

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Estudos computacionais de inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa do vírus HIV-1 (NNRTI)”.

Odonório Abrahão Júnior

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Química.

RIBEIRÃO PRETO -SP

2001

Orientador: **Prof. Dr. Sérgio Emanuel Galembeck**

Patrocínio: **FAPESP**

A Valdenice

e a Sofia.

Se podes olhar, vê. Se podes ver, repara.

José Saramago

Estranhe o que não for estranho.

Tome por inexplicável o habitual.

Sintam-se perplexos ante o cotidiano.

Tratem de achar um remédio para o abuso.

Mas não se esqueçam que o abuso é sempre a regra.

Bertolt Brecht

AGRADECIMENTOS

Ao Professor *Sérgio Emanuel Galembeck* pela orientação e participação efetiva em minha formação.

A Professora *Antônia Tavares do Amaral* pela co-orientação que se destaca pela constante motivação que proporciona.

Ao Professor *Carlos Aleman* de Barcelona, pela colaboração (autor do programa PAPQMD) e valiosas dicas durante sua permanência no Brasil.

Aos meus pais *Odonório e Teresinha* pela presença efetiva em todos os momentos da formação de seu filho. E a minhas irmãs *Marizete, Iolanda, Elizabete e Virgínia*, pela força.

A minha esposa *Valdenice*, pelo amor que se multiplica, ao lado da nossa *Sofia*.

Aos companheiros do LAMMOL, *Paulo Gustavo (Paulão), Renato (Batata), Hamilton, Sílvio, Marina, Valéria, Ivy, "Ana Glória", "Fernandas", Ali, Marcos (Chaveco), Josi e Giovanni*. Pela amizade, churrascos e excelente convivência.

Aos colegas *Cristiano e Leonardo* do laboratório de QSAR.

A FAPESP, pelo apoio financeiro e competência.

Ao LCCA, pelos recursos computacionais.

A Universidade pública, gratuita e de qualidade.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	iv
Abstract	vi
Abreviaturas utilizadas	viii
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xvii
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II - Desenvolvimento de parâmetros de campo de força e análise conformacional de TIBO	
2.1 - Introdução	20
2.2 - Procedimento computacional.....	23
2.2.1 - Campo de força e parametrização.....	23
2.2.2 - Tipos de átomos	25
2.2.3 - Parâmetros de equilíbrio	28
2.2.4 - Cargas RESP e parâmetros de Van der Waals	28
2.2.5 - Validação dos parâmetros desenvolvidos	30
2.2.6 - Análise conformacional	31
2.2.7 - Análise dos confôrmeros obtidos utilizando uma estratégia de clustering	34
2.2.8 - Parâmetros de dobramento de anéis	35
2.2.9 - Constantes de acoplamento	38
2.2.10 - Nomenclatura conformacional	39
2.3 - Resultados e discussão.....	41
2.3.1 - Parametrização cãs constantes de força	41
2.3.2 - Parametrização das torções	44
2.3.3 - Parametrização dos termos não ligados	45
2.3.4 - Parâmetros de equilíbrio	47

2.3.5 – Cálculos teste para a avaliação dos parâmetros	50
2.3.6 –Análise conformacional	71
2.3.7 – Parâmetros de dobramento de Cremer e Pople	98
2.3.8 – Constantes de acoplamento.....	103
2.3.9 – Momentos de dipolo e valores energéticos	104
CAPÍTULO III - Análises comparativas entre campos moleculares (CoMFA)	
de 49 não - nucleosídeos inibidores da transcriptase	
reversa do vírus HIV-1 (NNRTI) estruturalmente diversos.	
3.1 – Introdução.....	107
3.2 – aspectos metodológicos	110
3.2.1 – Seleção dos compostos para o estudo QSAR-3D	110
3.2.2 – Moléculas de NNRTI com estruturas cristalinas enzima-	
inibidor, disponíveis no banco de dados PDB	115
3.2.3 – Obtenção de cargas atômicas parciais	116
3.2.4 – Análises conformacionais de DABO e piridinonas	116
3.2.5 – Otimização das estruturas tridimensionais	118
3.2.6 – Alinhamento por campos moleculares (SEAL)	119
3.2.7 - Parametrização dos alinhamentos	121
3.2.8 - Campo hidrofóbico (HINT)	127
3.2.9 - Análises CoMFA	128
3.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	130
3.3.1 - Parametrização dos alinhamentos	130
3.3.2 – Análises CoMFA	132
3.3.3 - Visualização e análise de alguns diagramas de campos	
moleculares (mapas de contorno) dos modelos CoMFA	141
desenvolvidos	
3.3. 4 - Análise dos mapas de contorno gerados pelo melhor modelo...	145

3.3.5 - Validação e discussão do melhor modelo CoMFA obtido, de acordo com predição dos índices de atividade de um grupo teste de moléculas	150
CAPÍTULO IV - Estudo B3LYP/6-31G(d) de NNRTI:	
Uma representação qualitativa da similaridade quântica molecular	154
4.1 - Introdução.....	154
4.2 - Métodos computacionais	156
4.3 - Resultados e discussão	157
CAPÍTULO V - Considerações finais.....	175
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	179

RESUMO

A inibição da enzima transcriptase reversa do vírus HIV-1 (RT) é uma das estratégias propostas para se combater a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). As enzimas protease e integrase são dois outros alvos pesquisados contra este vírus. Os inibidores da RT causam a terminação do crescimento do DNA durante a transcrição reversa. Estes inibidores são classificados em dois grupos, dependendo se a sua interação será efetuada ou não com o sítio ativo do substrato. Ao primeiro grupo pertencem os 2'-3'-dideoxynucleosídeos (ddNs) e seus derivados, como por exemplo o AZT, DDC, DDI, o D4T e a lamivudina. Ao segundo grupo pertence a classe de inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa do HIV-1 (NNRTI). Estes compostos são inibidores não competitivos da transcriptase reversa do HIV-1 e não possuem efeito sobre esta enzima do HIV-2.

Esta tese estuda os NNRTI por três abordagens diferentes. Na primeira delas foi realizada a análise conformacional de moléculas da família das tetrahydroimidazobenzodiazepinonas (TIBO). Para isso foi necessária a parametrização total destas moléculas no campo de força AMBER94 a partir de cálculos mecânico-quânticos. Em seguida os parâmetros desenvolvidos foram validados pela comparação com dados experimentais e cálculos computacionais sofisticados. O campo de força AMBER94 modificado foi utilizado em análises conformacionais pseudo-sistemáticas SUMM (Systematic Unbonded Multiple Minimum Search) no vácuo, em água e em clorofórmio. As etapas de redução de dados das buscas foram realizadas pelo método de *clustering*. As energias dos confôrmeros obtidos na análise conformacional em clorofórmio foram ponderadas pela distribuição de Boltzmann e em seguida a equação de Karplus foi utilizada para o cálculo de constantes de acoplamento entre hidrogênios vicinais, cujos valores experimentais foram reproduzidos com boa precisão.

Na segunda abordagem estudou-se comparativamente alguns campos moleculares gerados por seis classes distintas de NNRTI. Em primeiro lugar

realizou-se uma seleção criteriosa de quarenta e nove NNRTI com informações homogêneas de índices de atividade biológica disponíveis na literatura. Em seguida efetuou-se o tratamento destes dados, de acordo com a metodologia CoMFA. Os dados sobre correlações estrutura-atividade (SAR) existentes para estas seis classes de NNRTI se correlacionam bem com campos moleculares obtidos neste trabalho. Desta forma, a metodologia CoMFA mostrou-se útil para a sugestão de substituintes para os NNRTI, pois conseguiu identificar regiões de similaridade das moléculas estudadas, de acordo com os campos estéricos e eletrostáticos destas moléculas, logo, as contribuições dadas por uma classe de NNRTI podem fornecer informações para a sugestão de modificações moleculares em outra classe.

Na última abordagem, buscou-se obter um modelo farmacofórico dos NNRTI por meio da teoria funcional de densidade (DFT), para quinze moléculas em suas conformações bioativas. Dessa forma pode-se localizar vários aspectos do potencial eletrostático comuns às várias classes de NNRTI. Além disto os orbitais de fronteira, HOMO e LUMO foram analisados em conjunto e também demonstraram grande semelhança. Um grupo amida, presente em um dos planos de cada um dos NNRTI estudados também pode ser considerado como um padrão farmacofórico destes compostos. Para enfatizar este resultado, uma análise NBO efetuada indicou uma forte interação do tipo $n(N) \rightarrow \pi^*(C=O)$ nesse grupo.

ABSTRACT

The inhibition of the reverse transcriptase of the HIV-1 (RT) is one of the approaches proposed to combat the Acquired Immuno-Deficiency Syndrome (AIDS). The protease and integrase enzymes are two other research goals against the virus. The RT inhibitors act causing the termination of the DNA grow during reverse transcription. These inhibitors can be classified in two groups based on the fact that their interaction occurs or not at the active site of the substrate. Classified within the first group are drugs such as 2', 3'-dideoxynucleoside (ddN) derivatives, three of which are now licensed for clinical use: azidothymidine (AZT), dideoxycytidine (ddC), didehydrodideoxythymidine (d4T) and 3'-thiadideoxycytidine (3TC) and are up-to-now the first option in the HIV-1 combat. The second group pertains to the non-nucleosides reverse transcriptase inhibitors of HIV-1 (NNRTI). These compound are non-competitive inhibitors structurally diverse, not acting at the active site but in a hydrophobic pocket proximal to the catalytic site, and are not effective against the HIV-2 virus.

This thesis presents three types of computational studies of NNRTI. The first work presents the parameterization of compounds belonging the class of Tetrahydro-imidazo[4,5,1-jk][1,4]-benzodiazepin-2-one (TIBO), in the Cornell et al. force field (J. Am. Chem Soc. 117 (1995) 5179) through *ab initio* and semi-empirical methods. The new parameters were used in the conformational analysis for TIBO R82913 and TIBO R79882. Various conformational search protocols were tested and the pseudo-systematic method SUMM led to the best results. A better understanding of the distribution of conformers was obtained through clustering techniques in the data reduction stages. It was possible to reproduce various experimental data such as the crystallographic structures of the isolated or reverse transcriptase-complexed (RT) molecules. The proton-proton coupling constants (J^3_{HH}) obtained for TIBO through NMR were also reproduced. Cremer and Pople puckering parameters enabled a precise description of both the conformation of

the seven-membered rings and the relative position of the substituents on them. These parameters also demonstrated the efficiency and precision of the two-stage clustering method.

In the third chapter of this thesis a comparative molecular field analysis (CoMFA) of six different classes of NNRTI was done. Initially a selection between forty-nine compounds was done based on the homogeneous biological activity index, available in the literature. Next, data treatment was executed, following the CoMFA methodology. The existing structure/activity correlation for the six NNRTI classes showed an excellent agreement with the molecular field data obtained in this research. Therefore, the CoMFA methodology showed to be appropriate for the investigation of new NNRTI substitutes, since it was capable of identifying regions of molecular similarities of the investigated molecules, based on the electrostatic and steric fields of these molecules. So, the contribution furnishing by a certain NNRTI class can be used to postulate molecular modification of another class of compounds.

Finally, the results of an investigation using the density functional theory, DFT, of fifteen NNRTI in their bioactivity conformation, are present. Not only the results of the calculation were compared directly but also using graphical visualization methods, permitting the identification of molecular similarities. MEP contour maps were design on the two planes of the butterfly like shape conformation of NNRTI, revealing a pattern of similarity. Besides, the HOMO and LUMO frontier orbitals were analysed revealing great similarity. An amide group, present in one of the planes of each of the NNRTI investigated is also a pharmacophoric pattern of these compounds. It is interesting to emphasising that a NBO analysis indicate a interaction of the type $n(\text{N}) \rightarrow (\text{C}=\text{O})$ on these regions.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

Nestes trabalhos utilizaram-se siglas provenientes do idioma inglês. Por isto apresenta-se abaixo, uma listagem completa destes símbolos com os respectivos significados ou traduções. Desta forma v se mantêm as notações originais encontradas na maioria dos trabalhos com inibidores do vírus HIV-1, que podem ser úteis como palavras - chave de eventuais buscas bibliográficas.

RT	enzima transcriptase reversa (“reverse transcriptase”)
NNRTI	não-nucleosídeos inibidores da enzima transcriptase reversa do vírus HIV-1 (“non-nucleosides reverse transcriptase inhibitors”)
FFCLRP-USP	Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
LCCA-USP	Laboratório de computação científica avançada da Universidade de São Paulo
HIV-1	vírus da imunodeficiência adquirida do tipo 1 (“human immunodeficiency virus”)
HIV-2	vírus da imunodeficiência adquirida do tipo 2
RMN	ressonância magnética nuclear
TIBO	tetrahydroimidazobenzodiazepinonas ou tionas
HEPT	hidroxi-etoxi-metilfenil-tiotiminas
DABO	diidro-aquiloxi-benzil-oxopirimidinas
S-DABO	diidro-aquiltio-benzil-oxopirimidinas
NEV	nevirapina
PYR	piridinonas
α -APA	α - anilino-fenilacetamidas
BHAP	bis(heteroaril)piperazinas
SYBYL	pacote de programas da TRIPOS Inc. Este nome também é dado

ao campo de força desenvolvido pela TRIPOS.

QSAR	relações quantitativas entre estrutura química e atividade biológica (“quantitative structure activity relationships”)
3D-QSAR	relações quantitativas em três dimensões entre estrutura química e atividade biológica
PDB	banco de dados <i>Brokhaven</i> de proteínas (Brokhaven protein data bank)
IC ₅₀	concentração inibitória = concentração necessária para inibir 50% de uma atividade enzimática.
CC ₅₀	concentração citotóxica = concentração suficiente para inibir em 50% a atividade normal das células.
SI	Índice de seletividade (CC ₅₀ /IC ₅₀) (“Selectivity index”)
DFT	Teoria funcional da densidade eletrônica (“Density Functional Theory”)
SUMM	“systematic unbonded multiple minimum search”
RESP	“restrained electrostatic potential fitting”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do vírus HIV-1. A RT é representada pelos círculos azuis no interior do organismo. [Stryer, 1996].....	2
Figura 2	Esquema da RT (Figura reproduzida de “ <i>The EMBO Journal</i> , 1998, 17, 15, 4532-4552”)	3
Figura 3	Inibidores ddNs liberados para uso clínico.....	5
Figura 4	Tetrahydroimidazolbenzodiazepinonas (TIBOs).....	9
Figura 5	Principais variações para os confôrmeros de TIBO.....	12
Figura 6	Esquema de uma molécula de HEPT.....	13
Figura 7	Molécula de α -apa (Lorivide, R89439).....	13
Figura 8	Estruturas da série da nevirapina cujos complexos moleculares RT-inibidor são disponíveis. Códigos PDB: 1VRT e 1RTH.....	14
Figura 9	Moléculas de piridinonas selecionadas para testes clínicos.....	15
Figura 10	Esquemas das moléculas de DABO e S-DABO.....	16
Figura 11	BHAP U-90152S - Delarvirdina.....	17
Figura 12	Tipos de átomos para TIBO.....	26
Figura 13	Modelos moleculares utilizados na parametrização de TIBO.....	27
Figura 14	Diagrama para a identificação das posições de substituintes de anéis [Cremer, 1984], de acordo com os parâmetros de dobramento do anel [Cremer e Pople, 1975].....	38
Figura 15	TIBO 82913.....	39
Figura 16	Perfis torcionais dos modelos moleculares utilizados na parametrização das TIBO, obtidas a partir de cálculos HF/6-31G(d).....	45
Figura 17	Cargas RESP.....	46
Figura 18	Correlação entre as freqüências obtidas com o campo de força modificado e com MP2/6-31G(d) para DVM. Eq. da reta: $Y = -73,45 + 0,97X$ ($R = 0,997$, $N = 24$ e $SD = 72,63$).....	51

Figura 19	- (a) 1-metil-3-vinil uréia e (b) uracila	53
Figura 20	Correlação entre as frequências calculadas e estimadas para uracila. (Eq. da reta: $Y = 0,967X$; $r = 0,989$; $SD = 156,4$).....	54
Figura 21	Correlação entre as frequências calculadas e estimadas para MVU. (Eq. da reta: $Y = 1,005X$; $r = 0,994$; $SD = 122,8$)	55
Figura 22	Correlação entre as frequências calculadas e estimadas para DBHZ. (Eq. da reta: $Y = 1,126X$; $r = 0,991$; $SD = 242,82$).....	64
Figura 23	Correlação entre as frequências calculadas e estimadas para MDP. (Eq. da reta: $Y = 0,962X$; $r = 0,997$; $SD = 113,33$).....	64
Figura 24	Correlação entre as frequências calculadas e estimadas para MBA. (Eq. da reta: $Y = 0,982X$; $r = 0,998$; $SD = 82,82$).....	65
Figura 25	Correlação entre as frequências calculadas e estimadas para HMZT.....	66
Figura 26	Correlação entre as frequências calculadas e estimadas para CLB...	66
Figura 27	Esquema para a identificação dos átomos da TIBO R79882.....	67
Figura 28	Esquema para a identificação dos átomos da TIBO R82913	69
Figura 29	Gráfico da razão de separação mínima entre os 4 <i>clusters</i> formados <i>versus</i> o nível de <i>clustering</i> , a partir da busca conformacional utilizando a estratégia MMC.....	73
Figura 30	Gráfico da razão de separação mínima entre os 4 <i>clusters</i> formados <i>versus</i> o nível de <i>clustering</i> , a partir da busca conformacional utilizando a estratégia SUMM.....	74
Figura 31	Dendritograma do <i>clustering</i> obtido a partir da busca conformacional MMC.....	74
Figura 32	Dendritograma do <i>clustering</i> obtido a partir da busca conformacional SUMM.....	75
Figura 33	Sobreposição das 4 moléculas representativas das 4 classes principais de confôrmeros de TIBO.....	76
Figura 34	Sobreposição dos <i>clusters</i> estudados. Cada grupo de confôrmeros,	

	TN, SN, TP e SP, podem ser identificados por uma cor diferente.....	77
Figura 35	Gráficos das razões de separação mínima para as 4 famílias confôrmeros de TIBO.....	78
Figura 36	Mosaicos da segunda etapa da análise de confôrmeros com o programa Xcluster.....	79
Figura 37	Diagramas das convergências dos números de <i>clusters</i> formados pelas famílias de confôrmeros. Observe que o número de <i>clusters</i> é igual ao número efetivo de <i>clusters</i> em altos níveis de <i>clustering</i> , convergindo com 5 confôrmeros para TN, TP e SN e confôrmeros para SP.....	80
Figura 38	Moléculas representativas dos cinco <i>clusters</i> considerados para cada família de confôrmeros de TIBO R79882, ou seis para a família SP.....	81
Figura 39	Estruturas representativas dos confôrmeros TN da TIBO R79882.....	83
Figura 40	Estruturas representativas dos confôrmeros SN da TIBO R79882.....	83
Figura 41	Estruturas representativas dos confôrmeros SP da TIBO R79882.....	84
Figura 42	Estruturas representativas dos confôrmeros TP da TIBO R79882.....	84
Figura 43	Variação das contribuições energéticas de campo de força com as conformações de mínima energia.....	86
Figura 44	Estruturas representativas dos confôrmeros TN da TIBO R82913.....	88
Figura 45	Estruturas representativas dos confôrmeros SN da TIBO R82913.....	89
Figura 46	Estruturas representativas dos confôrmeros SP da TIBO	

	R82913.....	89
Figura 47	Estruturas representativas dos confôrmeros TP da TIBO R82913.....	90
Figura 48	Distribuição de Boltzman para os confôrmeros de baixa população da TIBO R82913 em CHCl ₃	104
Figura 49	Análise CoMFA	109
Figura 50	Estrutura da α -APA.....	110
Figura 51	Estruturas das moléculas da família do HEPT.....	111
Figura 52	Estrutura da nevirapina.....	111
Figura 53	Estruturas das moléculas de DABO (composto líder) e S-DABO ...	112
Figura 54	Estruturas das piridinonas.....	113
Figura 55	Estrutura da família da TIBO.....	113
Figura 56	Seis classes de NNRTI incluídas no modelo CoMFA (A) TIBO (B) DABO (C) HEPT (D) piridinonas (E) nevirapina (F) α -APA.....	118
Figura 57	Gráficos da função de alinhamento (A_F) versus código numérico arbitrário para cada um dos 49 NNRTI auto-sobrepostos. Os pontos foram obtidos com o parâmetro α variando entre 0.05, a 0.5 e valores de $W_E=1.0$ e $W_S=1.0$, utilizando-se cargas ESP/AM1.....	122
Figura 58	Gráficos da função de alinhamento (A_F) versus código numérico arbitrário para cada um dos 49 NNRTI auto- sobrepostos. Os pontos foram obtidos com o parâmetro α variando entre 0.1, a 0.5 e valores de $W_E=1.0$ e $W_S=1.0$, utilizando-se cargas ZDO/AM1.....	124
Figura 59	Gráficos da função de alinhamento (A_F) versus código numérico arbitrário para cada um dos 49 NNRTI auto-sobrepostos. Os pontos foram obtidos com o parâmetro α variando entre 0.1, a 0.5 e valores de $W_E=1.0$ e $W_S=1.0$, utilizando-se cargas Gasteiger-Huckel.....	125
Figura 60	Alinhamentos dos 49 NNRTI utilizando os pesos 1 e 10 para as	

	contribuições estéricas e eletrostáticas, respectivamente.....	131
Figura 61	Alinhamentos dos 49 NNRTI utilizando os pesos 10 e 1 para as contribuições estéricas e eletrostáticas, respectivamente.....	132
Figura 62	Diagrama para a escolha do número ótimo de componentes para o modelo 1, espaçamento de grade 2,0 Å, cargas ZDO/AM1.....	136
Figura 63	Diagrama para a escolha do número ótimo de componentes para o Modelo 3, espaçamento de grade 1,0 Å, cargas ZDO/AM1.....	137
Figura 64	Diagrama para a escolha do número ótimo de componentes para o Modelo 20, espaçamento de grade 1,0 Å, cargas ESP/AM1.....	137
Figura 65	CoMFA obtido a partir de uma alinhamento SEAL, utilizando-se cargas ESP. A molécula HEPT3 está indicada como referência.....	142
Figura 66	CoMFA obtido a partir de uma alinhamento SEAL, utilizando-se cargas ZDO/AM1. A molécula HEPT3 é indicada como referência.....	142
Figura 67	Análise do número de componentes e espaçamentos de grade utilizados.....	144
Figura 68	Mapas de contorno dos campos moleculares utilizando a molécula AAPA1 como referencia para a análise.....	146
Figura 69	Mapas de contorno dos campos moleculares utilizando a molécula DABO1 como referencia para a análise.....	147
Figura 70	Mapas de contorno dos campos moleculares utilizando a molécula TIBO3 como referencia para a análise.....	148
Figura 71	Mapas de contorno dos campos moleculares utilizando a molécula PYR1 como referencia para a análise.....	149
Figura 72	Mapas de contorno dos campos moleculares utilizando as moléculas HEPT1 (a) e nevirapina (b) como referência.....	149
Figura 73	Estrutura da família da TIBO utilizadas no grupo de teste.....	151
Figura 74	Correlação linear entre os $-\text{LogIC}_{50}$ experimentais e preditos	

	para o grupo de testes ($Y = 1,9 + 0,77X$; $R = 0,874$; $SD = 0,55$).	152
Figura 75	MEP de AAPA1.....	159
Figura 76	Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões de planares da molécula AAPA1.....	161
Figura 77	Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões de planares da molécula AAPA4.....	161
Figura 78	Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões de planares da molécula AAPA6.....	162
Figura 79	Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões de planares da molécula nevirapina.....	162
Figura 80	Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões de planares da molécula DABO1.....	163
Figura 81	Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões de planares da molécula DABO2.....	163
Figura 82	Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões de planares da molécula DABO3.....	164
Figura 83	Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões de planares da molécula DABO5.....	164
Figura 84	Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões de planares da molécula HEPT2.....	165
Figura 85	Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões de planares da molécula HEPT3.....	165
Figura 86	Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões de planares da molécula PYR1.....	166
Figura 87	Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões de planares da molécula TIBO1	166
Figura 88	Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões de planares da molécula TIBO2	167
Figura 89	Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas	

	regiões de planares da molécula TIBO4	167
Figura 90	Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões de planares da molécula TIBO7.....	168
Figura 91	Orbitais HOMO (acima) e LUMO (abaixo) de moléculas da classe das α -APA. (a) e (b) AAPA1, (c) e (d) AAPA4, (e) e (f) AAPA6.....	169
Figura 92	(a) HOMO e (b) LUMO da nevirapina.....	170
Figura 93	(a) HOMO e (b) LUMO da molécula PYR1.....	171
Figura 94	Orbitais HOMO (acima) e LUMO (abaixo) para as moléculas HEPT1 (a) e (b), HEPT2 (c) e (d) e HEPT3 (e) e (f).....	171
Figura 95	Orbitais HOMO (acima) e LUMO (abaixo) para as moléculas da família DABO. (a) e (b) DABO1, (c) e (d) DABO2, (e) e (f) DABO3 e (g) e (h) DABO5.....	172
Figura 96	Orbitais HOMO (acima) e LUMO (abaixo) para as moléculas da família TIBO. (a) e (b) TIBO1, (c) e (d) TIBO2, (e) e (f) TIBO4 e (g) e (h) TIBO7.....	173

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Índices de atividade, seletividade e toxicidade de algumas TIBO e o AZT.....	11
Tabela 2	Tipos de átomos AMBER94 para TIBO.....	26
Tabela 3	Constantes de força para estiramentos de TIBOs obtidas com o programa PAPQMD.....	42
Tabela 4	Constantes de força para deformações angulares de TIBOs obtidas com o PAPQMD.....	43
Tabela 5	Parâmetros torcionais para TIBO.....	44
Tabela 6	Parâmetros para a avaliação do ajuste de cargas ao MEP.....	47
Tabela 7	Distâncias (Å) e ângulos (°) de equilíbrio obtidos para DMZ em diferentes níveis de teoria.....	48
Tabela 8	Distâncias de ligação de equilíbrio obtidas com MP2/6-31G(d).....	48
Tabela 9	Ângulos de ligação de equilíbrio obtidas com MP2/6-31G(d).....	49
Tabela 10	Comparação das geometrias otimizadas de DMZ dadas pelo campo de força com aquelas obtidas com MP2/6-31G(d).....	51
Tabela 11	Frequências vibracionais (cm ⁻¹) para DMZ obtidas com diferentes níveis de teoria.....	52
Tabela 12	Comparação de parâmetros geométricos de equilíbrio das geometrias otimizadas de uracila e MVU pelo campo de força e com MP2/6-31G(d).....	54
Tabela 13	Comparação de distâncias de ligação de equilíbrio dadas pelo campo de força e por MP2/6-31G(d)	56
Tabela 14	Comparação dos ângulos de ligação de equilíbrio dadas pelo campo de força e por MP2/6-31G(d).....	57
Tabela 15	Frequências vibracionais (cm ⁻¹) para DBHZ obtidas com MP2/631G(d) e com o campo de força modificado.....	58
Tabela 16	Frequências vibracionais (cm ⁻¹) para MDP obtidas com HF/6-	

	31G(d) e com o campo de força modificado.....	59
Tabela 17	Freqüências vibracionais (cm^{-1}) para MBA obtidas com MP2/631G(d) e com o campo de força modificado.....	60
Tabela 18	Freqüências vibracionais (cm^{-1}) para HMZT obtidas com MP2/6-31G(d) e com o campo de força modificado.....	61
Tabela 19	Freqüências vibracionais (cm^{-1}) para CLB obtidas com MP2/6-31G(d) e com o campo de força modificado.....	62
Tabela 20	Comparação das distâncias de ligação da TIBO R79882 obtidas com diferentes níveis de teoria.....	63
Tabela 21	Comparação dos ângulos de ligação da TIBO R79882 obtidas com diferentes níveis de teoria.....	68
Tabela 22	Distâncias (em Å) para a TIBO R82913 obtidos em vários níveis de teoria, em comparação com dados experimentais cristalográficos....	69
Tabela 23	Ângulos de ligação (em graus) para a TIBO R82913 obtidos em vários níveis de teoria, em comparação com dados experimentais cristalográficos.....	70
Tabela 24	Comparação das estratégias MMC e SUMM de busca conformacional.....	72
Tabela 25	Ângulos diedros selecionados dos confômeros obtidos para a TIBO R79882. Estes diedros foram utilizados como parâmetros variáveis das buscas conformacionais por <i>clustering</i>	82
Tabela 26	Energias totais, torcionais e dos termos não-ligados em Kcal/Mol obtidas para TIBO R79882 com o campo de força modificado (E_T = energias estéricas totais, E_{VDW} = energias de interações de van der Walls, E_{ELEC} = energias de interações eletrostáticas e E_{TOR} = energia relativa às torções).....	85
Tabela 27	Dados da busca conformacional para a TIBO R82913.....	86
Tabela 28	Ângulos diedros selecionados dos confômeros da TIBO R82913. Estes diedros foram utilizados como parâmetros variáveis das	

	buscas conformacionais por <i>clustering</i>	91
Tabela 29	Ângulos diedros selecionados dos confômeros de TIBO R82913 em clorofórmio.....	92
Tabela 30	Ângulos diedros selecionados dos confômeros de TIBO R82913 em água.....	93
Tabela 31	Diferenças relativas de energia em Kcal Mol ⁻¹ para a TIBO R82913 em CHCl ₃	95
Tabela 32	Diferenças relativas de energia em Kcal Mol ⁻¹ para a TIBO R82913 em H ₂ O.....	96
Tabela 33	Parâmetros de dobramento obtidos para a TIBO R79882.....	99
Tabela 34	Parâmetros de dobramento para TIBO R82913.....	100
Tabela 35	Parâmetros de dobramento para TIBO R82913 em CHCl ₃	101
Tabela 36	Parâmetros de dobramento para TIBO R82913 em H ₂ O.....	102
Tabela 37	Constantes de acoplamento entre prótons vicinais (J ³ em Hz) obtidas a partir a Equação de Karplus e de ¹ H-RMN (1) para a TIBO R82913.....	104
Tabela 38	Momentos de dipolo totais calculados para a molécula de TIBO R82913.....	105
Tabela 39	Moléculas da família das α -APA selecionadas.....	111
Tabela 40	Moléculas da família das HEPT e nevirapina selecionadas.....	112
Tabela 41	DABO e moléculas da família da S-DABO selecionadas.....	112
Tabela 42	Moléculas da família das piridinonas selecionadas.....	113
Tabela 43	Moléculas da família da TIBO selecionadas.....	114
Tabela 44	Moléculas selecionadas a partir do PDB.....	115
Tabela 45	Análises CoMFA da série de 49 NNRTI.(Ws = 10,0 e We = 1,0 e cargas AM1).....	134
Tabela 46	Análises CoMFA da série de 49 NNRTI (Ws = 1,0 e We = 10,0 para $\alpha = 0,1$ e cargas AM1).....	134
Tabela 47	Análises CoMFA da série de 49 NNRTI. (Ws = 1,0 e We = 1,0 para	

	$\alpha = 0,1$ e cargas AM1)	135
Tabela 48	Análises CoMFA da série de 49 NNRTI. ($W_s = 10,0$ e $W_e = 1,0$ e cargas Gasteiger-Huckel).....	135
Tabela 49	Análises CoMFA da série de 49 NNRTI para a avaliação de átomos de prova e campo hidrofóbico com cargas ESP/AM1 e $\alpha = 0,05$	139
Tabela 50	Análises CoMFA efetuadas com a exclusão de algumas classes de NNRTI para a verificação de outliers.....	140
Tabela 51	Moléculas da família da TIBO selecionadas para o grupo de testes.	151
Tabela 52	Moléculas de NNRTI otimizadas com B3LYP/6-31G(d).....	157
Tabela 53	Resultados selecionados dos cálculos B3LYP/6-31G(d) de NNRTI..	158

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A química computacional foi definida por Tony Hopfinger, um dos primeiros pesquisadores do assunto, como “a modelagem quantitativa do comportamento químico em um computador, por meio do formalismo da química teórica”. [Hopfinger, 1984] A química teórica é a parte da química que desenvolve teorias para descrever propriedades da matéria experimentalmente esperadas. Deste modo, a química computacional seria a implementação de algoritmos computacionais que exploram estas teorias para a predição de propriedades mensuráveis ou não. A química medicinal se utiliza de variados métodos da química computacional para a descoberta de um ligante biologicamente ativo, candidato a novo fármaco, e o seu desenvolvimento ou otimização em busca das melhores condições de atividade biológica, através de modificações na estrutura deste composto.

Nos anos recentes, a disponibilidade de estruturas tridimensionais detalhadas de proteínas e seus complexos com diversos ligantes, têm revolucionado os processos de projetos de fármacos, uma vez que os sítios de ação destes compostos podem ser explorados experimental e computacionalmente a nível molecular. Todavia, nem sempre se consegue a cristalização destes complexos, ou ainda estas informações não são disponíveis. Nestes casos geralmente se procura a utilização de métodos indiretos. A identificação de características moleculares que se relacionam com uma certa atividade, é de crucial importância. Estas características podem ser representadas por vários tipos de propriedades (tais como LogP, refratividade molar, volume ou conjuntos de cargas atômicas parciais) ou características moleculares como a presença de átomos ou

grupos doadores ou aceptores de hidrogênio, grupos polares, hidrofóbicos ou aromáticos.

A presença e posicionamento relativo de um certo conjunto de propriedades estruturais, dentro de um grupo de moléculas com mesma atividade, constituem um farmacóforo. [Gund, 1977, Veerapandian, 1995] Na ausência de estruturas tridimensionais detalhadas, o farmacóforo desempenha uma função chave para a química medicinal, embora a proposição de um padrão farmacofórico a partir de um grupo de moléculas ativas, nem sempre seja um processo fácil. Por isto, várias técnicas e estratégias têm sido propostas e utilizadas, [Johnson e Maggiora, 1990; Dean, 1995] onde destaca-se a utilização de métodos computacionais.

Nesta tese, abordam-se estudos computacionais sobre inibidores da enzima transcriptase reversa do vírus HIV-1 (RT), com o objetivo de fornecer subsídios para o entendimento da ação destes compostos.

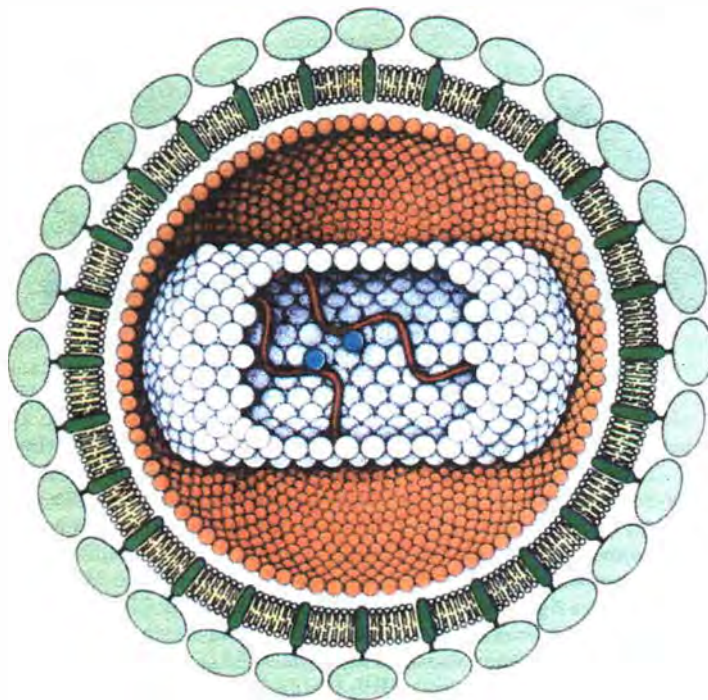


Figura 1 - Representação esquemática do vírus HIV-1. A RT é representada pelos círculos azuis no interior do organismo. [Stryer, 1996]

O HIV-1 (Figura 1), como outros retrovírus, mantém a herança genética no RNA, ao invés do DNA. Após a infecção, ocorre a transcrição do RNA de fita simples em DNA complementar, degradação do RNA molde (“template”) original e conversão deste em DNA proviral, de fita dupla (dsDNA), que irá se integrar no genoma celular. [Varmus, 1987 e Sarin, 1988] A única enzima que irá catalisar este processo é a transcriptase reversa. Em células infectadas a RT é a única polimerase encontrada no citoplasma. Esta enzima é encontrada em poucos procariotos ou eucariotos, sendo assim um alvo antiretroviral favorável para quimioterapia.

A RT é um heterodímero composto pôr duas subunidades inter-relacionadas, uma cadeia com 560 aminoácidos (66kD) e outra com 440 aminoácidos (51 kD), Figura 2. Na cadeia maior (p66) estão os receptores da protease e da ribonuclease H (RNaseH). Nesta última ocorre a degradação do RNA.[Jacobo-Molina e Arnold, 1991] O domínio de proteólise está situado no amino terminal e o da RNaseH no C-terminal. A cadeia menor (p51) possui estrutura primária semelhante ao N-terminal da p66, sendo derivada da clivagem da cadeia p66 pela ação da protease do HIV-1. [Romero, 1994]

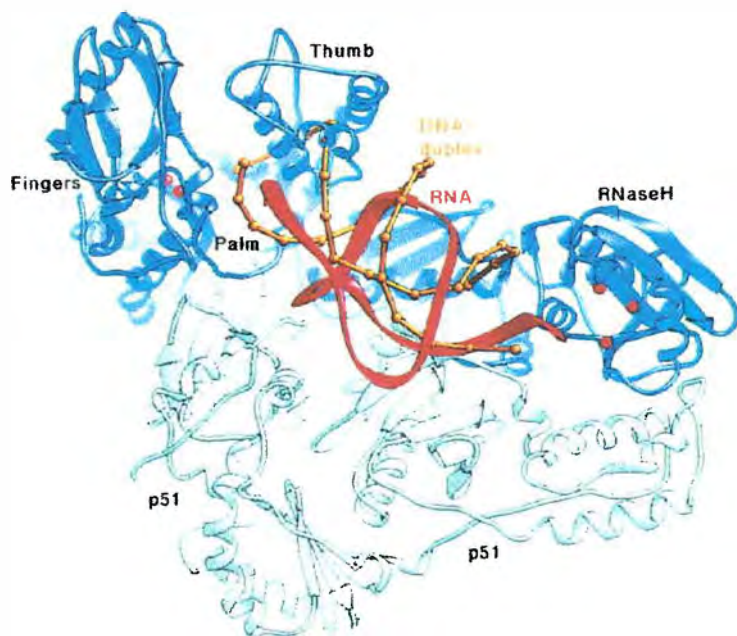


Figura 2 – Esquema da RT. Esta figura foi reproduzida de “*The EMBO Journal*, 1998, 17, 15, 4532-4552”.

Várias formas cristalinas de estruturas da RT foram elucidadas: isolada, [Esnouf et al., 1995; Rodgers, et al., 1995; Patel, 1995] complexada com DNA, [Jacobo-Molina, et al., 1993] complexada com seqüências falsas de RNA (outra classe de inibidor) [Jaeger, Restle e Steitz, 1998] e em combinação com vários inibidores quimicamente diversos (NNRTI) [Kohlstaedt, et al., 1992; Smerdon et al., 1994; Ding et al., 1995A e 1995B; Das, 1996, Hopkins, et al., 1999; Ren et al., 1995A e 1995B] A partir destes dados pode-se concluir que a RT é uma enzima bastante flexível e que o sítio de ação dos NNRTI não existe, caso um inibidor não estiver ligado. [Ding, 1995B]

O domínio de protease da cadeia p66 é composta de quatro subdomínios e possui o formato de uma mão. O polegar, a palma e os demais dedos assumem o formato de U. O sítio ativo da polimerase se situa na parte inferior deste U, na palma. [Kohlstaedt, et al., 1992] Este, e o demais sub-domínios possuiriam a função de fixação do complexo molde-iniciador (“template-primer”). [Jacobo-Molina, et al., 1993] Próximo ao sítio catalítico da protease encontra-se o sítio de ligação dos NNRTI, em uma região hidrofóbica. [Kohlstaedt, et al., 1992; Ding et al., 1995B; Ren et al, 1995A; Das, 1996; Hsiou et al., 1996] A RNaseH é separada da polimerase por 18 bases (em torno de 60 Å), consistente com estimativas obtidas por várias técnicas, [Jacobo-Molina, 1991] a dsDNA apresenta uma dobra de 40-45° entre os domínios, com várias implicações funcionais. [Jacobo-Molina, 1993] A cadeia p51 possui estruturas primária e secundária semelhantes à protease da p66, mas é desprovida de ação catalítica, pois seu arranjo espacial é substancialmente diferente. Uma comparação de três estruturas cristalinas da RT revelam que a molécula tem uma enorme flexibilidade específica que permite a rotação do sítio ativo de polimerase em relação ao restante da mesma. Esta liberdade conformacional permitiria a acomodação dos movimentos rotacionais e translacionais necessários ao crescimento da fita dupla de ácidos nucléicos na fase inicial da transcrição, ainda enquanto o tRNA estiver ligado. [Jaeger et al., 1994]

Os inibidores da RT são classificados em dois grupos, dependendo se a sua interação será efetuada ou não com o sítio ativo do substrato. [DeClercq, 1992, 1993, 1996, 1999] Os primeiros compostos inibidores da RT empregados na quimioterapia antiretroviral foram os 2'-3'-dideoxynucleosídeos (ddNs) (figura 3) e seus derivados, como AZT (3'-azido, 2',3'-dideoxitimidina, zidovulina, Retrovir), [Mitsuya, Yar et al. 1990; Langtry e Campoli-Richards, 1989; Rachlis, 1990] DDC (2',3'-dideoxicitina, zalcitabina, HIVID), [Whittington e Brodgen, 1992] DDI (2'-3'-dideoxinosina, didanozina, Videx), [Fauld e Brodgen, 1992] D4T (2',3'-dideidro-3'-dideoxitimidina, estavidina, Zerit) [Lin et al. 1987] e os nucleosídeo-fosfonatados acíclicos (ANPs), [De Clercq, 1992] que são alguns dos medicamentos utilizados atualmente no combate à infecção pelo HIV-1 na prática clínica.

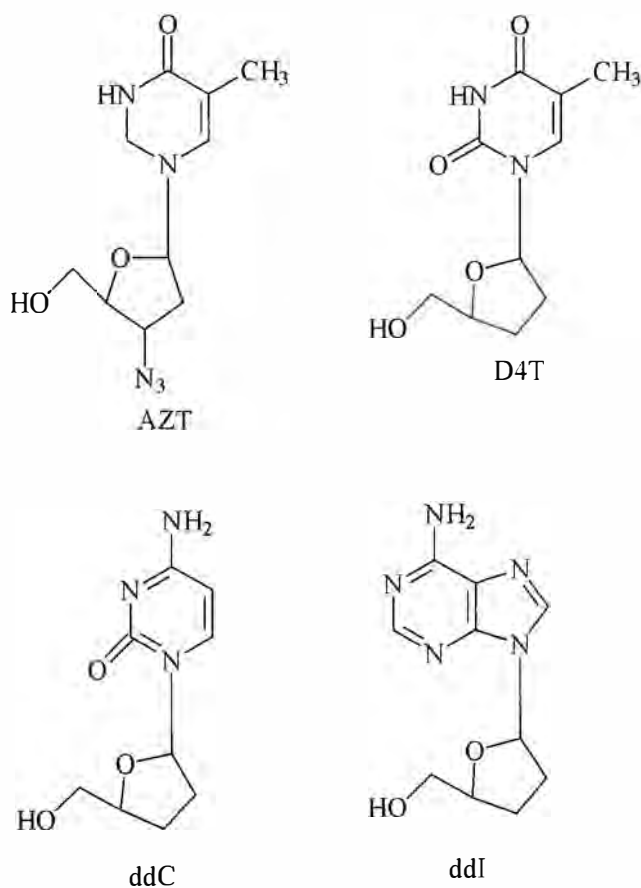


Figura 3 - ddNs liberados para uso clínico.

Os ddNs são estruturalmente similares aos substratos naturais da RT (nucleosídeos). [Artico, 1993] Assim como os nucleosídeos, os ddNs devem sofrer uma dupla fosforilação para então serem incorporados ao DNA viral. Estes compostos provocam diversos efeitos colaterais, tais como: anemia, pancreatite, miopatia mitocondrial, neuropatia periférica, etc, [DeClercq, 1999] devido à sua ação em várias outras proteases da célula hospedeira.

Devido à toxicidade e ao rápido aparecimento de resistência aos ddNs, buscou-se novos inibidores da RT. Diversas classes de inibidores não-competitivos, com estruturas químicas extremamente variadas foram encontradas. [DeClercq, 1999] Além de não-competitivos, estes compostos mostraram-se altamente específicos, não possuindo efeito sobre esta enzima do vírus HIV-2 e possuindo uma região de interação hidrofóbica comum, próximo ao sítio ativo de polimerase. Os ligantes que apresentam estas propriedades em comum são freqüentemente nomeados de NNRTI.

Primariamente a ação de inibição destes compostos foi atribuída a alterações conformacionais, especificamente distorções no sítio ativo de polimerase que seriam capazes de provocar uma interrupção dos movimentos do “polegar”, essenciais ao ciclo catalítico, [Kohlstaedt, et al., 1992; Smerdon et al., 1994] ou alterando a orientação de grupos carboxilato envolvidos na catálise. [Ren et al., 1995A] Posteriormente verificou-se que as interações da RT com inibidores não competitivos são capazes de bloquear a reação de polimerização diminuindo gradativamente a velocidade desta reação sem alterar drasticamente a formação das ligações nucleotídicas, ou seja, sem provocar alterações conformacionais expressivas. [Spence et al., 1995]

Os diversos complexos cristalinos RT/NNRTI elucidados permitem uma descrição geral da a região hidrofóbica comum de interação com estes inibidores. Basicamente estes compostos se ligam em torno de 10 a 15Å do sítio ativo de polimerase, entre os resíduos de aminoácidos da região de loop das fitas $\beta 5$ - $\beta 6$, fita

β_6 , voltas β_9 - β_{10} e β_{12} - β_{13} e fita β_{15} da cadeia P66, além da região do loop de conexão com a cadeia P51 (fitas β_7 - β_8). [Hsiou et al., 1996] De acordo com a elucidação de uma estrutura isolada da RT reportada por Esnouf et al. [Esnouf et al., 1995], na região das fitas β_6 - β_{10} - β_{10} e β_{12} - β_{13} - β_{14} existe uma pequena cavidade hidrofóbica onde os NNRTI se ligam pela interação com as cadeias laterais dos aminoácidos Tyr181, Tyr188, Phe227 e Try229. [Esnouf et al., 1995, Hsiou et al., 1996] Quando os NNRTI estão ligados ocorre uma reorientação das cadeias laterais dos resíduos Tyr181 e Tyr188, [Esnouf et al., 1995] causando um colapso no processo de transcrição reversa. Este mecanismo também é suportado por estudos cinéticos da inibição por NNRTI. [Spence et al., 1995] Além disto, a maioria dos padrões de resistência viral observados são originados por mutações pontuais que ocorrem com aminoácidos destas regiões. [Schinazi et al., 1997]

Algumas das principais classes de NNRTI são: tetrahydro-imidazol-benzodiazepinonas (TIBOs) [Pauwels et al., 1990, Debyser et al., 1991, White et al., 1991 e Pauwels et al., 1994] hidroxietoximetil-feniltiotiminas (HEPT), [Baba et al., 1991A e 1991B] dipiridro-diazepinonas (nevirapina), [Merluzzi et al., 1990; Koup, 1991] piridinonas, [Saari et al., 1991 e 1992; Hoffman et al., 1992; Wai, et al., 1993] bis(heteroaril)piperazinas (BHAP), [Dueweke et al., 1993; Romero et al., 1993] análogos de nucleosídeos do tercbutil-dimetilsililespiroaminoxatiolenedióxido (TSAO), [Balzarini et al., 1992] derivados da α -anilino-fenilacetamida (α -APA), [Pauwels et al., 1993] Feniletiltiazoltioureas (PETT), [Ahgren et al., 1995] ariltiazolbenzimidazoles (TBZ), [Buckheit-Jr. et al., 1993] diidroalquil-benziloxopirimidinas (DABO), [Ártico, 1996] e pirrolbenzo-tiodiazepinas. [Di Santo, et al., 1998]

O surgimento de novos procedimentos terapêuticos, como a combinação de fármacos em “coquetéis anti-HIV” justificam o interesse pelos NNRTI. Três destes fármacos foram aprovados para o uso em humanos: nevirapina (Viramune), delarvidina (Rescriptor) e DMP266 (Efavirenz). [Declercq, 1996; Young et al., 1995]

A seguir são fornecidas informações sobre os NNRTI estudados neste trabalho, além de outros compostos que compreendem as substâncias mais relevantes destas classes, de acordo com o interesse da comunidade científica dada por suas peculiaridades da interação com a RT. Entre estas informações, os estudos qualitativos da relação entre estrutura química e atividade biológica (SAR) serão especialmente úteis para as discussões do terceiro capítulo da tese. Posteriormente, apresenta-se uma breve revisão da literatura sobre as propostas de farmacóforos para estes compostos.

Tetrahydroimidazobenzodiazepinonas ou tionas (TIBO)

Entre 90 mil compostos químicos disponíveis no repositório da “Janssen Research Fondation”, dois mil foram selecionados e testados contra a enzima RT do HIV-1, em busca de um novo composto líder com estrutura distinta dos ddNs. No final de 1987 o composto líder foi identificado com: 4,5,6,7-tetrahydro-5-metilimidazo[4,5,1-jk]-[1,4]-benzodiazepin-2(1H)-ona (R14458, Figura 4), chamado por TIBO e apresentando $EC_{50} = 612\mu\text{M}$ e S.I. = 10.[Pauwels et al. 1990A e 1990B, Pialoux et al. 1991] Embora apresente baixa atividade, este composto foi o primeiro exemplo de NNRTI com boa seletividade e baixa toxicidade. Estas características foram inicialmente atribuídas aos efeitos farmacológicos tipo “diazepam”, mostrados por derivados que contêm o arranjo molecular 1,4-benzodiazepina.

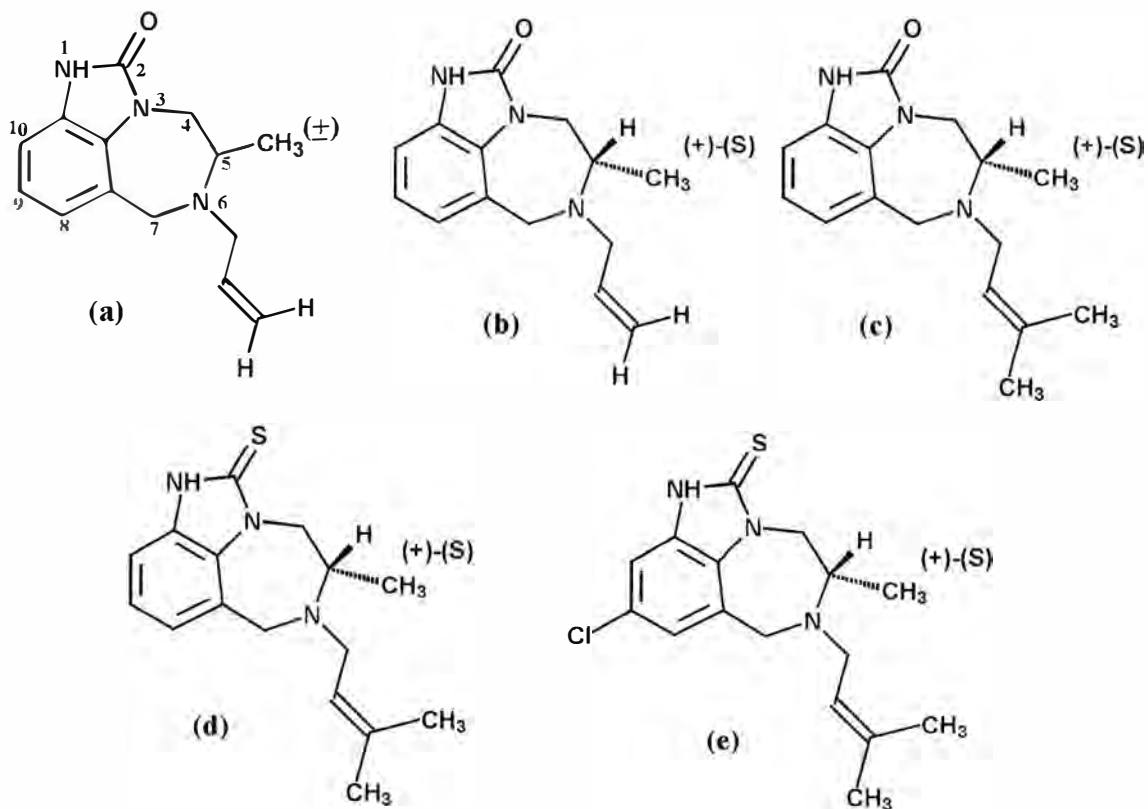


Figura 4 - Tetrahydroimidazolbenzodiazepinonas (TIBOs). (a) R14458 (composto líder), (b) R70305, (c) R80902, (d) R82150, (e) R82913.

A especificidade sem precedentes de TIBO e derivados, que se mostraram eficazes contra a RT do HIV-1 em concentrações que foram de 10 mil à 100 mil vezes menores que aquelas requeridas para afetar a viabilidade normal das células, despertou atenção especial por estas substâncias.

Conseqüentemente, estes fatores estimularam o início de um programa de síntese baseados no composto R14458. O isolamento dos dois isômeros ópticos do composto líder mostrou que apenas o isômero (+)-(S), (R78305, Figura 4(b)) inibe a replicação do HIV-1. Com isto a configuração (+)-(S) foi requerida para todos os análogos de TIBO (TIBOs) sintetizados posteriormente. A introdução de dois grupos metílicos na cadeia alílica substituinte em N6 proporcionou um aumento de dez vezes na potência e seletividade desta espécie (composto R80902, Figura 4(c)). Outra característica estrutural importante que proporcionou incremento na

atividade das TIBOs foi a substituição do o oxigênio do anel imidazólico por um enxofre, fornecendo o composto R82150 (Figura 4(d)), centenas de vezes mais ativo que o composto líder. A introdução de um átomo de cloro no carbono C9 do anel fenílico produziu o composto R82913 [White et al., 1991] (Figura 4 (e)), o melhor análogo de TIBO entre os então sintetizados. Este composto é ativo em concentrações nanomolares com valores de IC_{50} em torno de 20-30 nM. Quando comparado com o composto líder R14458, o resultado mostra-se acima de dez mil vezes mais ativo com uma mudança desprezível na toxicidade. Mais recentemente um derivado com cloro na posição C8 (R86183), resultado da síntese de uma nova série de TIBOs, mostrou-se melhor em atividade ($IC_{50}=1-5nM$) e seletividade ($SI=10mil - 100mil$).

Estudos qualitativos da relações entre estrutura química - atividade biológica (SAR) de TIBO, [Mathé et al., 1994; Pauwels et al., 1994; Breslin et al., 1995 e Ho et al., 1995] indicaram que a estereoquímica de um grupo metila na posição C7 do anel tricíclico imidazobenzodiazepina é um fator relevante. O grupo 3-metil-2-butenil na posição 6 é o melhor substituinte [Kukla, et al., 1991A] (Figura 4). Modificações no anel de cinco membros diminuem a atividade, com exceção da substituição do átomo de oxigênio (tipo uréia) por enxofre (tiouréia), que causa um grande aumento da atividade. [Kukla, et al., 1991B] A atividade anti-HIV-1 depende da estereoquímica do substituinte metila no carbono 5. [Kukla, et al., 1991A] Compostos metilados no carbono 7 são os únicos outros derivados com índices de atividade comparáveis. [Breslin et al., 1995] Substituintes no anel aromático (posições 8 e 9) também contribuem para a atividade, sendo que os derivados 8-substituídos (incluindo halogêneos, tiometil, metil, ciano, metoxi e acetil) mostram os melhores resultados, destacando que o análogo clorado (TIBO R86183 ou Tibo8Cl) foi selecionado para testes clínicos. [DeClerck, 1996]

A Tabela 1 apresenta parâmetros de atividade, seletividade e toxicidade de algumas TIBO, [Artico, 1996] além dos mesmos parâmetros para o AZT. [Rachlis,

1990] A comparação destes valores constituiu outra boa justificativa para o interesse de se estudar estes compostos.

