semi-empíricos AM1 e PM3, PM5, baseado na teoria do funcional densidade - DFT e métodos estatísticos PCA, HCA, KNN, K-means e também redes neurais artificiais ANN. Todas estas técnicas estão descritas nos próximos itens deste capítulo.

Depois de estabelecida as relações entre os descritores e os metabólitos canabinóides e proposto um modelo estatisticamente satisfatório para descrever a psicoatividade, partiu-se para uma etapa de validação dos resultados onde foi testado o modelo obtido. Para esta etapa utilizou-se como conjunto de treinamento os 30 metabólitos candidatos e para o conjunto de predição selecionou-se outros canabinóides já citados na literatura, formado por um conjunto de 22 canabinóides ativos e inativos estudados por Honório (2004). Ao final foram estudados 52 compostos canabinóides e o THC e todos submetidos a análises quimiométricas.

O modelo proposto, após a etapa de validação dos resultados, foi considerado satisfatório para descrever todos os 53 compostos.

Por fim, uma análise mais detalhada das geometrias otimizadas de alguns compostos estudados foi realizada para esclarecer aspectos geométricos das relações obtidas para os compostos canabinóides.

5.2 Nomenclaturas dos compostos estudados

Todos os metabólitos foram nomeados pelo sistema dibenzopirano (RAZDAN, 1979). As nomenclaturas de cada um dos compostos foram dadas neste trabalho seguindo as regras atuais da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Na tabela 4 estão listados os nomes dos 30 compostos alvos deste estudo.

Tabela 4 - Nomes dos 30 metabólitos Canabinóides estudados

METABOLITOS CANABINÓIDES	NOMES DOS COMPOSTOS ESTUDADOS
MET 1	3-pentil-9-carbóxi- Δ^9 -THC
MET2	3-(1'-hidróxipentil)-9-carbóxi- Δ^9 -THC
MET3	3-(2'-hidróxipentil)-9-carbóxi- Δ^9 -THC
MET4	3-(2'-hidróxietil)-9-carbóxi- Δ^9 -THC
MET5	3, 9-dicarbóxi- Δ^9 -THC
MET6	3-(1'-carbóximetil)-9-carbóxi- Δ^9 -THC
MET7	3-(2'-carbóxietil)-9-carbóxi- Δ^9 -THC
MET8	3-(3'-carbóxiopropil)-9-carbóxi- Δ^9 -THC
MET9	3-(2'-carbóxivinil)-9-carbóxi- Δ^9 -THC
MET10	3-pentil-8-ceto- Δ^9 -THC
MET11	α -3-pentil-8-hidróxil-9-hidróximetil- Δ^9 -THC
MET12	β -3-pentil-8-hidróxil-9-hidróximetil- Δ^9 -THC
MET13	3-(2'-hidróxipentil)-9-hidróximetil- Δ^9 -THC
MET14	3-(3'-hidróxipentil)-9-hidróximetil- Δ^9 -THC
MET15	3-(4'-hidróxipentil)-9-hidróxil- Δ^9 -THC
MET16	3-pentil-9-hidróximetil-9-epóxi- Δ^9 -THC
MET17	3-(4'-hidróxipentil)-9-carbóxi- Δ^9 -THC
MET18	3-(2'-carbóxietil)- Δ^9 -THC
MET19	3-(4'-hidróxipentil)-9-hidróximetil- Δ^9 -THC
MET20	3-carbóximetil-9-hidróximetil- Δ^9 -THC
MET21	3-(2'-carbóxietil)-9-hidróximetil- Δ^9 -THC
MET22	3-carbóximetil-8-hidróxil- Δ^9 -THC
MET23	3-(2-carbóxietil)-8-hidróxil- Δ^9 -THC
MET24	3-(3'-carbóxiopropil)-8-hidróxil- Δ^9 -THC
MET25	3-(3'-carbóxiopropenil)-8-hidróxil- Δ^9 -THC
MET26	3-(3'-hidróxipentil)-9-carbóxi- Δ^9 -THC
MET27	β -3-pentil- 8-hidróxil- Δ^9 -THC
MET28	3-pentil-9-hidróximetil- Δ^9 -THC
MET29	α -3-pentil- 8-hidróxil- Δ^9 -THC
MET30	3-(2'-hidróxipentil)- Δ^9 -THC

5.3. Sistema de numeração THC para os canabinóides estudados

A estrutura geral e o sistema de numeração utilizados neste trabalho encontram-se mostrado na figura 25. Os substituintes R1 tem numeração de C11 para o carbono nesta posição e R2 tem numeração (C1'-C2'-C3'-C4'-C5') para os carbonos. O anel carbocíclico é representado pela letra A. O anel pirânico pela letra B e o anel fenólico pela letra C. O anel B+C fundidos é chamado de anel benzopirano.

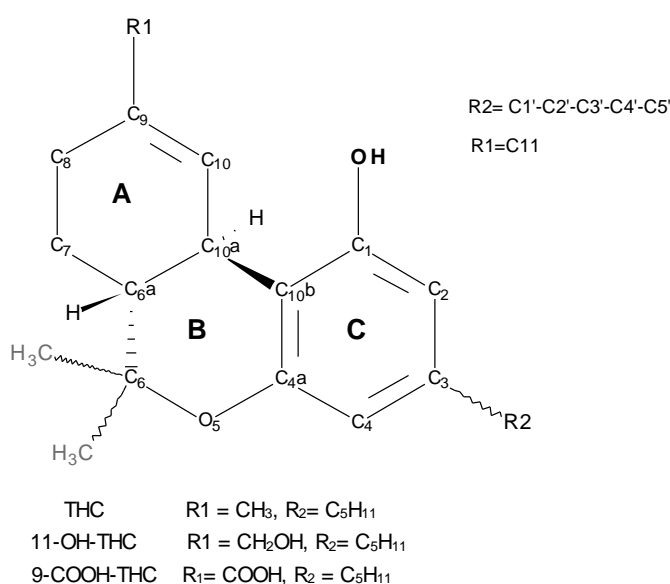


Figura 25 – Estrutura geral e sistema THC para canabinóides

5.4 Estudos da relação estrutura *versus* atividade biológica em canabinóides

Muitas relações importantes entre as propriedades moleculares, estruturais e eletrônicas e a atividade biológica dos canabinóides foram estabelecidas para o estudo de SAR e QSAR. Os fatores foram inicialmente citados por Mechoulam (1973), Razdan (1979) e Reggio et al. (1989) e também foram tratados por Honório (2004) e Arroio (2004). É importante esclarecer que todas estas relações foram proposições destes autores citados acima e estão descritas nos itens de 1 a 9 neste tópico.

As relações que porventura venham a ser propostas neste trabalho serão estabelecidas para metabólitos canabinóides e tratadas no capítulo 6, referente aos resultados e discussões. Os itens 1-9 propostos por Mechoulam (1973), Razdan (1979), Reggio et al. (1989), Honório (2004) e Arroio (2004) são os seguintes:

- (1) - Segundo Mechoulam (1973), o anel benzopirânico formado pela união dos anéis B e C, mostrados na figura 25, é condição importante para a atividade. Porém, a substituição do oxigênio do anel fenólico C, por um átomo também eletronegativo, como por exemplo, um átomo de nitrogênio ou enxofre, não acarreta perda da atividade.
- (2) - Substituintes na posição C-9 no anel carbocíclico A, mostrado na figura 25, não é essencial para a atividade e pode ser substituído por hidroxila, metoxila ou cetona, sem perda da atividade;
- (3) - A hidroxilação em C-11 mantém a atividade. Porém, uma posterior oxidação no C-11 à derivado 11-COOH, torna o composto inativo;
- (4) - Mesmo a presença de dois substituintes diferentes no anel carbocíclico A, tais como um grupo metila na posição 9 e uma dupla ligação no anel A, ou uma hidroxila na posição 8, mantém a atividade;
- (5) - O anel carbocíclico A tem geometria não planar e deve estar *trans* ao anel B para conferir a atividade. Entretanto, a adição de um anel planar ao anel benzopirano reduz a atividade;
- (6) - Os isômeros referentes à dupla ligação no anel A são ativos na seguinte ordem: (Δ^9 ->, Δ^8 ->, Δ^6 > - THC's);
- (7) - O grupo OH fenólico em C-1 deve estar livre. Substituições a este grupo por grupos alcóxidos (R-O-) mantêm a atividade, porém, grupos amino diminuem consideravelmente a atividade, e se estes grupos forem tióis, elimina;
- (8) - A cadeia lateral pentil, indicada na figura 25 pela letra R₂, é de grande importância na atividade. O comprimento desta cadeia pode ser variado sem perda da atividade. Porém, a condição mínima para manter a atividade é de 3 átomos de carbonos. Ramificações nesta cadeia aumentam a potência da molécula;
- (9) - A adição de cadeias laterais ao anel fenólico C também pode ser realizada via um átomo de oxigênio (formando um éter ou éster) sem perda de atividade, porém grupos volumosos em C-4 e C-2 parece interferirem na atividade.

Mechoulam et al. (1980) ainda descreve duas regularidades na cadeia canabinóide para realizar estudos de SAR: (a) Na ausência de outros substituintes, a estereoquímica do substituinte em C-1 é preferencialmente equatorial para haver psicoatividade na molécula canabinóide. (b) Se a adição de substituintes na cadeia canabinóide não causar substancial mudança na estereoquímica do tríciclo ABC a atividade psicoativa é mantida.

Nos estudos de Reggio et al. (1987), os autores sugerem que há dois componentes na molécula canabinóide que conferem a psicoatividade: o direcionamento dos pares isolados dos elétrons do grupo OH fenólico (hidroxila ligada a C1 na figura 25) e a orientação do anel A relativo a este oxigênio fenólico.

Reggio e Mazurek, (1987) mostram características moleculares e de reatividade do THC. Observando a geometria I da figura 26, observa-se ser esta a geometria de mais baixa energia para o Δ^9 -THC, obtida pela análise conformacional obtida pelos autores onde mostra o THC não planar. Para estes autores, o anel A existe na conformação metade-cadeira. O anel B foi suposta como uma conformação que um grupo metila está no mesmo lado do H₁₀ e o outro fica do lado contrário. Os autores esclarecem ainda que não existe efeito de impedimento entérico dos grupos CH₃ neste caso.

A geometria II mostra na figura 26 uma perspectiva diferente da molécula. Esta geometria tem mais alta energia. Nela, a conformação do anel A fica *quase* planar e não há saliência dos grupos na molécula. Para os autores, uma não planaridade para o anel A não auxilia na atividade do canabinóides. A conformação do anel A pode permitir interações hidrofóbicas. Os pares solitários dos elétrons da OH geram a reatividade direcional e as propriedades de reatividade são dependentes da orientação da OH, segundo Reggio, (1987).

Reggio (1987) estudou ainda dois estados conformacionais nos canabinóides:

- (1) O grupo OH fica ligeiramente dobrado fora do plano do anel C com o hidrogênio que aponta longe do anel A e o ângulo diedral (C2- C1- O-H = -1°), geometria I.
- (2) A OH está abaixo do plano do anel C e apontando para o anel A e (C2- C1- O-H = 155°), geometria II. A geometria I contribui significante para psicoatividade, segundo Reggio (1987) (figura 26).

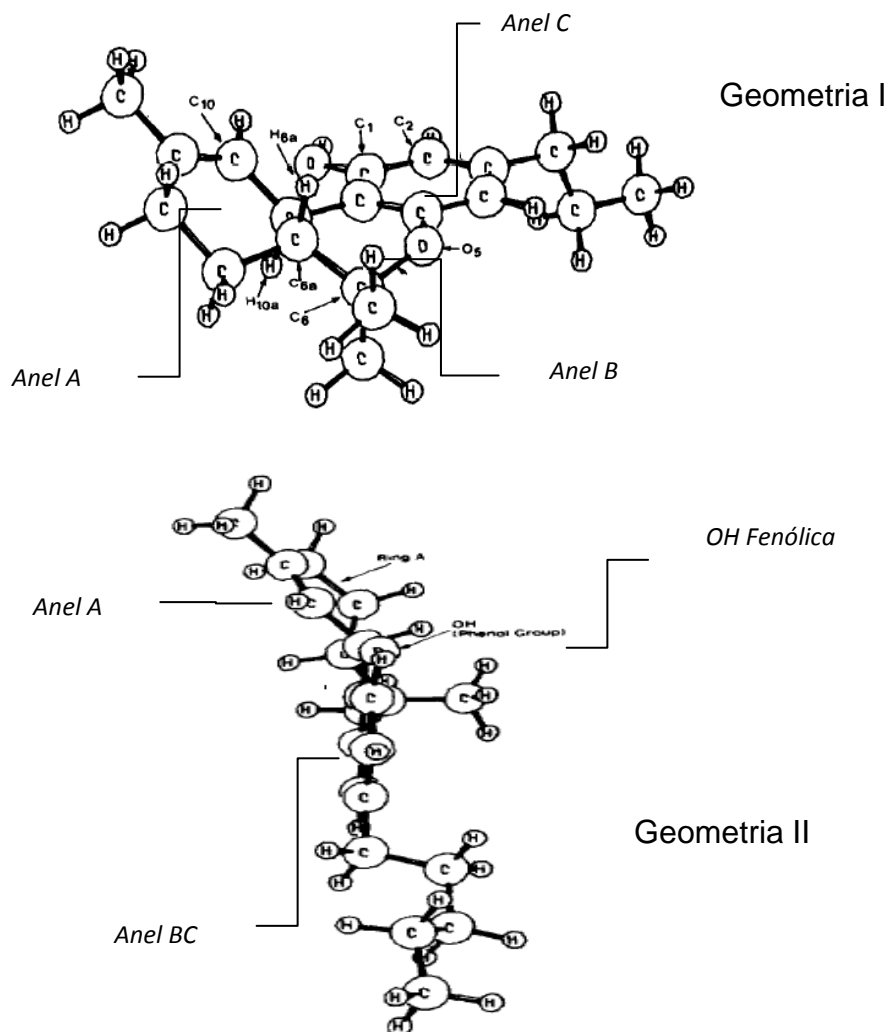


Figura 26 – Conformação do Δ^9 -THC determinada por mecânica molecular MM2: A geometria I mostra o anel A não planar. A geometria II o anel BC é paralelo à cadeia pentil. Fonte: Reggio & Mazurek 1987.

Honório et al. (2004) estudou canabinóides que apresentam substituintes nos carbonos C-4 e C-2, onde ela conclui que estas posições auxiliam na descrição da psicoatividade. Neste trabalho Honório et al. (2004) sugere que existem quatro importantes variáveis para descrever a psicoatividade dos canabinóides e são elas: E LUMO, Log P, VC4 (volume do substituinte na posição C4) e o LP1 (índice topológico de Lovasc-Pelikan). Os compostos metabólicos canabinóides estudados neste trabalho, não apresentam substituições no anel benzopirânico BC. As substituições mais características acontecem na cadeia lateral ligada ao anel C, nas posições C-8 e C-10 e C-9 da estrutura dos 30 metabólicos canabinóides (ver figuras 25,17a, b).

5.5 Modelagem molecular dos canabinóides

5.5.1 Otimização das geometrias dos compostos

A otimização da geometria de uma dada molécula é uma técnica de minimização de energia que visa encontrar um conjunto de coordenadas que descrevam a menor energia potencial de um sistema de interesse. O procedimento básico consiste em realizar uma varredura numa superfície potencial na direção em que a energia decresce e encontrar pontos em que o sistema apresente mínimo local de energia próximo.

A minimização da energia faz uso somente de uma pequena parte do espaço de configurações. Porém, pelos ajustes nas posições atômicas, ela relaxa as distorções nas ligações químicas, nos ângulos entre ligações e nos contatos de Van der Waals. Um dos problemas encontrados nos algoritmos de otimização é de não se conseguir ultrapassar possíveis barreiras de energia para se chegar à conformação de menor energia possível, ou seja, num mínimo global de energia, onde a energia é a menor do sistema. A figura 27 mostra os mínimos local e global.

A minimização da energia ou otimização da geometria é um processo iterativo para modelagem molecular (MM) e foi alcançado neste trabalho utilizando diferentes campos de força. O algoritmo de otimização utilizado nesta etapa é o Polak-Ribier, (1969) e utilizou-se o método do gradiente conjugado de energia, tendo como critério de convergência $0,01 \text{ kcal } \text{Å}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ para 675 ciclos utilizando o pacote computacional Hyperchem.

Como esta etapa de minimização de energia é um procedimento cauteloso quando se quer reproduzir geometrias otimizadas para descrever interações em sistemas biológicos, selecionou-se o método com perturbações aleatórias de Polak-Ribier (1969) por ser um método mais sofisticado de busca de um mínimo da função energia, pois além do método utilizar a informação sobre a primeira derivada (gradiente), leva em conta o caminho já percorrido na busca do mínimo, por um processo de “gradientes conjugados”.

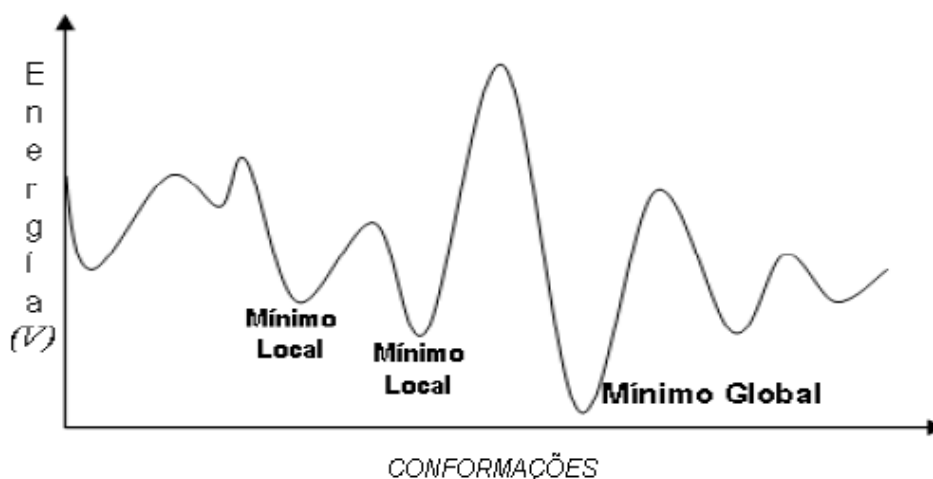


Figura 27 – Curvas de energia potencial mostrando mínimo local e global

Este método permite, em geral, uma convergência mais rápida que o método “steepest-descent”, que utiliza somente a informação do gradiente na coordenada, sendo também um método de primeira derivada, porém, converge mais lentamente que o Polak-Ribier nas proximidades do mínimo.

O método dos gradientes conjugados utiliza para a determinação do passo seguinte, além do valor do gradiente no ponto atual, o valor do gradiente obtido no passo anterior.

Após a otimização inicial por MM, as moléculas foram submetidas a uma técnicas de minimização de energia para obter uma conformação de menor energia em sistemas moleculares. Em seguida, uma reotimização das geometrias foi realizada utilizando o pacote computacional AMPAC 8.0 (AMPAC 8.0 manual Copyright 2004, Semichem, In., USA). Para assegurar que as estruturas otimizadas correspondam às conformações mais estáveis foram realizados cálculos subseqüentes a esta etapa utilizando as técnicas semi-empíricas do tipo AM1 e PM3, processadas no pacote computacional Hyperchem 7.5 (HyperChem Professional 7.5, Hypercube, INC., Gainesville, FL). O algoritmo de otimização utilizado nesta etapa foi o de Polak-Ribier e diversas propriedades foram calculadas e serão descritas a seguir.

5.5.2 Cálculos das propriedades moleculares

Depois de obtidas as geometrias otimizadas dos 30 metabólicos canabinóides as moléculas foram submetidas a cálculos semi-empíricos AM1 e PM3 utilizando o pacote computacional Hyperchem 7.5 e foram calculados 17 descritores e são eles: (energia do orbital molecular ocupado de mais alta energia (H); energia do próximo orbital molecular ocupado de mais alta energia (H-1); energia do orbital molecular desocupado de mais baixa energia (L); energia do próximo orbital molecular desocupado de mais baixa energia (L+1); dureza absoluta (η); logaritmo do coeficiente de partição octanol/água (Log P); polarizabilidade (α); energia de hidratação (E. H.); volume molecular (V); massa molecular (M); momento de dipolo (μ); área da superfície (A); refratividade molar (MR); ângulo diedro (C1-C10b-C10a-C10) (T1); ângulo diedro (H-O-C1-C2) (T2); ângulo diedro (O-C1-C2-C3) (T3); ângulo diedro (C1-C2-C3-C1) (T4).

Para estudo das propriedades eletrônicas utilizou-se o método Teoria do funcional da densidade – DFT. Segundo Koch, 2001, os métodos de DFT são melhores e mais precisos para otimização da geometria, pois incorporam parcialmente os efeitos da correlação eletrônica. Inicialmente, realizou-se a otimização estrutural de todos os 30 metabólicos e do THC com o método DFT, tendo como funcional híbrido B3LYP, com o conjunto de funções de base 6-31G*, pois, de acordo do Koch (2001) resultados como geometria molecular e propriedades associadas à distribuição de carga são adequadamente reproduzidas nestes sistemas de bases pequenas (KOCH, 2001).

O programa utilizado nesta etapa foi o Gaussian 3.0 (Gaussian 03 Online Manual. http://www.gaussian.com/g_ur/k_dft.htm).

Segundo Morgon e Custodio (1995), cálculos DFT fornecem resultados similares aos dos modelos *ab initio* mais comuns, tais como MP2 e MP4 (HEHRE, 1986), Para Vessecchi et al. (2008), os parâmetros geométricos obtidos pelos métodos DFT possuem a mesma qualidade daqueles otimizados por MP2, também tratados por Johnson e Pople (1993).

Os métodos DTF são técnicas alternativas aos métodos *ab initio* devido principalmente à demanda requerida de recursos computacionais, que na DFT é menor. Os descritores moleculares calculados por DFT foram: (energia do orbital

molecular ocupado de mais alta energia (H); energia do próximo orbital molecular ocupado de mais alta energia (H-1); energia do orbital molecular desocupado de mais baixa energia (L); energia do próximo orbital molecular desocupado de mais baixa energia (L+1); dureza molecular (η); coeficiente de partição (Log P); momento de dipolo (μ); ângulo diedral (C1-C10b-C10a-C10) (T1); ângulo diedral (H-O-C1-C2) (T2); ângulo diedral (O-C1-C2-C3) (T3); ângulo diedral (C1-C2-C3-C1) (T4). Todos estes descritores foram calculados por métodos AM1 e DFT.

5.6 Métodos quimiométricos de análises

Os métodos quimiométricos englobam um conjunto de métodos matemáticos e estatísticos para estudar sistemas químicos visando selecionar condições ótimas de medidas e experimentos para que o máximo de informação seja descrito nas técnicas selecionadas.

Os métodos quimiométricos levam vantagem porque são baseados na existência de colinearidade, segundo Ferreira (2002). Conseqüentemente, estes métodos muito têm a oferecer ao processo de construção de modelos de QSAR, especialmente em sistemas complexos, em que se dispõe de muitos descritores. A seguir, trataremos de cada método quimiométrico utilizado neste trabalho em particular.

Neste trabalho foram utilizadas diversas técnicas quimiométricas e a representatividade do conjunto de dados para os trinta metabólicos canabinóides foi alcançada quando os dados foram alocados em formas de matrizes de dados, onde as linhas representaram os canabinóides e as colunas representam as variáveis calculadas. Como os dados têm natureza multivariado, utilizaram-se diversas técnicas para extrair o maior número possível de informações relevantes.

Um problema multivariado pode ser abordado por diferentes maneiras. É quase impossível que este propósito seja alcançado utilizando um único método estatístico.

Um modelo satisfatório é representar o conjunto m-dimensional em um bidimensional. A dimensionalidade do problema constitui um aspecto importante a ser considerado. Não existe, *a priori*, um número exato de variáveis necessárias para descrever adequadamente as propriedades de um sistema, o que se pode

estabelecer, por momento, é que existe um número mínimo de variáveis para ser ter uma análise simplificada de determinado processo.

Para este processo de análise de dados, empregaram-se os métodos quimiométrico numa ordem de prioridade para predição, descrição, agrupamento e discriminação do potencial psicoativo dos compostos estudados. Estes métodos incluíram as análises PCA, HCA, KNN e RNAs. Os pacotes computacionais usados foram Statistica 6.0, {(Minitab Inc.'s SCAN release 1.0 (1995)} e Matlab 7.1 (<http://www.mathworks.com/products/matlab/>).

5.6.1 Preprocessamento

Antes de aplicar as análises dos dados numéricos, é necessário efetuar algum tipo de pré-processamento nos dados originais. Esta etapa consiste numa transformação dos dados em função da natureza do estudo, pois as grandezas apresentam dimensões distintas e devem ser preprocessados. Os principais tipos de pré-processamento são: Centrado na Média – CM, Escalados pela Variância – EV e Autoescalamento – AS.

Os dados centrados na média são mais usuais para modelos de calibração, segundo Beebe et al. (1998). Nesta técnica, a média de cada variável é subtraída de seus respectivos elementos, desta forma, populações e amostras são concentradas em vetores de médias e matrizes de covariância, onde a covariância é dada como uma medida da extensão da conectividade entre duas variáveis.

O grau de associação estatística existente em diferentes pares de variáveis aleatórias pode ser estimado obtendo-se uma covariância normalizada que pode ser alcançada utilizando um coeficiente de correlação para qualquer par de variáveis aleatórias restrito num intervalo (-1, +1). Assim, diferentes pares de variáveis aleatórias ficam em uma mesma escala adimensional, logo, podem ser comparadas umas com as outras. Se as variáveis estatisticamente são independentes, elas devem apresentar coeficientes de correlação igual a zero, logo o coeficiente de correlação estabelece uma associação linear existente entre duas variáveis e seu valor tem variação de -1 a 1.

O escalamento pela variância é empregado quando as variáveis possuem dimensões grandes e discrepantes entre si. Nestes casos, cada variável é dividida pelo seu desvio padrão. Assim, os pesos das variáveis em diferentes escalas são

considerados equivalentes diminuindo o risco de perdas de informações que poderiam ser relevantes. Este método é bastante sensível à presença de “*outliers*” (pontos atípicos no conjunto de dados).

A técnica de autoescalamento é aplicada a cada variável para que seja dada a mesma importância a cada uma delas nas próximas análises. O autoescalamento pode assegurar que as influências relativas às diferentes variáveis utilizadas nas análises sejam independentes de suas respectivas unidades. O autoescalamento é na verdade um somatório da técnica de centrar na média e escalamento pela variância. Assim, cada variável assumirá média zero e variância um.

O autoescalamento dá a mesma importância às variáveis independente da sua dimensão, por isso é um procedimento mais preciso do que o escalamento pela variância. Contudo, não é um método sensível a “*outliers*”. Neste trabalho utilizou-se o método de autoescalamento na etapa de preprocessamento dos dados.

5.6.2 Redução do número de variáveis

Após autoescalados todos os descritores, a próxima etapa foi a redução do número de variáveis. Para modelos de QSAR só há necessidade de uma variável para descrever dada propriedade, segundo Kubinyi (1995). De acordo com Ferreira (2002), a presença de duas variáveis correlacionadas é desnecessária. Neto et al. (2007) ainda esclarece que, no geral, há algum grau de correlação entre as variáveis, e quando isto ocorre provavelmente os termos envolvidos estão descrevendo a mesma propriedade.

Frequentemente, para diminuir o número de variáveis, no geral, os autores utilizam técnicas não supervisionadas, por exemplo: PCA e HCA, visto que estas duas técnicas conjuntas auxiliam na seleção prévia das variáveis relevantes e discriminatórias e o resultado obtido fornecerá um conjunto inicial que servirá de dados de entrada para as análises quimiométricas subsequentes (FERREIRA, 2002).

De acordo com Geladi e Kowalski (1986), uma análise estatística que possua um conjunto inicial de “*m*” variáveis, apenas um subconjunto *K* deverá ser utilizado na construção de modelos de QSAR e os valores de *K* apresentam limites.

A medida que *K* se aproxima de “*n*” (número de casos), ocorre um efeito conhecido popularmente de “ajuste forçado” (uma tradução de “*overfitting*”).

Segundo Ferreira (2002), em QSAR convencionou-se que, para reduzir a possibilidade de “overfitting”, cada grupo de cinco ou seis compostos incluídos no modelo permite a acomodação de uma variável (KUBINYI; 1995). Por exemplo, se a série possui vinte compostos ($n = 20$) o número de variáveis que o modelo pode acomodar é quatro ($K = 4$). Assim, podemos concluir que para a série de 30 canabinóides aqui estudados, 6 variáveis podem descrever a informação.

Os métodos quimiométricos também podem ser úteis no processo de seleção e redução de variáveis. Para Ferreira (2002), numa primeira etapa, pode-se utilizar PCA para explorar a estrutura dos dados, que consiste na visualização das propriedades das moléculas com base nos descritores considerados, sem o objetivo de descobrir ou propor qualquer relação causa-efeito. Isto é importante para visualizar a correlação entre os descritores e agrupamentos entre os compostos. A segunda etapa consiste na utilização desse espaço de descritores para a modelagem, que é feita através de outros métodos quimiométricos que também incluem PCA, muito embora a construção de modelos baseados em PCA e HCA não utiliza o processo de seleção nos mesmos moldes (FERREIRA; 2002).

Na PCA, o conjunto original de dados é reduzido gerando-se um número pequeno de variáveis denominadas componentes principal (CP). Estas técnicas têm a vantagem de reproduzirem componentes independentes (ortogonais) entre si e, portanto, a correlação entre as variáveis não limita sua aplicabilidade.

Observa-se na prática que há sempre algum grau de correlação entre as variáveis, e quando isto ocorre, teoricamente, é porque os termos envolvidos estão descrevendo a mesma propriedade. Nos modelos clássicos de QSAR, só há necessidade de uma variável que descreva dada propriedade (HANSCH et al; 1995 (a)(b); KUBINYI, 1995).

Ferreira (2002) ainda esclarece que a presença de duas variáveis correlacionadas, além de desnecessária, é também prejudicial, pois o tratamento dado a esta análise baseia-se em cálculos de matrizes e determinantes, e por sua vez, colunas que descrevam propriedades iguais levam a determinantes nulos, logo, devem ser desconsiderados. Para Bussab (1999), deve-se procurar diminuir o número de variáveis, de forma que a seleção de variáveis contemple tanto a sua relevância como seu poder de discriminação face ao problema em estudo. Segundo Neto et al. (2007), variáveis que assumem praticamente o mesmo valor para todos

os objetos são pouco discriminatórias e sua inclusão pouco contribui para a determinação da estrutura do agrupamento.

Por outro lado, a inclusão de variáveis com grande poder de discriminação, porém irrelevantes ao problema, pode mascarar os grupos e levar a resultados equivocados. Neste trabalho utilizou a técnica de PCA para redução do número de variáveis.

Outra maneira de reduzir o número de variáveis é calculando o peso de variância ou peso de Fisher para cada variável, em um par de categorias, método utilizado por Honório (2004) para tratamento estatísticos de dados obtidos para canabinóides. Este tipo de redução consiste em calcular o peso da variância dentro das classes, sendo aplicada quando tem-se um número considerável de variáveis no conjunto inicial.

Esta técnica não foi utilizada no conjunto de dados deste trabalho, já que a escolha dos descritores foi sistemática em função do critério da psicoatividade dos canabinóides e os descritores escolhidos para este trabalho são os mesmos já utilizados nas outras pesquisas com canabinóides.

Outra técnica para escolher uma variável relevante é antecipadamente decidir sobre o valor limite de correlação entre duas variáveis, que no geral, é papel do pesquisador, e calcular o índice de correlação que consiste em decidir em função da experiência do analista se uma dada variável é mantida ou eliminada da matriz de dados de acordo com o conhecimento prévio da representatividade de cada variável. Em QSAR, costumam-se evitar as combinações em que o índice de correlação seja inferior a 0,63, segundo Ferreira (2002).

Neste trabalho consideramos os índices da matriz de correlação para analisar a redução de variáveis, como um complemento para suportar a análise PCA e HCA na redução do número de descritores.

5.6.3 Métodos de reconhecimento de padrões e classificação

Os métodos de reconhecimento de padrões (RP), de acordo com Barros (2006), são aplicados para diferentes finalidades, entre elas a análise exploratória de dados e a classificação de amostras.

Os dois métodos de análise exploratória mais usada em SAR são a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA).

Estas duas técnicas foram utilizadas neste trabalho utilizando o programa Statistica 6.0. As metodologias destas técnicas foram baseadas nos artigos e livros dos autores (FERREIRA, 2002; FROSCHE et al. 2005; NETO et al. 2003).

A análise por PCA foi uma das técnicas quimiométricas que além de servir para a etapa de redução de variáveis, também foi utilizada para reconhecimento de padrões na intenção de se achar padrões de associação entre os descritores calculados para um conjunto de 30 metabólicos canabinóides e o THC. Como muitos dos metabólicos não tinham suas atividades esclarecidas, a hipótese utilizada foi a de que as amostras deveriam ser representativas da população. A partir disto tentou-se criar relações entre os descritores e os compostos canabinóides.

Em seguida, um método aglomerativo hierárquico conhecido como análise de agrupamentos do tipo K-means foi utilizado neste trabalho e o pacote computacional utilizado nesta etapa foi o Statistica. O modelo consistiu basicamente no cálculo de coordenadas dos centróides de cada agrupamento e das distâncias ao centróide mais afastado. Ao contrário dos métodos hierárquicos HCA, K-Means não cria uma estrutura de árvore para descrever os grupos, mas cria um único nível de conjuntos. K-Means usa algoritmo iterativo para minimizar a soma das distâncias de amostra ao seu centróide e entre todos os conjuntos. Este algoritmo move objetos entre conjuntos até que a soma não possa mais ser diminuída. O resultado é um grupo de conjuntos compactos e bem separados quanto possível. Para nosso conjunto utilizou-se a distância euclidiana para calcular o centróide e os resultados foram agrupados em gráficos de distribuição por grupos.

Quando não se dispõe de informação prévia sobre a classificação das amostras, procura-se identificar no conjunto de treinamento possíveis padrões de agrupamento, usando-se um método de reconhecimento não supervisionado, segundo Neto (2007).

A técnica mais popular para isto é a análise hierárquica de agrupamentos que utiliza dendrogramas para visualizar os agrupamentos entre as variáveis e as amostras.

A análise com HCA foi o procedimento realizado nesta etapa tendo sido feito no conjunto total de 17 descritores iniciais e também para os conjuntos de variáveis selecionadas como relevantes do método PCA e K-means. Neta análise, a distância utilizada foi a distância euclidiana e os métodos de separação foram pelo vizinho mais próximo por encadeamento simples (single linkage), vizinho mais distante por encadeamento completo (complete linkage) e médias ponderadas de grupos pareados (Weighted Pair-Group Average) (SILVA; 2008).

