

Eclética Química Journal

Original research publication in all aspects of Chemistry
homepage: <http://revista.iq.unesp.br/ojs/index.php/eletica/>
ISSN 1678-4618

| Vol. 41 | 2016 |

Geometria de equilíbrio da molécula de Azadiracthin através de métodos semiempíricos e *Ab initio* em comparação com os dados experimentais fornecidos pela difração de raios X

Daniel A. B. de Oliveira¹, Yagly G. dos Santos Gomes¹

Resumo: A azadiractina é uma molécula com múltiplas aplicações biológicas no combate de pragas e no tratamento de doenças em humanos. Por essa razão, o estudo da geometria deste tipo de estrutura molecular é essencial para o entendimento dos processos bioquímicos nos quais ela está envolvida. O estudo de geometrias de equilíbrio é realizado com o auxílio de aproximações quânticas que conseguem determinar estruturas de menor estado energético. A importância desse tipo de trabalho é verificada quando há reprodutibilidade dos dados experimentais pelos cálculos quânticos. Nesse trabalho foram realizados cálculos de estrutura eletrônica com diferentes aproximações para tentar reproduzir os dados de difração de raios X. O método semiempírico PM6 foi aquele que mostrou maior reprodutibilidade dos dados experimentais. Esse resultado otimiza ainda a relação entre esforço computacional e reprodutibilidade de dados, pois o método semiempírico PM6 é sabidamente mais barato computacionalmente que aqueles ditos que foram usados neste trabalho.

Palavras-chave: Azadiractina, *Ab initio*, Semiempírico, PM6

Abstract: The azadiracthin is a molecule with many biological applications in the pest control and in the treatment of human diseases. For this reason the geometry study of this molecular structure is essential to understand the biochemical process which it is involved. The study of equilibrium geometries was performed with the aid of quantum mechanics approach that can determine the structures with the least energetic state. The importance of this kind of study is verified when there is experimental data reproducibility by quantum calculations. In this work it was performed calculations of electronic structure with different approaches in order to try reproducing the experimental data base in X ray. The PM6 semi-empirical method was that showed the highest reproducibility of the experimental data. This result optimized yet the relation between computational cost and the good data reproducibility, because it is known that the PM6 semi-empirical method has the computationally less cost that the *ab initio* approaches that were used in this study.

Keywords: Azadiracthin, *Ab initio*, Semi-Empirical, PM6

¹ Fundação Universidade Federal do Tocantins. Campus Universitário Araguaína. Rua Paraguaia S/N 77838-824 - Araguaína, TO
E-mail: danielchem@uft.edu.br

INTRODUÇÃO

O uso de plantas com aplicabilidade medicinal tem crescido nos dias atuais. Dentre aquelas com potencial medicamentoso e repelente se destaca o Neem, que é uma árvore de origem asiática e que hoje se encontra difundida em países de clima tropical. O seu óleo apresenta ação repelente contra o mosquito *Aedes Aegypti* com duração de vários minutos a depender das condições físico-químicas. O uso combinado do óleo com outros repelentes e inseticidas conhecidos no mercado pode melhorar a sua atividade biológica¹. É sabido na literatura que o óleo de Neem apresenta propriedades antifúngicas², e que parte dos seus compostos bioativos está sendo estudados como potenciais fármacos para o tratamento e prevenção do câncer². Aplicações antimaláricas têm sido descritas na literatura recente³.

A extração do Neem usando um solvente polar como a água permite a obtenção de quantidades de moléculas bioativas suficiente para o controle de pragas⁴. Ensaio biológicos demonstraram que as moléculas bioativas presentes no extrato de Neem, como a azadiractina, nibina e 6-desacetilnibina inibem a atividade da enzima 20-monooxigenase, que está relacionada à ecdise em insetos⁵. Estudos mostram ainda a aplicabilidade do óleo de Neem no combate ao vírus da Dengue tipo 2⁶.