Tabela 1 – Índices de atividade, seletividade e toxicidade de algumas TIBOs e o AZT.

Composto	CC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	SI = CC ₅₀ / IC ₅₀
R14458	621	59	10
R78305	681	67	10
R80902	470	4	112
R82150	552	0,0440	12545
R82913	34	0,0033	1030
R86775	53	0,0030	17667
R86183	138	0,0046	30000
R84674	80	0,0140	5714
AZT	52	0,04	1300

Alguns problemas referentes à síntese deste compostos [Pawells et al., 1994] e desenvolvimento de resistência viral [Mellors, 1992, 1993; Balzarini, 1993] dificultam a colocação de uma droga desta classe no combate efetivo ao vírus HIV-1. Apesar disto, esta molécula tem sido o mais útil molde para o estudo das relações estrutura química-atividade biológica de NNRTI. Este fato tem levado alguns NNRTI que interagem da mesma forma com a enzima transcriptase reversa (RT) serem designados como "inibidores tipo TIBO" (ou "TIBO-like antiviral profile"), apesar de apresentarem estruturas moleculares distintas. [Pauwels et al., 1993]

Alguns trabalhos têm se dedicado ao estudo estrutural destes compostos. No monocristal da TIBO R82913 a molécula apresenta duas conformações que interagem por ligações de hidrogênio.[Liaw et al., 1991] Caldwell et al. estudaram a conformação da TIBO R82913 e de uma solução salina da TIBO em HCl a partir

de RMN de ^1H em diferentes temperaturas. Este estudo indicou a principal característica que diferencia os conformêros de TIBO é a inversão do anel provocada pela interconversão do nitrogênio N6, rotação em torno de N6 - C5 e a própria inversão do anel pela torção do diedro C13 - C7 - N6 - C5 (Figura 5). [Caldwell et al., 1993]



Figura 5 - Principais variações para os conformêros de TIBO.

Além disto, estes autores também efetuaram cálculos empregando o método semi-empírico PM3 para determinar as barreiras energéticas de um número limitado de conformêros. Outro trabalho de RMN de ^1H e de ^{13}C da TIBO R82913 foi publicado por Leo et al. [Leo et al., 1992]

Hidroxiétoxi-metilfenil-tiotiminas (HEPT)

Os derivados de 1-(2)-hidróxi-etóxi-(metil-6-feniltiotimina) (HEPT), juntamente das TIBO, foram os primeiros compostos que mostraram inibir especificamente o vírus HIV-1, mas não o HIV-2; sendo assim os primeiros NNRTI conhecidos. [Baba et al., 1991A e 1991B]

Estudos SAR destes compostos indicam a importância do grupo metil na posição 5 e de um grupo tio-fenil na posição 6, em relação a outros substituintes nesta posição. [Tanaka et al., 1991] A substituição do grupo metila por um grupo mais lipofílico (etila, isopropila) também aumenta a atividade, [Baba et al., 1991A, Tanaka et al., 1992] além disto, o grupo hidroxila ligado a cadeia do grupo (2)-

hidróxi-etóxi(metil) em N1 é relevante [Tanaka et al., 1991] uma vez que a substituição de 2-hidroximetoxi por etoxi ou benzoxi aumenta a atividade. [Baba et al., 1991A, 1991B] A adição de dois grupos metila no anel tiofenila aumenta a atividade de duas a vinte vezes, dependendo do precursor. [Baba et al., 1991B, Tanaka et al., 1992] A figura 6 apresenta a estrutura de uma molécula representativa desta classe. [Hopkins et al., 1996]

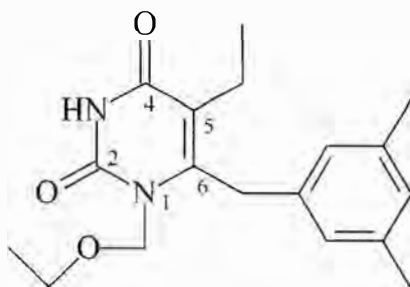


Figura 6 - Esquema de uma molécula de HEPT.

Derivados da α -anilinofenilacetamidas (α - APA)

As α -anilinofenilacetamidas pertencem à outra classe de NNRTI propostas por “screening” e desenvolvidas pelos mesmos autores que desenvolveram as TIBO nos laboratórios da empresa Jansen Farmacêutica, na Bélgica. [Pauwels et al., 1993] Estes compostos apresentam índices de atividade em concentrações nanomolares e de dez a cem mil vezes menores que os índices de toxicidade. Uma mistura racêmica dos compostos R90384 e R90385 foi nomeada de genericamente por lorivide e selecionada para testes clínicos (figura 7). [DeClercq, 1999]

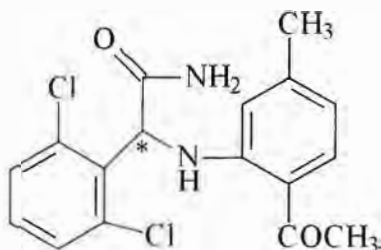
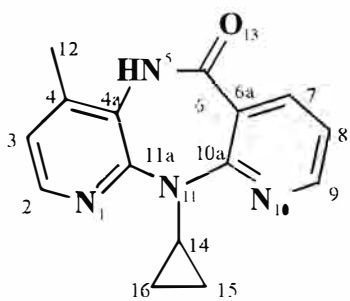


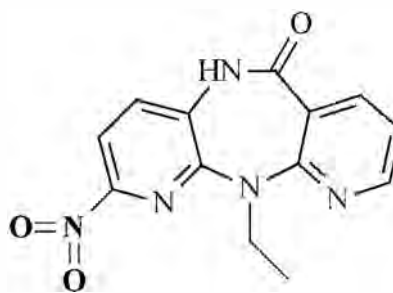
Figura 7 - Molécula de α -apa (Lorivide, R89439).

Dipiridodiazepinonas

Dentro desta classe de NNRTI destaca-se a nevirapina, primeiro NNRTI (BI-RG-587) liberado para uso clínico pela FDA. [Merluzzi et al., 1990; Koup, 1991] Os estudos SAR indicam a necessidade de um grupo alquila (etila ou ciclopropila) ligado no N(11) do anel diazepinona e de um substituinte lipofílico, por exemplo 7-metil na posição para as piridobenzodiazepinas e 4-metil para as dipiridobenzodiazepinas. [Hargrave, et al., 1991] Todos estes requisitos são preenchidos pelo composto 5,11-dihidro-4metil-6H-dipirido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepin-6-ona (nevirapina BI-RG-587, Figura 8). Os complexos nevirapina-RT para BI-RG-587 e de um derivado com NO₂ substituído são disponíveis no PDB. [Ren et al., 1995] Vários dipirido- ou pirido-benzoxazipinas foram descritos como NNRTI, porém apresentam menor atividade. [Klunder et al., 1992]



Nevirapina (BI-RG-587)



1051U91

Figura 8 - Estruturas da série das nevirapinas cujos complexos moleculares RT-inibidor são disponíveis. Códigos PDB: 1VRT e 1RTH.

Piridinonas

Nesta família de compostos [Saari et al., 1991 e 1992; Hoffman et al., 1992; Wai, et al., 1993] os derivados com o grupo benzoxazol mostraram-se mais ativos que os derivados com grupo ftalimida. Além disto, a inclusão de átomos de cloro ou grupos metila no anel aromático aumenta a atividade. Outra característica

marcante é que a substituição do grupo amino-metileno que interliga os anéis, por etileno, aumenta a atividade. Isto levou a identificação do composto L-696,229 (Figura 9) [Saari, et al., 1992] e o análogo estrutural L-697,661; considerados os derivados com maiores índices de seletividade e foram selecionados para testes clínicos. [Hoffman et al., 1992]

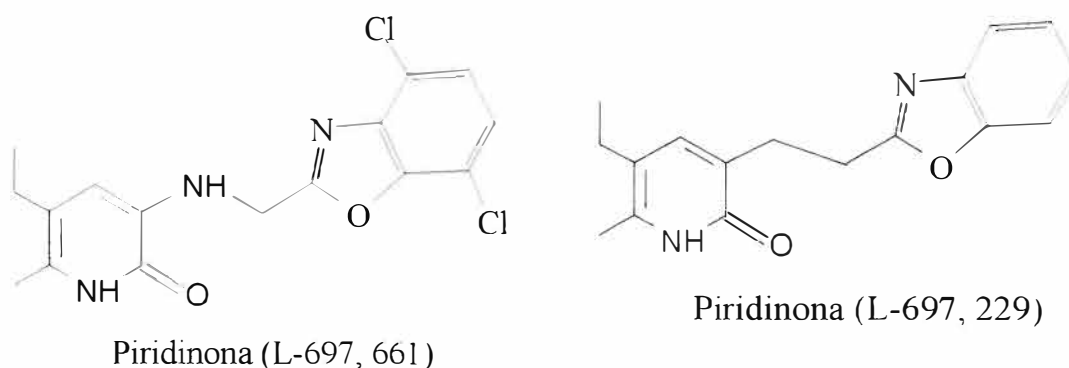


Figura 9 - Moléculas de piridinonas selecionadas para testes clínicos.

Diidro-alquiloxi-benzil-oxopirimidinas(DABO e S-DABO)

Esta classe é uma das mais recentemente estudadas. Estes compostos são estruturalmente semelhantes aos derivados de HEPT e portanto várias informações provenientes de estudo SAR de HEPT foram utilizadas no desenvolvimento destes compostos. [Massa et al., 1995; Ártico, 1996] Estudos SAR desta classe tem mostrado que a presença de um grupo alcóxi (DABO) ou tioalquil (S-DABO) na cadeia lateral se constitui em uma característica estrutural determinante para a atividade destes compostos, onde o tamanho e o tipo do substituinte em C(2), em C(5) e a substituição monometil em C3 ou dimetil em C(3) e C(5) têm pouca influencia na atividade biológica. [Mai et al., 1995] Além disto as seguintes modificações na estrutura influenciam a atividade biológica: (1) modificações na base pirimidínica, tais como alquilação em N(3), (2) introdução de substituintes em C(4), (3) deslocamento do grupo benzil de C(6) para C(5), (4)

modificação na distância entre a pirimidina e o grupo benzil e (5) troca do benzil por substituintes menores como o grupo propila. [Mai et al., 1997 e 1999] Os DABO e S-DABO incluídos neste trabalho foram selecionados a partir de publicações de 1995, 1998 e 1999, e não se encontra na literatura nenhum estudo QSAR, até o momento. A figura 10 apresenta a estrutura da DABO precursora (composto líder), além de uma molécula representativa para S-DABO. [Artico 1999]

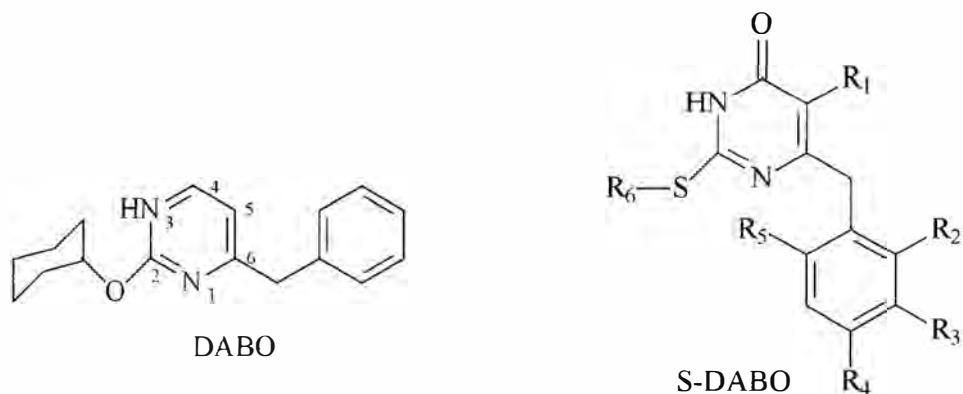


Figura 10 – Esquemas das moléculas de DABO e S-DABO.

Outros NNRTI

Entre outras moléculas de NNRTI bastante relevantes, podem-se destacar o Efavirenz®, [Yong et al., 1995] produzido pela empresa farmacêutica ROCHE e liberado para uso clínico pelo FDA, [Klein et al., 1995] além dos derivados de BHAP, TSAO, PETT, carboxamida, entre outras substâncias que vêm sendo constantemente classificadas como NNRTI. [DeClerck, 1999]

As bis(heteroaril)piperazinas (BHAP) merecem um comentário especial pois um derivado também já foi liberado para uso clínico pela FDA (delarvidina®). [Dueweke et al., 1993; Romero et al., 1993] O composto líder das BHAP foi o N-etil-2[4]-(metoxi-3,5-dimetilfenil)metil]piperazinil]-3-piridinamina (U80493E). [Romero et al., 1994] O grupo metilênico que liga o anel fenila a piperazina foi substituído por uma carbonila (composto U-85199E) sem alterar a atividade biológica, mas

quando o anel fenila é trocado por um grupo indol (composto U-85961) a atividade é aumentada [Romero et al., 1994]. Depois disto os derivados U87201E (atervidina) e U88204, foram preparados, onde uma nova geração de BHAP pode ser identificada e pode ser representada pela delarvidina (composto U-90152S). A estrutura cristalina desta molécula complexada com a RT foi determinada e está disponível no PDB [Esnouf et al., 1997] (figura 11).

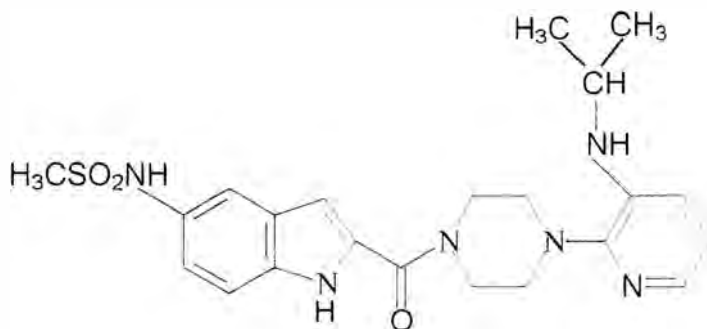


Figura 11 – BHAP U-90152S – Delarviridina.

A estrutura de delarvidina ocupa o mesmo sítio de ação dos NNRTI, porém o complexo RT-NNRTI é estabilizado por interações diferentes das observadas para as outras classes de compostos. Estes tipos de compostos geralmente se destacam como “outliers” em estudos QSAR.

Modelos farmacofóricos

A diversidade química estrutural dos NNRTI vem gerando uma enorme quantidade de informações experimentais sobre estes compostos e suas estruturas. Estas informações da literatura, aliadas a técnicas de modelagem molecular, cálculos envolvendo orbitais moleculares e QSAR/3D-QSAR, têm permitido a proposição de alguns modelos farmacofóricos para estes compostos.

O primeiro destes foi desenvolvido por Schäfer et al. baseado em estudos 3D-QSAR da nevirapina e de TIBO, possibilitando a sugestão de um novo NNRTI,

especificamente uma isoindolidona. [Schafer et al., 1993] Gussio e colaboradores [Gussio et al., 1996] utilizaram a minimização das energias de interações hidrofóbicas entre um derivado da nevirapina e o seu sítio de interação com a RT, calculadas a partir de um campo molecular hidrofóbico denominado HINT. [Kellogg, Semus e Abraham, 1994] Além disto, Gussio e colaboradores utilizaram cálculos baseados na teoria funcional de densidade de uma série congênica de derivados da nevirapina, bem como alguns mapas de contorno proveniente destes cálculos para a elaboração de um farmacóforo interessante, que por sua vez pode sugerir novas substâncias ativas. [Gussio et al., 1996] Em um trabalho de sobreposição de estruturas cristalográficas de quatro inibidores de três classes diferentes e de suas interações com o sítio hidrofóbico de interação com a RT foram observadas várias semelhanças espaciais e conformacionais. [Ren et al., 1995] Todos estes modelos possuem muitos pontos em comum como a existência de dois grupos insaturados separados por uma dada distância e dispostos de tal forma que assumam a conformação tipo borboleta (“butterfly-like conformation”), bem como a presença de grupos funcionais. Algumas destas características foram observadas na sobreposição das estruturas cristalinas da nevirapina e da TIBO. [Schafer et al., 1993] Outro modelo foi desenvolvido por Kroeger-Smith e colaboradores, [Kroeger-Smith et al., 1996] o que envolve cálculos da interação enzima-inibidor. Os autores utilizaram informações das minimizações de energia dos complexos solvatados de nevirapina, α -APA e TIBO para confirmar a preferência pela conformação tipo borboleta dos NNRTI. Neste trabalho verificou-se que as estruturas destes inibidores podem ser sobrepostas no sítio ativo de acordo com as interações entre os anéis aromáticos dos NNRTI e aqueles dos aminoácidos próximos ao sítio. Nos três casos as energias são altamente favoráveis às interações de formação dos complexos e correlacionam-se com os respectivos índices de atividade. Energias de interação π (entre resíduos individuais) são importantes para as ligações e correlacionam-se com as energias dos HOMO calculadas pelo método HF/6-31G(d). Em um trabalho mais recente, estes mesmos

autores sugerem um possível mecanismo de ação destes fármacos, monitorando as particularidades das interações de cada inibidor. Estas interações provocam alterações no sítio ativo de polimerase da RT e, portanto foram correlacionadas com as atividades destes inibidores. [Smith-Jr. et al., 1998]

Padrões moleculares farmacofóricos para NNRTI também têm sido investigados de acordo com a similaridade molecular sugerida por campos moleculares. Mestres, Rohrer e Maggiora mostraram que a sobreposição de três NNRTI por campos estéricos e eletrostáticos são equivalentes aos modos de interação destes inibidores com a RT, possibilitando a construção de um modelo farmacofórico equivalente aos tradicionais. [Mestres, Rohrer e Maggiora, 1999]

Os trabalhos desenvolvidos neste doutoramento são apresentados nos três capítulos seguintes. O próximo capítulo se refere à obtenção de parâmetros de campo de força a partir de cálculos mecânico-quânticos para a família TIBO, seguindo-se da utilização dos parâmetros desenvolvidos em análises conformacionais destes compostos.

O terceiro capítulo da tese apresenta um estudo de análises comparativas entre campos moleculares (CoMFA) de 49 NNRTI estruturalmente diversos. A metodologia CoMFA foi aplicada para um conjunto formado por seis classes distintas de NNRTI. A escolha desta classe de compostos foi determinada pela homogeneidade e qualidade dos dados de atividade disponíveis na literatura sobre alguns dos NNRTI mais relevantes.

O quarto capítulo continua a investigação de similaridade molecular nos NNRTI, desta vez utilizando métodos baseados na teoria funcional de densidade (DFT). O objetivo é o de se propor um novo modelo farmacofórico para os NNRTI. Apesar de vários aspectos desta etapa de trabalhos se referirem (ou se relacionarem) a similaridade molecular quântica, primeiramente estudada e discutida por Carbó e colaboradores, o estudo apresentado é predominantemente qualitativo, pois explora sistemas moleculares complexos em um nível de cálculo bastante sofisticado para os compostos em questão.

CAPÍTULO II

Desenvolvimento de parâmetros de campo de força e análise conformacional de TIBO

2.1- INTRODUÇÃO

A modelagem molecular já está bem fundamentada como uma ferramenta essencial para a pesquisa em química e cada vez mais tem sido utilizada para ensinar química. [Hehre, Shusterman and Nelson, 1998] Entre os métodos utilizados, os métodos empíricos, ou seja, aqueles sustentados pela mecânica molecular e suas equações de campo de força têm sido usados em larga escala e em muitos casos, abusivamente. A análise de estruturas moleculares e aspectos energéticos destas moléculas por meio de equações da mecânica clássica (mecânica e dinâmica molecular) pode levar a inúmeros equívocos. Isto se deve principalmente a facilidade de uso de pacotes de programas disponíveis no mercado que geralmente conduzem à aplicação destas técnicas em situações em que os campos de força são mal definidos ou até mesmo indefinidos. Uma parte substancial do uso duvidoso ou indevido destas metodologias se deve à baixa qualidade, escassez ou indefinição dos parâmetros de campo de força. A solução dada por vários campos de força é a utilização de parâmetros genéricos, que muitas vezes são úteis para a avaliação rápida e aproximada de propriedades de diferentes sistemas moleculares, embora deva ficar claro que para se obter resultados confiáveis, parâmetros de alta qualidade que muitas vezes devem ser específicos para o sistema molecular estudado são necessários. Qualquer estudo que envolva mecânica ou dinâmica molecular, tal como análise conformacional, depende diretamente da qualidade dos parâmetros de campo de força.

Uma rigorosa parametrização de campo de força deve ser feita a partir de dados obtidos experimentalmente, embora em muitos casos isto não seja possível ou é inviável. Desta forma, o uso de cálculos mecânico-quânticos para a obtenção de parâmetros de campo de força cada vez mais tem sido utilizado e vem adquirindo credibilidade. [Jensen, 1999] Muitas vezes, os resultados obtidos com campos de força bem parametrizados reproduzem resultados experimentais equivalentes, embora os seus parâmetros tenham sido obtidos via cálculos mecânico quânticos. [Abrahão-Júnior, Nascimento e Galembeck, 2001; Áleman, Casanovas e Galembeck, 1998]

Vários padrões de parametrização utilizam cálculo mecânico-quânticos. Hopfinger e Pearlstein propuseram um método de ajuste de parâmetros de campo de força aos valores de energia mecânica quântica de estruturas-modelo distorcidas, assumindo que os melhores resultados possíveis são obtidos quando este ajuste for o mais próximo possível. [Hopfinger e Pearlstein, 1984]

Palmö e colaboradores dividiram a energia mecânico-molecular em uma parte quadrática e outra não quadrática, assumindo que a parte não quadrática desta energia possa ser obtida a partir de várias origens (não provenientes de cálculos quânticos) e então ajustadas à parte quadrática exatamente como uma matriz hessiana (matriz das segundas derivadas das energias mecânico quânticas). [Palmö, Pietila e Krimm, 1991]

Hagler propôs um procedimento de dois passos. Em primeiro lugar um campo de força mecânico quântico é parametrizado inteiramente com dados provenientes de cálculos HF/6-31G(d) ou outro nível de cálculo similar. Daí então o campo de força é produzido a partir destes cálculos, pelo acréscimo de um pequeno número de fatores de escala, determinados pelo ajuste dos parâmetros iniciais com um determinado grupo de valores experimentais de confiança. [Hagler, 1994]

Halgren usou o método de Hagler [Hagler, 1994] para ajustar os parâmetros do campo de força MMFF à dados mecânico-quânticos. Todavia, em vez de confiar

no escalonamento de dados experimentais ele contou com o incremento dos níveis de cálculo em busca de uma convergência do próprio processo de parametrização. [Halgren, 1992 e 1996]

Vários outros grupos de pesquisa têm utilizado cálculos mecânico-quânticos na parametrização de campos de força. No entanto, na maioria dos casos a principal vantagem está na habilidade do método de parametrização considerar pontos não estacionários da hiper-superfície de energia potencial dos sistemas moleculares. [Norbby e Lilgefors, 1997] Tratando-se dos termos ligados de um campo de força, ou seja, estiramentos deformações angulares e torções, Alemán e colaboradores [Áleman et al., 1991; Áleman e Orozco, 1992] propuseram uma estratégia simples e eficiente, a qual foi utilizada para a parametrização de campo de força realizado neste trabalho, sendo, portanto detalhada no procedimento computacional.

Neste capítulo é apresentada a parametrização total de dois derivados da TIBO, R82913 e R79882, no campo de força desenvolvido por Kollman et al. [Kollman et al. , 1995] (também conhecido como AMBER94), com o uso do método PAPQMD (Program for Approximate Parametrization from Quantum Mechanical Data). [Áleman et al., 1991; Áleman e Orozco, 1992] Com estes parâmetros foram realizados estudos conformacionais para estas moléculas. Em um primeiro trabalho publicado, a parametrização de um fragmento molecular de TIBO, a 1,3 dihidroimidazol-2-ona foi apresentada. [Abrahão-Júnior, Áleman e Galembeck, 1999] Outro trabalho, referente à parametrização total e análise conformacional de TIBO e nevirapina foi recentemente aceito para publicação. [Abrahão-Júnior, Nascimento e Galembeck, 2001]

Uma das dificuldades nos estudos estruturais, computacionais ou experimentais dos NNRTI é que muitos deles apresentam múltiplas conformações, como a TIBO. Assim, é necessária a realização de análises conformacionais para uma compreensão do comportamento destes compostos. Habitualmente a busca conformacional é efetuada com o emprego de um campo de força, e alguns

parâmetros podem se mostrar inadequados para a obtenção de resultados comparáveis aos experimentais, sendo necessária a parametrização total ou parcial da molécula.[Orozco, Alemán e Luque, 1993]

Na próxima seção são apresentados os métodos computacionais empregados na parametrização total realizada para as moléculas R82913 e R79882, da família das TIBO, seguindo-se da validação e utilização destes parâmetros. Serão apresentados os parâmetros de campo de força para os termos ligados, ou seja, estiramentos, deformações angulares e torções, além das cargas RESP, específicas para a descrição do campo de força AMBER94 (Eq. 1). Após a validação destes termos, a análise conformacional realizada no vácuo, em água e em clorofórmio é discutida. A redução de dados das buscas conformacionais foi efetuada pela técnica de clustering. Uma análise mais aprofundada dos confôrmeros obtidos foi possível, graças a comparação de parâmetros de dobramento do anel de sete membros, calculados de acordo com a metodologia proposta por Cramer e Pople. A comparação das conformações obtidas com as estruturas determinadas experimentalmente por cristalografia de raios-X e pelas constantes de acoplamento entre prótons vicinais, obtidas por RMN, indicou que a análise conformacional reproduziu adequadamente os dados experimentais.

2.2 - PROCEDIMENTO COMPUTACIONAL

2.2.1 - Campo de força e parametrização

No campo de força de Kollman et al., também conhecido como AMBER94, as energias estéricas são computadas de acordo com a seguinte expressão: [Kollman et al., 1995]

$$E_{total} = \sum_{bonds} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{dihedrals} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] \quad (\text{Eq. 1})$$

Os dois primeiros termos da equação 1 representam a aproximação harmônica para o estiramento e deformação angular. Os termos torcionais são representados por uma expansão em série de Fourier. Os termos entre colchetes representam as interações não ligadas que compreendem termos eletrostáticos e de Lenard-Jones. K_r e K_θ são as constantes de força de estiramento e deformação angular. r_{eq} e θ_{eq} são as distâncias e ângulos de ligação de equilíbrio, V_n é a barreira de energia torcional para o termo com periodicidade n da série de Fourier da rotação em torno do ângulo diedro ϕ , e γ é o ângulo de fase deste diedro. A_{ij} e B_{ij} são os parâmetros de van der Waals para a interação entre os átomos i e j . q_i é a carga atômica para o átomo i .

O programa PAPQMD foi utilizado para se obter as constantes de força de estiramento e deformação angular. De acordo com este método um comprimento ou ângulo de ligação foi perturbado a partir das geometrias de equilíbrio, otimizando-se o restante da geometria em um dado método de cálculo de orbitais moleculares. Após a energia mecânico-quântica (ΔE^{QM}) destas estruturas ter sido determinada, empregou-se a equação 2 de forma a se considerar a perturbação em todos os termos da equação 1, e desta forma se obter o menor desvio quadrático médio entre a energia total do campo de força (ΔE^{FF}) e a energia mecânico-quântica.

$$(\Delta E^{QM} - \Delta E^{FF})^2 = (\Delta E^{QM} - \Delta E_l - \Delta E^{per})^2 = \text{MÍNIMO} \quad (\text{Eq. 2})$$

A equação 2 expressa ΔE^{FF} como a adição da energia relacionada com a variação da variável geométrica perturbada (ΔE_1) e a energia relacionada com todas as outras variações da geometria molecular (ΔE^{per}). Neste trabalho utilizou-se o método AM1.[Dewar et al., 1985] Alguns estudos têm demonstrado que o método PAPQMD/AM1 produz constantes de força de estiramento e deformação angular comparáveis aquelas obtidas por métodos pós-Hartree-Fock. [Alemán e Orozco, 1992 e 1994; Alemán, Muñoz-Guerra, 1996; Alemán, Casanovas e Galembeck, 1998]

Os parâmetros torcionais foram calculados por uma expansão em série de Fourier de quatro termos, ($n = 1, 2, 3$ e 6 , equação 1), a partir de energias HF/6-31G(d). Apenas a natureza dos átomos centrais, B e C, em $\{A_i\}$ -B-C- $\{D_i\}$ foi considerada, com exceção do ângulo diedro $C_{sp^2} = C_{sp^3} - C = O$, que considera todos estes quatro átomos indicados.

2.2.2 - Tipos de átomos

Para a parametrização foi necessária a definição de novos tipos de átomos para o campo de força AMBER94, os quais são apresentados na tabela 2 e figura 12. Para parametrização foi necessária ainda a utilização de fragmentos moleculares. Desta forma foram gerados seis fragmentos da TIBO, representados pelas moléculas 1,3-diidroimidazo-2-ona (DMZ), 1N-metil-3N-hidroimidazol-2-tiona (HMZT), 1,3-diidro-benzimidazol-2-ona (DBHZ), 3,4-dimetil-2,3,4,5-tetraidro-1H-[1,4]-diazepina (MDP), 3-metil-2-butenilamina (MBA) e clorobenzeno (CLB); (figura 13). Os parâmetros geométricos de equilíbrio foram obtidos a partir das geometrias otimizadas destas moléculas com o método B3LYP/6-31G(d).

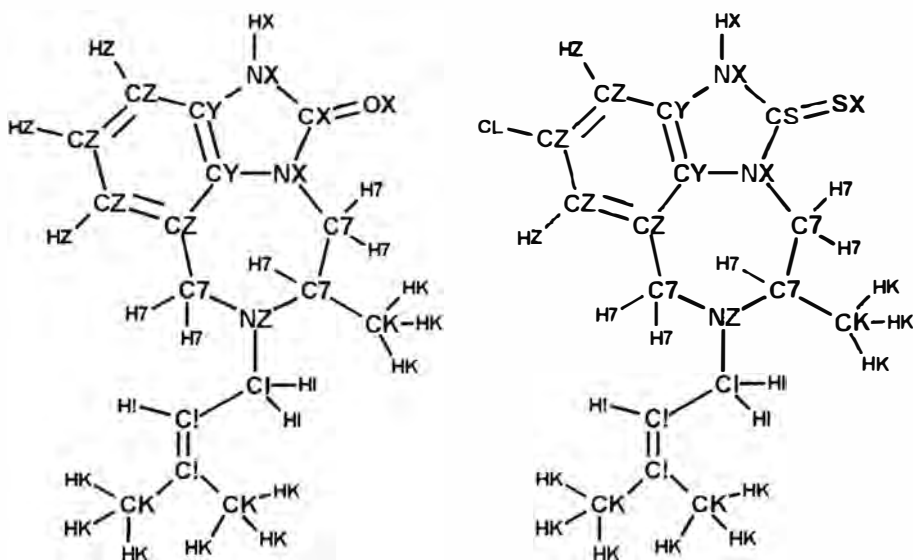


Figura 12 - Tipos de átomos para TIBO.

Tabela 2 - Tipos de átomos AMBER94 para TIBO.

Átomo	Descrição
CX	C=O - Carbono de grupo carbonila diretamente ligado a mais de um átomo de nitrogênio.
CY	Carbono sp^2 ligado a NX.
CZ	Carbono sp^2 aromático em anel de 6 membros.
CS	C=O - Carbono de grupo tiocarbonila diretamente ligado a mais de um átomo de nitrogênio.
C7	Carbono sp^3 de anel de 7 membros.
CI	Carbono sp^3 ligado à NY (átomo do grupo substituinte).
CK	Carbono sp^3 ligado a três hidrogênios.
C!	Carbono sp^2 alifático.
NX	Átomo de nitrogênio ligado simultaneamente a um grupo carbonila e a um carbono sp^2 .
NY	Átomo de nitrogênio de anel de 7 membros ligado à 2 carbonos do anel e à um grupo substituinte.

Tabela 2 - Continuação.

OX	C=O - Átomo de oxigênio de grupo carbonila diretamente ligada a mais de um átomo de nitrogênio.
SX	C=S - Átomo de enxofre de grupo tiocarbonila diretamente ligada a mais de um átomo de nitrogênio.
HX	Átomo de hidrogênio ligado a NX.
HY	Átomo de hidrogênio ligado a CY.
HZ	Átomo de hidrogênio ligado a CZ.
H7	Átomo de hidrogênio ligado a H7.
HI	Átomo de hidrogênio ligado a CI.
HK	Átomo de hidrogênio ligado a CK.
H!	Átomo de hidrogênio ligado a C! .
Cl	Cloro ligado a CZ (substituinte de anel benzênico)

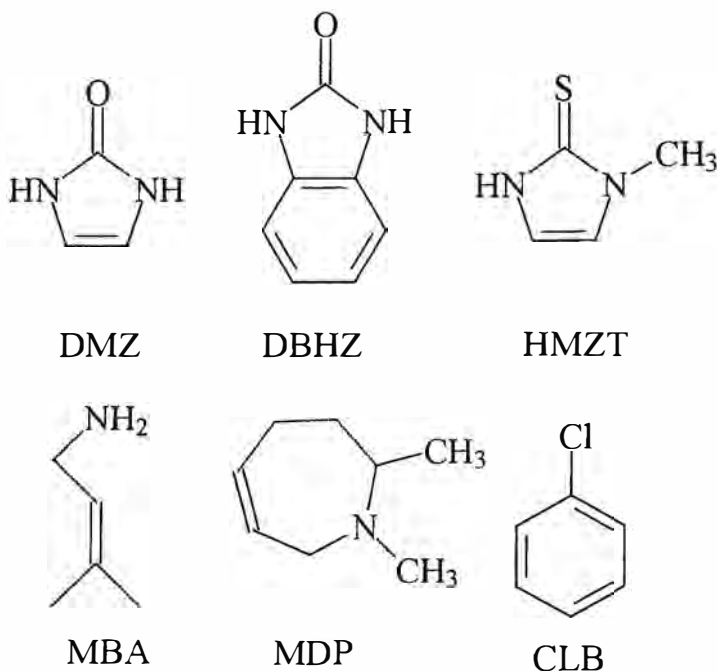


Figura 13 - Fragmentos moleculares utilizados na parametrização de TIBO.

2.2.3 - Parâmetros de equilíbrio

Inicialmente as distâncias e ângulos de equilíbrio para a DMZ foram calculados por vários métodos mecânico-quânticos (HF/6-31G(d), [Ditchfield et al., 1971; Hehre, Ditchfield e Pople, 1972; Francl et al., 1982; Gordon, 1980] MP2/6-31G(d), [Møller, C.; Plesset, 1937] B3LYP/6-31G(d), [Hariharan e Pople, 1973; Becke, 1988; Lee, Yang e Parr, 1988] e AM1 [Dewar, 1985]), para se escolher o melhor para o cálculo dos parâmetros geométricos de equilíbrio. O método B3LYP/6-31G(d) foi escolhido e utilizado para os cálculos com os demais fragmentos, uma vez que reproduz adequadamente geometrias e outros dados experimentais a um razoável custo computacional.

Os cálculos *ab initio* foram efetuados usando o programa Gaussian-94 [Frisch et al. 1994] para otimização e GAMESS [Schmidt et al., 1993] para a obtenção do potencial eletrostático molecular quântico (MEP) necessário ao cálculo de cargas RESP. [Bayly et al., 1993] Cálculos semi-empíricos AM1 foram efetuados com os programas MOPAC 6.0 e MOPAC93R2. [Stewart, 1990] Cálculos de otimização de geometria e obtenção de frequências vibracionais com o campo de força AMBER94 modificado foram efetuados no programa MACROMODEL Versão 5.5. [Mohamadi, 1990]

2.2.4 - Cargas RESP e parâmetros de van der Walls

As cargas foram calculadas a partir dos potenciais eletrostáticos e ajustadas utilizando-se o “restrained electrostatic potential fitting” (RESP) [Bayly et al., 1993] Para isto, o potencial eletrostático molecular (MEP) foi avaliado a partir de uma rede de pontos localizada de acordo com a estratégia de Singh e Kollman [Singh e Kollman, 1984] usando uma função de onda HF/6-31G(d).

Os modelos de cargas atômicas parciais, utilizados na maioria dos campos de força mais conhecidos [Allinger, 1977; Allinger et al., 1989; Jorgensen e Tirado-Rives, 1988, Berendsen, Grigera e Straatsama, 1987] inclusive o ajuste padrão ao potencial eletrostático molecular quântico (MEP), utilizado também pela versão do campo de força AMBER conhecida como AMBER86, [Weiner et al., 1984; 1986] não fornecem resultados ideais por duas razões principais. Em primeiro lugar porque as diferenças entre as cargas parciais fornecidas por diferentes conformações de uma mesma molécula são grandes. Isto é ilustrado por Willians, que estudou a variação das cargas ajustadas ao MEP utilizando a base 6-31G(d) para 12 diferentes conformações do dipeptídeo de alanina. [Willians, Weaver e Lowrey, 1990] Vários outros exemplos podem ser encontrados, como por exemplo no trabalho de Kollman e colaboradores sobre a propilamina. [Cornell et al., 1993] O segundo fator pela qual o ajuste padrão ao ESP não é o ideal é que cargas são estatisticamente indeterminadas para átomos tais como carbonos sp^3 em butano ou propilamina e geralmente assumem valores relativamente altos para cargas de átomos apolares, [Bayly et al., 1993] cuja boa representação é imprescindível para os casos das regiões hidrófobas das proteínas.

Tais fatos estimularam Bayly e colaboradores a desenvolver um método de ajuste de cargas atômicas parciais que as tornam menos dependentes das conformações moleculares, o método RESP. [Bayly et al., 1993] Este modelo envolve um ajuste ao MEP por mínimos quadrados, mas com restrições hiperbólicas para cargas de átomos diferentes de hidrogênio. O novo modelo de cargas também mostra boa performance ao reproduzir energias de interação e energias livres de solvatação, [Kollman et al., 1995] embora tanto o ajuste padrão ao MEP como o RESP forneceram bons resultados energéticos para maioria das pequenas moléculas estudadas por Cornell e colaboradores, sem a necessidade de parâmetros muito elaborados para ângulos diedros. [Cornell et al, 1995]

Em adição ao novo conjunto de cargas atômicas parciais do campo de força AMBER94 que fornece bons resultados em fases condensadas, [Bayly et al., 1993;

Cornnel et al, 1995] novos parâmetros de van der Waals foram adicionados e otimizados para este campo de força, de forma a reproduzir propriedades em líquidos. Os parâmetros originais são equivalentes aos propostos por Hagler, Euler e Lifson em 1974 [Hagler, Euler e Lifson, 1974] e os novos parâmetros para hidrogênios alifáticos e aromáticos levam em conta efeitos de átomos vicinais eletronegativos.

Parâmetros atômicos de van der Waals e de interações de hidrogênio são razoavelmente transferíveis. Todavia os primeiros dependem principalmente dos núcleos atômicos e dos graus de hibridização. Desta forma os parâmetros não ligados relacionados com os átomos adicionados no campo de força, foram considerados equivalentes aos átomos semelhantes contidos no campo de força AMBER94.

2.2.5 - Validação dos parâmetros desenvolvidos

As geometrias dos fragmentos foram otimizadas por vários métodos (HF/6-31G(d), MP2/6-31G(d), B3LYP/6-31G(d), e AM1), e frequências vibracionais MP2/6-31G(d) foram comparadas com resultados obtidos pelo campo de força AMBER94, acrescido dos parâmetros desenvolvidos neste trabalho. Além disto, as geometrias das duas moléculas de TIBO, R82913 e R79882, também foram otimizadas com os métodos computacionais citados acima, para serem comparadas com valores experimentais.

Um teste adicional foi efetuado com as moléculas 1-metil-3-vinil uréia e uracila, escolhidas por apresentarem os tipos de átomo parametrizados. Estas foram submetidas a cálculos de otimização de geometria e frequências vibracionais com o campo de força modificado e com o método MP2/6-31G(d).

2.2.6 - Análise conformacional

A busca conformacional foi realizada em fase gasosa utilizando-se o método SUMM (Systematic Unbonded Multiple Minimum Search), [Goodman e Still, 1991] para a TIBO R79882 e TIBO R82913, cujos resultados foram comparados com outros provenientes da aplicação de outras metodologias de busca. O método SUMM, diferentemente de outras técnicas de busca conformacional sistemática, possui um esquema para gerar confôrmeros logo no início da busca, cujas estruturas não são necessariamente relacionadas com os ângulos diedros variáveis. A técnica parte de uma baixa resolução do espaço conformacional dos ângulos de torção variáveis. A princípio os confôrmeros são procurados em 120° do espaço conformacional dos diedros variáveis. A partir daí a resolução aumenta gradativamente (menor ângulo de busca), até que todos os pontos do espaço conformacional de uma dada resolução tenham sido encontrados. A pesquisa pode ser finalizada automaticamente, assim que novos confôrmeros pararem de ser encontrados neste espaço de determinado máximo de energia.

A análise se inicia com uma molécula que contém B ângulos de torção que devem ser variados a partir de uma resolução inicial R, sendo R definido como o número de maneiras possíveis de se variar um ângulo de torção. Com isto, partindo-se de uma resolução de 120° significa que R é igual a 2 ($360^\circ/120^\circ - 1 = 2$). Define-se c como o nível de resolução e atribui-se o valor inteiro $c = 1$ para a resolução inicial (120°). Após um certo número de passos de uma busca, Q(1), todos os pontos de resolução inicial já foram examinados. Neste caso, dobra-se a resolução para 60° em um nível $c = 2$. Com isto, define-se M(c) como o número de maneiras possíveis de variar uma torção de um nível de resolução c, a partir de uma certa resolução inicial R.

$$M(c) = (2^{c-1} (R+1)) - 1 \qquad \text{Eq.3}$$

Antes de a análise atual ter sido iniciada, dois arranjos iniciais são estabelecidos, $P(a, B, c)$ e $Q(c)$. Os elementos do primeiro arranjo, $P(a, b, c)$, são os números de maneiras possíveis de variar a ângulos de torção, até um total de b torções em um nível de resolução c .

Um arranjo seguinte, $Q(c)$, possui elementos com o número total de maneiras de se variar B ângulos de torção em um nível de resolução c . Mínimo e máximo na equação seguinte se refere a um mínimo (normalmente 1) e a um máximo (normalmente B) número de torções que devem ser alteradas simultaneamente.

$$Q(c) = \sum_{a=\text{mínimo}}^{\text{máximo}} P(a, B, c) \quad \text{Eq. 4}$$

Desta forma, uma análise conformacional completa é efetuada definindo-se um arranjo $P(a, b, c)$ inicial; uma permutação $Q(c)$ seguinte de maior resolução e um determinado número de passos N , que representa o conjunto de variações possíveis para os ângulos de torção de determinada estrutura de partida. [Goodman e Still, 1991]

Para a TIBO R82913 a análise conformacional foi realizada também em água e em clorofórmio, com o emprego do método GB/SA. [Still et al., 1990] Trata-se de um método de solvatação baseado em uma aproximação que considera o solvente como um “contínuo dielétrico” de acordo com a equação de Born para a sobreposição de cargas atômicas parciais (GB), aplicada sobre a superfície molecular acessível pelo solvente (SA).

Neste método, a energia livre de solvatação (G_{SOL}) é considerada a soma dos termos que representam a cavitação solvente-solvente (G_{CAV}), a interação de van der Waals soluto-solvente (G_{vdw}) e a polarização eletrostática soluto-solvente (G_{pol}):

$$G_{\text{SOL}} = G_{\text{CAV}} + G_{\text{vdw}} + G_{\text{pol}} \quad \text{Eq. 5}$$

Note que G_{SOL} para hidrocarbonetos saturados em água é linearmente relacionada com a superfície total acessível pelo solvente (SA), dada por:

$$G_{\text{CAV}} + G_{\text{vdW}} = \sum \sigma_k SA_k \quad (\text{Eq.6})$$

Onde SA_k é a superfície total acessível ao solvente pelos átomos do tipo k e σ_k é um parâmetro empírico de solvatação.

Para G_{pol} , a energia eletrostática (G_{es} , kcal/mol) de partículas idealmente separadas (distâncias r (Å), α raios (radianos) e q cargas) em um campo dielétrico médio ϵ , é dada pela Equação 7, ou seja, pela soma da equação da lei de Coulomb em um campo dielétrico contínuo e a equação de Born (segundo termo da Eq. 7).

$$G_{\text{es}} = 332 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \frac{q_i q_j}{r_{ij}} - 166 \left(1 - \frac{1}{\epsilon} \right) \sum_i^n \frac{q_i}{\alpha_i} \quad (\text{Eq. 7})$$

O primeiro termo da Equação 7 pode ser expandido para interpretar as interações entre pare de partículas carregadas sobre o efeito de um campo dielétrico contínuo. [Still et al. 1990]

Utilizou-se o programa Macromodel 5.5. [Mohamadi, et al., 1990] O método SUMM foi escolhido, pois apresentou resultados superiores a várias outras estratégias de busca conformacional para compostos cíclicos ou não. Alguns testes foram realizados com outros métodos disponíveis nesta versão do Macromodel, tais como a comparação de ângulos torcionais utilizando a estratégia de Monte-Carlo, [Senderowitz, Guarnieri e Still, 1995] ou a comparação rápida entre posições atômicas e ângulos torcionais [Chang, Guida e Still, 1989; Kolossvary e Guida, 1992] Em ambos os casos, estas metodologias não encontraram a mesma quantidade de confôrmeros obtidas com o método SUMM, além de terem apresentado custos computacionais maiores.

2.2.7 - Análise dos confôrmeros obtidos utilizando uma estratégia de *clustering*

Não há uma definição universal dos termos *cluster* ou *clustering*. A palavra *clustering* (agregamento) é utilizada para indicar uma separação de um conjunto de pontos para subconjuntos chamados *clusters* (agregados), usando critérios pré definidos.

O programa XCluster [Shenkin e Mcdonald, 1994] realiza a análise de *clusters* a partir da matriz de distâncias entre conformações. Vários critérios de medidas de proximidade podem ser utilizados. Uma série de parâmetros estatísticos são calculados para os *clusters* encontrados, e os resultados podem ser apresentados em uma variedade de formatos gráficos.

O programa foi utilizado para se relacionar as diferentes conformações obtidas nas buscas conformacionais, calculando-se as diferenças de desvio quadrático médio entre os correspondentes ângulos torcionais em pares de estruturas como uma definição de distância (critério Trms). Outros critérios de distância podem ser utilizados:

Arms: usa o desvio quadrático médio (rms) para a distância entre átomos correspondentes seguindo a superposição de todos os átomos entre pares de estruturas, com exceção dos hidrogênios e de pares de elétrons isolados.

Nrms: calcula o desvio quadrático médio (rms) pela comparação de átomos correspondentes como uma medida de distância, sem anteriormente fazer uma superposição de todos os átomos.

O que estes critérios tem em comum é que todos eles podem ser usados para especificar quão diferentes duas estruturas são através de uma distância entre confôrmeros, d_{ij} , entre um par de estruturas, i e j . Quando o critério Trms é utilizado, as medidas de distância correspondem ao termo “distância conformacional”, como descrito por Saunders. [Saunders, 1991]

Os resultados foram apresentados por meio de figuras de mérito, que nada mais são que diagramas ou gráficos representativos dos processos estatísticos de

agregamento. A primeira figura de mérito utilizada é dada pelo gráfico da razão de separação mínima (R_i) *versus* nível de *clustering*. R_i é a razão entre a menor distância entre dois confôrmeros de um mesmo *cluster* (ou seja, a menor distância entre dois *clusters*) e uma distância de separação crítica que, por sua vez, deve ser maior que a menor distância entre duas estruturas de um mesmo *cluster*. O nível de *clustering* corresponde ao número de *clusters* N menos 1 ($N - 1$), e é gerado através da construção da matriz de distância selecionada, onde N é o número de conformações. Se a razão de separação mínima R_i for grande para um determinado nível de *clustering* então todos os *clusters* deste nível estarão bem separados. Outra figura de mérito utilizada foi a avaliação de *clustering* através de mosaico ou dendritograma. Estes diagramas podem ser construídos quando os dados de *clustering* (conformações) são reordenados. A nova disposição das estruturas é chamada de ordem genérica e um grande bloco horizontal destacado indica um nível de *clustering* particular e suas propriedades. O programa XCluster também possibilita a visualização das conformações superpostas e coloridas por *cluster*, e a separação das estruturas representativas de cada *cluster*, ou seja, aquela estrutura que melhor representa a geometria média para cada um destes *clusters*.

2.2.8 - Parâmetros de dobramento em anéis

Os parâmetros de Cremer e Pople [Cremer e Pople, 1975] consistem em uma maneira única e bem determinada de se analisar quantitativamente as conformações anelares em moléculas, onde os anéis podem ter de 4 a N átomos. [Cremer, 1984] O programa RING [J. Cremer, 1975] é um programa de transformação de coordenadas de forma a fornecer dados para a interpretação quantitativa de conformações de anéis. Estes dados são chamados de parâmetros de dobramento e são utilizados para avaliar o caráter não planar de um anel de uma

forma única e exata: um grupo de amplitudes de dobramento q_m e ângulos de fases ϕ_m que determinam a intensidade e forma de dobramento.

Este método descreve o dobramento de anéis com qualquer número de membros de uma forma única e exata. É interessante ressaltar que este procedimento é sugerido pela IUCr (União Internacional de Cristalografia) para a descrição das geometrias de anéis em estruturas cristalinas, possibilitando a comparação com geometrias obtidas computacionalmente. [Cremer, 1984]

Um anel de N átomos tem um total de $(N-3)$ coordenadas de dobramento, ou seja, um anel de 3 membros é sempre planar, os anéis de 4 membros possuem uma única amplitude q_2 , os de cinco membros são caracterizados pelo par amplitude - fase (q_2, ϕ_2) , os de seis possuem um par amplitude - fase (q_2, ϕ_2) e uma amplitude adicional q_3 , e assim em diante. Para anéis ímpares, tem-se $\frac{1}{2}(N-3)$ pares de amplitude-fase (q_m, ϕ_m) , com $m = 2, 3, \dots, (N-1)/2$. Já os anéis com um número par de membros tem-se $\frac{1}{2}(N-4)$ pares amplitude - fase (q_m, ϕ_m) com $m = 2, 3, \dots, (N-2)/2$ e ainda uma amplitude adicional q_{m+1} . As N distâncias z_j ($j = 1, 2, \dots, N$) dos átomos de um anel dobrado à um determinado plano médio de referência, podem ser expressos em termos de coordenadas de dobramento (q_m, ϕ_m) .

$$z_j = \left(\frac{2}{N}\right)^{\frac{1}{2}} \sum_{M=2}^{\frac{1}{2}(N-1)} q_m \cos[\phi_m + 2m(j-1)/N], \quad \text{se } N \text{ é par.} \quad \text{Eq. 8}$$

$$z_j = \left(\frac{2}{N}\right)^{\frac{1}{2}} \sum_{M=2}^{\frac{1}{2}(N-2)} q_m \cos[\phi_m + 2m(j-1)/N] + \left(\frac{1}{N}\right)^{\frac{1}{2}} q_{(N/2)^{(-1)^{(j-1)}}$$

para N ímpar. Eq. 9

O procedimento matemático usado para determinar o plano médio ao anel e as coordenadas de dobramento foi primeiramente descrito por Cremer e Pople em

1975 [Cremer e Pople, 1975; Cremer, 1984] e a interpretação destes parâmetros é apresentada a seguir.

Cada par amplitude: fase (q, ϕ) com $q > 0$ e $0 < \phi < 2\pi$ corresponde à conformação de um circuito de “pseudo-rotação” do anel de N membros em questão. Uma amplitude única $q_{(N/2)}$ de anéis com números pares de átomos pode assumir valores positivos e negativos, sendo que os valores negativos correspondem às conformações produzidas pelo processo de inversão de uma amplitude $q_{(N/2)}$. Cada conformação anelar é um ponto de uma hipersfera $(N - 3)$ - dimensional, para $N \geq 7$, um ponto de uma esfera para $N = 6$, um ponto de um plano para $N = 5$ e um ponto em uma reta para $N = 4$.

Se apenas um plano médio é calculado, as orientações relativas de substituintes ligados ao anel também podem ser calculadas. Cremer sugere que ligações perpendiculares a este plano ou próximas a isto, sejam chamadas de **axiais**, enquanto que as ligações paralelas a este plano sejam chamadas de **equatoriais**. Ligações intermediárias são chamadas de **incliniais** e ainda as letras **t** e **b** (top: acima e botom: abaixo) devem ser utilizadas para especificar de uma forma precisa, as orientações destas ligações, de acordo com a figura 14.

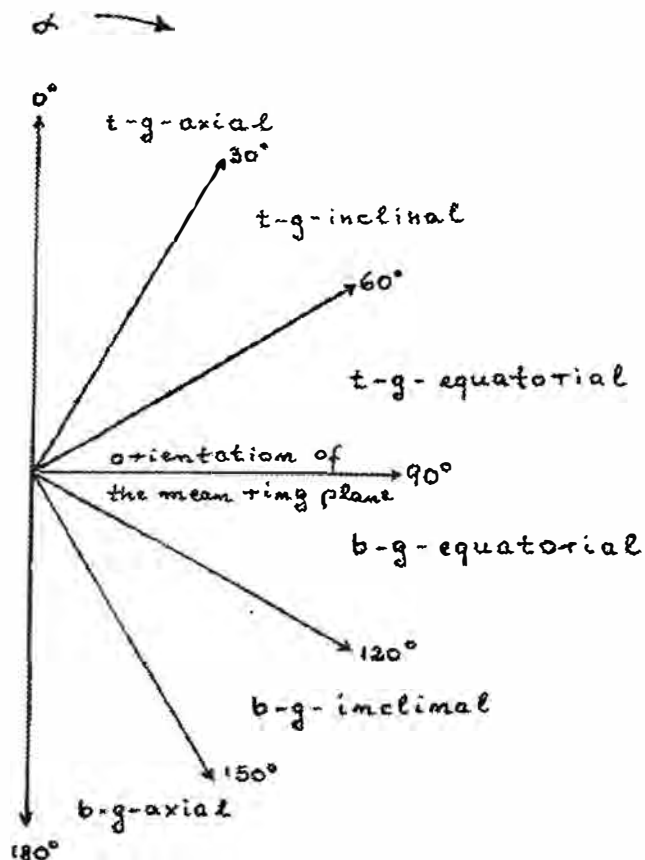


Figura 14 - Diagrama para a identificação das posições de substituintes de anéis, [Cremer, 1984] de acordo com os parâmetros de dobramento do anel. [Cremer e Pople, 1975]

2.2.9 - Constantes e acoplamento de hidrogênios vicinais

Desde que M. Karplus [Karplus, 1959, 1960 e 1963] descreveu a relação matemática entre as constantes de acoplamento entre hidrogênios vicinais H e H' e o ângulo diedro ϕ de um fragmento HCC'H' de uma molécula (Eq. 10), uma grande quantidade de autores apresentaram modificações da equação empírica proposta. [Thomas, 1997]

$${}^3J_{HH'} = A + B\cos\phi + C\cos 2\phi \quad \text{Eq. 10}$$

Karplus mostrou que a constante de acoplamento depende não só dos diedros, mas também de uma variedade de outros fatores, tais como a presença de substituintes, ângulos e comprimento de ligação. A Eq. 10 foi derivada a partir dos cálculos de ligação de valência para moléculas de etano, sem perturbações eletrônicas. Para um comprimento de ligação de 1,543 Å com hibridização sp^3 e energia de ligação média (ΔE) igual a 9 e.v., as constantes são $A = 4,22$; $B = -0,5$ e $C = 4,5$ Hz. [Karplus, 1963]

A Eq. 10 pode ser utilizada para o cálculo de constantes de acoplamento porque alguns autores mostraram que, ao contrário de observado por Karplus, mudanças com comprimentos de ligação e ângulos de ligação, tem pouca influência no cálculo, bem como o efeito das vibrações moleculares é pequeno quando comparado com os efeitos de eletronegatividade e posição relativa dos substituintes ligados ao fragmento H-C-C'-H'. [Thomas, 1997]

2.2.10 - Nomenclatura conformacional

A numeração dos átomos de TIBO e apresentada na figura 15 com a molécula de TIBO R82913. Para a TIBO R79882, deve-se trocar o enxofre por oxigênio e o átomo de cloro ligado ao carbono C(9) por hidrogênio.