Outro estudo típico de reconhecimento de padrão é a classificação de amostras de acordo com uma propriedade específica, baseada em medidas indiretamente relacionadas com as propriedades. Os métodos de classificação que usam esse processo são conhecidos como métodos supervisionados de reconhecimento de padrões. São conhecidos como método dos vizinhos mais próximos (KNN), e foi um dos descritos por Honório (2004) para canabinóides e também foi utilizado neste trabalho. O tratamento por KNN consistiu no cálculo das distâncias euclidianas para cada descritor, e numa primeira análise um total de 10 vizinhos mais próximos foram dispostos em uma matriz de dissimilaridades.

5.6.4 Métodos de inteligência artificial

5.6.4.1 Redes neurais artificiais (RNAs)

Esta aproximação é utilizada especialmente para traçar as relações não lineares existentes entre as amostras. As redes neurais com sistemas de retropropagação são técnicas de aprendizagem supervisionada em que os pesos adaptáveis são revisados dinamicamente para minimizar erros de estimativas. Para a classificação não-supervisionada, os mapas auto-organizáveis (Self-Organizing Map – SOM), conhecidos por mapas de Kohonen (Kohonen 2001), são os mais utilizados. Segundo Costa e Neto (2007), a rede SOM forma um mapeamento de um espaço de entrada p -dimensional em um arranjo de neurônios geralmente bidimensional, via aprendizado não-supervisionado.

O método RNAs por aprendizado não-supervisionado foi o método adicional utilizado neste trabalho. A técnica RNA teve como alvo principal criar um modelo auto-organizável em forma de mapas. Estes mapas servem para aglomerar os canabinóides com propriedades similares, relacionados aos descritores relevantes para separação em canabinóides ativos e psicoativos já selecionados pelas técnicas anteriores (PCA, HCA, KNN, K-means). Foram construídos mapas auto-organizáveis em duas dimensão utilizando uma topologia quadrada 12x12 (12 linhas e 12 colunas) para construir a matriz, totalizando 144 neurônios e 100.000 passos (epochs) para treinamento. As distâncias euclidianas foram as medidas selecionadas entre os neurônios vizinhos. A taxa de aprendizagem foi ajustada para 0,9 (primeira fase) e a 0,01 (segunda fase) ao treinamento. Esta etapa foi realizada utilizando o pacote computacional Matlab.

No capítulo 6 a seguir serão mostrados os dados obtidos no trabalho e discutidos os resultados, as relações propostas, as análises das geometrias dos compostos e a proposição de modelos de correlação estrutura *versus* atividade psicofarmacológica dos canabinóides e seus metabólitos.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Apresentação dos resultados

6.1.1 Siglas e definições dos descritores moleculares

Um conjunto de 17 descritores de diferentes classes foi calculado com a intenção de descrever propriedades atômicas e moleculares relacionadas ao potencial psicoativo de 30 metabólicos canabinóides. As siglas, suas definições e respectivas unidades de medidas estão mostradas na tabela 5 abaixo.

Tabela 5. Siglas, definições e unidades das propriedades atômicas e moleculares calculadas no trabalho.

Propriedades calculadas e respectivas unidades	
H	Primeiro orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO) (eV)
H-1	Segundo orbital molecular ocupado de mais alta energia (eV)
L	Primeiro orbital molecular desocupado de mais baixa energia (LUMO) (eV)
L+1	Segundo orbital molecular desocupado de mais baixa energia (eV)
η	Dureza absoluta ($\eta = \frac{1}{2} (L-H)$) (eV)
Log P	Logaritmo do Coeficiente de Partição octanol/água
α	Polarizabilidade molecular (\AA^3)
E. H.	Energia de hidratação (Kcal/mol)
V	Volume molar (\AA^3)
M	Massa molecular (u.m.a)
μ	Momento de dipolo (D)
A	Área de superfície (\AA^2)
MR	Refratividade molar (\AA^3)
T1	Ângulo diedral T1 (C1-C10b-C10a-C10) ⁰
T2	Ângulo diedral T2 (H-O-C1-C2) ⁰
T3	Ângulo diedral T3 (O-C1-C2-C3) ⁰
T4	Ângulo diedral T4 (C1-C2-C3-C1) ⁰

6.1.2 Dados dos descritores e estudo das propriedades dos canabinóides

Primeiramente foram calculadas as energias dos orbitais de fronteira (HOMO) (H) e (LUMO) (L) em virtude do caráter especial que esta variável tem no esclarecimento acerca dos estudos da relação estrutura-atividade (SAR) aos canabinóides (SILVA et al., 2008; HONORIO e DA SILVA; 2002; DA SILVA e TRSIC; 1995). Estas energias estão mostradas na tabela 6.

Tabela 6 - Descritores moleculares que representam os orbitais de fronteira (H, L, H-1 e L+1)*calculados por métodos AM1, utilizando o programa Hyperchem.

Compostos	H-1(eV)	H(eV)	L(eV)	L+1(eV)	η (eV)
THC (+)	-5,771	-5,483	0,363	0,773	2,92
MET1 (-)	-5,992	-5,674	-0,816	0,194	2,43
MET2 (-)	-6,015	-5,646	-0,781	0,154	2,43
MET3 (-)	-5,911	-5,545	-0,767	0,295	2,39
MET4	-6,060	-5,727	-0,844	0,136	2,44
MET5	-6,474	-6,018	-1,284	-0,912	2,36
MET6	-6,170	-5,829	-0,886	-0,267	2,47
MET7	-6,112	-5,780	-0,878	0,076	2,45
MET8	-6,107	-5,771	-0,869	-0,068	2,45
MET9	-0,628	-6,052	-1,825	-0,979	2,12
MET10 (+/-)	-6,089	-5,753	0,066	0,080	2,29
MET11 (+/-)	-5,985	-5,684	0,219	0,320	2,84
MET12 (+/-)	-5,846	-5,547	0,310	0,659	2,89
MET13	-5,728	-5,396	0,343	0,726	2,87
MET14	-5,733	-5,444	0,343	0,727	2,89
MET15	-5,734	-5,439	0,345	0,638	2,88
MET16 (+/-)	-5,770	-5,487	0,364	0,765	2,92
MET17	-6,040	-5,750	0,015	0,134	2,40
MET18	-6,052	-5,797	-0,131	0,363	2,83
MET19	-5,753	-5,477	0,342	0,732	2,90
MET20	-5,655	-5,988	-0,149	0,414	2,92
MET21	-5,978	-5,679	-0,030	0,35	2,82
MET22	-5,693	-5,996	-0,197	0,517	2,90
MET23	-5,679	-5,977	-0,028	0,417	2,93
MET24	-5,577	-5,864	0,269	0,320	3,06
MET25	-6,10	-5,775	-1,216	0,030	2,28
MET26	-6,044	-5,723	-0,917	0,111	2,41
MET27 (+)	-5,835	-5,544	0,274	0,693	2,91
MET28 (+)	-5,595	-5,880	0,225	0,582	3,05
MET29 (+)	-5,787	-5,461	0,318	0,654	2,88
MET30	-5,698	-5,361	0,393	0,845	2,88

Os sinais (+) são para os metabólicos psicoativos; (+/-) para os de baixa psicoatividade e (-) para os psicoinativos. Os demais descritores dos 17 calculados serão mostrados nas tabelas seguintes.

As propriedades eletrônicas relacionadas aos orbitais de fronteira fornecem informações sobre o caráter elétron-aceptor e elétron-doador dos compostos. Os processos de transferência de elétrons de um orbital presente numa espécie doadora para um orbital presente numa espécie aceitadora são típicos das interações fármaco-receptor. O orbital HOMO mede o caráter elétron-doador e para maiores valores de energia do HOMO (E_{HOMO}), maior a tendência doadora de elétrons da espécie. O orbital LUMO mede o caráter elétron-aceptor, sendo assim, valores menores de energias do LUMO (E_{LUMO}) representam menos resistência da molécula para aceitar elétrons de outra espécie e este efeito pode ser aplicado ao canabinóides e foi tratado por Honório e Da Silva (2002). Segundo estes autores, os canabinóides têm caráter elétron-aceptor pronunciado, sendo assim, baixos valores de E_{LUMO} , muito embora os compostos psicoativos no geral, apresentam $E_{\text{LUMO}} > 0,3$ eV.

Os metabólicos psicoativos estão indicados na Tabela 6 pelo sinal (+) e são eles: 8 β -Hidróxi- Δ^9 -THC (MET27); 8 α -Hidróxi- Δ^9 -THC (MET29) (obtidos pela hidroxilação em C-8 do Δ^9 -THC) e o metabólito 11-Hidróxi- Δ^9 -THC (MET28) (obtido pela hidroxilação do THC em C-11), sendo este último um metabólito mais lipofílico que o THC. O THC também é psicoativo (PERTWEE, 2005).

Os metabólicos de mais baixa psicoatividade estão mostrados na tabela 6 com o sinal (+/-) e são eles: 8-ceto- Δ^9 -THC (MET10) (obtido por oxidação enzimática dos METs 27 e 28) e também o 9,10-epóxido do Δ^9 -THC (MET16) (obtido pelo ataque à dupla ligação do THC) e apresentou potencial equivalente ao derivado em catalepsia, anticonvulsante, porém menos psicoativo e temos também os isômeros 8 α ,11 α -dihidróxi- Δ^9 -THC (MET11) e 8 α ,11 β -dihidróxi- Δ^9 -THC (MET12) produtos de hidroxilações em C-8 do 11-hidróxi- Δ^9 -THC e também exibem baixa psicoatividade (MATSUNAGA et al. 2001; WATANABLE et al, 2005; PERTWEE, 2005).

Os metabólicos psicoativos estão indicados na tabela 6 pelo sinal (-) e são eles: O 11-Carbóxi- Δ^9 -THC (MET1) (obtido pela oxidação em C-11 do THC) e os metabólicos 11-carbóxi-1'-hidróxi- Δ^9 -THC (MET2) e 11-carbóxi-2'-hidróxi- Δ^9 -THC (MET3) (obtidos pela oxidação na cadeia pentil), (PERTWEE, 2005; DRUMMER e ODELL, 2001; MATSUNAGA et al. 2001; WATANABLE et al, 2005). As posições alfas (α) são as posições que estão acima do plano do anel A, as posições beta (β) se encontram abaixo do plano do anel (ver figura 25 para esclarecimentos).

Pela tabela 6 pode-se verificar que os valores do HOMO não apresentam quase variações, sendo todos os valores negativos, o que não fornece distinção do potencial psicoativo que devem ser consideradas. As energias dos LUMO, ao serem comparadas, apresentaram características importantes. Os compostos ativos (os que possuem sinal (+) na tabela 6), possuem energia do LUMO positivas e a metade dos compostos apresentaram valores acima de 0,3 eV. As moléculas inativas apresentam valores abaixo de 0,3 eV, concordando com Honório (2004).

Os próximos descritores calculados medem parâmetros eletrônicos empíricos e foram calculados a partir das geometrias otimizadas obtidas pelo método AM1, com exceção do dipolo (μ) que utilizou DFT. Estes descritores estão na tabela 7.

Tabela 7 – Refratividade Molar (MR), Polarizabilidade (α) e momento dipolar (μ)

Compostos	MR (Å^3)	α (Å^3)	μ (D)
THC (+)	96,450	37,490	0,999
MET1 (-)	98,160	38,220	1,317
MET2 (-)	99,680	38,850	2,701
MET3 (-)	99,830	38,850	1,975
MET4	86,290	33,350	1,123
MET5	81,480	31,600	1,746
MET6	86,020	33,430	1,035
MET7	90,630	35,270	1,115
MET8	95,230	37,100	2,611
MET9	91,720	35,080	2,895
MET10 (+)	97,140	37,580	4,067
MET11 (+/-)	99,740	38,770	2,966
MET12 (+/-)	99,740	38,770	1,868
MET13	99,890	38,770	2,818
MET14	99,890	38,770	2,115
MET15	99,970	38,770	2,924
MET16 (+/-)	96,670	38,190	2,201
MET17	99,910	38,850	4,625
MET18	88,910	34,550	5,622
MET19	96,450	37,490	1,401
MET20	86,060	33,350	0,433
MET21	90,680	35,180	1,285
MET22	85,820	33,350	3,605
MET23	90,420	35,180	3,960
MET24	95,020	37,020	2,398
MET25	96,120	36,830	1,700
MET26	99,830	38,850	2,317
MET27 (+)	97,960	38,130	1,762
MET28 (+)	98,220	38,130	3,299
MET29 (+)	97,960	38,130	2,573
MET30	98,110	38,130	1,085

O momento dipolar (μ) mede a magnitude da carga deslocada numa molécula e pode estar relacionado às forças intermoleculares. Os canabinóides psicoativos e psicoinativos apresentam variações nos seus valores de momento de dipolo, possivelmente, pela presença de grupos substituintes de polaridades distintas na estrutura das moléculas canabinóides estudadas.

De acordo com a tabela 7, percebem-se oscilações nos valores dos momentos dipolares, porém os valores não seguem uma regularidade que permita diferenciação em relação à psicoatividade e psicoinatividade, sendo assim, ao que parece, este descritor não é eficiente para separar canabinóides psicoativos dos psicoinativos.

Quanto mais polarizável for uma molécula, maior será sua tendência a unir-se a outras moléculas. Altos valores de polarizabilidade (α) medem a tendência à deformação. Esta variável também não apresentou variações significativas que permitam separar os canabinóides mostrados na tabela 7.

A refratividade molar (MR) é uma medida que permite informações a cerca do encaixe da molécula com seu respectivo receptor, estando correlacionada com a conformação tridimensional da estrutura molecular do fármaco de acordo com Dunn, (1980). Segundo Tavares (2004), esta variável também pode expressar o caráter lipofílico de grupos substituintes. Pela tabela 7, há pouca variação nos valores e percebe-se que a refratividade molar também não se comportou neste estudo como uma variável eficiente para diferenciar o potencial psicoativo nos metabólicos canabinóides.

O coeficiente de partição (Log P) de uma determinada espécie química é um parâmetro que mede o comportamento de um composto ao se locomover nas biofases aquosa ou orgânica no interior das células (WERMUTH, 2000). Como a lipofilia esta diretamente relacionada à afinidade da membrana lipídica às moléculas, os canabinóides ativos que possuem altos valores de Log P devem apresentar mais afinidades pelas membranas lipídicas. Observando os valores da tabela 8 percebe-se que o Log P apresenta valores maiores para os compostos ativos, conseqüentemente, estes compostos são mais lipofílicos e que, provavelmente, atravessam a membrana biológica com mais facilidade. Os menores valores de Log P são encontrados para os metabólicos psicoinativos.

Tabela 8 – Valores da área (A), volume (V), massa molar (M), coeficiente de partição (Log P) e energia de hidratação (E. H.)

Compostos	Log P	E. H. kcal/mol	A (Å ²)	V (Å ³)	M (u.m.a.)
THC (+)	5,350	-0,490	543,65	1015,730	314,470
MET1 (-)	4,580	-5,860	542,99	1038,920	344,450
MET2 (-)	3,660	-10,120	548,33	1056,770	360,450
MET3 (-)	3,520	-9,490	552,10	1059,380	360,450
MET4	2,240	-14,010	461,80	907,020	318,370
MET5	2,220	-13,370	424,85	852,060	318,330
MET6	2,160	-13,970	454,63	908,500	332,350
MET7	2,550	-14,830	494,01	963,530	346,380
MET8	2,950	-13,400	528,35	1017,000	360,410
MET9	2,630	-13,460	486,19	943,030	344,360
MET10 (+/-)	4,960	-1,400	570,92	1026,520	328,450
MET11 (+/-)	3,430	-11,140	625,69	1057,920	346,470
MET12 (+/-)	3,430	-9,090	561,33	1066,570	346,470
MET13	3,290	-9,460	566,66	1060,790	346,470
MET14	3,290	-10,450	567,06	1061,750	346,470
MET15	3,210	-10,820	576,06	1065,280	346,470
MET16 (+/-)	3,530	-5,470	575,76	1051,400	346,470
MET17	3,450	-10,910	541,25	1064,520	360,450
MET18	3,320	-9,200	561,53	938,230	316,400
MET19	3,431	-10,93	493,12	1024,720	314,470
MET20	1,920	-14,250	564,63	905,490	318,370
MET21	2,320	-13,370	457,48	962,770	332,400
MET22	2,010	-12,780	494,58	902,330	318,370
MET23	2,410	-12,910	450,37	958,230	332,400
MET24	2,800	-13,740	489,19	1012,770	346,420
MET25	2,880	-14,320	527,76	988,730	344,410
MET26	3,520	-10,420	511,46	1061,570	360,450
MET27 (+)	4,430	-5,370	564,74	1032,890	330,470
MET28 (+)	4,340	-6,450	553,91	1040,580	330,470
MET29 (+)	4,430	-3,640	557,90	1029,070	330,470
MET30	4,290	-3,900	555,20	1039,130	330,470

Os descritores presentes na tabela 8 foram calculados a partir da geometria otimizada utilizando o método AM1 e programa Hyperchem. As energias de hidratação (E.H.) estão relacionadas ao transporte da molécula nas biofases aquosas. Os canabinóides ativos apresentam os valores menos negativos das energias de hidratação e são conseqüências de maiores absorções de energia ao entrar em contato com moléculas de água. O THC apresenta a maior energia de hidratação, assim como os METs 27,28 29 todos psicoativos. O MET 10 também

apresenta alto valor de E.H. Com exceção do MET1 os METs 2 e 3 (psicoativos) apresentaram E.H mais baixas.

Apesar de algumas irregularidades, as energias de hidratação permitiram uma separação entre metabólicos psicoativos e psicoativos, podendo ser considerada uma variável importante no estudo da relação estrutura atividade para canabinóides.

Os descritores A, V e M, também mostrados na tabela 8, medem os parâmetros estéreos e geométricos dos canabinóides e refletem o aspecto tridimensional dos canabinóides e segundo Tavares (2004), são muitas vezes decisivos para a compreensão dos mecanismos envolvidos no estabelecimento da atividade biológica desempenhada por alguns compostos. Entretanto, não se mostraram variáveis que permitiram diferenciar o potencial psicoativo dos canabinóides, pois seus valores na tabela 8 não mostram variações que devam ser consideradas relevantes.

Para a classe de compostos canabinóides, os ângulos diedros são variáveis correlacionadas com a geometria do anel carbonílico A (ver figura 25 para esclarecimentos) e esta geometria por sua vez interfere na psicoatividade, segundo Mechoulam (1980) e Reggio (1987). Os diedros também foram calculados por Silva (2008), Honório (2000, 2004) e Arroio (2004, 2006). Sendo assim, estes ângulos se mostraram interessantes de serem analisados para o estudo nos metabólicos canabinóides e serão descritos a seguir.

Foram calculados os seguintes ângulos diedros: T1(C1-C10b-C10a-C10); T2(H-O-C1-C2); T3(O-C1-C2-C3) e T4(C1-C2-C3-C1') (tabela 9) e são os que representam a região da cavidade entre os anéis ABC (ver figura 25 para esclarecimentos).

O T1 representa o ângulo da cavidade entre os anéis ABC. O T2 indica a orientação do grupo OH fenólico. O T3 e T4 correspondem à orientação do anel fenólico com relação ao grupo R2.

Observa-se, pela tabela 9, que os valores dos diedros T1 e T2 são os que apresentam maiores variações e por isto, devem ser os mais representativos para diferenciar o potencial psicoativo. T2 têm menores valores para os metabólicos psicoativos e maiores valores para os metabólicos psicoativos, já o T4 e T3 não apresentaram este comportamento. Apesar de T3 apresentar uma variação nos seus valores, este não se mostrou ser o diedro mais relevante para representar a propriedade geométrica.

Apesar de não termos evidências experimentais para estabelecer uma escolha dos descritores diedros a serem considerados em todos os metabólitos canabinóides aqui estudados, devido o caráter inédito da realização de cálculos teóricos com metabólitos canabinóides, decidiu-se considerar os diedros T1 e T2, mostrados na tabela 9, como os mais significativos para diferenciar a psicoatividade e psicoinatividade nos canabinóides. Estes descritores foram calculados pelo métodos DFT.

Tabela 9 – Valores de ângulos diedros T1, T2, T3 e T4

Compostos	T1(C1-C10b-C10a-C10) ⁰	T2(H-O-C1-C2) ⁰	T3(O-C1-C2-C3) ⁰	T4(C1-C2-C3-C1') ⁰
THC (+)	-66,345	1,557	-178,414	178,062
MET1 (-)	47,570	4,012	177,406	178,358
MET2 (-)	45,659	5,218	177,686	178,642
MET3 (-)	47,254	3,693	177,404	179,074
MET4	47,000	3,634	177,020	177,773
MET5	47,215	3,919	177,178	179,725
MET6	46,644	4,772	177,160	179,443
MET7	47,454	3,647	177,084	177,911
MET8	47,566	4,381	177,148	177,717
MET9	47,335	3,981	177,459	179,202
MET10 (+/-)	48,154	0,390	177,584	177,420
MET11 (+/-)	47,454	0,871	177,075	178,049
MET12 (+/-)	46,810	3,067	177,224	-178,371
MET13	46,761	-0,189	177,046	179,562
MET14	46,933	0,361	177,156	177,895
MET15	46,505	0,333	177,107	177,606
MET16 (+/-)	-60,362	0,896	-177,771	178,311
MET17	47,336	3,575	177,235	177,508
MET18	46,971	0,266	176,811	178,039
MET19	-46,745	-0,486	-177,373	178,463
MET20	46,807	-0,095	177,269	178,758
MET21	46,464	0,962	177,503	-178,618
MET22	65,244	-0,614	178,324	179,421
MET23	65,773	-1,227	178,220	178,187
MET24	65,650	-0,429	178,357	178,209
MET25	-66,741	2,061	178,152	179,537
MET26	-46,007	-1,891	-177,510	178,230
MET27 (+)	-65,782	1,902	-178,459	178,155
MET28 (+)	47,309	1,480	177,260	177,415
MET29 (+)	-66,783	1,797	-178,572	178,087
MET30	-47,273	0,444	-177,280	-179,404

Podemos considerar, a partir dos dados das tabelas 6,7,8 e 9, e em função do estudo das propriedades descritas para cada variável, que alguns descritores foram avaliados como os mais significativos dentre os 17 calculados inicialmente. Sendo assim, estes descritores selecionados podem ser os mais relevantes para diferenciação da psicoatividade e psicoinatividade dos metabólicos canabinóides estudados neste trabalho.

É oportuno ainda salientar que as considerações acerca das propriedades das moléculas canabinóides psicoativas e psicoinativas, com base nos 17 descritores, são dados preliminares e que nem todos os descritores selecionados apresentam evidências experimentais de seu efeito na molécula. Como estas análises foram realizadas, até o momento, de forma empírica, decidiu-se realizar um estudo com fundamentos estatísticos para convalidação das proposições feitas.

Para realizar um estudo em conjunto dos dados que representam as propriedades físico-químicas, os compostos foram submetidos a análises estatísticas utilizando algumas técnicas quimiométricas. Estes procedimentos foram aplicados na tentativa de criar correlações mais efetivas, e uma análise simultânea e multivariada de todos os parâmetros medidos. Todos estes métodos quimiométricos serão descritos a seguir.

Resumindo, o estudo realizado para cada descritor permitiu selecionar alguns considerados relevantes no estudo e estes descritores são os seguintes: energia do orbital LUMO, coeficiente de partição, energia de hidratação, momento de dipolo, ângulo diedro (T1 e T2), todos selecionados das considerações feitas com os dados obtidos das tabelas 6,7,8 e 9. Os resultados das análises quimiométricas descritas a seguir, podem dar fundamentação as estas considerações feitas.

6.2 Resultados das análises quimiométricas

Antes de iniciar as análises quimiométricas por PCA, HCA, KNN, K-MEANS e RNAs, calculou-se a matriz de correlação utilizando o programa Statistica 6.0 para todos os descritores relatados e, assim, pode-se visualizar as correlações entre eles. Pode-se observar pela matriz de correlação, mostrada na tabela 10, que alguns descritores em particular apresentaram os menores coeficientes de correlação entre si. Por exemplo: em relação a energia do LUMO, o menor índice de correlação foi com o T2 e este por sua vez têm menor correlação com a dureza. A energia do

LUMO também apresentou baixa correlação com o Log P, e este apresentou baixa correlação com os diedros. Analisando a energia de hidratação percebe-se que a menor correlação é com o T2, o mesmo acontece com o momento de dipolo. Segundo Ferreira et al. (2002), boas correlações são aquelas que apresentam baixos coeficientes na matriz de correlação.

De acordo com as considerações feitas acima, pode-se perceber que os descritores que apresentam menores coeficientes de correlação, na matriz da tabela 10, são os mesmos relatados no final da sessão anterior e considerados relevantes, e são eles: LUMO, T2, dureza, Log P, energia de hidratação e dipolo.

A concordância de que os descritores selecionados pela matriz de correlação são os mesmos descritores selecionados como relevantes para descrever às propriedades dos canabinóides psicoativos e psicoinativos sugere que as implicações feitas até o momento são satisfatórias e descrevem a propriedade que se deseja, muito embora as técnicas quimiométricas (PCA, HCA, K-means, KNN e RNAs) são as análises que vão dar maior consistência a proposição inicial e serão tratadas a seguir.

Tabela 10 – Matriz de Correlação para 17 descritores. Tabela selecionada diretamente do programa Statistica.

	H-1	H	L	L+1	η	LogP	Pol	E.H.	V	M	μ	A	Ref	T1	T2	T3	T4
H-1	1.00	0.48	0.86	0.90	0.85	0.20	0.37	0.28	0.39	-0.07	-0.03	0.34	0.34	-0.11	-0.62	-0.23	-0.13
H	0.48	1.00	0.64	0.73	0.39	0.64	0.74	0.61	0.74	0.20	-0.13	0.70	0.72	-0.39	-0.10	-0.40	-0.24
L	0.86	0.64	1.00	0.90	0.96	0.27	0.37	0.38	0.39	-0.18	-0.03	0.39	0.34	-0.20	-0.55	-0.34	-0.27
L+1	0.90	0.73	0.90	1.00	0.80	0.42	0.53	0.49	0.55	-0.06	-0.00	0.51	0.50	-0.29	-0.53	-0.37	-0.24
η	0.85	0.39	0.96	0.80	1.00	0.09	0.17	0.22	0.19	-0.29	0.02	0.21	0.13	-0.09	-0.62	-0.26	-0.23
LogP	0.20	0.64	0.27	0.42	0.09	1.00	0.69	0.93	0.66	0.06	0.10	0.68	0.68	-0.50	-0.03	-0.53	-0.02
Pol	0.37	0.74	0.37	0.53	0.17	0.69	1.00	0.52	1.00	0.65	0.14	0.95	1.00	-0.29	-0.12	-0.29	-0.08
E.H.	0.28	0.61	0.38	0.49	0.22	0.93	0.52	1.00	0.50	-0.18	0.08	0.52	0.50	-0.53	-0.14	-0.63	-0.10
V	0.39	0.74	0.39	0.55	0.19	0.66	1.00	0.50	1.00	0.67	0.14	0.95	0.99	-0.25	-0.13	-0.27	-0.10
M	-0.07	0.20	-0.18	-0.06	-0.29	0.06	0.65	-0.18	0.67	1.00	0.09	0.55	0.65	0.08	0.22	0.12	0.06
μ	-0.03	-0.13	-0.03	-0.00	0.02	0.10	0.14	0.08	0.14	0.09	1.00	0.20	0.14	0.29	-0.25	0.23	0.27
A	0.34	0.70	0.39	0.51	0.21	0.68	0.95	0.52	0.95	0.55	0.20	1.00	0.95	-0.21	-0.20	-0.23	-0.07
Ref	0.34	0.72	0.34	0.50	0.13	0.68	1.00	0.50	0.99	0.65	0.14	0.95	1.00	-0.28	-0.11	-0.26	-0.08
T1	-0.11	-0.39	-0.20	-0.29	-0.09	-0.50	-0.29	-0.53	-0.25	0.08	0.29	-0.21	-0.28	1.00	0.13	0.88	0.07
T2	-0.62	-0.10	-0.55	-0.53	-0.62	-0.03	-0.12	-0.14	-0.13	0.22	-0.25	-0.20	-0.11	0.13	1.00	0.24	0.04
T3	-0.23	-0.40	-0.34	-0.37	-0.26	-0.53	-0.29	-0.63	-0.27	0.12	0.23	-0.23	-0.26	0.88	0.24	1.00	0.12
T4	-0.13	-0.24	-0.27	-0.24	-0.23	-0.02	-0.08	-0.10	-0.10	0.06	0.27	-0.07	-0.08	0.07	0.04	0.12	1.00

Energia do orbital molecular ocupado de mais alta energia (H); Energia do próximo orbital molecular ocupado de mais alta energia (H-1); Energia do orbital molecular desocupado de mais baixa energia (L); Energia do próximo orbital molecular desocupado de mais baixa energia (L+1); dureza absoluta (η), índice de reatividade molecular, $\eta = \frac{1}{2} (E(\text{LUMO}) - E(\text{HOMO}))$; Logaritmo do coeficiente de partição octanol/água (Log P); Polarizabilidade (Pol.); Energia de Hidratação (E. H.); Volume Molecular (V); Massa Molecular (M); Momento de dipolo (μ); Área da superfície (A); Refratividade Molar (Ref); Ângulo diedro (C1-C10b-C10a-C10) (T1); Ângulo diedro (H-O-C1-C2) (T2); Ângulo diedro (O-C1-C2-C3) (T3); Ângulo diedro (C1-C2-C3-C1) (T4).

6.2.1 Análise de PCA

A análise de PCA está fundamentada na correlação entre os descritores, agrupando aqueles que são mais correlacionados em uma nova variável chamada componente principal (PC), de forma que as outras PCs, ortogonais a primeira PC, possam representar os outros descritores também correlacionados entre si e que o conjunto final tenha o menor número quanto possível de variáveis e que seja representativo da propriedade biológica que se quer estudar.

A informação contida numa componente principal não está presente na outra e a variância que elas descrevem é uma medida da quantidade de informação que as mesmas contêm, conforme comenta Ferreira et al. (1999).

As relações entre os compostos não são alteradas nessa transformação para PCs, porém, como os novos eixos são ordenados pela sua importância, pode-se visualizar a estrutura do conjunto de dados em gráficos de baixa dimensionalidade, como por exemplo, no gráfico de PC1 x PC2 mostrado na figura 28.

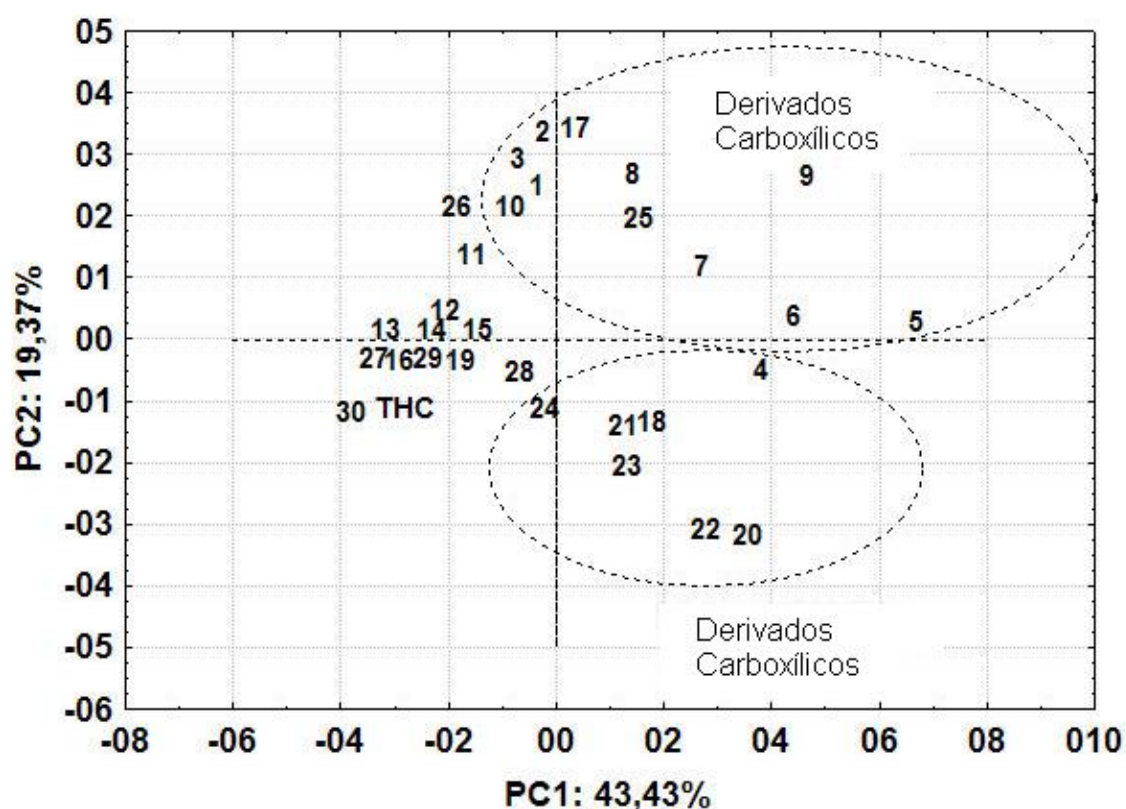


Figura 28 - Gráfico dos escores (PC1xPC2) para a separação entre os compostos canabinóides carboxilados dos demais, utilizando o conjunto total de 17 descritores.

Inicialmente, considerou para análise PCA o conjunto total de 17 descritores. As numerações 1-30 mostradas na figura 28 referem-se aos METs 1-30. Os metabólicos canabinóides que possuem o grupo funcional carboxila (COOH) na cadeia foram classificados neste trabalho como derivados carboxílicos dos canabinóides, as evidências experimentais de suas respectivas atividades não são conhecida para todos eles, por isto, não estão indicadas no texto.

O gráfico dos escores representa a posição das amostras no novo sistema de coordenadas PCs representado pela figura 28. Percebe-se pelo gráfico que este conjunto contendo derivados carboxílicos apresentou maiores valores para a primeira componente principal PC1 e estão representados dentro dos círculos tracejados, figura 28.

Os resultados de PCA mostram que 06 (seis) PCs descrevem 92,95% da informação total da variância do conjunto de dados (ver tabela 11). As duas primeiras PCs PC1xPC2 descrevem juntas 62,80 % da variância do conjunto de dados. A PC1 é a principal responsável pela separação entre os canabinóides carboxilados e descreve 43,43 % da informação total.