A separação de cada composto com potencial biológico do óleo de Neem foi realizada utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. Destas moléculas a mais representativa é a Azadiractina. No extrato obtido do fruto desta árvore encontram-se oito tipos de azadiractina A,B,C,D,E,F,G e I⁷. A azadiractina A possui ampla aplicação na inibição do crescimento de insetos, bem como pode ser usada como inseticida natural tendo a vantagem de ser uma molécula biodegradável. Na literatura consta ainda que esta molécula pode ter propriedades inflamatórias, antifúngicas bem como pode ser utilizada no tratamento de neoplasias⁸.

Devido a sua ampla utilidade em diferentes tipos de doenças em humanos e animais, Ley e colaboradores propuseram uma síntese completa

dessa molécula, que perdurou 22 anos na universidade de Cambridge⁹. A demora na síntese desta molécula foi resultado da presença de 16 carbonos assimétricos na estrutura da molécula, que pode apresentar conformações de equilíbrio complexas.

Estudos conformacionais são de fundamental importância para a construção e aplicação de possíveis inibidores, pois a inibição de biomoléculas se dá pela complementariedade estrutural do inibidor com o sítio catalítico do alvo enzimático¹⁰. Tendo em vista a relação estrutura e atividade da molécula azadiractina, Baldone e colaboradores realizaram uma análise quantitativa multidimensional a fim de determinar geometrias de equilíbrio, que ajudariam no entendimento do comportamento da molécula de azadiractina. Nesse trabalho foram computados ângulos diedros e distância entre átomos das estruturas de equilíbrio usando o método AM1¹¹.

Estudos teóricos recentes¹⁵ utilizando a distribuição de Boltzman com o método Monte Carlo para a procura de geometrias de equilíbrio associados com cálculos de estrutura eletrônica com funcionais híbridos, foram comparados com aqueles provenientes de dados experimentais¹³, refinando desse modo os resultados de Baldone e colaboradores¹¹. Esses estudos mostram o interesse crescente em elucidar a geometria da molécula azadiractina com mais acurácia em relação aos dados experimentais. Entretanto, como são métodos mais refinados demandam maior custo e tempo computacional.

No que tange ao estudo de geometrias de equilíbrio deve-se otimizar a relação esforço computacional com a reprodutibilidade de dados experimentais, como aqueles provenientes de técnicas espectroscópicas. Em busca da relação entre esforço computacional e qualidade dos métodos de cálculo de estrutura eletrônica, foram obtidas estruturas de equilíbrio utilizando aproximações semiempíricas (PM6, AM1, PM3, PM3/MM) e aquelas provenientes de cálculos estritamente quânticos com funcionais de densidade e o método Hartree-Fock, e pós Hartree-Fock MP2. Nossos resultados de distância de ligação entre átomos de carbono e oxigênio, utilizando o método semiempírico PM6, mostram que o método

reproduz de maneira satisfatória os dados experimentais de difração de raios X, embora não sejam observadas a mesma correlação em relação aos ângulos diedros. Estes resultados poderão ser utilizados em futuros estudos de *docking* molecular e SAR (Relação Estrutura e Atividade) com alvos enzimáticos específicos⁵.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

A estrutura da molécula de azadiractina foi desenhada no programa HYPERCHEM¹³. Em uma etapa posterior, a estrutura molecular foi otimizada utilizando os seguintes cálculos de estrutura eletrônica: semiempíricos, (PM6, AM1, PM3, PM3/MM), Teoria do Funcional de Densidade (B3LYP/STO-3G, B3LYP/6-31g) e *ab initio* (HF/STO-3G, HF/6-31G, MP2/6-31G). Estes cálculos foram realizados no programa Gaussian 2009¹⁴. Os dados resultantes dos cálculos de estrutura eletrônica foram correlacionados com os dados experimentais de difração de raios X da literatura¹². As distâncias de ligação obtidas com cálculos de estrutura eletrônica foram correlacionadas com aquelas obtidas experimentalmente com a técnica de difração de raios X. Os ângulos diedros obtidos teoricamente também foram correlacionados com os dados experimentais. Para efeito comparativo com os dados do experimento, os átomos foram numerados conforme a Figura 1¹². A escolha da numeração objetivou seguir o *modus operandi* do artigo que contém os dados experimentais¹². O coeficiente de correlação *r* foi utilizado como medida de acurácia dos métodos testados. A confirmação dos mínimos energéticos obtidos foi feita pelo cálculo das frequências.