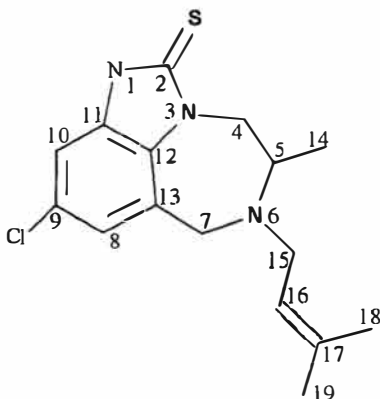


Figura 15 - TIBO R82913.

Como conseqüência do sistema molecular de anéis acoplados nas TIBO, apenas um número limitado de graus de liberdade conformacionais é possível. O benzeno, o anel imidazolidona (ou tiona) e ainda três átomos do anel de sete membros do sistema benzo-imidazo (C(13), C(12) e N(3)) são planares. Com isto, somente quatro conformações do anel diazepínico são possíveis. A diferença conformacional básica é dada pela posição dos dois átomos do anel de sete membros em relação ao plano principal da molécula, ou seja, em relação ao plano formado pelo grupo benzo-imidazol. Este fato nos permite afirmar que o anel de sete membros pode assumir apenas as conformações sofá (quando os C(5) e N(6) estão de um mesmo lado do plano principal) ou sofá-torcido (quando cada átomo está de um lado deste plano). Isto especifica a primeira letra que atribuímos aos confôrmeros encontrados, *S* ou *T*. A segunda letra é atribuída em relação à posição de N6 em relação ao plano principal da molécula, *T* quando este átomo está acima e *B* quando está abaixo deste plano. A partir daí a complexidade aumenta, a medida que os diferentes confôrmeros somente poderão ser classificados de acordo com a conformação dos substituintes metila e 3-metil-2-butenil. Desta forma preferimos atribuir números às estruturas encontradas, em ordem de energia. Um completa descrição de nomenclatura para esta classe de compostos foi proposta por Peeters e colaboradores, [Peeters et al., 1995] porém com uma complexidade que confunde uma identificação visual simples. Pode-se ressaltar que os parâmetros de dobramento, apresentados na seção anterior, são úteis na identificação de confôrmeros, de uma forma bastante prática.

2.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 - Parametrização das constantes de força

Constantes de força para os estiramentos e deformações angulares obtidas com cálculos AM1 e utilizando a estratégia PAPQMD são dispostos nas tabelas 3 e 4. Deve-se comentar que um hamiltoniano semi-empírico é capaz de fornecer constantes de força razoáveis [Alemán, Casanovas, e Galembeck, 1997] mesmo que as geometrias moleculares previstas pelo método AM1 apresentem desvios dos valores experimentais. Em todos os casos as constantes de força PAPQMD/AM1 foram consistentes com a natureza química das ligações simples e duplas, ou seja, as constantes de força obtidas para ligações duplas são maiores que aquelas das ligações simples.

Uma comparação dos parâmetros derivados para o fragmento DMZ e aqueles derivados para a molécula imidazol [Áleman et al., 1991] revela um comportamento consistente. Esta tendência é especialmente notada para as constantes de força de deformações angulares. Para ambas as moléculas, deformações angulares de hidrogênios ligados a nitrogênio ou carbono apresentam constantes de força em torno de 25-35 kcal/mol*rad². Considerando-se as deformações angulares diretamente envolvidas com o anel de 5 membros as constantes são em torno de 100-120 kcal/mol*rad². Por outro lado podemos notar que o estiramento da ligação carbonila é superestimado com o método PAPQMD/AM1. Este problema é devido ao mal desempenho da função de onda RHF para representar o estiramento de uma ligação dupla. Cálculos a nível MP4 são necessários para descrever o estiramento desta ligação. [Orozco e Luque, 1993]

Tabela 3 - Constantes de força para os estiramentos das TIBO obtidas pelo método PAPQMD/AM1.

Ligação	K / (kcal/mol) Å ²	Fragmento molecular utilizado
CZ = CZ	457	DBHZ
CZ - HZ	397	DBHZ
CZ - C7	432	MDP
CZ = CY	495	DBHZ
C7 - NZ	402	MDP
C7 - H7	347	MDP
C7 - C7	365	MDP
C7 - NX	431	MDP
C7 - CK	419	MDP
NZ - CI	496	MDP
NX - CX	351	DMZ
NX - CY	498	DMZ
CX = OX	1021	DMZ
NX - HX	510	DMZ
CY = CY	606	DMZ
CI - C!	418	MBA
CI - HI	332	MBA
C! = C!	776	MBA
C! - H!	390	MBA
CK - HK	356	MBA
C! - CK	438	MBA
CZ - CI	307	CLB
CS = SX	355	HMZT
NX - CS	415	HMZT
NX - C7	431	HMZT
CZ - CI	347	HMZT

Tabela 4 - Constantes de força para as deformações angulares das TIBO obtidas pelo método PAPQMD/AM1.

Angulo	K / (kcal/mol)rad²	Fragmento usado
CZ - CZ - CZ	117	DBHZ
CZ - CZ - HZ	31	DBHZ
CZ - CZ - C7	49	MDP
CZ - CZ - CY	44	DBHZ
C7 - CZ - CY	49	MDP
CZ - C7 - NZ	82	MDP
CZ - C7 - H7	45	MDP
NZ - C7 - H7	58	MDP
H7 - C7 - H7	36	MDP
C7 - NZ - C7	61	MDP
C7 - NZ - CI	89	MDP
NZ - C7 - C7	93	MDP
NZ - C7 - CK	80	MDP
C7 - C7 - CK	85	MDP
C7 - C7 - H7	54	MDP
CK - C7 - H7	45	MDP
C7 - C7 - NX	93	MDP
NX - C7 - H7	57	HMZT
C7 - NX - CX	65	HMZT
C7 - NX - CY	48	MDP
NX - CY - CZ	62	DBHZ
CY - CZ - HZ	43	DBHZ
CY - CY - CZ	46	DBHZ
NZ - CI - C!	83	MBA
NZ - CI - HI	52	MDP
C! - CI - HI	38	MBA
CI - C! - C!	62	MBA
CI - C! - H!	45	MBA
C! - C! - H!	35	MBA
C7 - CK - HK	89	MDP
HK - CK - HK	38	MDP
C! - C! - CK	61	MBA
CK - C! - CK!	58	MBA
C! - CK - HK	46	MBA
CZ - CZ - CL	100	CLB
NX - C7 - H7	57	HMZT
C7 - NX - CS	65	HMZT
CS - NX - CY	104	HMZT
CY - NX - CS	104	HMZT
NX - CS = SX	81	HMZT
NX - CS - NX	88	HMZT

2.3.2 - Parametrização das torções

Devido à natureza cíclica de TIBO, os parâmetros torcionais foram obtidos a partir de fragmentos moleculares menores, de preferência a menor molécula que contenha os átomos envolvidos na torção em questão e aqueles átomos ligados a estes. O sinal de cada termo $V_n/2$ indica o ângulo de fase (γ) do n -ésimo termo da série de Fourier. Se $V_n/2$ é positivo o ângulo de fase é 0° e se for negativo o ângulo de fase é 180° . A tabela 5 apresenta estes termos e a figura 16 ilustra os perfis diedrais. Note-se que, em alguns casos, o principal termo é aquele com periodicidade 2, que envolve torções em ligações duplas e duplas parciais, o que deve reforçar a característica rígida do esqueleto molecular. [Alemán e Orozco, 1992] Além disto, pode-se notar que, nestes casos, as três torções com maior $V_n/2$ caracterizam o fragmento DMZ que representa a porção mais rígida da TIBO.

Tabela 5 - Parâmetros torcionais para TIBO, obtidos pelo método HF/6-31G(d).

Ângulo diedro	Molécula utilizada	$V_1/2$	$V_2/2$	$V_3/2$	$V_6/2$
** - NX - CX - **	Formamida	0,68	-5,36	-0,52	-0,18
** - CY - CY - **	Etileno	-0,805	-14,180	1,284	-2,319
** - CY - NX - **	Etileno-amina	-0,253	-17,111	1,715	-2,161
** - C7 - C7 - **	Propanamina	0,738	0,455	2,198	0,067
** - NZ - C7 - **	Dimetilamina	0,077	-0,130	1,667	0,015
** - NZ - CI - **	Dimetilamina	0,077	-0,130	1,667	0,015
** - CI - C! - **	Propeno	0,011	-0,007	-1,035	0,044
** - CZ - C7 - **	Propeno	0,011	-0,007	-1,035	0,044
** - C! - CK - **	Propeno	0,011	-0,007	-1,035	0,044
** - C7 - CK - **	Propanamina	0,738	0,455	2,198	0,067
** - NX - C7 - **	dipeptídeo de glicina ^(b)	0,70	1,20	0,000	-
** - NX - CS - **	Tioformamida	2,655	-9,231	-4,393	1,576

(a) $V_n/2$ em kcal/mol. (b) = Mcdonald e Still, 1992.

Uma comparação dos resultados obtidos para a torção * - NX - CX - * (~21,4Kcal/mol), com valores experimentais (~20 Kcal/mol) [Stewart, 1990] também comprova a boa qualidade dos resultados.

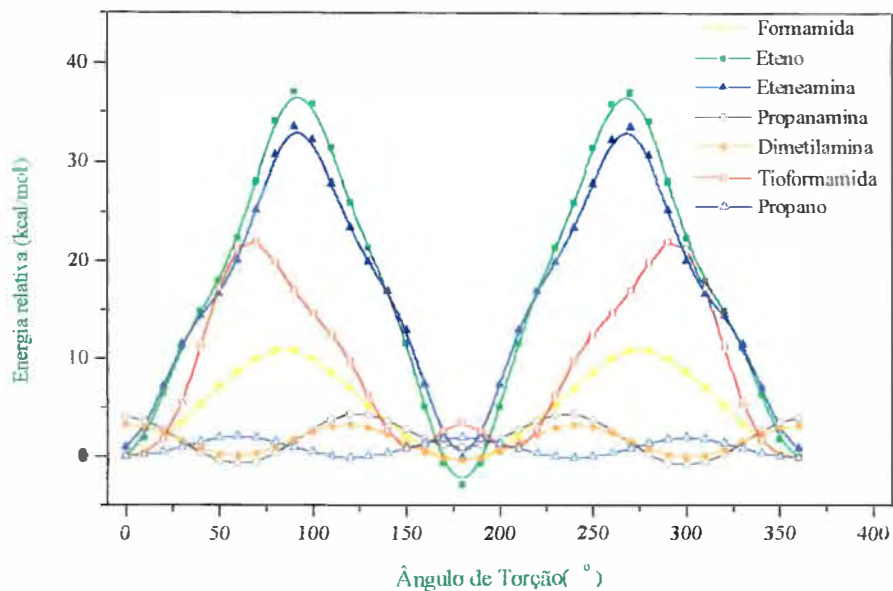


Figura 16 - Perfis torcionais dos fragmentos moleculares utilizados na parametrização das TIBO, obtidas a partir de cálculos HF/6-31G(d).

2.3.3 - Parametrização dos termos não ligados

Uma vez que se assumiu que os parâmetros de van der Waals são equivalentes aos já existentes no campo de força AMBER94, os únicos termos não ligados a serem parametrizados são os eletrostáticos, ou as cargas atômicas parciais obtidas pelo método RESP (figura 17). Note-se que a simetria dos fragmentos DMZ, CLB e DBHZ foi considerada nos processos de ajuste, onde as cargas dos átomos relacionados por simetria foram consideradas como a média das cargas obtidas.

Os desvios quadráticos médios relativos e absolutos das MEPs, bem como o número de pontos para o ajuste das cargas, os momentos de dipolo determinados a partir destas cargas e aqueles provindos de função de onda SCF são apresentados na tabela 6 para a avaliação dos ajustes efetuados. Note-se que os momentos de dipolo estimados com estas cargas exibem uma grande similaridade com aqueles calculados com MP2/6-31G(d).

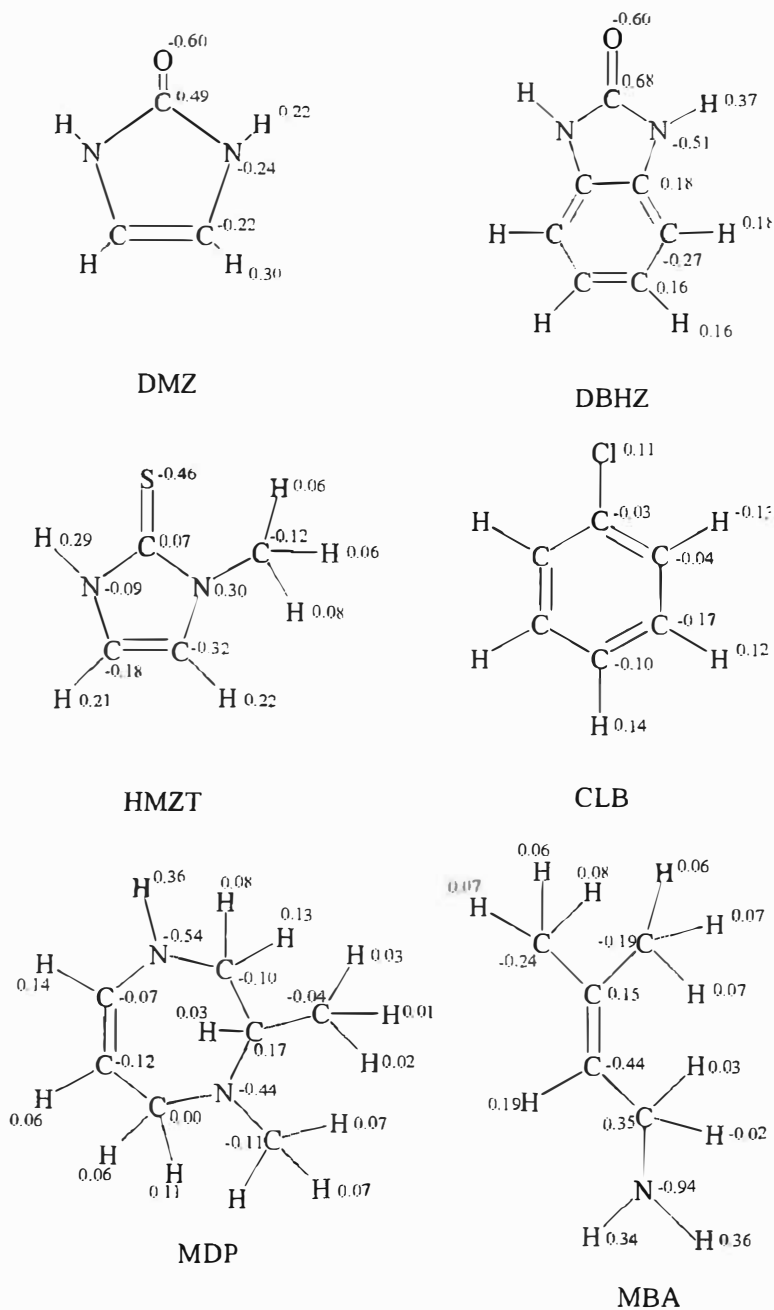


Figura 17 - Cargas RESP.

Tabela 6 - Parâmetros para a avaliação do ajuste de cargas ao MEP.

Molécula	RMS*	RRMS**	N ^o de pontos	μ / (D)	μ / (D)
				AMBER94 modificado	MP2 6-31G(d)
DMZ	0,00135	0,0711	614	4,59	4,54
DBHZ	0,0015	0,0641	798	2,40	2,742
MDP	0,0023	0,2503	894	3,48	1,938
HMZT	0,0029	0,1214	780	4,92	5,950
CLB	0,0014	0,2155	810	2,28	1,558
MBA	0,0019	0,2228	783	0,98	1,356

* = Desvio quadrático médio absoluto, ** = Desvio quadrático médio relativo.

2.3.4 - Parâmetros de equilíbrio

A tabela 7 compara distâncias e ângulos de equilíbrio para DMZ. Note que, de um ponto de vista qualitativo, todos os métodos produzem resultados razoáveis para a descrição da geometria molecular de DMZ. Desta forma, preferiu-se utilizar o método B3LYP/6-31G(d) nos cálculos com os demais fragmentos (Tabelas 8 e 9), uma vez que este método forneceu valores confiáveis a um razoável custo computacional. Os valores obtidos com o método escolhido foram usados para modificar o campo de força AMBER94.

Tabela 7 - Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação obtidos para DMZ com diferentes níveis de teoria.

	HF/6-31G(d)	MP2/ 6-31G(d)	AM1	B3LYP/6-31G(d)
NX-CX	1,368	1,389	1,417	1,393
NX-CY	1,393	1,390	1,407	1,396
CX=OX	1,202	1,230	1,247	1,222
CY=CX	1,327	1,358	1,385	1,351
NX-HX	0,991	1,010	0,983	1,007
CY-HY	1,068	1,079	1,089	1,078
∠ NX-CX-NX	103,7	102,5	106,1	102,7
∠ NX-CX=OX	128,1	128,7	126,9	128,2
∠ NX-CY=CX	107,2	106,9	108,2	107,2
∠ NX-CY-HY	122,2	122,6	121,7	122,4
∠ CX-NX-CY	110,9	111,8	108,7	111,4
∠ CX-NX-HX	122,0	121,4	124,5	121,6
∠ CY-NX-HX	127,1	126,8	126,7	126,9
∠ CY=CX-HY	130,5	130,4	130,1	130,4

Tabela 8 - Distâncias de ligação obtidas pelo método B3LYP/6-31G(d).

Ligação	Comprimento (Å)	Fragmento molecular utilizado
CZ = CZ	1,398	DBHZ
CZ - HZ	1,087	DBHZ
CZ - C7	1,518	MDP
CZ = CY	1,391	DBHZ
C7 - NZ	1,457	MDP
C7 - H7	1,083	MDP
C7 - C7	1,537	MDP
C7 - NX	1,457	MDP
C7 - CK	1,538	MDP
NZ - CI	1,442	MDP
CI - C!	1,498	MBA
CI - HI	1,099	MBA
C! = C!	1,346	MBA
C! - H!	1,090	MBA
CK - HK	1,096	MBA
C! - CK	1,506	MBA
CZ - CL	1,742	CLB
CS = SX	1,671	HMZT
NX - CS	1,377	HMZT
NX - C7	1,467	HMZT
CZ - CI	1,742	HMZT

Tabela 9 - Ângulos de ligação obtidos com o método B3LYP/6-31G(d).

Átomos	Ângulo (°)	Fragmento usado
CZ - CZ - CZ	121,3	DBHZ
CZ - CZ - HZ	119,2	DBHZ
CZ - CZ - C7	125,1	MDP
CZ - CZ - CY	117,3	DBHZ
C7 - CZ - CY	125,1	MDP
CZ - C7 - NZ	118,0	MDP
CZ - C7 - H7	108,6	MDP
NZ - C7 - H7	108,0	MDP
H7 - C7 - H7	106,0	MDP
C7 - NZ - C7	119,0	MDP
C7 - NZ - CI	115,0	MDP
NZ - C7 - C7	111,5	MDP
NZ - C7 - CK	115,7	MDP
C7 - C7 - CK	110,8	MDP
C7 - C7 - H7	105,6	MDP
CK - C7 - H7	106,4	MDP
C7 - C7 - NX	116,5	MDP
NX - C7 - H7	109,0	HMZT
C7 - NX - CX	124,0	HMZT
C7 - NX - CY	121,2	MDP
NX - CY - CZ	132,3	DBHZ
CY - CZ - HZ	121,4	DBHZ
CY - CY - CZ	121,3	DBHZ
NZ - CI - C!	108,7	MBA
NZ - CI - HI	109,6	MDP
C! - CI - HI	111,2	MBA
CI - C! - C!	128,3	MBA
CI - C! - H!	113,5	MBA
C! - C! - H!	118,2	MBA
C7 - CK - HK	111,3	MDP
HK - CK - HK	108,3	MDP
C! - C! - CK	120,4	MBA
CK - C! - CK!	114,2	MBA
C! - CK - HK	113,4	MBA
CZ - CZ - CL	119,4	CLB
NX - C7 - H7	110,0	HMZT
C7 - NX - CS	124,0	HMZT
CS - NX - CY	111,0	HMZT
CY - NX - CS	111,0	HMZT
NX - CS = SX	129,4	HMZT
NX - CS - NX	103,4	HMZT

2.3.5 - Cálculos teste para a avaliação dos parâmetros desenvolvidos

Como forma de avaliar a eficiência dos parâmetros desenvolvidos, vários cálculos foram efetuados, onde foram comparadas as geometrias moleculares e as frequências vibracionais obtidas com o campo de força modificado e com cálculos *ab initio* MP2 ou HF/6-31G(d).

Em primeiro lugar são apresentados os resultados obtidos com a molécula DMZ, uma vez que estes resultados foram publicados no decorrer dos trabalhos. [Abrahão-Júnior, Galembeck e Alemán, 1999] Em seguida são apresentados os testes para os parâmetros obtidos com os demais fragmentos.

Na tabela 10 as geometrias de DMZ otimizadas com o campo de força modificado e com cálculos MP2/6-31G(d) são comparadas. Os resultados indicam a habilidade do novo campo de força em reproduzir parâmetros geométricos. Desta forma, distâncias e ângulos de ligação foram reproduzidos com erros menores que 0.014Å e 2º respectivamente. As frequências vibracionais da DMZ obtidas de cálculos HF/6-31G(d), MP2/6-31G(d) e B3LYP/6-31G(d) além daquelas obtidas a partir do campo de força são apresentadas na tabela 10. A análise estatística destes resultados demonstra a qualidade dos termos desenvolvidos.

Tabela 10 – Comparação dos ângulos e distâncias de ligação da DMZ calculados pelo campo de força e com o método MP2/6-31G(d).

Parâmetro geométrico *	AMBER94 modificado	$\Delta(\text{AMBER94- MP2})$
NX-CX	1,375	-0,014
NX-CY	1,395	0,005
CX=OX	1,226	-0,003
CY=CY	1,359	-0,004
NX-HX	1,007	-0,003
CY-HY	1,083	0,004
\sphericalangle NX-CX-NX	102,3	-0,201
\sphericalangle NX-CX-OX	128,8	0,149
\sphericalangle NX-CY-CY	106,3	-0,616
\sphericalangle NX-CY-HY	123,3	0,744
\sphericalangle CX-NX-CY	112,6	0,767
\sphericalangle CX-NX-HX	121,1	-0,340
\sphericalangle CY-NX-HX	128,7	-1,944
\sphericalangle CY-CY-HY	130,4	0,025

* Ângulos em graus e distâncias em Å.

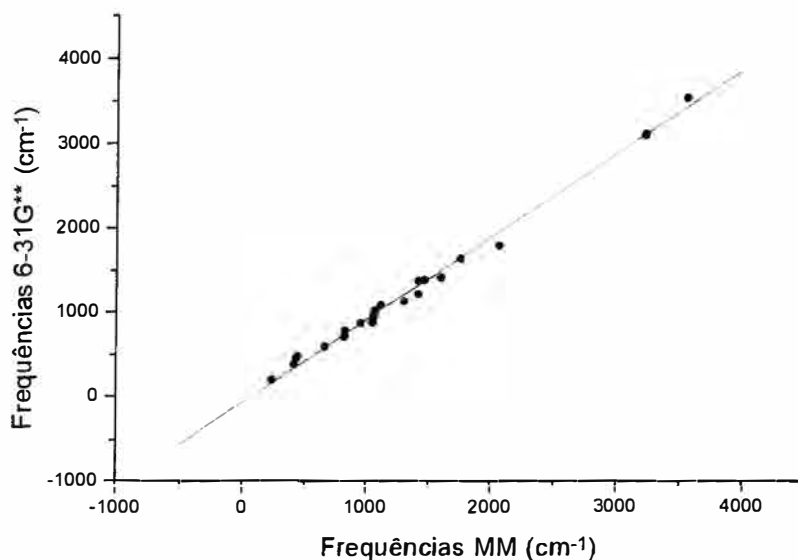


Figura 18 – Correlação entre as frequências obtidas com o campo de força modificado e com MP2/6-31G(d) para DVM. (Eq. da reta: $Y = -73,45 + 0,97X$, $R=0,997$, $N=24$ e $SD=72,63$).

Tabela 11 - Freqüências vibracionais (cm⁻¹) para DMZ obtidas por diferentes níveis de cálculo.

HF/6-31G(d)	MP2/6-31G(d)	B3LYP/6-31G(d)	AMBER94 modificado	Atribuição
207,9	193,26	219,03	332,6	NX-CX-NX, abano.
401,36	371,92	428,97	427,3	HX-NX-CX, torção.
491,30	461,51	486,17	648,0	2(NX-HX), abano.
531,86	481,63	492,79	677,4	NX-CX=OX, def. angular .
653,68	582,73	614,80	754,8	CY=CX, torção.
779,78	639,64	662,06	817,7	NX-CX-NX, abano.
793,75	721,01	730,86	830,8	2(CY-HY)-CX, abano.
866,89	736,50	753,75	1077,2	CY-NX-CX, torção.
957,32	738,27	778,49	1084,6	CY=CX-HY, torção.
973,64	905,07	903,96	1111,5	NX-CY=CX, def. angular.
1058,52	987,71	976,66	1262,6	NX-CX, estiramento.
1128,04	1101,24	1078,87	1418,2	CY-NX; NX-HX, estiramentos
1201,43	1153,15	1143,44	1437,0	CY-NX, estiramento.
1253,28	1168,79	1151,80	1562,8	respiração do anel.
1347,67	1256,04	1225,25	1596,4	deformação do anel.
1524,84	1399,72	1388,92	1749,7	NX-CX, estiramento assimétrico.
1538,67	1421,86	1415,36	1750,3	CY-NX, estiramento.
1571,95	1467,88	1455,00	2072,1	deformação do anel.
1816,94	1643,72	1630,09	2136,7	CY=CX, estiramento.
1989,34	1865,94	1816,48	2486,0	CX=OX, estiramento.
3467,80	3331,74	3290,41	3245,9	CY-HY, estiramento.
3491,66	3352,00	3309,87	3254,4	CY-HY, estiramento.
3929,70	3701,47	3655,29	3575,1	NX-HX, estiramento assimétrico.
3930,02	3702,98	3655,52	3580,1	NX-HX, estiramento assimétrico.

As moléculas uracila e 1-metil-3-vinil uréia (MVU), apresentadas pela figura 19, foram utilizadas para testes dos parâmetros obtidos, tendo em vista que apresentam os mesmos tipos de átomos de DMZ.



Figura 19 - (a) 1-metil-3-vinil uréia e (b) uracila

Os valores obtidos para as geometrias otimizadas com o campo de força modificado e com MP2/6-31G(d) podem ser comparados na tabela 12. As Figuras 20 e 21 apresentam as correlações entre as frequências calculadas com MP2/6-31G(d) e aquelas estimadas com o campo de força modificado. Note-se que os parâmetros desenvolvidos mostraram-se hábeis para reproduzir os valores *ab initio* em ambos os casos. Alguns ângulos de ligação da MVU não foram bem reproduzidos, uma vez que a natureza química de DMZ faz com que os termos sejam mais bem utilizados em compostos cíclicos. As frequências vibracionais foram também reproduzidas com boas correlações, $r = 0,998$ para a uracila e $0,994$ para MVU (figuras 20 e 21). Um ajuste linear foi efetuado para cada gráfico até o zero, donde os fatores de escala para cada correlação sugerem um desvio máximo de 3,3% e 0,5% entre as frequências obtidas por métodos empíricos e mecânico-quânticos para a uracila e a MVU, respectivamente. Intervalos de confiança de 95% são apresentados. Apenas três modos de vibração não foram bem reproduzidos, pois se encontram fora do intervalo de confiança. Estes são o estiramento da carbonila, o da ligação dupla carbono-carbono além da deformação angular de HX-NX-HX. As frequências de duplas ligações não são preditas adequadamente pela parametrização PAPQMD/AM1, enquanto que o ângulo em questão não foi reparametrizado, pois não é necessário para o trabalho com TIBO. Neste caso o parâmetro disponível no campo de força original foi utilizado.

Tabela 12 - Comparação de parâmetros geométricos da uracila e da MVU obtidas pelo AMBER94 modificado e pelo método MP2/6-31G(d).

Parâmetro geométrico *	AMBER94 modificado		MP2/6-31G(d)	
	Uracila	MVU	Uracila	MVU
NX-CX	1,379	1,380	1,390	1,369
NX-CY	1,393	1,384	1,377	1,394
CX=OX	1,221	1,227	1,224	1,231
CY=CY	1,346	1,356	1,352	1,340
NX-HX	1,004	1,004	1,013	1,009
CY-HY	1,077	1,079	1,082	1,084
∠ NX-CX-NX	113,1	100,5	112,4	114,3
∠ NX-CX-OX	123,5	129,0	123,2	126,6
∠ NX-CY-CY	114,1	105,7	112,7	106,9
∠ NX-CY-HY	119,5	125,4	120,5	112,6
∠ CX-NX-CY	125,0	113,1	123,9	121,9
∠ CX-NX-HX	115,1	121,1	115,3	121,0
∠ CY-NX-HX	124,7	125,8	121,2	118,0
∠ CY-CY-HY	122,9	121,5	122,8	123,0

* Ângulos em graus e distâncias em Å.

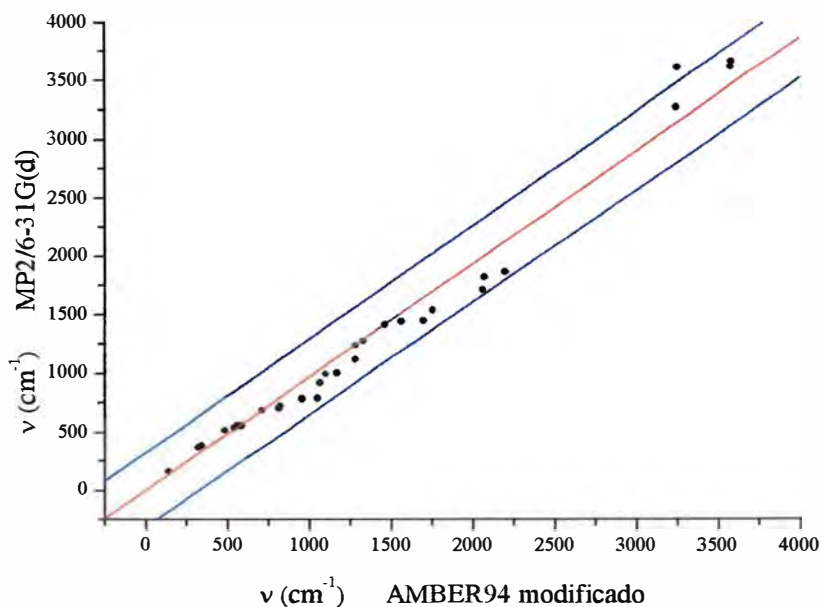


Figura 20 - Correlação entre as frequências calculadas e estimadas para uracila. (Eq. da reta: $Y = 0967X$; $r = 0,989$; $SD = 156,4$) Em azul: intervalo de confiança de 95%.

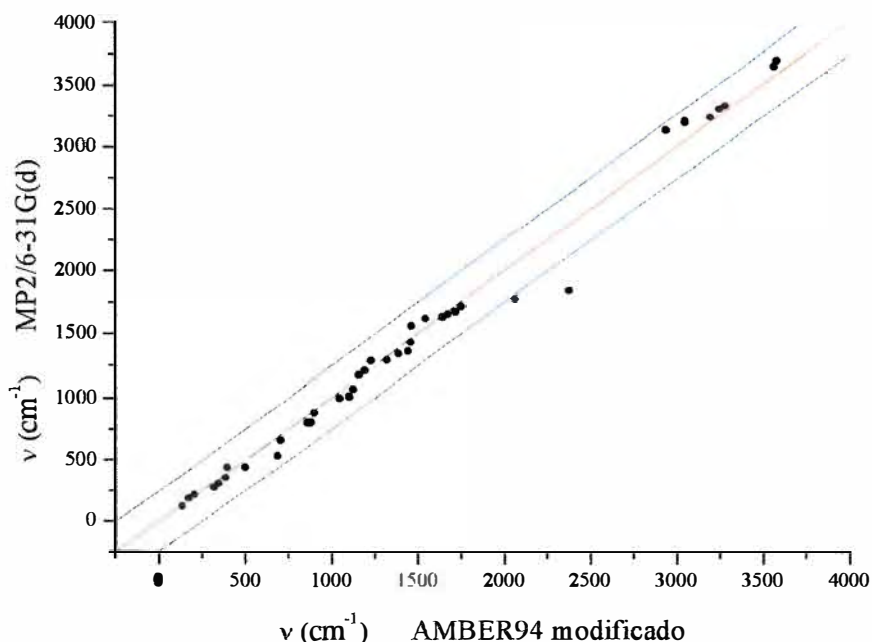


Figura 21 - Correlação entre as frequências calculadas e estimadas para MVU. (Eq. da reta: $Y = 1,005X$; $r = 0,994$; $SD = 122,8$) Em azul: intervalo de confiança de 95%.

Para os outros fragmentos de parametrização (figura 13), especificamente as moléculas 1N-metil-3N-hidroimidazol-2-tiona (HMZT), 1,3-diidro-benzimidazol-2-ona (DBHZ), 3,4-dimetil-2,3,4,5-tetraidro-1H-[1,4]-diazepina (MDP), 3-metil-2-butenilamina (MBA) e clorobenzeno (CLB), as frequências vibracionais foram obtidas ao nível MP2/6-31G(d) [Hariharan e Pople, 1993] e comparadas diretamente com os resultados obtidos com os novos parâmetros no campo de força AMBER94 modificado. Distâncias e ângulos de ligação B3LYP/6-31G(d) foram reproduzidos com erros menores que $0,021\text{\AA}$ e $4,3^\circ$ respectivamente; como pode se visto nas tabelas 13 e 14. Frequências vibracionais para estas moléculas são apresentadas e comparadas nas tabelas 15 a 19 e figuras 22 a 26.

Tabela 13 - Comparação dos comprimentos de ligação obtidos com o AMBER94 modificado e com o método B3LYP/6-31G(d).

Comprimento de ligação (Å)	AMBER94 modificado	B3LYP/6-31G(d)	Molécula
CZ = CZ	1,405	1,398	DBHZ
CZ - HZ	1,087	1,087	DBHZ
CZ = CY	1,395	1,391	DBHZ
CZ - C7	1,516	1,512	MDP
C7 - NZ	1,478	1,469	MDP
C7 - H7	1,095	1,098	MDP
C7 - C7	1,572	1,534	MDP
C7 - NX	1,483	1,467	MDP
C7 - CK	1,559	1,538	MDP
NZ - CI	1,421	1,454	MDP
CI - C!	1,486	1,498	IPN
CI - HI	1,095	1,099	MBA
C! = C!	1,342	1,346	MBA
C! - H!	1,087	1,090	MBA
CK - HK	1,096	1,096	MBA
C! - CK	1,507	1,506	MBA
CS = SX	1,672	1,671	HMZT
NX - CS	1,379	1,377	HMZT
NX - C7	1,460	1,467	HMZT
CZ - CI	1,702	1,742	CLB

Tabela 14 - Comparação dos ângulos de ligação calculados com o AMBER94 modificado e com o método B3LYP/6-31G(d).

Ângulo de ligação (em graus)	AMBER94 modificado	B3LYP/6-31G(d)	Molécula
∠ CZ - CZ - CZ	120,4	121,3	DBHZ
∠ CZ - CZ - HZ	119,8	119,2	DBHZ
∠ CZ - CZ - CY	118,1	119,0	DBHZ
∠ NX - CY - CZ	132,0	132,3	DBHZ
∠ CY - CZ - HZ	121,9	121,4	DBHZ
∠ CY - CY - CZ	121,7	121,3	DBHZ
∠ CZ - C7 - H7	105,6	105,5	MDP
∠ NZ - C7 - H7	107,1	106,4	MDP
∠ H7 - C7 - H7	105,1	105,3	MDP
∠ C7 - NZ - C7	116,0	116,4	MDP
∠ C7 - NZ - C1	112,0	113,2	MDP
∠ NZ - C7 - C7	112,7	111,0	MDP
∠ NZ - C7 - CK	117,0	116,5	MDP
∠ C7 - C7 - CK	108,1	110,5	MDP
∠ C7 - C7 - H7	106,6	108,2	MDP
∠ CK - C7 - H7	103,6	106,6	MDP
∠ C7 - C7 - NX	122,5	116,0	MDP
∠ C7 - NX - CY	125,3	121,1	MDP
∠ CZ - CZ - C7	127,1	122,4	MDP
∠ C7 - CZ - CY	127,1	122,4	MDP
∠ CZ - C7 - NZ	122,1	117,7	MDP
∠ NZ - C1 - H1	110,7	109,1	MDP
∠ C7 - CK - HK	111,6	111,0	MDP
∠ HK - CK - HK	108,1	108,3	MDP
∠ NZ - C1 - C!	107,4	108,7	MBA
∠ C! - C1 - H1	111,5	111,2	MBA
∠ C1 - C! - C!	127,9	128,3	MBA
∠ C1 - C! - H!	114,2	113,5	MBA
∠ C! - C! - H!	117,6	118,2	MBA
∠ C! - C! - CK	120,2	120,4	MBA
∠ CK - C! - CK!	116,2	114,2	MBA
∠ C! - CK - HK	112,6	113,4	MBA
∠ NX - C7 - H7	110,0	110,0	HMZT
∠ C7 - NX - CS	125,6	124,0	HMZT
∠ CS - NX - CY	111,0	111,0	HMZT
∠ NX - CS = SX	130,2	129,4	HMZT
∠ NX - CS - NX	103,4	103,4	HMZT
∠ CS - NX - HX	121,0	120,8	HMZT
∠ CZ - CZ - C1	119,4	119,4	CLB

Tabela 15 - Frequências vibracionais (cm⁻¹) calculadas para DBHZ pelo método MP2/631G(d) e com o AMBER94 modificado.

MP2/631G(d)	AMBER94 modificado	Atribuição
109,1	246,5	Deformação molecular angular fora do plano.
217,6	297,3	Deformação molecular angular assimétrica.
244,4	453,9	Deformação molecular angular assimétrica.
276,4	497,6	Deformação molecular angular simétrica.
316,4	545,6	NX-CY-CZ, deformação angular.
366,7	616,9	NX-HX, abano; def. do anel fora do plano.
404,7	621,0	NX-HX, balanço, CZ-CZ-CZ, def. fora do plano.
499,8	690,4	HX-NX-HX, CZ-HZ, abanos.
513,7	730,6	CY-CZ-CZ, deformação angular.
547,9	817,6	NX-CY-CZ, deformação angular.
549,2	860,1	NX-HX, balanço.
626,5	929,3	Deformação angular entre os anéis.
704,9	984,0	NX-CX-NX, CY-CZ-CZ; deformações angulares.
715,3	1042,0	CZ-HZ, abanos.
726,4	1045,0	NX-CX-NX, abano.
793,1	1077,3	CZ-HZ, abanos assimétricos.
822,3	1088,7	CZ-HZ, abanos assimétricos.
862,5	1219,0	CZ-HZ, abanos assimétricos.
873,2	1229,9	Respiração dos anéis.
916,5	1241,7	Deformação angular do anel benzênico.
1012,8	1324,9	NX-CX, estiramentos simétricos.
1057,0	1397,2	CZ-CZ, estiramentos simétricos.
1149,6	1422,4	CZ-CZ-HZ, deformações angulares.
1211,3	1559,3	CZ-CZ-HZ, deformações angulares.
1229,7	1580,1	NX-CX-OX, deformações angulares em fase.
1271,1	1615,5	CY-NX-HX, CY-CZ-HZ, def. angulares.
1295,1	1713,0	NX-HX, deformações angulares.
1369,0	1733,0	OX-CX-NX, deformação angular assimétrica.
1401,7	1877,9	**NX-HX, **CZ-HZ, deformações angulares.
1415,5	1885,7	NX-CY, CY-CY, estiramentos.
1509,9	1901,8	CY-CY, CZ-CZ, estiramentos.
1548,3	1942,1	CZ-CZ, estiramentos, CZ-CZ-HZ, def. angulares.
1555,9	2038,8	NX-CY, estiramentos, CY-CZ-CZ, def. angulares.
1683,3	2072,2	CY-CY, CZ-CZ, estiramentos.
1708,2	2240,0	NX-CY, CY-CZ, estiramentos.
1875,0	2297,2	CX=OX, estiramento.
3227,0	3416,3	CZ-HZ, estiramentos assimétricos.
3233,6	3417,1	CZ-HZ, estiramentos simétricos.
3242,0	3418,0	CZ-HZ, estiramentos assimétricos.
3251,7	3421,7	CZ-HZ, estiramentos simétricos.
3683,2	3573,5	NX-HX, estiramentos simétricos.
3683,8	3580,0	NX-HX, estiramentos assimétricos.

** = Qualquer átomo vizinho.

Tabela 16 - Frequências vibracionais (cm⁻¹) calculadas para MDP pelo método MP2/631G(d) e com o AMBER94 modificado.

MP2/631G(d)	AMBER94 modificado	Atribuição
82,3	116,5	NZ-CI, abanos.
131,4	172,6	CY-CZ-C7, abano.
210,5	311,6	NX-HX, CK-HK, abanos.
253,1	348,2	NZ-CI, C7-CK, deformações angulares em fase.
288,1	355,3	NZ-CI-HI, deformação angular assimétrica.
302,7	386,8	C7-CK-HK, def. angular assimétrica.
350,7	423,8	C7-NZ-C7, C7-C7-NX, def. angulares.
407,2	434,7	NZ-CI, C7-CK, abanos.
417,7	485,6	CZ-CY-CX, deformação angular.
429,2	509,7	C7-NZ-C7, deformação angular.
491,4	539,1	C7-NZ-C7, abano.
514,2	662,7	NX-HX, abano.
626,9	755,0	NX-HX, abano.
713,6	803,0	Deformação do anel.
767,3	846,2	CZ-HZ, abano.
815,6	892,4	CY-HY, CZ-HZ, abanos.
875,4	966,0	CY-CZ-C7, deformação angular.
928,4	987,5	NZ-C7, estiramentos.
957,6	1063,0	Respiração do anel.
989,7	1080,6	C7-CZ, estiramento.
1067,5	1100,9	C7-C7, estiramento.
1094,4	1141,0	CZ-CY-HZ, CY-CZ-HZ, def. angulares.
1102,3	1152,2	NZ-C7-H7, deformação angular.
1123,6	1160,5	NZ-C7, estiramento.
1164,9	1194,4	C7-CK-HK, deformação angular.
1210,8	1266,1	C7-CK, estiramento.
1229,5	1298,7	C7-CK-HK, NZ-CI-HI, def. angulares.
1255,4	1309,3	NZ-C7-H7, deformações angulares.
1274,5	1348,4	CZ-C7, NX-C7, estiramentos.
1301,6	1357,3	Deformação assimétrica do anel.
1391,4	1377,9	** -NX-HX, NX-C7-H7, def. angulares.
1410,0	1412,2	CZ-CY-HY, CY-CZ-HZ, def. angulares.
1440,0	1428,7	** -C7-H7, deformações angulares.
1474,5	1433,3	NX-C7, estiramento; NX-C7-H7, def. angulares.
1505,5	1444,0	C7-H7, abano; NX-CY-HY, def. angular.
1510,9	1464,4	CK-C7-H7, deformações angulares.
1529,0	1491,0	C7-H7, abano.
1549,8	1513,8	C7-H7, abano.

Tabela 16 (Continuação) - Freqüências vibracionais (cm⁻¹) calculadas para MDP pelo método MP2/631G(d) e com o AMBER94 modificado.

MP2/631G(d)	AMBER94 modificado	Atribuição
1564,4	1534,9	CK-3HK, deformações angulares em fase.
1576,3	1570,8	CY-CZ-HZ, CZ-CY-HY, def. angulares.
1614,0	1584,7	CI-3HI, deformações angulares em fase.
1638,9	1620,4	HK-CK-HK, HI-CI-HI, deformações angulares assimétricas.
1645,1	1647,1	H-Csp3-H, deformações angulares assimétricas.
1648,5	1709,4	H-Csp3-H, deformações angulares.
1654,7	1727,0	CK-HK, CI-HI, deformações angulares.
1665,7	1772,1	** -NX-HX, deformações angulares.
1669,2	1794,5	H-Csp3-H, deformações angulares assimétricas.
1672,7	1878,9	H-Csp3-H, deformações angulares simétricas.
1887,5	1981,0	CZ-CY, estiramento.
3145,0	2842,5	CI-HI, estiramento simétrico.
3155,3	2942,7	C7(primário)-H7, estiramento.
3191,7	2946,2	C7-H7, estiramento assimétrico.
3204,7	2947,0	CK-HK, estiramento.
3230,7	2947,9	CI-HI, estiramento.
3244,8	2950,5	C7-H7, estiramento.
3258,4	2981,2	C7-H7, CK-HK, CI-HI, estiramentos assimétricos.
3267,2	3005,2	CK-HK, CI-HI, estiramentos assimétricos.
3272,6	3007,0	Csp3-Hsp3, estiramentos assimétricos.
3280,7	3049,9	C7-H7, estiramentos assimétricos.
3304,1	3052,4	CK-HK, estiramentos assimétricos.
3344,4	3239,2	CY-HY, CZ-HZ, estiramentos assimétricos.
3369,5	3415,3	CY-HY, CZ-HZ, estiramentos.
3840,4	3576,3	NX-HX, estiramento assimétrico.

** = Qualquer átomo vizinho.

Tabela 17 - Frequências vibracionais (cm⁻¹) calculadas para MBA pelo método MP2/631G(d) e com o AMBER94 modificado.

MP2/631G(d)	AMBER94 modificado	Atribuição
54,0	59,9	Deformação angular da molécula.
128,1	150,7	CK-3HK, deformações angulares assimétricas.
156,8	171,9	CK-3HK, deformações angulares em fase.
205,9	238,4	CK-3HK, deformações angulares assimétricas.
266,2	335,7	NZ-CI, torção.
329,9	401,7	NZ-CI, torção.
372,4	491,3	CK-CI-CK, deformação angular.
422,2	507,0	CK-CI-CK, abano.
500,4	546,5	NZ-CI-CI, deformação angular.
517,1	663,2	CI-CI=CI, deformação angular.
800,4	892,1	CI-CK, estiramentos.
865,0	916,3	CI-HI, abano.
907,9	981,8	H-NZ-H, abano.
982,0	998,6	CI-NZ-H, CI-CK-HK, deformações angulares.
996,8	1005,5	CI-CK-HK, deformações angulares.
1043,7	1042,0	HK-CK-HK, deformações angulares assimétricas.
1066,1	1092,8	NZ-CI, estiramento.
1106,7	1106,9	CI-CK-HK, CI-NZ-H, def. angulares assimétricas.
1136,2	1174,1	CI-CK-HK, deformações angulares assimétricas.
1185,0	1196,2	CI-CI, estiramento.
1201,7	1292,1	CI-CI-HI, H-NZ-H, deformações angulares.
1267,9	1323,7	CI-CK, estiramento.
1338,6	1396,6	CI-CI-HI, deformação angular.
1403,0	1423,8	CI-CI-HI, deformação angular.
1459,5	1425,3	NZ-CI-HI, deformação angular.
1466,3	1430,7	CK-3HK, deformações angulares.
1476,4	1442,6	CK-3HK, deformações angulares assimétricas.
1534,5	1454,5	CK-3HK, deformações angulares em fase.
1550,3	1494,7	CK-HK, estiramentos.
1553,1	1522,2	HK-CK-HK, gangorra.
1559,8	1579,4	HK-CK-HK, deformações angulares.
1574,0	1661,8	HI-CI-HI, deformação angular.
1715,4	1691,5	H-NZ-H, deformação angular.
1765,2	2005,1	CI=CI, estiramento.
3064,7	2878,5	CI-HI, estiramentos.
3085,1	2947,7	CK-HK, estiramentos.
3093,2	2948,0	CK-HK, estiramentos.
3117,8	2948,7	CI-HI, estiramentos.
3155,9	3043,0	CK-HK, estiramentos assimétricos.
3158,9	3045,9	CK-HK, estiramentos assimétricos.
3194,2	3046,4	CK-HK, CI-HI, estiramentos axiais.
3203,3	3046,7	CI-HI, estiramentos.
3215,7	3158,7	CK-HK, estiramentos.
3503,7	3537,1	CK-HK, estiramentos axiais.
3608,4	3609,2	NZ-H, estiramentos assimétricos.

Tabela 18 - Frequências vibracionais (cm^{-1}) calculadas para HMZT pelo método MP2/631G(d) e com o AMBER94 modificado.

MP2/6-31G(d)	AMBER94 modificado	Atribuição
183,6	206,3	C7-H7 ₂ , rock.
228,6	282,6	C7-H7 ₂ , rock.
269,9	404,9	NX-CS-SX, deformação angular.
418,0	419,3	C7-NX-CY; C7-NX-CS, def. angulares.
514,4	516,8	NX-HX, NX-C7; def. angular fora do plano.
556,4	646,0	CS=SX, estiramento.
596,2	753,0	NX-HX, CY-HY, def. fora do plano.
650,6	797,3	CY-HY, def. fora do plano.
679,7	840,9	CY-HY, def. fora do plano.
709,5	1052,8	NX-C7, estiramento.
723,7	1060,8	CY-HY, def. fora do plano.
932,4	1083,6	NX-CY-CY, deformação angular.
1051,5	1135,4	NX-CY, estiramento.
1126,2	1137,2	CY-CY-HY, NX-C7-H7, def. angular.
1138,5	1250,1	NX-CY, estiram. *-CY-HY, def. angular assim.
1184,6	1260,1	C7-H7 ₂ , rock.
1206,8	1443,5	CS-SX, estiramento.
1265,7	1455,5	CS-SX, estiramento, *-NX-HX, def. angular.
1326,5	1476,4	Respiração do anel.
1408,1	1596,5	NX-CS, estiramento.
1469,2	1611,1	NX-C7, estiramento.
1506,2	1645,9	NX-C7, estiramento.
1522,6	1656,4	CS-SX, estiramento, *-NX-HX, def. angular.
1554,8	1792,6	C7-H7 ₂ , def. angular simétrica.
1562,0	2051,9	C7-H7 ₂ , def. angular assimétrica.
1629,6	2469,3	CY=CX, estiramento.
3117,2	2939,9	C7-H7, estiramento simétrico.
3208,9	3050,3	C7-H7, estiramento assimétrico.
3238,2	3050,8	C7-H7, estiramento assimétrico.
3326,0	3246,7	CY-HY, estiramento assimétrico.
3348,0	3252,4	CY-HY, estiramento simétrico.
3672,4	3575,1	NX-HX, estiramento.

Tabela 19 - Freqüências vibracionais (cm^{-1}) calculadas para CLB pelo método MP2/6-31G(d) e com o AMBER94 modificado.

MP2/6-31G(d)	AMBER94 modificado	Atribuição
230,8	269,1	CZ-Cl deformação fora do plano.
330,5	426	CZ-CZ-Cl deformação angular.
448,7	444,8	CZ-Cl estiramento.
481,3	732,3	CZ-Cl def. assimétrica fora do plano.
550,8	813	CZ-Cl def. simétrica fora do plano.
675,2	839	CZ-CZ-CZ def. angulares.
766,9	921	CZ-Cl estiramento.
778,9	922	Deformação axial fora do plano.
892,6	954,6	CZ-HZ def. simétrica fora do plano.
996,7	1006,5	CZ-HZ def. assimétrica fora do plano.
1073,6	1040,6	Respiração do anel.
1074,0	1083	CZ-HZ def. assimétrica fora do plano.
1111,3	1091,4	CZ-Cl, estiramento.
1134,9	1235,5	CZ-HZ def. assimétrica fora do plano.
1136,0	1311,6	CZ-CZ, estiramentos assimétricos.
1157,1	1327	CZ-HZ, abano.
1183,1	1442,7	CZ-HZ, rock.
1195,0	1502	CZ-Cl, estiramento.
1301,7	1655,5	CZ-CZ-HZ, def. angulares laterais.
1333,3	1693	CZ-CZ-HZ, def. angulares laterais assimétricas.
1474,3	1720	CZ-CZ-HZ, deformações angulares.
1604,2	1778	CZ-CZ, estiramentos, CZ-CZ-HZ, rock.
1648,9	1915	CZ-HZ, deformações angulares laterais simétricas.
1748,8	2083	CZ-CZ, estiramentos assimétricos acima e abaixo.
1760,1	2298	CZ-CZ, estiramentos laterais.
3251,8	3417	CZ-HZ, estiramentos assimétricos
3261,7	3417,3	CZ-HZ, estiramentos laterais assimétricos.
3275,3	3420,4	CZ-HZ, estiramentos assimétricos (mais intensos próximos ao cloro)
3283,4	3422,4	CZ-HZ, estiramentos laterais assimétricos.
3287,3	3424,4	CZ-HZ, estiramentos simétricos.

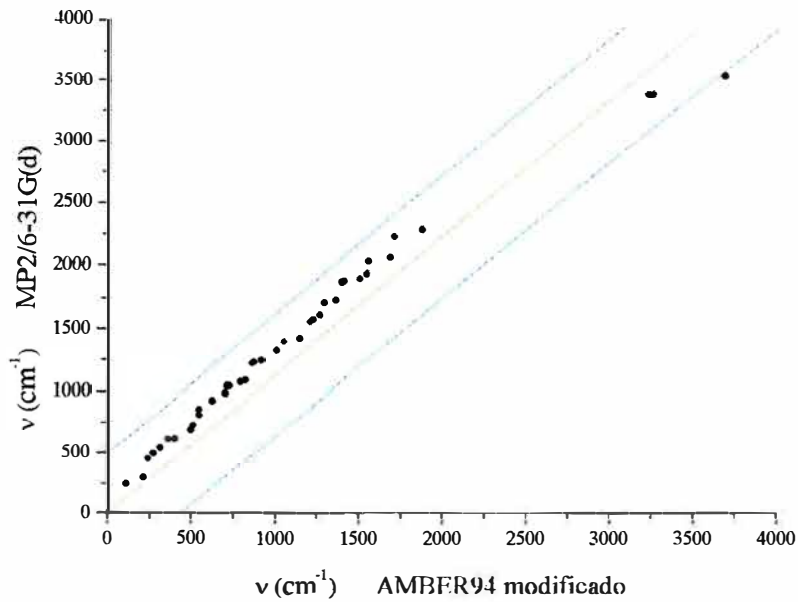


Figura 22 - Correlação entre as frequências calculadas e estimadas para DBHZ. (Eq. da reta: $Y = 1,126X$; $r = 0,991$; $SD = 242,82$) Em azul: intervalo de confiança de 95%.

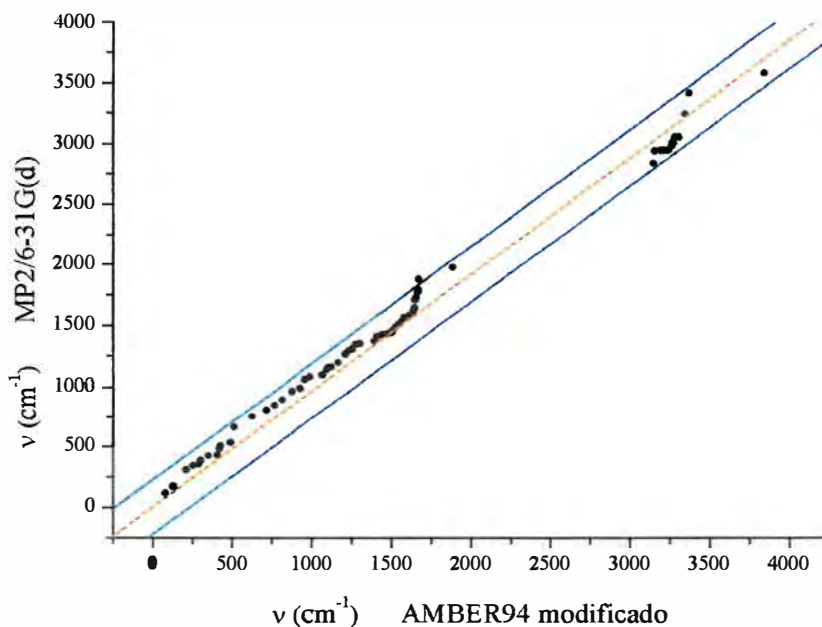


Figura 23 - Correlação entre as frequências calculadas e estimadas para MDP. (Eq. da reta: $Y = 0,962X$; $r = 0,997$; $SD = 113,33$) Em azul: intervalo de confiança de 95%.