Tabela 11 - Variância do conjunto de dados considerando 6 PCs

PCs	% individual	% acumulada
PCA	43,43	43,43
PC2	19,36	62,79
PC3	12,60	75,39
PC4	8,32	83,71
PC5	5,35	89,07
PC6	3,88	92,95

O gráfico dos “loadings”, figura 29, representa as correlações entre as variáveis e as PCs com os sinais de magnitude refletindo as direções e a importância relativa de cada variável original na construção das PCs.

Os resultados obtidos pelo gráfico dos “loadings” mostram que as variáveis distribuíram-se em 03 classes distintas, contudo, ainda não decidiu-se reduzir o número de descritores. Achou-se mais conveniente realizar a próxima técnica quimiométrica para verificar como o sistema se comporta.

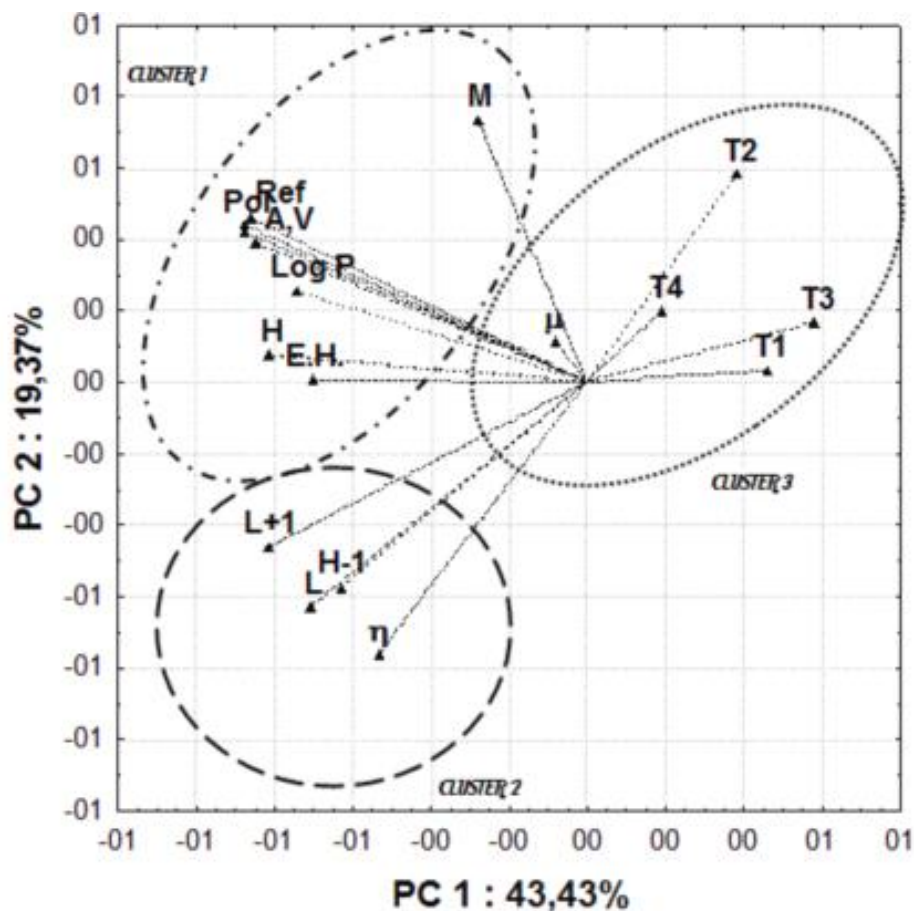


Figura 29 - Gráfico dos “loadings” PC1 x PC2 para o conjunto de 30 metabólicos e o THC utilizando as 17 variáveis separadas em 03 clusters distintos. O índice Ref mostrado no gráfico refere-se ao descritor refratividade molar que até agora foi atribuída a sigla (MR) e o índice Pol refere-se a polarizabilidade atribuída até este momento a letra (α).

Para agrupar de forma mais eficiente os descritores que formarão o novo conjunto de variáveis, uma análise de agrupamento utilizando o método K-means foi realizada em seguida.

6.2.2 Análise K-means

A técnica K-Means consistiu basicamente no cálculo de coordenadas dos centróides de cada agrupamento e das distâncias ao centróide mais afastado.

O resultado deste teste é a formação de um agrupamento dos compostos distribuídos em 3 grupos, compactos e bem-separados quanto possível. Utilizou-se da distância euclidiana para calcular as distâncias ao centróide dos grupos.

As variáveis ficaram distribuídas em apenas três grupos. O grupo 1 (chamado no gráfico de cluster 1) reúne os parâmetros eletrônicos mais relacionados ao tamanho e polarizabilidade (Pol, Ref, E.H. V, M, A, M e H). O grupo 2 (Cluster 2) reúne os parâmetros relacionados aos orbitais de fronteira (H-1, L, L+1 e η). O grupo 3 (cluster 3) incluem os descritores relacionados a parâmetros estéreos e geométricos (T1,T2,T3,T4, e μ) e todos estão mostrados na figura 30.

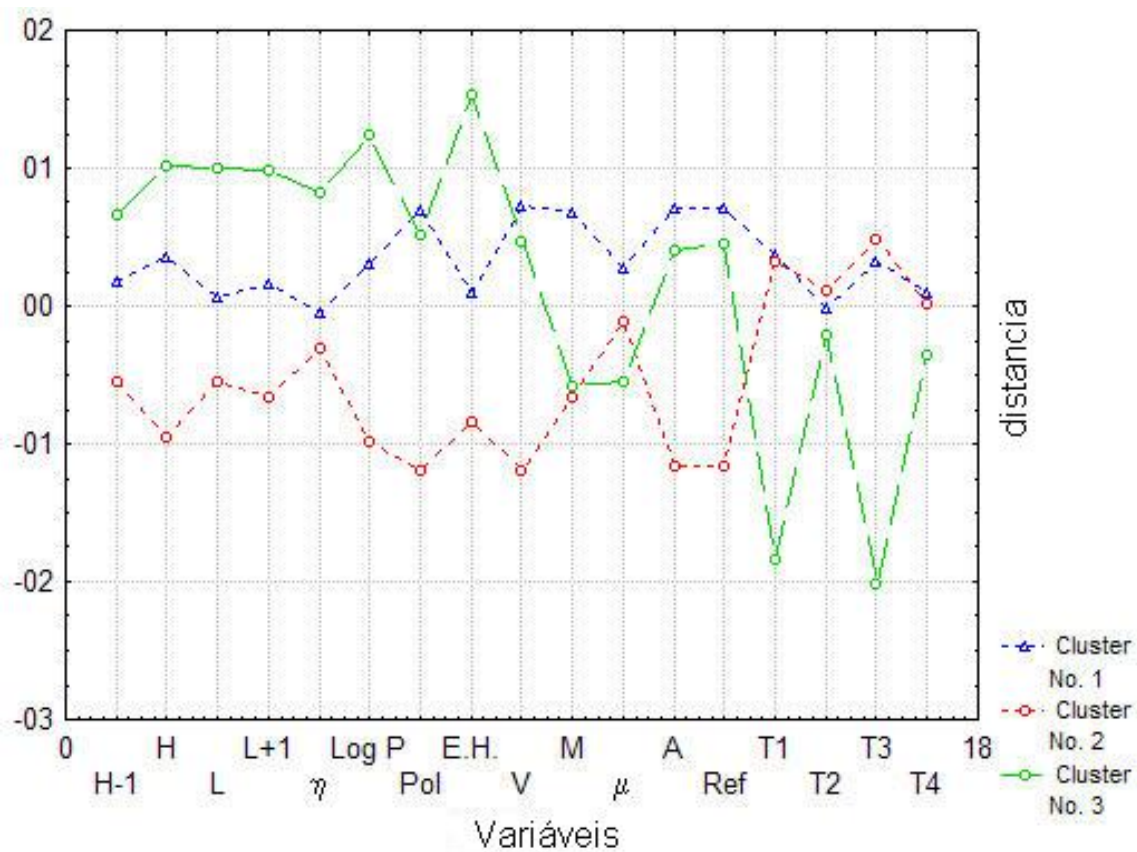


Figura 30 - Distribuição dos 03 grupos para todas as 17 variáveis. Os grupos 1,2 e 3 estão representados como cluster 1, cluster 2 e cluster 3, respectivamente.

A tabela 12 mostra as distâncias euclidianas ao centróide de cada descritor em cada grupo.

Tabela 12 – Membros de cada grupo e distâncias euclidianas aos respectivos centróides

Grupo1 8 descritores		Grupo 2 4 descritores		Grupo 3 5 descritores	
variáveis	distâncias	variáveis	distâncias	variáveis	distâncias
H	0,588	H-1	0,315	μ	0,870
Log P	0,594	L	0,222	T1	0,632
Pol	0,243	L+1	0,327	T2	0,932
E.H.	0,757	η	0,320	T3	0,600
V	0,262			T4	0,860
M	0,878				
A	0,341				
Ref	0,265				

Pela tabela 12, selecionou-se as variáveis que apresentavam as maiores distâncias ao centróide dentro de cada grupo, pois assim, pode-se obter objetos mais longes uns dos outros dentro de cada grupo, e assim, representar uma maior vizinhança. Obedecendo a proposição de Ferreira (2002) que considera ser necessário apenas uma variável para cada parâmetro num estudo de QSAR e considerando que, segundo Geladi e Kowalski (1986), numa amostragem de 30 compostos, são necessários 6 descritores para o estudo quimiométrico, decidiu-se selecionar 2 descritores de cada grupo, somando um total de 6 descritores.

O grupo 1, formado por 8 descritores (tabela 12) mostra os parâmetros eletrônicos, hidrofóbicos e de tamanho e forma da molécula. Escolhendo um descritor para cada propriedade que se quer descrever e que estes apresentassem as maiores distâncias ao centróide, escolheu-se 3 descritores neste grupo. Os selecionados foram: Log P, E.H e massa (tabela 12).

O grupo 3 inclui os descritores relacionados a parâmetros estéreo e geométricos, num total de 5 descritores, Para as duas propriedades foram os dois com as maiores distâncias ao centróide são: T2 e μ .

Por último, selecionou-se os descritores do grupo 2, que mostra os parâmetros relacionados aos orbitais de fronteira ($H-1$, L , $L+1$ e η). Contudo, este agrupamento apresentou algumas particularidades que devem ser consideradas: as distâncias dentro deste grupo não variam muito e, segundo Neto et al. (2007), variáveis que assumem praticamente o mesmo valor para todos os objetos são pouco discriminatórias e sua inclusão pouco contribui para a determinação da estrutura do agrupamento. Para Bussab (1999), deve-se, então, procurar diminuir o conjunto ao máximo, de forma que a seleção de variáveis contemple tanto a sua relevância como seu poder de discriminação face ao problema em estudo.

Sendo assim, a inclusão de variáveis com grande poder de discriminação, porém irrelevantes ao problema, pode mascarar os grupos e levar a resultados equivocados. Levando em consideração os relatos dos autores citados, e observando a energia do HOMO (observar os valores mostrados anteriormente na tabela 6), os valores não mostraram muitas variações que pudesse permitir uma separação dos compostos. O mesmo efeito acontecendo com a dureza. Por outro lado, a energia do LUMO é um descritor bastante utilizado nos estudos de QSAR envolvendo canabinóides, segundo Honório (2004, 2002). É importante relatar que até o momento foram selecionados 5 descritores (Log P, E.H, massa, diedro T2 e dipolo). Como o nosso conjunto final deverá conter apenas 6 variáveis, com base nos estudos de Ferreira (2002), resta apenas uma variável a ser selecionada no grupo 2. Assim sendo, no grupo 2 a energia do LUMO (tabela 12) foi selecionada para compor o conjunto que pudesse ter melhor poder discriminatório.

Resumindo, depois de calculados os 03 grupos e selecionados os descritores mais relevantes de cada um deles, obedecendo as sugestões de Geladi e Kowalski (1986), Ferreira (2002) e Neto et al., (2007) (para uma análise QSAR composta de 30 compostos são necessárias, no máximo, 6 variáveis para o estudo de correlação estrutura atividade), um novo conjunto de variáveis para correlacionar os 30 canabinóides deveria contar com apenas 6 variáveis. A partir deste fato, novas análises quimiométricas foram realizadas com este novo conjunto e estão descritas a seguir.

6.2.3 Análise de PCA para o novo conjunto de 6 descritores

Em seguida, foram realizadas outras análises de PCA e construídos os gráficos dos escores e dos “loadings” para este novo conjunto de seis descritores, mostrados nas figuras 31 e 32.

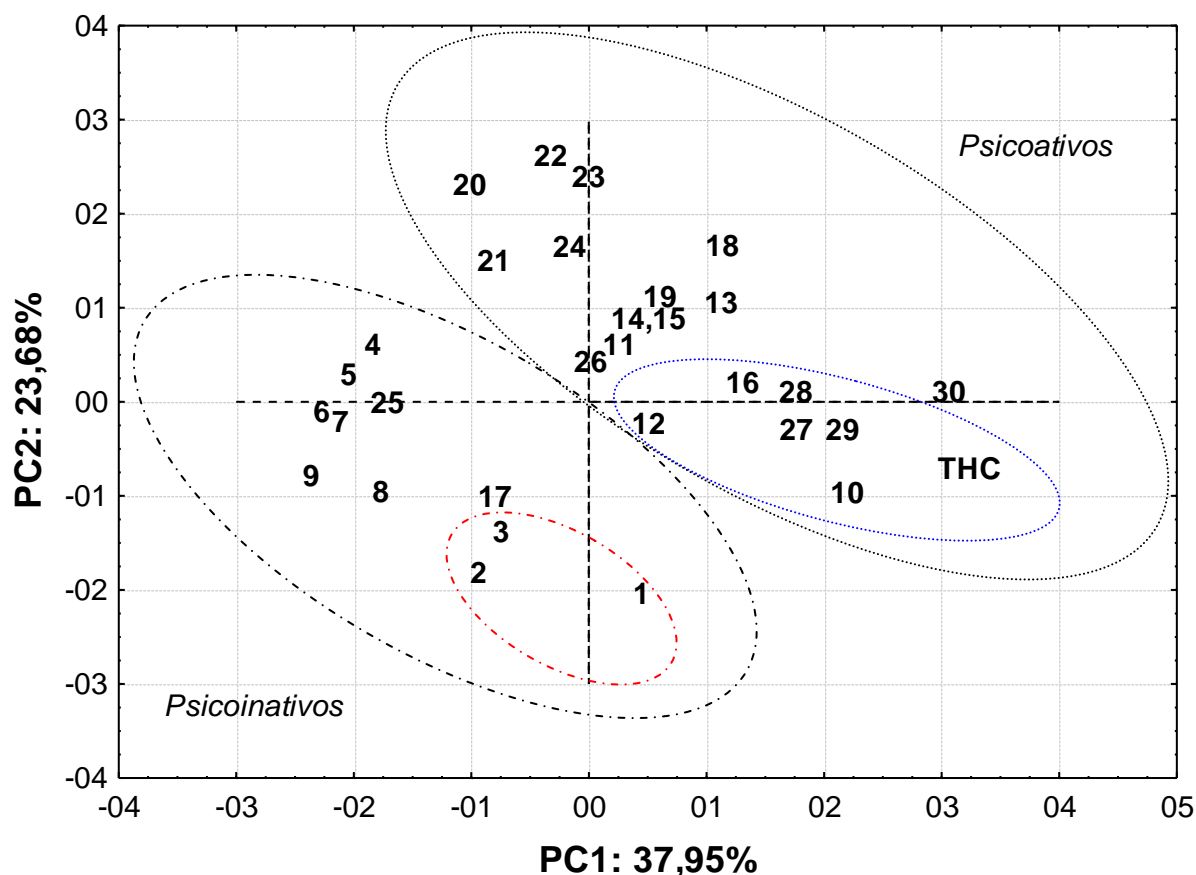


Figura 31 – Gráfico dos escores PC1xPC2 para o novo conjunto de 6 descritores (Log P, E.H. e M, E_{LUMO}, T2 e μ).

O novo conjunto de seis descritores consegue separar os metabólicos psicoativos 11-COOH-THC (METs 1-9 e METs 17,25) num bloco distinto distribuídos ao redor das PC1 x PC2 (negativas). Do conjunto de psicoativos, apenas os METs 1-3 têm psicoatividade comprovada na literatura e estão separados no conjunto menor (PERTWEE, 2005). O conjunto de psicoativos cae em PC1 e PC2 positivas.

Por outro lado, os metabólicos com propriedades psicoativas comprovadas na literatura (PERTWEE, 2005), os compostos THC, METs 27-29 (alta psicoatividade) e os METs 10-12,16 (baixa psicoatividade) caem todos em PC1 positiva (tracejado na cor azul) no gráfico da figura 31. Todos os outros metabólitos do conjunto de psicoativos não têm suas propriedades relatadas na literatura.

A variância do conjunto de dados, considerando 6 descritores, fornece 37,95% da informação na PC1 e 23,68 % na PC2, (figura 31).

A figura 32 ilustra o gráfico dos “loadings” para os seis descritores e percebe-se que do conjunto, as variáveis E_{LUMO} e dipolo assumem o mesmo comportamento em PC1 x PC2 (positivas). O mesmo acontecendo para as variáveis T2, M que caem em PC1 x PC2 (negativas) e com as duas variáveis E.H e Log P que caem em PC1 (positiva) x PC2 (negativa).

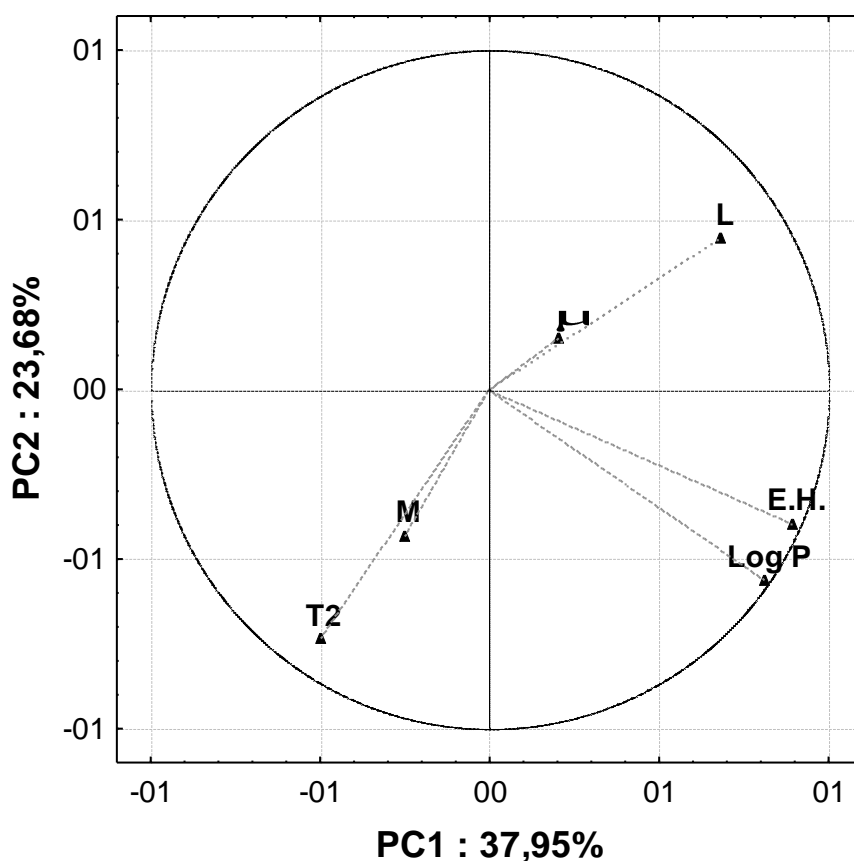


Figura 32 – Gráfico dos loadings PC1 x PC2 para o novo conjunto de seis descritores (Log P, E.H., M, L, T2 e μ) (L= E_{LUMO}).

Segundo Ferreira (2002), o conjunto mínimo de variáveis deve conter os parâmetros físico-químicos e estruturais capazes de descrever certa propriedade e estas variáveis devem ser o mais descritivas quanto possível para que a correlação intraclasses seja preservada.

Hansch e Leo (1995) e Kubinyi (1995) também esclarecem que nos modelos clássicos de QSAR deve-se procurar o menor número de variáveis para representar os dados. Sendo assim, ao observar o gráfico da figura 32 percebe-se um comportamento similar dos pares de descritores $\{(E_{LUMO}$ e dipolo), (E.H e Log P) e (T2 e M) $\}$ selecionados dentre os 17 descritores iniciais, pois cada par de descritor cae na mesma região do gráfico PC1 x PC2 da figura 32.

Com base nos argumentos e nas proposições de Ferreira (2002), Hansch e Leo (1995) e Kubinyi (1995) (que os dados devem estar representados pelo menor número de variáveis para a correlação intraclasses), pode-se propor, inicialmente, que apenas 3 descritores são representativos para a análise do comportamento dos canabinóides ao redor das PCs.

Para a escolha deste novo conjunto reduzido de variáveis, composto de apenas 3, escolheu-se os maiores valores em cada PC. Sendo assim, as 3 variáveis com maior poder de discriminação no gráfico PC1 x PC2 (figura 32), apresentando maiores valores para PC1 e PC2 e que sejam também as mais representativas para correlacionar psicoatividade e psicoinatividade dos canabinóides são: ângulo diedro (T2(O-H-C1-C2)), a energia do orbital mais baixo desocupado (E_{LUMO}) e o coeficiente de partição (Log P).

Estes descritores podem ser considerados os mais descritivos dentre as 17 variáveis iniciais selecionadas neste estudo e são os mais relevantes para construção de um modelo de QSAR para os 30 metabólicos canabinóides estudados.

O gráfico indicado na figura 33 mostra que as três variáveis selecionadas se distribuem satisfatoriamente ao redor das PC1 e PC2 ortogonais entre si. T2 está em PC1 positiva e os descritores Log P e L em PC1 negativa, sendo que o L tem valores positivos em PC2.

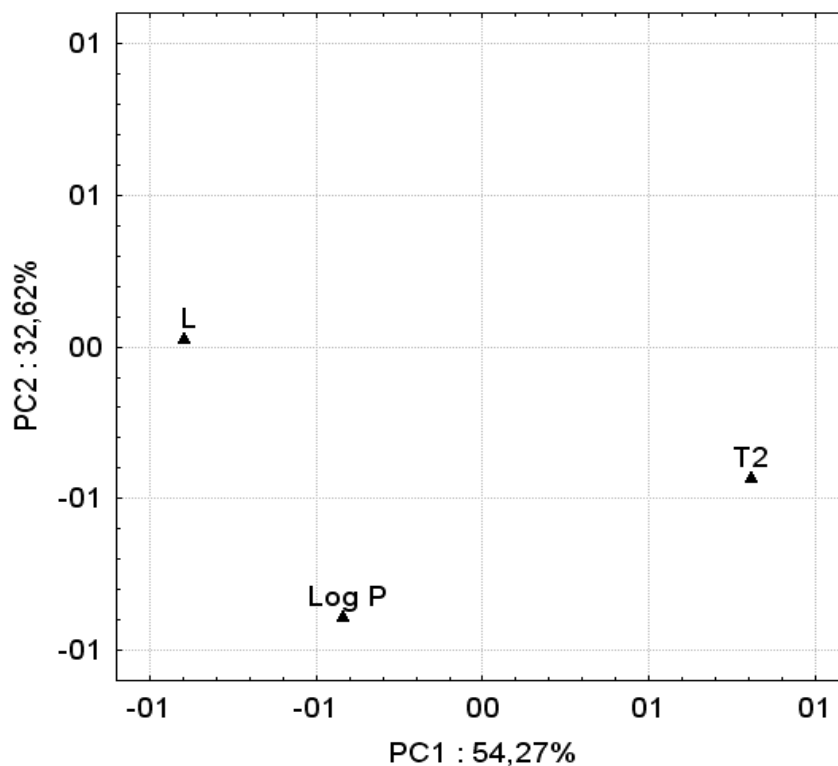


Figura 33 - Gráfico dos “loadings” PC1xPC2 para os descritores (L, T2 e Log P)
(L = E_{LUMO})

Uma boa separação dos metabólicos psicoativos e psicoinativos foi alcançada com estes três descritores e seus resultados são mostrados no gráfico dos “scores” para os 30 metabólicos e o THC, (figura 34).

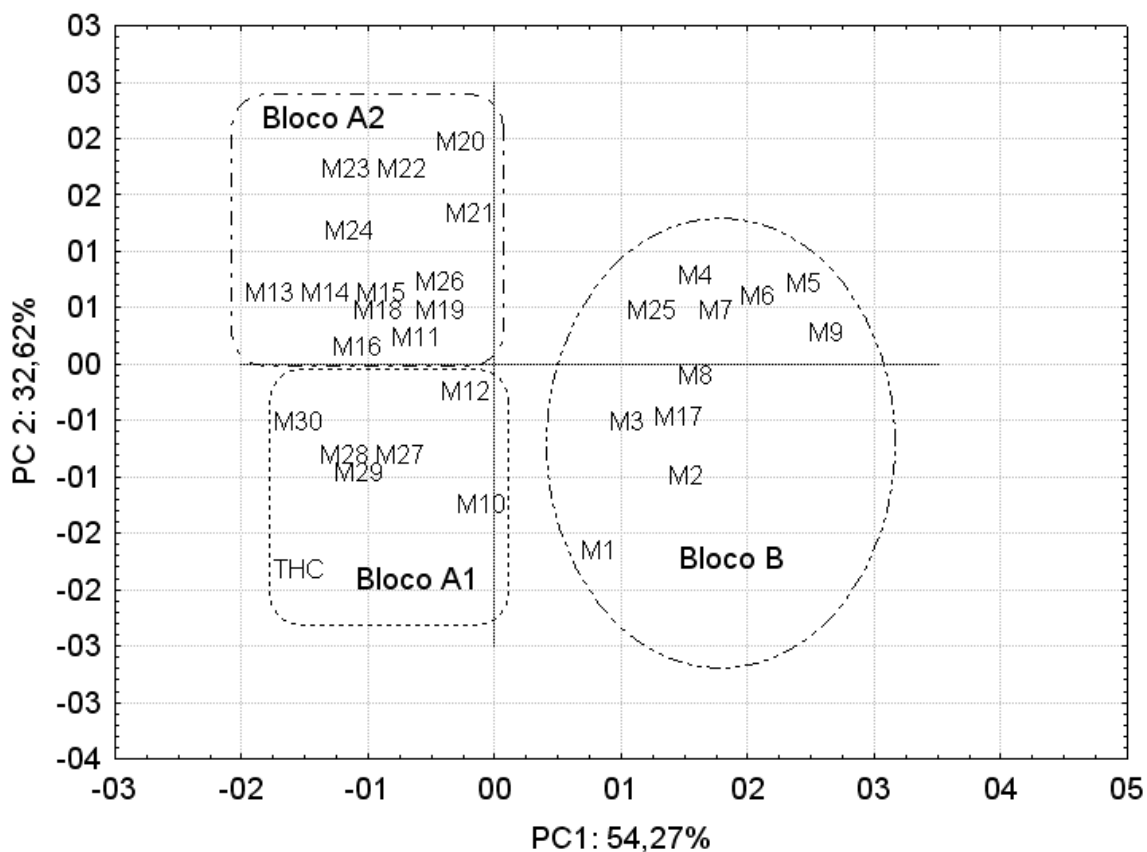


Figura 34 – Gráfico do scores PC1xPC2 para as três variáveis selecionadas. Separação em 3 blocos: A1 (psicoativos), A2 (moderadamente psicoativos) e o bloco B (psicoativos). A letra M refere-se a cada metabólito.

Observa-se pela comparação das figuras 33 e 34 que três descritores são eficientes para compor o conjunto de variáveis, porque além dos compostos se distribuírem melhor ao redor das PC1 e PC2, há uma separação entre psicoativos e psicoativos. Os metabólicos que apresentam propriedades psicoativas (METs 10,12, METs 27-29 e THC) ficaram num bloco isolado para PC1 e PC2 negativas, (atribuiu-se a este bloco a designação de bloco A1 para compostos psicoativos). As irregularidades neste bloco acontecem com os METs 10 e 12, que são considerados +/- psicoativos na literatura (PERTEWEE, 2005). A princípio, decidiu-se que os METs 10 e 12 permaneçam classificados no bloco A1, muito embora, estudos na geometria destes metabólitos serão realizados para maiores esclarecimentos e convalidação desta classificação.

Outro ponto a considerar, é que os MET1-3 (que são comprovadamente psicoativos) são derivados carboxílicos do THC, e que os METs 4-9, MET 17 e MET 25 também são derivados carboxílicos do THC. Sendo assim, é conveniente atribuir todos os metabólicos METs 1-9, MET17 e MET25 pertencentes ao bloco B dos psicoativos. Esta classificação também concorda com o conjunto de psicoativos mostrado na figura 31 para os METs 1-3, confirmando mais uma vez que a redução do número de variáveis foi satisfatória e mantém a separação.

Para esclarecer sobre a designação do bloco A2, devem-se considerar alguns outros pontos: O primeiro deles diz respeito aos MET 11 e MET16, que são canabinóides de baixa psicoatividade (são produtos secundários de hidroxilação aos derivados do THC) comprovados na literatura (DRUMMER & ODELL, 2001; POTTER, 2004). Os METs 11 e 16 caem em PC2 positiva e estes metabólitos apresentaram valores positivos de energia do LUMO. Segundo Honório (2004) e Arroio (2004), maiores valores do E_{LUMO} diferencia a potencialidade de psicoatividade nos canabinóides. Sendo assim, se o E_{LUMO} apresentou-se em PC2 positiva, segundo mostra a figura 33, ao que parece PC2 pode diferenciar a potencialidade da psicoatividade dos compostos metabólitos canabinóides estudados.

O segundo ponto a ser considerado é que o bloco A2 está situado em PC2 positiva, e o único descritor que descreve esta região é a energia do LUMO. Observando a tabela 6 no início deste capítulo, percebe-se que a maioria dos metabólicos do bloco designado A2 tem valores de energia do LUMO positivas e alguns deles acima de 0,3 eV, que é típico de canabinóides psicoativos, conforme esclarecem Honório e Da Silva (2002).

Sendo assim, reintera-se que é conveniente designar que existe um bloco de metabólicos canabinóides descritos pela energia do LUMO que podem ter psicoatividade moderadas.

Resumindo: três regiões são distintas e incluem os grupos (A1) psicoativos, (A2) moderadamente psicoativos e (B) psicoativos, (figura 34). Esta designação para os metabólicos em questão foi publicada recentemente por Silva et al. (2008).

Ainda a respeito da figura 34, observa-se que os metabólicos psicoativos caem em PC1 negativa descritas por Log P e E_{LUMO} , pode-se então sugerir que os descritores relacionados à psicoatividade são a energia do LUMO e o Log P e esta

proposição foi também concluída por Honório (2004). Por outro lado, os psicoativos caem em PC1 positiva descrita por T2.

Logo, PC1 separa os metabólicos psicoativos (A1) dos psicoativos (B). Com base neste argumento, é fácil concluir que o ângulo diedro T2 é relevante para descrever psicoatividade. Deve-se ter em mente que a descrição da psicoatividade é importante quando se quer realizar um planejamento racional para obter canabinóides psicoativos. O diedro T2 pode estar relacionado ao encaixe no receptor canabinóide, pois este descritor está relacionado a efeitos estéreos e geométricos da molécula, pois segundo Honório (2004), substituintes numa posição estratégica da molécula (no caso na posição C-4, ver figura 25 para esclarecimentos) estão relacionados a parâmetros estéreos.

As propriedades eletrônicas, estéreos e de lipofilicidade são importantes para o estudo dos canabinóides (HONÓRIO, 2003, 2004). As propriedades eletrônicas neste trabalho estão representadas pelas energias dos orbitais mais baixo ocupados - LUMO. As propriedades de lipofilicidade estão representadas pelo coeficiente de partição - Log P e as propriedades geométricas representadas pelo ângulo diedral T2. Os resultados da tabela 13 para a PCA mostram que três PCs descrevem 100% da informação total (variância) do conjunto de dados e a primeira PC (PC1) é responsável por 54,25 % da informação total do sistema.

Tabela 13 – Variância do conjunto de dados considerando 3 PCs

Variável	% Total	% Acumulado
PC1	54,27	54,27
PC2	32,62	86,83
PC3	13,11	100,00

Para os compostos estudados neste trabalho estas propriedades estão representadas nos três descritores que compõem o novo conjunto. A propriedade eletrônica está representada pela energia do orbital mais baixo desocupado - LUMO. A propriedade de lipofilicidade está representada pelo coeficiente de partição - Log P e a propriedade geométrica representada pelo ângulo diedral T2. Na tabela 14 são representados os valores numéricos dos “loadings” das 3 variáveis selecionadas para a construção das equações das PCs.

Tabela 14 - Valores de loadings das 3 variáveis (L, T2 e Log P) para PC1 e PC2 responsáveis pela separação dos compostos canabinóides estudados.

Variável	PC1	PC2
L	-0,893411	+0,028176
Log P	-0,424063	-0,887037
T2	+0,805996	-0,435470

A partir das figuras 33 e 34 e dos valores da tabela 14 as duas componentes responsáveis pela separação podem ser expressas pelas equações 40-41.

$$PC1 = - 0,893411 L - 0,424063 \text{ Log P} + 0,805996 T2 \quad (40)$$

$$PC2 = + 0,028176 L - 0,887037 \text{ Log P} - 0,435470 T2 \quad (41)$$

Segundo Honório (2004), valores de energia do LUMO e Log P para uma série de canabinóides apresentaram também valores negativos na PC1 para as moléculas psicoativas e as psicoativas apresentaram PC1 positivas.

Este mesmo comportamento foi observado neste trabalho, sugerindo que o conjunto de três descritores foi bem selecionado e as equações 40 e 41, representam este comportamento.

Pode-se ainda dizer que as três variáveis multiplicadas por seus respectivos coeficientes da equação 40 determinam a presença ou ausência de psicoatividade em metabólicos canabinóides. Portanto, para que PC1 seja negativa (que é o caso dos metabólicos psicoativos) são necessários altos valores de E_{LUMO} e Log P e baixos valores de T2, segundo a equação 40.

Para os metabólicos psicoativos, o descritor que mais influencia é o diedro T2, contudo este diedro não permite separar psicoativos dos psicoativos, pois se observamos a figura 33 e 34, mostrada anteriormente, fica claro que o descritor T2 foi atribuído em PC1 positiva, justificando apenas psicoatividade.

Igualmente como no caso de Honório (2004), é possível dizer que o conjunto de metabólicos canabinóides estudados neste trabalho pode ser agrupado em três classes distintas: estéreo e geométricas, eletrônicas e lipofílicas.

Nos trabalhos de Honório (2004), substituintes em carbonos C-2 e C-4 levaram a classificar outras duas propriedades como importantes na separação dos compostos psicoativos e psicoinativos, descritas pela autora como propriedades topológicas. Contudo, estas propriedades não foram consideradas no modelo estudado neste trabalho devido a não existência de canabinóides com substituintes em C-2 e C-4.