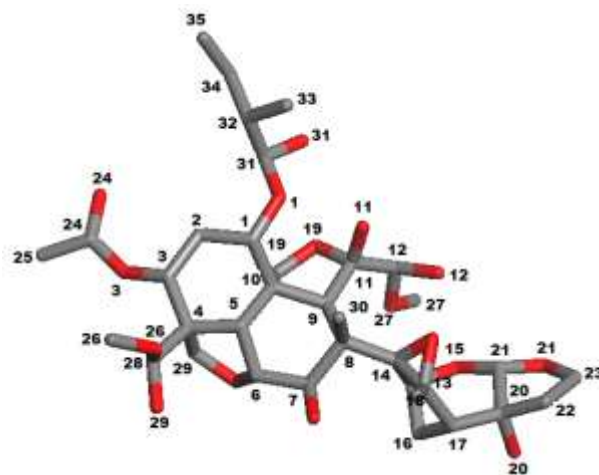


Figura 1. Molécula de azadiractina com os átomos numerados para computação das distâncias e ângulos diedros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparação com os dados experimentais

Os resultados inerentes às otimizações com diferentes métodos são mostrados na Tabela 1, que diz respeito às distâncias de ligação.

O método semiempírico PM6 apresentou maior correlação com os dados experimentais com um coeficiente de correlação *r* igual 0,91 conforme Tabela 1. Os métodos semiempíricos AM1, PM3 e PM3/MM apresentaram coeficientes de correlação bem próximos com uma ligeira vantagem para o método AM1, que apresentou $r=0,84$ enquanto os demais apresentaram um valor de $r=0,82$. Os métodos *ab initio* Hartree-Fock e MP2 exibiram baixa reprodutibilidade dos dados com coeficientes de correlação variando entre 0,80 para o método HF com a função de base STO-3G e $r=0,67$ para o método HF combinado com o funcional 6-31G e o método pós Hartree-Fock MP2 combinado com funcional 6-31G. O funcional B3LYP apresentou melhor correlação com os dados experimentais quando foi utilizado o funcional STO-3G com correlação igual a **0,70**. Uma ligeira piora no coeficiente de correlação ($r=0,67$) é observada com o uso da função de base 6-31G para o funcional B3LYP. Esses resultados demonstram a vantagem do uso do método semiempírico PM6 na descrição da estrutura da molécula de azadiractina. A vantagem então está no baixo custo computacional do método PM6 aliada com a boa reprodutibilidade das distâncias de ligação.

Tabela 1. Distâncias de ligação calculadas teoricamente

O...O Distância Angstroms	PM6	AM1	PM3	P3MM	HF- STO3 G	B3LYP (sto-3G)	MP2 6- 31g	HF- 6- 31G	B3L YP- 6- 31G	EXP ¹³
21 -15	2,25	2,21	2,16	2,16	2,32	2,4	2,29	2,29	2,33	2,27
21-13	4,49	4,45	4,47	4,47	4,51	4,5	4,23	4,12	4,2	5,39
15-13	3,15	3,13	3,17	3,17	3,16	2,84	2,62	2,62	2,69	3,62
13-19	6,09	5,78	6	6	5,87	5,52	5,11	5,07	5,19	5,9
13- 6	5,82	5,78	6,01	6,01	6,1	6,07	6	5,98	6,05	5,08
19- 6	5,67	4,55	4,6	4,6	4,48	4,38	4,44	4,41	4,43	5,76
7- 6	2,51	2,51	2,53	2,53	2,35	3,72	3,53	3,54	3,58	2,96
11- 12	2,5	2,55	2,6	2,6	2,58	2,62	2,59	2,6	2,64	2,65
r	0,91	0,84	0,82	0,82	0,80	0,70	0,68	0,67	0,67	