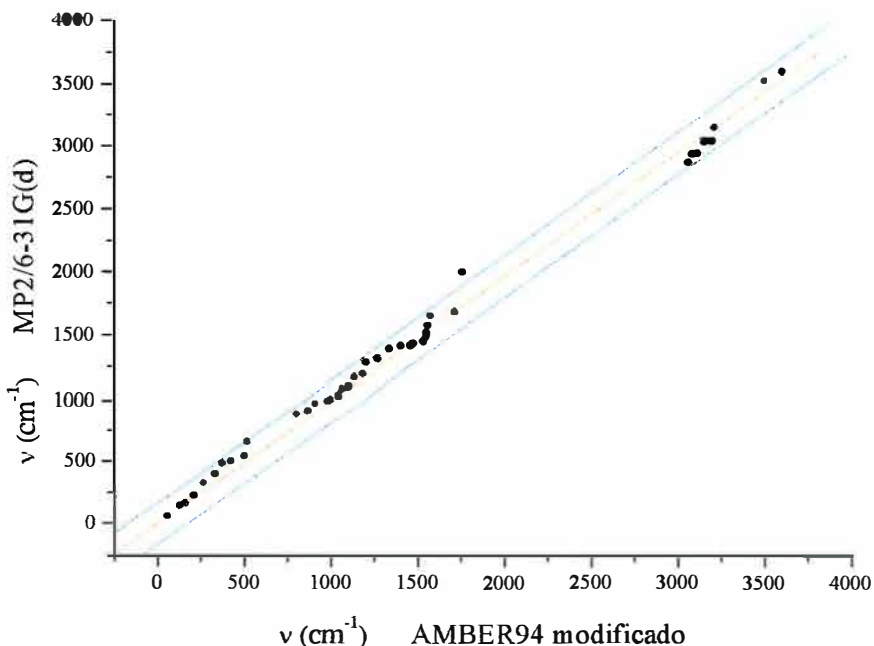


Figura 24 - Correlação entre as frequências calculadas e estimadas para MBA. (Eq. da reta: $Y = 0,982X$; $r = 0,998$; $SD = 82,82$) Em azul: intervalo de confiança de 95%.

As análises estatísticas destes resultados indicam que os termos desenvolvidos são de boa qualidade. As correlações entre as frequências mecânico-quânticas e empíricas apresentam boa correlação ($r > 0,99$), como também os fatores de escala sugerem um desvio máximo de 2 à 12% entre as frequências empíricas e mecânico-quânticas. Os intervalos de confiança a 95% indicam que alguns estiramentos de duplas ligações não foram bem reproduzidos. Este fato pode ser mais bem caracterizado para a correlação apresentada para as frequências vibracionais de DBHZ, o que pode ser também atribuído às torções impróprias, características do sistema aromático desta molécula. É importante ressaltar ainda que os ajustes lineares efetuados consideram como origem de coordenadas o ponto (0,0) e nem um ponto foi excluído das estatísticas, como forma de se avaliar o conjunto completo de parâmetros para cada fragmento molecular.

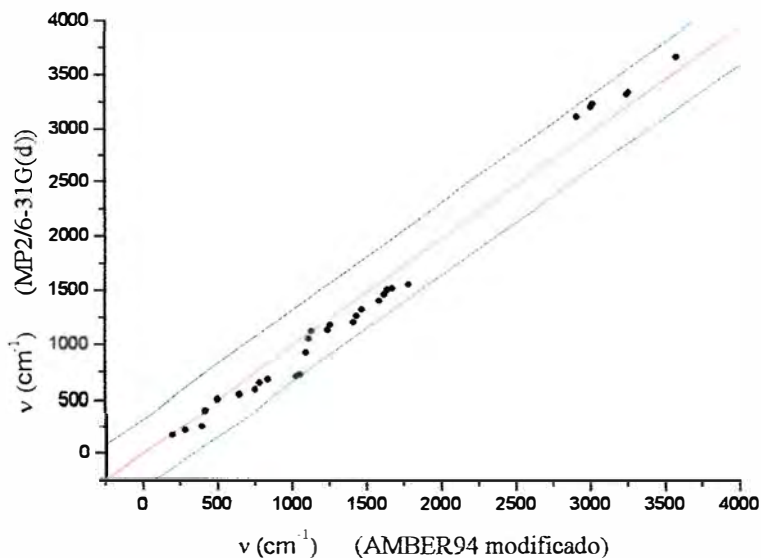


Figura 25 - Correlação entre as frequências calculadas e estimadas para HMZT. (Eq. da reta: $Y = 0,989X$; $r = 0,994$; $SD = 160,61$) Em azul: intervalo de confiança de 95%.

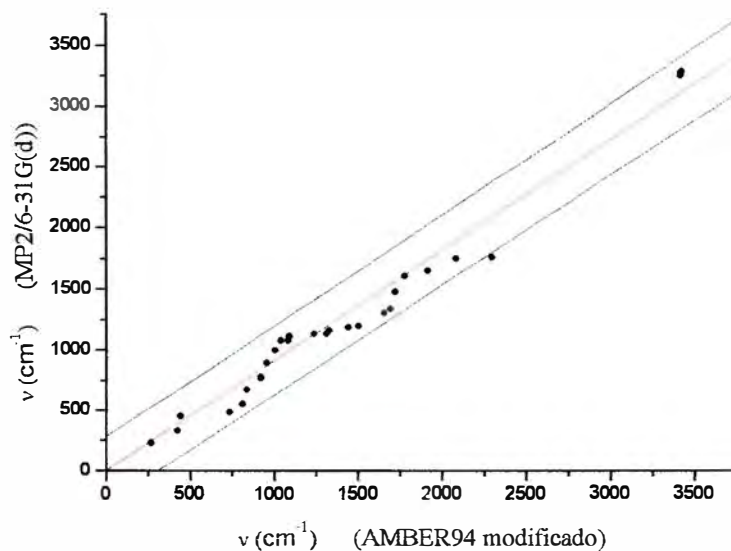


Figura 26 - Correlação entre as frequências calculadas e estimadas para CLB. (Eq. da reta: $Y = 0,910X$; $r = 0,991$; $SD = 137,73$) Em azul: intervalo de confiança de 95%.

O campo de força modificado permitiu que cálculos com as moléculas de TIBO R82913 e R79882 fossem efetuados por mecânica molecular, de forma a reproduzir resultados mecânico-quânticos de alto nível. As tabelas 20 e 21

tabelas 22 e 23 para a TIBO R82913, além de valores experimentais para a TIBO R82913. A identificação dos átomos pode ser feita através das figuras 27 e 28.

Note que o campo de força modificado consegue reproduzir bem os valores dados pelo cálculo HF/6-31G(d), demonstrando que a parametrização produz resultados comparáveis ao método HF/6-31G(d) e superiores aos outros métodos empregados.

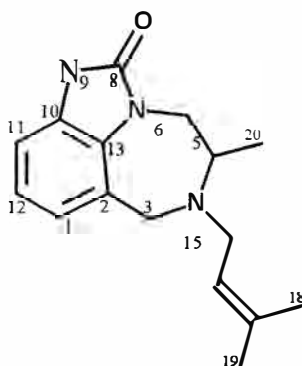


Figura 27 - Esquema para a identificação dos átomos da TIBO R79882.

Tabela 20-Comparação das distâncias de ligação da TIBO R79882 obtidas com diferentes níveis de teoria.

Ligação (Å)	AMBER94 modificado	HF/3-21G	HF/6-31G(d)	AM1	MM3
C1-C2	1,410	1,396	1,399	1,405	1,409
C2-C3	1,526	1,523	1,520	1,501	1,510
C3-N4	1,447	1,455	1,444	1,447	1,451
N4-C5	1,478	1,468	1,458	1,456	1,463
C5-C6	1,575	1,532	1,530	1,552	1,526
C6-N7	1,458	1,465	1,455	1,439	1,457
N7-C8	1,374	1,385	1,376	1,445	1,389
C8-C9	1,365	1,376	1,368	1,428	1,375
C8-O14	1,228	1,215	1,199	1,242	1,207
N9-C10	1,391	1,389	1,384	1,410	1,376
C10-C13	1,362	1,402	1,398	1,452	1,400
C10-C11	1,402	1,369	1,373	1,388	1,387
C11-C12	1,398	1,389	1,391	1,399	1,392
C1-C12	1,400	1,379	1,382	1,391	1,397
C5-C20	1,546	1,538	1,531	1,531	1,528
N4-C15	1,431	1,473	1,458	1,456	1,338
C15-C16	1,526	1,509	1,507	1,496	1,335
C16-C17	1,380	1,321	1,325	1,342	1,509
C17-C18	1,510	1,516	1,511	1,483	1,537

Tabela 21 - Comparação dos ângulos de ligação da TIBO R79882 obtidos com diferentes níveis de teoria.

Ângulo (graus)	AMBER94 modificado	HF/3-21G	HF/6-31G(d)	AM1	MM3
C1-C2-C3	118,6	118,8	119,4	119,1	117,1
C1-C12-C11	120,1	120,4	120,7	121,5	120,0
C1-C2-C13	117,4	117,1	116,4	117,5	117,7
C2-C1-C12	121,3	122,3	122,5	122,1	121,9
C3-C2-C13	123,9	124,0	124,1	123,3	125,1
C2-C3-N4	120,9	116,2	117,5	118,8	113,8
C3-N4-C5	117,4	115,5	114,6	114,8	118,8
C3-N4-C15	111,6	114,2	114,2	113,8	117,2
C5-N4-C15	115,4	118,3	117,3	115,2	120,0
N4-C5-C6	116,7	113,5	115,1	115,5	112,3
N4-C5-C20	117,0	110,7	111,2	112,9	111,1
C6-C5-C20	107,8	109,4	109,5	106,7	109,9
C5-C6-N7	116,5	113,8	114,2	114,2	116,6
C6-N7-C13	128,9	131,2	129,6	124,4	125,7
C6-N7-C8	117,1	118,2	118,8	118,5	121,6
C8-N7-C13	113,9	110,2	109,6	106,7	110,1
N7-C8-N9	100,8	105,7	106,3	108,7	105,6
N7-C8-O14	130,2	126,4	126,8	125,9	127,7
C8-N9-C10	114,1	101,8	110,8	107,6	110,6
N9-C8-O14	129,0	127,9	126,9	125,2	126,4
N9-C10-C11	131,7	130,8	131,0	130,7	129,9
N9-C10-C13	106,1	106,9	106,6	108,2	107,6
C11-C10-C13	122,3	122,3	122,4	121,0	122,5
C10-C11-C12	118,1	117,6	117,1	117,7	118,3
C2-C13-C10	120,8	120,3	120,9	120,2	119,5
C2-C13-N7	134,1	133,4	132,4	131,5	134,4
C10-C13-N7	105,1	106,4	106,7	108,2	106,0
N4-C15-C16	110,1	109,7	111,0	113,6	124,2
C15-C16-C17	128,3	128,1	128,8	122,4	125,4
C16-C17-C18	124,5	125,7	125,6	122,7	109,9
C16-C17-C19	120,4	121,0	120,6	121,5	109,9
C18-C17-C19	111,1	113,3	113,8	115,8	110,8

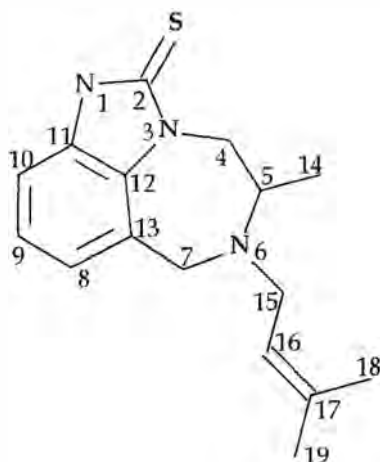


Figura 28 - Esquema para a identificação dos átomos da TIBO R82913.

Tabela 22 - Distâncias (Å) para a TIBO R82913 obtidos em vários níveis de teoria, em comparação com dados experimentais obtidos por cristalografia de raios-X.

Distância	AMBER94 modificado	HF/3-21G	HF/6- 31G(d)	AM1	B3LYP / 6-31G(d)	Experimental
N1-C2	1,362	1,351	1,348	1,409	1,380	1,373
C2-N3	1,369	1,357	1,354	1,425	1,390	1,358
C2-S	1,665	1,729	1,676	1,575	1,713	1,688
N3-C4	1,473	1,477	1,464	1,438	1,481	1,450
C4-C5	1,569	1,531	1,529	1,551	1,540	1,529
C5-N6	1,497	1,466	1,457	1,455	1,481	1,472
C5-C14	1,545	1,539	1,532	1,531	1,544	1,548
N6- C7	1,462	1,450	1,440	1,444	1,464	1,453
N6-C15	1,453	1,474	1,459	1,456	1,488	1,472
C7-C13	1,515	1,524	1,521	1,501	1,529	1,506
C8-C9	1,403	1,375	1,384	1,396	1,388	1,405
C9-C10	1,399	1,372	1,381	1,401	1,386	1,395
C9 - CL	1,743	1,815	1,743	1,701	1,833	1,735
C10-C11	1,393	1,375	1,378	1,389	1,389	1,382
C11-C12	1,371	1,397	1,393	1,452	1,420	1,417
C13-C12	1,403	1,386	1,389	1,394	1,400	1,403
C15-C16	1,503	1,509	1,507	1,495	1,511	1,494
C16-C17	1,359	1,321	1,325	1,342	1,339	1,310
C17-C18	1,515	1,516	1,511	1,483	1,518	1,519

Tabela 23 - Ângulos de ligação (graus) para a TIBO R82913 obtidos em vários níveis de teoria, em comparação com dados experimentais obtidos por cristalografia de raios-x.

Ângulo	AMBER94 modificado	HF/3-21G	HF/6-31G(d)	AM1	B3LYP / 6-31G(d)	Experimental
N1-C2-N3	103,9	106,9	106,9	107,8	105,6	106,2
N1-C2-S	125,8	124,9	124,6	125,1	126,1	126,5
N1-C11-C10	130,4	130,6	130,5	131,0	131,0	129,5
N1-C11-C12	107,0	106,5	106,3	107,3	106,6	106,5
C2-N1-C11	111,6	111,0	111,1	109,3	111,4	111,3
C2-N3-C4	121,1	119,9	120,7	120,8	119,5	122,3
C2-N3-C12	111,7	109,9	109,5	108,3	110,3	108,5
N3-C2-S	130,2	128,2	128,5	127,0	128,2	126,3
N3-C12-C13	133,4	134,0	133,4	132,7	133,7	132,7
N3-C12-C11	105,6	105,8	106,8	107,2	106,1	107,2
C4-N3-C12	127,1	130,0	129,2	126,3	129,8	127,6
C4-C5-C14	110,3	108,8	108,9	106,6	108,6	107,0
C5-C4-N3	121,7	114,3	114,8	114,8	114,8	115,1
C5-N6-C15	114,7	118,6	117,4	115,2	117,4	116,5
C5-N6-C7	116,1	115,3	114,3	114,8	114,8	112,6
N6-C5-C4	114,5	113,9	115,4	115,5	114,6	115,2
N6-C5-C14	113,8	110,8	112,2	112,7	110,5	110,1
N6-C15-C16	109,0	109,7	111,0	113,6	119,7	109,8
C7-C13-C12	125,6	124,6	124,9	124,0	124,4	123,8
C7-N6-C15	109,9	114,8	114,6	114,1	113,7	113,6
C7-C13-C8	116,4	118,3	118,5	118,2	118,3	119,9
C8-C9-C10	120,4	122,6	121,9	122,0	123,1	121,7
C8-C13-C12	116,9	117,0	116,5	117,7	117,1	115,9
C8 - C9 - CL	119,9	118,8	119,2	119,3	118,7	119,1
C9-C8-C13	121,5	121,4	122,0	121,7	121,1	122,7
C9-C10-C11	117,6	116,0	115,9	116,9	116,0	115,4
C10-C11-C12	122,6	122,9	123,3	121,7	122,5	124,0
C11-C12-C13	121,0	120,1	120,4	119,9	120,2	120,0
C13-C7-N6	122,0	115,7	117,2	119,1	116,9	118,6
C15-C16-C17	133,0	128,0	128,7	122,5	127,7	126,1
C16-C17-C19	120,5	121,0	120,6	121,5	120,8	120,7
C18-C17-C19	116,1	113,3	113,8	115,8	113,9	-

2.3.4 - Análise conformacional

As predições de uma série de propriedades moleculares por modelagem molecular têm sido dificultadas principalmente por dois fatores. Um se refere à avaliação das diferenças de energias livres em fases condensadas de forma rápida e realística, o outro obstáculo é o problema dos múltiplos mínimos. Este último trata da dificuldade intrínseca de se localizar todos os confôrmeros moleculares populados de baixa energia, definidos pela complexa hipersuperfície de energia potencial de moléculas com várias ligações flexíveis. Vários métodos de modelagem molecular têm sido propostos para definir estes confôrmeros de baixa energia. [Howard e Kollman, 1988] A maioria deles, no entanto, omite espécies com populações significativas, impedindo a obtenção de resultados confiáveis.

Em certas ocasiões deseja-se compreender melhor como as conformações obtidas se relacionam, ou seja, após uma busca conformacional o pesquisador deve investigar se as conformações obtidas podem ser agrupadas ou se os confôrmeros são distribuídos aleatoriamente em uma certa região do espaço conformacional. Caso os confôrmeros sejam relacionados uns com outros por determinados padrões, moléculas representativas destes grupos devem ser identificadas. Os procedimentos utilizados para estas finalidades consistem na redução de dados de uma busca conformacional, uma vez que o número de estruturas geradas com a variação dos ângulos diedros livres de uma molécula é muito grande. Por exemplo, se uma busca tipo MMC (busca conformacional tipo Monte Carlo) é efetuada, variando seis diedros de uma molécula em intervalos de 30° , 12^6 ou 2985984 estruturas são geradas.

Neste trabalho, duas metodologias de busca conformacional foram empregadas e comparadas: MMC e SUMM. A tabela 24 apresenta um resumo dos resultados, indicando a superioridade da metodologia SUMM, a qual foi utilizada nos demais casos. Para um mesmo limiar de energia a busca SUMM mostrou ser mais eficiente, uma vez que encontra um número maior de confôrmeros, bem

como mais confôrmeros com boa convergência. As duas últimas linhas da tabela apresentam dados obtidos com a estratégia de *clustering* para avaliar os dois métodos de busca conformacional empregados. Este método foi utilizado na redução de dados das buscas conformacionais e foi descrito na seção 2.2.7. Em uma primeira etapa, os quatros confôrmeros previstos em estudos anteriores [Caldwell et al., 1993; Schäfer et al., 1993, Peeters et al., 1995] são encontrados apenas se o limiar de energia for de 24 Kcal/Mol, no entanto o método SUMM consegue localizar os quatro confôrmeros esperados com um limiar de 16,8 Kcal/Mol, embora com baixa população em dois deles. A comparação conformacional é feita pela sobreposição de todos os átomos rígidos do esqueleto da TIBO, ou seja, os átomos do plano molecular benzoimidazol, exceto os hidrogênios. Além disto, os valores obtidos para os números de confôrmeros encontrados (terceira e quarta linhas da tabela 24) não excluem os confôrmeros relacionados por estereoquímica. Em todos os casos foram efetuados doze mil ciclos para as buscas conformacionais.

Tabela 24 – Comparação das estratégias MMC e SUMM de busca conformacional.

Estratégia	MMC	MMC	SUMM	SUMM	SUMM	SUMM
Limiar (Kcal/Mol)	24	12	28,8	24	16,8	12
Nº de confôrmeros	249	189	370	340	317	71
Confôrmeros com boa convergência	134	113	267	256	200	50
Número de clusters	4	2	4	4	4	2 - 4
Razão de separação mínima	2,98	24,44	7,62	7,21	6,16	-

As figuras 29 e 30 apresentam as primeiras figuras de mérito da análise estatística. Os quatro *clusters* esperados foram obtidos com os dois métodos usando um limiar de 24 Kcal/Mol, A melhor razão de separação mínima para um bom nível de *clustering* é obtido com o método SUMM. O critério Trms foi utilizado, onde as medidas de distância desta (“distâncias conformacionais”, [Saunders, 1991]) foram feitas entre os diedros livres do anel de sete membros das TIBO, ou seja, os diedros entre os átomos C(4), C(5), N(6) E C(7).

As figuras 31 e 32 a seguir apresentam os dendritogramas construídos a partir do ordenamento genérico das estruturas (item 2.2.7). Pode-se notar bons resultados nos dois casos, no entanto, apesar da estratégia de metrópolis também se mostrar eficiente na busca conformacional, o método SUMM é claramente superior, uma vez que apresenta um menor número de clusters com altos níveis de *clustering*. Além disto pode-se notar que o método SUMM apresenta um pico de razão de separação mínima elevado apenas para os mais altos níveis de *clustering*. Portanto optou-se pelo uso deste método nas análises conformacionais.

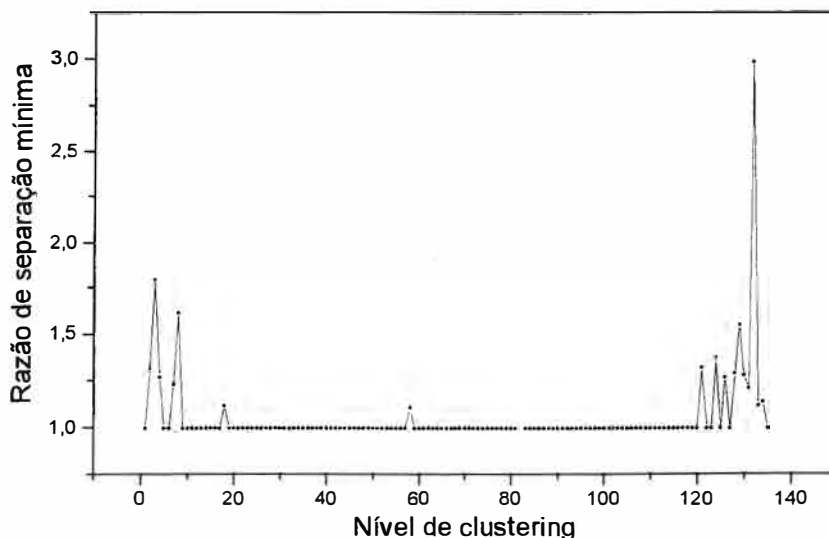


Figura 29 - Gráfico da razão de separação mínima entre os quatro *clusters* formados *versus* o nível de *clustering*, a partir da busca conformacional utilizando a estratégia MMC.

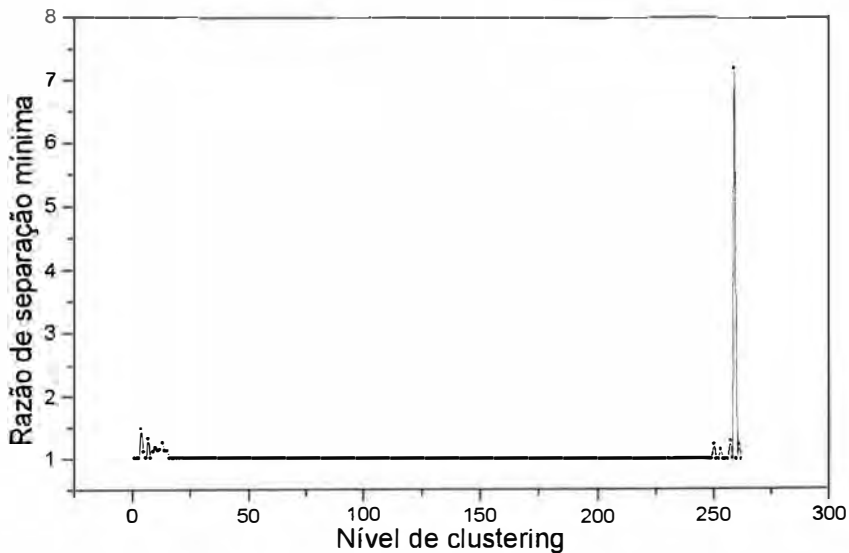


Figura 30 - Gráfico da razão de separação mínima *versus* o nível de *clustering*, a partir da busca conformacional utilizando a estratégia SUMM.

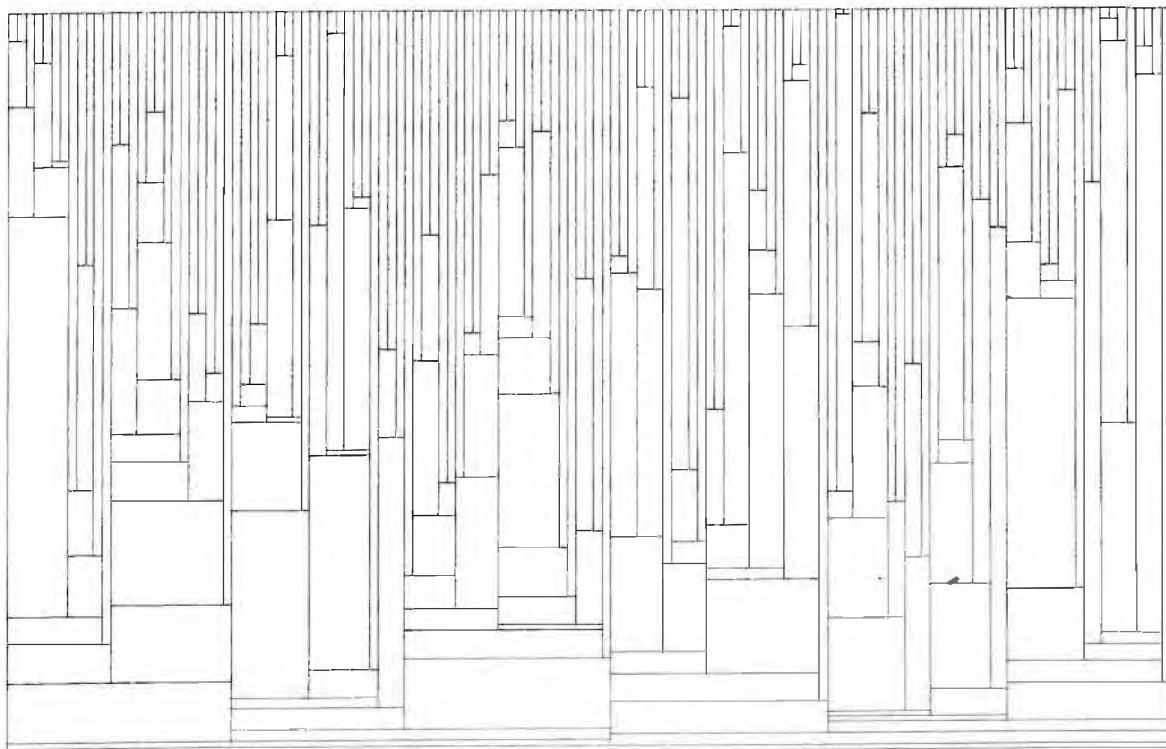


Figura 31 - Dendrograma do *clustering* obtido a partir da busca conformacional MMC.

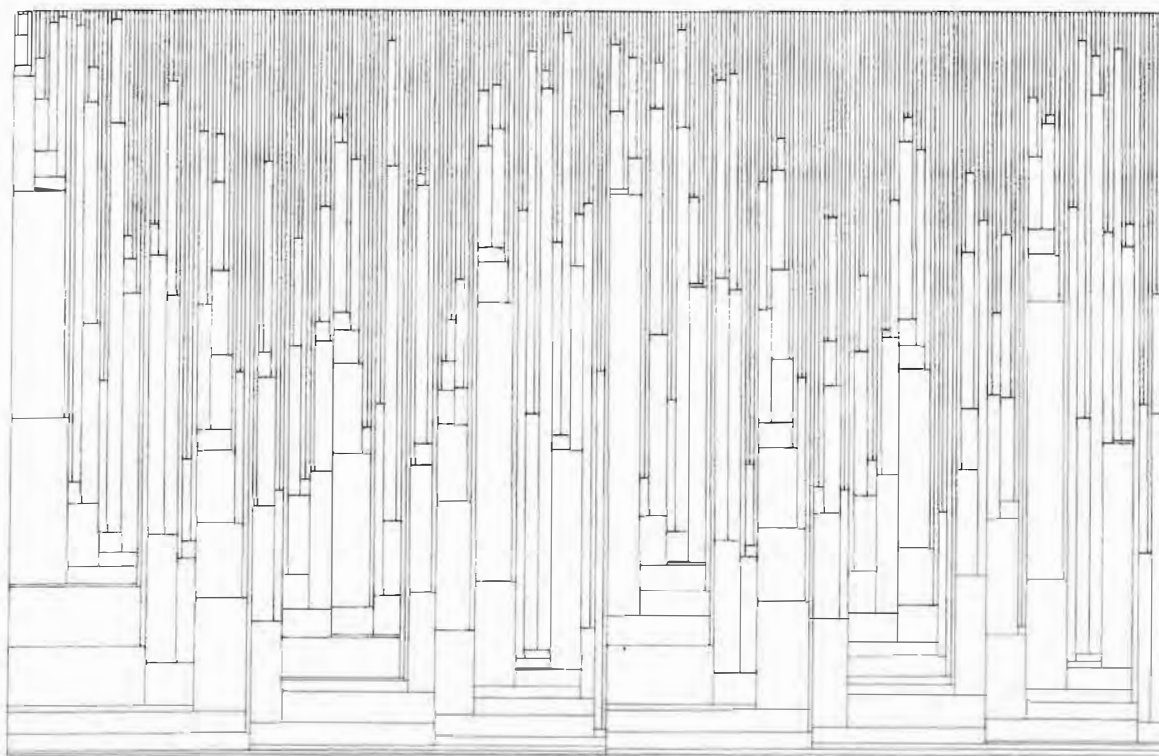


Figura 32 - Dendritograma do *clustering* obtido a partir da busca conformacional SUMM.

A figura 33 a seguir ilustra os resultados da primeira etapa desta análise conformacional, onde as estruturas representativas para cada um dos quatro grupos de confôrmeros foram sobrepostas, para que as variações conformacionais possam ser identificadas por diferentes cores. Note-se que a diferença básica é dada pela posição dos dois átomos substituídos do anel benzodiazepínico (C5 e N6) em relação ao plano principal da molécula. Os pares TN e TP são estereoisômeros, bem como SN e SP; no entanto as energias totais (Eq. 1) são idênticas apenas para os confôrmeros TN e TP de mínima energia, uma vez que a liberdade conformacional do substituinte 3-metil-2-butenil não garante as mesmas interações para todas as outras estruturas identificadas. Uma completa análise dos termos energéticos de campo de força envolvidos será apresentada adiante. A figura 34 mostra a sobreposição de todas as moléculas obtidas pela busca conformacional, ilustrando que o grupo 3-metil-2-butenil pode ser encontrado com

com qualquer ângulo diedro com relação à parte rígida da TIBO, mas preferencialmente existem quatro grupos de diedros que correspondem às quatro classes separadas pelo critério Trms do método de *clustering*.

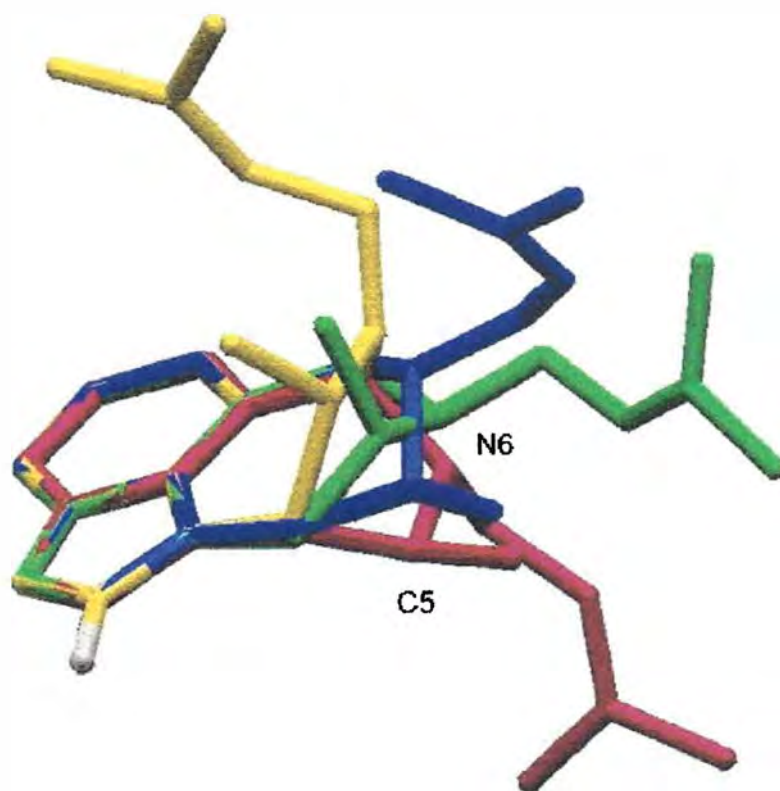


Figura 33 - Sobreposição das quatro moléculas representativas das classes principais de confôrmeros da TIBO.

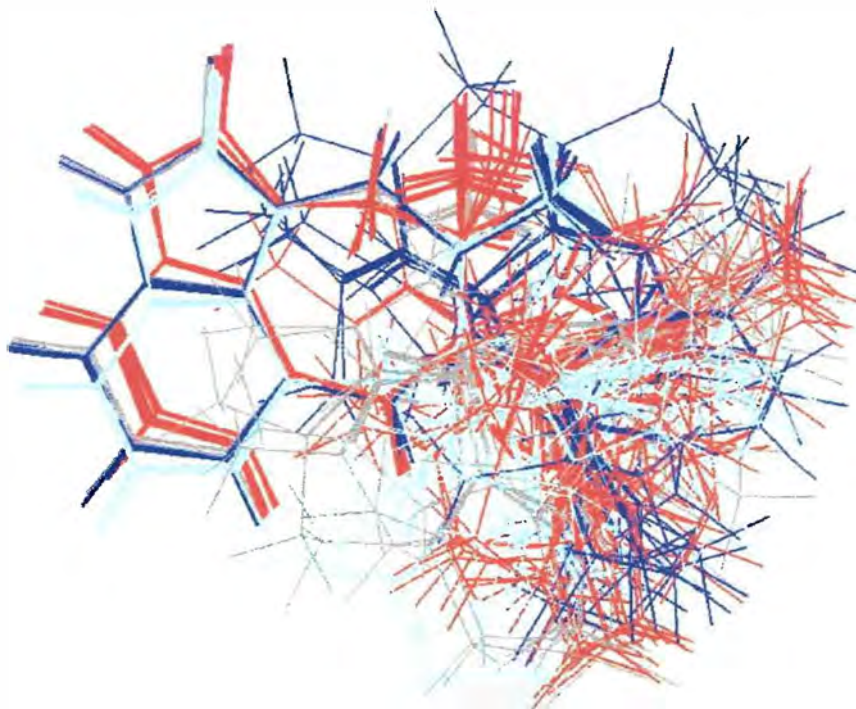
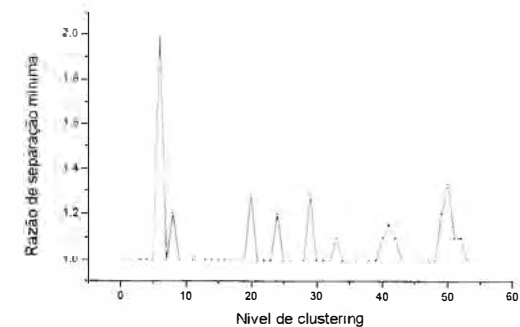


Figura 34 – Sobreposição dos *clusters* estudados. Cada grupo de conformêros (TN, SN, TP e SP) pode ser identificado por uma cor diferente.

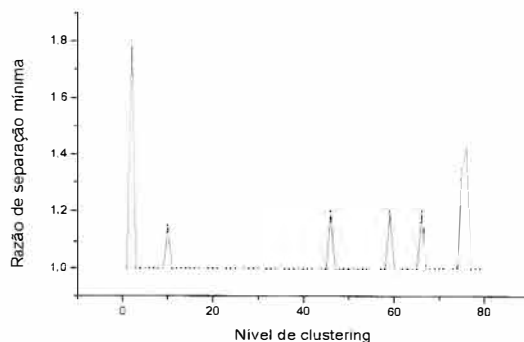
Para prosseguir com a análise dos conformêros obtidos, será considerada a nomenclatura conformacional anteriormente descrita, ou seja, os conformêros serão numerados em cada grupo por ordem de energia. Dos 259 conformêros encontrados na busca com 24Kcal/Mol de limiar, os *clusters* de moléculas TN, SN, TP e SP foram formados por 55, 80, 45 e 79 moléculas, respectivamente.

Analisando-se as figuras de mérito apresentadas na figura 35, pode-se notar que nenhum dos gráficos apresentou picos de razão de separação mínima grandes para altos níveis de *clustering*. Com isto outras formas de avaliação de cada processo de *clustering* foram consideradas, uma vez que deseja-se estudar novas estruturas representativas dentro das famílias de conformêros já encontradas, principalmente visando-se encontrar as conformações similares à forma ativa contra a RT do HIV-1. A variação da conformação da cadeia lateral está intimamente ligada às interações que favorecem a conformação “butterfly-like”

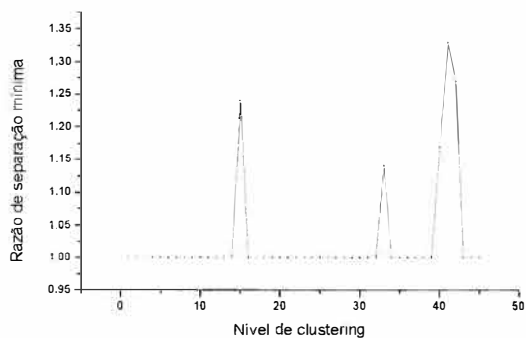
em TIBO, uma vez que esta conformação é observada em todos os NNRTI de maior atividade estudados. [Declerk, 1993]



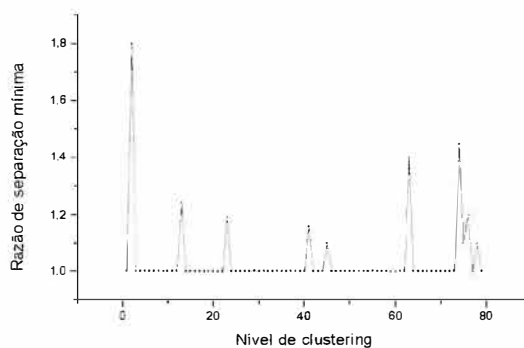
TP



SP



TN



SN

Figura 35 – Gráficos das razões de separação mínima para as quatro famílias de confôrmeros de TIBO.

Os dendritogramas apresentados na figura 36 indicam a formação de *clusters* igualmente populados em altos níveis de *clustering*. Os clusters são ainda mais homogêneos quando os níveis de *clustering* correspondem aos últimos picos de razão de separação mínima mostrados pela figura 37, o que corresponde cinco ou seis confôrmeros dentro de cada classe estudada. Em geral podem ser encontrados cinco confôrmeros com, no máximo 13Kcal/mol de diferença de energia do mínimo global dentro de cada família de confôrmeros, sendo que daí por diante, se um novo confôrmero é considerado, ele tem pelo menos 23Kcal/mol de diferença de energia.

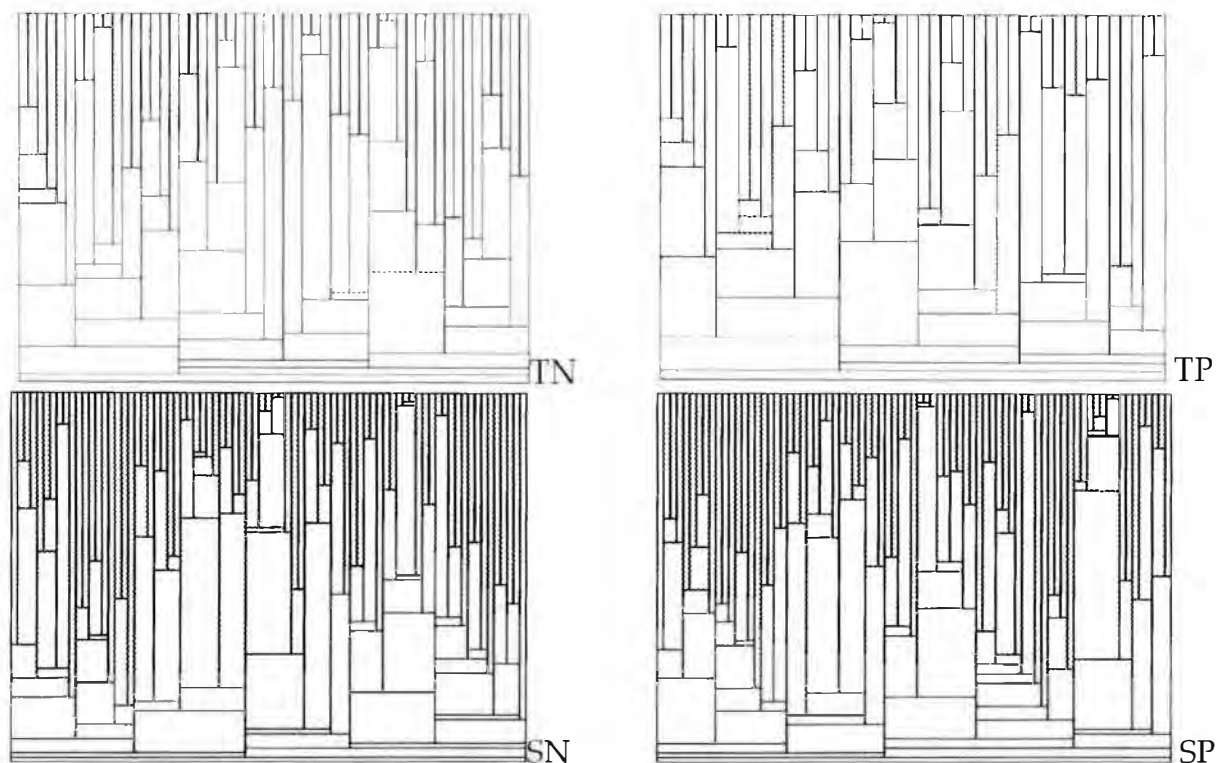
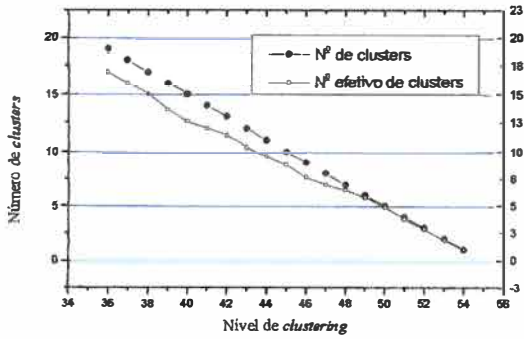


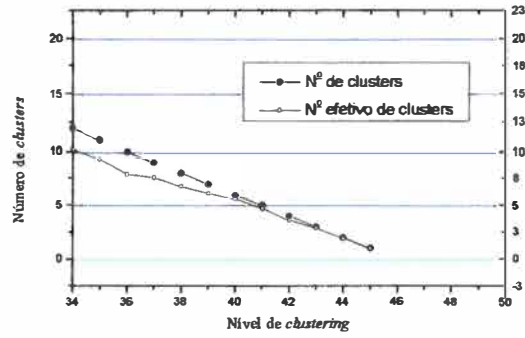
Figura 36 - Dendritogramas da segunda etapa da análise de confôrmeros com o programa Xcluster.

Para que se possa realmente considerar as estruturas representativas destes possíveis novos *clusters* como confôrmeros, outros recursos de análise estatística de clusters devem ser considerados. Podemos observar, a partir dos diagramas a seguir, que o número efetivo de *clusters* converge para o número de *clusters* quando este número se aproxima de cinco. Isto implica que as distâncias conformacionais, ou seja, o desvio RMS da sobreposição entre as torções variáveis, são grandes para estruturas de *clusters* diferentes e bem pequenas para estruturas dentro de um mesmo *cluster*. Argumentos semelhantes foram utilizados em uma análise conformacional de piridinofanos [GrignonDubois, et al., 1997] A figura 38 apresenta a sobreposição das moléculas representativas dos cinco *clusters* considerados para cada família de confôrmeros de TIBO, ou seis para a família SP. As orientações dos substituintes metila e 2-metil-3-butenil podem ser axiais,

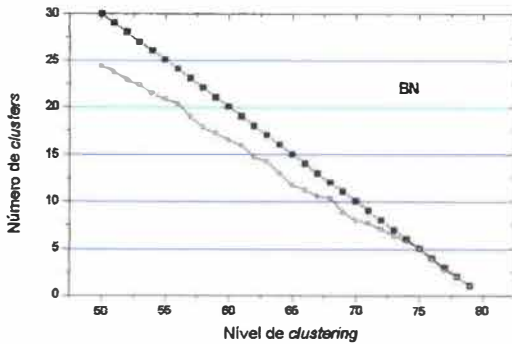
equatoriais ou inclinais, sendo que os conceitos de dobramento de anéis de Cremer e Pople devem ser considerados e são detalhadamente apresentados adiante.



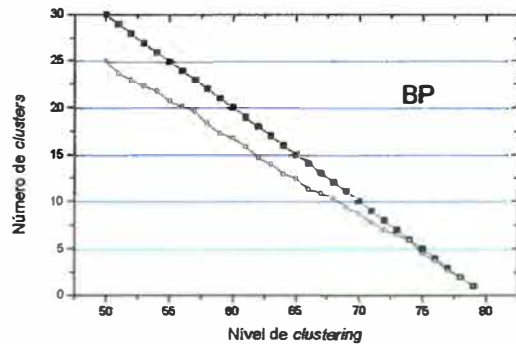
(a) TN



(b) TP



(c) SN



(d) SP

Figura 37 – Diagramas das convergências dos números de *clusters* formados pelas famílias de confôrmeros. Observe que o número de *clusters* é igual ao número efetivo de *clusters* em altos níveis de *clustering*, convergindo com 5 confôrmeros para TN, TP e SN e confôrmeros para SP.

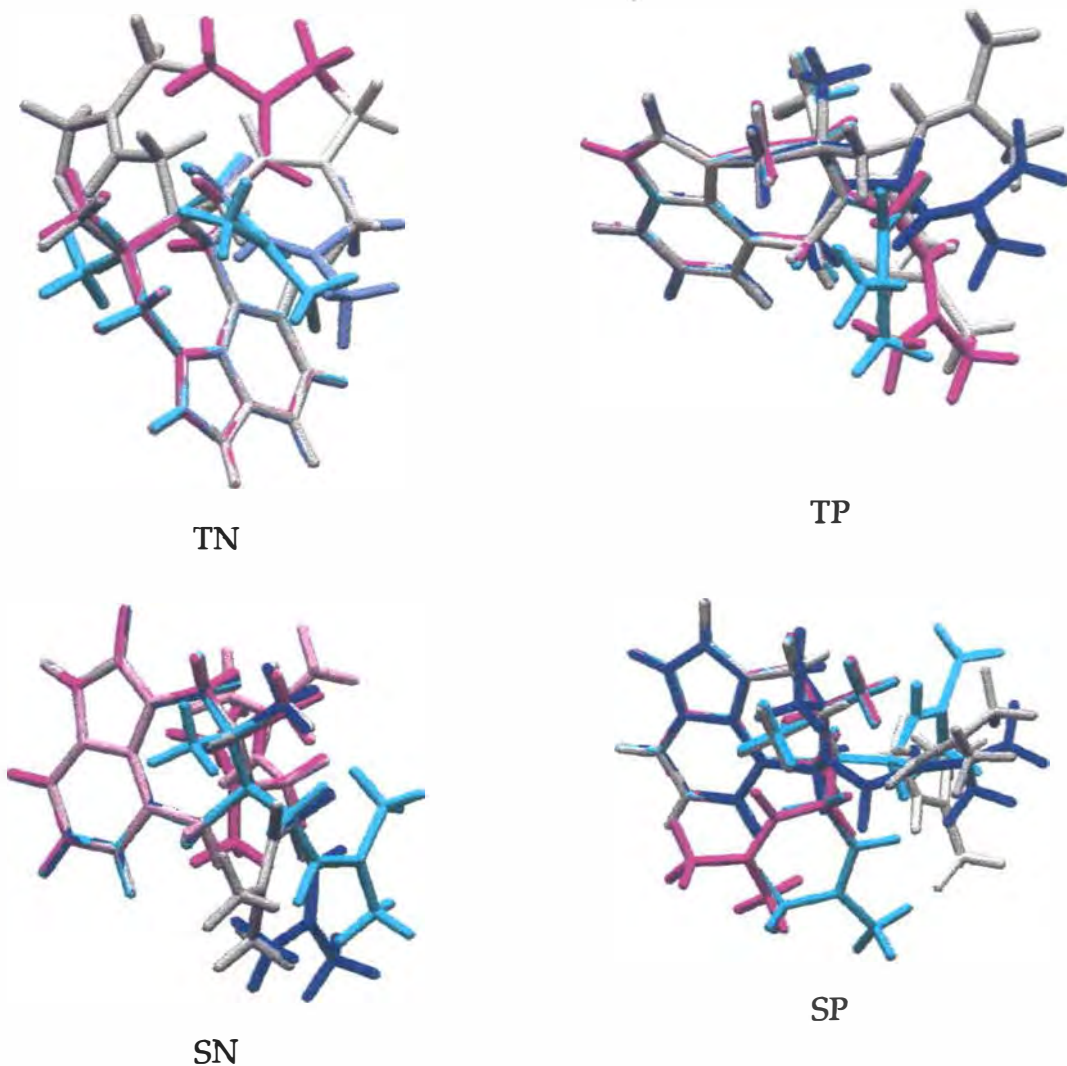


Figura 38 - Moléculas representativas dos cinco *clusters* considerados para cada família de conformêros de TIBO R79882, ou seis para a família SP

Os ângulos diedros utilizados pelo programa XCLUSTER no estudo estatístico dos conformêros de TIBO e conseqüente obtenção das estruturas acima superpostas, são apresentados na Tabela 25. A clara discriminação dos conformêros de acordo com as posições axiais, equatoriais ou incliniais (figura 14), podem ser vista na ilustração dada pela figura 38 e serão analisadas de acordo e em conjunto com os parâmetros de dobramento expostos adiante.

Tabela 25 - Ângulos diedros selecionados dos confôrmeros obtidos para a TIBO R79882. Estes diedros foram utilizados como parâmetros variáveis das buscas conformacionais por *clustering*.

	Primeiro <i>Clustering</i>			Segundo <i>Clustering</i>	
	C3-C4-C5-N6	C4-C5-N6-C7	C5-N6-C7-C13	C5-N6-C15-C16	N6-C15-C16-C17
TN1	58,7	-77,5	57,1	55,5	136,6
TN2	63,5	-75,7	50,9	61,0	139,3
TN3	63,5	-75,4	50,4	-58,7	-88,0
TN4	58,8	-77,4	57,0	166,7	-90,7
TN5	58,8	-77,3	56,8	165,5	140,0
TP1	-58,7	77,5	-57,1	-55,5	136,3
TP2	-58,9	77,4	-56,7	-165,8	-113,1
TP3	-58,9	77,3	-56,7	-166,3	48,9
TP4	-57,6	75,6	-55,3	77,1	-125,0
TP5	-56,6	74,4	-55,9	71,3	43,6
SN1	-66,7	14,2	55,0	-72,6	111,3
SN2	-66,6	13,4	56,7	166,5	-90,9
SN3	-66,8	13,8	56,4	165,3	137,8
SN4	-56,2	-17,2	70,4	72,5	-113,2
SN5	-71,9	24,6	44,5	65,5	109,0
SP1	66,7	-14,2	-54,9	72,6	-111,3
SP2	65,5	-11,2	-56,0	74,2	114,4
SP3	66,3	-13,4	-56,7	-166,5	90,9
SP4	56,2	17,2	-70,4	-72,5	113,2
SP5	56,7	16,0	-69,5	-71,0	-95,0
SP6	66,8	-13,8	-56,4	-165,2	-137,8

As estruturas representativas de todos os confôrmeros obtidos para a TIBO R79882 são apresentados nas quatro figuras a seguir. Os argumentos estatísticos de visualização, geométricos e intuitivos utilizados na obtenção destas estruturas são considerados suficientes, principalmente porque todas as conformações esperadas, levando em conta os dados experimentais, podem ser encontradas e avaliadas de forma única. A conformação “butterfly like”, por exemplo, é similar à estrutura SP5 da TIBO R82913, de acordo com a análise conformacional deste composto, que foi realizada na seqüência dos trabalhos.

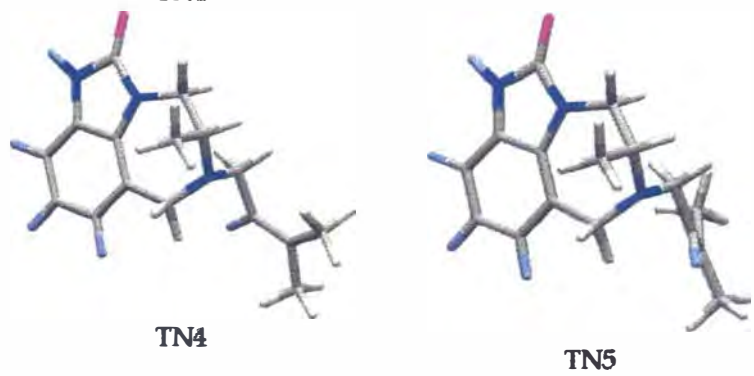
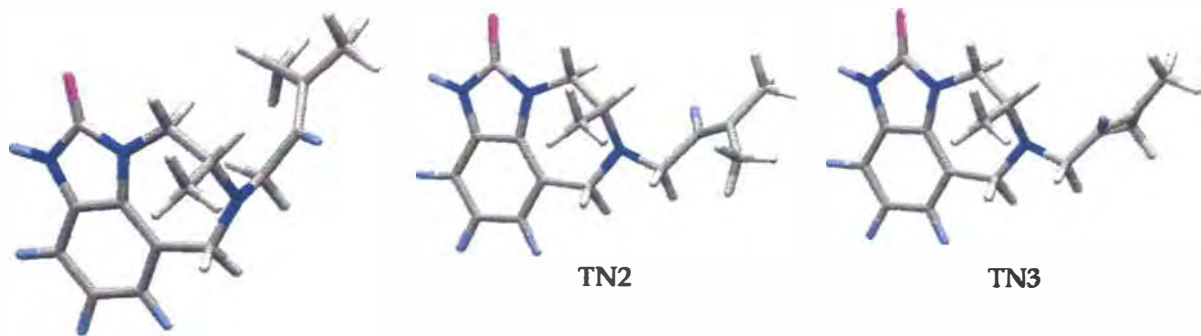


Figura 39 – Estruturas representativas dos conformêros TN da TIBO R79882.