Analisando a equação 41, percebe-se que para que PC2 seja positivo e justifique o bloco A2 (figura 33), é necessário que os valores do E_{LUMO} sejam altos e, característico de psicoatividade, o que aumentam as possibilidades de que pode ser que PC2 permita separar os psicoativos A1 dos moderadamente psicoativos A2, com exceção dos METs 10 e 12, que não foram bem classificados.

Por outro lado, altos valores de Log P aumentam a psicoatividade e conduzem a PC2 mais negativas de acordo com a equação 41. O THC tem o maior valor de Log P dos compostos estudados o que justifica o bloco do THC ser designado como psicoativo. Para confirmação dos resultados obtidos na PCA decidiu-se realizar uma análise por HCA, uma técnica hierárquica de agrupamentos e está descrita na seção a seguir.

6.2.4 Análise de HCA

A análise hierárquica de agrupamentos (HCA) foi realizando usando a técnica incremental (BRUNS; FAIGLE, 1985), utilizada para cálculo de distâncias euclidianas. O gráfico na forma de dendrograma obtido utilizando os descritores selecionados (L, Log P e T2), está representado na figura 35.

As linhas verticais correspondem aos valores de similaridade entre os metabólicos canabinóides em função da distância euclidiana.

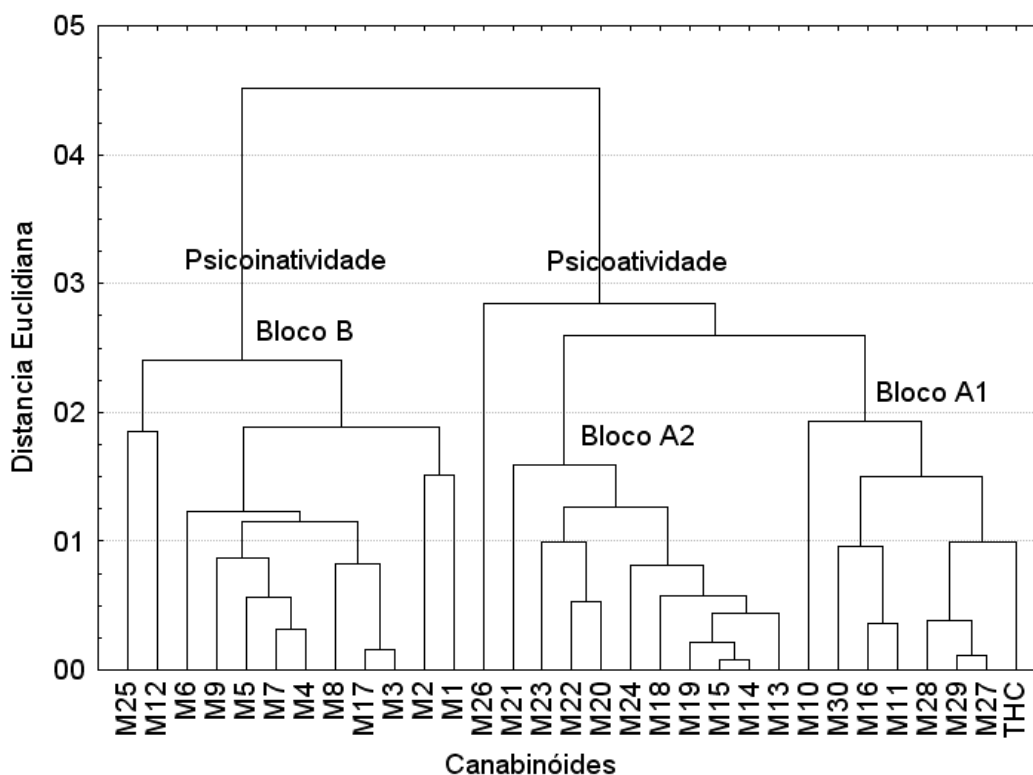


Figura 35 - Dendrogramas mostrando a separação entre candidatos a canabinóides psicoativos (B), psicoativos (A1) e moderadamente psicoativos (A2), utilizando a técnica de médias ponderadas de grupos pareados pela distância euclidiana (Weighted pair-group average euclidean distances).

A partir da figura 35, mesmo considerando algumas irregularidades, é possível sugerir que uma separação entre psicoatividade e psicoinatividade foi obtida utilizando o conjunto de três descritores (L, Log P e T2) nesta técnica de HCA, corroborando com os resultados obtidos até o momento com PCA. Utilizou um valor de similaridade igual a 0,0 para garantir que as classes estejam bem distintas entre si.

Os metabólicos canabinóides se distribuíram em duas árvores hierárquicas. A primeira que descreve a propriedade de psicoatividade formada por dois blocos: o bloco A1 de canabinóides psicoativos contendo o THC e bloco A2 de canabinóides moderadamente psicoativos. A segunda árvore descreve a propriedade de psicoinatividade e está presente o bloco B formado pelos metabólicos psicoativos.

Pode-se então considerar que os resultados de HCA foram comprobatórios aos resultados obtidos pela PCA. Outras técnicas quimiometria ainda foram realizadas para confirmação dos resultados de HCA e PCA e estão mostradas a seguir.

6.2.5 Análise de KNN

A técnica de KNN foi utilizada para realizar uma validação dos resultados obtidos das técnicas PCA e HCA. As tabelas 15a e 15b mostram a matriz de dissimilaridades para os 08 vizinhos mais próximos (8NN) calculados pelas distâncias euclidianas (verificar fórmula da equação 34 contida no tópico 4.3.2).

Pela análise das tabelas 15a e 15b verifica-se que os 8 vizinhos mais próximos do THC corresponderam a todos os metabólicos psicoativos confirmados na literatura (PERTWEE, 2005) e são os METs 27-30, METs 10-11 e os METs 14,16. Os MET 27-30 são 2NN, 3NN, 1NN e 4NN respectivamente em relação ao THC. Por esta técnica estes metabólitos são os quatro vizinhos mais próximos do canabinóide mais psicoativo, THC, o que pode também sugerir psicoatividade destes metabólitos, e esta proposição foi confirmada nas outras técnicas anteriores. Por sua vez, os metabólitos MET10, MET11, MET14 e MET16 são respectivamente 6NN, 7NN, 8NN e 5NN distantes em relação ao THC. Os MET11, MET16 e MET14 são metabólicos do bloco A2, moderadamente psicoativo, e estão mais distantes do THC, o que confirma sua psicoatividade mais reduzida.

O MET 1 por ser o metabólito mais psicoativo foi utilizado como referência para observar o grupo dos psicoativos B. Sendo assim, os resultados das tabelas 15a,b podem ser interpretados que em relação ao MET1. Sendo assim, os METs 2-4 são 3NN, 1NN e 8NN, os METs 7-9 são 6NN, 4NN e 7NN e os MET12 e MET17 são 5NN e 2NN distantes respectivamente do MET1. Estes resultados confirmam que os classificados como psicoativos B são os 8 vizinhos mais próximos do MET1, com exceção do MET 12.

Tabela 15a - Matriz de dissimilaridade entre o THC e os METs 1-15 utilizando o calculo pela distância euclidiana.

	THC	MET1	MET2	MET3	MET4	MET5	MET6	MET7	MET8	MET9	MET10	MET11	MET12	MET13	MET14	MET15
THC	0.000	2.756	4.146	2.968	3.875	4.159	4.649	3.644	3.846	4.079	1.784	2.060	2.444	2.700	2.382	2.465
MET1	2.756	0.000	1.517	1.108	2.370	2.395	2.537	2.063	1.672	2.126	3.654	3.416	1.740	4.502	3.993	4.044
MET2	4.146	1.517	0.000	1.531	2.128	1.985	1.567	1.925	1.099	1.830	5.011	4.404	2.334	5.502	4.963	4.996
MET3	2.968	1.108	1.531	0.000	1.283	1.390	1.739	0.975	0.897	1.288	3.620	2.898	1.068	4.000	3.469	3.500
MET4	3.875	2.370	2.128	1.283	0.000	0.469	1.141	0.311	1.031	0.972	4.242	3.093	1.611	4.089	3.580	3.582
MET5	4.159	2.395	1.985	1.390	0.469	0.000	0.919	0.554	0.936	0.610	4.469	3.456	1.969	4.462	3.961	3.964
MET6	4.649	2.537	1.567	1.739	1.141	0.919	0.000	1.191	0.882	1.209	5.206	4.171	2.333	5.193	4.670	4.677
MET7	3.644	2.063	1.925	0.975	0.311	0.554	1.191	0.000	0.836	0.870	4.060	3.005	1.417	4.038	3.520	3.529
MET8	3.846	1.672	1.099	0.897	1.031	0.936	0.882	0.836	0.000	0.956	4.476	3.617	1.685	4.694	4.160	4.180
MET9	4.079	2.126	1.830	1.288	0.972	0.610	1.209	0.870	0.956	0.000	4.315	3.561	2.127	4.598	4.106	4.116
MET10	1.784	1.230	5.011	3.620	4.242	4.469	5.206	4.060	4.476	4.315	0.000	1.888	3.310	2.182	2.104	2.165
MET11	2.060	3.416	4.404	2.898	3.093	3.456	4.171	3.005	3.617	3.561	1.888	0.000	2.206	1.106	0.600	0.644
MET12	2.444	1.740	2.334	1.068	1.611	1.969	2.333	1.417	1.685	2.127	3.310	2.206	0.000	3.260	2.711	2.744
MET13	2.700	4.502	5.502	4.000	4.089	4.462	5.193	4.038	4.694	4.598	2.182	1.106	3.260	0.000	0.550	0.528
MET14	2.382	3.993	4.963	3.469	3.580	3.961	4.670	3.520	4.160	4.106	2.104	0.600	2.711	0.550	0.000	0.085
MET15	2.465	4.044	4.996	3.500	3.582	3.964	4.677	3.529	4.180	4.116	2.165	0.644	2.744	0.528	0.085	0.000
MET16	1.936	3.434	4.430	2.954	3.193	3.575	4.243	3.099	3.680	3.701	1.993	0.314	2.175	1.111	0.587	0.648
MET17	2.985	1.218	1.663	0.211	1.215	1.307	1.761	0.906	0.952	1.168	3.530	2.824	1.140	3.924	3.400	3.429
MET18	2.441	3.994	4.994	3.475	3.588	3.938	4.696	3.523	4.177	4.037	1.865	0.626	2.822	0.606	0.411	0.415
MET19	2.427	3.973	4.919	3.426	3.511	3.895	4.603	3.456	4.104	4.049	2.169	0.583	2.664	0.607	0.095	0.080
MET20	3.831	4.926	5.617	4.145	3.789	4.139	4.913	3.844	4.632	4.371	3.198	1.797	3.520	1.434	1.501	1.419
MET21	3.105	3.853	4.507	3.047	2.760	3.143	3.881	2.786	3.546	3.388	2.868	1.114	2.392	1.538	1.184	1.133
MET22	4.011	5.318	6.081	4.589	4.289	4.630	5.420	4.333	5.114	4.834	3.223	2.062	3.964	1.423	1.672	1.593
MET23	4.062	5.710	6.596	5.082	4.913	5.258	6.048	4.928	5.678	5.427	3.171	2.333	4.420	1.396	1.842	1.779
MET24	3.233	4.870	5.780	4.274	4.207	4.577	5.329	4.194	4.905	4.749	2.609	1.461	3.552	0.550	0.932	0.868
MET25	2.847	2.609	3.272	1.793	1.726	1.973	2.818	1.645	2.340	2.003	2.668	1.665	1.685	2.636	2.185	2.191
MET26	4.047	5.998	7.111	5.585	5.672	5.962	6.800	5.622	6.298	5.988	2.707	2.870	5.055	2.016	2.498	2.479
MET27	0.985	2.306	3.519	2.192	2.947	3.269	3.788	2.740	3.041	3.267	2.014	1.454	1.535	2.382	1.918	1.988
MET28	1.013	2.722	3.915	2.537	3.169	3.510	4.081	2.989	3.372	3.533	1.788	1.130	1.831	1.972	1.534	1.610
MET29	0.952	2.415	3.626	2.291	3.020	3.347	3.876	2.819	3.138	3.352	1.957	1.387	1.617	2.290	1.834	1.906
MET30	1.537	3.721	4.916	3.479	3.933	4.285	4.943	3.797	4.291	4.328	1.481	1.013	2.763	1.184	1.004	1.087

Na tabela 15a a representação dos vizinhos mais próximos (NN) são dadas da seguinte forma: os 8 vizinhos mais próximos apresentam as 8 menores distancias euclidianas. Por exemplo, o oitavo vizinho mais próximo (8NN) do THC corresponde ao valor numérico de 2.382, representado pelo MET 14. O primeiro vizinho mais próximo (1NN) do THC corresponde ao valor 0.925, representado pelo MET 29. Esta regra segue para toda a tabela 15a.

Tabela 15b - Matriz de dissimilaridade entre o THC e os METs 16-30 utilizando o cálculo pela distância euclidiana.

	MET16	MET17	MET18	MET19	MET20	MET21	MET22	MET23	MET24	MET25	MET26	MET27	MET28	MET29	MET30
THC	1.936	2.985	2.441	2.427	3.831	3.105	4.011	4.062	3.233	2.847	4.047	0.985	1.013	0.952	1.537
MET1	3.434	1.218	3.994	3.973	4.926	3.853	5.318	5.710	4.870	2.609	5.998	2.306	2.722	2.415	3.721
MET2	4.430	1.663	4.994	4.919	5.617	4.507	6.081	6.596	5.780	3.272	7.111	3.519	3.915	3.626	4.916
MET3	2.954	0.211	3.475	3.426	4.145	3.047	4.589	5.082	4.274	1.793	5.585	2.192	2.537	2.291	3.479
MET4	3.193	1.215	3.588	3.511	3.789	2.760	4.289	4.913	4.207	1.726	5.672	2.947	3.169	3.020	3.933
MET5	3.575	1.307	3.938	3.895	4.139	3.143	4.630	5.258	4.577	1.973	5.962	3.269	3.510	3.347	4.285
MET6	4.243	1.761	4.696	4.603	4.913	3.881	5.420	6.048	5.329	2.818	6.800	3.788	4.081	3.876	4.943
MET7	3.099	0.906	3.523	3.456	3.844	2.786	4.333	4.928	4.194	1.645	5.622	2.740	2.989	2.819	3.797
MET8	3.680	0.952	4.177	4.104	4.632	3.546	5.114	5.678	4.905	2.340	6.298	3.041	3.372	3.138	4.291
MET9	3.701	1.168	4.037	4.049	4.371	3.388	4.834	5.427	4.749	2.003	5.988	3.267	3.533	3.352	4.328
MET10	1.993	3.530	1.865	2.169	3.198	2.868	3.223	3.171	2.609	2.668	2.707	2.014	1.788	1.957	1.481
MET11	0.314	2.824	0.626	0.583	1.797	1.114	2.062	2.333	1.461	1.665	2.870	1.454	1.130	1.387	1.013
MET12	2.175	1.140	2.822	2.664	3.520	2.392	3.964	4.420	3.552	1.685	5.055	1.535	1.831	1.617	2.763
MET13	1.111	3.924	0.606	0.607	1.434	1.538	1.423	1.396	0.550	2.636	2.016	2.382	1.972	2.290	1.184
MET14	0.587	3.400	0.411	0.095	1.501	1.184	1.672	1.842	0.932	2.185	2.498	1.918	1.534	1.834	1.004
MET15	0.648	3.429	0.415	0.080	1.419	1.133	1.593	1.779	0.868	2.191	2.479	1.988	1.610	1.906	1.087
MET16	0.000	2.901	0.782	0.579	1.938	1.256	2.193	2.422	1.515	1.879	2.985	1.352	0.999	1.274	0.885
MET17	2.901	0.000	3.384	3.356	4.035	2.952	4.476	4.976	4.185	1.632	5.467	2.199	2.524	2.295	3.435
MET18	0.782	3.384	0.000	0.441	1.446	1.221	1.579	1.751	0.929	2.060	2.264	2.006	1.634	1.927	1.080
MET19	0.579	3.356	0.441	0.000	1.447	1.093	1.644	1.851	0.939	2.132	2.554	1.926	1.554	1.845	1.081
MET20	1.938	4.035	1.446	1.447	0.000	1.134	0.528	1.238	1.002	2.525	2.490	3.227	2.916	3.167	2.472
MET21	1.256	2.952	1.221	1.093	1.134	0.000	1.612	2.191	1.492	1.585	3.183	2.324	2.108	2.287	2.068
MET22	2.193	4.476	1.579	1.644	0.528	1.612	0.000	0.746	0.899	2.940	2.067	3.513	3.165	3.443	2.562
MET23	2.422	4.976	1.751	1.851	1.238	2.191	0.746	0.000	0.921	3.469	1.493	3.733	3.339	3.648	2.540
MET24	1.515	4.185	0.929	0.939	1.002	1.492	0.899	0.921	0.000	2.784	1.906	2.844	2.454	2.759	1.730
MET25	1.879	1.632	2.060	2.132	2.525	1.585	2.940	3.469	2.784	0.000	4.012	1.999	2.043	2.030	2.535
MET26	2.985	5.467	2.264	2.554	2.490	3.183	2.067	1.493	1.906	4.012	0.000	4.026	3.625	3.936	2.692
MET27	1.352	2.199	2.006	1.926	3.227	2.324	3.513	3.733	2.844	1.999	4.026	0.000	0.435	0.110	1.468
MET28	0.999	2.524	1.634	1.554	2.916	2.108	3.165	3.339	2.454	2.043	3.625	0.435	0.000	0.330	1.038
MET29	1.274	2.295	1.927	1.845	3.167	2.287	3.443	3.648	2.759	2.030	3.936	0.110	0.330	0.000	1.362
MET30	0.885	3.435	1.080	1.081	2.472	2.068	2.562	2.540	1.730	2.535	2.692	1.468	1.038	1.362	0.000

Na tabela 15b a representação dos vizinhos mais próximos (NN) são dadas da seguinte forma: os 8 vizinhos mais próximos apresentam as 8 menores distâncias euclidianas. Por exemplo, o primeiro vizinho mais próximo (1NN) do MET16 corresponde a distância euclidiana 0.314 representado pelo MET 11. O oitavo vizinho mais próximo (8NN) do MET16 corresponde a distância euclidiana 0.999, representado pelo MET 28. Esta regra segue para toda a tabela 15b.

Os valores de distâncias euclidianas para compor as tabelas 15a, 15b foram processados no programa Excel, no pacote Microsoft Office 2003.

Resumindo, as técnicas quimiométricas PCA, K-MEANS e HCA confirmaram que é viável correlacionar os descritores energia do LUMO, Log P e T2 para separar os metabólicos canabinóides psicoativos e psicoinativos.

Por último, a técnica de inteligência artificial utilizando redes neurais foi utilizada para confirmação dos resultados e será descrita a seguir.

6.2.6 Análises de redes neurais artificiais – RNA

Esta análise enfatiza a técnica de agrupamento de dados (Data Clustering) usando mapas auto-organizáveis (Self-Organizing Maps – SOM) como principal instrumento. SOM é uma rede neural artificial baseada em aprendizado competitivo e não-supervisionado, o que significa que o treinamento é inteiramente guiado pelos dados e que os neurônios do mapa competem entre si.

Uma rede SOM possui a habilidade de formar mapeamentos que quantizam os dados, como por exemplo, em duas topologias (retangular e hexagonal), figura 36.

A análise de agrupamentos a partir de SOM considera o mapa topológico gerado e a topologia dos dados no processo de agrupamento. Uma análise experimental e comparativa é apresentada, evidenciando os resultados previstos como potencialidade da proposta, destacando, por fim, as principais relações entre compostos.

Neste trabalho esta análise foi utilizada com o objetivo de validar o conjunto de variáveis selecionadas (E LUMO, Log P e ângulo diedro T2) para os metabólicos canabinóides estudados. A distância entre os neurônios da vizinhança foi a distância euclidiana. A taxa de aprendizagem foi ajustada para 0.9 na primeira fase a 0,001 na segunda fase de treinamento e 100.000 ciclos (epochs).

A forma de ligação entre os neurônios no mapa SOM define a vizinhança do neurônio e neste trabalho foi utilizada uma rede SOM quadrada e os valores calculados pelos oito vizinhos mais próximos, formando uma matriz quadrada. As distâncias calculadas foram armazenadas numa matriz U e alocados em uma estrutura matricial de formato 12x12.

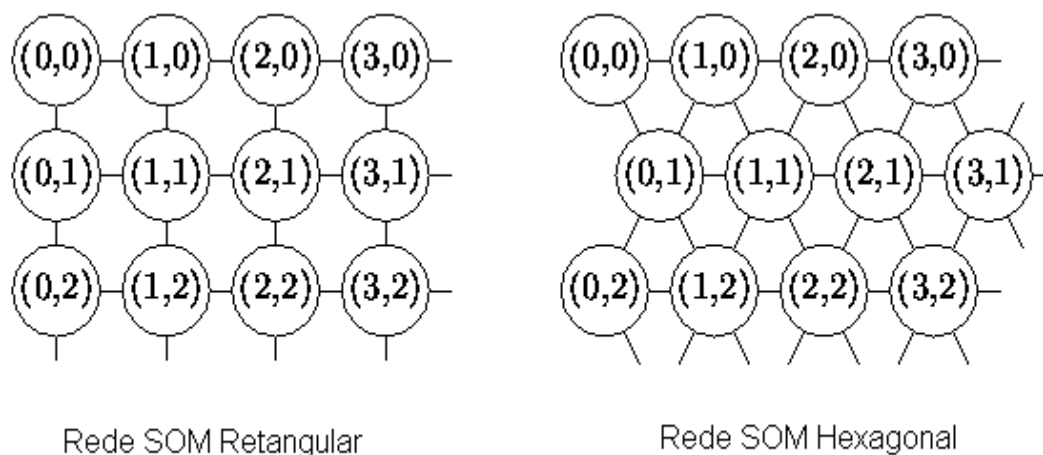


Figura 36 - Diferentes topologias (Retangular e Hexagonal)
Representadas para uma rede do tipo SOM

O mapa auto-ajustável SOM obtido utilizou na primeira camada de treinamento as 17 variáveis e os 30 compostos. Na segunda camada do SOM tomaram-se como entrada os dados organizados por similaridade da primeira camada.

O número de neurônios na segunda camada é igual ao número de grupos desejados e utilizou nesta camada a distribuição análoga ao algoritmo K-means. Na camada de saída utilizou o grupo de três descritores (E LUMO, Log P e T2), como números de classes.

Os resultados foram bem satisfatórios e permitiram aglomerar os elementos em suas respectivas relações topológicas e similaridades e as propriedades descritas pelos 3 descritores selecionados validam a mesma classificação dada com as técnicas PCA, HCA, K-means e KNN, separando os metabólicos canabinóides em grupo de compostos psicoativos A1, compostos psicoativos B e compostos moderadamente psicoativos A2. Estes resultados encontram-se mostrados na figura 37. A principal dificuldade no uso das redes neurais é a pouca familiaridade dos pesquisadores na área com tal técnica já que se trata de um método recente em relação aos demais métodos estatísticos e o critério de seleção entre diferentes redes é pragmático, ou seja, é escolhida aquela que atinge os objetivos esperados.

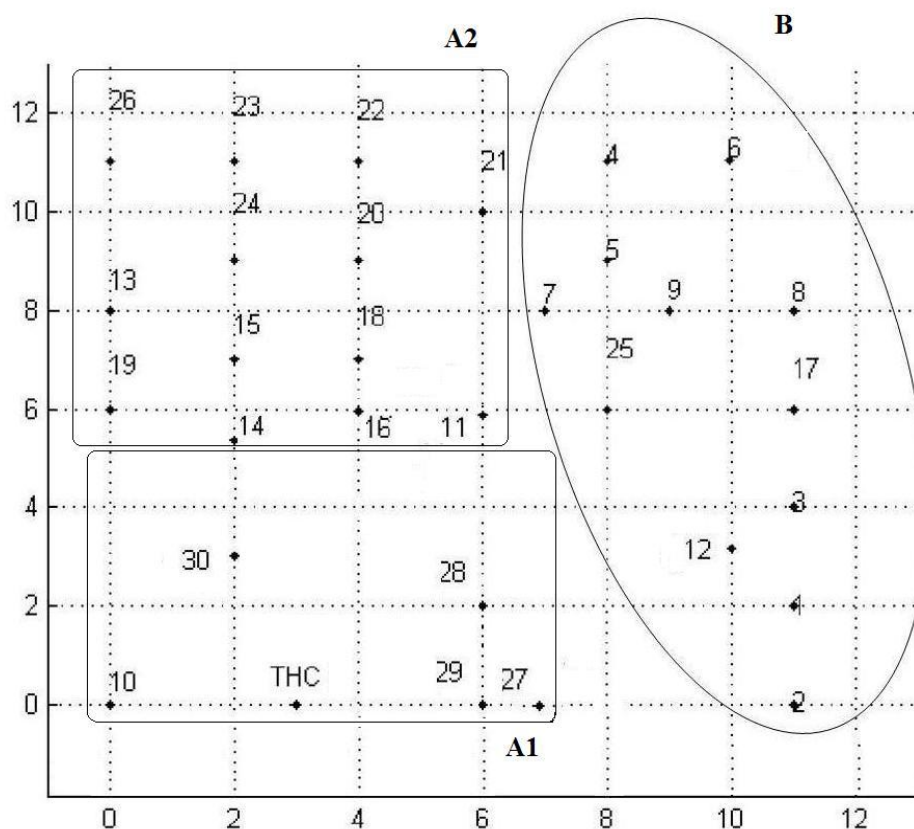


Figura 37– Mapas auto organizáveis (SOM) para a rede neural formada pelos METs1-30 e THC. Os eixos X e Y representam as distâncias euclidianas.

As análises com redes neurais exposto neste trabalho foram realizadas em colaboração com o professor André Sih, e os procedimentos desenvolvidos no Departamento de Energia Elétrica da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Para validação dos resultados obtidos até o momento resolveu-se testar o modelo obtido e atribuindo-se ao conjunto de 30 metabólicos canabinóides estudados, os METs 1-30, a designação de conjunto de treinamento e o conjunto de predição utilizou-se 22 canabinóides psicoativos e psicoativos derivados do Δ^9 e Δ^8 -THC estudados por Honório (2004), onde os compostos foram submetidos a cálculos teóricos e tratamentos por técnicas quimiométricas. As estruturas e respectivos nomes dos compostos do conjunto de predição estão mostrados nas figuras 38a (para compostos ativos - AC) e 38b (para compostos inativos – IC).

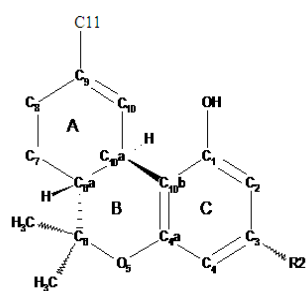
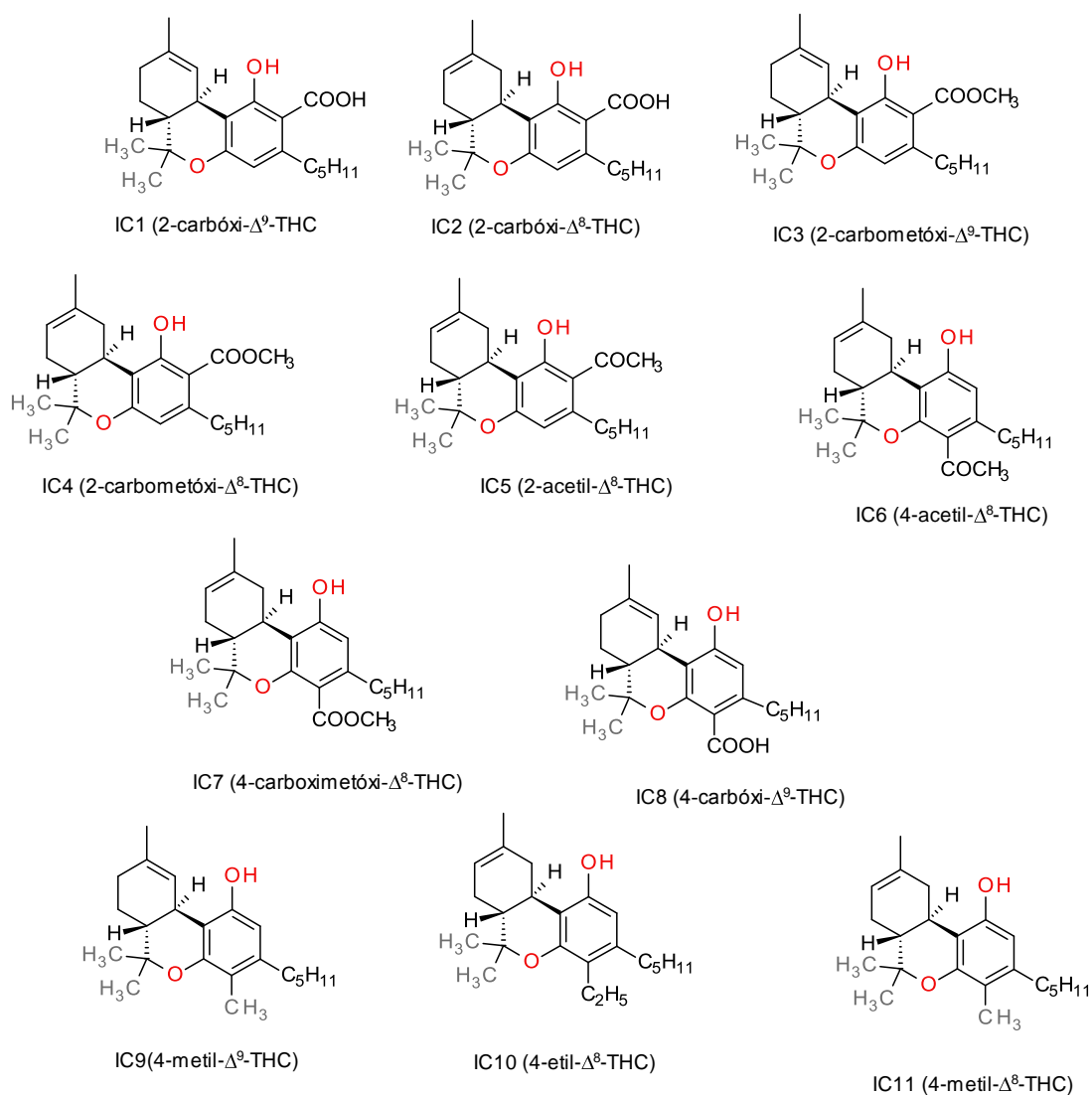
6.3 Validação dos resultados obtidos para os 30 metabólicos canabinóides utilizando um conjunto de treinamento com 22 canabinóides psicoativos e psicoativos.

O conjunto de predição são os 22 compostos canabinóides psicoativos e psicoativos (ver figura 38a e 38b) (HONÓRIO, 2004), todos derivados Δ^8 e Δ^9 -THC.

O conjunto de treinamento são os 30 metabólicos canabinóides (ver figura 17a e 17b para esclarecimentos) e o THC. O conjunto total a ser processado por PCA e HCA é formado por 53 compostos canabinóides e seus metabólicos (figura 39). Os dados da energia do LUMO, Log P e diedro T2 para o conjunto de predição estão mostrados na tabela 16.

Tabela 16 - Valores das variáveis E_{LUMO} (eV), Log P e T2 do conjunto de predição [AC(1-11) e IC1-11)] (HONÓRIO, 2004). As propriedades foram calculadas utilizando método DFT.

Composto	E_{LUMO} (eV)	T2 (H-O-C1-C2) ^o	Log P
AC1	0,319736	2,4547	4,5500
AC2	0,327083	2,4057	5,7400
AC3	0,332254	-0,7006	5,7400
AC4	0,351030	2,4875	5,6800
AC5	0,360009	-0,4149	5,6800
AC6	0,333886	1,8116	6,0100
AC7	0,342594	-0,0975	6,0100
AC8	0,387493	29,4749	5,8100
AC9	0,362459	64,3982	6,2100
AC10	0,368989	66,2104	6,2100
AC11	0,526120	24,1653	5,8100
IC1	-0,929132	-3,7686	5,0400
IC2	-0,953490	-4,1163	5,0400
IC3	-0,819070	-4,2957	5,0800
IC4	-0,841110	-3,2399	4,6500
IC5	-1,339630	22,6188	4,4800
IC6	-0,767910	-159,4090	5,0400
IC7	-0,377040	0,4784	4,6500
IC8	-0,289260	1,1493	5,0400
IC9	0,395929	1,7764	6,2100
IC10	0,360282	0,3714	6,2100
IC11	0,407086	1,0857	6,2100



Sistema de numeração adotado para moléculas ACs e ICs

Figura 38a – Estruturas de alguns canabinóides psicoativos [IC(1-11)] derivados do THC e sistema de numeração.