No que se refere aos ângulos diedros, não há boa concordância para nenhum dos métodos de cálculo de estrutura eletrônica utilizados, conforme pode ser visualizado na Tabela 2. Alguns ângulos particulares são reproduzidos pelos métodos quânticos, outros mostram demasiada discordância com os métodos experimentais. Para o diedro associado aos átomos C18-C13-C14-C15 verifica-se uma boa concordância do funcional B3LYP com a função de base 6-31G com os dados experimentais. Para o funcional B3LYP o diedro calculado é de 153,18° enquanto no experimento é de 157,95°. Outro ângulo diedro que apresenta boa correlação com os dados experimentais é aquele associado aos átomos C13-C14-C15-C16. O método MP2 (29,9° apresenta melhor correlação com os dados experimentais 29,77°), seguido dos métodos HF (28,4°) com a função de base 6-31G e o método semiempírico AM1 e o funcional de densidade B3LYP com a função de base 6-31G. Para ambos o diedro obtido foi de 28,2°. Neste

ponto não é observada correlação entre o método de cálculo de estrutura eletrônica e a qualidade dos resultados quando comparados aos dados experimentais, havendo como já citado ligeiras concordâncias e muitas discordâncias com os métodos experimentais de difração de raios X. Em vista dos resultados há uma evidente vantagem do método semiempírico PM6 concernente à reprodução de dados de distâncias de ligação para a molécula de azadiractina. Porém, a reprodutibilidade dos dados de ângulos diedros para a molécula Azadiractina não pode ser confiada a uma otimização com cálculos de estrutura eletrônica. Esse problema se dá pelos elevados graus de liberdade conformacional existente na molécula de Azadiractina, o que pode levar como consequência a uma complexa superfície de potencial energético com diversos mínimos energéticos que é demasiada complexa para ser explorada.

Tabela 2. Ângulos diedros obtidos por diversos métodos de cálculo de estrutura eletrônica comparados com os dados provenientes da difração de raios X

Ângulo Diedro	PM6	AM1	PM3	P3MM	HF- STO3G	B3LYP (STO- 3G)	MP2 6-31g	HF-6- 31G	B3LYP- 6-31G	EXP. ¹³
O6-C6-C7-O7	-127,3	-127,9	-121,8	-121,8	-125,4	-36,9	-123,3	-125,7	125,2	59,2
C7-C8-C14- C13	-80,2	-82,9	-96,6	-96,6	-83,6	-69,6	-88	-85,3	-84,6	- 110,52
C7-C8-C14- C15	66,9	63	46	46	62	74,4	57,8	62,5	60,9	89,3
C13-C14-C15- C16	25,3	28,2	31	31	28,8	24,6	29,9	28,4	28,2	29,77
O13-C14-C15- O15	-30,4	-28,3	-27,5	-27,5	-29,6	-33,7	-26,3	-25,5	-25,6	-147,8
O13-C13-C17- C16	-90,9	-88,2	-89,4	-89,4	-89,5	-93,7	-90,2	-91,3	-91,8	39,39
C13-C17-C20- C22	175,9	176,7	179	179	171,3	169,3	174	174	173,6	- 177,48
C4-C5-C6-O6	45,7	44,5	42,6	42,6	47,3	50,6	47,9	46,3	48,1	39,74
C10-C9-C11- O19	-32,8	-28,8	-30,5	-30,5	-32,1	-34,1	-30	-31,4	-32,5	14,96
O7-C7-C8- C30	-48,4	-43,9	-51	-51	-47,8	-39,7	-50,6	-49,8	-50,4	- 173,11
O20-C20-C22- C23	-114,7	-116,5	-177	-177	-121,9	-125,5	-114,1	-113,1	112,9	- 108,37
C18-C13-C14- C15	-149,5	-151,8	-149,7	-149,7	-151,1	-143,8	-154,8	-154,7	153,8	157,95
O7-C7-C8-C9	-168,5	-164,6	-170	-170	-169,1	-159,9	-171	-170,1	170,9	62,6
O11-C11-C12- O12	-14,6	-11,2	-2,9	-2,9	-12	-17	-14,1	-17,8	-13,7	-24,71

CONCLUSÕES

Os resultados de cálculos de estrutura eletrônica demonstraram que há uma vantagem no uso do método semiempírico PM6 para a reprodução de distâncias de ligação na molécula de azadiractina. A

vantagem se dá pela boa correlação com os dados experimentais de difração de raios X e pelas características do método que possui menor custo computacional quando comparado aos cálculos *ab initio* e de funcional de densidade. Dessa forma o uso do método semiempírico é altamente recomendável

para o tratamento desse tipo de problema. O mesmo não ocorre com a reprodução dos ângulos diedros. Há concordâncias de alguns métodos com alguns ângulos pontuais e discordância na maior parte dos resultados.