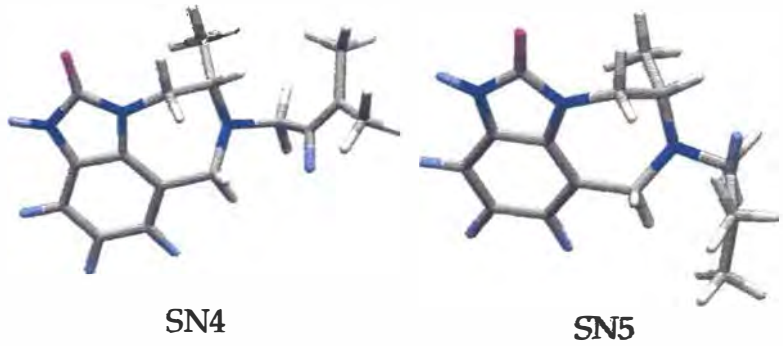
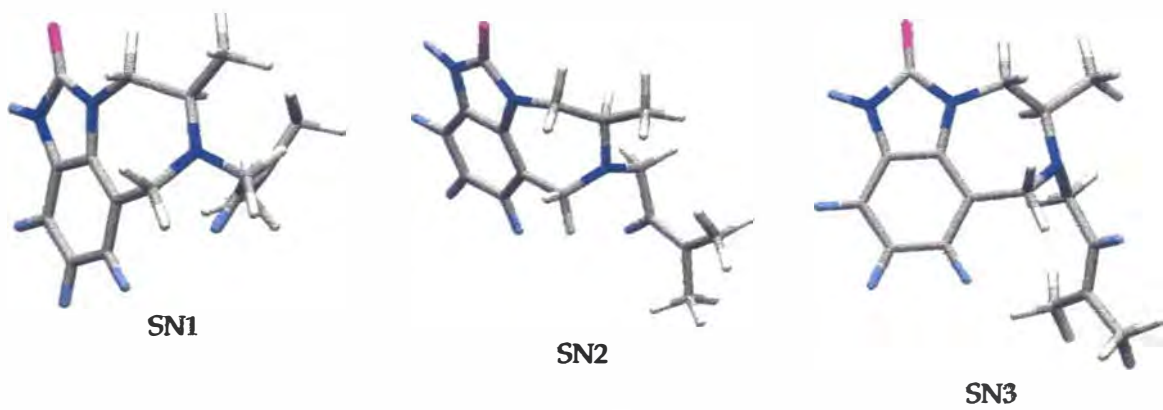


Figura 40 – Estruturas representativas dos conformêros TN da TIBO R79882.

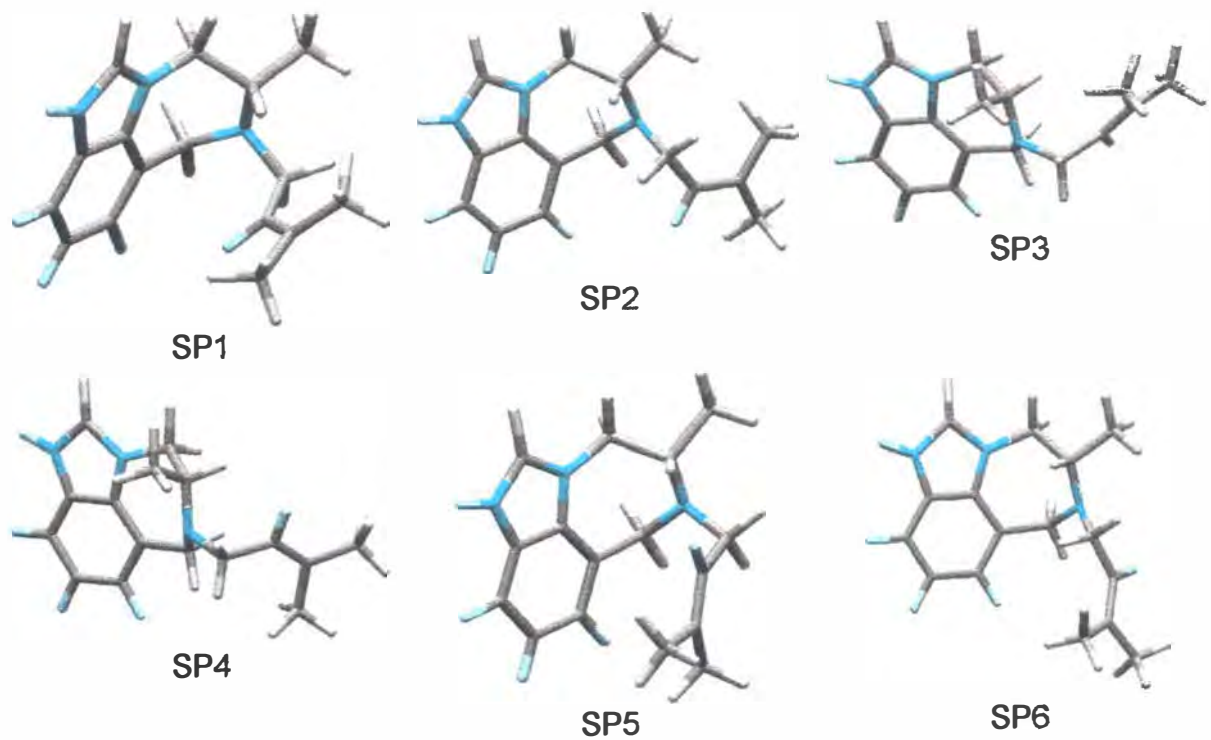


Figura 41 – Estruturas representativas dos conformêros SP da TIBO R79882.

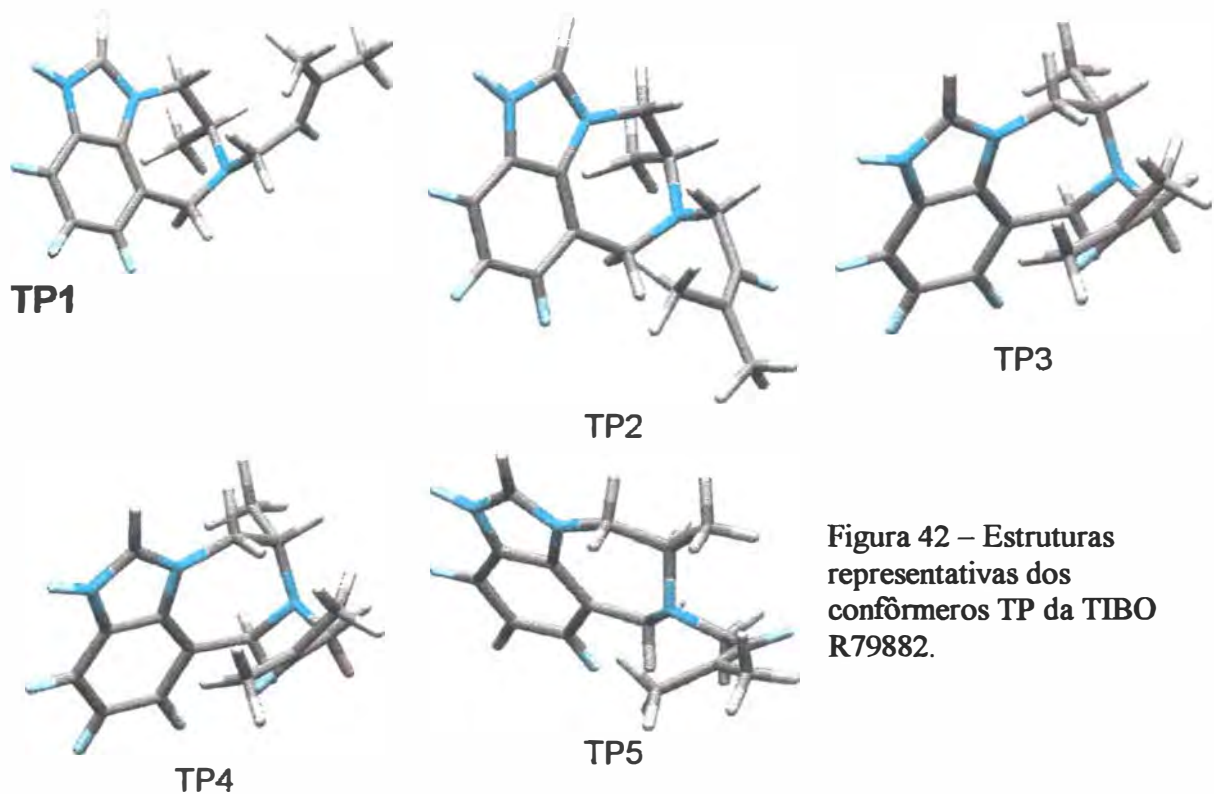


Figura 42 – Estruturas representativas dos conformêros TP da TIBO R79882.

Antes de se prosseguir com a análise conformacional da TIBO R82913, é interessante que façamos uma avaliação dos parâmetros de campo de força desenvolvidos, pela comparação dos termos energéticos separadamente. A tabela 26 a seguir apresenta esta avaliação para os termos não-ligados e para a energia torcional do campo de força (Eq.1), onde podemos notar que as energias torcionais são maiores para as conformações em o anel de sete membros está na conformação sofá e as energias torcionais são as que limitam a busca, crescendo com o aumento da diferença de energia total. Os termos referentes à energia torcional e energia eletrostática são comparados pela figura 43, já que apresentam as variações mais expressivas. As variações de energias para os outros termos foram menores que aquelas apresentadas para o termo eletrostático e, portanto não foram ilustradas.

Tabela 26 – Energias totais, torcionais e dos termos não-ligados em Kcal Mol⁻¹ obtidas para TIBO R79882 com o campo de força modificado (E_T = energias estéricas totais. E_{VDW} = energias de interações de van der Walls, E_{ELEC} = energias de interações eletrostáticas e E_{TOR} = energia relativa às torções).

Moléculas	E_T	E_{VDW}	E_{ELEC}	E_{TOR}
TP1	-19,8996	7,520325	-180,337	145,715
TP2	-17,7857	6,757532	-178,082	146,3678
TP3	-16,2817	7,257293	-177,365	146,7312
TP4	-15,3802	5,73649	-178,812	149,5672
TP5	-8,67767	9,356767	-179,316	148,2209
SN1	-8,22095	5,786705	-178,477	158,1588
SN2	-6,15256	7,180775	-177,288	157,5371
SN3	-6,03061	7,627929	-177,975	157,6853
SN4	-7,70206	7,178384	-178,785	158,0894
SN5	-4,39264	6,984696	-179,617	161,8771
TN1	-19,8996	7,520325	-180,337	145,715
TN2	-18,1755	7,914873	-179,77	145,4017
TN3	-18,1588	7,388809	-179,07	145,3563
TN4	-17,3266	7,448589	-177,482	145,88
TN5	-17,7738	7,778575	-178,472	145,9397
SP1	-8,22095	5,789096	-178,479	158,1588
SP2	-7,73792	5,203252	-177,86	159,1583
SP3	-6,15256	7,180775	-177,291	157,5395
SP4	-7,70206	7,180775	-178,783	158,0846
SP5	-7,08274	7,202296	-178,752	158,6896
SP6	-6,03061	7,627929	-177,975	157,6877

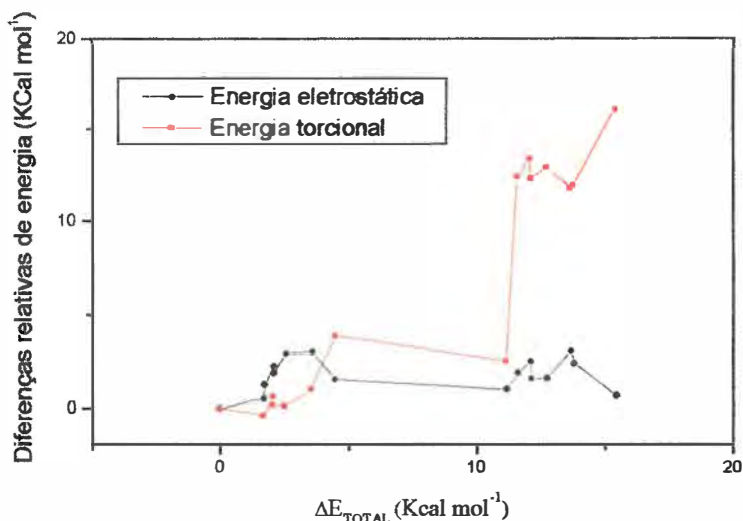


Figura 43 – Variação das contribuições energéticas de campo de força para as conformações de energia mínima.

Os mesmos procedimentos para a TIBO R79882 foram efetuados para a molécula R82913. Neste caso a comparação com dados experimentais foi possível. O limiar de energia usado foi de 120KJ/Mol em buscas conformacionais SUMM de vinte mil ciclos. A busca conformacional foi realizada em água e clorofórmio, de acordo com o método GB/SA [Hasel et al., 1988, Still et al., 1990. [Reddy et al., 1998] A Tabela 27 apresenta os resultados gerais das buscas no vácuo e nestes dois solventes.

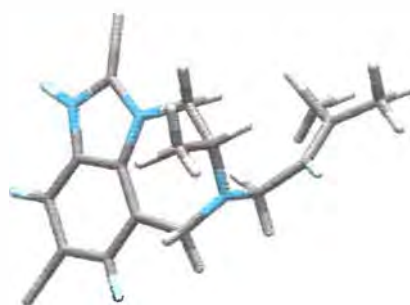
Tabela 27 – Dados da busca conformacional para a TIBO R82913.

	Vácuo	CHCl ₃	H ₂ O
Nº de conformeros encontrados	371	316	315
Conformeros de boa convergência	252	266	251
Distância de separação mínima (Primeiro clustering, 4 grupos principais)	7,3	6,6	6,5
Nº total de conformeros representativos	26	21	23

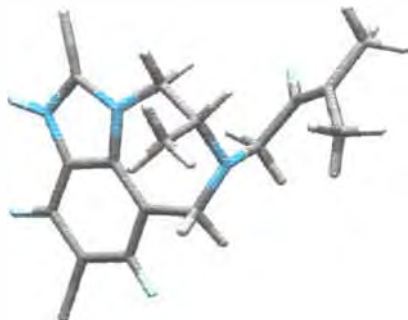
As figuras 44 a 47 apresentam as estruturas representativas para a molécula de TIBO R82913 em fase gasosa. Pelo menos vinte e seis estruturas representativas foram encontradas para esta molécula no vácuo, sendo em torno de seis ou sete para cada tipo de dobramento do anel de sete membros. Os ângulos diedros que foram variados na busca conformacional são

anel de sete membros. Os ângulos diedros que foram variados na busca conformacional são comparados na Tabela 28 com os valores experimentais. As Tabelas 29 e 30 comparam estes ângulos para as buscas em água e clorofórmio. Note-se que a interação com o solvente clorofórmio, diminui as diferenças entre os ângulos diedros experimentais e aqueles obtidos na busca conformacional, representando melhor as estruturas bioativas obtidas por cristalografia de raios-X.

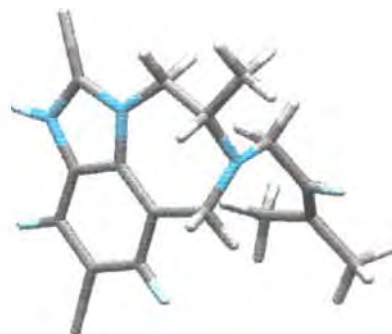
O estudo de difração de raios-X reportado por Liaw et al. [Liaw et al., 1995] apresenta as duas formas, sofã e sofã torcido, no monocristal, embora a forma sofã, análoga ao confômero SP3 apresente desordem molecular. Esta estrutura foi localizada em um mínimo local da busca conformacional, sendo que as formas torcidas TN1 e TP1 foram encontradas em dois mínimos globais degenerados. Apesar disto, o confômero TN3 é o que mais se parece com a forma torcida encontrada no monocristal. A estrutura potencialmente ativa (conformação “butterfly like”, encontrada no complexo TIBO R82913 – RT) [Das, et al., 1996] é equivalente ao confômero SP5, sendo que uma pequena diferença entre eles provavelmente é adquirida na interação com a RT.



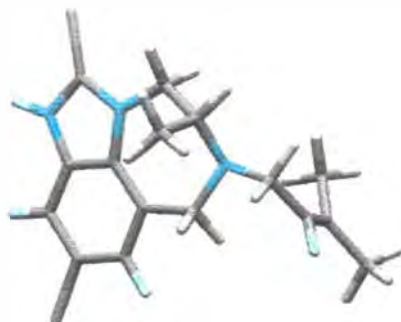
TN1



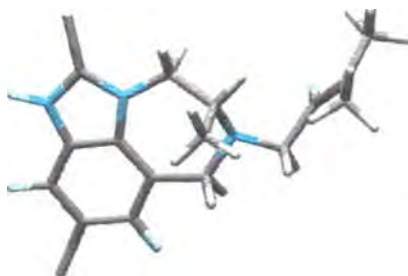
TN2



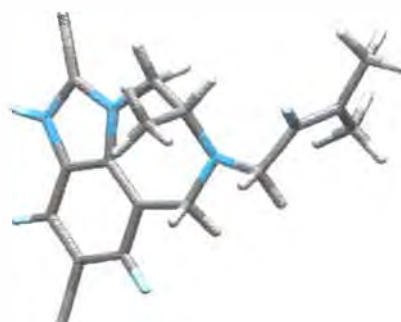
TN3



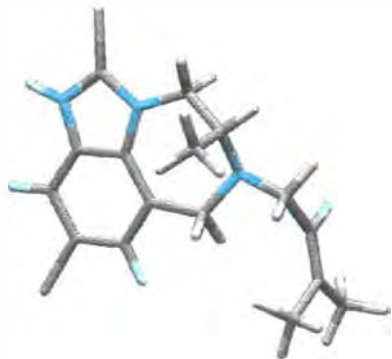
TN4



TN5



TN6



TN7

Figura 44 – Estruturas representativas dos confôrmeros TN da TIBO R82913.

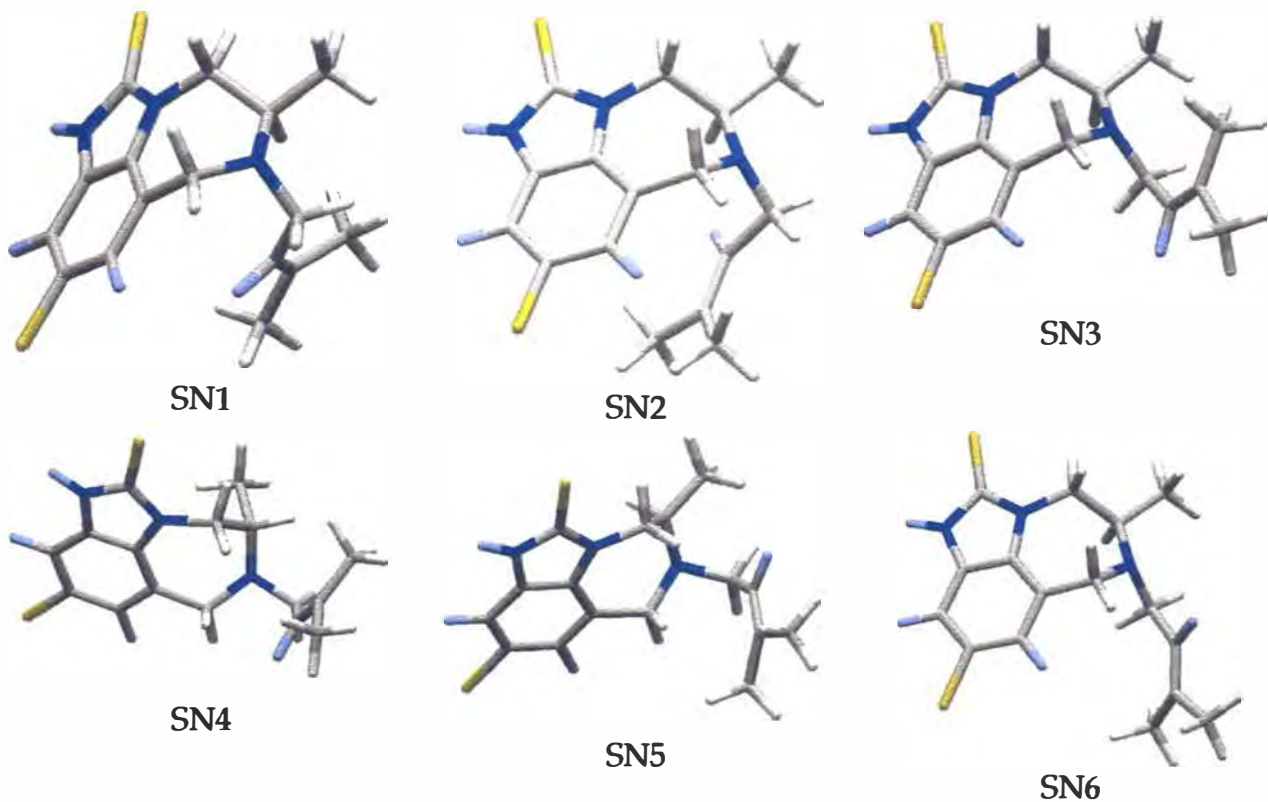


Figura 45 - Estruturas representativas dos confôrmeros SN da TIBO R82913.

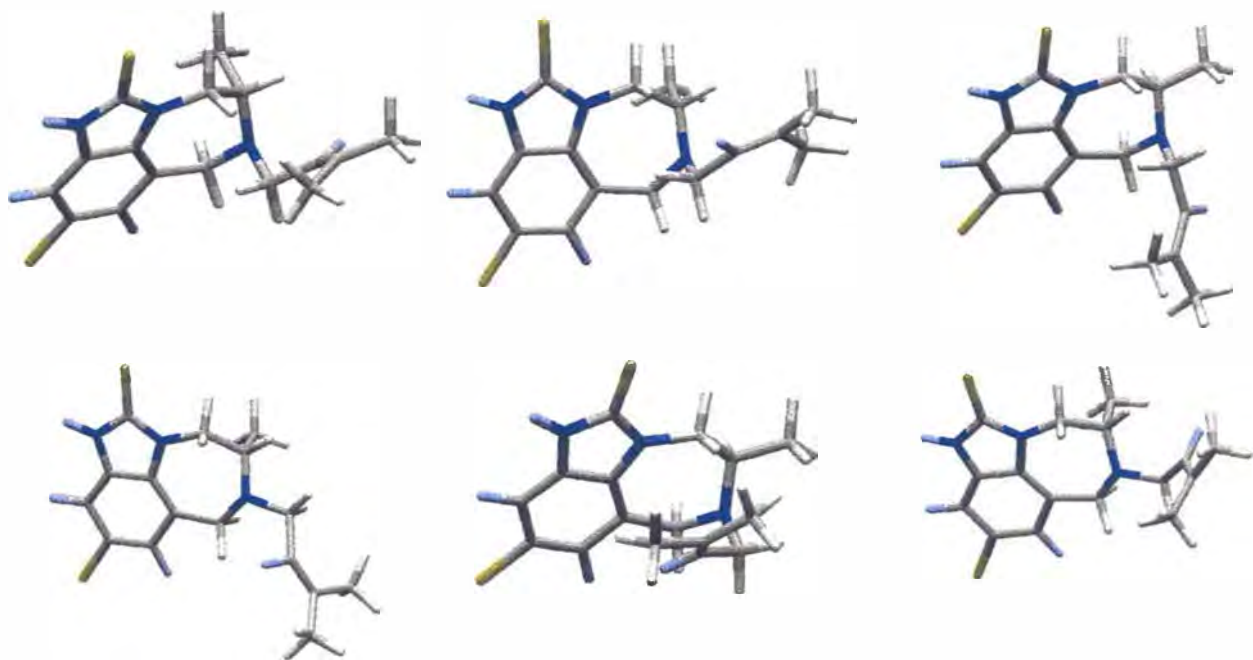
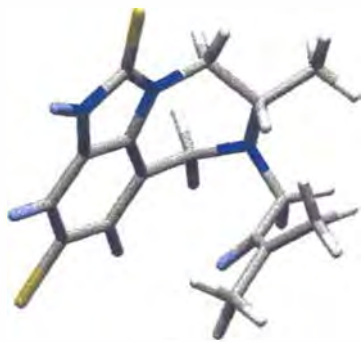
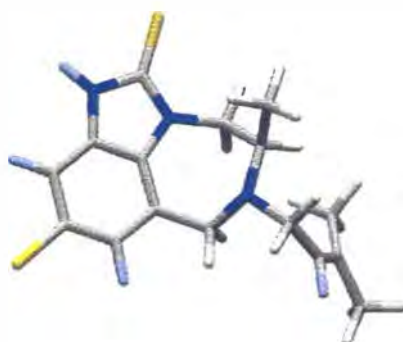


Figura 46 - Estruturas representativas dos confôrmeros TP da TIBO R82913.



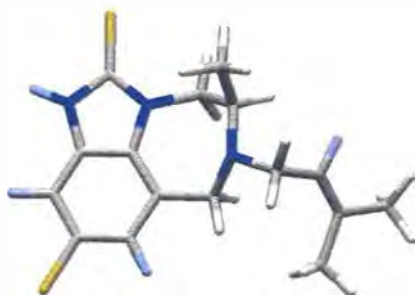
SP1



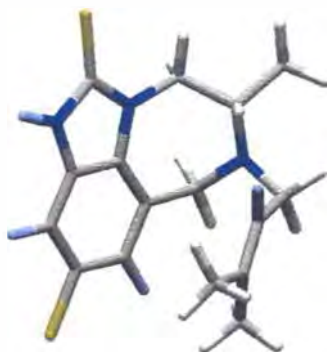
SP2



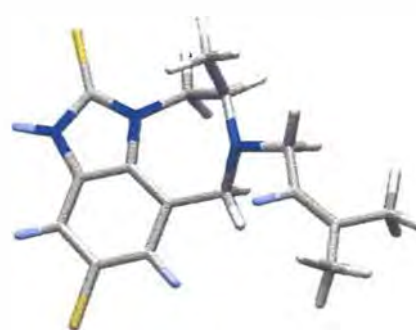
SP3



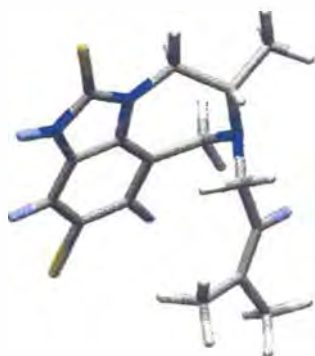
SP4



SP5



SP6



SP7

Figura 47 – Estruturas representativas dos conformêros SP da TIBO R82913.

Tabela 28 – Ângulos diedros (graus) dos confôrmeros da TIBO R82913. Estes diedros foram utilizados como parâmetros variáveis das buscas conformacionais em fase gasosa.

	primeira etapa do <i>Clustering</i>			segunda etapa do <i>Clustering</i>	
	C3-C4-C5-N6	C4-C5-N6-C7	C5-N6-C7-C13	C5-N6-C15-C16	N6-C15-C16-C17
TN1	59,1	-78,1	56,7	55,4	-132,2
TN2	58,9	-78,3	57,2	52,7	40,0
TN3	53,1	-77,7	62,0	169,0	116,0
TN4	64,4	-75,8	49,0	-167,9	41,5
TN5	63,8	-76,7	50,7	-63,1	116,3
TN6	63,9	-75,8	49,6	-57,4	-87,7
TN7	64,4	-75,9	49,2	-167,0	-113,6
TP1	-59,1	78,1	-56,8	-55,4	132,1
TP2	-58,9	78,3	-57,2	-52,7	-39,9
TP3	-53,2	77,7	-62,1	-168,1	-138,1
TP4	-64,3	76,1	-49,8	166,4	140,6
TP5	-51,9	75,7	-60,6	74,3	-119,4
TP6	-63,9	75,8	-49,6	57,4	87,7
SN1	-66,2	11,9	56,8	-75,9	97,9
SN2	-65,9	11,4	55,6	-73,5	-113,6
SN3	-67,2	14,4	55,9	166,0	-46,2
SN4	-73,4	29,7	40,4	67,8	-95,7
SN5	-72,6	34,1	37,7	63,2	95,5
SN6	-67,1	14,0	56,1	164,8	136,6
SP1	66,2	-11,8	-56,9	76,0	-97,8
SP2	65,9	-11,4	-55,6	73,5	113,3
SP3	64,7	16,5	-69,7	163,3	111,2
SP4	57,1	15,7	-69,3	70,3	92,3
SP5	57,7	12,8	-66,4	90,4	142,9
SP6	57,0	16,5	-70,5	-163,2	40,7
SP7	48,9	26,6	-77,5	-170,4	-134,4
SPcristal ⁽¹⁾	34,7	46,8	-94,3	164,6	123,7
TNcristal ⁽¹⁾	66,6	-84,1	69,3	157,2	124,8
Complexo TIBO-RT ⁽²⁾	48,9	11,5	-66,3	95,8	160,2

(1) Liaw et al., 1991; (2) Das et al., 1996.

Tabela 29 - Ângulos diedros (graus) dos confôrmeros da TIBO R82913. Estes diedros foram utilizados como parâmetros variáveis das buscas conformacionais em solução de clorofórmio.

	primeira etapa do <i>Clustering</i>			segunda etapa do <i>Clustering</i>	
	C3-C4-C5-N6	C4-C5-N6-C7	C5-N6-C7-C13	C5-N6-C15-C16	N6-C15-C16-C17
TN1	59,1	-77,5	56,2	55,9	-133,7
TN2	53,3	-77,6	61,8	167,3	138,8
TN3	64,2	-76,1	49,8	166,2	-140,6
TN4	63,5	-75,9	50,5	-61,8	138,4
TN5	63,8	-75,7	49,7	-57,9	-89,5
TP1	-59,1	78,0	-56,7	-55,9	136,7
TP2	-53,3	77,7	-61,8	-167,3	-138,8
TP3	-64,2	76,1	-49,8	166,2	140,7
TP4	-63,2	75,8	-50,4	61,8	-138,2
TP5	-63,8	75,7	-49,7	57,8	89,4
SN1	-66,9	14,4	55,1	116,8	109,0
SN2	-66,0	12,3	55,1	-73,9	-113,4
SN3	-56,6	-16,4	69,7	73,2	-111,6
SN4	-56,9	-16,5	70,5	-163,1	-141,0
SN5	-67,1	14,2	55,8	164,1	138,0
SP1	66,9	-14,4	-55,1	73,6	-109,8
SP2	66,0	-12,3	-55,0	73,9	113,4
SP3	56,9	16,5	-70,5	163,1	141,0
SP4	56,6	16,4	-69,7	73,2	111,5
SP5	57,6	12,9	-66,3	90,2	141,9
SP6	67,1	-14,2	-55,8	-164,1	-138,0
SP no cristal ⁽¹⁾	34,7	46,8	-94,3	164,6	123,7
TN no cristal ⁽¹⁾	66,6	-84,1	69,3	157,2	124,8
Complexo TIBO-RT ⁽²⁾	48,9	11,5	-66,3	95,8	160,2

(1) Liaw et al., 1991; (2) Das et al., 1996.

Tabela 30 - Ângulos diedros (graus) dos confôrmeros da TIBO R82913. Estes diedros foram utilizados como parâmetros variáveis das buscas conformacionais em solução aquosa.

	primeira etapa do <i>Clustering</i>			segunda etapa do <i>Clustering</i>	
	C3-C4-C5-N6	C4-C5-N6-C7	C5-N6-C7-C13	C5-N6-C15-C16	N6-C15-C16-C17
TN1	58,9	-77,9	56,7	55,7	131,9
TN2	58,6	-77,6	56,9	551	83,7
TN3	58,9	-77,7	56,4	166,4	111,7
TN4	63,5	-75,7	49,8	-58,9	-86,0
TN5	63,4	-75,8	50,3	-61,3	137,0
TN6	58,7	-78,0	56,9	54,7	41,7
TP1	-58,9	77,9	-56,7	-55,6	131,9
TP2	-64,1	75,6	-49,1	167,4	111,5
TP3	-58,9	77,7	-56,4	-166,5	-111,6
TP4	-63,5	75,7	-49,8	59,0	86,1
TP5	-63,4	75,8	-50,3	61,3	-136,9
SN1	-65,8	12,2	55,1	-74,6	-112,8
SN2	-66,8	14,3	55,2	-72,9	108,8
SN3	-66,6	13,5	56,8	166,6	-88,1
SN4	-56,5	-16,5	69,8	72,7	-110,5
SN5	-66,6	13,7	55,8	165,4	119,5
SP1	65,8	-12,2	-55,1	74,6	112,8
SP2	66,8	-14,3	-55,2	72,9	-108,8
SP3	66,6	-13,4	-56,8	166,7	88,1
SP4	56,9	15,6	-69,3	71,6	-91,9
SP5	56,5	16,5	-69,8	72,7	110,5
SP6	66,6	-13,7	-55,8	-165,4	119,4
SP no cristal ⁽¹⁾	34,7	46,8	-94,3	164,6	123,7
TN no cristal ⁽¹⁾	66,6	-84,1	69,3	157,2	124,8
Complexo TIBO-RT ⁽²⁾	48,9	11,5	-66,3	95,8	160,2

(1) Liaw et al., 1991; (2) Das et al., 1996.

A avaliação dos cálculos que consideram a presença de solventes é feita a seguir, observando os termos energéticos de campo de força (energias torcionais, eletrostáticas e de van der Walls) com o efeito da solvatação (tabelas 31 e 32). As energias de solvatação apresentadas (ΔG_{sol}) correspondem às somas das contribuições para as energias livres de solvatação dadas pelo método contínuo de solvatação GB/SA (Eq. 32). [Hasel et al., 1988, Still et al., 1990, Reddy et al., 1998] Pode-se notar que as principais características da “solvatação” foram a maior estabilização de algumas estruturas na conformação sofá, uma vez que foram encontrados menos confôrmeros destes grupos, além de que a conformação potencialmente ativa fica bem mais evidente entre os confôrmeros encontrados na busca em clorofórmio, quando alguns ângulos diedros da tabela 28 são comparados. Outro fato interessante é que na presença de solventes as energias de van der Walls são menores e as energias eletrostáticas são maiores para os confôrmeros sofá. Os cálculos que simulam a presença de água mostraram resultados semelhantes, apesar de apenas vinte e três confôrmeros representativos terem sido encontrados e das energias de solvatação serem maiores. Este fato provavelmente está relacionado com o caráter hidrofóbico de TIBO. Deve-se ressaltar que o custo computacional destas buscas é bem maior. Enquanto que no vácuo os vinte mil ciclos efetuados demandam algo em torno de dias de cálculos em uma Estação de trabalho Silicon Graphics INDY R5000, em água ou clorofórmio pelo menos três dias foram necessários.

Tabela 31 - Diferenças de energia (Kcal Mol⁻¹) para a TIBO R82913 em CHCl₃ (E_T = energia estérica total, E_{VDW} = energia de van der Waals, E_{TOR} = energia torcional e ΔG_{SOL} = energia livre de solvatação).

Moléculas	ΔE _T	ΔE _{VDW}	ΔE _{ELEC}	ΔE _{TOR}	ΔG _{SOL}
TP1	0,00	2,75	0,00	0,37	0,61
TP2	2,75	2,42	2,99	0,57	0,20
TP3	3,74	3,29	3,15	0,45	0,00
TP4	3,03	3,18	2,26	0,00	0,26
TP5	4,15	2,51	4,60	0,01	0,06
SN1	13,59	0,00	3,95	12,60	0,89
SN2	14,02	0,01	5,06	13,49	0,29
SN3	14,25	2,16	4,33	12,65	0,35
SN4	12,48	3,58	3,52	12,19	0,00
SN5	14,54	2,79	3,77	12,17	0,03
TN1	0,00	2,75	0,00	0,37	0,61
TN2	2,75	2,42	3,00	0,56	0,20
TN3	3,74	3,39	3,15	0,45	0,00
TN4	3,03	3,18	2,27	0,00	0,25
TN5	4,15	2,51	4,60	0,00	0,06
SP1	13,58	0,72	3,92	12,59	0,89
SP2	14,01	0,01	5,06	13,56	0,52
SP3	14,71	3,58	3,52	12,19	0,00
SP4	12,37	2,16	4,33	12,65	0,34
SP5	14,53	2,10	3,00	17,16	0,36
SP6	23,04	2,79	3,77	12,17	0,02

Tabela 32 - Diferenças de energias (Kcal Mol⁻¹) para a TIBO R82913 em H₂O (E_T = energia estérica total, E_{VDW} = energia de van der Walls, E_{TOR} = energia torcional e ΔG_{SOL} = energia livre de solvatação).

Moléculas	ΔE_T	ΔE_{VDW}	ΔE_{ELEC}	ΔE_{TOR}	ΔG_{SOL}
TP1	0,00	2,67	0,00	0,43	3,76
TP2	2,42	2,62	3,60	0,72	1,44
TP3	1,55	1,83	3,93	0,69	1,79
TP4	2,12	2,51	4,56	0,00	1,12
TP5	2,24	3,13	2,31	0,04	2,62
TP6	2,42	2,62	3,60	0,72	1,44
SN1	12,70	0,00	5,17	13,44	2,27
SN2	12,89	0,69	4,00	12,55	3,34
SN3	13,90	2,24	6,33	12,05	0,94
SN4	13,26	2,13	4,37	12,63	2,48
SN5	13,54	1,93	4,01	12,76	1,84
TN1	0,00	2,66	0,00	0,43	3,76
TN2	2,49	2,07	7,12	0,40	0,00
TN3	3,88	1,82	3,93	0,70	1,80
TN4	2,12	2,51	4,56	0,00	1,12
TN5	2,25	3,14	2,31	0,03	2,62
TN6	2,49	2,18	5,70	0,55	0,31
SP1	12,65	0,02	5,17	13,44	2,27
SP2	12,88	0,69	4,00	12,54	3,33
SP3	13,90	2,24	6,33	10,14	0,94
SP4	12,66	2,20	3,88	13,28	1,63
SP5	13,26	2,12	0,64	12,63	2,48
SP6	13,54	1,93	4,01	12,76	1,83

Para a molécula estudada em clorofórmio, vê-se que as energias torcionais são maiores para os confôrmeros SN ou SP, de maior energia, as quais limitam a busca (delimitam o espaço conformacional percorrido). A diferença média de energia total de campo de força para as formas sofá e torcida é de 12 Kcal Mol⁻¹. É curioso se notar que as energias de Van de Walls são mínimas para as conformações próximas aquelas potencialmente ativas, isto é, encontradas nos complexos TIBO-RT. Analisando-se as interações da dupla ligação do grupo 3-metil-2-butenil com os átomos do sistema aromático da molécula, de acordo com a comparação dos valores para as interações não ligadas entre os átomos C16 e C17 com os átomos do sistema aromático, observou-se que as interações eletrostáticas são bastante negativas para as estruturas onde a conformação tipo borboleta é mais característica. Estas interações contribuem na minimização da energia estérica destas moléculas e conseqüentemente reforçam que esta interação é favorecida como é proposto em alguns modelos farmacofóricos de NNRTI. [Schäfer et al., 1993, Gussio et al., 1996] As maiores energias de solvatação em água são para as moléculas de menor energia e um pouco menores para as conformações SN ou SP, equivalentes à conformação tipo borboleta. Os demais termos energéticos não apresentaram variações expressivas.

2.3.7 - Parâmetros de Cremer e Pople

As tabelas 33 a 36 apresentam os parâmetros de dobramento calculados para todos os confôrmeros representativos dos clusters de TIBO. De acordo com Boessenkool e Boeyens, estes quatro parâmetros de Cremer e Pople são necessários para caracterizar as conformações cadeira, bote e sofá, presentes em anéis de sete membros. Estes autores demonstraram que estes termos podem ser interpretados sobre a superfície de um toróide. [Boessenkool e Boeyens, 1980] Os valores calculados para as estruturas representativas da TIBO R82913 são comparados com os mesmos parâmetros calculados a partir de dados cristalográficos. As estruturas identificadas por “TN no cristal” e “SP no cristal” são referentes à estrutura cristalina de monocristal elucidada por Liaw et al. [Liaw et al., 1991] e a estrutura “complexo TIBO-RT” foi obtida no banco de dados PDB (“Protein Data Bank”), sendo relativas à publicação de Das et al.. [Das et al., 1996] Estes valores permitem identificar com precisão quais os confôrmeros que mais se aproximam da estrutura ativa, ou seja, encontrada num complexo TIBO-RT. As seis orientações preferenciais descritas na figura 15 devem ser utilizadas para a comparação das orientações dos substituintes nas estruturas. As linhas coloridas das tabelas 35 e 36 destacam a similaridade entre algumas conformações encontradas e aquelas obtidas experimentalmente. Nem sempre a estrutura TN de mínima energia é similar à forma torcida encontrada no monocristal [Liaw et al., 1991] Os parâmetros de dobramento em geral não são muito diferentes dentro de cada família de confôrmeros, no entanto, a utilização do programa RING permitiu a determinação da orientação dos substituintes, de acordo com as posições dos átomos C14 e C15 em relação ao plano médio do anel de sete membros.

Tabela 33 – Parâmetros de dobramento obtidos para a TIBO R79882.

Molécula	q2	ϕ 2	q3	ϕ 3	C(14)	C(15)
TN1	0,293	8,28	0,433	241,63	s-axial	t-axial
TN2	0,294	8,05	0,431	241,52	s-axial	t-axial
TN3	0,290	7,82	0,431	241,51	s-axial	t-axial
TN4	0,281	8,40	0,419	241,38	s-axial	t-axial
TN5	0,322	10,26	0,417	242,15	s-equat.	t-equat.
TP1	0,293	188,28	0,433	61,63	t-axial	s-axial
TP2	0,316	176,28	0,427	58,31	t-axial	t-equat.
TP3	0,316	175,66	0,425	58,11	t-axial	t-equat.
TP4	0,291	188,23	0,432	61,62	t-axial	s-axial
TP5	0,291	188,34	0,432	61,60	t-axial	s-axial
SN1	0,725	295,40	0,276	167,38	t-equat.	s-inclinal
SN2	0,735	295,60	0,279	165,10	t-equat.	s-inclinal
SN3	0,316	175,66	0,425	58,11	t-axial	t-equat.
SN4	0,740	272,27	0,278	147,66	s-inclinal	t-equat.
SN5	0,716	300,50	0,278	176,66	s-axial	t-inclinal
SP1	0,725	115,41	0,276	347,39	s-equat.	t-inclinal
SP2	0,717	112,67	0,274	346,22	s-equat.	t-inclinal
SP3	0,735	115,58	0,279	345,10	s-equat.	t-inclinal
SP4	0,741	92,25	0,278	327,64	t-inclinal	t-equat.
SP5	0,737	92,99	0,277	328,66	t-axial	t-equat.
SP6	0,734	115,75	0,279	345,40	s-equat.	t-inclinal

Tabela 34 - Parâmetros de dobramento para a TIBO R82913.

Molécula	q2	φ2	q3	φ3	C(14)	C(15)
TN1	0,295	187,84	0,434	61,52	t-axial	s-axial
TN2	0,296	188,13	0,434	61,70	t-axial	s-axial
TN3	0,312	201,42	0,426	65,18	s-equat.	s-axial
TN4	0,320	173,81	0,423	57,55	t-axial	t-equat.
TN5	0,322	176,32	0,428	58,39	t-axial	t-equat.
TN6	0,318	174,57	0,424	57,84	t-axial	t-equat.
TN7	0,320	174,28	0,424	57,79	t-axial	t-equat.
TP1	0,295	7,83	0,434	241,52	s-axial	t-axial
TP2	0,296	8,12	0,434	241,70	s-axial	t-equat.
TP3	0,311	21,59	0,427	245,22	t-equat.	t-axial
TP4	0,319	355,11	0,427	238,06	s-axial	s-equat.
TP5	0,294	22,15	0,415	245,16	t-equat.	t-axial
TP6	0,318	354,56	0,424	237,84	s-axial	s-equat.
SN1	0,734	293,57	0,277	165,43	t-equat.	s-inclinal
SN2	0,720	292,12	0,276	166,55	t-equat.	s-inclinal
SN3	0,739	295,89	0,281	165,77	t-equat.	s-inclinal
SN4	0,715	303,14	0,282	180,48	s-axial	t-inclinal
SN5	0,714	308,40	0,275	182,02	s-equat.	t-inclinal
SN6	0,737	295,27	0,280	165,59	s-equat.	t-inclinal
SP1	0,734	113,54	0,277	345,40	s-equat.	t-inclinal
SP2	0,720	112,11	0,276	346,55	s-equat.	t-inclinal
SP3	0,743	92,40	0,278	328,43	s-inclinal	t-equat.
SP4	0,744	93,06	0,279	328,94	t-axial	t-equat.
SP5	0,727	94,67	0,273	332,40	t-axial	t-equat.
SP6	0,754	92,64	0,283	327,09	s-inclinal	t-equat.
SP7	0,758	87,14	0,291	318,16	s-inclinal	t-axial
TNcristal	0,249	202,06	0,540	62,85	s-equat.	s-axial
SPcristal	0,813	80,37	0,367	302,36	s-inclinal	t-equat.
Complexo						
TIBO-RT	0,705	104,36	0,284	318,97	s-inclinal	t-inclinal
T9CI						
mutante	1,014	127,62	0,662	305,71	s-inclinal	t-equat.

Tabela 35 - Parâmetros de dobramento para a TIBO R82913 em CHCl₃.

Molécula	q2	φ2	q3	φ3	C(14)	C(15)
TN1	0,295	187,85	0,434	61,52	s-equat.	s-axial
TN2	0,311	201,11	0,427	58,10	t-axial	s-axial
TN3	0,318	175,26	0,426	58,10	t-axial	t-equat.
TN4	0,316	176,24	0,427	58,40	t-axial	t-equat.
TN5	0,304	166,87	0,435	65,42	t-axial	t-equat.
TP1	0,295	7,77	0,434	241,52	s-axial	t-axial
TP2	0,311	21,02	0,427	245,12	t-equat.	t-axial
TP3	0,318	355,26	0,426	238,10	s-axial	s-equat.
TP4	0,316	356,19	0,427	238,39	s-axial	s-equat.
TP5	0,317	354,88	0,424	237,96	s-axial	s-equat.
SN1	0,730	295,40	0,277	167,09	t-equat.	s-inclinal
SN2	0,719	292,87	0,275	167,04	t-equat.	s-inclinal
SN3	0,743	272,44	0,278	148,46	t-equat.	s-inclinal
SN4	0,753	272,58	0,283	147,05	s-inclinal	t-equat.
SN5	0,735	295,44	0,279	165,85	t-equat.	s-inclinal
SP1	0,730	115,43	0,277	347,11	s-equat.	s-inclinal
SP2	0,719	112,87	0,275	347,05	s-equat.	s-inclinal
SP3	0,753	92,61	0,280	327,08	s-inclinal	t-equat.
SP4	0,727	94,58	0,272	332,34	s-axial	t-equat.
SP5	0,743	92,45	0,278	328,47	s-inclinal	t-equat.
SP6	0,735	115,44	0,279	345,85	t-equat.	t-inclinal
TNcristal ¹	0,249	202,06	0,540	62,85	s-equat.	s-axial
SPcristal	0,813	80,37	0,367	302,36	s-inclinal	t-equat.
Complexo	0,705	104,36	0,284	318,97	s-inclinal	t-inclinal
TIBO-RT						
T9C1	1,014	127,62	0,662	305,71	s-inclinal	t-equat.

mutante

¹ Liaw et al., 1991.

Tabela 36 – Parâmetros de dobramento para a TIBO R82913 em H₂O.

Molécula	q2	φ2	q3	φ3	C(14)	C(15)
TN1	0,296	188,13	0,433	61,64	s-equat.	s-axial
TN2	0,292	188,36	0,432	61,73	t-axial	s-axial
TN3	0,295	188,16	0,432	61,60	t-axial	s-axial
TN4	0,317	175,36	0,425	58,16	t-axial	t-equat.
TN5	0,316	176,24	0,426	58,43	t-axial	t-equat.
TN6	0,295	188,28	0,433	61,71	t-axial	s-axial
TP1	0,296	8,14	0,433	241,65	s-axial	t-axial
TP2	0,318	354,56	0,424	237,91	s-axial	s-equat.
TP3	0,295	8,20	0,432	241,60	s-axial	t-axial
TP4	0,317	355,37	0,425	238,16	s-axial	s-equat.
TP5	0,315	356,25	0,426	238,43	s-axial	s-equat.
	0,318	354,56	0,424	237,91	s-axial	s-equat.
SN1	0,718	292,84	0,275	166,91	t-equat.	s-inclinal
SN2	0,730	295,22	0,277	166,99	t-equat.	s-inclinal
SN3	0,738	295,25	0,280	164,98	t-equat.	s-inclinal
SN4	0,745	272,43	0,279	148,25	s-inclinal	s-equat.
SN5	0,730	294,81	0,278	165,86	t-equat.	s-inclinal
SP1	0,718	112,81	0,275	346,89	s-equat.	t-inclinal
SP2	0,730	115,25	0,277	347,01	s-equat.	t-inclinal
SP3	0,738	115,21	0,280	344,95	s-equat.	t-inclinal
SP4	0,743	93,08	0,279	328,91	t-axial	t-equat.
SP5	0,745	92,44	0,279	328,25	s-inclinal	t-equat.
SP6	0,730	114,80	0,278	345,86	s-equat.	t-inclinal

2.3.8 - Constantes de acoplamento

Os resultados obtidos a partir da busca conformacional em clorofórmio para a TIBO R82913 foram utilizados no cálculo das constantes de acoplamento próton-próton vicinais ($^3J_{HH}$), através da equação de Karplus (Eq. 10). Para isto, a distribuição de Boltzmann (Eq. 11) foi utilizada para ponderar as contribuições para os termos calculados, de acordo com a equação 4. Os resultados são comparados com dados experimentais [Leo et al., 1992] na tabela 37. A maioria dos confôrmeros apresentaram baixa população, uma vez que as estruturas TN1 e TP1, de mínimo global, correspondem a 98% da população. A Figura 48 apresenta a distribuição de Boltzmann apenas para os confôrmeros de baixa população. Esta distribuição foi construída a partir de todos os 266 confôrmeros encontrados na busca conformacional em clorofórmio e o comportamento da mesma foi reproduzido com os vinte e seis confôrmeros considerados. Outra observação importante é o comportamento similar dos supostos pares de estereoisômeros TN e TP ou SN e SP, na distribuição de Boltzmann. Finalmente observa-se que a tabela 37 mostra resultados excelentes indicando que as preferências conformacionais de TIBO são bastante definidas, bem como a conformação tipo borboleta, freqüentemente explorada em modelos farmacofóricos de NNRTI. [Schafer et al, 1993, Gussio et al., 1996]

$$\frac{N_i}{N_T} = \frac{e^{-\Delta\Delta E_i / RT}}{\sum_i e^{-\Delta\Delta E_i / RT}} \quad \text{Eq. 11}$$

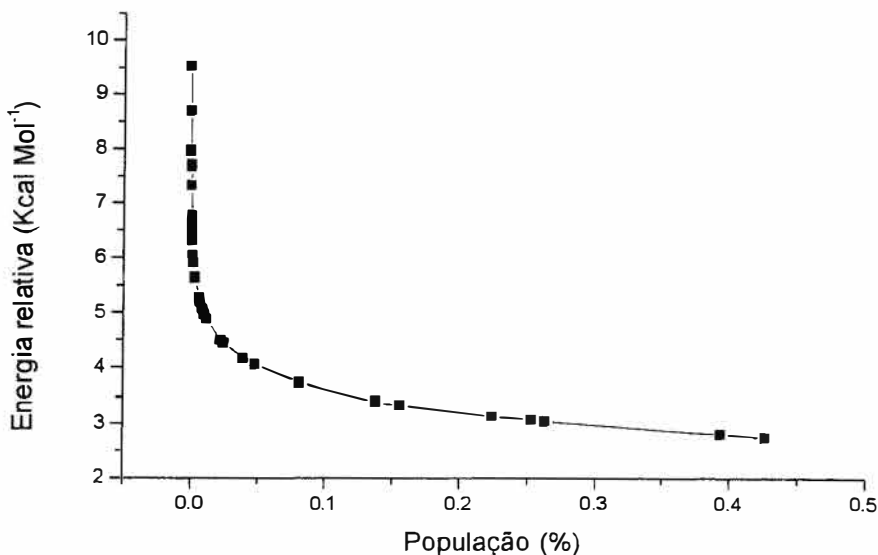


Figura 48 – Distribuição de Boltzmann para os conformêros de baixa população da TIBO R82913 em CHCl₃.

Tabela 37 – Constantes de acoplamento entre prótons vicinais (J^3 em Hz) obtidas a partir a Equação de Karplus e de ¹H-RMN (1) para a TIBO R82913.

Hidrogênios	J^3_{HH} - experimental	J^3_{HH} - calculado
H4 - H5	8,8	9,0
H4' - H5	2,9	2,5
H15 - H16	7,5	7,4
H15' - H16	6,4	6,4

(1) Caldwell et al., 1993 e Leo et al., 1992

2.3.9 – Momentos de Dipolo e valores energéticos

A tabela 38 apresenta os momentos de dipolo totais no vácuo, em água e em colrofórmio, calculados para todos os conformêros representativos da TIBO R82913. A otimização das geometrias dos conformêros TN1 e SP5 com o método HF/6-31G(d)

forneceram os valores 4,13D e 4,71D; respectivamente para os momentos de dipolo totais de cada estrutura. Estes valores são semelhantes aos encontrados para os confôrmeros TN1 e SP1 no vácuo com o método SUMM, indicando que estes valores são mais bem reproduzidos para as estruturas de energia mínima. Se os confôrmeros apresentados pelas figuras 44 a 47 forem observados, pode-se concluir que as conformações tipo borboleta são exatamente as de energia mínima ou aquelas com valores de momento de dipolo próximos aos encontrados com o método HF/6-31G(d). Em geral as polaridades aumentam em água e diminuem em clorofórmio, com algumas exceções pouco esclarecedoras.

Tabela 38 – Momentos de dipolo totais calculados para a molécula TIBO R82913

nº	TN			SN			TP			SP		
	vac.	H ₂ O	CHCl ₃	vac.	H ₂ O	CHCl ₃	vac.	H ₂ O	CHCl ₃	vac.	H ₂ O	CHCl ₃
1	3,64	3,90	0,94	3,99	4,86	1,46	0,37	4,70	2,85	4,49	2,93	4,16
2	7,78	4,99	5,21	6,70	5,66	3,97	4,46	7,52	2,76	1,68	3,39	1,24
3	5,20	5,47	4,67	7,40	8,49	0,75	8,59	0,79	5,01	1,91	8,54	2,61
4	6,12	2,41	2,92	0,66	3,84	1,78	6,00	1,22	6,56	3,85	3,73	0,07
5	5,76	3,31	0,21	5,74	0,55	2,96	1,14	2,59	4,01	5,43	0,71	1,70
6	1,52	3,46	-	7,98	-	-	5,23	-	-	1,59	3,08	1,96
7	6,46	-	-	-	-	-	-	-	-	4,20	-	-

Cálculos dos valores de energia obtidos pelo método HF/6-31G(d) indicam que as diferenças de energia entre os confôrmeros sofá e sofá torcido são aproximadamente 3,2Kcal/Mol. Os valores para algumas destas diferenças, calculadas por Peeters et al. demonstram mais coerência entre as energias estéricas obtidas e as energias Hartree-Fock para alguns confôrmeros [Peeters et al., 1995] e são no máximo de 9 Kcal/Mol

entre as formas sofá e sofá torcido, uma vez que o método Hartree-Fock não considera dispersão e correlação eletrônica. Apesar disto os valores obtidos garantem a qualidade das superfícies de energia potencial estudadas, uma vez que as diferenças nas energias totais de campo de força são desta mesma ordem de grandeza.

Finalmente realizou-se a sobreposição de alguns confôrmeros com as respectivas estruturas experimentais equivalentes, onde os menores valores para os desvios médios quadráticos (RMS) obtidos foram 0,183Å para as estruturas TN1 e a forma torcida do monocristal [Liaw et al., 1991]; 0,248Å entre SP5 (obtida em clorofórmio) e a TIBO R82913 do complexo TIBO-RT e 0,841Å entre SP3 (também obtida em clorofórmio) e a estrutura sofá do monocristal, embora esta última estrutura experimental não seja bem resolvida para o substituinte 2-metil-3-butenil.

CAPÍTULO III

Análises comparativas entre campos moleculares (CoMFA) de 49 Não-Nucleosídeos inibidores da Transcriptase Reversa do vírus HIV-1 (NNRTI) estruturalmente diversos

3.1 - INTRODUÇÃO

A busca por novos medicamentos geralmente se inicia com um pequeno número de estruturas químicas molde ("lead compounds") que apresentam uma atividade específica contra um dado alvo terapêutico. Com isto uma determinada atividade biológica de um grupo selecionado de substâncias estará estritamente relacionada com as estruturas espaciais (ou tridimensionais) destas moléculas e suas interações específicas com um receptor biológico. É muito freqüente que um determinado grupo de moléculas apresentam a mesma atividade com um dado receptor, apesar de grandes diferenças estruturais. Isto faz com que a busca de características similares nas propriedades eletrônicas, estruturais e empíricas não facilmente localizadas a primeira vista se torne de grande importância, e seja um trabalho muito fascinante.