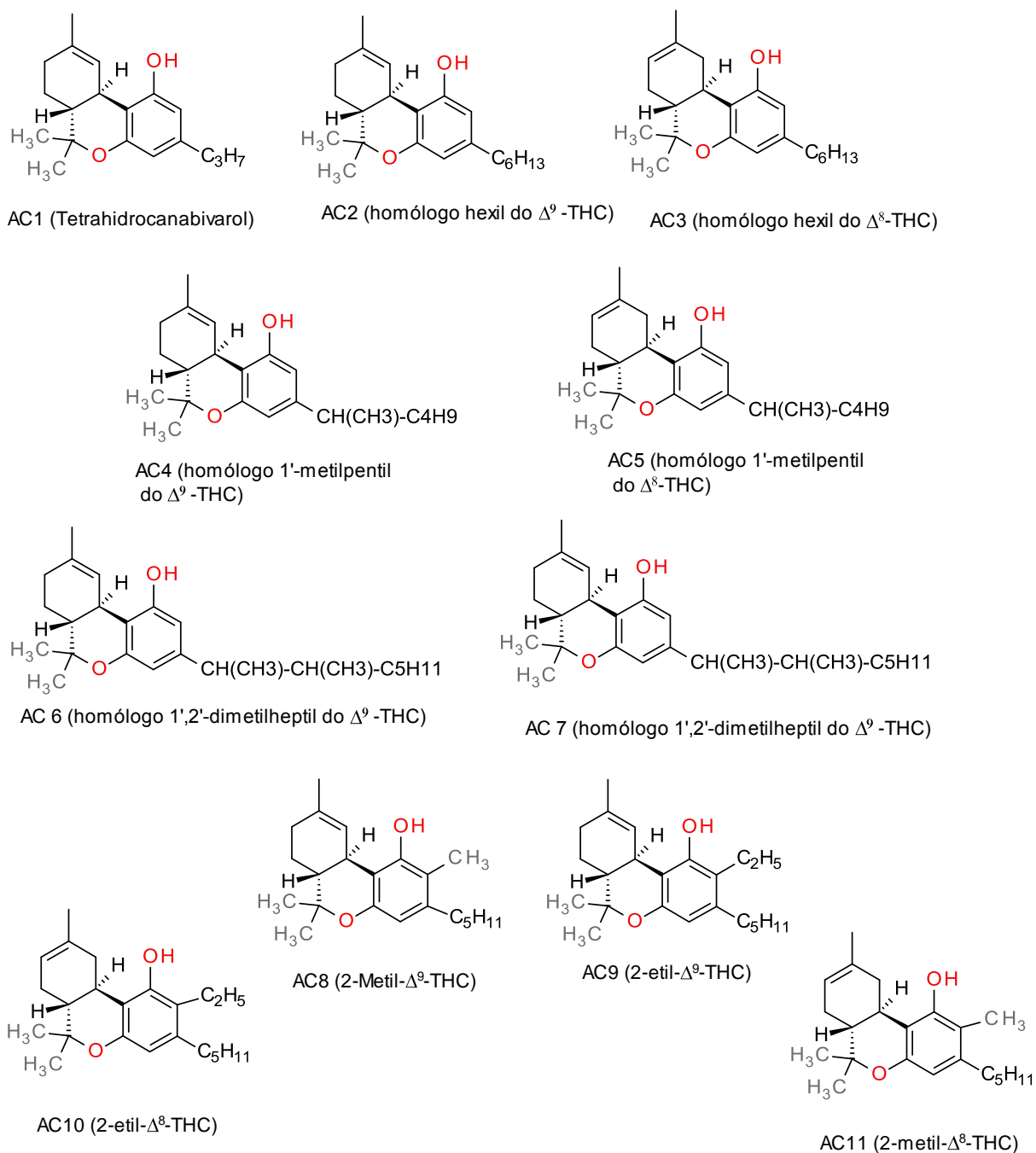


Figura 38b – Estruturas de alguns canabinóides psicoativos [AC(1-11)] derivados do THC

6.3.1 Resultados e discussão das análises PCA e HCA para o conjunto de validação formado por 53 compostos {30 metabólicos canabinóides (METs1-30), 11 canabinóides ativos (AC1-11), 11 canabinóides inativos (IC1-11) e o THC}.

6.3.1.1 Análise de PCA para o conjunto de 53 compostos canabinóides

A figura 39 mostra o conjunto de predição {IC1-11 (para os compostos psicoativos) + AC1-11 (para os compostos psicoativos)} e o conjunto de treinamento {METs1-30 (B (psicoativos) + A1 (psicoativos) + A2 (moderadamente psicoativos)) e THC}.

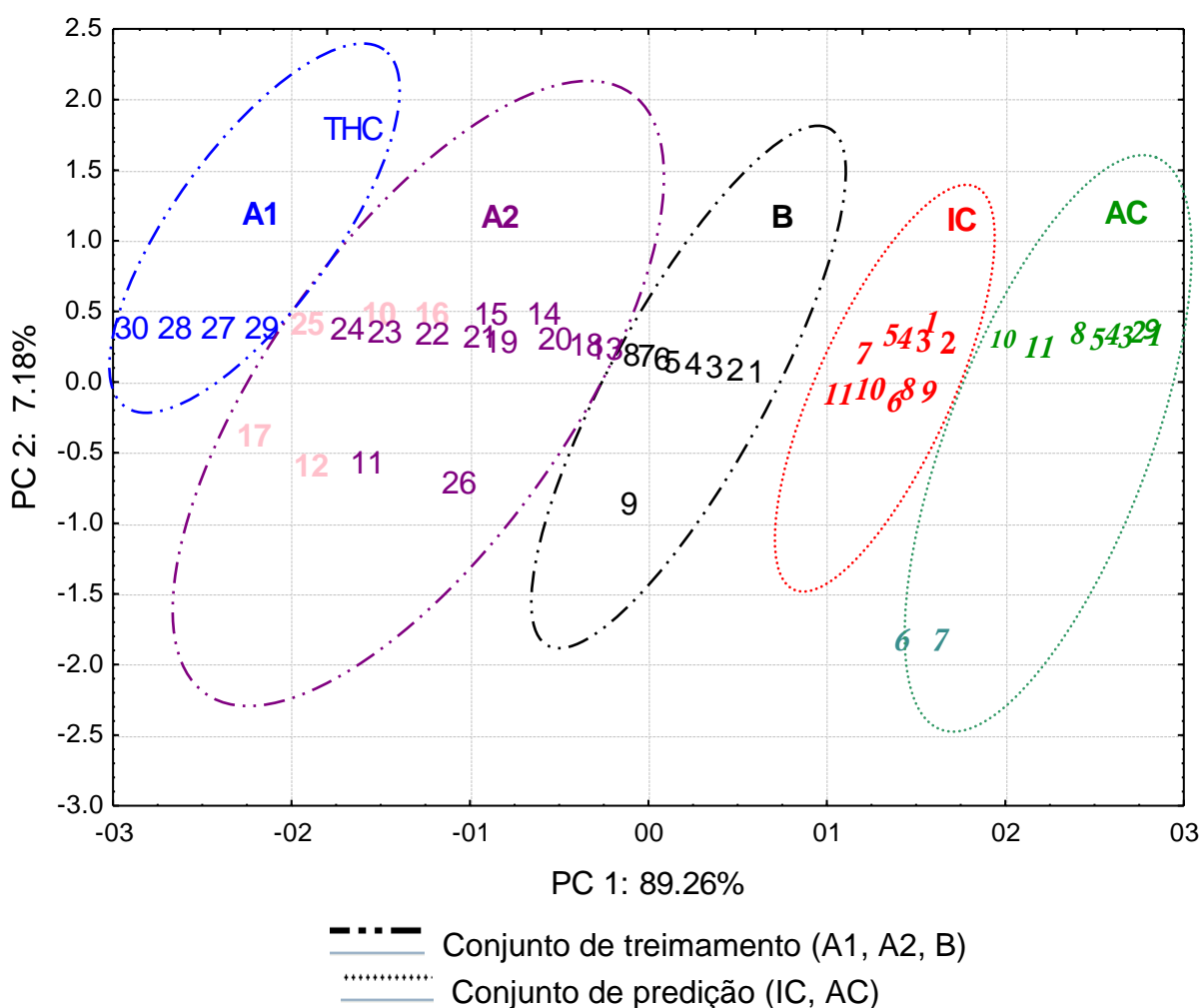


Figura 39 - Gráfico dos “scores” para o conjunto de 53 canabinóides

(30 canabinóides do conjunto de treinamento + 22 canabinóides do conjunto de predição + THC).

Pela análise da figura 39, observa-se uma separação entre os compostos do conjunto de treinamento e do conjunto de predição na PC1, descrita com 89,6 % da informação. A PC2 descreve apenas 7,18% da informação.

Os compostos do conjunto de treinamento estão em PC1 negativa e os compostos do conjunto de predição em PC1 positiva, com a particularidade de que o bloco B (psicoativos do conjunto de treinamento) aparece intermediário entre as duas PCs.

O bloco B (inativos do conjunto de treinamento) está próximo dos inativos do conjunto de predição. Sendo assim, o modelo classifica bem os canabinóides psicoativos.

Alguns pontos importantes devem ser considerados neste novo conjunto da figura 39 obtido a partir do processo de validação:

(1) - os METs 10 e 12 que até então vinham caindo no conjunto dos psicoativos A1, foi atribuído neste processo de validação como A2 (metabólitos moderadamente psicoativos), o que era esperado, já que estes metabólitos são classificados como (+/-) (psicoatividade moderada) segundo Pertwee (2005,2006);

(2) - Os blocos A1 e A2 caem em PC1 negativa, figura 39. Estes blocos também foram atribuídos a PC1 negativa na etapa de treinamento (etapa antes da validação, realizada para os METs 1-30). Sendo assim, se o comportamento de A1 e A2 se mantém para o conjunto final de 53 compostos, ao que parece, os canabinóides psicoativos e moderadamente psicoativos, respectivamente, foram bem classificados.

(3) - O conjunto de predição (IC + AC) encontra-se em PC1 positiva e os compostos ICs estão separados dos ACs.

O gráfico dos “loadings” da figura 40 mostra a distribuição dos descritores Log P, LUMO e T2 em torno das PC1xPC2.

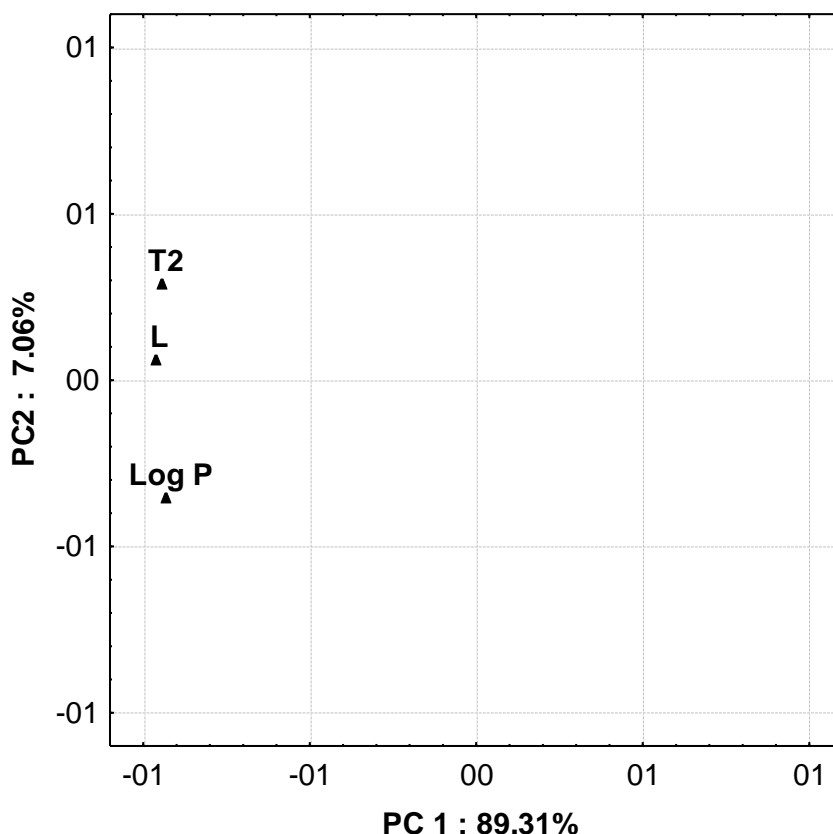


Figura 40 – Gráfico dos “loadings” para os descritores L, T2 e Log P do conjunto de 53 canabinóides (30 compostos do conjunto de treinamento + 22 do conjunto de predição).

Na figura 40, os descritores Log P, L e T2 estão atribuídos na PC1 negativa. O diedro T2 e o E_{LUMO} correspondem a PC2 positiva e Log P a PC2 negativa.

Considerando-se a componente principal PC1 para o conjunto de predição e analisando os gráficos dos “escores” e “loadings” das figuras 39 e 40, percebe-se que os canabinóides psicoativos AC (1-5) (não possuem substituições em C-2) têm maiores valores de PC1 em relação aos AC (8-11) (possuem substituições em C-2). A diferença entre eles é o substituinte em C-2.

Por sua vez, os canabinóides IC (1-5) (compostos que possuem substituintes em C-2) caem em PC2 positiva e os descritores responsáveis por esta PC são o diedro T2 e o log P. Por sua vez, os IC (5-11), (compostos que possuem substituintes em C-4) caem em PC2 negativa, com exceção do MET 7 e na PC2 negativa o descritor relacionado é o Log P. Resumindo, substituintes em C-2 sofrem influência do diedro T2 e da energia do LUMO, já substituições em C-4 não parecem

sofrer efeito destes descritores. C-4 sofre influência do Log P. Estas proposições estão de acordo com Honório (2004).

Outro ponto também importante em relação ao conjunto de predição, diz respeito aos canabinóides inativos que possuem substituintes volumosos em C-4, o caso dos IC (8-11) (ver figura 38a). Segundo Honório (2004, 2000), substituintes volumosos em C-4 é fator chave para separar canabinóides psicoativos dos psicoativos. Este fato pode ser confirmado (observar a figura 38a) já que o conjunto de predição (com substituições em C-4) são todos inativos. Os IC (8-11) caem todos em PC2 negativa, e por sua vez, influencia no Log P (comparar figuras 39 e 40). Segundo Honório (2004) e Arroio (2004), altos valores de Log P indicam psicoatividade e baixos valores deste descritor indicam psicoatividade.

Resumindo, substituições em C-4 afetam o Log P e a psicoatividade e este efeito está comprovado na análise de PCA para os 53 compostos canabinóides.

Por outro lado, se os IC (1-5) caem em PC2 positiva e estes compostos não apresentam substituintes em C-4 e estão descritos por T2. pode-se reiterar que o diedro T2 não sofre influência de grupos em C-4.

Os metabólitos psicoativos do bloco B caem todos em PC2 positiva (com exceção do MET9) e esta PC é descrita pelo diedro T2. A proposta de que T2 justifica a psicoatividade feita para o conjunto de treinamento também é sustentada no estudo de validação. Os baixos valores de E LUMO e Log P justificam os canabinóides psicoativos no conjunto de 53 compostos.

Finalmente, o estudo de validação para 53 canabinóides pode sustentar as propostas de Honório (2004) de que altas E LUMO e Log P são para canabinóides psicoativos. Comprovado nos gráficos dos “escores” e “loadings” das figuras 39 e 40 para os metabólicos psicoativos A1 e A2.

Segundo Honório (2004), canabinóides que possuem substituintes volumosos em C-4 e apresentam baixos valores de LUMO são candidatos a serem psicoativos e os IC 9-11 em PC1 positiva comprovam isto.

A análise de HCA pode também esclarecer outros aspectos no estudo e será tratada a seguir.

6.3.1.2 Análise de HCA para o conjunto de 53 compostos canabinóides

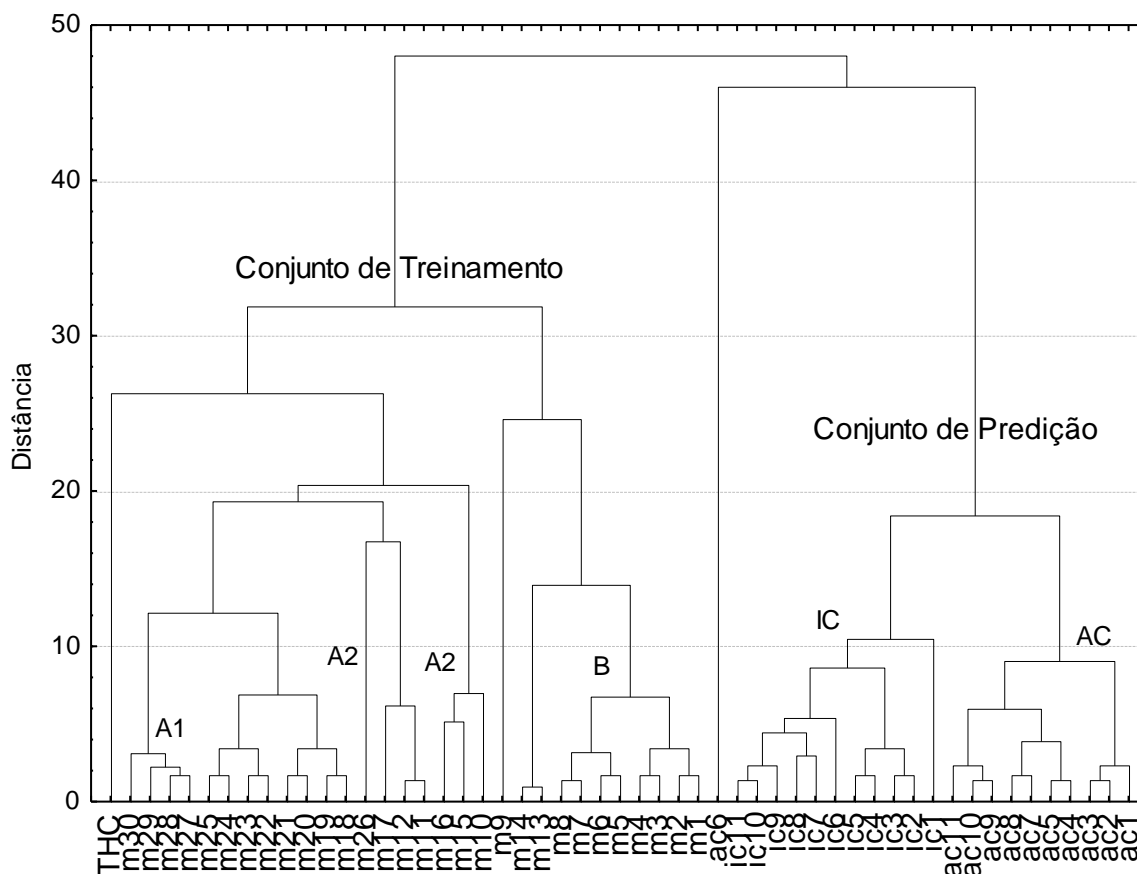


Figura 41 – Dendrogramas para o conjunto de 53 canabinóides (30 compostos do conjunto de treinamento + 22 do conjunto de predição + THC) Calculado pelas médias ponderadas de grupos pareados por distancia euclidianas

Analisando a figura 41, está clara a separação em 3 árvores. Uma árvore aparecem os blocos A1 e A2; a segunda árvore aparece o bloco B e na terceira árvore estão os ACs e ICs e IC. Sendo assim, os descritores energia do LUMO, Log P e T2 São descritores eficientes para separar psicoatividade de psicoinatividade.

Resumindo, as análises PCA e HCA para os 53 canabinóides permitiram a confirmação de que o conjunto de treinamento foi satisfatoriamente classificado pelos descritores LUMO, Log P e T2 e correspondem aos mesmos comportamentos para o conjunto de previsão estudado por Honório (2004) quando estão ausentes substituições em C-2 ou C-4 na cadeia das moléculas canabinóides. Outro ponto

esclarecido diz respeito ao diedro T2 que foi considerada a variável que separa compostos canabinóides em função das substituições em C-2 e C-4.

É importante reportar-se aos METs 10,11,12,16, que pelas técnicas quimiométricas não se posicionaram bem nas classificações dadas. Porém, a partir da figura 41, estes metabólitos caem todos no conjunto de treinamento numa região que descreve os compostos de moderada psicoatividade, confirmando a classificação experimental dada na literatura (PERTWEE, 2005; WATANABLE et al., 2005).

Concluindo estas discussões a respeito das análises quimiométricas, e mesmo considerando algumas irregularidades, é possível sugerir que a melhor separação entre psicoatividade e psicoinatividade foi obtida utilizando o conjunto de três descritores (E_{LUMO} , Log P e T2) para os 53 compostos.

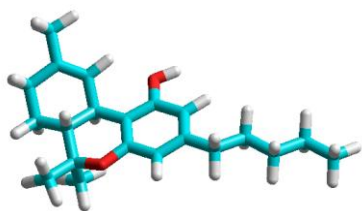
A seguir, serão feitas algumas considerações na geometria molecular e regiões de interesse das moléculas e estabelecidas algumas correlações da estrutura e atividade dos compostos canabinóides.

6.4. Estudo das geometrias dos compostos estudados e relações entre psicoatividade e psicoinatividade

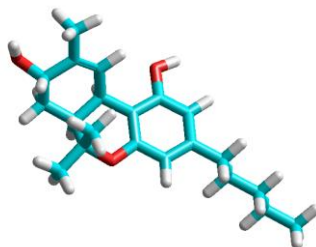
Nesta seção, os resultados das geometrias serão analisados por uma ótica descritiva, com observações visuais acerca da distribuição dos átomos ao redor das regiões de interesse e considerando as implicações já publicadas na literatura. O programa utilizado nesta etapa foi o hyperchem 7.5.

Na figura 42, os sinais (+), (-) e (+/-) significam canabinóides psicoativos, psicoinativos e de baixa psicoatividade, respectivamente.

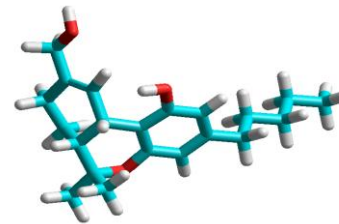
THC (+)



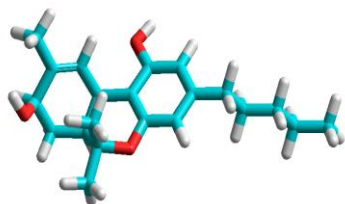
MET27 (+)



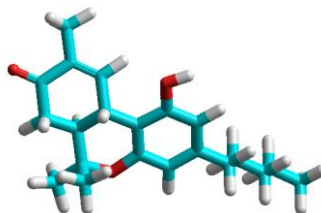
MET28 (+)



MET29(+)



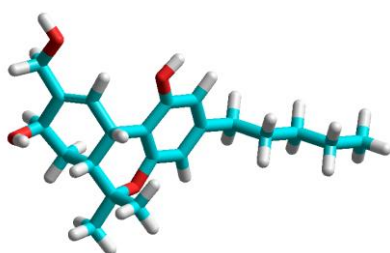
MET10 (+/-)



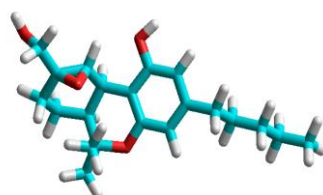
MET11 (+/-)



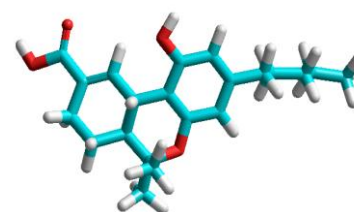
MET12 (+/-)



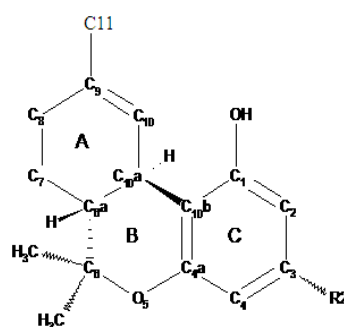
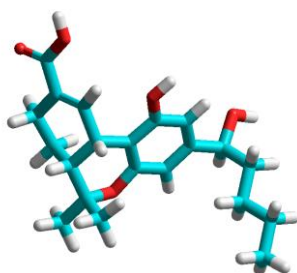
(MET16 (+/-)



MET1 (-)



MET2 (-)



MET3 (-)

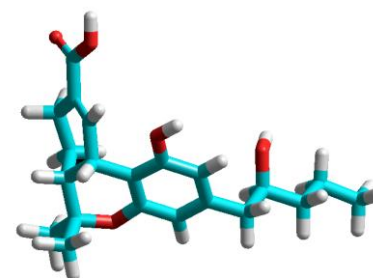


Figura 42 - Geometrias otimizadas dos compostos canabinóides psicoativos e psicoinativos utilizando método de cálculo DFT. Fontes: Pertwee (2005), Fraser et al. (2004), Honório (2004), Arroio (2004).

A conformação do anel carbocíclico A dos compostos expostos na figura 42 mostrou-se não planar para os psicoativos. Adições de grupos polares no anel A, especificamente no carbono C-8 para os METs 27, 29, 10, 11 e 12 e nas posições C-9 e C-10 para o derivado epóxido (MET16), também não modificam a conformação do anel A, como também não interferem na psicoatividade. Esta condição foi descrita por Mechoulam (1973) e Razdan (1979), sendo obedecida para os compostos estudados.

O anel pirânico B adota uma conformação preferencial onde o grupamento metila ligado em C-6 está orientado do mesmo lado do hidrogênio em C-10a, esclarecido por Honório (2004) e também tratado anteriormente por Huetis et al. (1996) e Drummer e Oddell (2001). Os metabólitos da figura 42 não seguem uma regularidade para o posicionamento destes grupos CH₃ em C-6 e H em C-10a. Para Mechoulam et al. (1992), estes hidrogênios não necessariamente precisam estar de lados contrários para conferir a psicoatividade aos canabinóides e este efeito foi comprovado para os compostos aqui estudados.

Segundo Mechoulam et al. (1992), Razdan (1979) e Reggio et al. (1989), o comprimento da cadeia lateral ligada ao anel C (ver numeração na figura 42) pode ser variado sem perda da atividade, mas a condição mínima para manter a atividade é de 3 átomos de carbonos. Todos os metabólicos da figura 42 obedecem esta proposição.

O anel benzopirano (anel B e C unidos) deverá ser planar, condição descrita por Mechoulam et al. (1992). Observa-se que as estruturas otimizadas dos compostos da figura 42, ao serem analisadas não apresentaram variações na geometria que fossem significativas para perda da planaridade deste anel mantendo-se em todos os metabólicos ativos.

Segundo Razdan (1979) e Mechoulam et al. (1992), a direção do anel A em relação ao anel benzopirano é condição para o potencial psicoativo nos canabinóides. Estudos teóricos sugerem que o anel carbocíclico A é equatorial ao anel benzopirano BC (REGGIO et al. 1989). As geometrias dos metabólitos da figura 42 sustentam esta idéia.

As geometrias moleculares otimizadas para o triciclo ABC do THC (psicoativo) e do MET1 (psicoinativo) que estão mostradas na figura 43 deixam claro que o arranjo espacial dos grupos CH_3 no carbono C-6 e do H no carbono C-10a (indicados por asteriscos na figura 43), estão em posição *cis* (do mesmo lado no anel B) para THC e MET 1, o que indica não ser o direcionamentos dos grupos C-6 e C-10a um fator limitante para separar compostos psicoativos e psicoinativos, segundo Mechoulam et al. (1992). Contudo, a direção do anel A para baixo e equatorial no THC, confere a psicoatividade, conforme Reggio (1989, 1992), sendo contrário no MET1, pois o anel A está para cima. O que mostra que a posição deste anel é fator limitante na psicoatividade.

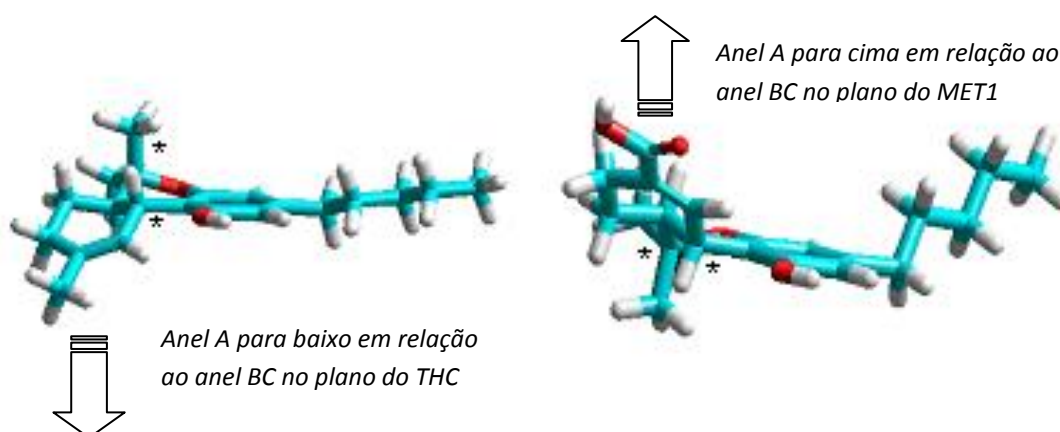


Figura 43 - Visualização do Δ^9 -THC e 11-carbóxi- Δ^9 THC (MET1) mostrando o anel benzopirano BC no plano

Os derivados canabinóides que apresentam substituições na cadeia lateral ligada ao anel C, no geral, apresentam-se como potentes analgésicos. Como exemplo pode-se citar o potente analgésico e antiinflamatório - HU-210, (-)-1,1-dimetilheptil-11-OH- Δ^8 -THC - um análogo sintético do canabinóide 11-OH- Δ^8 -THC (DEVANE et al. 1992).

A respeito das substituições e ramificações na cadeia pentil ligada ao anel C, segundo esclarecem Mechoulam (1973) e Razdan (1979), grupos polares nesta cadeia posição da cadeia, aumentam a potência da molécula canabinóides, porém, a adição de um átomo de oxigênio (formando um éter ou éster) pode ser realizada sem perda de atividade.

Para uma melhor correlação dos efeitos estereoeletrônicos causados por substituições em R2 e sua influencia na psicoatividade, selecionou-se os METs com substituições polares nesta cadeia. Inicialmente, foram analisadas as geometrias dos derivados 9-COOH-THC e, posteriormente, analisaremos as geometrias dos derivados 11-OH-THC.

Todos os metabólicos presentes na figura 44 foram designados como psicoativos pertencentes ao bloco B. A princípio, não se percebe muitas variações nas geometrias do anel triciclo ABC que devam ser consideradas importantes. As que se mostraram significativas foram nos METs 4-6. Contudo, em função destes metabólitos possuírem menos de 3 carbonos na cadeia lateral, era esperado certa irregularidade na cadeia, por não obedecer a condição de que a cadeia mínima ligada a C deve ser de 3 carbonos, propostas por Mechoulam (1992).

Outro ponto importante a ser considerado diz respeito à direção da OH fenólica em C-1 e seu efeito sobre substituinte em C-9, tratados por Reggio (1989; 1992) na diferenciação da psicoatividade e analgesia do canabinóide 9-nor-9 β -OH-HHC. Mechoulam et al. (1980) também realizaram estudos de SAR numa série de canabinóides a respeito de substituições em C-1, onde conclui-se que na ausência de outros substituintes no anel fenólico, a estereoquímica do substituinte em C-1 é preferencialmente equatorial para haver psicoatividade na molécula canabinóide. Analisando a figura 44, todos os substituintes em C-1 são OH e não se observa variação na direção dos grupos OH nos metabólicos 11-COOH-THC, com exceção do MET 5. Ao que parece, a cadeia lateral ligada ao anel C é importante na orientação dos elétrons da OH fenólica e este efeito foi estudado por Reggio et al. (1989).

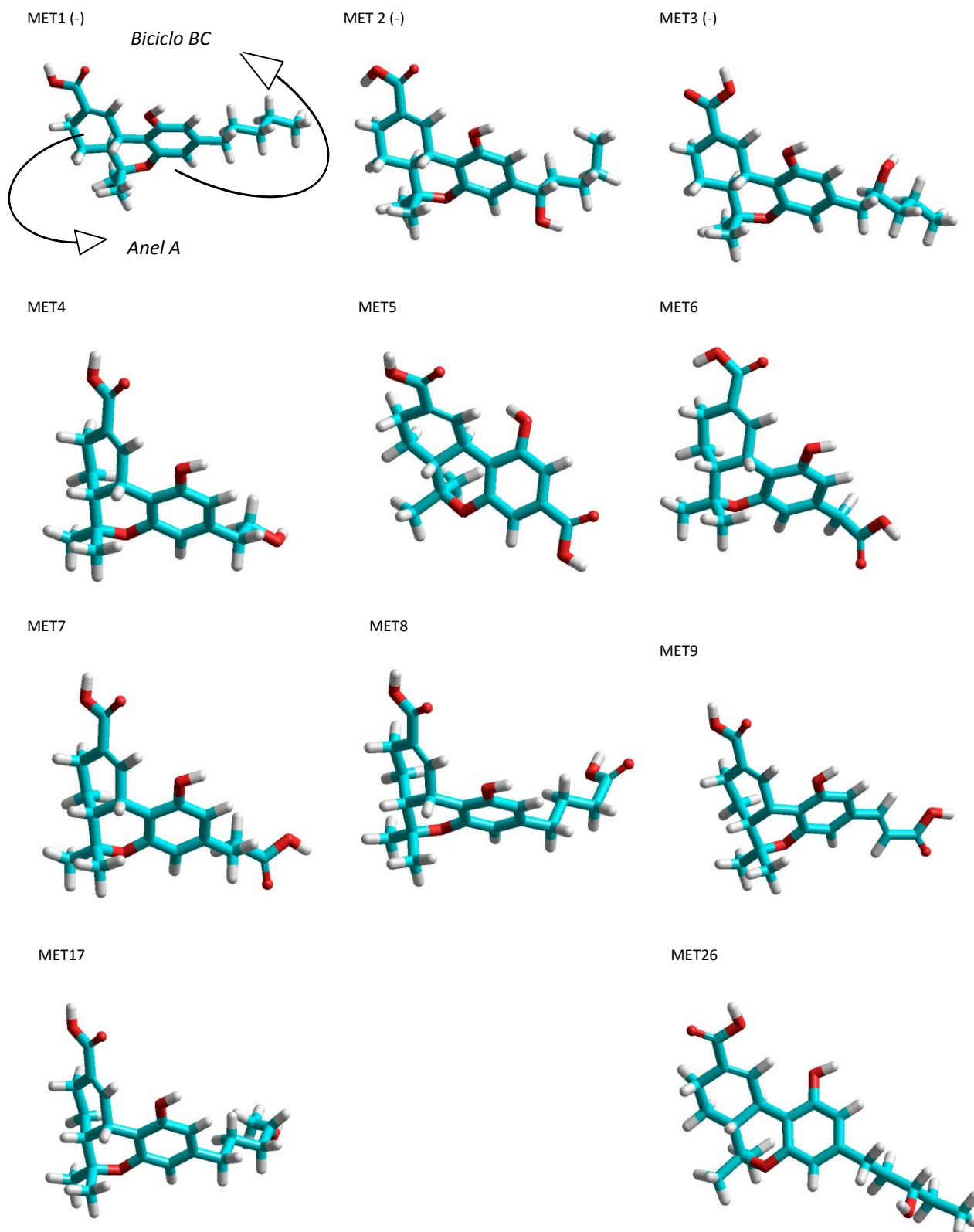


Figura 44 - Geometrias otimizadas dos derivados 9-COOH- Δ^9 -THC por métodos DFT

Para estudar a rotação da OH fenólica em C-1, Reggio et al. (1989) estabeleceu que há dois componentes na molécula canabinóide que conferem à psicoatividade:

- (1) o direcionamento dos pares isolados dos elétrons do oxigênio da hidroxila fenólica e;
- (2) a orientação do anel carbocíclico A relativo a este oxigênio fenólico. Na figura 44, considerar a mesma notação dada ao anel A e o biciclo BC do MET1 para todos os compostos da figura 44.

O comportamento rotatório da OH fenólica e a energia do sistema em torno de C-9, para alguns canabinóides, fizeram Reggio et al. (1989) concluir que a orientação dos substituintes em C-9 interfere no ângulo torcional da OH fenólica em C-1, sendo este fator importante para discriminação do potencial psicoativo dos canabinóides.