Esse problema pode ser decorrente da complexa superfície energética da molécula de azadiractina.

REFERÊNCIAS

- [1] Y. Mukesh, P. Savitri, R. Kaushik, N. P. Singh, Studies on repellent activity of seed oils alone and in combination on mosquito, *Aedes aegypti*, *Journal of Environmental Biology.*, **2014**, *35*, 917-922.
- [2] F. Hao, S. Kumar, N. Yadav, D. Chandra, Neem components as potential agents for cancer prevention and treatment, *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer.*, **2014**, *1846*, 247-257.
- [3] E. Innocent, A. Hassanali, W. N. W. Kisinza, P. P. P. Mutalemwa, S. Magesa, E. Kayombo, *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine.*, **2014**, *10:56*, 1-11.
- [4] T. R. Govindachari, G. Gopalakrishnan, G. Suresh, Triterpenoidal constituents of an aqueous extract from neem kernels, *Fitoterapia*, **1999**, *70*, 558-560.
- [5] M. J. Mitchell, S. L. Smith, S. Johnson, E. D. Morgan, Effects of the neem tree compounds azadirachtin, salannin, nimbin, and 6-desacetylnimbin on ecdysone 20-monooxygenase activity, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **1997**, *35*, 199-209.
- [6] M. M. Parida, C. Upadhyay, G. Pandya, A. M. Jana, Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on Dengue virus type-2 replication. *J. Ethnopharmacol.*, **2002**, *79*, 273-278.
- [7] S. V. Ley, A. A. Denholm, A. Wood, *The chemistry of azadirachtin*, *Natural Product Reports.*, **1993**, *10*, 109-109.
- [8] F. Ricci, V. Berardi, G. Risuleo, Differential Cytotoxicity of MEX: a Component of Neem Oil Whose Action Is Exerted at the Cell Membrane Level, *Molecules.*, **2009**, *14*, 122-132.
- [9] S. V. Ley, A. Abad-Somovilla, J. C. Anderson, C. Ayats, R. Banteli, E. Beckmann, A. Boyer, M. G. Brasca, A. Brice, H. D. Broughton, B. J. Burke, E. Cleator, D. Craig, A. A. Denholm, R. M. Denton, T. Durand-Reville, L. B. Goob, M. Gobel, B. L. Gray, R. B. Grossmann, C. E. Gutteridge, N. Hahn, S. L. Harding, L. Jennens, P. J. Lovell, P. J. Loveell, H. J. Lovell, M. L. De La Puente, H. C. Kolb, W.-J. Koot, C. F. McCusker, A. Mattes, A. R. Pape, A. Pinto, D. Santafianos, J. S. Scott, S. C. Smith, A. Q. Somers, C. D. Spilling, F. Stelzer, P. L. Toogood, R. M. Turner, G. E. Veitch, A. Wood, C. Zumbunn, *Chemical European Journal*, **2008**, *14*, 10683-10704.
- [10] S. Kortagere, M. D. Krasowski, S. Ekins, The importance of discerning shape in molecular pharmacology, *Trends in Pharmacological Sciences*, **2009**, *30*, 138-147.

- [11] H. A. Baldoni, R. D. Enriz, I. G. Csizmadia, Quantitative multidimensional conformational analysis of azadirachtin *Journal Molecular Structure.*, **1999**, *463*, 251-270.
- [12] V. Kabaleeswaram, S. S. Rajan, T. R. Govindachari, G. Gopalakrishnam, Crystal and molecular structure of Azadirachtin-A, *Current Science*, **1994**, *66*, 362-364.
- [13] HyperChem(TM) Professional 7.51, Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA.
- [14] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, **Gaussian Program**, Inc., Wallingford CT, 2016.
- [15] E. A. S. de Castro, D. A. B. de Oliveira, S. A. S. Farias, R. Gargano, J. B. L. Martins, Structure and electronic properties of azadirachtin, *Journal of Molecular Modeling*, **2014**, *20*:2084, 1-7.