Estudos em três dimensões das relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade biológica (3D-QSAR), [Martin, 1998] realizados com a metodologia de análise comparativa entre campos moleculares, CoMFA; [Cramer, Paterson e Bunce, 1988] correlacionam a resposta biológica associada às interações molécula bioativa-receptor. A molécula é representada por seus campos tridimensionais estéricos e eletrostáticos, entre outros. Para isto, moléculas que possuem a mesma atividade e modos de ação são selecionadas. As coordenadas tridimensionais destas moléculas são utilizadas nos cálculos de suas propriedades estruturais e eletrônicas, de acordo com métodos computacionais de vários níveis

de sofisticação. Estas moléculas são sobrepostas em suas supostas conformações bioativas, obtendo-se um padrão único de alinhamento. [Kubinyi, Hamprecht e Mietzner, 1998] A seguir, um paralelepípedo regular é construído, envolvendo as moléculas, de forma que os seus lados sejam muito maiores que a dimensão destas. Nesta caixa é adicionado um retículo tridimensional onde se calcula os vários campos moleculares, a partir de cada ponto desta grade. Átomos ou grupos de átomos de prova (“probe atoms”) ou grupos de átomos percorrem cada ponto do retículo para avaliar as interações de cada campo, ou seja, um carbono neutro quantifica as interações de van der Waals, uma dada carga avalia as interações eletrostáticas e doadores ou receptores de ligações de hidrogênio avaliam as possibilidades destes tipos de interações. Isto é realizado para cada molécula. As funções matemáticas utilizadas são o potencial de Lennard-Jones para as interações de van der Waals e o potencial de Coulomb para as interações eletrostáticas. O conjunto de dados utilizado forma um grupo de treinamento do modelo CoMFA proposto e então um novo grupo de moléculas (o grupo de teste) é utilizado para avaliar as predições deste modelo quanto a similaridade molecular necessária para determinada ação biológica. Para isto, os campos moleculares são correlacionados com parâmetros de atividade biológica medidos experimentalmente, empregando análises de mínimos quadrados parciais (PLS), [Kubinyi, 1993] com ou sem a seleção de variáveis. [Martin, 1998] A Figura 49 ilustra todo o processo de uma análise CoMFA. A base do método é uma tabela, cuja primeira coluna geralmente apresenta as respostas biológicas, que serão então correlacionadas com os campos moleculares e propriedades dispostas nas demais colunas. Teoria, métodos e aplicações recentes são disponíveis em artigos de revisão. [Kubinyi, 1993, 1994; Kubinyi, Folkers e Martin, 1998; Norinder, 1998]

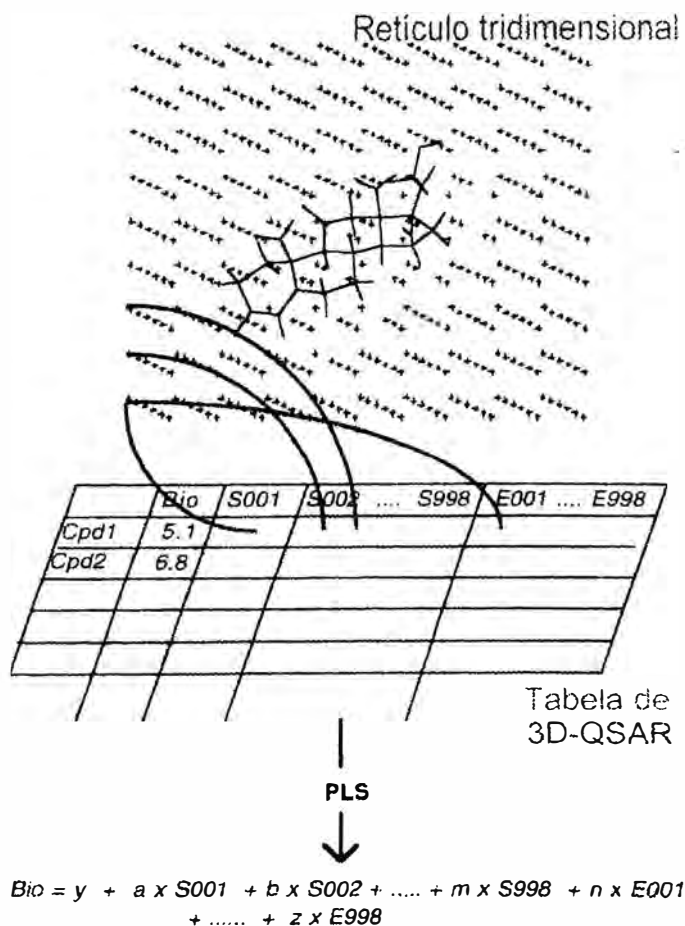


Figura 49 - Análise CoMFA.

Neste capítulo a metodologia CoMFA é aplicada para um conjunto de moléculas pertencentes a seis classes distintas de NNRTI. Pelo fato destes compostos pertencerem a mais de trinta classes de compostos estruturalmente distintos, [DeClerk, 1996, 1998, 1999, Ártico, 1996] e por suas atividades biológicas terem sido estudadas em diferentes laboratórios, foi necessário uma seleção criteriosa dos compostos estudados.

Os quarenta e nove compostos foram selecionados de acordo com critérios apresentados na seção 3.2.1. Estes compostos pertencem às classes das tetrahydroimidazol-benzodiazepinonas (TIBO), [Pauwels et al., 1990, Debysers et al., 1991, White et al., 1991 e Pauwels et al., 1994] hidroxi-etoxi-metil-fenil-tiotiminas (HEPT), [Baba et al., 1991A e 1991B] dipirido-diazepinonas (nevirapina), [Merluzzi

et al., 1990] piridinonas, [Saari et al., 1991 e 1992, Hoffman et al., 1992, Wai, et al., 1993] derivados da α -anilino-fenil-acetamida (α -APA) [Pauwels et al., 1993] e diidro-alquil-benziloxo-pirimidinas (DABO). [Ártico, 1993, 1999]

3.2 - ASPÉCTOS METODOLÓGICOS

3.2.1 - Seleção dos compostos para o estudo QSAR-3D

As moléculas de NNRTI foram selecionadas a partir de dados disponíveis na literatura, com base nos métodos de determinação da resposta biológica, ou seja, pelos dados do índice de atividade IC_{50} serem homogêneos. Para isto observou-se a origem sintética dos produtos e os detalhes dos testes biológicos (método de ensaio *in vitro* utilizado e cepa de vírus). Em geral as moléculas selecionadas foram testadas contra uma cepa selvagem (WT - “wild type”) de HIV-1 do tipo HTLV-III B em células MT-4, utilizando-se a metodologia estabelecida por Pauwels et al. em 1988. [Pauwels et al. 1988] Além disso, os testes biológicos foram efetuados no mesmo laboratório responsável pela síntese.

As estruturas das moléculas são apresentadas nas figuras 50 a 55 e tabelas 39 a 43, juntamente com as atividades biológicas. Várias informações referentes a estudos SAR dos compostos escolhidos foram apresentadas anteriormente na introdução desta tese.

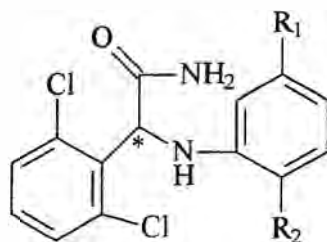


Figura 50 - Estrutura da α -APA.

Tabela 39 - Moléculas da família das α -APA selecionadas.

Nome	-Log (IC ₅₀)	Isômero	R ₁	R ₂
AAPA1	8,30	+	NO ₂	H
AAPA2	5,68	-	NO ₂	H
AAPA3	7,72	+	C(O)CH ₃	H
AAPA4	5,19	-	C(O)CH ₃	H
AAPA5	7,48	+	C(O)CH ₃	CH ₃
AAPA6	5,78	-	C(O)CH ₃	CH ₃

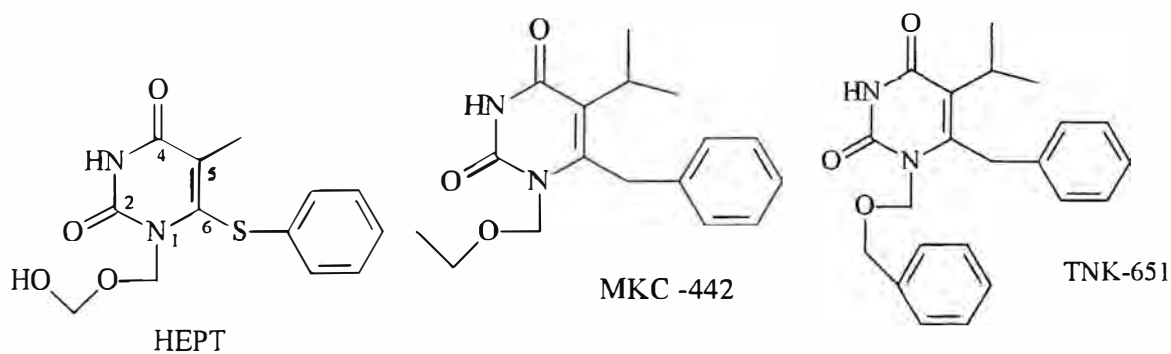


Figura 51 - Estruturas das moléculas da família do HEPT.

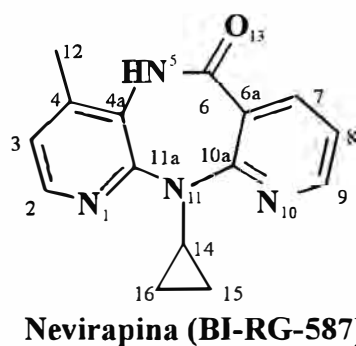


Figura 52 - Estrutura da nevirapina

Tabela 40 - Moléculas da família das HEPT e nevirapina selecionadas.

Código	-Log (IC ₅₀)	Nome original/Referência
HEPT1	4,77	E-EPU/[Baba et al., 1989]
HEPT2	8,10	I-EBU ou MKC-442/[Baba et al., 1993]
HEPT3	8,22	E-EBU-dM/[Baba et al., 1993]
NEV1	7,07	Nevirapina/[Tramontano et al., 1992]

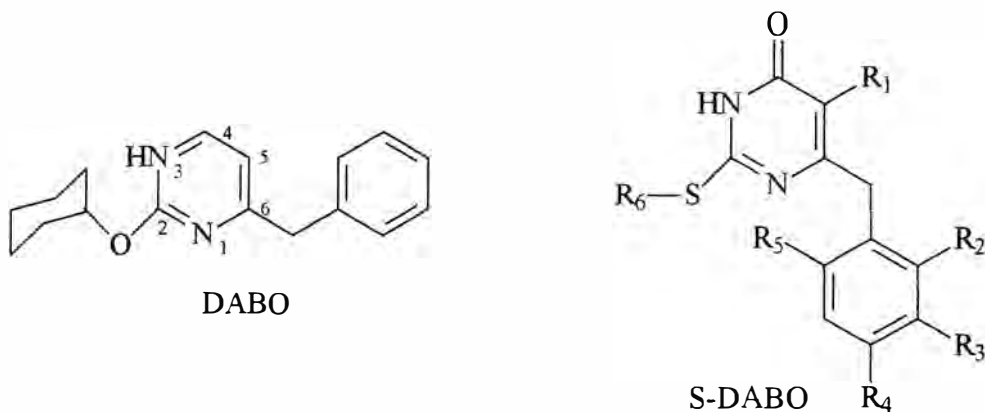


Figura 53 - Estruturas das moléculas de DABO (composto líder) e S-DABO.

Tabela 41 - DABO e moléculas da família da S-DABO selecionadas.

Código	-Log (IC ₅₀)	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
DABO1	5,74	Composto líder.					
DABO2	6	H	H	H	H	H	s-bt*
DABO3	6,30	CH ₃	H	H	H	H	s-bt
DABO4	5,79	H	H	H	H	H	c-pt**
DABO5	6,30	CH ₃	H	H	H	H	c-pt
DABO6	5,32	H	H	H	Cl	H	s-bt
DABO7	4,89	CH ₃	H	F	H	H	s-bt
DABO8	5,79	H	Cl	H	H	H	s-bt
DABO9	5,72	H	H	Cl	H	H	s-bt
DABO10	6,52	H	F	H	H	H	s-bt
DABO11	6,22	H	H	F	H	H	s-bt
DABO12	5,13	H	H	H	F	H	s-bt
DABO13	5,52	H	Cl	H	H	Cl	CH ₃
DABO14	7	H	Cl	H	H	Cl	s-bt

* = séc-butil, ** = ciclo-pentil, [Ártico et al., 1993, Mai et al., 1999]

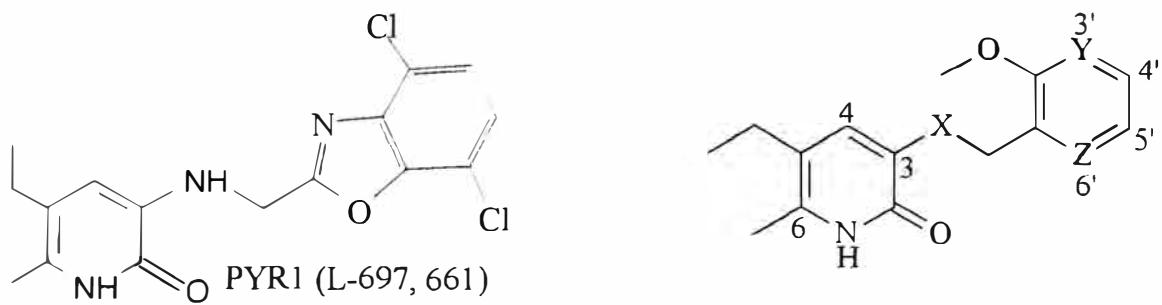


Figura 54 - Estruturas das piridinonas

Tabela 42 - Moléculas da família das piridinonas selecionadas.

Código	-Log (IC ₅₀)	X	Y	Z	substituintes
PYR1	7,72	-	-	-	-
PYR2	7,72	NH	N	CH	4'-Me, 5'-Et
PYR3	8,10	NH	CH	CH	4',5'-Me ₂
PYR4	7,15	NH	CH	N	4',5'-Me ₂
PYR5	6,17	CH ₂	N	CH	-
PYR6	6,58	NH	-	-	-
PYR7	8,04	NH	-	-	4',5'-Me ₂

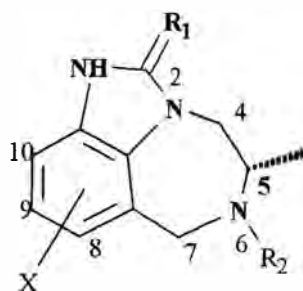


Figura 55 - Estrutura da TIBO.

Tabela 43 - Moléculas da família da TIBO selecionadas.

Código	-Log (IC ₅₀)	X	R ₁	R ₂
TIBO1	4,15	H	O	2-propenil
TIBO2	7,47	9-Cl	S	3-metil,2-butenil
TIBO3	8,37	8-Cl	S	3-metil,2-butenil
TIBO4	7,36	H	S	3-metil,2-butenil
TIBO5	8,525	8-Br	S	3-metil,2-butenil
TIBO6	6,00	8-CH ₃	O	3-metil,2-butenil
TIBO7	7,85	8-CH ₃	S	3-metil,2-butenil
TIBO8	4,48	9-NO ₂	O	ciclopropilmetil
TIBO9	4,22	9-NH ₂	O	ciclopropilmetil
TIBO10	7,60	9-F	S	3-metil,2-butenil
TIBO11	7,59	9,10-diCl	S	3-metil,2-butenil
TIBO12	5,23	9-CF ₃	O	3-metil,2-butenil
TIBO13	6,32	9CF ₃	S	3-metil,2-butenil
TIBO14	5,94	8-CN	O	3-metil,2-butenil
TIBO15	7,25	8-CN	S	3-metil,2-butenil
TIBO16	7,33	8-Br	O	3-metil,2-butenil
TIBO17	5,32	10-OCH ₃	S	3-metil,2-butenil
TIBO18	5,97	10-Br	S	3-metil,2-butenil

3.2.2 - Moléculas de NNRTI com estruturas cristalinas enzima-inibidor, disponíveis no banco de dados PDB

As estruturas de alguns complexos RT-NNRTI foram determinadas por cristalografia de raios-X. As estruturas dos NNRTI complexadas com a enzima selvagem que possuem os requisitos para este estudo foram obtidas do PDB e utilizadas neste trabalho.

No caso das moléculas pertencentes às classes de TIBO, HEPT, α -APA e nevirapina, as conformações dos inibidores nos complexos com a RT foram consideradas como as conformações bioativas e utilizadas posteriormente nos alinhamentos, utilizando a estrutura da TIBO R86183 (TIBO-8Cl) como molde.

A tabela 44 apresenta as moléculas extraídas do PDB. Suas coordenadas foram transformadas com o programa BABEL [Walters e Stahl, 1994] para o formato mol2 para serem empregados em cálculos com o SYBYL. [SYBYL, Tripos Associates Inc.]

Tabela 44 - Moléculas obtidas do PDB.

Molécula	Código PDB	Classe	Referência
TIBO-8CL	1HNV	TIBO	Nat. Struct. Biol. 1995, 2, 407.
TIBO-9CL	1VER	TIBO	Structure, 1995, 3, 915.
Nevirapina	1VRT	Benzodiazepinona	Struct. Biol., 1995 2, 4, 293.
α -apa	1HNI	α -APA	Structure 1995, 3, 365.
HEPT líder	1RTI	HEPT	Struct. Biol., 1995, 4, 293.
mkc442	1RT1	HEPT	J. Med. Chem., 1996, 39, 1589.
tnk551	1RT2	HEPT	J. Med. Chem., 1996, 39, 1589.

3.2.3 - Obtenção de cargas atômicas parciais

O campo eletrostático usado em análises CoMFA emprega um potencial coulômbico, descrito por distribuições de cargas atômicas parciais. Desta forma, a qualidade destas cargas deve determinar a qualidade do campo molecular eletrostático usado.

Três conjuntos de cargas atômicas parciais foram utilizados neste trabalho. Geralmente as cargas derivadas do potencial eletrostático molecular quântico (cargas ESP) fornecem bons resultados para a validação estatística de modelos CoMFA [Cramer, Paterson e Bunce, 1988] de acordo com artigos de revisão. [Martin, 1998; Kubiny, Folkers e Martin, 1998; Norinder, 1998] No entanto em alguns sistemas moleculares estes parâmetros não são excepcionalmente decisivos para os resultados CoMFA, ou seja, bons resultados também têm sido obtidos com vários outros conjuntos de cargas atômicas parciais [Martin, 1998; Kubiny, 1993]

Além das cargas ESP, utilizou-se também cargas do tipo Gasteiger-Huckel (empíricas) e ZDO/AM1 (semi-empíricas). [Dewar, 1988, 1990] Estas cargas podem ser inseridas automaticamente nos átomos das moléculas otimizadas, utilizando a interface gráfica do Sybyl 6.5.

3.2.4 - Análises conformacionais de DABO e piridinonas

Não foram localizadas as estruturas cristalinas para as moléculas das classes de DABO e piridinonas e portanto suas conformações bioativas não são conhecidas. Estas moléculas foram submetidas à análises conformacionais sistemáticas (“*systematic search*”), de acordo com a metodologia implementada no Sybyl 6.5.

As conformações potencialmente ativas foram escolhidas com base nos modelos farmacofóricos existentes e nas características dos NNRTI complexados com a RT, apresentados na tabela 44. Em primeiro lugar foram aceitas somente as

conformações do “tipo borboleta”. Confôrmeros lineares, por exemplo, foram desconsiderados desde o início das buscas conformacionais. O critério seguinte foi a elaboração de mapas de distância. As distancias entre os centros geométricos dos anéis aromáticos da nevirapina, HEPT e α -APA, ou a distância do grupo benzoimidazol de TIBO com a dupla ligação do substituinte 2-metil-3-butenil, bem como a orientação entre estes centros, serviram para discriminar as possíveis conformações bioativas de DABO e das piridinonas nas buscas conformacionais. Uma distância entre um destes centros e o átomo do substituinte lipofílico mais distante também auxiliou nas discriminações, uma vez que a existência e característica deste substituinte constituem um farmacóforo explorado em alguns modelos. [Schafer et al, 1993, Gussio et al. 1996, Kroeger-Smith et al., 1995, Smith-Jr. et. al., 1998 Mestres et al., 1999] Poucas moléculas de DABO e piridinonas que possuem estas características foram encontradas. Foram selecionadas três estruturas das DABO e seis das piridinonas para a minimização de geometrias com o emprego do método AM1 [Dewar, 1990] no programa Mopac 6.0. [Stewart, 1990] As moléculas resultantes foram submetidas aos alinhamentos por campos estéricos e eletrostáticos com a metodologia SEAL. Os confôrmeros supostamente bioativos destas duas classes foram escolhidos de acordo com o melhor índice de sobreposição obtido com esta metodologia (item 3.2.9). Estes procedimentos foram realizados com DABO1 (composto líder da classe das DABO), PYR1 e PYR2 (composto líder e derivado isótero das piridinonas). As demais estruturas destas classes foram geradas a partir dos confôrmeros discriminados na busca, sendo submetidos em seguida a minimizações com o método AM1.

As conformações selecionadas de acordo com estes critérios foram consideradas como bioativas. Este fato também pode ser sustentado por um estudo paralelo realizado no LAMMOL, que analisou exaustivamente as preferências conformacionais das piridinonas e de outros NNRTI e cujos resultados foram recentemente publicados. [Parreira, Abrahão-Júnior e Galembeck, 2001]

3.2.5 - Otimização das estruturas tridimensionais

A figura 56 apresenta as estruturas tridimensionais de um composto representante de cada uma das seis séries de NNRTI estudados.

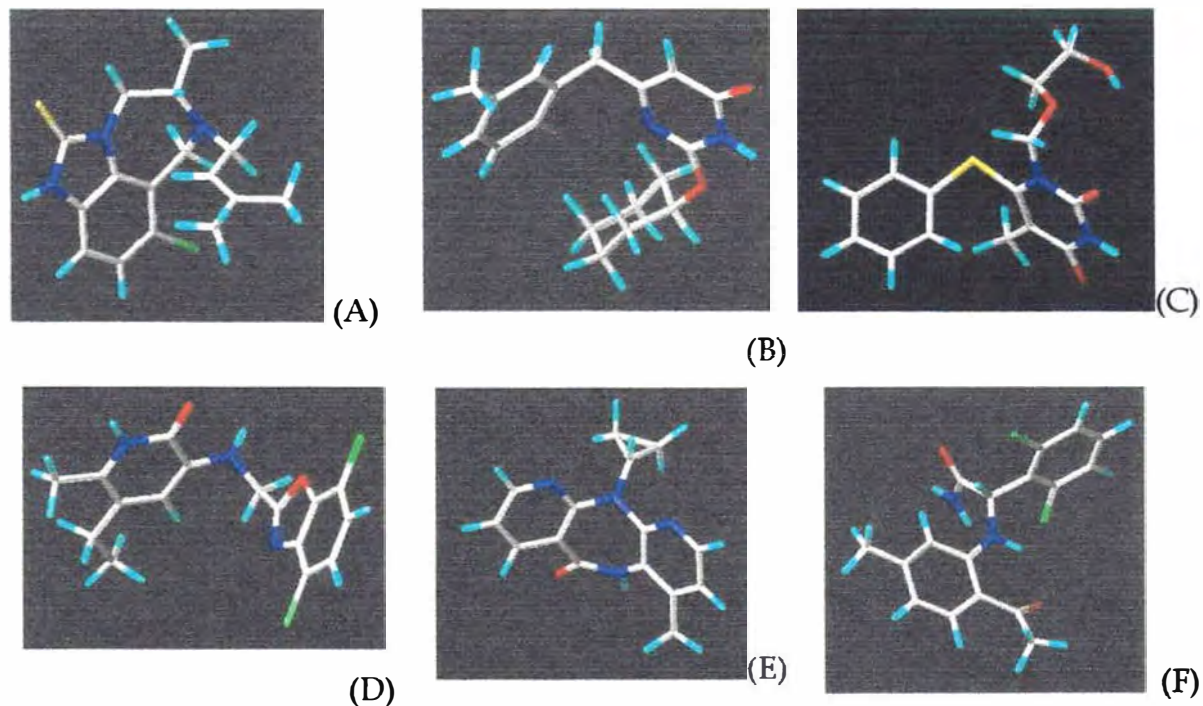


Figura 57 - Representação tridimensional de uma molécula de cada uma das seis classes de NNRTI incluídas no modelo CoMFA. (A) TIBO (B) DABO (C) HEPT (D) Piridinonas (e) Nevirapina (F) α -APA

As geometrias dos compostos foram otimizadas pelo método semi-empírico AM1 [Dewar, 1988, 1990] através do programa MOPAC 6.0 [Stewart, 1990] Estes cálculos foram realizados diretamente no programa Sybyl versão 6.5, implementado em uma estação de trabalho Iris II R10000, utilizando como terminal gráfico uma workstation O2, ambas da Silicon Graphics. O critério de convergência da norma do gradiente foi reduzido para 0.1 (palavra-chave GNORM=0.1) e os critérios de convergência da otimização e do cálculo autoconsistente foram incrementados de 100 vezes pelo uso da palavra-chave PRECISE. Utilizou-se ainda a palavra-chave MMOK para efetuar as correções de

mecânica molecular dos ângulos de torção das ligações peptídicas. As moléculas foram totalmente otimizadas com do algoritmo de Baker [Baker, 1986] sem o emprego de restrições de geometria.

3.2.6 - Alinhamento por campos moleculares (SEAL)

Kearsley e Smith [Kearsley e Smith, 1990] descreveram uma função de alinhamento de acordo com a sobreposição de duas moléculas rígidas. Este método foi então implementado no programa SEAL (“Steric and Electrstatic Alignment”). [Kearsley e Smith, 1990, código QCPE qcmp634] O procedimento compreende uma dupla soma sobre todos os possíveis pares de átomos entre as duas moléculas. Para isto calcula-se escores de similaridade A_f de um dado alinhamento de acordo com a seguinte expressão:

$$A_F = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n w_{ij} e^{-\alpha r_{ij}^2} \quad \text{Eq. 12}$$

No primeiro somatório i explora todos os m átomos da primeira molécula e no segundo j é variado pelos n átomos da segunda estrutura. O termo w_{ij} por sua vez compreende um somatório sobre todas as propriedades físico-químicas consideradas e ponderadas com os fatores de peso (w_k) para estas substâncias, de acordo com a Equação 13. Nesta expressão os pesos w_k são utilizados para as contribuições eletrostáticas (w_E) e estéricas (w_S). q_i e q_j são as cargas atômicas parciais sobre os átomos i e j e v_i e v_j são os volumes ocupados por estes átomos.

$$w_{ij} = w_E q_i q_j + w_S v_i v_j \quad \text{Eq. 13}$$

No artigo original, [Kearsley e Smith, 1990] Kearsley e Smith usaram cargas atômicas parciais e raios de van der Waals como propriedades. Eles mostraram também que uma medida de hidrofobicidade com base nos átomos também pode ser considerada como uma propriedade adicional para sobrepor partes relativamente neutras das moléculas, utilizando-se de uma relação que envolve os quadrados das cargas atômicas parciais descritas. Todavia outras parametrizações para a descrição do campo molecular hidrofóbico (ou até mesmo de ligações de hidrogênio) podem ser incluídas. [Kubinyi, 1993, Matin, 1998]

No termo exponencial, r_{ij} é a distância entre os átomos i e j . O parâmetro ajustável α a razão de atenuação dependente desta distância. Este fator irá influenciar como o modelo leva em consideração a forma (“*shape*”) e propriedades das moléculas estudadas na comparação entre elas: com pequenos valores de α , os mínimos detalhes de cada campo gerado pelas moléculas são considerados no alinhamento. A superfície gerada neste caso (caso uma minimização seja efetuada) deve ser suave e com poucos mínimos. Quando α é maior, uma grande atenuação dependente das distâncias interatômicas para a similaridade molecular é considerada. De acordo com o método isto deve subestimar as características locais das moléculas comparadas. Por outro lado, apesar da similaridade molecular global se tornar menos importante, as afinidades particulares de cada molécula pelo receptor biológico podem ser mais bem exploradas, uma vez que espécies estruturalmente diversas podem ser comparadas com este tipo de alinhamento, diferentemente da sobreposição átomo a átomo geralmente utilizada. [Kubinyi, 1993] A aplicação do método revela várias soluções que podem ser discriminadas de acordo com os fatores de alinhamento A_f obtidos.

Estudos anteriores mostram que os resultados são altamente dependentes dos fatores α , w_E e w_S . [Klebe, 1994] Para contornar esta situação, é necessário estabelecer a dependência do sistema estudado com a variação destes parâmetros.

3.2.7 - Parametrização dos alinhamentos

O fator de atenuação α e os pesos das contribuições estéricas e eletrostáticas foram explorados de diversas formas para que se possa analisar as suas influências nos alinhamentos, bem como nos resultados de validação estatística dos modelos CoMFA.

O programa SEAL realiza apenas pares de alinhamentos. Uma em cada par de estruturas foi considerada como molde para a sobreposição. Neste caso a geometria da TIBO-8Cl, obtida experimentalmente, foi utilizada como molde em relação a cada uma das outras moléculas. Antes, a função de alinhamento foi normalizada através do auto-alinhamento realizado para cada molécula. Esta normalização é necessária para que os resultados das sobreposições sejam os melhores possíveis, isto é, que os alinhamentos realmente se dêem pela similaridade dos campos estéricos e eletrostáticos. Os valores de A_f (coeficiente de sobreposição) obtidos nos auto-alinhamentos foram utilizados em um critério de parametrização de α . Estes valores devem oscilar o mínimo possível com a variação deste parâmetro, [Kearsley e Smith, 1990; Ishiki, 1999] por isto eles foram primeiramente normalizados e dispostos em gráficos onde na ordenada encontram-se os valores de A_f e na abscissa são colocados números arbitrários em ordem crescente e na atribuído para cada composto N (Figuras 57, 58 e 59), de forma que fosse possível se obter o valor do parâmetro de alinhamento, α , que causasse a menor variação da função de alinhamento. Desta forma, as derivadas das curvas obtidas (curvas da direita) servem para discriminar o α que proporciona menores oscilações nos escores de sobreposição, tal como discutiram Kearsley e Smith ao proporem esta metodologia. [Kearsley e Smith, 1990] Este procedimento foi realizado para cada um dos três conjuntos de cargas atômicas citados no item 3.2.3.

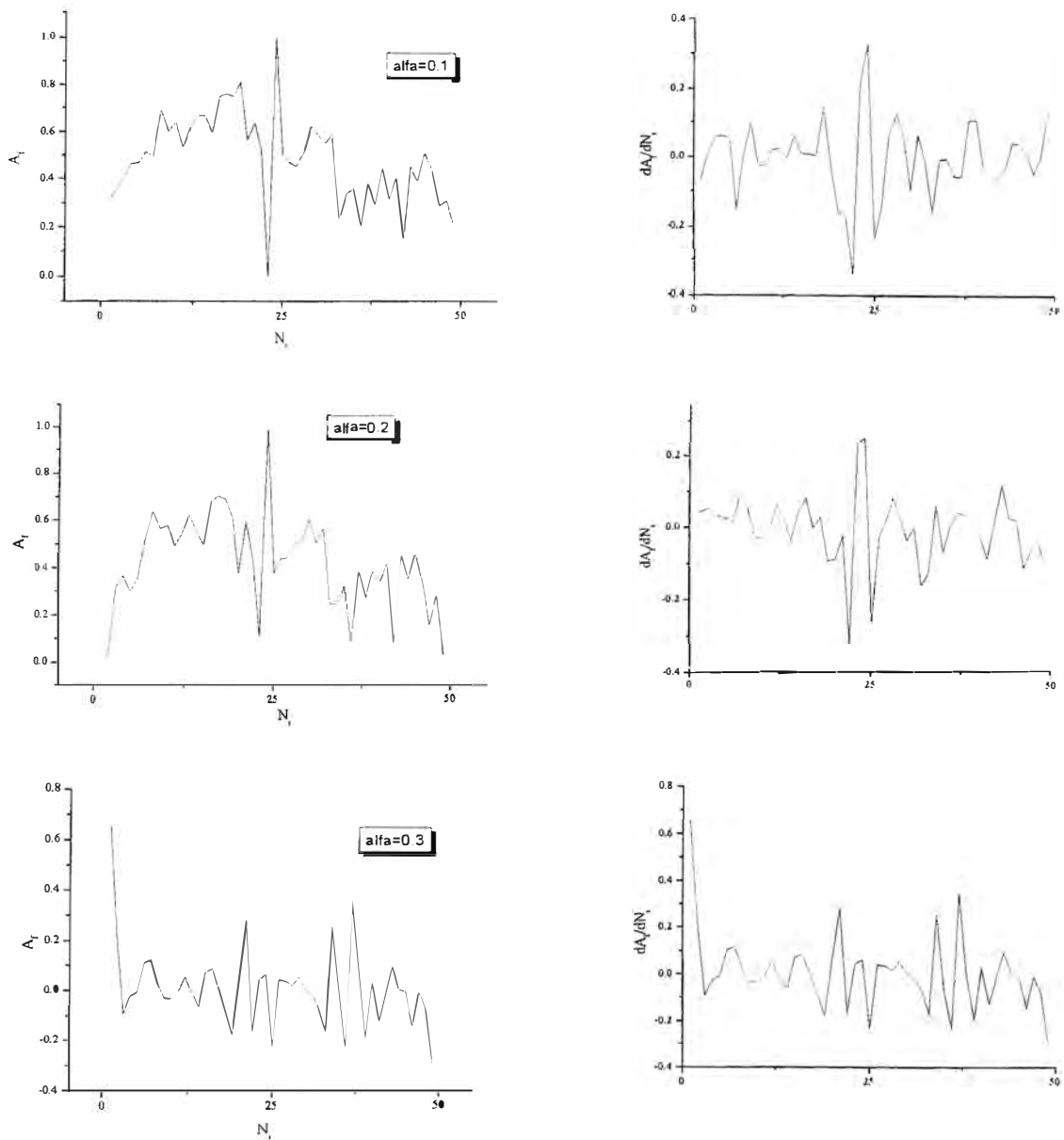


Figura 57 - Gráficos da função de alinhamento (A_i) versus código numérico arbitrário (N_i) para cada um dos 49 NNRTI auto-sobrepostos à esquerda e derivadas das curvas obtidas à direita. Os pontos foram obtidos com o parâmetro α variando entre 0.05, a 0.5 e valores de $w_E=1.0$ e $w_S=1.0$, utilizando-se cargas ESP/AM1.

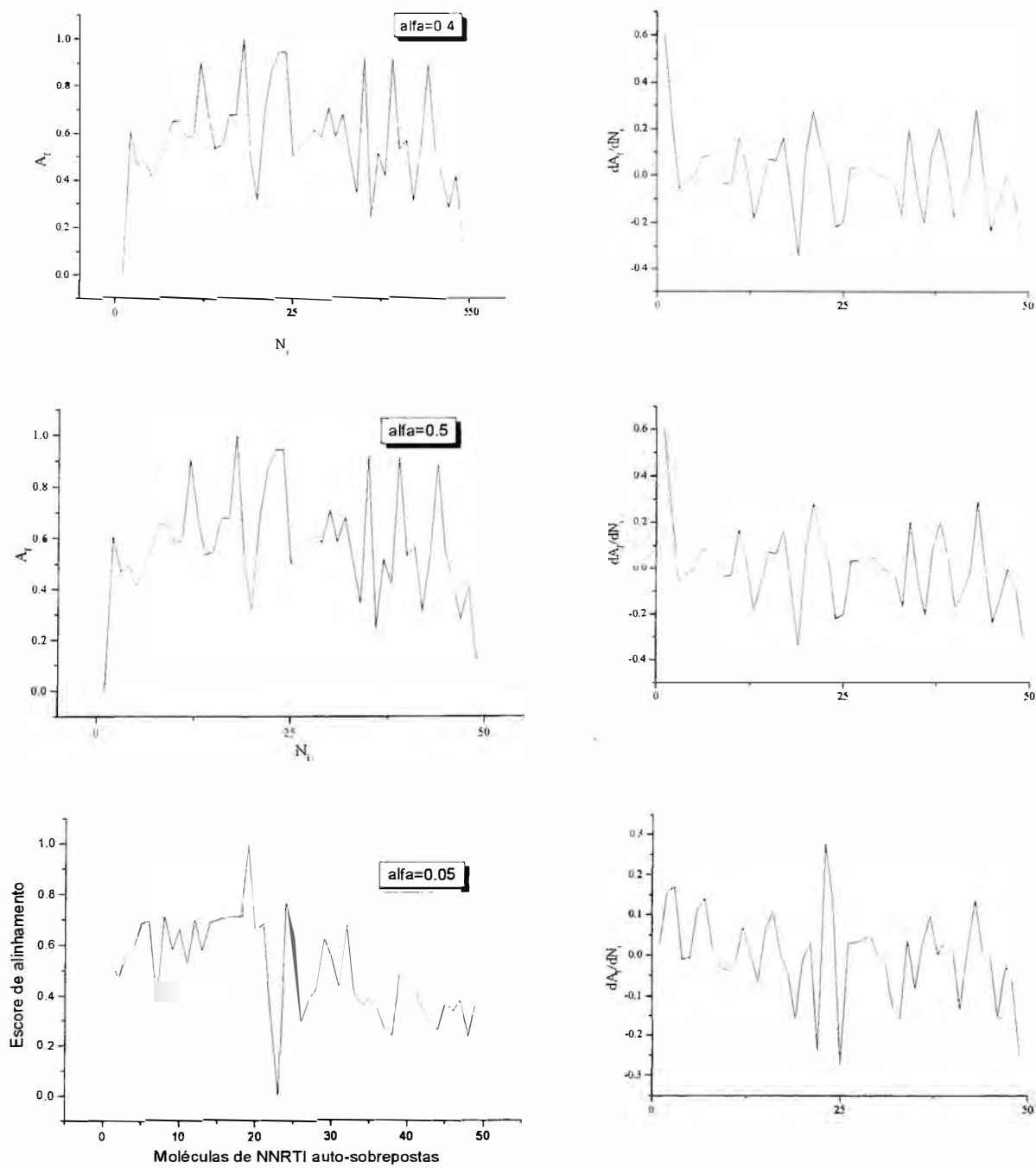


Figura 57 - (Continuação)

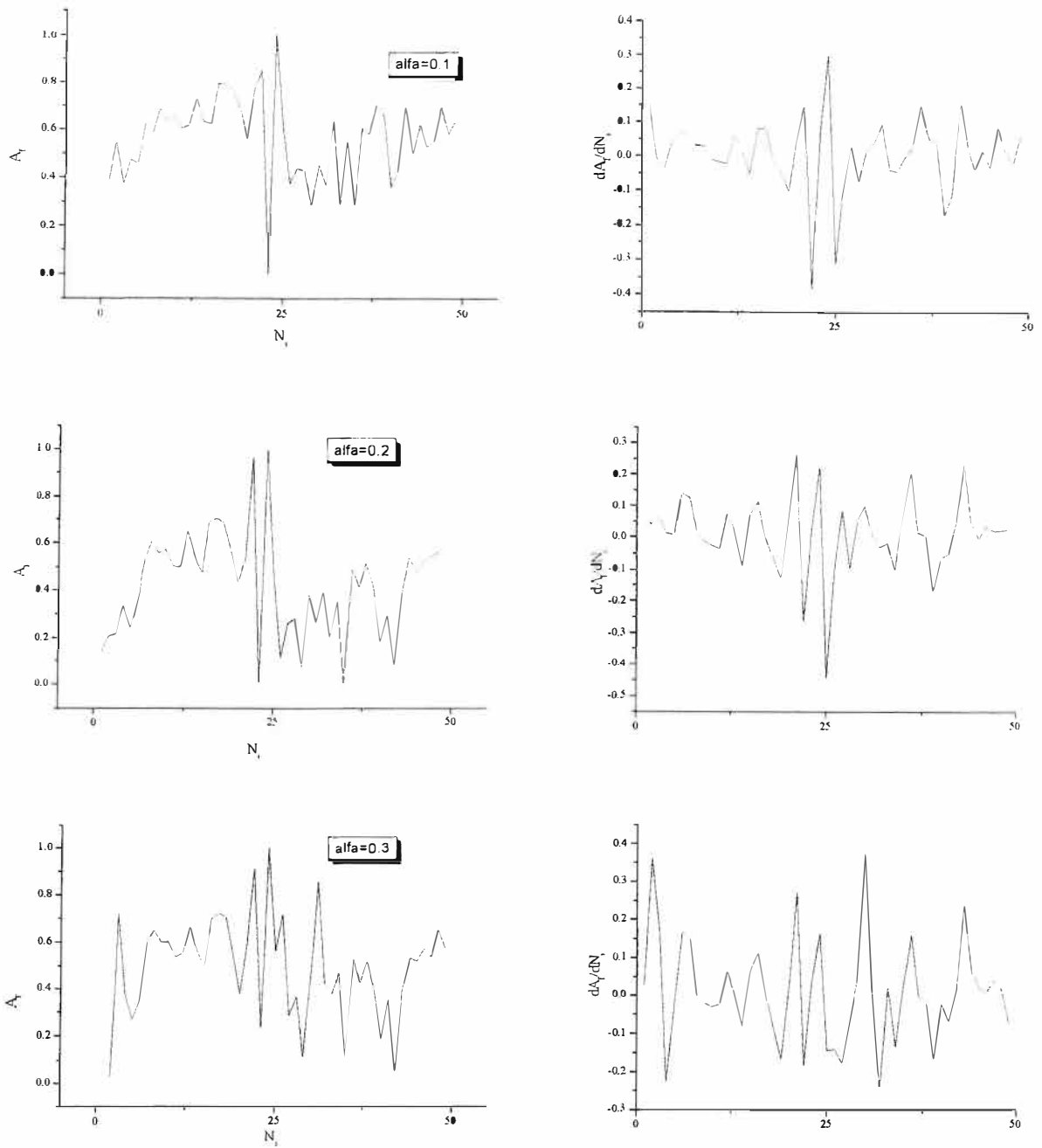


Figura 58 - Gráficos da função de alinhamento (A_i) versus código numérico arbitrário (N_i) para cada um dos 49 NNRTI auto-sobrepostos a esquerda e derivadas das curvas à direita. Os pontos foram obtidos com o parâmetro α variando entre 0.1, a 0.5 e valores de $w_E=1.0$ e $w_S=1.0$, utilizando-se cargas ZDO/AM1.

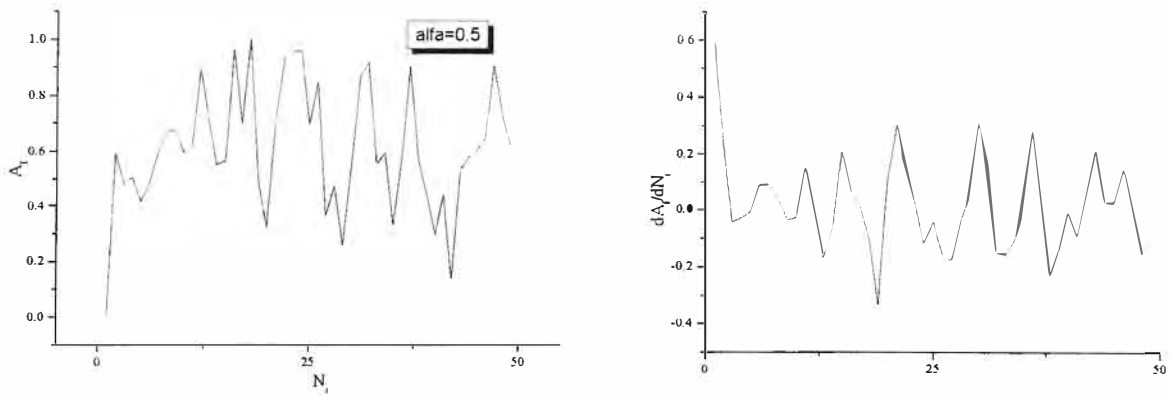
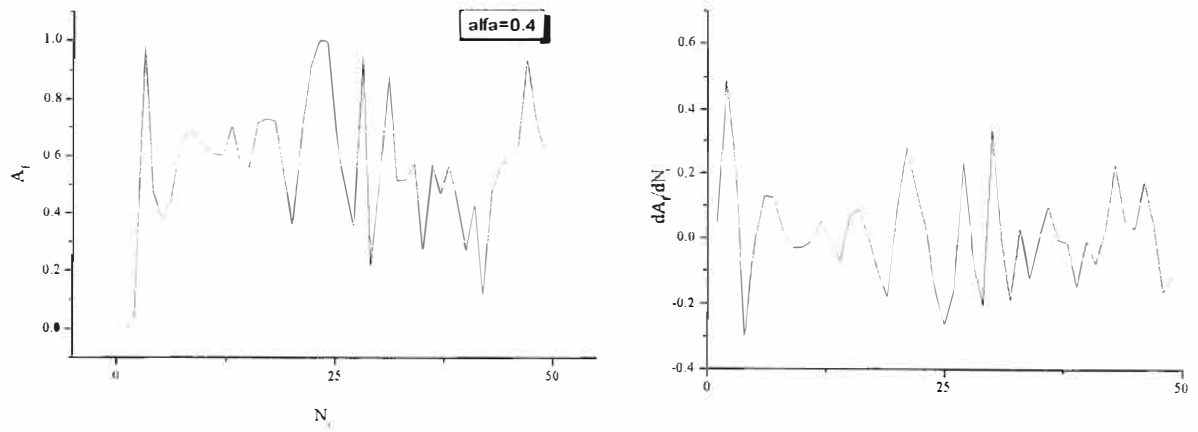


Figura 58 - Continuação.

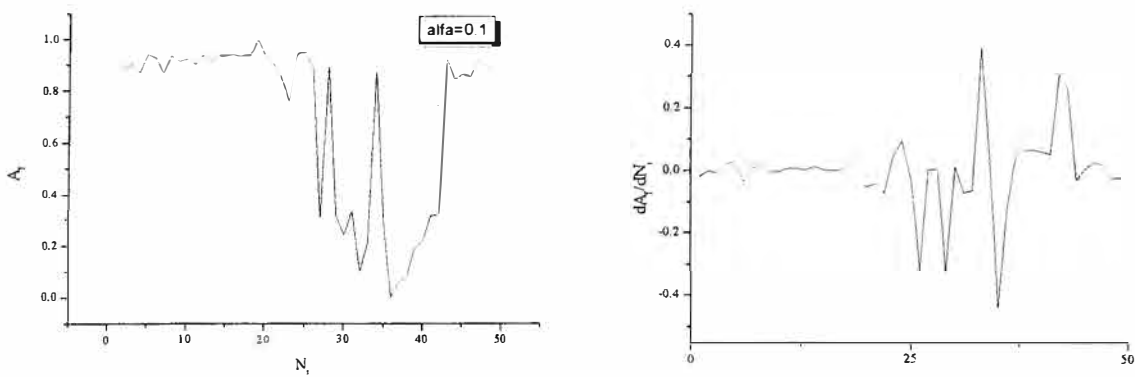


Figura 59 - Gráficos da função de alinhamento (A_f) versus código numérico (N_i) arbitrário para cada um dos 49 NNRTI auto-sobrepostos, a esquerda e derivadas das curvas à direita. Os pontos foram obtidos com o parâmetro α variando entre 0.1, a 0.5 e valores de $w_E=1.0$ e $w_S=1.0$, utilizando-se cargas Gasteiger-Huckel.

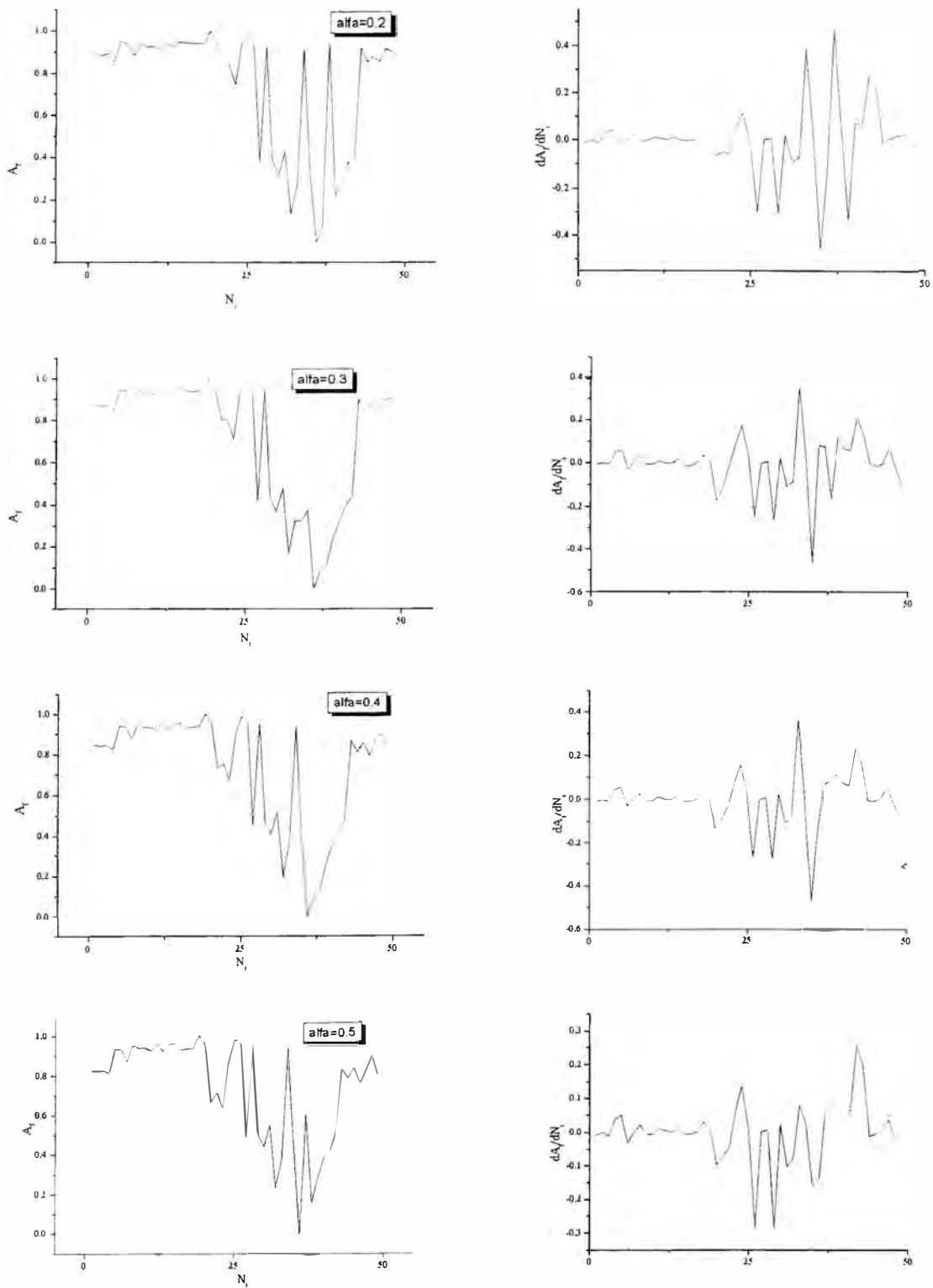


Figura 59 - Continuação

3.2.8 - Campo hidrofóbico (HINT)

A hidrofobicidade tem sido considerada uma propriedade físico-química chave para o entendimento da atividade de fármacos há vários anos. [Meyer, 1899] Normalmente a hidrofobicidade é medida como P , o coeficiente de partição da solubilidade de uma substância entre água e um solvente orgânico. Normalmente se emprega o octanol como o solvente orgânico. O programa HINT [Kellogg e Abraham, 1991] foi desenvolvido para calcular e mapear esta propriedade para pequenas moléculas e proteínas. Ele calcula constantes hidrofóbicas moleculares obedecendo o seguinte critério: (1) a soma de constantes atômicas de um fragmento é valor da constante para este fragmento; (2) fatores designados para ligações, halogênios geminais e vicinais, cadeias laterais, etc. são aplicados para todos os átomos qualificados, enquanto que fatores de proximidade polar são aplicados (quando necessário) aos átomos centrais destes fragmentos; (3) átomos terminais são considerados mais importantes que os átomos centrais dos fragmentos e geralmente as constantes hidrofóbicas atômicas originais são mantidas. [Hansch e Leo, 1979; Abraham e Leo, 1987]

O campo hidrofóbico é calculado pela sobreposição de um retículo tridimensional de pontos de teste, no espaço em torno da molécula de interesse, avaliando a soma das interações com cada ponto, de acordo com a seguinte equação:

$$A_t = \sum_{i=1}^{drug} s_i a_i R_{it} \quad \text{Eq. 14}$$

onde, s_i e a_i são a área acessível da superfície do solvente e constante hidrofóbica atômica para o átomo i . R_{it} é uma função da distância (r) entre o átomo i e o ponto de teste t . $R_{it} = e^{-r}$, foi a função utilizada neste trabalho.

3.2.9 - Análises CoMFA

As energias dos campos estérico e eletrostático do CoMFA, foram calculadas para cada composto automaticamente através de um átomo de prova em todas as interseções de um cubo suficientemente grande para acomodar todos os compostos estudados. Este cubo é automaticamente estendido, em 4 Å, em todas as direções. Neste estudo foram utilizados como átomos de prova o carbono sp^3 com carga +1, o oxigênio sp^3 com carga -1 e o hidrogênio com carga +1, sendo que os espaçamentos de grade utilizados foram de 1.0 Å, 1.5 Å, 2.0 Å. Para os cálculos das energias estéricas foram utilizadas funções potenciais de Lennard-Jones 6-12 e para os cálculos das energias eletrostáticas utilizou-se os potenciais coulômbicos (com o dielétrico dependente de $1/r$). Os valores de A e B na equação de Lennard-Jones foram obtidos através dos valores padrão do campo de força da Tripos. Uma energia de corte (*cutoff*) de 30 kcal/mol para ambas as contribuições, estéricas e eletrostáticas, foi utilizada. Se a repulsão do átomo de prova for maior que a energia de corte, esta interação será ajustada automaticamente para o valor da energia de corte e a interação eletrostática será então ajustada pela média das energias das outras moléculas neste ponto do cubo.

As análises de regressão das energias dos campos CoMFA foram realizadas através do algoritmo dos mínimos quadrados parciais - PLS (*Partial Least Square*) [Cramer, Patterson e Bunce, 1998] que está contido no módulo de QSAR no programa Sybyl. A PLS é uma técnica que produz uma equação para descrever ou prever diferenças nas variáveis dependentes (ou propriedades de entrada) através das diferenças nos descritores. Quando mais de uma variável está envolvida, uma equação separada é calculada para cada propriedade de entrada, mas os coeficientes são inter-relacionados e geralmente diferem daqueles que são obtidos analisando-se as propriedades de entrada separadamente.

A análise PLS é uma extensão da técnica de regressão múltipla. Estes procedimentos estatísticos fornecem resultados numéricos (coeficientes, r^2 e s)

quando aplicadas da mesma forma para o mesmo grupo de treinamento. Estes valores determinam a validade estatística dos modelos, ou seja, dizem o quanto as propriedades envolvidas se correlacionam.

Primeiramente foi utilizado o procedimento de auto-validação (*cross-validation*). A auto-validação é uma aproximação para selecionar qual o modelo que possui um bom valor preditivo. Este método elimina um ou vários grupos de entrada do grupo de treinamento, originando um modelo quantitativo dos objetos restantes e predizendo, mas não reproduzindo, a atividade para um ou vários objetos que não estão incluídos na derivação do modelo [Vinter, Davis e Saunders, 1987, Wold et al., 1994] O quadrado do coeficiente de correlação da auto-validação, q^2 , e os desvios padrões de predição, s , foram calculados através da soma dos quadrados dos resíduos preditos.

$$PRESS = \sum (y_{pred} - y_{obs})^2 \quad \text{Eq. 15}$$

Os valores de r^2 e S são calculados através da variância não explicada para prever a qualidade dos modelos. A melhor equação obtida será utilizada para prever a atividade de outros compostos.