É oportuno lembrar que para os metabólicos do bloco B, o diedro T2, que representa a rotação da OH fenólica em C-1, se mostrou uma variável preponderante para descrever estes metabólitos. Logo, ao que parece, grupos COOH em C-9 podem interferir no direcionamento dos pares de elétrons da OH em C-1 acarretando perda da psicoatividade. As proposições de Reggio et al. (1989) se aplicaram aos metabólicos canabinóides 11-COOH, (figura 44).

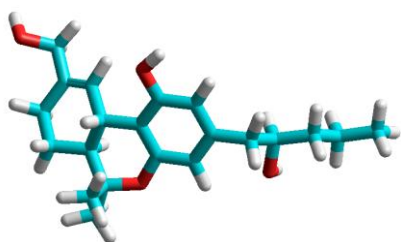
Se a distribuição dos pares de elétrons em torno da OH fenólica é fator discriminante para psicoatividade, conforme esclareceu Reggio (1987), é possível que diferentes grupos polares em R2 afetem a psicoatividade, se porventura estas substituições mudar a geometria do anel benzopirano. Sendo assim, os metabólicos derivados 11-OH-THC que só diferem pelas adições de grupos polares em R2 (figura 46) também devem ser analisados.

Acerca da geometria do anel benzopirano, pode-se dizer que é um fator preponderante na aproximação dos grupos dentro da região do farmacóforo (região para a interligação canabinóide – receptor). Se assim for, o descritor ângulo diedral T2, representando a cavidade do anel ABC, por ser um parâmetro estéreo, pode estar correlacionado ao encaixe no receptor ao respectivo canabinóide dentro da membrana celular. Se T2 interfere diretamente na geometria do biciclo BC, este descritor também torna-se preponderante para descrever a aproximação canabinóide-receptor.

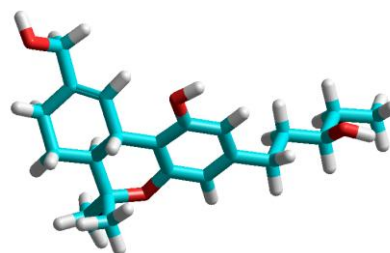
Para esclarecimentos da geometria das moléculas canabinóides, Reggio et al. (1992) estudou o poder discriminatório do potencial eletrostático e das características da reatividade molecular dos compostos Δ^9 -THC (psicoativo) e 9-nor-9 β -OH-HHC (analgésico) e comprova que a geometria da molécula é importante para diferenciar analgesia de psicoatividade. A influência da geometria para descrever moléculas canabinóides também foi esclarecida por Arroio (2004).

Dos metabólicos da figura 45, apenas o MET 28 apresenta atividade conhecida na literatura, sendo um potente analgésico e psicoativo. Os outros metabólicos mostrados foram designados como pertencentes ao bloco A2, classificados como moderadamente psicoativos. Percebe-se que MET 28 é o único que apresenta a OH fenólico de lado contrário em relação aos outros METs. Sabe-se que na otimização de geometria é possível forçar o grupo de interesse a se direcionar numa posição estratégica na cadeia, porém, no caso do MET 28, não achou-se pertinente forçar um direcionamento da OH para o outro lado, para que ficasse garantida a análise da geometria mínima proposta por DFT, um método que reproduz melhor as propriedades eletrônicas e conformacionais das moléculas, segundo esclarece Simas e Rocha (2007). Segundo Reggio, o ângulo torcional da OH fenólica e o direcionamento dos pares isolados dos elétrons do oxigênio desta hidroxila fenólica causa efeito na psicoatividade e sofre influências dos substituintes em C-9. Este efeito parece confirmado neste bloco da figura 45, já que todos foram classificados como moderadamente psicoativos, diferentemente do psicoativo MET28, o único que direciona os pares de elétrons do OH fenólico para outro lado na sua conformação mínima, e o mais potente analgésico da serie mostrada na figura 45.

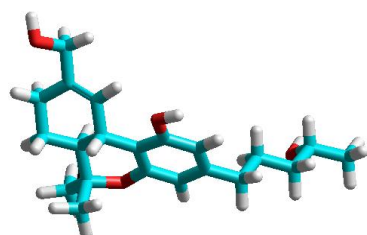
MET13



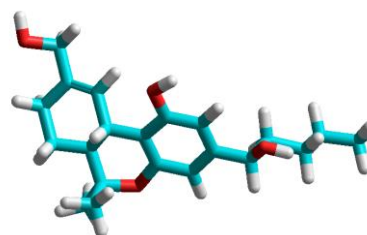
MET14



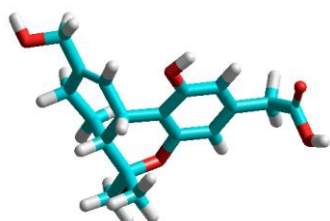
MET 15



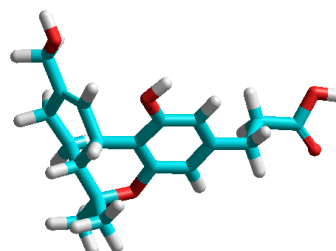
MET 19



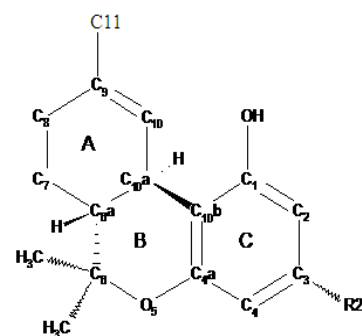
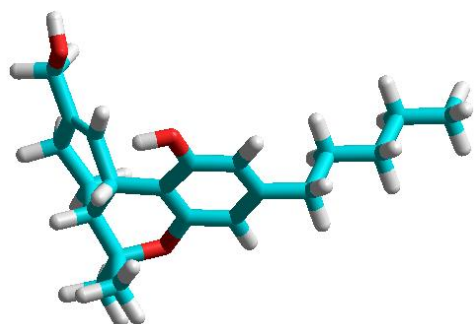
MET 20



MET 21



MET 28 (psicoativo e potente analgésico)



Numeração utilizada nos compostos

Figura 45 – Metabólitos canabinóides derivados 11-OH- Δ^9 -THC e sistema de numeração utilizado nos compostos.

Por fim, existem alguns critérios que foram considerados determinantes por Reggio et al., (1989) para o estudo de psicoatividade em canabinóides. Para melhor avaliação destes critérios é oportuno considerar a figura 46 para visualização.

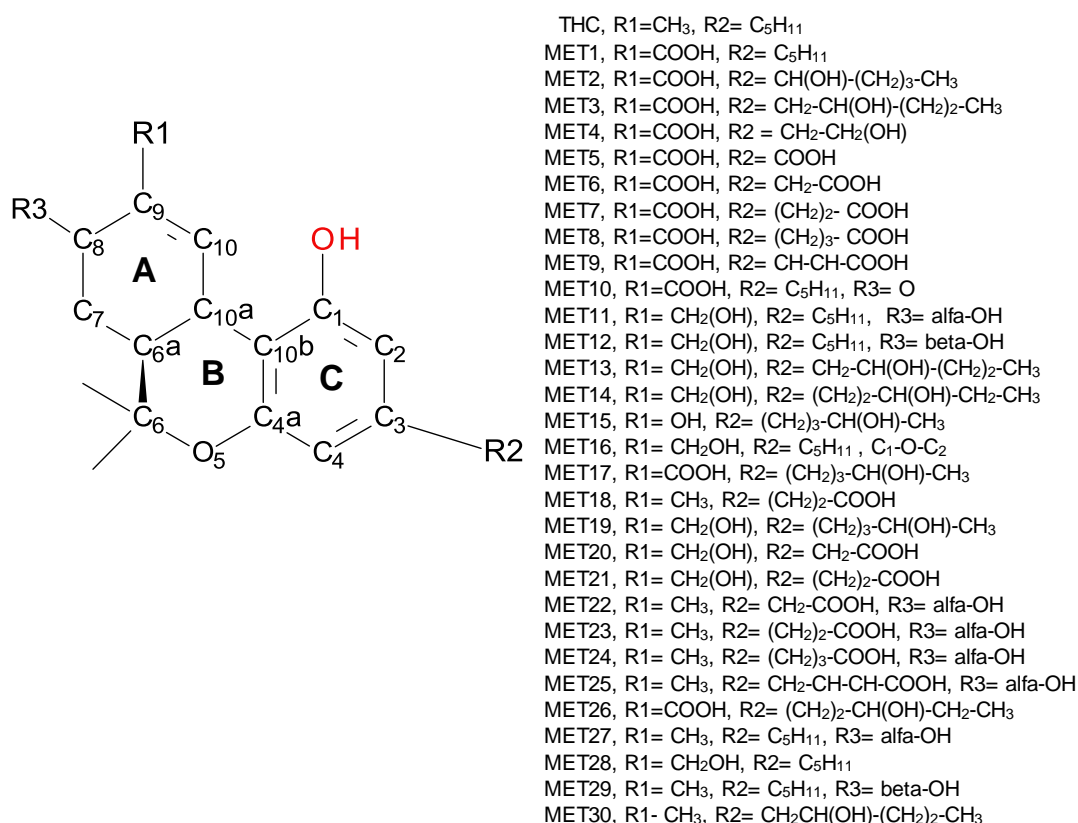


Figura 46 – Estrutura e representação dos grupos R1, R2 e R3 para os METs 1-30.

Os critérios considerados determinantes no estudo dos canabinóides por Reggio et al.,(1989) são os seguintes:

- (1) Os canabinóides devem ter atividade conhecida e terem sido testados sob os mesmos tipos de testes;
- (2) Os canabinóides devem diferir do Δ^9 -THC somente no anel carbocíclico A;
- (3) Os anéis B e C não devem possuir substituições adicionais e devem ter geometria igual ao THC e a geometria do anel C não pode diferir do THC, sendo a cadeia pentil imprescindível;
- (4) As posições do grupo OH ligado ao anel C devem ser idênticas àquelas do THC;
- (5) As variações no anel A não devem causar variação no potencial eletrostático em comparação ao THC.

Com a proposta deste trabalho é tentar estabelecer correlações entre algumas propriedades para previsão da psicoatividade e psicoinatividade de uma serie de metabólitos canabinóides, e nem todos eles tiveram suas atividades esclarecidas na literatura, o critério 1 não será considerado neste estudo.

Correlacionando os critérios 2-5 com os compostos estudados, temos que: Os METs 1-30 (figuras 46), obedecem, em partes, aos critérios de Reggio et al. (1989). Por exemplo, alguns dos METs1-30 não apresentam modificações no anel carbocíclico A, concordando com o critério (2). Deve-se ter em mente que como a proposta deste trabalho é também descrever a psicoinatividade, o critério (2) pode ser aplicado para comparar os metabólitos em estudo com o metabólitos MET 1 (o canabinóide mais psicoinativo da série). O MET 1 apresenta o grupo COOH em C-11 (ver figura 46) e muitos dos metabólitos estudados apresentam substituintes nestas posições. Sendo assim, critério (2) é obedecido para a série de METs 1-30.

Os anéis B e C não possuem substituições diferentes para os METs 2-30 se comparadas ao THC e MET1 (figura 46). A maior parte dos metabólitos apresenta a cadeia lateral pentil e a presença de grupos polares nesta cadeia pentila, em algumas moléculas, não interferiu na geometria para que fosse perdida a planaridade do biciclo (ver figuras 43, 44 e 45), concordando com a proposição (3). Todos os metabólicos apresentavam OH fenólica e não apresentaram variações que devam ser consideradas na direção desta OH se comparadas ao THC e o MET 1, obedecendo ao critério (4); (ver figuras 42, 43, 44 e 45 para esclarecimentos das geometrias).

Como não foram calculados os potenciais eletrostáticos neste trabalho, não será avaliada a condição (5).

Com relação à geometria dos compostos, é importante também considerar os estudos de Vessecchi et al. (2008), que sugere que alterações na geometria de moléculas podem estar associadas à distribuição de carga e polaridade dos grupos. Ao que parece, a geometria dos canabinóides pode sofrer influência dos efeitos indutivos provenientes dos substituintes em R2 e isto deve ser considerado. Para estes esclarecimentos, achou-se oportuno realizar um estudo mais detalhado acerca das geometrias em algumas regiões de interesse. Estes estudos foram fundamentados nos esclarecimentos acerca das propriedades estéreas e geométricas para canabinóides tratadas nos trabalhos de Mechoulam (1992, 2001), Reggio (1992, 1989), Honório (2000; 2004) e Arroio (2004).

Para Reggio (1989), a geometria do triciclo ABC é importante para diferenciar psicoatividade e analgesia. Arroio (2004) propôs um comparativo para propriedades de analgesia e psicoatividade nos canabinóides e concluiu que efeito de hidrofobicidade é diferenciador para analgesia e psicoatividade. Contudo, para Arroio (2004), descritores geométricos e estéreo descrevem regiões específicas da molécula e são mais importantes para psicoatividade.

6.4.1 Considerações finais obtidas acerca dos resultados das geometrias

Os compostos psicoativos apresentam $E_{LUMO} > 0,3$ eV segundo relatos dos autores Honório (2004) e Arroio (2004). Este fato se aplica aos metabólicos canabinóides aqui estudados, com exceção do MET 10. Para esclarecimento da geometria do MET10 (produto da oxidação dos isômeros MET 29 (8- α -OH-THC) em menor quantidade e do MET28 (8- β -OH-THC) em maior quantidade), um estudo mais detalhado destes metabólitos e mostrado a seguir.

Os METs 27 e 29 são isômeros e diferem na direção da OH em C-8, sendo α no MET 27 e β no MET 29, os dois são psicoativos segundo Grotenhermen (2003) e têm suas geometrias mostradas na figura 47. Os hidrogênios ligados aos carbonos C-6a e C-10a estão representados por asteriscos (*), e nos dois casos, estes hidrogênios se apresentam do mesmo lado. Não observa-se mudança na geometria do anel A nos dois casos.

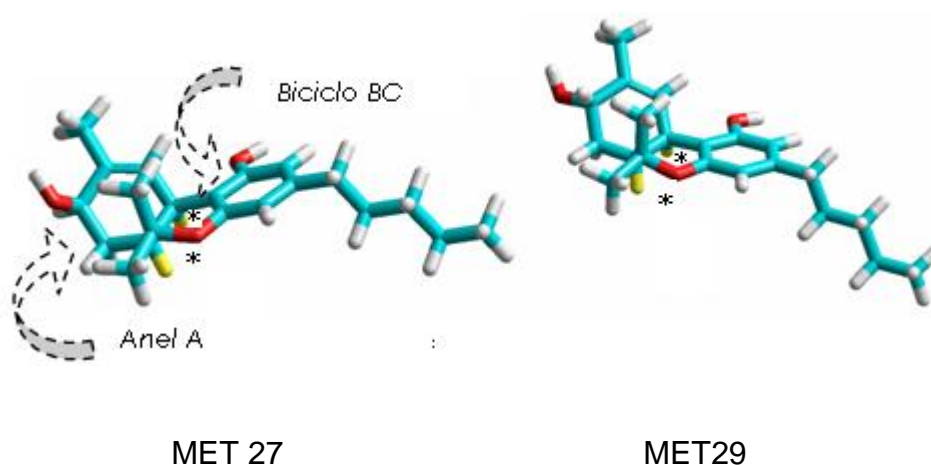


Figura 47 – Geometria dos metabólicos 3-pentil- 8-axial-hidróxil- Δ^9 -THC (MET 27) e 3-pentil- 8-equatorial-hidróxil- Δ^9 -THC (MET 29) respectivamente

A potência da psicoatividade não é esclarecida para estes metabólitos. O MET 27 apresenta valor de energia do LUMO 0,273 eV e o MET 29 0,311 eV. Na classificação dada pelas técnicas quimiométricas estes metabólitos pertencem ao bloco A1, de compostos psicoativos.

Observa-se que o anel carbonílico A está em posição equatorial ao anel planar benzopirânico BC e os hidrogênios C6a e C10a (marcados com asterisco), encontram-se do mesmo lado do anel nos dois casos (figura 47). Os MET 27 e 29 ao sofrerem oxidações da OH em C-8 fornecem o MET 10, figura 48. Os METs 27, 29 e 10 são os primeiros produtos da hidroxilação seguida de oxidação do THC pelo citocromo P450 (PERTWEE; 2005).

A geometria do MET10 sofre influência da carbônica em C-8, conseqüentemente, o anel A assume uma geometria quase planar em relação ao anel benzopirano BC conforme verifica-se na figura 48. Observam-se também mudanças para os hidrogênios C-6a e C-10^a (marcados com asteriscos) que passam a ficar em posições contrárias no plano. Ao que parece, oxidações na posição C-8 da cadeia canabinóides afetam a geometria do anel A, o que acarreta diminuição da psicoatividade, pois o MET 10 apresenta uma moderada atividade psicoativa em relação ao THC segundo Pertwee (2006).

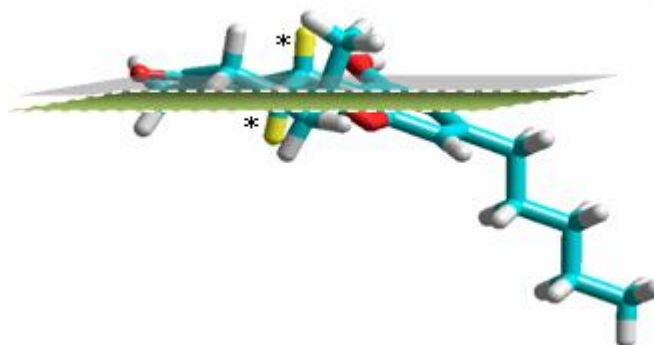


Figura 48 - Geometria molecular do derivado 3-pentil-8-ceto- Δ^9 -THC (MET10)

O MET 28, figura 49, é um potente analgésico e também apresenta caráter psicoativo devido a direção equatorial do grupo OH em C-11, segundo Reggio et al. (1992). A geometria *equatorial* da OH em C-11 permite combinar analgesia e psicoatividade para o MET 28, já a forma *axial* apresenta analgesia e uma reduzida psicoatividade. As posições do substituinte em C-11 nas moléculas canabinóides é

um ponto de diferenciação entre analgesia e psicoatividade descrita anteriormente neste trabalho.

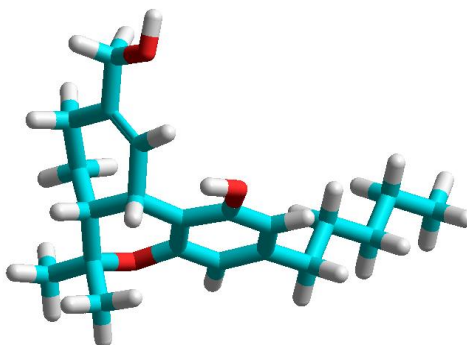


Figura 49 – Geometria otimizada do metabólito canabinóide 3-pentil-11-hidróxi- Δ^9 -THC (MET28).

Levando-se em consideração o posicionamento do grupo em C-11 do MET 28 (figura 49), deve-se averiguar também os dois produtos da hidroxilação do MET 28, que são os isômeros MET 11 (*axial, axial*, 8,11-dihidróxi-THC) e MET 12 (*axial, equatorial*, 8,11-dihidróxi-THC) (figura 50), tendo em vista que estes metabólitos diferenciam entre si apenas pela posição da OH em C-11. Os METs 11 e 12 apresentam valores de E_{LUMO} positivos. O MET 11 apresentou um E_{LUMO} igual a 0,2126 Ev e o MET 12 o E_{LUMO} mediu 0,3080 Ev. Baixos valores de E_{LUMO} indicam maior caráter elétron-aceptor. Sendo assim, o MET 11 será menos elétron-aceptor que o MET 12. As hidroxilas em C-8 e C-11 estão marcadas com dois asteriscos e os H em C-6a e C-10a estão marcados com 1 asterisco nas estruturas da figura 50

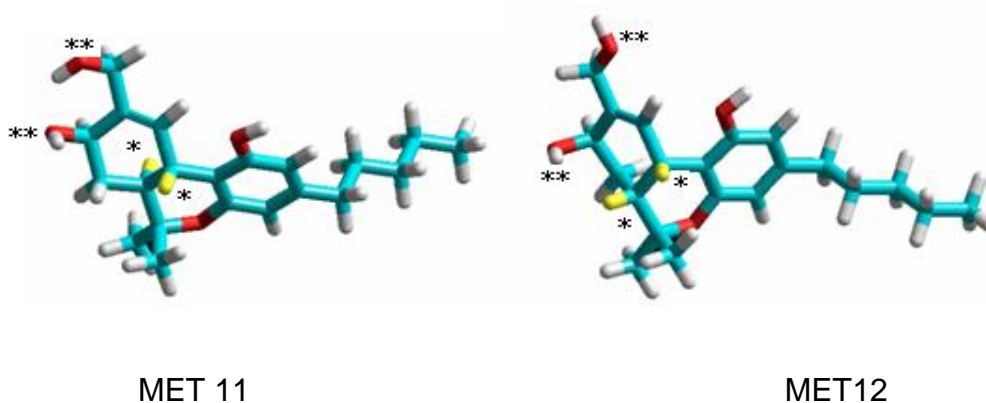


Figura 50 – Geometrias dos metabólicos 3-pentil-8,11-*axial, axial*-dihidróxi- Δ^9 -THC (MET11) e 3-pentil-8,11-*axial, equatorial*-dihidróxi-2'-hidróxi- Δ^9 -THC (MET12).

Segundo Cunha (2009), as forças intramoleculares entre hidroxilas podem ser causadas por mudança orientacional (o que estabiliza sua geometria) e conseqüentemente, uma diminuição no momento dipolo (o que desestabiliza sua interação com a água) dos compostos. Se na molécula há grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, o dipolo também pode variar dependendo das orientações relativas das hidroxilas conforme ainda comenta Cunha (2009).

Especificamente nos METs 11 e 12, onde as OHs estão nos carbonos C-9 e C-11 (marcadas por dois asteriscos), se formarem-se ligações de hidrogênio intramolecular, certamente acarretariam mudanças no potencial eletrostático desta região. Relembrando os critérios de Reggio et al., (1989), a variação no anel A não devem causar mudanças no potencial eletrostático. Sendo assim, nos METs 11 e 12, se as interações entre as hidroxilas interferir na geometria do anel A e afetar o potencial eletrostático, podem acontecer mudanças na psicoatividade destes metabólitos.

Analisando as geometrias dos METs 11 e 12 (figura 50), percebe-se que os átomos de hidrogênio em C-6a e C-10a (marcados com 1 asterisco) estão em lados contrários no MET 11 e do mesmo lado para o MET 12. Contudo, o posicionamento destes hidrogênios não acarretou mudança na geometria do Anel A que deva ser considerada relevante para perda da psicoatividade observando a figura 50.

Antes de calcular o potencial eletrostático dos METs 11 e 12, decidiu-se avaliar com mais pormenores a região em torno dos carbonos C-11 e C-8.

Medindo a distância entre o hidrogênio do grupo OH em C-8 ao oxigênio do OH em C-11 no MET 11, o valor encontrado foi de 2.017 Å, (0.2017 nm). O MET 12 apresentou distância entre estes grupos de 4.18 Å. Estes valores foram calculados pelo programa Hyperchem.

A distância de 2,017 Å para o MET 11 pode sugerir que os grupos polares em C-8 e C-11 poderiam interagir por forças de van der Waals do tipo ligações de hidrogênio intramolecular. Segundo Silva (2008), os comprimentos típicos de uma ligação de hidrogênio intramolecular são bastante diferentes em aglomerados de átomos doadores interagindo com receptores. Estas conclusões foram retiradas por Silva (2008) ao realizar cálculos de comprimento de ligação de hidrogênio em diversos aglomerados de moléculas, em vários níveis de cálculos, garantindo que as estruturas estivessem no estado de mínima energia através de cálculo de frequências vibracionais positivas.

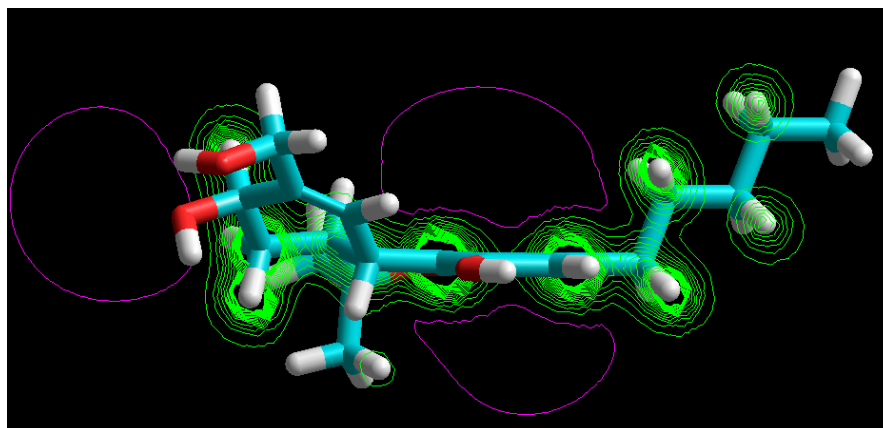
No artigo citado, Silva (2008) comenta que, de um modo geral, observou-se uma pequena variação nas distâncias de ligação de hidrogênio entre os vários níveis de cálculo. O melhor nível de cálculo sugere a distância de uma ligação de hidrogênio entre 2,0 - 2,5 Å - 3% acima. Sendo assim, é provável que a formação de ligação de hidrogênio intramolecular no MET 11 acarrete variação de psicoatividade, pois segundo Reggio et al., (1989), se substituintes no anel A causar mudanças no potencial eletrostático a psicoatividade sofre influência.

Dentre as interações de van der Waals, uma das mais importantes existentes em meio biológico, a ligação de hidrogênio desempenha um papel importante nos processos bioquímicos. Define-se a formação da ligação de hidrogênio a partir da interação existente entre um doador (DX) e um receptor de próton (R), para uma interação (R...DX) segundo Oliveira et al., (2007). No geral, esta interação é tão fraca que muitos pesquisadores não a consideram como uma ligação plenamente formada e lançam questionamentos se a interação é puramente eletrostática ou se os efeitos de transferência de carga são realmente importantes (OLIVEIRA, et al., 2009).

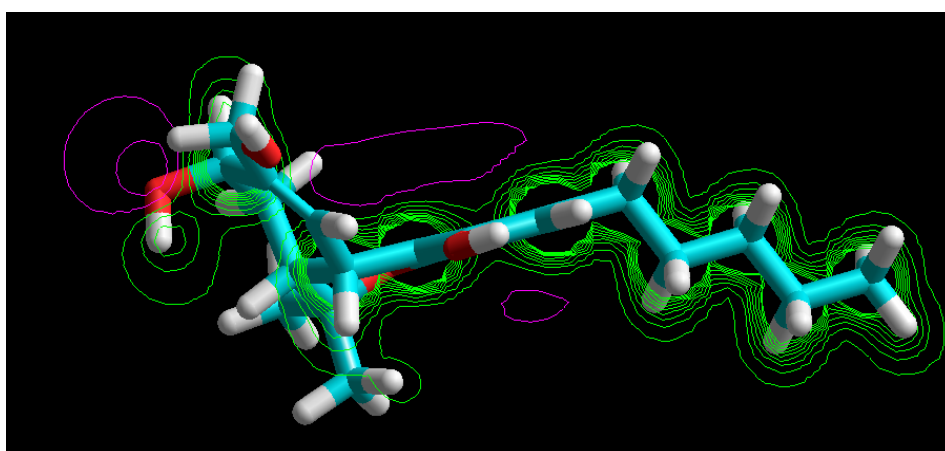
Um modelo amplamente difundido na comunidade teórica para cálculos de ligações de hidrogênio é o das cargas derivadas do potencial eletrostático molecular quântico, usualmente denominado como MEP ("Molecular Electrostatic Potential"), tratados por Chuang et. al, (1999), cujo formalismo não será aqui descrito. O potencial eletrostático em torno da região dos carbonos C-8 e C-11 está mostrado na figura 51.

Como não era proposta estudar todos os pormenores que justifiquem ligações de hidrogênio entre os metabólicos canabinóides, pois segundo Oliveira (2008), as ligações de hidrogênio pode causar um elenco considerável de efeitos em sistemas biológicos e estes estudos demandariam mais tempo. Sendo assim, a abordagem dada na região entre os carbonos C-8 e C-11 que justifiquem ligação de hidrogênio, limitou-se apenas a uma análise do potencial eletrostático nos METs 11 e 12.

A figura 51 mostra as diferenças nas curvas de níveis do potencial eletrostático dos METs 11 e 12.



MET11



MET12

Figura 51 - Potencial eletrostático dos metabólicos 3-pentil-8,11-*axial*, *equatorial*-dihidroxi- Δ^9 -THC (MET11) e 3-pentil-8,11-*axial*, *equatorial*-dihidroxi-2'-hidróxi- Δ^9 -THC (MET12).

Percebe-se uma diferenciação nas curvas de níveis em cada metabólito da figura 51. Deve-se considerar que os METs 11 e 12 apresentam psicoatividades moderadas, sendo o MET 12 o mais potente, segundo Grotenhermer (2003). Segundo Reggio et al., (1989) a geometria do anel A não interfere na psicoatividade se o potencial eletrostático não mudar de forma considerável. Ao que parece as psicoatividades devem ser distintas nos METs 11 e 12.

Por ultimo, considerando-se a cadeia pentila da figura 51 para os METs 11 e 12, percebe-se que o arranjo dos átomos de carbonos desta cadeia lateral estão diferentes nos dois metabólitos. No MET 11 a cadeia pentila fica para cima, do mesmo lado do anel A.

No MET 12 a cadeia pentila está direcionada para baixo, contrária ao anel A. Esta diferença só vem corroborar com a sugestão de que as psicoatividades dos dois metabólitos, METs 11 e 12, podem ser distintas e que grupos polares nos carbonos C-8 e C-11 no anel A podem ser o causador desta mudança.

Analisando a cadeia pentila da figura 52, neste caso em duas perspectivas, (I) frontal e (II) com o anel benzopirano no plano (figura 52) e que os valores de LUMO para os isômeros MET 7 e MET 9 diferem substancialmente, sendo -0,865 eV para o MET 7 e -1,816 eV para o MET 9, e considerando ainda que o MET 9 é o metabólito de menor LUMO de toda a série de compostos estudados neste trabalho e que os METs 7 e 9 diferem entre si apenas na posição da dupla ligação presente na cadeia pentil ligada ao anel C, é possível traçar algumas diferenças importantes neste caso. Por exemplo, na perspectiva (II) percebe-se que apenas a presença de uma dupla na cadeia pentil do MET 7(II), causa mudança da geometria se comparada as estruturas dos MET9 (II), figura 52.

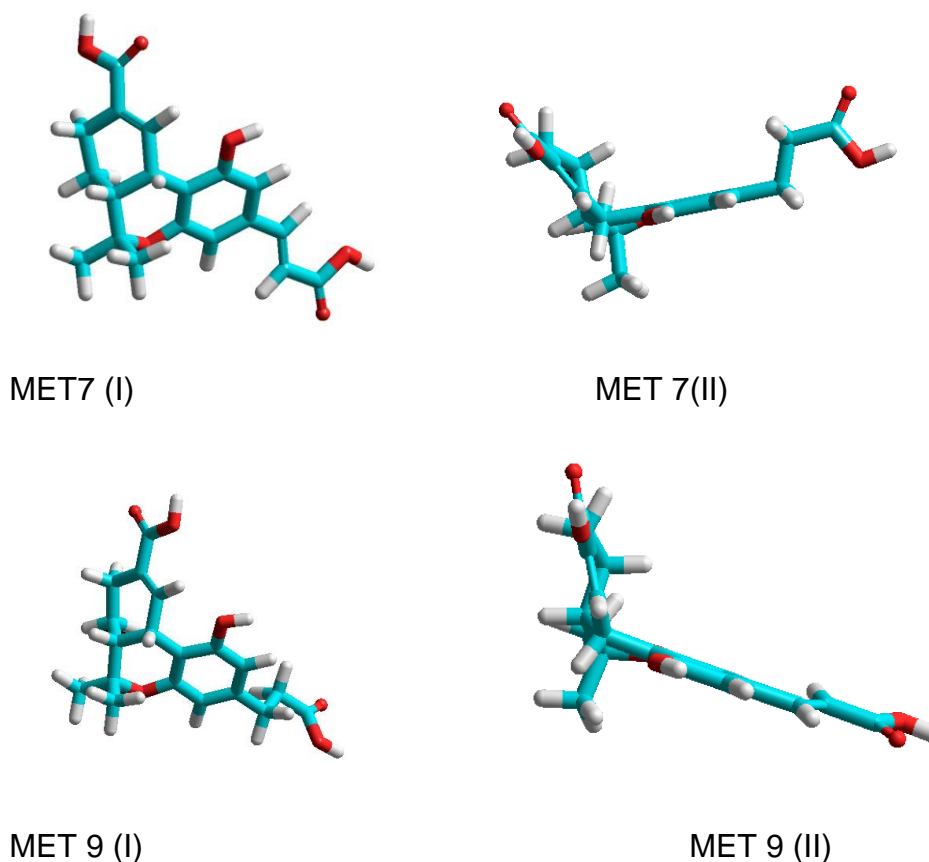
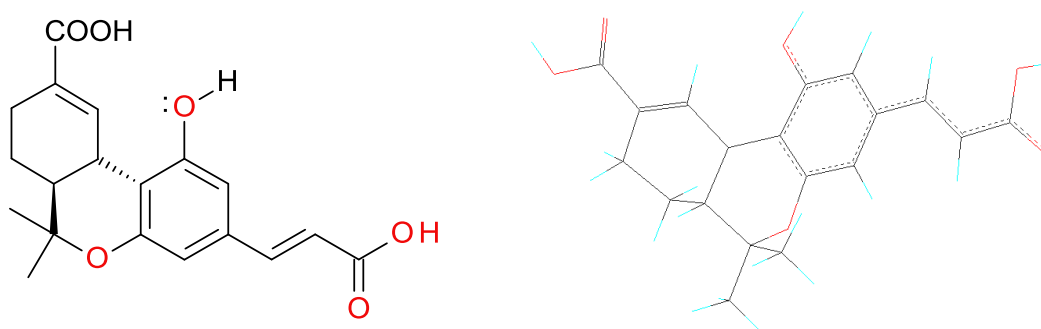


Figura 52 - Geometria dos metabólicos canabinóides 3-(2'-carbóxi-1-etil)-9-carbóxi- Δ 9-THC (MET 7) e 3-(2'-carbóxi-vinil)-9-carbóxi- Δ 9-THC (MET 9)
(I) perspectiva frontal (II) perspectiva no plano.

O metabólito MET 9 apresentou os menores valores de energia do LUMO e dureza, dentre todos os metabólicos estudados. Logo, possui um acentuado caráter elétron-aceptor, e isto, possivelmente, pode ser devido a conjugação da carboxila terminal α,β insaturada ligada ao anel fenólico, causando um delocalização de elétrons numa região específica da molécula, conforme mostra a figura 53. Essa conjugação se comporta como retiradora de elétrons do anel aromático e este efeito reflete nos pares de elétrons não ligantes da OH fenólica, que ficam comprometidos na ressonância, como mostrado na figura 53.