Os campos estéricos e eletrostáticos foram escalonados usando o padrão CoMFA para igualar seus pesos no modelo aplicado. O valor mínimo de $\sigma=1.0$ kcal/mol foi utilizado como filtro de coluna para reduzir os ruídos nas análises de PLS. O melhor número de componentes foi obtido através da auto-validação tendo o menor erro padrão de predição (s). Este melhor número de componentes foi utilizado para derivar a melhor reta do modelo de correlação usando a não auto-validação (non-cross-validated).

As contribuições hidrofóbicas, ou seja, do campo estérico calculado de acordo com a metodologia HINT, [Kellog Semus e Abraham, 1991] foram consideradas da mesma forma que as contribuições estéricas e eletrostáticas dos modelos CoMFA convencionais.

3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 - Parametrização dos alinhamentos

Os gráficos apresentados nas figuras 57, 58 e 59, apresentaram as parametrizações de α para os três conjuntos de cargas atômicas parciais utilizadas. As oscilações normalizadas de A_f (gráficos à esquerda) e suas derivadas com relação à N_i (gráficos à direita) para a análise precisa das menores oscilações obtidas.

Pode-se notar que os melhores valores de α (menores oscilações de A_f) variam com as cargas utilizadas no alinhamento. No caso das cargas ZDO/AM1 o melhor valor encontrado foi 0,1; no entanto podemos ver que as oscilações também não são muito expressivas quando $\alpha = 0,2$. Testes adicionais foram realizados durante as análises CoMFA, apresentadas no próximo tópico.

No caso das cargas ESP/AM1, o comportamento dos fatores de sobreposição A_f sugeriu que o melhor valor de α poderia ser menor ainda, estando fora da faixa estudada. Para se investigar esta suposição decidiu-se auto-sobrepôr o conjunto de moléculas também com $\alpha = 0,05$. Os resultados, de acordo com os diagramas apresentado pela figura 57, mostram que dois valores podem ser ótimos : 0,05 e 0,2. Qual destes dois valores é o mais adequado só poderá ser indicado pelos estudos CoMFA desta série.

Cargas do tipo Gasteiger-Huckel também foram empregadas, onde a parametrização de α sugeriu valores ótimos de 0,4 e 0,5. Como pode ser verificado na publicação original, e também em um trabalho de G. Klebe, [Klebe, 1999] um valor grande para α indica que as moléculas estão sendo sobrepostas com menor detalhamento. Provavelmente, este resultado já esteja indicando que este conjunto de cargas é inferior em relação aos dados obtidos pelos dois outros métodos. Isto foi confirmado com as análises CoMFA, expostas adiante.

Após a determinação do melhor fator de alinhamento e dos pesos das contribuições estéricas e eletrostáticas foram realizados os alinhamentos para todos os compostos com a TIBO-8Cl como molde.

Os resultados das sobreposições de todas as moléculas com cargas atômicas parciais ESP/AM1 e $\alpha = 0,05$, são apresentados para valores iguais a 10,0 e 1,0 e 1,0 e 10,0 para os pesos w_s e w_E das contribuições estéricas e eletrostáticas (figuras 60 e 61).

Para esta série de NNRTI de seis classes estruturalmente distintas, utilizadas em um único modelo CoMFA, é interessante se utilizar os pesos estéricos maiores que os eletrostáticos para se garantir um padrão único de alinhamento (Figura 60). Caso $w_E > w_s$, apresentado na Figura 61, pode-se verificar que uma molécula não se superpõe adequadamente e, portanto deve estar sendo erroneamente alinhada. Este fato pode vir a prejudicar o modelo ou mesmo destacar um "outlier", como já foi discutido pelos autores do SEAL em sua publicação original. [Kearsley e Smith, 1990]

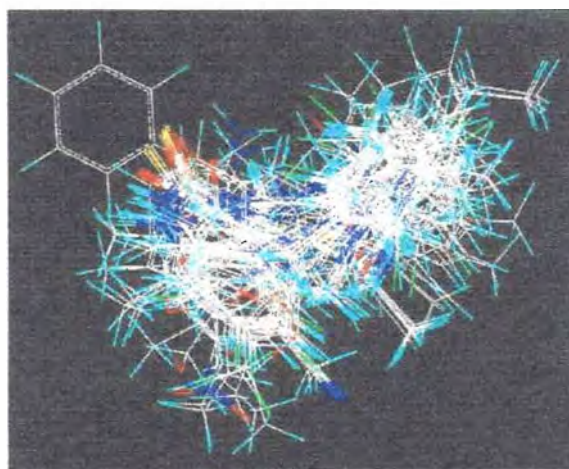


Figura 60 - Alinhamentos dos 49 NNRTI utilizando os pesos 1 e 10 para as contribuições estéricas e eletrostáticas, respectivamente.

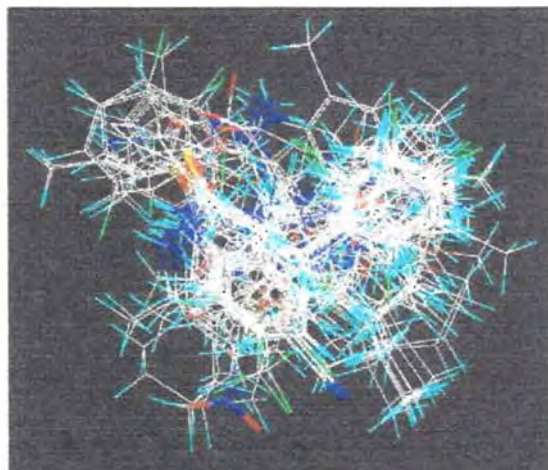


Figura 61 – Alinhamentos dos 49 NNRTI utilizando os pesos 10 e 1 para as contribuições estéricas e eletrostáticas, respectivamente.

3.3.2 - Análises CoMFA

Foram desenvolvidos diversos modelos utilizando-se espaçamentos de grade de 1.0Å, 1.5Å e de 2.0Å. Para os modelos que utilizaram as cargas ESP/AM1, foram utilizados ainda três diferentes átomos de prova: carbono sp^3 com carga +1, oxigênio sp^3 com carga -1 e hidrogênio com carga +1. Avaliou-se também a influência do campo hidrofóbico HINT.

As tabelas 45, 46 e 47 apresentam alguns valores estatísticos de análises CoMFA para as moléculas alinhadas com as cargas ZDO/AM1. Pode-se notar que os pesos das contribuições estéricas e eletrostáticas (w_E e w_S) influenciam pouco os resultados dos alinhamentos bem como a validação estatística das análises CoMFA, uma vez que estas duas contribuições são independentes. Todavia, quando w_S é maior que w_E , vê-se uma ligeira melhora nos parâmetros estatísticos, principalmente para um número de componentes ótimo elevado e espaçamento pequeno para a grade. Este resultado provavelmente está relacionado com o balanceamento nos escores de alinhamento, ou seja, quando as contribuições são mais bem distribuídas, tem-se maior reprodutibilidade e melhores resultados. Nos

modelos desenvolvidos, as contribuições mais equilibradas foram obtidas para $w_S = 10$ e $w_E = 1$. No artigo original do programa SEAL, Kearsley e Smith [Kearsley e Smith, 1990] observaram resultados semelhantes e sugerem que os pesos w_E e w_S devem ser escolhidos justamente da forma que as contribuições estéricas e eletrostáticas fiquem as mais homogêneas.

A tabela 45 também apresenta resultados de análises CoMFA com $\alpha = 0,2$. Este valor não foi empregado para as análises futuras, uma vez que os resultados de validação estatística obtidos são bem inferiores aos com $\alpha = 0,1$. Este fato pode garantir o critério de parametrização de α utilizado (auto-sobreposições) e será confirmado com as análises que utilizam outros conjuntos de cargas atômicas parciais.

A tabela 48 apresenta as análises CoMFA onde as moléculas foram alinhadas com cargas do tipo Gasteiger-Huckel. [Gasteiger e Marsili, 1980] Os resultados de validação estatística são bastante inferiores e por isto descartamos este conjunto de cargas para as análises futuras.

Tabela 45 - Análises CoMFA para a série de 49 NNRTI.
($w_S = 10,0$ e $w_E = 1,0$ e cargas AM1)

Identificação	$\alpha = 0,1$			$\alpha = 0,2$	
	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5
Espaçamento de grade	2,0	1,5	1,0	2,0	1,5
n	12	10	13	9	12
q^2 *	0,520	0,579	0,592	0,273	0,567
r^2 *	0,979	0,978	0,996	0,971	0,994
s *	0,867	0,879	0,895	1,132	0,909
SD *	0,201	0,198	0,085	0,225	0,107
F	138,12	171,069	735,88	146,43	500,89
CONTRIBUIÇÕES					
estérica	0,499	0,501	0,480	0,528	0,469
eletrostática	0,501	0,499	0,520	0,472	0,531

* n = Número ótimo de componentes, q^2 = quadrado do coeficiente de correlação da autovalidação (Eq. 15), r^2 = coeficiente de correlação total, s = desvio padrão de predição, SD = desvio padrão, F = resultado do teste F.

Tabela 46 - Análises CoMFA para a série de 49 NNRTI
($w_S = 1,0$ e $w_E = 10,0$ para $\alpha = 0,1$ e cargas AM1)

Identificação	Modelo 6	Modelo 7	Modelo 8
Espaçamento de grade	2,0	1,5	1,0
n	11	11	12
q^2	0,543	0,378	0,409
r^2	0,984	0,985	0,993
s	0,911	1,075	1,062
SD	0,170	0,165	0,114
F	212,142	225,09	441,724
CONTRIBUIÇÕES			
estérica	0,561	0,560	0,556
eletrostática	0,439	0,440	0,444

Tabela 47 - Análises CoMFA da série de 49 NNRTI.

 $(w_S = 1,0$ e $w_E = 1,0$ para $\alpha = 0,1$ e cargas AM1)

Indentificação	Modelo 9	Modelo 10	Modelo 11
Espaçamento de grade	2,0	1,5	1,0
Nº ótimo de componentes	8	11	11
q2	0,285	0,296	0,325
r2	0,993	0,994	0,991
s	1,109	1,165	1,120
SD	0,128	0,107	0,117
F	383,27	459,66	379,54
CONTRIBUIÇÕES			
estérica	0,543	0,566	0,542
eletrostática	0,457	0,434	0,458

Tabela 48 - Análises CoMFA para a série de 49 NNRTI.

 $(w_S = 10,0$ e $w_E = 1,0$ e cargas Gasteiger-Huckel)

Indentificação	$\alpha = 0,5$			$\alpha = 0,4$		
	Modelo 12	Modelo 13	Modelo 14	Modelo 15	Modelo 16	Modelo 17
Espaçamento de grade	2,0	1,5	1,0	2,0	1,5	1,0
n	8	13	8	18	14	18
q2	0,294	0,258	0,308	0,421	0,405	0,465
r2	0,950	0,991	0,967	0,994	0,997	0,999
s	1,101	1,206	1,090	1,151	1,096	1,106
SD	0,292	0,132	0,237	0,114	0,083	0,030
F	95,36	300,465	147,408	290,501	704,903	4243,62
CONTRIBUIÇÕES						
estérica	0,503	0,474	0,518	0,439	0,451	0,447
eletrostática	0,497	0,526	0,482	0,561	0,549	0,553

Os números de componentes ótimos dos modelos desenvolvidos foram escolhidos com base na variação deste número com q^2 (correlação de validação cruzada) e de s (desvio padrão de predição). Os diagramas apresentados nas figuras 62, 63 e 64 a seguir, ilustram as escolhas destes parâmetros de análise para alguns casos, onde os menores desvios de predição e maiores correlações de validação cruzada indicam o número ótimo de componentes para a análise PLS. Os valores utilizados nos diagramas foram obtidos através da estratégia SAMPLS ("distance Partial Least Squares"), [Bush, 1993] disponível no Sybyl 6.5.

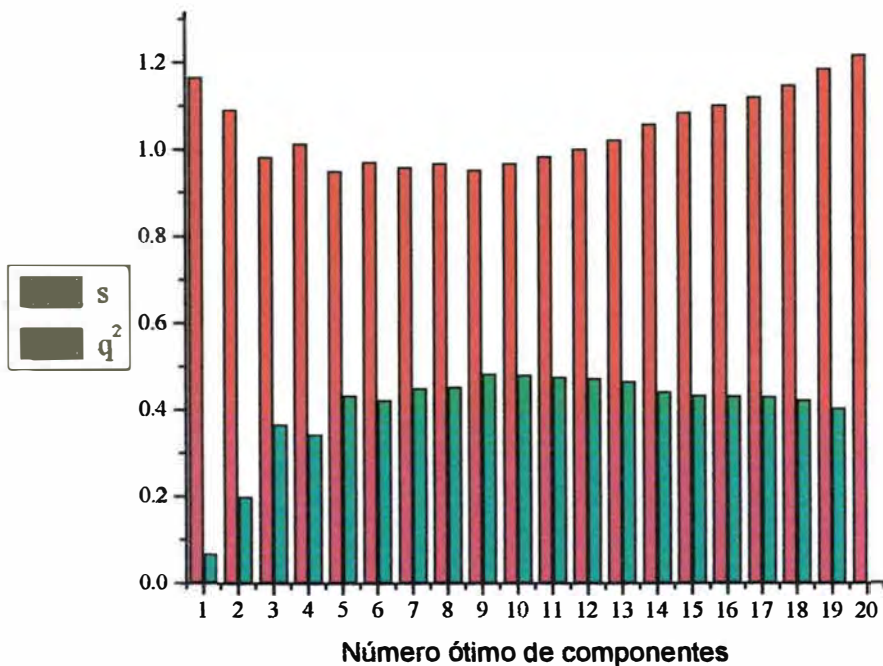


Figura 62 – Diagrama para a escolha do número ótimo de componentes para o modelo 1.

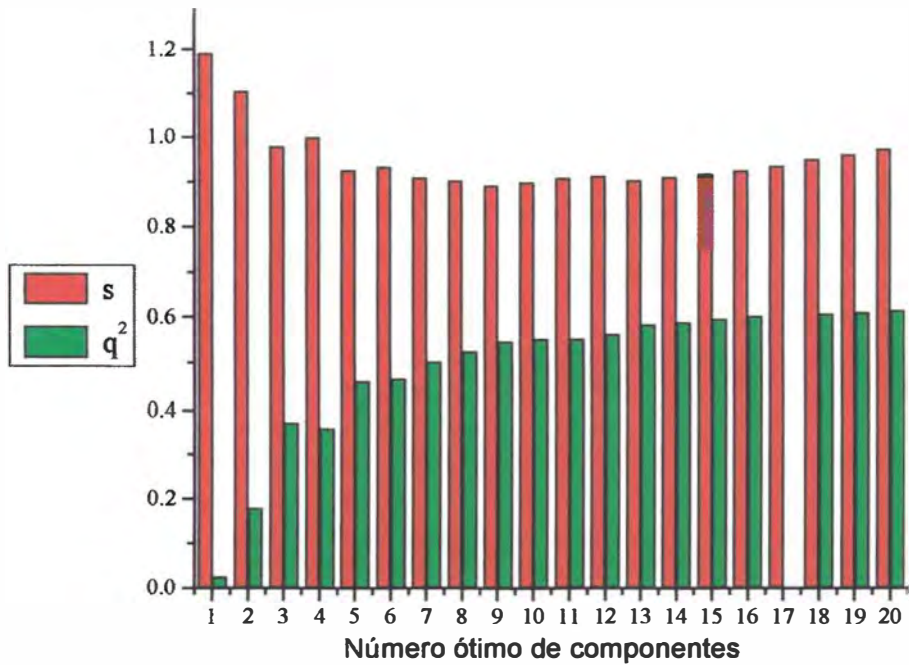


Figura 63 – Diagrama para a escolha do número ótimo de componentes para o modelo 3.

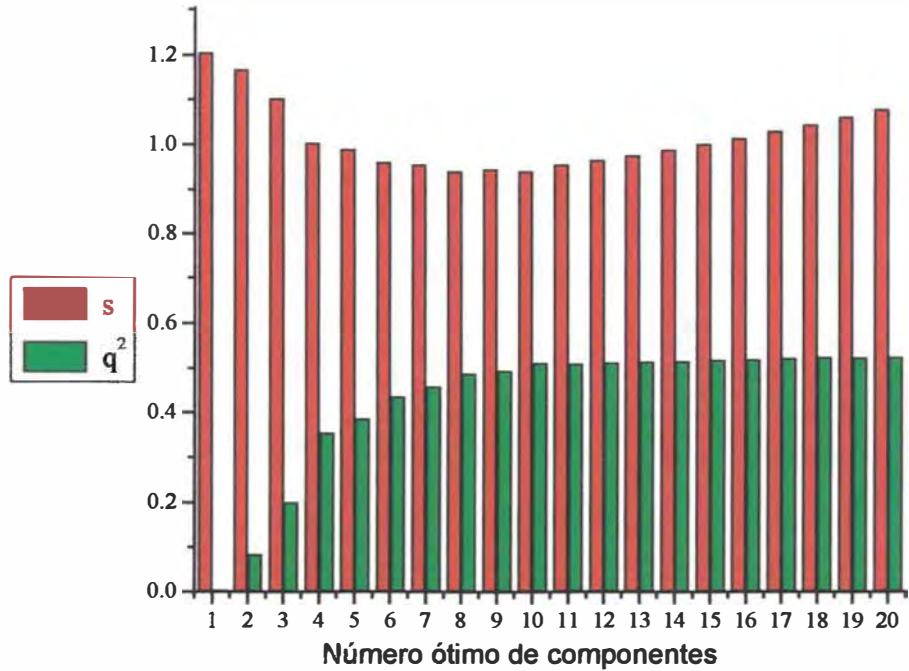


Figura 64 – Diagrama para a escolha do número ótimo de componentes para o modelo 20.

A figura 62 indica claramente que o número ótimo de componentes para o Modelo 1 é 9. O mesmo não ocorre quando o espaçamento de grade é 1,0 Å (Modelo 3), onde poderíamos escolher um número ótimo que proporciona correlações de validação cruzada superiores, sem alterar significativamente os desvios padrão de predição (s). Por outro lado, um número ótimo de componentes muito alto (no caso igual a 20) produziria mapas de contorno muito complexos e difíceis de serem analisados. Desta forma, o critério deve garantir o desenvolvimento de bons modelos CoMFA, tanto do ponto de vista da validação estatística (boa capacidade preditiva), como da obtenção de mapas de contorno que possam fornecer informações qualitativas. No caso do modelo 20 (tabela 49), desenvolvido com cargas ESP/AM1, o número ótimo de componentes é 10 (figura 64).

A tabela 49 apresenta vários modelos CoMFA, onde se avaliou a variação de átomos de prova e a utilização do campo hidrofóbico HINT, com o emprego das cargas ESP/AM1 (tabela 49). Pode-se verificar que o carbono sp^3 é o melhor átomo de prova e que o campo hidrofóbico HINT não aprimora significativamente os resultados de validação estatística destes modelos.

Tabela 49 - Análises CoMFA da série de 49 NNRTI para a avaliação de átomos de prova e campo hidrofóbico com cargas ESP/AM1 e $\alpha = 0,05$.

Átomo de prova	Carbono sp ³ (carga +1)					
	CoMFA			CoMFA / HINTCoMFA		
Indentificação	Modelo 18	Modelo 19	Modelo 20	Modelo 21	Modelo 22	Modelo 23
Espaçam. de grade	2,0	1,5	1,0	2,0	1,5	1,0
Nº ótimo de comp.	10	10	10	11	14	11
q ²	0,436	0,386	0,518	0,463	0,384	0,514
r ²	0,986	0,999	0,996	0,989	0,996	0,993
s	1,01	1,054	0,943	0,999	1,116	0,950
SD	0,160	0,044	0,088	0,143	0,086	0,111
F	264,05	2381,91	881,42	303,29	606,42	492,79
Contribuição						
estérica	0,486	0,506	0,499	0,295	0,306	0,270
eletrostática	0,514	0,494	0,501	0,351	0,298	0,359
hidrofóbica	-	-	-	0,354	0,396	0,371
Átomo de prova	Oxigênio sp ³ (carga -2)					
	CoMFA			CoMFA / HINTCoMFA		
Indentificação	Modelo 24	Modelo 25	Modelo 26	Modelo 27	Modelo 28	Modelo 29
Espaçam, de grade	2,0	1,5	1,0	2,0	1,5	1,0
Nº ótimo de comp.	8	10	10	16	5	17
q ²	0,331	0,345	0,460	0,419	0,354	0,436
r ²	0,977	0,994	0,995	0,998	0,901	0,999
s	1,072	1,089	0,988	1,117	1,018	1,112
SD	0,198	0,103	0,098	0,063	0,398	0,043
F	213,27	650,27	709,79	1067,07	78,1	2176,16
Contribuição						
estérica	0,481	0,513	0,490	0,294	0,338	0,293
eletrostática	0,519	0,487	0,510	0,398	0,312	0,339
hidrofóbica	-	-	-	0,309	0,350	0,369
Átomo de prova	Hidrogênio (carga +1)					
	CoMFA		CoMFA / HINTCoMFA			
Indentificação	Modelo 28	Modelo 29	Modelo 30		Modelo 31	
Espaçam, de grade	2,0	1,5	2,0		1,5	
Nº ótimo de comp.	8	10	5		5	
q ²	0,354	0,345	0,398		0,400	
r ²	0,977	0,994	0,910		0,904	
s	1,053	1,089	0,981		0,985	
SD	0,197	0,106	0,379		0,392	
F	215,59	603,91	87,26		80,95	
Contribuição						
estérica	0,464	0,478	0,331		0,343	
eletrostática	0,536	0,522	0,305		0,328	
hidrofóbica	-	-	0,331		0,329	

Após este estudo dos parâmetros de alinhamento e otimização estatística, observou-se o comportamento dos resultados estatísticos, com a exclusão de uma das seis séries de NNRTI do modelo CoMFA. Este procedimento visa, além de detectar possíveis “outliers”, verificar qual destas séries mais contribui com o modelo proposto, para a posterior avaliação dos campos moleculares tridimensionais obtidos.

A tabela 50 a seguir apresenta algumas análises realizadas com este critério. A coluna da esquerda especifica a série excluída do modelo inicial, ou especifica a análise CoMFA realizada só com as moléculas de TIBO. Em todos os casos foram utilizados $W_s = 10$, $W_e = 1$, $\alpha = 0,1$ e cargas ZDO/AM1. O átomo de prova usado foi carbono sp^3 . Além disto, verificou-se a influencia da variação de alguns espaçamentos da grade.

Tabela 50 – Análises CoMFA efetuadas com a exclusão de algumas classes de NNRTI para a verificação de outliers e variação no espaçamento de grade.

Séries ausentes do CoMFA	q^2	r^2	SD	F	n	Grade (Å)
Nevirapina	0,362	0,922	0,344	81,06	6	2
Nevirapina	0,472	0,991	0,135	225,68	15	1
HEPT	0,306	0,830	0,434	90,00	5	2
α -apa	0,386	0,891	0,390	70,57	5	1
Modelo só com TIBO	0,605	0,965	0,310	67,15	5	2
Modelo só com TIBO	0,605	0,974	0,279	70,03	6	1

Esta avaliação indicou primeiramente que todas as séries de compostos são importantes para o modelo, sendo que a série de TIBO forma uma espécie de “base”, uma vez que apenas as dezoito moléculas desta classe permitem a obtenção de bons valores de validação estatística para as análises efetuadas. Esta observação pode ainda ser importante para a sugestão de modificações moleculares na TIBO visando a melhoria da atividade pela otimização das

interações com os aminoácidos do sítio de interação com a RT. Além disso, a detecção de “outliers” poderá servir para incrementar o poder de predição do modelo CoMFA dos NNRTI.

A melhor correlação de predição cruzada (q^2) foi de 0,59 para o modelo obtido com cargas ZDO/AM1, com espaçamento de grade de 1,0 Å. Este modelo foi escolhido para testes de predição dos índices de atividade que são apresentados adiante. Outro resultado interessante foi que os números ótimos de componentes das análises CoMFA [Kubiny, 1998] foram maiores que aqueles geralmente encontrados na literatura [Kubinyi, Folkers e Martin, 1998]. Isto deve indicar o maior nível de complexidade matemática deste modelo com seis classes estruturais distintas. Em alguns casos a influência de uma classe de substâncias para a sugestão de uma modificação em outra pode ser verificada, de acordo com os campos gerados.

3.3.3 - Visualização e análise de alguns diagramas de campos moleculares (mapas de contorno) dos modelos CoMFA desenvolvidos

As figuras 65 e 66 apresentam a análise dos resultados CoMFA de acordo com os mapas de contorno dos campos moleculares gerados a partir dos alinhamentos com cargas ESP/AM1 e ZDO/AM1.

Os planos de contorno dos campos estéricos e eletrostáticos são apresentados. Os poliedros verdes (80% da contribuição) representam as regiões aonde a presença de grupos substituintes pode aumentar a atividade e os poliedros amarelos (20% da contribuição) indicam as áreas aonde estes serão desfavoráveis. As áreas favoráveis à presença de átomos ou grupos com cargas positivas estão indicadas pelos poliedros azuis (80% da contribuição), enquanto as áreas favoráveis à presença de átomos ou grupos com cargas negativas estão indicadas pelos poliedros vermelhos (20% da contribuição).

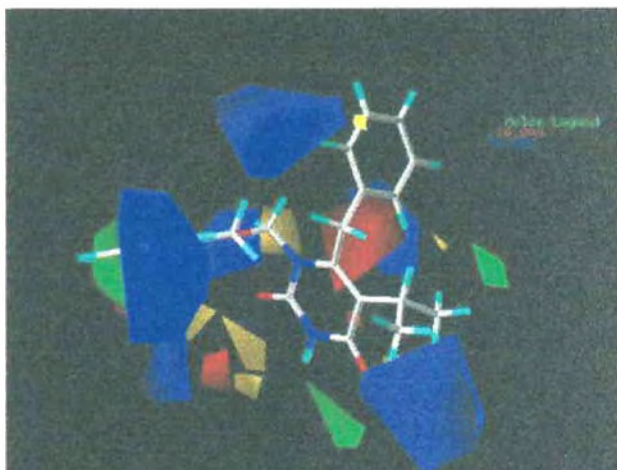


Figura 65 - CoMFA obtido a partir de uma alinhamento SEAL, utilizando-se cargas ESP/AM1. A molécula HEPT3 está indicada como referência.

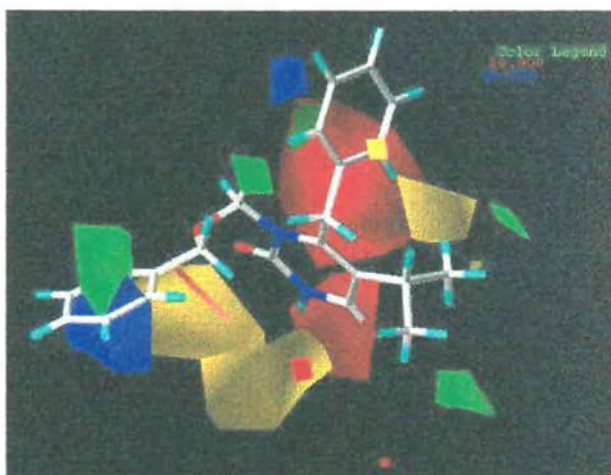


Figura 66 - CoMFA obtido a partir de uma alinhamento SEAL, utilizando-se cargas ZDO/AM1. A molécula HEPT3 é indicada como referência.

Estas duas figuras permitem a comparação dos campos moleculares gerados com as mesmas condições de análise e diferentes cargas atômicas parciais. A molécula HEPT3 foi escolhida para ser utilizada como referência.

Em primeiro lugar pode-se notar uma melhor visualização e composição do campo eletrostático gerado a partir das cargas ESP/AM1, com poliedros mais bem definidos. Como consequência desta contribuição mais significativa, o campo estérico obtido com este modelo é um pouco menor que aquele do modelo que utiliza cargas ZDO/AM1 (figura 66). A quantidade de poliedros e as suas

respectivas posições relativas são bastante semelhantes. Com isto, pode-se dizer que a escolha do conjunto de cargas é arbitrária. As cargas ESP/AM1 garantem uma boa visualização dos campos eletrostáticos. Por outro lado, as cargas ZDO/AM1 forneceram uma ótima visualização dos campos estéricos e bons resultados de validação estatística, como pode ser observado na seção anterior. Este fato nos levou a continuar esta discussão, explorando os modelos CoMFA gerados com as cargas ZDO/AM1.

Em seguida, analisamos os modelos apresentados na tabela 45, enfocando os diferentes espaçamentos de grade utilizados. A tabela 45 mostra que a complexidade aumenta para menores espaçamentos de grade, pois o número ótimo de componentes aumenta. Este fato, além dos melhores valores de validação obtidos com o espaçamento de grade menor, indica que é interessante utilizarmos um espaçamento de grade pequeno, desde que o número ótimo de componentes não seja muito grande. Este resultado pode ser melhor compreendido ao observar a Figura 67.

Pode-se notar os campos moleculares mais complexos para espaçamentos de grade iguais a $1,0\text{\AA}$ e $1,5\text{\AA}$. Este fato indica que o número ótimo de componentes utilizados, apesar de serem bem maiores que a maioria dos modelos CoMFA disponíveis na literatura, [Martin, 1998] não são decisivos para a qualidade dos mapas de contorno, ao contrário dos espaçamentos de grade. Este resultado pode ser confirmado observando-se novamente a tabela 49 e Figura 65 que apresentam, os modelos e os mapas de contorno desenvolvidos com cargas ESP/AM1, com espaçamento de grade $2,0\text{\AA}$ e número ótimo de componentes igual a 10. Os poliedros são menores e mais bem definidos para este espaçamento de grade apesar do número ótimo de componentes ser alto. Isto também sugere que devemos ter um equilíbrio entre o espaçamento da grade e o número ótimo de componentes para a obtenção de bons resultados, como já foi discutido em alguns artigos de revisão recentes da metodologia [Martin, 1998; Kubinyi, 1993].

Em seguida o modelo 1 apresentado na tabela 45 ($q^2= 0,52$) foi escolhido para avaliar as contribuições estéricas e eletrostáticas, utilizando uma molécula de cada série de NNRTI estudada com referência. Este modelo apresentou um bom resultado de validação estatística e mapas de contorno bem definidos, podendo ser útil para analisar diferentes substituições nestas moléculas, sugeridas pelos campos.

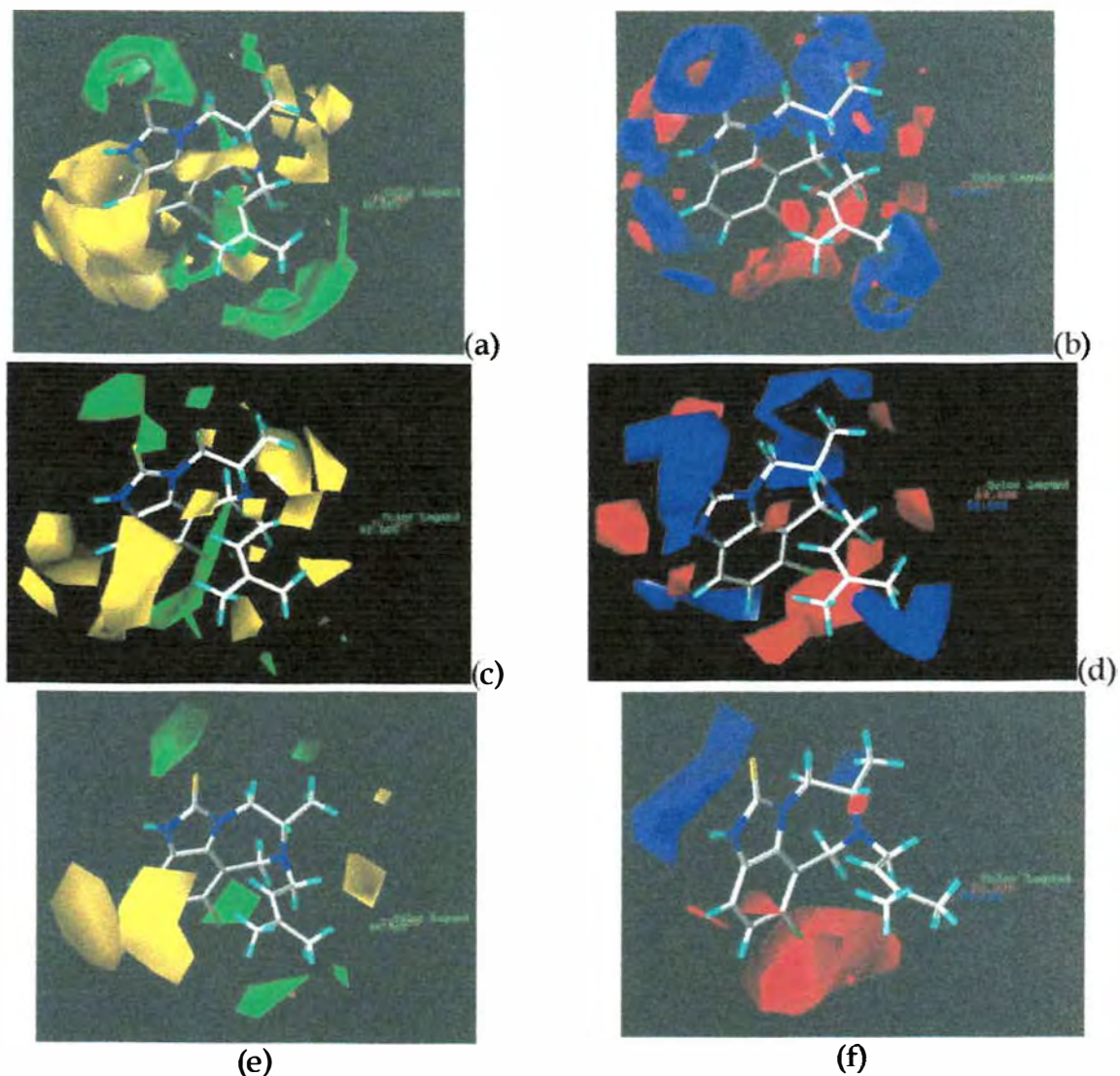


Figura 67 - Análise do número de componentes e espaçamentos de grade utilizados nas análises CoMFA de NNRTI apresentados na tabela 45. (a) e (b) grade = 1,0; (c) e (d) grade = 1,5 e (e) e (f) grade = 2,0 Å.

3.3.4 - Análise dos mapas de contorno gerados pelo melhor modelo

A similaridade molecular dos NNRTI pode ser evidenciada, de acordo com os campos moleculares do modelo CoMFA proposto e pode ser revista de acordo com as regiões tridimensionais apresentadas.

Esta forma gráfica de apresentação de resultados enfatiza a interatividade do estudo efetuado. Em outras palavras, se uma molécula de outra classe de NNRTI for colocada como referência, uma nova análise pode ser obtida e os conceitos de similaridade entre estas seis classes de compostos, ilustrados por mapas de contorno de seus campos moleculares, podem ser úteis para o entendimento das interações entre os NNRTI e a RT. Recentemente, Hannongbua e colaboradores desenvolveram modelos CoMFA para TIBO e sobrepuseram a estrutura da RT com os mapas de contorno de seu melhor modelo [Hannongbua et al., 1999]. O resultado destaca a contribuição dos campos eletrostáticos para as interações com a RT. Além disto os mapas que estes autores obtiveram são bem semelhantes aos obtidos neste trabalho, enfatizando a maior contribuição da família da TIBO para a determinação destes campos.

Dando seqüência a este método de análise, as estruturas de uma molécula de cada classe de NNRTI, são apresentadas nas figuras seguintes. A figura 68 apresenta os mapas de contorno gerados pelo modelo CoMFA em discussão, com uma molécula da família das α -APA colocada como referência da análise.

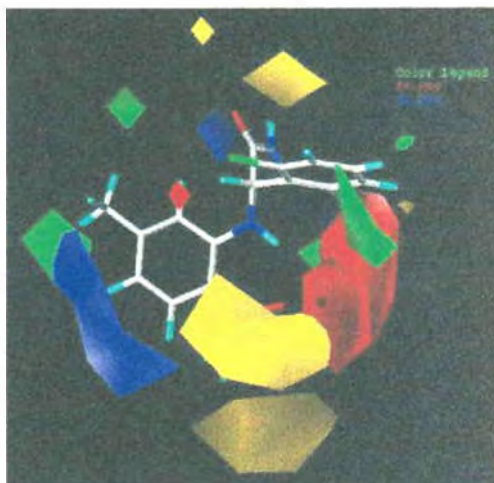


Figura 68 - Mapas de contorno dos campos moleculares utilizando a molécula AAPA1 como referencia para a análise.

No caso da família das moléculas α -APA, antes apresentadas pela figura 53 e tabela 39, observamos que os isômeros “+” apresentam maior atividade. Esta estereo-química inverte os substituintes R_1 e R_2 no espaço tridimensional e os mapas de contorno indicam carga negativa favorável para R_1 (vermelho, figura 68) e positiva para R_2 . O substituinte metila é desejável como substituinte R_2 , de acordo com o efeito estérico caracterizado pelo poliedro verde. O substituinte NO_2 se mostra melhor que COCH_3 , quando R_1 é caracterizado de acordo com o menor efeito estérico indicado pelo poliedro amarelo, além de possuir carga mais negativa, como já comentado. Além disso, os poliedros azuis indicam que um grupo substituinte de carga mais positiva em R_1 ou em posição vizinha a este, pode aumentar a atividade biológica desta classe. Uma provável ligação de hidrogênio entre R_1 (carbonila ou NO_2) com o grupo amina da junção entre os anéis também pode ser caracterizada com os poliedros vermelhos que indicam as cargas negativas dos átomos eletronegativos envolvidos, em toda a extensão deste poliedro.

Na figura 69 uma molécula da classe das DABO é utilizada como referência (figura 53, tabela 41). Efeitos do substituinte R_1 podem ser caracterizados por uma região com um pequeno poliedro verde e outro azul, indicando que um substituinte com pequeno efeito estérico e carga positiva incrementam a atividade

dos compostos. Este fato fica evidenciado pelo fato dos substituintes metila das moléculas DABO3 e DABO5 incrementarem a atividade. R_6 pode ser caracterizado por pequenos poliedros verdes. Por outro lado, o modelo sugere que a atividade ótima é obtida quando o anel benzênico não possua substituintes (poliedros amarelos), ou seja, é preferível que R_2 , R_3 e R_4 sejam hidrogênicos. Além disso, o modelo sugere um substituinte maior e com carga positiva em R_5 , de acordo com os poliedros verde e azul localizados nesta região. Como nenhuma das quatorze moléculas de DABO deste modelo não possuem esta característica, estes poliedros devem ter sido gerados pela contribuição de outra classe para o modelo, o que pode ser encarado como uma sugestão de outra classe de NNRTI para modificações que aprimorem a interação de DABO com a RT.

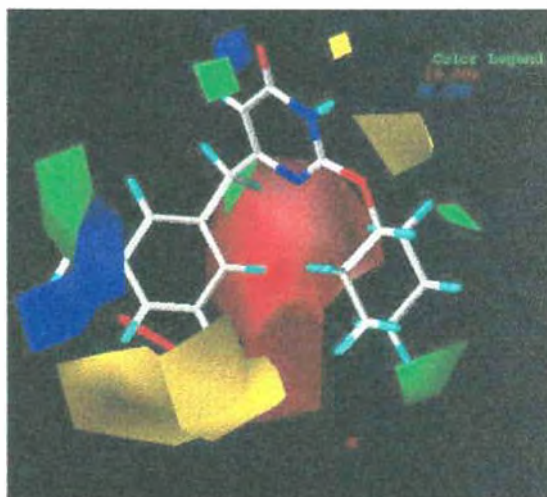


Figura 69 – Mapas de contorno dos campos moleculares utilizando a molécula DABO1 como referencia para a análise.

As moléculas da família da TIBO representam a maior contribuição para este modelo (18 estruturas) e as suas características SAR ficam muito bem evidenciadas pelos mapas de contorno (figura 70). O substituinte 2-metil-3-butenil gera um composto bastante potente [Kukla, et al., 1991A, 1991B] que pode ser caracterizado pelos pequenos poliedros verdes na região de sua extremidade, além

de pequenos poliedros amarelos acima deste, que caracterizam a conformação tipo borboleta de TIBO. A carga negativa do substituinte X é fundamental para as moléculas de TIBO mais ativas e é caracterizada neste modelo por um poliedro vermelho nesta região. Isto está de acordo com os estudos SAR [Kukla, et al., 1991A, 1991B] desta classe, o que é comprovado com as moléculas TIBO2, TIBO3 e TIBO5, com alta atividade. A substituição de enxofre por oxigênio em R₁ torna a molécula mais ativa e pode ser verificado pelos poliedros verde e azul nesta região. O substituinte metila no carbono 5 também favorece a atividade da TIBO, de acordo com um pequeno poliedro azul nesta região.



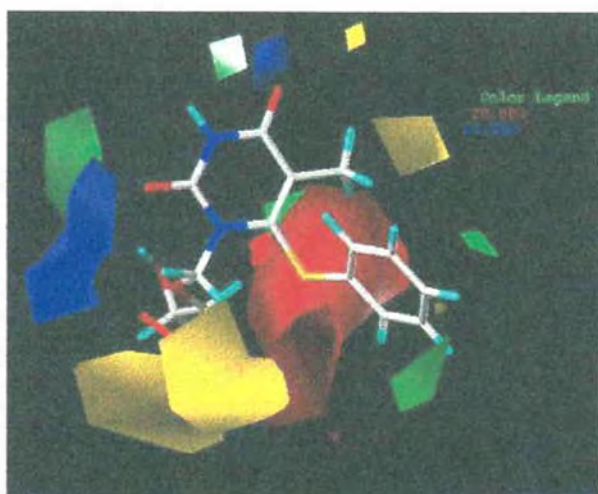
Figura 70 – Mapas de contorno dos campos moleculares utilizando a molécula TIBO3 como referencia para a análise.

No caso das piridinonas (figura 71), o modelo CoMFA indica que o nitrogênio como átomo X (figura 54) é essencial para a atividade desta classe (poliedro vermelho). As variações de Y, Z e substituintes em 4' e 5' devem incluir átomos de carga negativa, como sugere o poliedro vermelho grande, estando de acordo com estudos SAR anteriores [Saari et al., 1991 e 1992, Hoffman et al., 1992, Wai, et al., 1993]. Além disto podemos ressaltar que a conformação tipo borboleta ficou delimitada pelos poliedros amarelos deste modelo, sendo esta uma característica considerada como padrão farmacofórico dos NNRTI [Schafer et al,

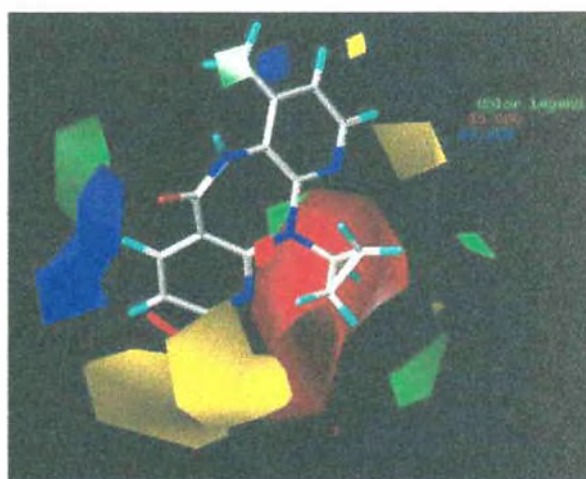
1993, Gussio et al. 1996, Kroeger-Smith et al., 1995, Smith-Jr. et. AL., 1998 Mestres et al., 1999].



Figura 71 - Mapas de contorno dos campos moleculares utilizando a molécula PYR1 como referencia para a análise.



(a)



(b)

Figura 72 - Mapas de contorno dos campos moleculares utilizando as moléculas HEPT1 (a) e Nevirapina (b) como referência.

As moléculas de HEPT e nevirapina foram colocadas como referência na figura 76. As contribuições destas classes são pouco expressivas para este modelo CoMFA pois o mesmo possui um número limitado de moléculas destas classes. Isto foi devido ao fato de não se encontrar valores experimentais dos índices de atividade (IC_{50}) homogêneos com aqueles que delimitaram a série de moléculas deste estudo (vide métodos). Apesar disto, se estas moléculas forem excluídas do

modelo, os valores estatísticos de validação pioram, indicando que os mapas de contorno gerados apresentam contribuições destas espécies. Desta forma, os poliedros dos mapas de contorno podem ser úteis para a sugestão de modificações moleculares nestas classes, de acordo com os campos moleculares gerados pelos diferentes NNRTI deste estudo.

De uma forma geral, a conformação tipo borboleta dos NNRTI é bem caracterizada pelos mapas de contorno dos campos estéricos (poliedros verdes e amarelos) e várias substituições podem ser sugeridas, de acordo com a similaridade dos campos eletrostáticos (poliedros azuis e vermelhos), nas duas partes aromáticas das moléculas (asas da borboleta). A característica de maior similaridade entre estes NNRTI se dá por um substituinte volumoso de um lado da molécula, que pode ser caracterizado por pequenos poliedros verdes na região do substituinte 3-metil-2-butenil de TIBO, ou ciclohexil de DABO1 ou grupo benzoxazol de PYR1, grupo benzil substituinte de HEPT, os substituintes R1 e R2 de α -APA ou ainda o grupo ciclopropil da nevirapina. Além disto a presença de uma região aromática, oposta a outra região com grupos de carga positiva podem ser observadas para cada classe, sendo caracterizadas pelos maiores poliedros azuis e vermelhos dos mapas de contorno deste modelo CoMFA.

3.3.5 - Validação e discussão do melhor modelo CoMFA obtido, de acordo com predição dos índices de atividade de um grupo teste de moléculas

Como forma de validar o modelo QSAR-3D de NNRTI desenvolvido com a metodologia CoMFA que apresentou o melhor conjunto de resultados de validação estatística (Modelo 3, tabela 45), foram selecionadas dez moléculas da família da TIBO a partir da literatura [Breslin, 1995], para compor um grupo de testes. Estas moléculas são apresentadas pela figura 73 e tabela 51.

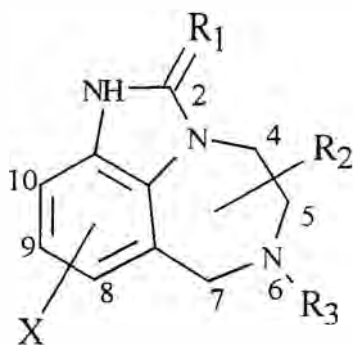


Figura 73 - Estrutura da família da TIBO utilizadas no grupo de teste.

Tabela 51 - Moléculas da família da TIBO selecionadas para o grupo de testes.

Identificação	-Log (IC ₅₀)	-Log (IC ₅₀)	X	R ₁	R ₂	R ₃
	experimental	predito				
TIBOTEST1	7,9	7,337	8-Cl	S	H	3-metil,2-butenil
TIBOTEST2	7,47	6,796	9-Cl	S	H	3-metil,2-butenil
TIBOTEST3	6,075	4,493	H	O	4-CH ₃	2-butenil
TIBOTEST4	6,74	6,799	9-Cl	O	7-CH ₃	3-metil,2-butenil
TIBOTEST5	7,46	7,108	H	S	7-CH ₃	3-metil,2-butenil
TIBOTEST6	7,41	7,638	9-Cl	S	7-CH ₃	3-metil,2-butenil
TIBOTEST7	7,38	7,377	H	S	5,7-diCH ₃ trans	3-metil,2-butenil
TIBOTEST8	7,16	5,939	H	S	5,7-diCH ₃ cis	3-metil,2-butenil
TIBOTEST9	4,4	4,224	H	O	5-CH ₃	n-propil
TIBTEST10	5,83	5,777	H	S	5-CH ₃	n-propil

Estas moléculas foram desenhadas e tiveram as suas geometrias otimizadas com o método AM1 no SYBYL 6.5. Em seguida elas foram sobrepostas de acordo com os seus campos estéricos e eletrostáticos utilizando a metodologia SEAL, exatamente da mesma forma empregada para o desenvolvimento deste modelo CoMFA, ou seja, com as seguintes variáveis de alinhamento: $W_E = 1,0$, $W_S = 10,0$ e $\alpha = 0,1$. O cálculo de predição dos índices de atividade destes compostos foi realizado com a planilha do SYBYL. A correlação é representada pela figura 74. De acordo com este gráfico conseguimos prever as atividades destas moléculas de TIBO com uma correlação linear igual a 0,874, em relação aos valores experimentais. Este valor é bem mais significativo que o q^2 obtido pelo modelo explorado, justificando a sua capacidade de predição.

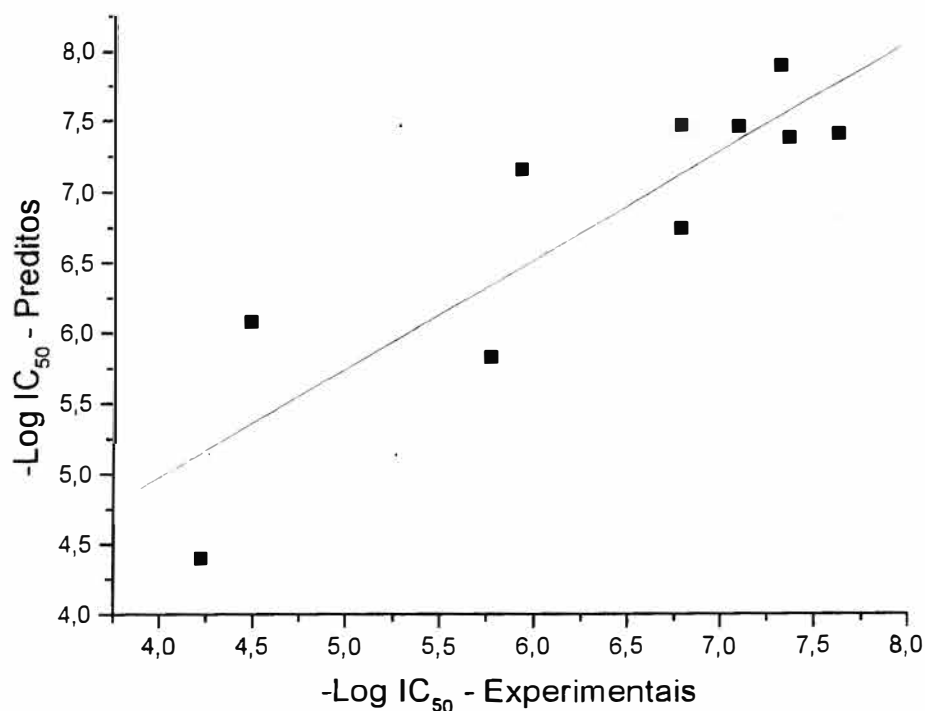


Figura 74 - Correlação linear entre os $-\text{LogIC}_{50}$ experimentais e preditos para o grupo de testes ($Y = 1,9 + 0,77X$; $R = 0,874$; $SD = 0,55$).

Desta forma, as características estéricas e eletrostáticas similares de alguns NNRTI foram correlacionadas com os índices de atividade obtidos experimentalmente, demonstrando a eficiência do modelo CoMFA proposto, no contexto de um amplo projeto racional de fármacos assistido por computador. Neste aspecto, o entendimento das interações moleculares envolvidas entre um ligante e o seu receptor biológico, é de fundamental importância, podendo ser útil, em conjunto com outros resultados disponíveis na literatura, para a sugestão de modificações moleculares, que aprimorem os índices de atividades de uma determinada classe de fármacos, ou mesmo para a proposta de novos NNRTI, uma vez que este tipo de modelo diferencia da maioria dos modelos CoMFA disponíveis na literatura, devido ao fato do mesmo ser derivado de seis classes de compostos estruturalmente distintos, alinhados com a metodologia SEAL.

CAPÍTULO IV

Estudo B3LYP/6-31G(d) de NNRTI:

Uma representação qualitativa da similaridade quântica molecular

4.1 - Introdução

A aplicação de métodos mecânico-quânticos para o estudo de similaridade molecular entre sistemas moleculares complexos tem se tornado uma realidade. [Martin, 1998; Mestres, Rohrer e Maggiora, 1999]

Um exemplo típico pode ser dado pela parte eletrônica do potencial eletrostático molecular (eMEP). Trata-se de um valor derivado da densidade eletrônica e foi primeiramente utilizado por Bonaccorsi et al. em 1970. [Bonaccorsi, Scrocco e Tomasi 1970] O eMEP pode ser avaliado na posição R do espaço tridimensional, $V(R)$, computado sobre uma função da densidade eletrônica de primeira ordem, $\rho(R)$, definida com o uso da Equação 16 como:

$$| \Omega(r) = |r - R|^{-1} \wedge V(R) = \int |r - R|^{-1} \rho(r) dr \quad \text{Eq. 16}$$

Se o sinal da carga eletrônica não for levado em consideração, eMEP age como uma distribuição de probabilidade, com o máximo localizado no “núcleo molecular”, sendo este o ponto de comparação entre os sistemas que se deseja estudar.

O formalismo apresentado por Carbó e colaboradores propõe uma medida da similaridade quântica molecular (MQSM) entre pares de moléculas, por meio de índices de similaridade. [Fradera et al., 1997] O mais antigo e conhecido destes índices é chamado de índice de Carbó, [Carbó, Leyda e Arnau, 1980] dado por:

$$R_{AB} = \frac{\int P_A P_B d\nu}{(\int P_A^2 d\nu)^{1/2} (\int P_B^2 d\nu)^{1/2}} \quad \text{Eq. 17}$$

A similaridade molecular R_{AB} é determinada a partir da comparação entre as propriedades estruturais P_A e P_B . O numerador mede a propriedade das moléculas A e B sobrepostas enquanto o denominador normaliza o resultado. Desta forma o índice varia de 0, quando as moléculas não possuem semelhança alguma, a 1, quando A igual B. Este formalismo tem sido proposto como uma alternativa para o estudo QSAR [Fradera et al., 1997] e representa uma conexão entre química quântica e QSAR, [Carbó-Dorca et al., 2000] embora a maioria das aplicações é para grupos pequenos de moléculas com poucos átomos. [Fradera et al., 1997] Este fato certamente está relacionado com a dificuldade de se realizar cálculos sofisticados para populações consideráveis de moléculas relativamente grandes. Além disto, a medida do índice de Carbó envolve o cálculo de integrais de quatro centros, freqüentemente inviáveis de se calcular sem a utilização de aproximações. [Constans e Carbó, 1995, Mestres et al., 1994] Por outro lado, este tipo de informação estabelece novos padrões de similaridade cuja aplicabilidade em projeto de fármacos é crescente e podem ser tratados também de forma qualitativa. [Mestres, Rohrer e Maggiora, 1998] Desta forma, altos níveis de teoria podem ser utilizados para fornecer subsídios na forma de padrões farmacofóricos de grupos de moléculas distintas e que inibem o mesmo sítio de uma mesma enzima.

A elaboração de um modelo farmacofórico que utilize dados provenientes de cálculos mecânico-quânticos baseados na teoria funcional de densidade (DFT) deve, a princípio proporcionar subsídios qualitativos para o entendimento de relações estrutura-atividade de um grupo de moléculas de NNRTI. A distribuição de densidade eletrônica e sua representação a partir de conjuntos de cargas atômicas parciais, a aromaticidade de anéis, parâmetros de reatividade, energias de solubilidade, orbitais de fronteira (HOMO e LUMO) e ligações de hidrogênio

são algumas propriedades que podem estar relacionadas com a atividade biológica destes compostos e são investigadas neste trabalho.

4.2 - Métodos computacionais

Algumas das moléculas incluídas no estudo CoMFA apresentado no capítulo anterior (Figuras 50 a 55 e Tabelas 39 a 43), foram utilizadas neste trabalho. As geometrias foram otimizadas, utilizando o método B3LYP/6-31G(d) no programa Gaussian 98. As cargas atômicas parciais derivadas do potencial eletrostático, cuja distribuição de pontos foi dada pelo método MK. [Singh e Kollmann, 1984] A análise da função de onda foi realizada pelo método de orbitais naturais de ligação (NBO, natural bond orbitals), [Reed, Curtiss, Weinhold, 1988] calculadas com o método B3LYP/6-31G(d) no programa Gaussian 98.