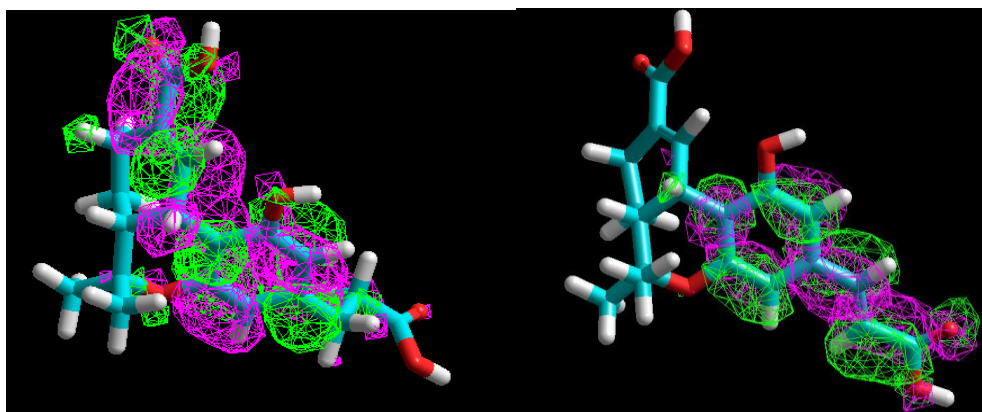
(a) delocalização dos elétrons

(b) intermediário de ressonância

Figura 53 - (a) Delocalização dos elétrons nos metabólicos 3-(2'-carbóxi-vinil)-9-carbóxi- Δ^9 -THC (MET 9). (b) intermediário de ressonância.

A consequência direta desta delocalização é que pelos elétrons estarem mais compactados na conjugação, inclusive os elétrons da OH fenólica, aumenta o caráter aceptor do MET 9, comprovado pela mais baixa energia do LUMO. Sendo assim, este metabólito irá atrair moléculas mais elétron-doadoras para suprir esta necessidade da molécula.

Na figura 54 a seguir estão apresentados os mapas de contribuição do LUMO do MET 7 e MET9.



LUMO MET 7

LUMO MET9

Figura 54 – Orbitais LUMO dos metabólicos canabinóides 3-(2'-carbóxi-1-etil)-9-carbóxi- Δ^9 -THC (MET 7) e 3-(2'-carbóxi-vinil)-9-carbóxi- Δ^9 -THC (MET 9).

Percebe-se na figura 54 que a carboxila em C-11 está mais livre no MET 9, pois as linhas de contorno não estão concentradas nesta região, e se deslocam mais na região entre o anel C e a cadeia lateral pentil. A anergia do LUMO no MET 9 mede -1.816. Se baixas energia de LUMO são características de moléculas electrón-aceptoras, fica claro que o MET 9 é um metabólito aceitador de elétrons, se comparado ao MET 7. Sendo assim, MET 9 pode interagir por processos de transferência de carga.

Este tipo de processo de transferência de carga nos canabinóides também foi sugerido por Honório (2004) e Arroio (2004). O contrário acontece com o MET 30, que possui a maior energia do LUMO dá série (0.391 eV), o que indica um menor caráter electrón-aceitador, a exemplo do THC, que apresentou LUMO (0.358 eV). O MET 30 foi classificado no bloco A1 de psicoativos, pertencente ao bloco do THC, e ao que parece, foi bem classificado.

O MET 9 foi designado no bloco B (psicoativos) e isto pode ter fundamento considerando que, segundo Mechoulam, (1980, 1982) e Reggio et al., (1989), uma quantidade de 3 átomos de carbono na cadeia lateral ligada ao anel C não confere psicoatividade.

Ainda verificando se a dupla ligação na cadeia lateral ligada ao anel C influencia a psicoatividade, resolvemos comparar os METs 24 e 25 que também se diferenciam em relação a dupla ligação, só que neste caso há uma conjugação com

uma carboxila terminal na cadeia lateral ligada ao anel C e isto acarreta acentuada redução na energia do LUMO.

A Figura 55 mostra a geometria dos metabólicos MET 24 e MET 25. A energia do LUMO do MET 24 foi de 0.263 eV e o MET 25 o LUMO mede -1.205, logo, percebe-se que a presença da dupla ligação na cadeia lateral ligada ao anel fenólico interfere bastante no caráter eletrônico da molécula canabinóide. A princípio, o metabólito de maior LUMO seria o mais psicoativo, obedecendo as proposições de Arroio (2004) e Honório (2004). Como não temos as atividades biológicas destes metabólitos conhecida na literatura, achou-se pertinente fazer algumas considerações a respeito da geometria dos METs 24 e 25 pela análise da figura 55.

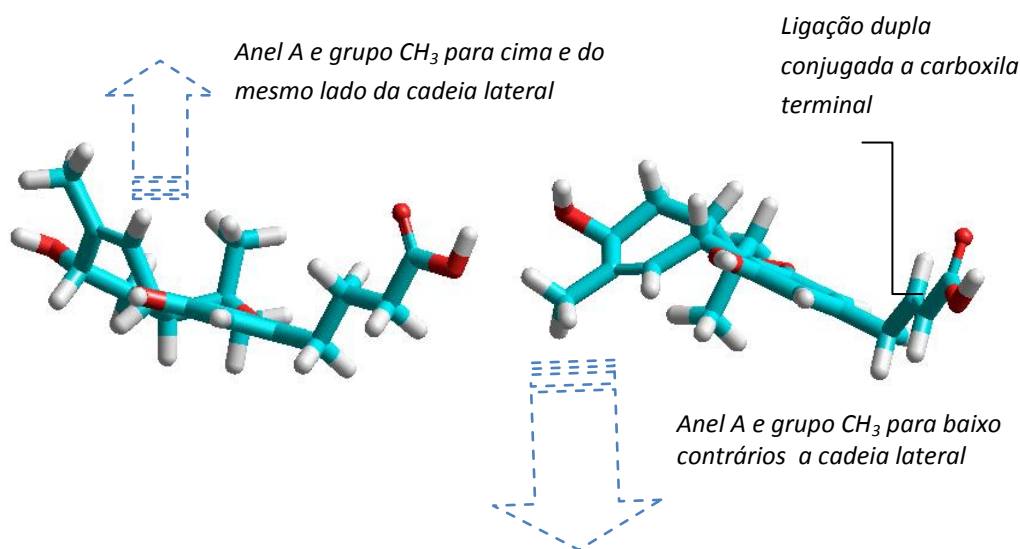


Figura 55 – Geometrias dos metabólitos canabinóides 3-(3'-carbóxi-1-propil)-8-hidróxil- Δ^9 -THC (MET 24) e 3-(3'-carbóxi-2'-propenil)-8-hidróxil- Δ^9 -THC (MET25).

Fica claro que a presença de uma insaturação na cadeia pentil ligada ao anel C interfere diretamente no posicionamento do anel carbonílico A, pois no MET 24 se direcionou para cima, no mesmo sentido do grupo CH_3 e da cadeia lateral, já no MET 25 o anel A se posicionou para baixo, contrário a cadeia lateral ligada ao anel fenólico. Pode-se dizer então que foi acertada a designação do MET 24 como pertencentes ao bloco dos moderadamente psicoativos A2 e o MET 25 ao bloco dos psicoativos B, pois conforme Reggio et al., (1989), a mudança da geometria do anel A causa mudança na psicoatividade.

Este efeito reflete diretamente no encaixe do receptor biológico com o canabinóide e este fato se mostrou importante para esclarecer que a polaridade e dispersão de carga causada pela presença de substituintes na cadeia lateral ligada ao anel C, interferem no caráter elétron-aceptor e elétron-doador dos canabinóides.

Finalmente, é oportuno lembrar que os derivados carboxílicos 11-COOH-THC (METs 1-9, METs 17-18, METs 20-23 e METs 25-26) apresentaram valores negativos para as energias do LUMO (ver tabela 6). A classificação dada neste trabalho de psicoativos aos metabólicos 11-COOH pertencentes ao bloco B concorda com os estudos de Honório e Da silva (2003), ao considerar que energias dos orbitais LUMO são baixas para compostos canabinóides psicoativos.

O esclarecimento acerca dos derivados 11-COOH de certa forma contribui para o planejamento de fármacos derivados de canabinóides se tomar como exemplo o ácido ajulênico (AJA) (figura 56), um potente analgésico e antiinflamatório análogo sintético derivado do metabólito psicoativo 11-COOH-THC, segundo Burstein (2007).

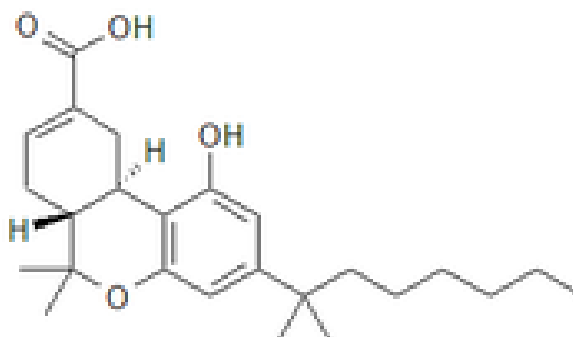


Figura 56 - O ácido Ajulênico (AJA) um potente analgésico e antiinflamatório sintético.

Como considerações finais têm-se que as reações de hidroxilações e oxidações no anel ABC dos canabinóides e reduções formando insaturações na cadeia lateral e em alguns casos epóxidos, podem levar a metabólicos mais polares, assunto tratado por Pertwee (2005) e o esclarecimento acerca destes metabólitos podem trazer valorosas contribuições ao estudo dos canabinóides.

Segundo Grotenhermer (2003), são mais de 100 metabólicos de canabinóides que incluem aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos que já foram identificados. As implicações destas reações e os efeitos estéreos eletrônicos na cadeia dos

canabinóides e sua influência no potencial psicoativo são, com certeza, interessantes para serem explorados e proporcionarem maiores esclarecimentos acerca dos canabinóides.

A investigação a respeito do potencial terapêutico dos metabólicos canabinóides se fundamentadas no caráter eletrônico e de polaridade, certamente, levará à compreensão do comportamento dos compostos canabinóides com seus respectivos receptores no cérebro, este entendimento é de caráter relevante na tentativa de propor canabinóides mais potentes e menos psicoativos, o que torna o estudo dos metabólicos canabinóides de certa forma, promissor e até fascinante.

As relações estabelecidas entre a estrutura e atividade aos canabinóides possibilitam aos pesquisadores da área propor moléculas potencialmente ativas tornando-as candidatas a sínteses e avaliações biológicas e farmacológicas.

7. CONCLUSÕES

Os métodos de mecânica molecular, semi-empírico do tipo AM1 e os cálculos de DFT foram usados para obter geometrias otimizadas preliminares de 30 metabólitos canabinóides. As geometrias finais, os valores das energias e as propriedades relacionadas foram obtidos pelo método DFT/B3LYP com função das bases 6-31G*.

Os descritores eletrônicos, estéreos geométricos e farmacocinéticos selecionados foram tratados com diferentes métodos quimiométricos para análise multivariada, utilizando as técnicas de PCA, HCA, K-MEANS, KNN e métodos de inteligência artificial utilizando redes neurais (RNAs), a fim de classificar os derivados canabinóides pelo potencial de psicoatividade.

Pode-se concluir que, a partir dos resultados fornecidos pelas técnicas quimiométricas e especialmente por redes neurais artificiais, que fornecem um satisfatório grau de acerto em relação as outras técnicas empregadas, o conjunto de variáveis selecionado discrimina o potencial de psicoatividade nos metabólicos canabinóides estudados.

Primeiramente foram selecionados 06 descritores dentre os 17 iniciais, porém as similaridades entre os pares dos descritores do conjunto de seis permitiu sugerir um segundo conjunto final de 3 descritores para compor o modelo de correlação estrutura *versus* psicoatividade. Os descritores escolhidos são: Energia do orbital mais baixo desocupado (E_{LUMO}), Logaritmo do coeficiente de partição (Log P) e Ângulo diedral em torno da OH fenólica (T2). Este novo conjunto de descritores pertence a três classes distintas de variáveis: eletrônicas (E_{LUMO}), hidrofóbicas (Log P) e estéreo geométricas (T2). Estas variáveis foram os parâmetros utilizados para a construção de um modelo consistente de QSAR que permitiu a discriminação entre psicoatividade e psicoinatividade para os metabólicos canabinóides e classificou os compostos em três grupos distintos: psicoativos, moderadamente psicoativos e psicoinativos.

A primeira componente principal (PC1) é a responsável pela separação entre metabólicos psicoativos e psicoinativos. Os metabólicos que caem em PC1 negativa devem, a princípio, apresentar psicoatividade.

As equações para o PCA sugerem que a variável eletrônica relacionada ao orbital de fronteira LUMO permite boa separação dos compostos canabinóides e influenciam fortemente o sinal das PCs.

Das equações 40 e 41 propostas neste trabalho, pode-se também concluir que os valores elevados do Log P proporcionam PC1 e PC2 negativas e este descritor permite separar os metabólicos em função do potencial psicoativo.

Pode-se ainda dizer que as três variáveis (E_{LUMO} , Log P e T2), multiplicadas por seus respectivos coeficientes da equação 40, determinam a presença ou ausência de psicoatividade em metabólicos canabinóides.

Uma análise sobre as três variáveis permitiu concluir que, em relação ao efeito de lipossolubilidade, os valores de Log P permitem separar os canabinóides pelo potencial psicoativo, pois altos Log P indicam maiores psicoatividade e baixos Log P indicam baixas psicoatividade. O Log P está intimamente relacionado ao transporte de um fármaco na fase orgânica e aquosa. Isto indica que o transporte dos canabinóides até as proximidades dos receptores é um importante fator a ser levado em consideração nos estudos de SAR e QSAR nestes compostos.

Segundo Honório e Da Silva (2003), canabinóides com energia de LUMO baixas (em torno de zero e negativas) podem ser classificados como elétron-aceptores, sendo assim, podem interagir com receptores elétron-doadores por um processo de transferência de carga. No caso dos metabólicos canabinóides, este fato foi comprovado ao realizar um estudo descritivo nas geometrias das moléculas de onde se conclui que a polaridade e dispersão de carga em posições estratégicas nos anéis ABC e substituições na cadeia lateral afetam os valores de E_{LUMO} e, conseqüentemente, interferem no caráter elétron-aceitador dos canabinóides. Sendo assim, os metabólicos também podem interagir por processos de transferência de carga.

O ângulo diedral que descreve a rotação da OH fenólica, representado por valores de T2, é um parâmetro importante para descrever a psicoatividade dos canabinóides e sofre a influência dos substituintes na posição C-1 presente no anel carbocíclico A.

Resumindo, a intensidade da psicoatividade depende de fatores estéreos geométricos e de solubilidade. Sendo assim, dependem de como se locomovem nas membranas e do tamanho da molécula.

A sustentação para confirmar nossos resultados teóricos foi obtida pelas evidências experimentais encontradas em canabinóides de reconhecida atividade, citadas na literatura pelos autores Pertwee (2005), Honório (2004), Arroio (2004), Matsunaga et al. (2001) e Mechoulam e Hanu (2001).

Foram realizados estudos com derivados COOH-THC, e OH-THC de onde se conclui que quase todos os derivados canabinóides carboxílicos (COOH- Δ^9 -THC) caem no mesmo bloco do (MET1), o principal metabólito psicofarmacologicamente inativo e o modelo proposto neste trabalho também confirma o comportamento para os METs 2 e 3, metabólicos que apresentaram psicoinatividade comprovada e cai no mesmo bloco dos COOH-THC.

A este respeito deve-se levar em consideração que interações dos grupos no carbono C-9 que sofram influências de outros substituintes nas outras posições do anel carbocíclico, principalmente em C-8 e C-10, causam mudanças nas energias do LUMO. Logo, o caráter elétron-aceitador das moléculas canabinóides como um todo é comprometido e pode interferir na psicoatividade. A influência eletrônica também se estende até a cadeia lateral pentila ligada ao anel fenólico C, principalmente quando há insaturações que causam conjugação ao anel.

Utilizando os modelos obtidos pelos métodos PCA, HCA, K-MEANS, KNN e RNAs para o conjunto de 30 metabólicos canabinóides, realizou-se uma etapa de validação do modelo proposto pelo estudo de previsão de psicoatividade para um novo conjunto de 22 compostos de comprovada psicoatividade para validar os resultados.

Com relação às variáveis na etapa de validação, conclui-se que tanto no conjunto de treinamento, como no conjunto de predição, mesmo que separadamente, o modelo consegue descrever a psicoatividade pelos descritores Log P, T2 e E_{LUMO} . Os psicoativos A1 e A2 caem em PC1 negativa, mostrados na figura 39, que comparado ao gráfico dos "loadings" da figura 40, está descrita em altos E_{LUMO} e T2. Resumindo, altos valores de E_{LUMO} são típicos do canabinóides psicoativos no conjunto de treinamento e este mesmo comportamento se manteve na etapa de validação.

O diedro T2, no modelo do conjunto de treinamento, descreve eficientemente canabinóides psicoativos e psicoinativos e consegue separar os canabinóides do conjunto de predição em função dos substituintes em C-2 e C-4. Substituições em C-2 sofrem mais o efeito do diedro T2 do que em C-4.

Concluiu-se que o modelo proposto neste trabalho pode ser eficientemente utilizado para separar os compostos do conjunto de treinamento quando se quer diferenciar em relação às substituições em C-2 e C-4 e a variável que permite esta diferenciação é o diedro T2 que define a rotação da OH fenólica e descreve parâmetros estéreo e geométricos e está relacionada à topologia das moléculas canabinóides.

Sendo assim, as análises PCA e HCA para os 53 canabinóides permitiram a confirmação de que o conjunto de treinamento (METs 1-30) foi satisfatoriamente classificado pelos descritores E_{LUMO} , Log P e T2 e correspondem aos mesmos comportamentos para o conjunto de predição estudado por Honório (2004) quando não há substituições em C-2 ou C-4 do anel fenólico.

Finalmente, um estudo descritivo nas geometrias dos canabinóides metabólicos permitiu algumas implicações acerca das interações eletrostáticas e polares dos diversos grupos substituintes na cadeia canabinóides e suas influências, e algumas delas são:

(1) Grupos em C-9 em posições *equatoriais* e *axiais*, quando interagem com outros grupos polares na cadeia canabinóides, podem mudar o direcionamento dos pares de elétrons da OH em C-1 e afetar o ângulo torcional, acarretando perda da psicoatividade.

(2) A geometria *equatorial* para o anel A em relação ao anel benzopirano BC é um fator limitante para separar compostos psicoativos e psicoinativos.

(3) A direção do anel A para baixo e *equatorial* (como no caso do THC, o canabinóide mais psicoativo) confere a psicoatividade. A psicoatividade acontece quando a posição do anel A é *axial* (como no caso do canabinóide mais psicoativo, o MET1). Conclui-se que a posição deste anel é fator limitante na psicoatividade.

(4) As hidroxilações na posição C-11 são as reações mais importantes para o metabolismo canabinóide na maioria das espécies, segundo Pertwee (2005). O 11-OH-THC é mais polar e tem uma atividade farmacológica aumentada em relação ao THC. Verificou-se que substituições OH em C-11, quando estão nas posições *axiais* e *equatoriais*, interferem no caráter elétron-aceptor dos metabólitos canabinóides. Isto sugere que estes grupos em C-11 mudam o direcionamento da interação molécula-receptor, sendo fator importante para descreve o potencial psicoativo.

8. PROPOSTAS DE TRABALHOS FUTUROS

Pretende-se realizar um planejamento racional e propor canabinóides sintéticos potencialmente bioativos e de baixa psicoatividade em função dos resultados obtidos no trabalho em epígrafe.

O potencial eletrostático molecular é um determinante importante da ação biológica de uma substância no organismo e pode auxiliar no esclarecimento da reatividade molecular. O campo do potencial eletrostático estende-se no espaço e nas influências das moléculas próximas. Certamente, forças eletrostáticas parecem guiar uma molécula até o compartimento do receptor biológico e alinhá-la de modo mais energeticamente favorável. Conseqüentemente, um estudo da natureza eletrostática da extensão de interações molécula-receptor pode ser obtido traçando o potencial gerado por uma molécula. Assim, realizar um estudo mais particularizado utilizando propriedades estruturais, análises conformacionais e cálculos de potencial eletrostático das moléculas canabinóides e calores de formação proporcionará um entendimento acerca da interação eletrônica dos canabinóides aos seus receptores CB1 e CB2.

A otimização da energia pode localizar as conformações de energia mínima, mas não pode ser usada para explorar todo o espaço configuracional. Uma molécula biológica possui muitos mínimos, que podem variar em função do número de torções, estiramentos e deformações em perturbações em geral de todos os ângulos e distâncias. Os mínimos locais tem valores muito próximos e a molécula estará em um destes mínimos quando nenhuma força agir mais em nenhum átomo. Esta tarefa pode levar um enorme tempo de máquina e ser inviável. Sendo assim, outra proposta de trabalhos futuros é calcular freqüências dos modos normais de vibração ao nível B3LYP/6-31G**, para se possível encontrar estados estacionários.

Por ultimo, outra proposta de trabalhos futuros é desenvolver estudos mais avançados nas conformações, ligação de hidrogênio, transferência de carga, atividade biológica e interação com receptores CB1 e CB2 em canabinóides, e se oportuno, estender estas pesquisas para outras classes de compostos, receptores biológicos e moléculas bioativas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS R., HARFENIST M. LOEWE S., (1949). New analogs of THC, Part XIX, *Journal of the American Chemical Society*, 71, 1624–1628

ALGER B.E. (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Progress in Neurobiology*, 68, (4), 247-286.

ALKORTA I., VILLAR H.O., (1992). Quantum Mechanical Parametrizations for a conformationally dependent hydrofobic index. *Int. j. Quantum. Chem.*, 44, 203-218.

ALLINGER N.L., CAVA M.P., JONGH D.C., JONHSON C.R., LEBEL, N.A., STEVENS, C.L. Química Orgânica, Guanabara Dois: Rio de Janeiro, 1978.

ALLINGER N.L., (1977). Conformational Analysis 130. MM2. A Hydrocarbon Force Field Utilizing V1 and V2 Torsional Terms. *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 8127-8134.

ALLINGER N.L., ZHU Z.Q.S., CHEN K., (1992). Molecular mechanics (MM3) studies of carboxylic acids and esters. *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 6120–6133.

ALMEIDA P.P., NOVAES M.A.F.P., BRESSAN R.A., LACERDA A.L.T., (2008) Revisão: funcionamento executivo e uso de maconha. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, 30 (1), 69-76.

AMERI A., (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobiol.* 58, 4, 315.

ARAUJO M.P.R., Transtorno de pânico em dependentes de substâncias psicoativas alcoólicas e não alcoólicas. 2004. Tese Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 198p.

ARROIO, A., Um estudo teórico da atividade analgésica de compostos da planta cannabis sativa. 2004., Tese doutorado, Universidade de São Paulo/São Carlos, 141p.

ASHTON J.C., GLASS M., (2007). The Cannabinoid CB2 Receptor as a Target for Inflammation-Dependent Neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol.* 5(2), 73–80.

ATKINS P.W., JONES L., Princípios de Química, Porto Alegre, Bookman, 2001.

AZEVEDO R.C.S., Usuários de cocaína e aids: um estudo sobre comportamentos de risco. 2000. Tese Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. 192p.

BAKER D., PRYCE G., GIOVANNONI G.E., THOMPSON A.J., (2003). The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurol.*, 2, 5, 291-298.

BAMBICO F.R., KATZ N., DEBONNEL G., GOBBI G., (2007). Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex. *J. Neurosci.*, 27, 11700-11711.

BARNES M.P., (2006). Sativex: clinical efficacy and tolerability in the treatment of symptoms of multiple sclerosis and neuropathic pain. *Expert Opin Pharmacother*, 7, 5, 607.

BARREIRO E.J., FRAGA C.A.M., (2001). Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos, Artmed: Porto Alegre.

BATKAI S., JARAI Z., WAGNER J.A., et al. (2001). Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nat Med*, 7, 827-32.

BAYEWITCH M. et al., (1996). Δ^9 -Tetrahydrocannabinol antagonizes the peripheral cannabinoid receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.*, 271, 9902–9905.

BEAR M.F., CONNORS P.W., PARADISO M.A., (2002), Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. 2ª Edição, ArtMed, Porto Alegre,

BEEBE K.R.; PELL R.J. SEASHOLTZ M.B., (1998). Chemometrics: a practical Guide. New York, John Wiley & Sons, 257.

BECKE A.D., (1988). Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A*, 38, 3098.

BENET L.Z., KROETZ D.L., SHEINER L.B. Farmacocinética: a dinâmica da absorção, da distribuição e eliminação das drogas. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD,

MOLINOFF L.E., RUDDON P.B., *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9.^a ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 1996.

BENITO C., TOLÓN R.M., PAZOS et al., (2008). Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation, *British Journal of Pharmacology* 153, 277–285.

BINGHAM R.C., DEWAR M.J.S., LO D.H., (1975). *J. Am. Chem. Soc.* 97, 1285.

BLOCK R. I., GHONEIM M. M., (1993). *Psychopharmacology*. 100, (1-2), 219.

BGCI 2008 (Botanic Garden Conservation International)

<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> pagina visitada em 30/09/2008.

BORN M., OPPENHEIMERR., (1927). *Ann. Der. Phys.*, 84, 457.

BONFÁ L.; VINAGRE, R.C.O.; FIGUEIREDO, N.V., (2008). Uso de Canabinóides na Dor Crônica e em Cuidados Paliativos, *Rev. Bras. Anestesiol.*, 58, 3 Campinas.

OLIVEIRA B.G., DE ARAÚJO R.C.M.U., (2007). Relação entre transferência de carga e as interações intermoleculares em complexos de hidrogênio heterocíclicos *Quím. Nova*, 30.4.

BRITO R.G. Papel dos receptores canabinóides em um modelo experimental de angiogênese inflamatória, (2007) 105 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas.

BROOKS B.R., BRUCCOLERI R.E., OLAFSON B.D., et al., (1983): A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comp. Chem.* 4, 187-217.

BROWN A.J., (2007). Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol.*, 152, 5, 567-75.

BRUNS R.E., FAIGLE J.F.G., (1985). Quimiometria. *Quim. Nova*, 4, 84-89.

BURNS T.L., INECK J.R., (2006) Cannabinoid analgesia as a potential new therapeutic option in the treatment of chronic pain, *Ann Pharmacother*, 40(2), 251-60.

BURSTEIN S.H., FRIDERICHS E., KOGEL B., SCHNEIDER J., SELVE N., (1998) Analgesic effects of 1',1' dimethylheptyl- Δ^8 -THC-11-oic acid (CT3) in mice; *Life Sciences*, 63(3), 161-168.

BURSTEIN S.H., (2007). In humans, Ajulemic Acid has a more favorable side effect profile than THC for the treatment of chronic neuropathic pain. *Cannabinoids*, 2,1-2.

BURKERT U., ALLINGER N.L., (1982). Molecular Mechanics, American Chemical Society, Washington, DC.

BUSSAB W.O., MIAZAQUI E.S., ANDRADE D.F., (1990). Introdução à análise de agrupamentos. Associação Brasileira de Estatística, 9º Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística. São Paulo.

BUSTAMANTE P., ESCALERA B., MARTIN A., SELLES E., (1989); *J. Pharm. Sci.*, 78, 567.

Cabral, G., D. Dove Pettit., (1998). Drugs and immunity: cannabinoids and their role in decreased resistance to infectious diseases. *J. Neuroimmunol.* 83:116-123.

CAMMARATA A., YAU S. J., ROGERS K. S., (1971). *J. Med. Chem.*, 14, 1211.

CAMPOS D.R., YONAMINE M., MOREAU R.L.M., (2003). Marijuana as doping in sports. *Sport Med.*, Baltimore, 33, 6, 395-399.

CARLINI E.A. et al., (1981) "Hipnótica e Antiépiléptica Efeitos da Cannabidiol," *J. Clin. Pharmacol.*, 21, 417-427.

CARLINI E.A., et al., (2001). Drogas Psicotrópicas: o que são e como agem, *IMESC*, 3, 9-35.

CARLINI E.A., GALDURÓZ J.C., NOTO A.R., et al., II levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país em 2005. São Paulo: Páginas & Letras, 2007. v. 01. 472 p.

CARLINI E.A., RODRIGUES E., GALDURÓZ J.C.E. Simpósio Cannabis sativa L. e substâncias canabinóides em medicina. CEBRID, São Paulo, 2005.

CARNEIRO H., (2002), Amores e sonhos da flora: afrodisíacos e alucinógenos na botânica e na farmácia. 1. ed. São Paulo: Xamã Editora, 1. 240 p.

CARVALHO I., et al., (2004). Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. *Quím. Nova* 27(4), 428-438

COLLANDER R. The partition of organic compounds between higher alcohols and water. *Acta Chem. Scand.* 1951, 5, 774-780.

CORBETT C., E. Farmacodinâmica, 6a ed., Rio de Janeiro (RJ). Guanabara Koogan, 1982.

CERRO J.C., Cannabis (II): Dependência. Eds., Drogodependencias. Madrid. Editorial Panamericana, 1998. 444p.

CEBRID 2005. <http://200.144.91.102/cebridweb/conteudo.aspx?cd=651> pagina visitada em 13 novembro 2008.

CHARTON M., CHARTON B. I., (1979). *J. Org. Chem.*, 44, 228.

CHALSMA A.L., BOYURN D. Marijuana Situation Assesment. Washington D.C.: Office of National Drug Control Policy. 1994.

CHUANG Y.Y., CRAMER C.J., TRUHLAR D.G., The interface of electronic structure and dynamics for reactions in solution, *Int. J. Quantum Chem.* 1998, 70, 887.

COELHO L., W., et. al. (1999). Aplicação de mecânica molecular em química inorgânica, *Quím. Nova*, 22, 3, 1999.

COMPTON D.R., DEWEY W.L., MARTIN B.R., (1990). Cannabis dependence and tolerance production. *Adv Alcohol Subst Abuse.* 9, (1-2), 129-47.

CONCEPCIÓN M.R., (2006). Early Steps in Isoprenoid Biosynthesis: Multilevel Regulation of the Supply of Common Precursors in Plant Cells. *Phytochemistry Reviews.* 5, (1), 61-15.

COOK C.E., SELTZMAN H.H., SCHINDLER V.H., et al., Radioimmunoassays for Cannabinoids. Analysis of Cannabinoids, Research Monograph 42, R. Hawks. Editor National Institute on Drug Abuse, 1982.

COOK C.E., SELTZMAN H.H., SCHINDLER V.H., et al., Radioimmunoassays for Cannabinoids. Analysis of Cannabinoids, Research Monograph 42, R. Hawks. Editor National Institute on Drug Abuse, 1982

CORMARCK R., (1971). A review of classification. *Journal of the Royal Statistical Society (Series A)*, 134, 321-367.

CORREIA P.R.M., FERREIRA M.M.C., (2007). Non-supervised pattern recognition methods: Exploring. *Quim. Nova*, 30(2), 481-487.

COSTA J.A.F., NETTO M.L.A., (2007). Segmentação de mapas auto-organizáveis com espaço de saída 3-D, *Revista Controle & Automação*, 18 (2), 150.

CRIPPA J.A.S., et. al., (2005). Efeitos Cerebrais da Maconha - Achados de Neuroimagem. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, São Paulo, 27(1), 70-78.

CRUM-BROWN A., FRAZER T.R., (1868). On the connection between chemical constitution and physiological action. Part 1. *Trans. Roy. Soc. Edinburgh*, 9, 25,151.

CUNHA A.R., LAMY M.T., COUTINHO K., Estudo do Campo de Força para a Emodina. IV Escola de modelagem molecular em sistemas biológicos. Laboratório Nacional de Computação Científica, Outubro de 2008.

CYBENKO G. (1989). Approximation by Superpositions of a Sigmoidal Function. *Math. Control Signal Systems*, 304-314.

DA SILVA A.B.F., TRSIC M. (1995). Theoretical and conformational studies of a series of cannabinoids. *Journal of Molecular Structure*. 356, 247.

DE MEDICIS E., TETRAUT J.P., (2007). Cannabinoids for postoperative analgesia, *Canadian Journal of Anesthesia*. 54(02), 155.

DELAY J: Les Avant Mémoires. Paris, Editions Gallimard, 1979

DESAI A.K, GROSSBERG G.T., (2005). Diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Neurology*, 64 (3), 34–39.

DEVANE W.A, BREUER A., SHESKIN T., JÄRBE T.U., EISEN M.S., MECHOULAM R., (1992). "A novel probe for the cannabinoid receptor". *J. Med. Chem.* 35 (11), 2065-9.

DEVANE W.A., DYSARZ F.A., JOHNSON M.R., MELVIN L.S. e HOWLETT A.C., (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*, 34, 605-13.

DEWAR M.J., HASELBACH S., (1970), Ground states of sigma-bonded molecules. IX.The MINDO/2 method, *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 590.

DEWAR M.J.S, THIEL W., (1977) Ground states of molecules. 38. The MNDO method. approximations and parameters., *J Am. Chem. Soc.*, 99, 4899.

DEWAR M.J.S., ZOEBISCH, E.G., HEALY, E.F., STEWART, J.J.P., (1985). A new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 3902.

DI CHIARA G. (1997). Alcohol and dopamine: Alcohol world and health research. 21, 108-113.

DI MARZO V., BIFULCO, M., DE PETROCELLIS L. (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Nature Reviews Drug Discovery* 3, 771-784.

DI MARZO V. (2008); Endocannabinoids: synthesis and degradation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.*,160,1-24p.

DOMINE D.; DEVILLERS J.; CCASTRETTE M., (1994). A nonlinear map of substituent constants for selecting test series and deriving structure-activity relationships. 2. Aliphatic series. *J. Med. Chem.*, 37, 973- 981.

DRUMMER O.H., ODELL M. (2001).The forensic pharmacology of drugs of abuse. London: Arnold, 462.

DUARTE H.,(2001). índices de reatividade química a partir da teoria do funcional de densidade: formalismo e perspectivas, *Quím. Nova*,24(4), 501.

DUNN W.J. (1977). Molar Refractivity as an independent variable in quantitative structure-activity studies. *Eur. J. Med. Chem.*,12, 109.

DYCK E. (2005). Flashback: Psychiatric Experimentation with LSD in Historical Perspective. *Can. J. Psychiatry*, 50, 381-388.

EISBERG R., RESNICK R. Física Quântica, Editora Campus, 1994.

EYRING H., POLANYI M., (1931). Z. The development of Transition-State *Phys. Chem. Abt. B* 12, 279.

FDA 2008. www.fda.gov, pagina visitada em julho 2008

FELDER C.C, JOYCE K.E, BRILEY E.M, et. al., (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Mol Pharmacol.* 48, 443-450.

FELLERMEIER M., EISENREICH W., BACHER A., ZENK M., (2004). Biosynthesis of cannabinoids. *European Journal of Biochemistry*, 268, 6, 1596 – 1604.

FERMI E. (1927). "Un Metodo Statistico per la Determinazione di alcune Priorieta dell'Atome". *Rend. Accad. Naz. Lincei* 6: 602–607.

FERREIRA M.M.C., ANTUNES A.M., MELO M.S., VOLPE P.L.O., (1999). Quimiometria I: Calibração Multivariada - Um Tutorial". *Quim. Nova*, 22, 724.

FERREIRA M.M.C., (2002). Multivariate QSAR., *Braz. J. Chem. Soc.*,13(6), 742-53.

FICHERA M., CRUCIANI G., BIANCHI A., MUSUMARRA G., (2000). A 3D-QSAR study on the structural .., *Journal of Medicinal Chemistry*. 43, (12), 2300 – 2309.

FIORE M., (2005). A medicalização da questão do uso de drogas no Brasil: reflexões acerca de debates institucionais e jurídicos. In: Venâncio, Renato P.; Carneiro, Henrique (Org.). *Álcool e drogas na História do Brasil*. São Paulo: Alameda, 257-290.

FORMUKONG EA, EVANS AT, EVANS FJ, (1988). Analgesic and Antiinflammatory activity of constituents of Cannabis sativa L., *Inflammation*, 12, 4, 361- 371.

FRANCISCHETTI E.A, DE ABREU V.G, (2006).O sistema endocanabinóide: nova perspectiva no controle de fatores de risco cardiometabólico, *Arq. Bras. Cardiol.*, 87,4.

FRANCO L.M., FRANCO Y.O., (2003), Biotransformation: importance and toxicity, *Saúde Rev.*, 5(9), 69-76.

FRASER A.D, WORTH D., (2004). Urinary excretion profiles of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -THC- COOH, *Forensic Sci Int.*, 143(2-3), 147.

FREE S.M Jr., WILSON J.W, (1964). A Mathematical contribution to structure-activity studies., *J. Med. Chem.*, 7, 395.

FROSCH M.S., VON F.J., BRO R., (2005). Robust methods for multivariate data analysis. *Journal of Chemometrics*, 19(10), 549.

GARCIA A., BORCHARDT D., CHANG C.A., MARSELLA M.J, (2009). Thermal Isomerization of Cannabinoid Analogues. *J. Am. Chem. Soc.*, 131 (46), 16640–16641 pp.

GAONI & MECOULAM (1966). Teach methods of converting CBD to, among other compounds, .DELTA8-THC and .DELTA9-THC. *Tetrahedron* 22: 1481-1488p.

GAONI Y., MECOULAM R. (1964). Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.*, 86,1646–1647.

GERTSCH J., et al, (2008). Anti-inflammatory compound from cannabis found in herbs.<http://www.rsc.org/chemistryworld/News/2008/June/24060801.asp>. Acesso em 16/11/2008.

GERARD C.M., MOLLEREAU C., VASSART G., PARMENTIER M. (1991). Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *J. Biochem.*, 279 (1), 129-34.

GILL E.W., (1976). The effects of cannabinoids and other CNS depressants on cell membrane models. *Ann N Y Acad Sci*, 281, 151-61.

GODOY-MATOS A.FO. sistema canabinóide. In: Godoy- Matos AF, editor. Síndrome metabólica. São Paulo: Atheneu, (2005).

GONG JP; ONAIVI, ES; ISHIGURO, H., et al., (2006). Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.*,1071,10–23.

GONZALEZ S; CEBEIRA M, FERNANDEZ-RUIZ J (2005) Cannabinoid tolerance and dependence: A review of studies in laboratory animals. *Pharmacol Biochem Behav*, 23. 81: 300–318

GRAEFF F.G., Drogas psicotrópicas e seu modo de ação. 2.ed. rev. e amp. São Paulo: EPU, 1989.

GRAHAM A.W., SCHULTZ T.K., WILFORD B.B., (1998). Principles of Addiction Medicine, 2nd Edition, Chevy Chase, MD: *American Society of Addiction Medicine, Inc.*

GRANT G.H., RICHARDS W. H.; Computational Chemistry, Oxford University Press 1995.

GRIFFIN G., FERNANDO S.R., ROSS R.A., et al. (1997). Evidence for the presence of CB2-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals. *Eur. J. Pharmacol.*, 339, 53-61.

GROTENHERMEN F., (2003). **Pharmacokinetics** and pharmacodynamics of cannabinoids, *Clin Pharmacokinet.* 42(4), 327.

GUIMARAES F.S., et al., (2008). A. Activation of CB1 cannabinoid receptors in the dorsolateral periaqueductal gray reduces the expression of contextual fear conditioning. *Psychopharmacology*, v. 198, p. 405-411.

GHOSE, AK; CRIPPEN, GM. (1987). Atomic physicochemical parameters for three-dimensional-structure-directed quantitative structure-activity relationships. Modeling dispersive and hydrophobic interactions. *J Comput Sci.* 27, 21–35.

GONÇALVES M M; FRACETO L F; VILA M M D C; (2006) Oliveira R V M, Polarizabilidade atômica efetiva α_d pode ditar a ionização de radioligantes $^{99}\text{Tc}^m$ - diaminoditiol alquilamínicos? *Quím. Nova*, 29(5), 1072-1077

GUZMAN M., (2003). Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer*, 3(10): 745-55.

HAIR J. et al. *Análise Multivariada de Dados*. 5ª ed. Porto Alegre, Bookman, 2005.

HALL A., (2007). *Entheogens and the Origins of Religion*, 557.

HAMMOND C.T. AND P.G. MAHLBERG, (1994). Phloroglucinol glucoside as a natural constituent of *Cannabis sativa*. *Phytochemistry* 37: 755-756.

HAMPSON A.J., GRIMALDI M., LOLIC M., WINK D.R., (2000). Neuroprotective Antioxidants from Marijuana. *Annals of the New York Academy of Sciences, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 899, 274-82.

HANSCH C., LEO A., HOEKMAN D. *Exploring QSAR: hydrophobic, electronic and steric constants*, ACS: Washington, 1995.

HANUS L., ABU-LAFI S., FRIDE E., et al., (2001). 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3662-5.

HARTREE D. R., (1927). *Proc. Camb. Phil. Soc.*, , 24, 111.

HAYKYN S. *Redes neurais: princípios e práticas*. Porto Alegre, Bookman, 2001.

HEBB D.O. *Organization of Behavior*. New York: Wiley, 1949, pp. 335

HEISHMAN S.J., ARASTEH K.M., STITZER M.L., (1997). Comparative effects of alcohol and marijuana on mood, memory, and performance, *Pharmacol Biochem Behav.*, 58(1), 93.

HELGAKER T., *Quantum chemistry and molecular properties*, summer school, Oslo, 1990.

HERKENHAM M., LYNN A.B., LITTLE M.D., et. al. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 1932-6.

HILLIG K.W., MAHLBERG P.I.G., (2004). A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (Cannabaceae). *American Journal of Botany* 91(6), 966-975.

HILLIG K.W., (2005) Genetic evidence for speciation in Cannabis (Cannabaceae). *Genetic Resources and Crop. Evolution*, 52, 161-180.

HILEY C.R., FORD W.R. (2004). Cannabinoid pharmacology in the cardiovascular system: potential protective mechanisms through lipid signaling. *Biol. Rev.* 79, 187-205.

HOFMANN A., (1981). LSD, My Problem Child. McGraw-Hill. 1980. p.

HOHENBERG P., KOHN W. (1964). Inhomogeneous electron gas. *Physical Review*, v. 136, n. 3B, p. B864-B871.

HONÓRIO K.M., ARROIO A., DA SILVA A. B. F. (2006). Therapeutical aspects of compounds of the plant Cannabis sativa, *Química. Nova*, 29 (2), 318-325.

HONÓRIO K.M. Um estudo sobre o planejamento racional de compostos canabinóides psicoativos. São Carlos, (2004). Tese Doutorado 2004, Universidade de São Paulo/São Carlos, 135p.

HONÓRIO K.M., DA SILVA A.B.F. (2002). A theoretical study on the influence of the frontier orbitals HOMO and LUMO and the size of C4 and C2 substituents in the psychoactivity of cannabinoid compounds. *Journal of Molecular Structure*. 578, 111.

HONÓRIO K.M., FREITAS L.G., TRSIC M., DA SILVA A.B.F., (2001). A quantum chemical study on the psychoactivity of cannabinoid compounds. *Journal of Molecular Structure*. 538, 99.

HOPFIELD J. (1982). Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 9, 2554.

HOWLETT A.C, BREIVOGEL C.S, CHILDERS S.R, et al., (2004) Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*. 47 Suppl 1, 345-58.

HOWLETT A.C., BARTH F., BONNER T.I., (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 54 (2), 161-202.

HOWLETT A.C., QUALY J.M., KHACHATRIAN L.L., (1986). Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol*, 29, 307-13.

HUANG S.M., BISOGNO T., TREVISANI M., et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 29, 50(1):83-90.

HOWLETT A.C., FLEMING R.M. (1984). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol*, 26, 532-8.

HUESTIS M.A., JOHN M.M., EDWARD J.C., (1996). Urinary Excretion Profiles of 11-Nor-9-Carboxy-D9-Tetrahydrocannabinol in Humans after Single Smoked Doses of Marijuana. *Journal of Analytical Toxicology*, 20(6), 441-452.

IVERSEN L.B, (2003) Cannabis and the brain. 126, (6), 1252-1270.

JENSEN F., Introduction to Computational Chemistry, 1st Edition, 2003, 446p.

JIANG H., LI X., ZHAO Y., et al., (2006). A new insight into Cannabis sativa (Cannabaceae) utilization from 2500-year-old Yanghai Tombs, Xinjiang, China *Journal of Ethnopharmacology*, 108(3), 414-422.

JOHNSON B. G.; GILL P. M. W.; POPLE J. A., (1993). The performance of a family of density functional methods, *J. Chem. Phys.*, 98, 5612.

JOHNSON R.A., WICHERN D.W., "Applied Multivariate Statistical Analysis", Prentice Hall, Prentice-Hall, 2002, 767p.

JÖRESKOG K.G., KLOVAN J.E., REYMENT R.A., (1976). Geological Factor Analysis; Elsevier; Amsterdam, 178 p.

JULIEN R.M. A Primer of Drug Action: a Concise, Nontechnical Guide to the Actions, Uses, and Side Effects of Psychoactive Drugs, 8th Ed., New York, Henry Holt, 1997;548.

KALANT K., Adverse effects of *cannabis* on health: an update of the literature since 1996. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2004, 28, 849-863.

KARL W. H., (2003) Genetic evidence for speciation in Cannabis (Cannabaceae) Genetic evidence for speciation in Cannabis (Cannabaceae), *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52,(2), 161-180.

KINTZ P., CIRIMELE V., LUDS B., (2000). Detection of cannabis in oral fluid (saliva) and forehead wipes (sweat) from impaired drivers. *J. Anal. Toxicol.*, 24, p.557-561.

KOCH W., HOLTHAUSEN M.C., A Chemist's Guide to Density Functional Theory, Wiley-VCH, Weinheim, 2^a ed., 2002, 289p.

KOHN W., SHAM L.J., (1965). Self consistent equations including exchange and correlations effects. *Physical Review*, 140, 4A, A1133-A1138p.

KOHONEN T. Self-Organizing Maps, 3rd Ed., Berlin: Springer. (2001), 501p.

KOOPMANS T. (1934). Teoria de Hartree-Fock-Roothaan. Teorema de Koopmans: *Physica*, 1, 104.

KOROLKOVAS A., BURCKHALTER J.H. Química Farmacêutica, Guanabara Dois, 1982, 783p.

KRIPPNER S., MURPHY G., (1973), Humanistic Psychology and Parapsychology. *Journal of Humanistic Psychology*, 13, 3.

KUBINYI H. "The quantitative analysis of structure-activity relationship", in Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery: Principles and Practice, 5th ed., Vol. 1, M. E. Wolff, pp. 497– 572, John Wiley, New York , 1995.

KUNOS G., BATKAI S., OFFERTALER L., et al., (2002). The quest for a vascular endothelial cannabinoid receptor. *Chem Phys Lipids*, 121, 45-56.

LAMBERT W.J., (1993). Development of an analytical reversed-phase high-performance liquid chromatography assay for transforming growth factor β 3. *J. Chromatogr., A* 656, 469.

LABUTE P.A., (2000). Widely Applicable set of descriptors. *J. Mol. Graphics Modell.*, 18, 464-477.

LABATE B.C., GOULART S.L. (Orgs) - O Uso Ritual das Plantas de Poder. Mercado das Letras e FAPESP, Campinas, SP. (2005), 518 p.

LASTRES B.I., FERNANDEZ R.J., (2006). An overview of Parkinson's disease and the cannabinoid system and possible benefits of cannabinoid-based treatments. *Current medicinal chemistry*, 13, 30, 3705.

LEE C., YANG W., PARR R. G., (1988)., *Condens. Matter, Phys. Rev. B.*, 37, 785.

LEMES N.H.T., Redes Neurais Artificiais, Um texto básico, Três Corações, M G, UNINCOR, (1), 2000, 78p.

LERSTEN N.R., CURTIS J.D., (1991). *Plant Systematic and Evolution*. 176,179-203.

LEVINE I. N., Molecular Spectroscopy, John Wiley & Sons, (1975), New York, 491p.

LEWIN L. (1932). Phantastica: Narcotic and Stimulating Drugs, *Journal of Mental Science.*, 78, 211-212.

Li H. (1974) An Archaeological and Historical Account of Cannabis in China. *Economic Botany*, 28, 437.

Li H. The Origin and Use of Cannabis in Eastern Asia: Their Linguistic Cultural Implications, in Cannabis and Culture, Springer, New York, 28, (3), 1975, 293-301p.

LOYD S.P., (1982). Least squares quantization in PCM. Special issue on quantization, *IEEE Trans. Inform. Theory*, 28:129–137.

LORENZI H., SOUZA H. M. Plantas Ornamentais no Brasil - arbustivas herbáceas e trepadeiras. 3a. edição. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum. 2001,1120 p.

LOURENÇO A., MATIAS R.P. Estatística Multivariada. Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2000.

LYNN A.B., HERKENHAM M. (1994). Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther*, 268, 1612-23.

MACQUEEN J.B., (1967): "Some Methods for classification and Analysis of Multivariate Observations, Proceedings of 5-th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability", Berkeley, University of California Press, 1, 281-297.

MCCULLOCH W., PITTS W., (1943). A logical calculus of the ideas imminent in nervous activity. *Bulletin of Mathematical, Biophysics* 5, 115-33.

MCPARTLAND J.M., GLASS M., (2003). Functional mapping of cannabinoid receptor homologs in mammals, other vertebrates, and invertebrates, *Gene* 312, 297- 303.

MCPARTLAND J., (2002). Byssinosis in Hemp Mill Workers, *Journal of Industrial Hemp*: 8,33- 44.

MARTIN Y.C. Quantitative drug design: A critical introduction, Marcel Dekker: New York, 1978

MATSUDA L.A., LOLAIT S.J., BROWNSTEIN M.J., et al., (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346(6284), 561–564.

MATLAB for Windows User's Guide, The Math Works Inc., 1991.

MATSUNAGA T., TANAKA H., HIGUCHI S., ET AL., (2001). Oxidation mechanism of 7-hydroxy-delta 8-tetrahydrocannabinol and 8-hydroxy-delta 9-tetrahydrocannabinol to the corresponding ketones by CYP3A11, *Drug-Metab-Dispos.* 29(11): 1485-91.

MECHOULAM R., (2005). Plant cannabinoids: a neglected pharmacological treasure trove *British Journal of Pharmacology.* 146, 913–915.

MECHOULAM R., HANU L., (2001). The cannabinoids: an overview. Therapeutic implications in vomiting and nausea after cancer chemotherapy, in appetite promotion, in multiple sclerosis and in neuroprotection. *Pain Res Manag* 6(2), 67-73.

MECHOULAM R., BEN-SHABAT S., (1999) From gan-zi-gun-nu to anandamide and 2-arachidonoylglycerol: the ongoing story of cannabis. *Nat Prod Rep.*, 16,131–143.

MECHOULAM R., BEN-SHABAT S., HANUS L., et al., (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 50 (1), 29, 83-90.

MECHOULAM R., LANDER N., VARKONY T.H., (1980). Stereochemical requirements for cannabinoid activity. *Med Chem.*, 23(10), 1068-72.

MECHOULAM R. Marijuana: chemistry, Pharmacology, Metabolism and Clinical effects. New York, academic Press, (1973), 409p.

MECHOULAM R. (1970). Marijuana Chemistry, *Science*, 168 (3936) 1159 – 1165.

MECHOULAM R., GAONI Y., (1967). Recent advances in the chemistry of hashish., *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, 25, 175-213.

MENKES D.B., HOWARD R.C., SPEARS G.F., CAIRNS E.R., (1991). Salivary THC following cannabis smoking correlates with subjective intoxication and heart rate. *Psychopharmacology*, Berlin, 103, 277-279.

MEYER U., (1996). Overview of enzymes of drug metabolism. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, 24, 449-459,.

MILLER K.J., (1990). Additivity Method in Molecular Polarizability. *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 853.

MINSKY M.L. & PAPER S.A. Perceptrons: an introduction to computational geometry. The MIT Press, Massachusetts, 1969, 275p.

MONTANARI M.L.C., MONTANARI C.A., GAUDIO A.C., (2002). Validação lateral em relações quantitativas entre estrutura e atividade farmacológica, QSAR. *Quím. Nova*, 25(2).

MOREIRA F.A., LUTZ B., (2008).The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addiction Biology*, 13, 196-212.

MOREAU R.L.M. Fármacos e drogas que causam dependência. In: Oga, S. (ed.) Fundamentos de Toxicologia Atheneu Editora, São Paulo, 230-240, (1996).

MORGON N.H., CUSTÓDIO R., (1995). Teoria do Funcional de Densidade. *Química Nova*, 18, 44-55.

MULLIKEN R.S., (1934), A new eletroaffinity scale; together with data on valence states and on valence ionization potentials and electron affinities. *J. Chem. Phys.*, 2, 782.

MUNRO S., THOMAS K.L, ABU-SHAAR M., (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.*, 2, 365, 61-5.

NAHAS G.G. Marihuana in science and medicine, Raven Press: New York, 1984.

NCCN- National Comprehensive Cancer Network. Nausea and vomiting. Treatment guidelines for patients with cancer. (2006); 3:5-31.

NETO B.B., SCARMINIO I.S., BRUNS R.E., Como fazer experimentos. Campinas: Editora da UNICAMP, 2003.

NETO B.B., SCARMINIO I.S., BRUN, R.E., (2006). 25 anos de quimiometria no Brasil *Quím. Nova*. 29,6, 1401-1406.

NIEBDALA R.A., KARDOS K.W., FRITCH D.F., et al., (2001). Detection of marijuana use by oral fluid and urine analysis following single-dose administration of smoked and oral marijuana. *J. Anal. Toxicol.*, 25, 289-303.

NIDA , 2007– National Institute on Drug Abuse. Marijuana. National Institute on Drug Abuse, 2007. Disponível: <http://www.nida.nih.gov/DrugPages/Marijuana.html>
Acesso: out/2007.

NIDA, 1987 – National Institute on Drug Abuse. Marijuana. National Institute on Drug Abuse - monografie série 79. Structure-Activity Relationships of the Cannabinoids.

Disponível :<http://archives.drugabuse.gov/pdf/monographs/79.pdf>, acesso em outubro 2007.

NIDA , 1882– National Institute on Drug Abuse. Marijuana. National Institute on Drug Abuse - monografie série 42 - The Analysis of Cannabinoids in Biological Fluids.

NYE M.J., (2007). Working tools for theoretical chemistry: Polanyi, Eyring, and debates over the "semiempirical method". *J comp. chem.*, 2898-108.

OLIVEIRA C.D.R., ROEHSIG M., ALMEIDA R.M., ROCHA W.L., YONAMINE M., (2007). Recent advances in chromatographic methods to detect drugs of abuse in alternative biological matrices. *Current Pharmaceutical Analysis*, 3, 95-109,.

OLIVEIRA B.G., ARAÚJO, R.C.M.U. (2007). Relação entre transferência de carga e as interações intermoleculares em complexos de hidrogênio heterocíclicos. *Quim. Nova*, 30 (4), 791-796.

OLIVEIRA B.G., ARAÚJO R.DE C. M. U., CARVALHO A.B., RAMOS M.N., (2009) Uma comprovação químico-quântica sobre a formação de ligações de hidrogênio e interações secundárias em sistemas heterocíclicos intermoleculares. *Orbital*, 1 (2), 167-182.

OMS 2001. Organização Mundial da Saúde. Relatório sobre a saúde no mundo 2001: Saúde mental: nova concepção, nova esperança. 20 Avenue Appia, 1211 Genebra 27, Suíça. 2001.

OMS 2004. Organização Mundial da Saúde. Neurociências: consumo e dependência de substâncias psicoativas, 20 Avenue Appia, 1211 Genebra 27, Suíça.

ORMOND J.G.P., Glossário de termos usados em atividades agropecuárias, florestais e ciências ambientais / José Geraldo Pacheco Ormond – Rio de Janeiro: BNDES, (2006), 316 p.

OSMOND H., (1957). A review of the clinical effects of Psychotomimetic Agents. *Annal. N. Y. Acad. Sci*, 14, 1957.

PARR R.G., CHATTARAJ P.K., (1991). Principle of maximum hardness. *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 1854.

PARR R.G., YANG W., Density-Functional Theory of Atoms and Molecules, Oxford University Press, New York, 1989.

PEARSON R.G., PALKE W.E., (1992). Support for a principle of maximum hardness. *J. Phys. Chem.*, 96, 3283.

PEREZ-REYES M., TIMMONS M.D., LIPTON M.A., CHRISTENSEN H.D., and DAVIS K.H.,(1973). A comparison of the pharmacological activity of delta-9-THC and its monohydroxylated metabolites in man. *Experientia*, 29, 1009-1010.

PEREZ-REYES M., TIMMONS M.D., LIPTON M.A., DAVIS K.H., and WALL M.E.,(1972). Intravenous injection in man of delta-9-THC and 11-OH-delta-9-THC, *Science*, 177, 633-635.

PERTZILKA T., (1969). Synthesis of hashish constituents. *Helvetica Chimica Acta*, 52, 1102.

PERTWEE R.G. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther*, 74, 129-80.

PERTWEE R. G., Pharmacological actions of cannabinoids, In: Pertwee RG (ed). Springer – Verlag, (2005). 777p.

PERTWEE R.G., (2006). Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *British Journal of Pharmacology*. 147, 163–171.

PERTWEE R.G., The pharmacology and therapeutic potential of cannabidiol Cannabinoids.; New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, ed. Di Marzo, p. (2004.) 32-83.

POLAK-RIBIER (1969). Projective method of Newton-Rafson. Davidon-Flatcher-Powell method. *Pearson J.D. Computer J.*, 13,1969, 171.

PORTER A.C., SAUER J.M., KNIERMAN M.D., et al. (2002). Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 301, 1020-4.

POPLE J.A., BEVERIDGE D.L., DOBOSH P.A., (1967). *J. Chem. Phys.*, 6, 47, 2026.

RADWAN M.M., ELSOHLY M.A., SLADE D., (2008). Non-cannabinoid constituents from a high potency Cannabis sativa variety, *Phytochemistry*. 69, 14, 2627-2633.

RANG H.P., et al., Farmacologia. 5° ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RAZDAN R.K., (1986). Structure-activity relationships in cannabinoids. *Pharmacol Rev.* Jun; 38(2), 75–149.

RBG, 2008 - <http://data.kew.org/cgi-bin/vpfg1992/genlist.pl?CANNABACEAE> pagina visitada em 30/09/ 2008.

REGGIO P.H., (2006). Computational methods in drug design: modeling G protein-coupled receptor monomers, dimers, and oligomers., *AAPS Journal* ; 8 (2), 322-336.

REGGIO P.H., (2003). Pharmacophores for Ligand Recognition and Activation / Inactivation of the Cannabinoid Receptors. *Curr. Pharm.* 9, 1607-1633.

REGGIO P.H., (1992). A search for properties which produce discrimination between cannabinoid psychoactivity and analgesic activity, *International journal of quantum chemistry*, 44, 2, 165-179.

REGGIO P.H., GREER K.V., COX S.M., (1989). The importance of the orientation of the C9 substituent to cannabinoid activity., *J-Med-Chem*; 32(7), 1630-5.

REGGIO P.H., MAZUREK A.P., (1987). A molecular reactivity template for cannabinoid activity, *Journal of molecular structure*, 149, (3-4), 331-343.

REKKER R.F., MANNHOLD R., Calculation of drug lipophilicity: the hydrophobic fragmental constant approach, VCH: Weinheim, 1992.

ROCHA G.B., FREIRE R.O., SIMAS A.M., and STEWART J.J.P., (2006). *Journal of Computational Chemistry*, 27, 1101

ROSENZWEID M.R., LEIMAN A.L., BREEDLOVE S.M. (1999) Biological psychology, 2a.ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

ROSEMBLANTT F., Principles of Neurodynamics. Spartan Books, 1962.

RUMELHART D.E., CHAIVIN Y. Backpropagation: Theory, architectures, and applications. Hillsdale, Lawrence Erlbaum Associates, 1995. 561p.

RUSSO E. Cannabis Therapeutics in HIV/AIDS, Ed Haworth Press, 2001.

RUSSO E.B., MCPARTLAND J.M., (2003), Cannabis is more than simply D9-tetrahydrocannabinol, *Psychopharmacology*. 165, 431–432.

RYBERG E.V., VU H.K., LARSSON N., et al., (2005). Identification and characterisation of a novel splice variant of the human CB1 receptor., *FEBS Lett.* 3; 579(1), 259-64.

SALIO C., FISCHER J., FRANZONI M.F., et al., (2001). CB1-cannabinoid and mu-opioid receptor co-localization on postsynaptic target in the rat dorsal horn. *Neuroreport*, 12, 3689-92.

SANDERSON R.T (1954). *J. Chem. Educ.*, 31, 238.

SANCHEZ I.J.F., VERPOORTE R., (2008). PKS activities and biosynthesis of cannabinoids and flavonoids in *Cannabis sativa* L. plants., *Plant & cell physiology*; 49(12), 1767-82.

SARTON G.A. History of Science: Hellenistic Science & Culture in the Last Three Centuries B C., Harvard University Press, 1952.

SCHODINGER E., (1926). An Undulatory Theory of the Mechanics of Atoms and Molecules, *Phys. Rev.* 28 (6), 1049 –1070.

SCHULTES R.E., KLEIN W.M., PLOWMAN T., et al., (1974). Cannabis: an example of taxonomic neglect. Harvard University Botanical Museum Leaflets 23: 337–367.

SENA M.M., POPPI R.J.; FRIGHETTO R.T.S. (2000). Avaliação do uso de métodos. quimiométricos em análise de solo. *Quim. Nova*, 23, 547-556,

SILVA T. M. B., PEREIRA M. A., MALTA V. S., BENTO E. S., SAM-MIGUELI M. A., ZIOLLE R. L., MARTINS J.B.L., SIH A., TAFT C.A., (2008). The use of density functional theory and statistical methods for studying metabolites cannabinoids. *International Journal of Quantum Chemistry*, 108, 13, 2531.

SILVA A.M., (2008) Efeitos de ligações de hidrogênio em propriedades de aglomerados de moléculas. Dissertação de mestrado. Universidade federal do Amazonas. Departamento de Física.

SKAPER S.D., BURIANI A., DALTOSO R., et al. (1996). A. The Aliami de palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 93, 3984 – 9.

SOLTIS D.E., SOLTIS C.P.S., MORT M.W., et. al., (2000). Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* 133, 381-461.

SPARTAN Wavefunction, Inc., 1840, Von Karman Avenue, Suite 370, Irvine, CA 92612 USA.

STEWART J.J.P., (1989). Optimization of Parameters for Semi-Empirical Methods I-Method, *J. Comp.Chem.*, 10, 209-220.

STEWART J.J.P., Manual Mopac, 2002, Fujitsulmeted, Tokyo, Japan.

STATISTIC. StatSoft, Inc,(2001) STATISTIC for Windows (Pagina da web) <http://www.statsoft.com/> visitada em 03 abril 2007.

SIMAS A. M., ROCHA G. B., Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular, Nelson H. Morgon & Kaline Coutinho Eds, São Paulo, Ed Livraria da Física, 2007, 533p.

SYMONS I.E., (2002). Cannabis smoking and anaesthesia. *Anaesthesia.*, 57, 1134-45.

SYSTMA K., MORAWETZ J.J., PIRES J.C., et al., (2002). Urticalean rosids: circumscription, rosid ancestry, and phylogenetics based on rbcL, trnLF, and ndhF sequences. *American Journal of Botany*. 89, 1531-1531.

TAFT R.W., Jr., (1960). Sigma values from reactivities. *Journal of Physical Chemistry*, 64(12), 1805.

TAKAHASHI R.N., PAMPLONA F. A., FERNANDES M. S., (2005). The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. *Neuroscience Letters*, 380, 270-275.

TAVARES L.C. (2004). QSAR: a abordagem de Hansch. *Quím. Nova*, 27, 4, 631-39.

TAURA F., MORIMOTO S., SHOYAMA Y., (1996). Purification and Characterization of Cannabidiolic-acid Synthase from Cannabis sativa *The journal of biological chemistry*, 271 (29) 17411-17416.

TAYLOR P.J. "Hydrophobic properties of drugs", in C. Hansch, P. G. Sammes, J. B. Taylor. *Comprehensive Medicinal Chemistry: The Rational Design, Mechanistic Study and Therapeutic Application of Chemical Compounds*, 4, 241–294, Pergamon Press, Oxford (1990).

THOMAS L.H., (1927). "The calculation of atomic fields". *Proc. Cambridge Phil. Soc.* 23 (5), 542–548.

TRAMER M.R., CARROLI D., CAMPBELL F., et al. (2001). Cannabinoids for the control of chemotherapy induced nausea and vomiting: quantitative systematic review. *British Medical Journal*, 323, 16–21.

UNDOC (2008, 2006): Disponível em: http://www.unodc.org/unodc/world_drug_report.html. Acessado em novembro de 2008.

VAN DE WATERBEEM H. *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*; Mannhold, R. et al., eds.; VCH: Weinheim, 1995, vol. 3.

VAN DE WATERBEEMD H. (1992). "The History of Drug Research: from Hansch to Present." *Quant. Struct.-Act. Relat.* 11, 200-204.

VERSTRAETE A.G., PIERCE A. (2001). Workplace drug testing. Europe. Forensic Sci. Int., Amsterdam, 121, 2-6.

VERMA R.P., HANSCH C., (2005). A comparison between two polarizability parameters in chemical–biological interactions, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13, Issue 7, 2355-2372.

VELLASCO M. M. B. R., PACHECO M. A. C. Nucleo de Pesquisa em Inteligência Computacional Aplicada. PUC-RIO. Disponível em: <<http://www.ica.ele.pucrio.br>>. Acesso em: 03 Jan 2008.

VESSECCHI R., GALEMBECK S.E., LOPES N.P., et. al. (2008). Aplicação da Química Quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometrias de Massa., *Quim. Nova*, 31, 4, 840-853.

VOLKOW N.D, (2001) Low level of brain dopamine D2 receptors in methamphetamine abusers: association with metabolism in the orbitofrontal cortex. *American Journal of Psychiatry*, 158, 2015-2021.

WALL M.E., BRINE D.R., BURSEY J.T., ROSENTHAL D., (1979). Detection and quantitation of tetrahydrocannabinol in physiological fluids. In J.A. Vinson (ed.), *Cannabinoid Analysis in Physiological Fluids*, ACS Symposium Series 98, Am. Chem. Soc., Washington, D.C., 39-57.

WATANABE K., MATSUNAGA T., KIMURA T., (2005). Stereospecific and Regioselective Hydrolysis of Cannabinoid Esters by ES46.5K, an Esterase from Mouse Hepatic Microsomes, and Its Differences from Carboxylesterases of Rabbit and Porcine Liver. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 28(9), 1743.

WATANABE K., ITOKAWA Y., YAMAORI S., (2007). Conversion of cannabidiol to Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and related cannabinoids in artificial gastric juice and their and pharmacological effects in mice. *Forensic Toxicology*, 25(1), 16.

WATKINS P.B., (1992). Drug metabolism by cytochromes P450 in the liver and small bowel. *Gastroenterology Clin. North. Am.*, 21, 511-526.

WEBB A.R. *Statistical Pattern Recognition*. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2002.

WERMUTH C.G. *The practice of medicinal chemistry*, Academic Press: San Diego, 2000.

WILLIAMSON E.M., EVANS F.J. (2000), Cannabinoids in clinical practice. *Journal Article, Review Drugs*. 60(6), 1303-14.

WILLIAMS P.L., MOFFAT A.C., (1980). Identification in human urine of delta-9-THC-11- oic acid glucuronide: A THC metabolite. *J Pharm. Pharmacol.*, 32, 445-448.

WILLETT P., (2008). From chemical documentation to chemoinformatics: 50 years of chemical information science. *Journal of Information Science*, 34, (4), 477-499.

WOOD M., DE BOECK G., SAMYN N., (2003). Development of a rapid and sensitive method for the quantitation of amphetamines in human plasma and oral fluid by LC-MS-MS. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, 27, 78-87.

WOOD T. B., SPIVEY W. T. N., EASTERFIELD T. H., (1896). The Resin of Indian Hemp. *Journal Chem Soc.*, 69, 539-546.

WILSON R. I.; NICOLL R. A. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*, 296, 678-682,

YONAMINE M. (2004). A saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas 125p.

ZADEH L.A. *Toward a Theory of Fuzzy Systems*. In *aspects of Network and System Theory*. Rinehart and Winston, New York, 1971, 469-490.

ZHU L.X., SHARMA M., STOLINA S., (2000). IL-10 Mediates Sigma₁ Receptor-Dependent Suppression of Antitumor Immunity *Immunology*, 165(1), 373-380.

ZON B.A., (1996). Born-Oppenheimer approximation for molecules in a strong light field, *Chemical Physics Letters*, 262(6), 744-746.

ZUARDI A.W, (2006). History of cannabis as a medicine: a review. *Rev Bras Psiquiatr*, 28, 153-157.

ZUARDI A.W., CRIPPA J.A.S., HALLAK J.E., (2006). Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39 (4), 421-429.

ANEXOS

Artigos publicados