Não foi possível se concluir a otimização de geometria para todos os quarenta e nove NNRTI incluídos no estudo CoMFA devido as dificuldades inerentes a estes cálculos.

A maioria dos cálculos foi realizada nos computadores de Laboratório de Computação Científica Avançada da USP (LCCA-USP), em computadores IBM SP2, Cray e Dec Alpha. Dois microcomputadores, um Athlon 800MHZ com 768Kb de memória e disco SCSI de 18GB e um Pentium III 500MHZ com 768Kb de memória e disco de 8Gb, implementados com o sistema operacional LINUX também foram utilizados a obtenção dos dados e visualização dos resultados.

O programa Molekel versão 3.04 foi utilizado para a visualização e análise dos orbitais de fronteira das moléculas (HOMO e LUMO). O programa Molden versão 3.6 [Schafteenaar e Noordik, 2000] foi utilizado para a visualização de representações da densidade eletrônica e do potencial eletrostático molecular quântico (MEP).

4.3 - Resultados e discussão

A tabela 52 apresenta algumas informações referentes às moléculas para as quais a otimização de geometria foi bem sucedida. Cada cálculo de otimização de geometria consumiu de quatro a onze dias de CPU nos computadores do LCCA ou nos computadores disponíveis no LAMMOL.

Tabela 52 - Moléculas de NNRTI otimizadas com B3LYP/6-31G(d).

Molécula	Log(1/IC ₅₀)	Fórmula	E (SCF) (Hartree)
AAPA1	8,30	C ₁₇ H ₁₆ Cl ₂ N ₂ O ₂	-1837,81440
AAPA4	5,19	C ₁₆ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O ₂	-1798,47470
AAPA6	5,78	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ N ₃ O ₃	-1850,33285
NEVIRAPINA	7,07	C ₁₅ H ₁₄ N ₄ O ₁	-874,24470
DABO1	5,74	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₂	-959,16064
DABO2	6,00	C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O ₁ S ₁	-1165,38336
DABO3	6,30	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₁ S ₁	-1204,70031
DABO5	6,30	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₁ S ₁	-1242,79235
HEPT2	8,10	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₃	-996,27100
HEPT3	8,22	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₃	-1187,99927
PYR1	7,72	C ₁₆ H ₁₅ Cl ₂ N ₃ O ₂	-1853,84976
TIBO1	4,15	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₁	783,20551
TIBO2	7,47	C ₁₆ H ₂₀ Cl ₁ N ₃ S ₁	-1644,38717
TIBO4	7,36	C ₁₆ H ₂₁ N ₃ S ₁	-1184,79903
TIBO7	7,85	C ₁₇ H ₂₃ N ₃ S ₁	-1224,11420

Pela análise das propriedades estudadas foi possível se verificar alguns aspectos qualitativos de similaridade molecular entre os NNRTI. Estes cálculos devem permitir um entendimento mais aprofundado da estrutura eletrônica destes compostos, e a partir daí se obter um modelo farmacofórico baseado em

propriedades calculadas pelo método B3LYP/6-31G(d). Alguns resultados são apresentados na tabela 53.

Tabela 53 – Resultados selecionados dos cálculos B3LYP/6-31G(d) de NNRTI. Energias em Hartree, momentos de dipolo em Debye.

Molécula	E _{HOMO}	E _{LUMO}	Momento de dipolo
AAPA1	-0,20518	-0,05271	3,2813
AAPA4	-0,19516	-0,03747	3,2604
AAPA6	-0,21232	-0,07579	7,7457
NEVIRAPINA	-0,21309	-0,04866	2,3572
DABO1	-0,22635	-0,02791	4,5653
DABO2	-0,22901	-0,04021	4,4553
DABO3	-0,21983	-0,03801	4,0086
DABO5	-0,21874	-0,03800	3,8439
HEPT2	-0,23281	-0,03754	3,6277
HEPT3	-0,23523	-0,03990	4,8364
PYR1	-0,17935	0,04869	2,7125
TIBO1	-0,20227	-0,00304	2,3446
TIBO2	-0,19769	-0,03033	4,2468
TIBO4	-0,19283	-0,2414	4,5896
TIBO7	-0,19089	-0,02421	5,0062

Como forma de procurar identificar aspectos similares nas informações fornecidas pelos cálculos realizados, alguns recursos gráficos foram utilizados. Inicialmente tentou-se visualizar alguns mapas tridimensionais do MEP para algumas moléculas. Logo se percebeu que a complexidade destas superfícies não traria informações qualitativas seguras, como pode ser conferido pela figura 75 que apresenta o mapa tridimensional do MEP de AAPA1. Nesta figura observa-se que

a única informação segura é a conformação tipo borboleta, já conhecida para estas moléculas. Por isto essas informações não foram utilizadas.

Relembrando que os NNRTI são conhecidos por sua preferência conformacional, [Parreira, Abrahão-Júnior e Galembeck, 2001] ou seja, uma vez que os NNRTI adotam a conformação tipo borboleta para se interagir com a RT, resolveu-se investigar os planos de contorno que correspondem às asas desta borboleta.

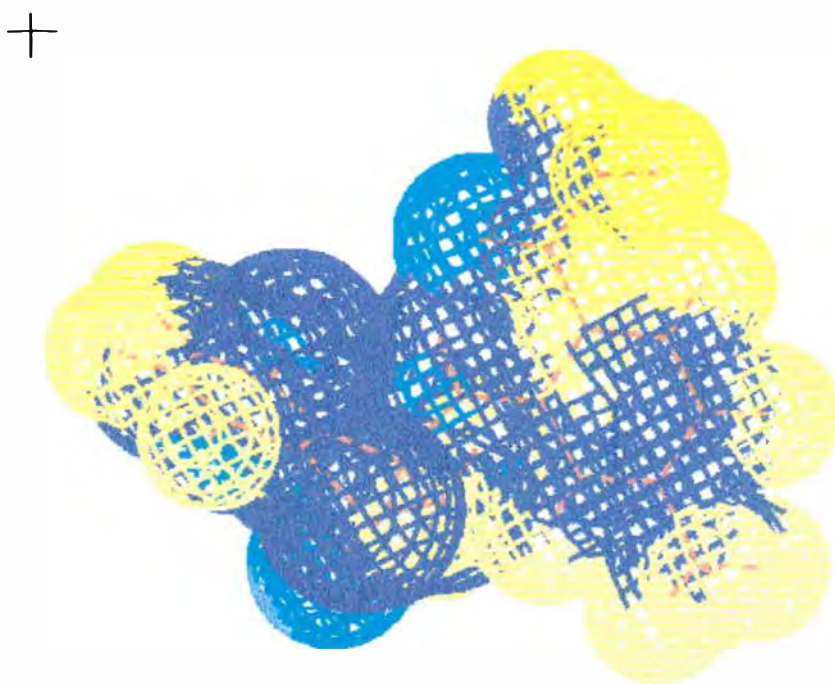


Figura 75 – MEP de AAPA1.

Planos de contorno das superfícies isopotenciais do MEP foram obtidos para duas regiões distintas de cada um dos 15 compostos que tiveram as geometrias otimizadas são apresentados nas figuras 76 a 90. Para isto esta grandeza foi calculada sobre as duas principais regiões planares dos NNRTI, as quais são equivalentes às asas da conformação tipo borboleta dos NNRTI. O primeiro plano

(plano A), foi traçado a partir de três átomos que definem a região planar principal de cada composto, a qual inclui um grupo amida. Por exemplo, o anel benzodiazepínico das TIBO. No caso de moléculas com maior uniformidade ou simetria, ou seja, moléculas com os planos das asas parecidos, o plano A foi traçado em qualquer um dos planos, mas contendo o grupo amida. Por exemplo, um dos anéis aromáticos da nevirapina ou dos planos de uma molécula de α -APA, incluindo o grupo amida localizado na intersecção das asas. O segundo plano, (plano B) foi traçado a partir de três átomos que definem a segunda região planar de cada NNRTI, ou seja, a segunda asa da conformação preferencial. Um esquema funcional para a identificação das regiões das asas formadas especificamente pelas moléculas de piridinonas foi recentemente proposto. [Parreira, Abrahão-Júnior e Galembeck, 2001] Apesar disto, as especificações atribuídas para as moléculas de piridinonas neste trabalho, bem como outros esquemas que discriminam as “asas” dos NNRTI, [Gussio et al., 1996, Mager, 1997] não são adequados para representar estas regiões para todos os tipos de moléculas estudadas nesta tese. Desta forma se preferiu não adotar um esquema gráfico geral de identificação, mas apenas a discriminação geral descrita acima para os planos A e B.

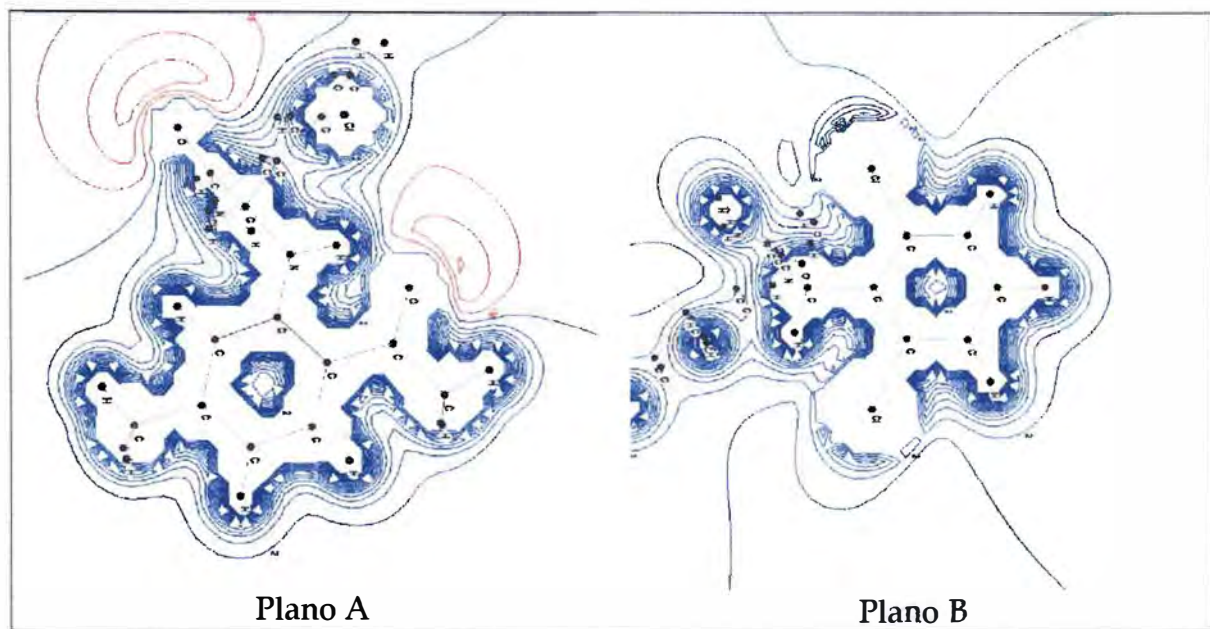


Figura 76 - Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões planares da molécula AAPA1.

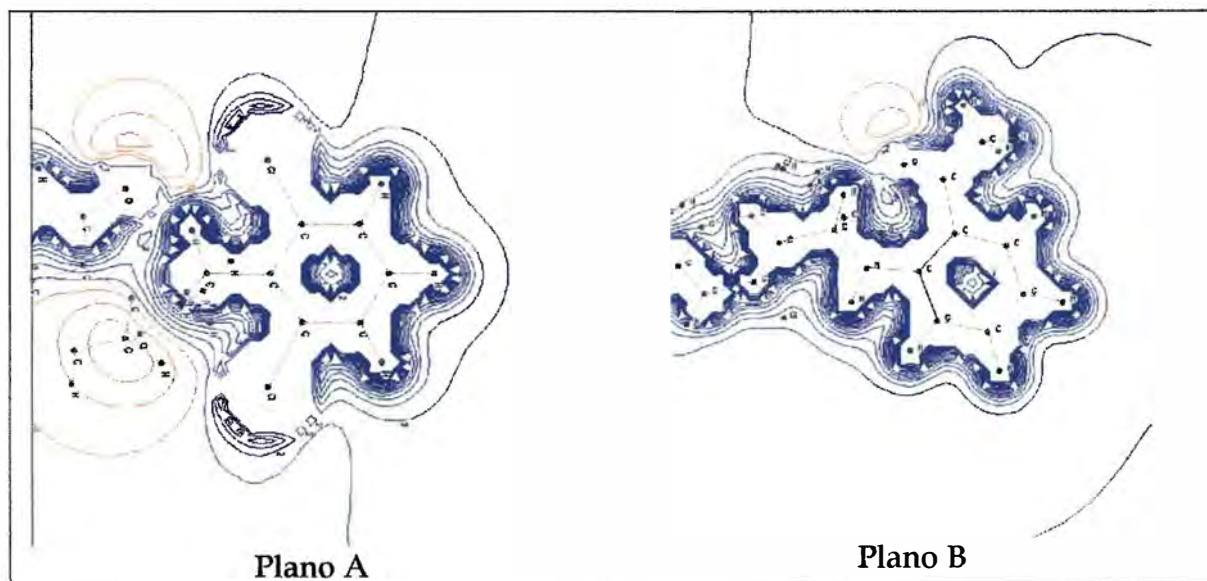


Figura 77 - Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões planares da molécula AAPA4.

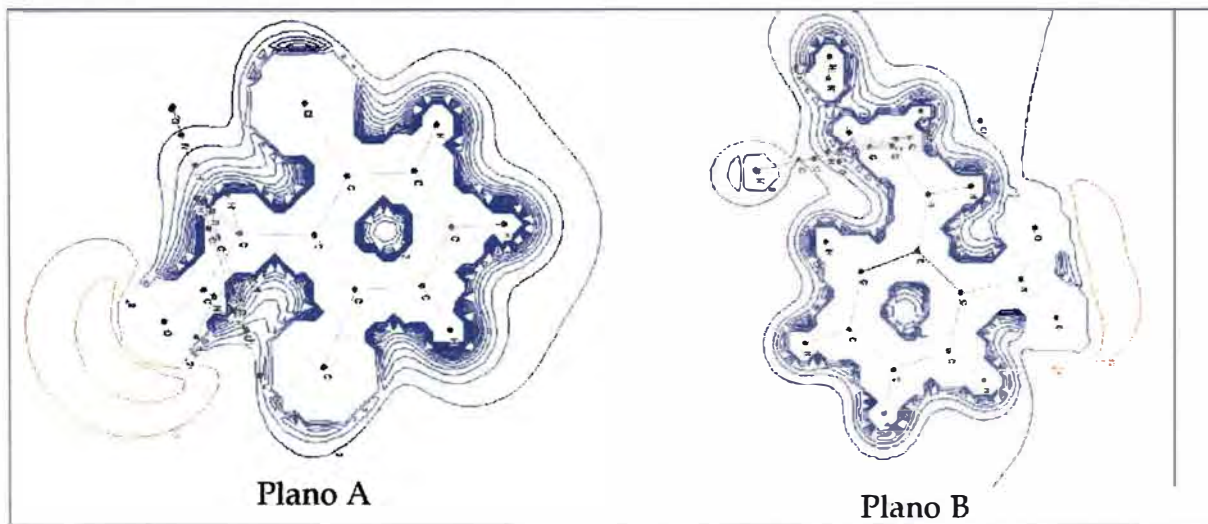


Figura 78 – Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões planares da molécula AAPA6.

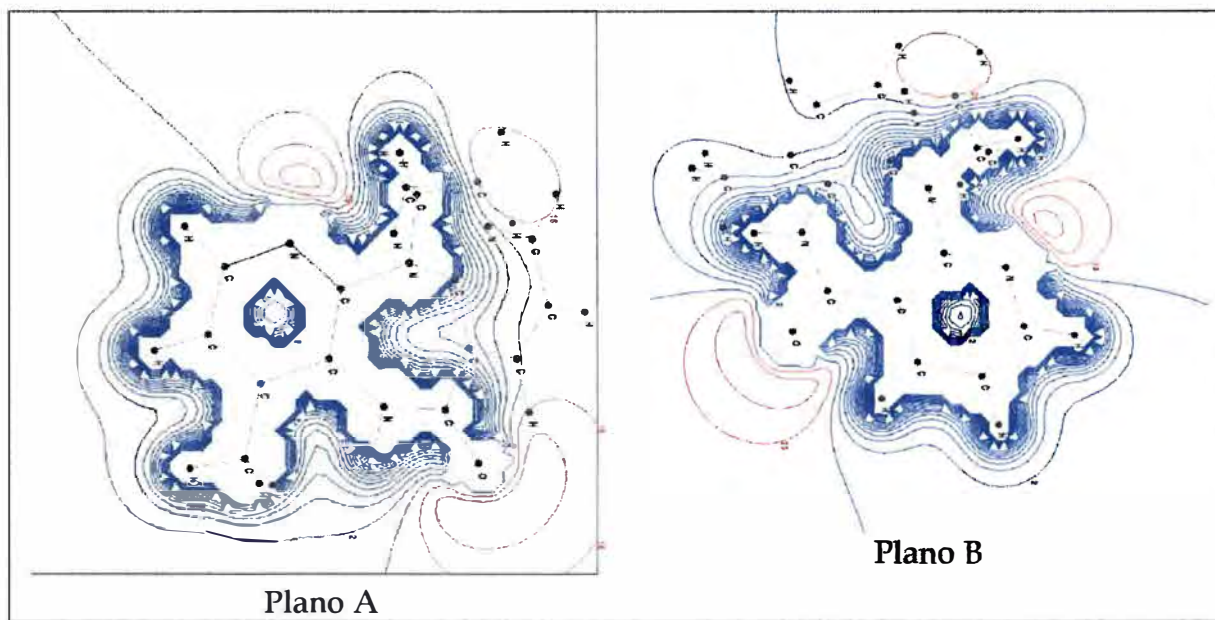


Figura 79 – Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões planares da molécula nevirapina.

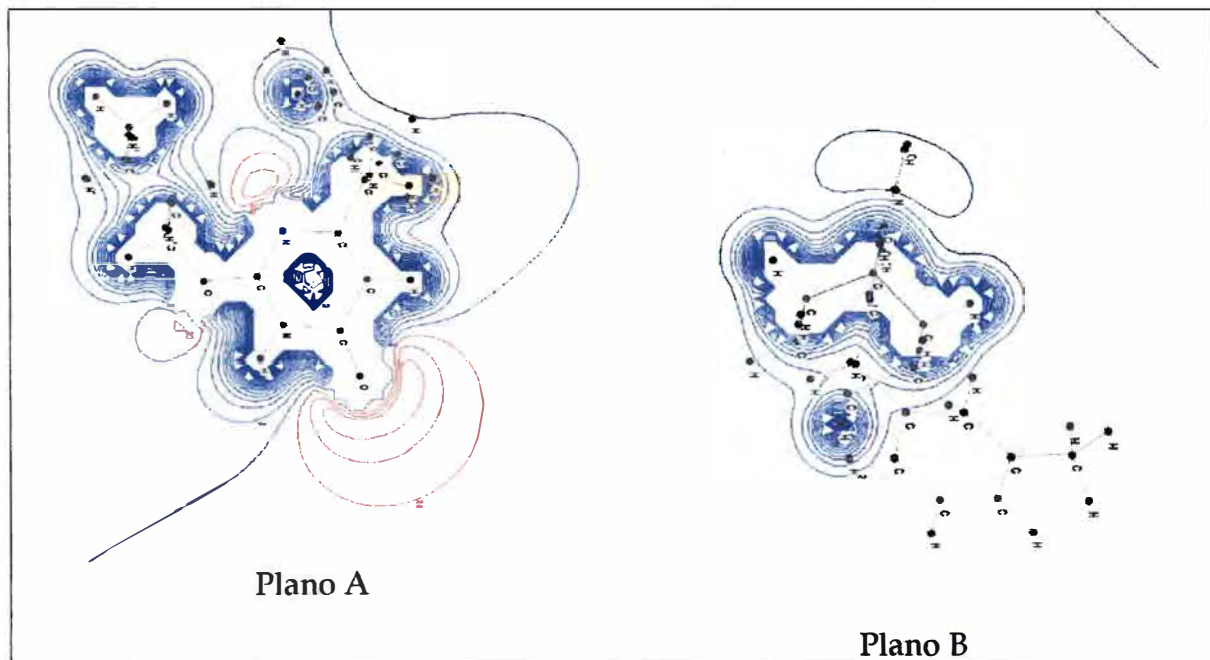


Figura 80 - Mapas de contorno isopotencial do MEP traçados sobre duas regiões planares da molécula DABO1.

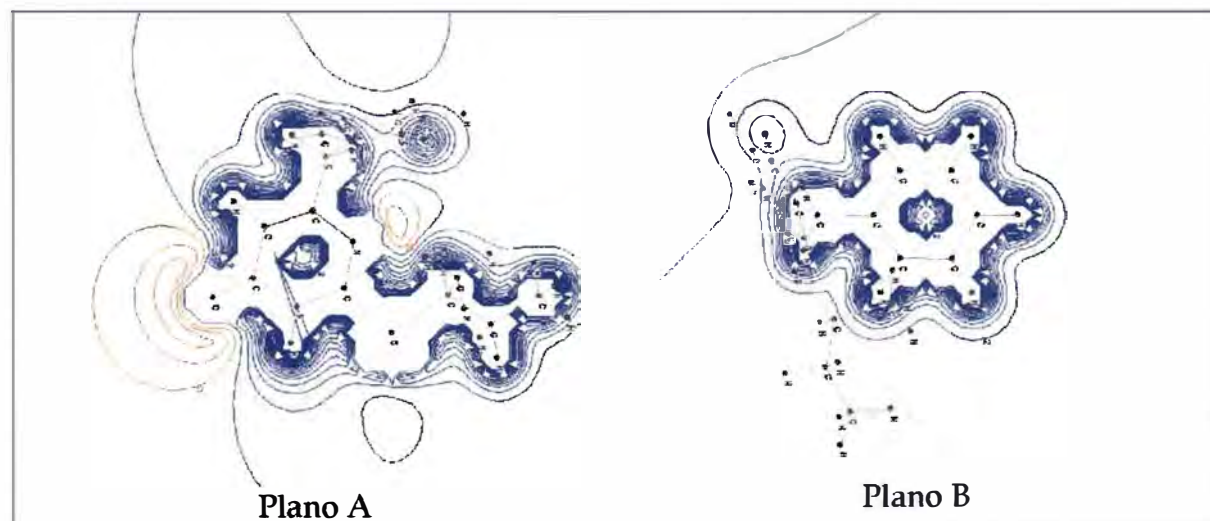


Figura 81 - Mapas de contorno isopotencial do MEP traçados sobre duas regiões planares da molécula DABO2.

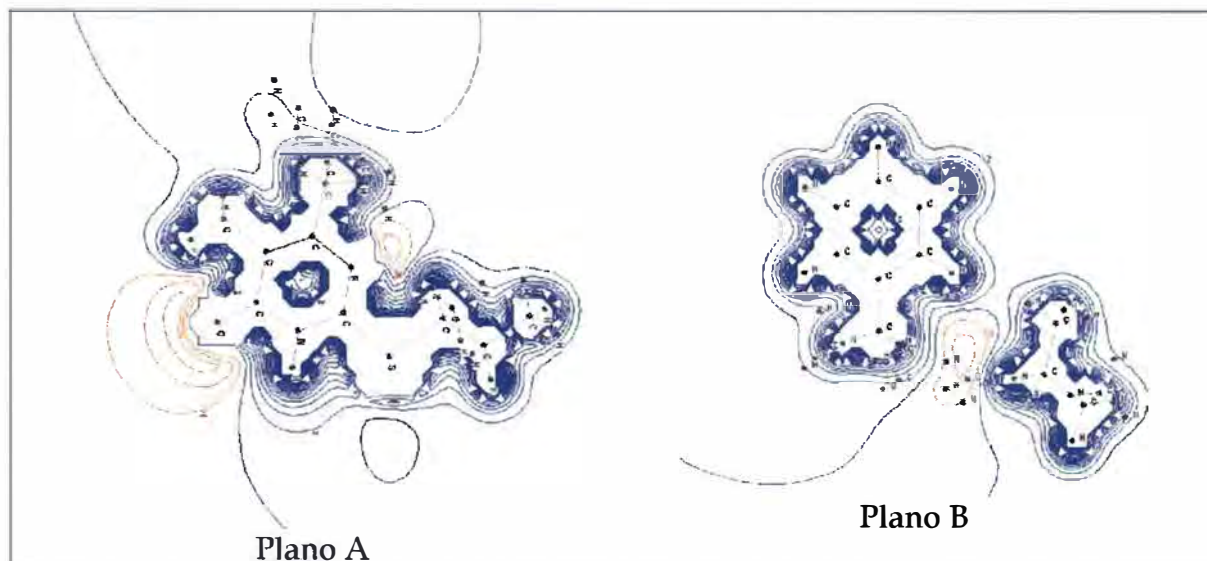


Figura 82 – Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões planares da molécula DABO3.

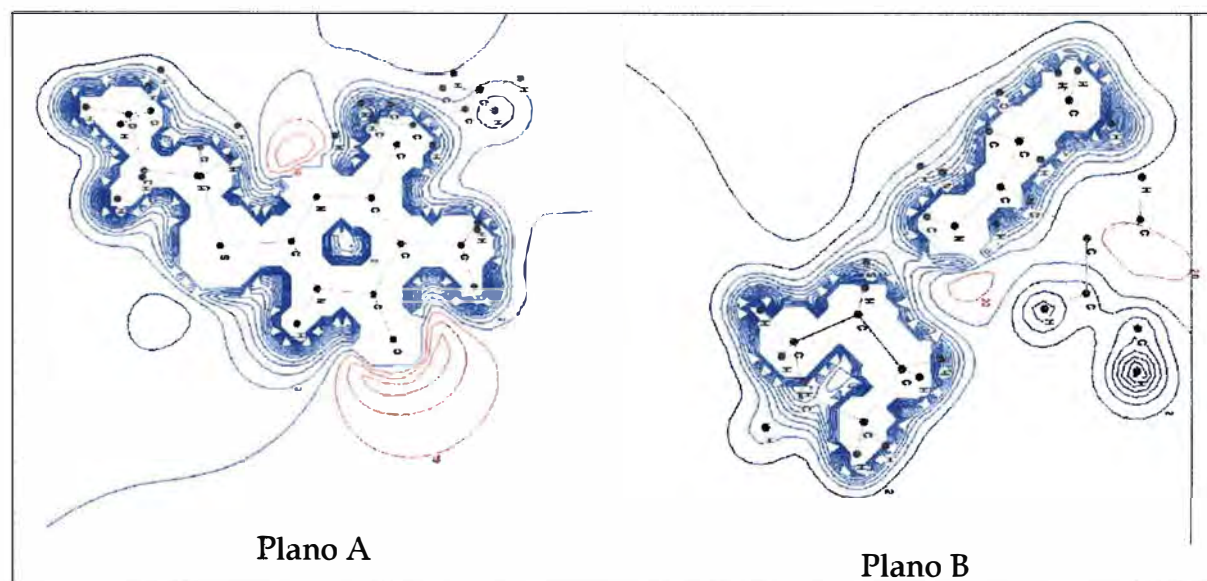


Figura 83 – Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões planares da molécula DABO5.

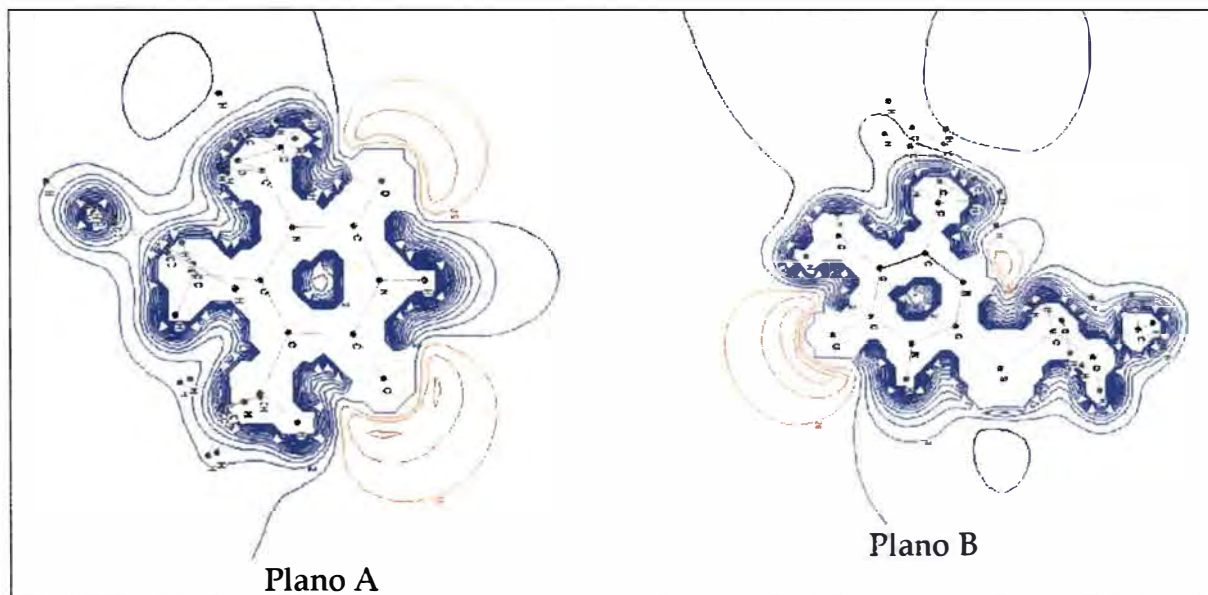


Figura 84 - Mapas de contorno isopotencial do MEP traçados sobre duas regiões planares da molécula HEPT2.

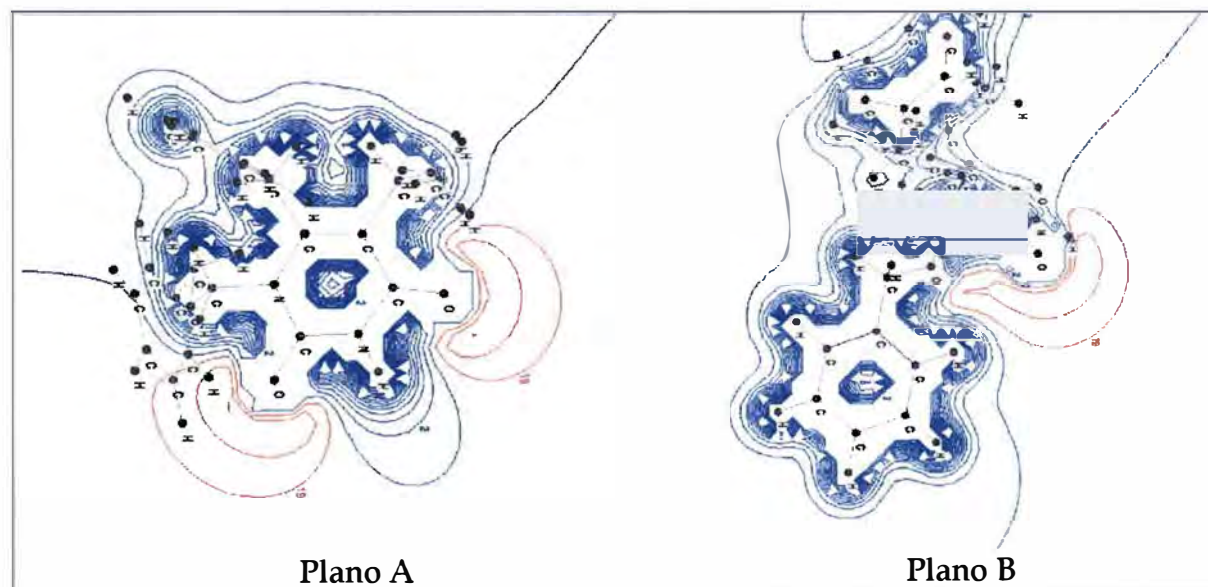


Figura 85 - Mapas de contorno isopotencial do MEP traçados sobre duas regiões planares da molécula HEPT3.

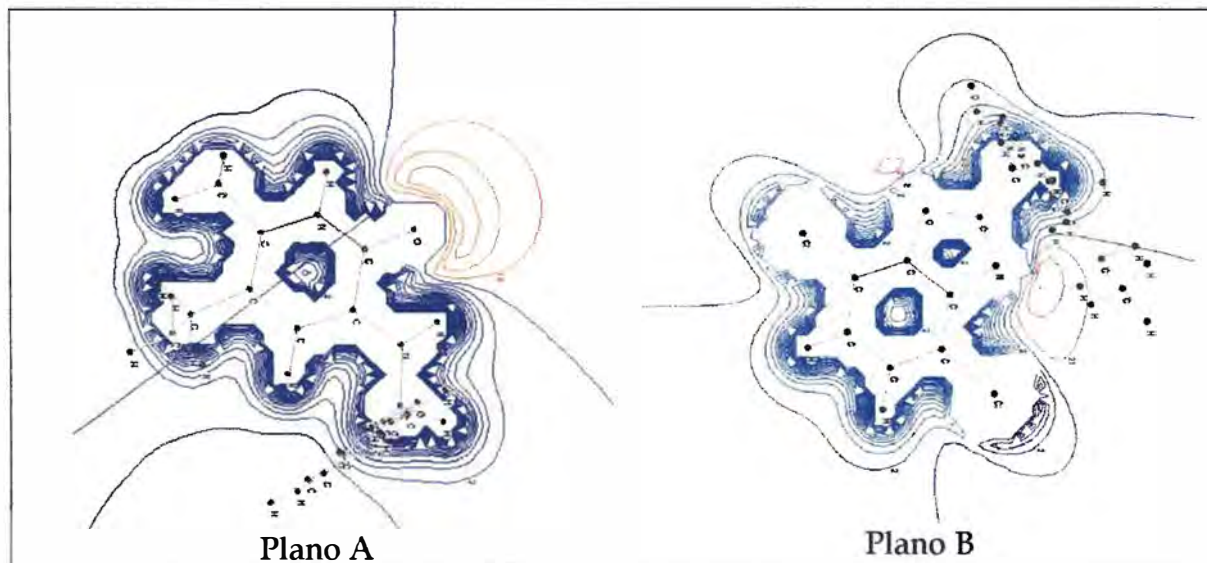


Figura 86 – Mapas de contorno isopotencial do MEP traçados sobre duas regiões planares da molécula PYR1.

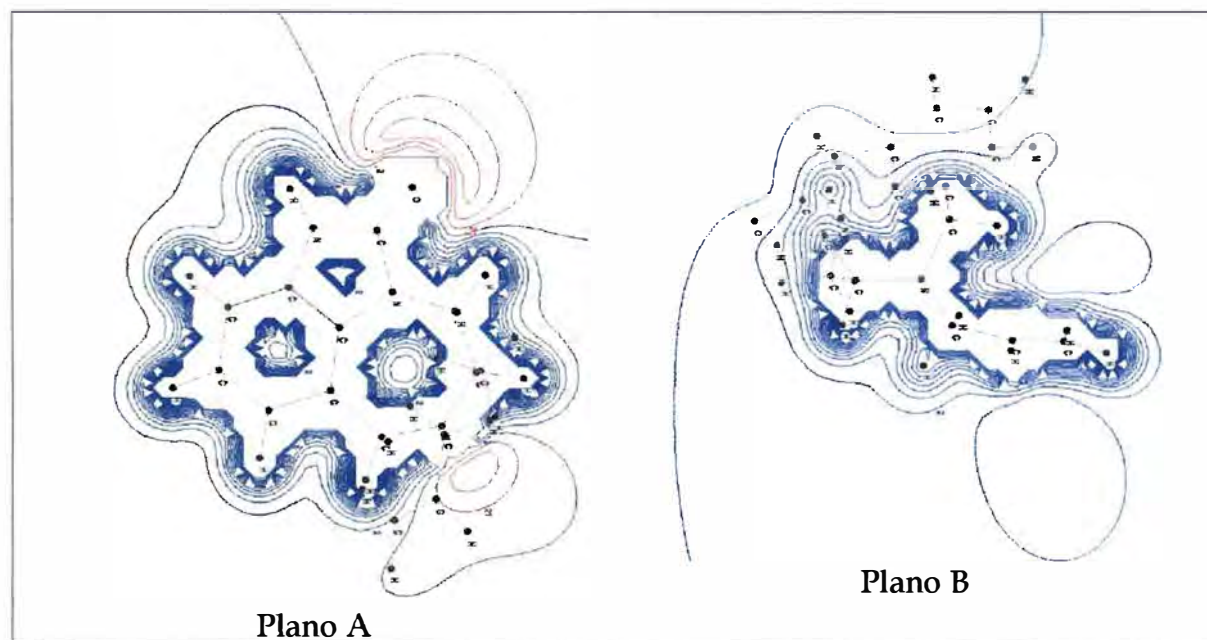


Figura 87 – Mapas de contorno isopotencial do MEP traçados sobre duas regiões planares da molécula TIBO1.

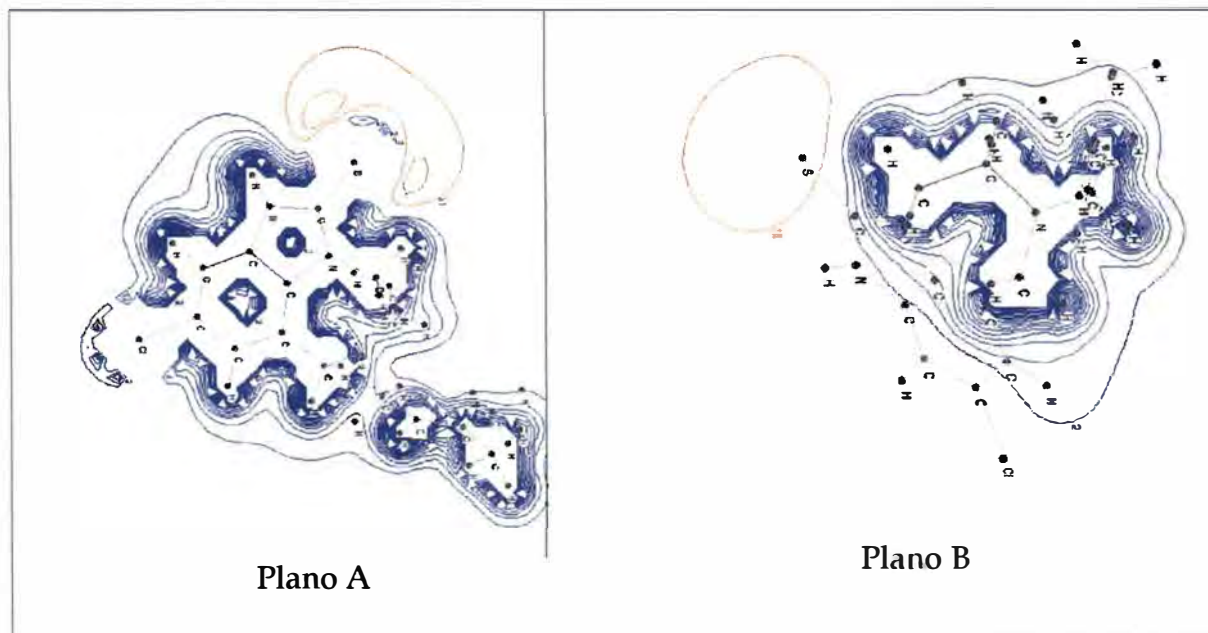


Figura 88 – Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões planares da molécula TIBO2.

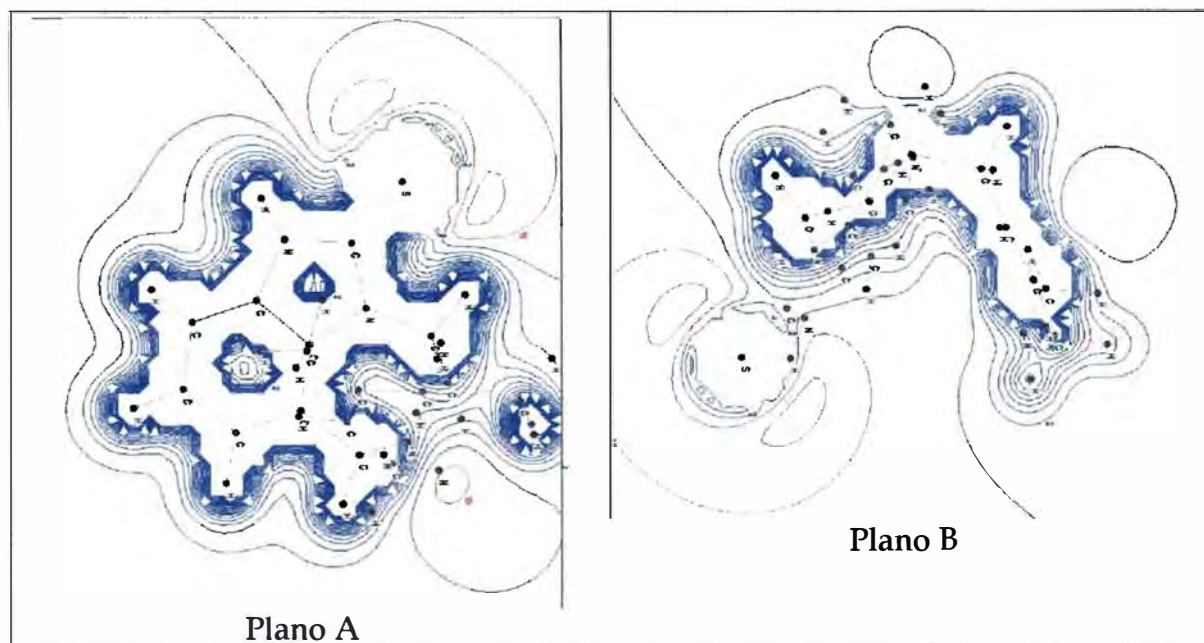


Figura 89 – Mapas de contorno isotopotencial do MEP traçados sobre duas regiões planares da molécula TIBO4.

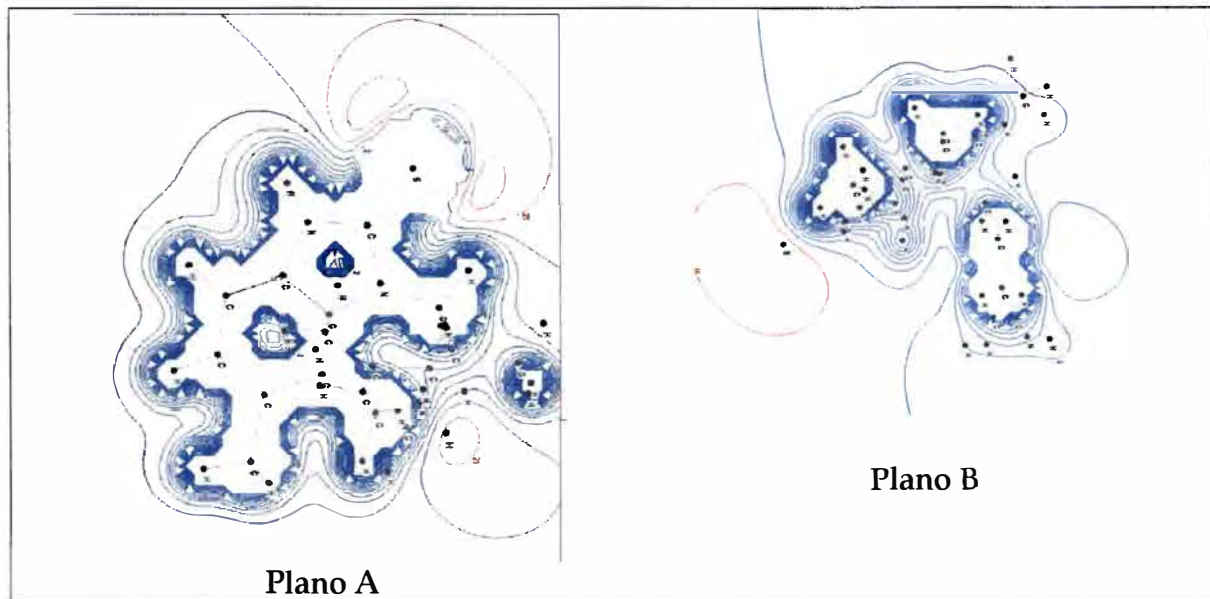


Figura 90 – Mapas de contorno isopotencial do MEP traçados sobre duas regiões planares da molécula TIBO7.

Estas figuras permitiram que se comparasse duas regiões moleculares comuns aos NNRTI, (planos A e B) representando uma avaliação qualitativa direta do campo eletrostático destes compostos. As regiões vermelhas representam potenciais eletrostáticos negativos e as azuis, potenciais positivos.

Os mapas de contorno isopotenciais do MEP das moléculas estudadas apresentam vários aspectos comuns quando as duas regiões planares são analisadas. Pode-se verificar que o plano A é caracterizado por uma região com dois centros de potencial eletrostático negativo. Uma destas regiões contém uma ligação do tipo $-N-C=O$ (grupo amida), geralmente localizado na extremidade de uma região aromática. O outro potencial negativo, quando presente, localiza-se próximo à intersecção entre os dois planos apresentados e é caracterizada pela presença de um átomo de nitrogênio substituído. Este átomo de nitrogênio certamente está relacionado com o ângulo entre os planos apresentados, uma vez que os ângulos de ligação deste átomo delimitam as asas da conformação tipo borboleta dos NNRTI. Além disso, este nitrogênio geralmente está ligado a um sistema aromático substituído ou a um grupo hidrofóbico volumoso, tal como os

substituintes alifáticos de TIBO ou um grupo ciclohexil da molécula HEPT2 ou DABO (planos B).

Os orbitais de fronteira HOMO e LUMO dos quinze NNRTI (tabela 53) também apresentaram grande similaridade. As figuras 91 a 96 a seguir apresentam os mapas de contorno tridimensionais destes orbitais, acompanhados de uma discussão para cada classe de compostos.

Kroeger-Smith e colaboradores realizaram um estudo destes orbitais de fronteira para três tipos de NNRTI: TIBO, α -APA e nevirapina, de onde se pode obter algumas informações e discutir algumas analogias com este trabalho. As orientações preferenciais destes compostos no sítio hidrofóbico da RT analisadas em conjunto com os orbitais de fronteira indicaram que os NNRTI são preferencialmente doadores de elétrons enquanto que a enzima seria o receptor. [Kroeger-Smith, 1995, 1998] Para chegar a esta conclusão estes autores aplicaram a teoria dos orbitais de fronteira, [Fukui e Fujimoto, 1967] sobre um modelo doador-receptor. [Kroeger-Smith, 1995] Os orbitais de fronteira da nevirapina e α -APA são orientados para uma região com os aminoácidos Tyr318/ Tyr319, que não possuem características de doadores de elétrons. [Ren et al., 1995, Kroeger-Smith, 1995]

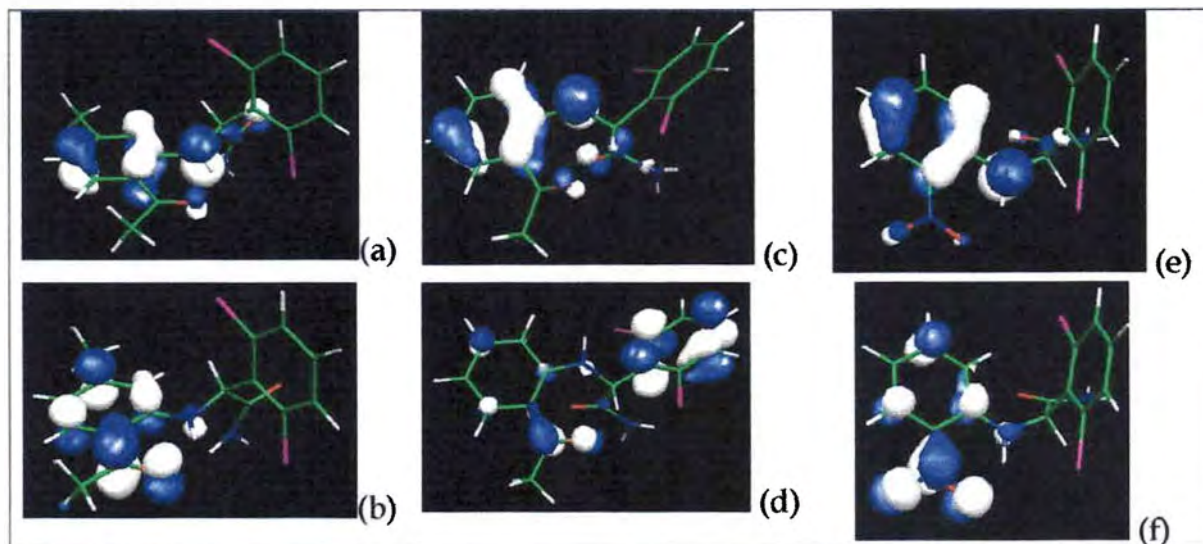


Figura 91 - Orbitais HOMO (acima) e LUMO (abaixo) de moléculas da classe das α -APA. (a) e (b) AAPA1, (c) e (d) AAPA4, (e) e (f) AAPA6.

No caso das α -APA os orbitais HOMO possuem as mesmas características. Trata-se de orbitais π localizados sobre cinco átomos de um anel aromático e um carbono exocíclico situado sobre uma das asas da borboleta. Os orbitais LUMO destas moléculas α -APA também se localizam principalmente sobre seis átomos do plano A das α -APA, com exceção de AAPA4 (figura 91 (d)) que apresentou este orbital localizado principalmente sobre o Plano B desta molécula. Pode-se verificar na tabela 39 que AAPA4 é a molécula com menor índice de atividade entre estas três.

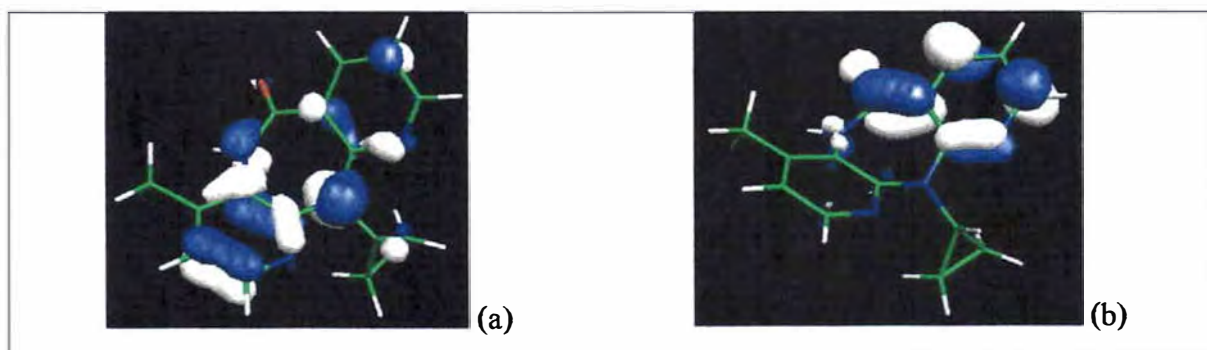


Figura 92 – (a) HOMO e (b) LUMO da nevirapina.

Os orbitais HOMO e LUMO da nevirapina (figura 92) alternam-se de posição, estando o HOMO no plano A e o LUMO no plano B, tais como os mesmos orbitais da molécula de piridinona, PYR1 (figura 93). As moléculas da classe das HEPT possuem os HOMO e LUMO nos planos A e B respectivamente e principalmente sobre seis átomos.

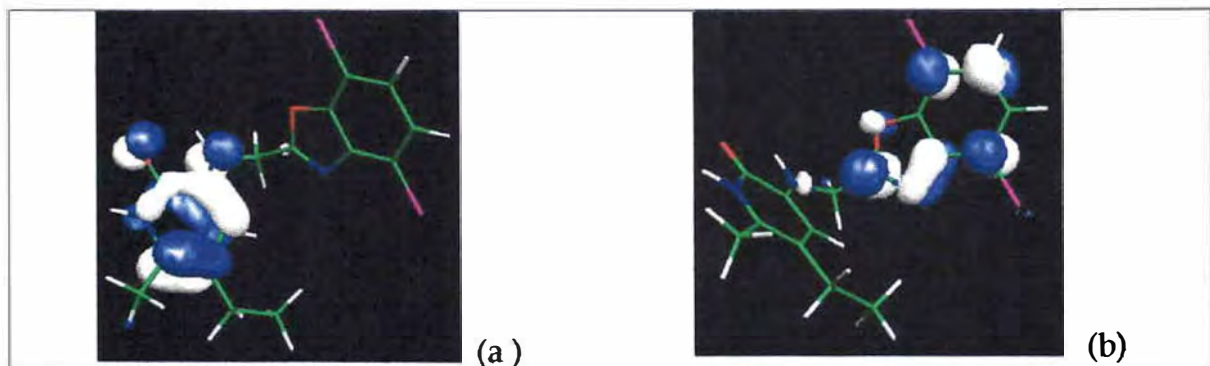


Figura 93 – (a) HOMO e (b) LUMO da molécula PYR1.

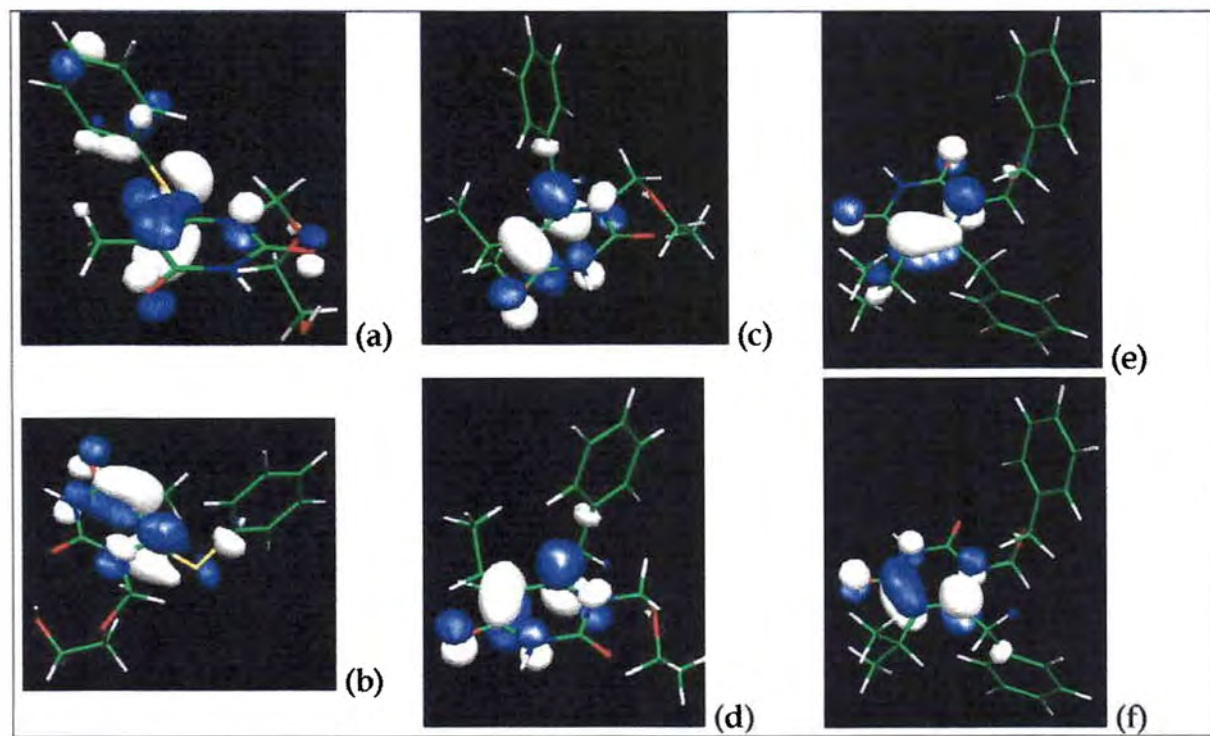


Figura 94 – Orbitais HOMO (acima) e LUMO (abaixo) para as moléculas HEPT1 (a) e (b), HEPT2 (c) e (d) e HEPT3 (e) e (f).

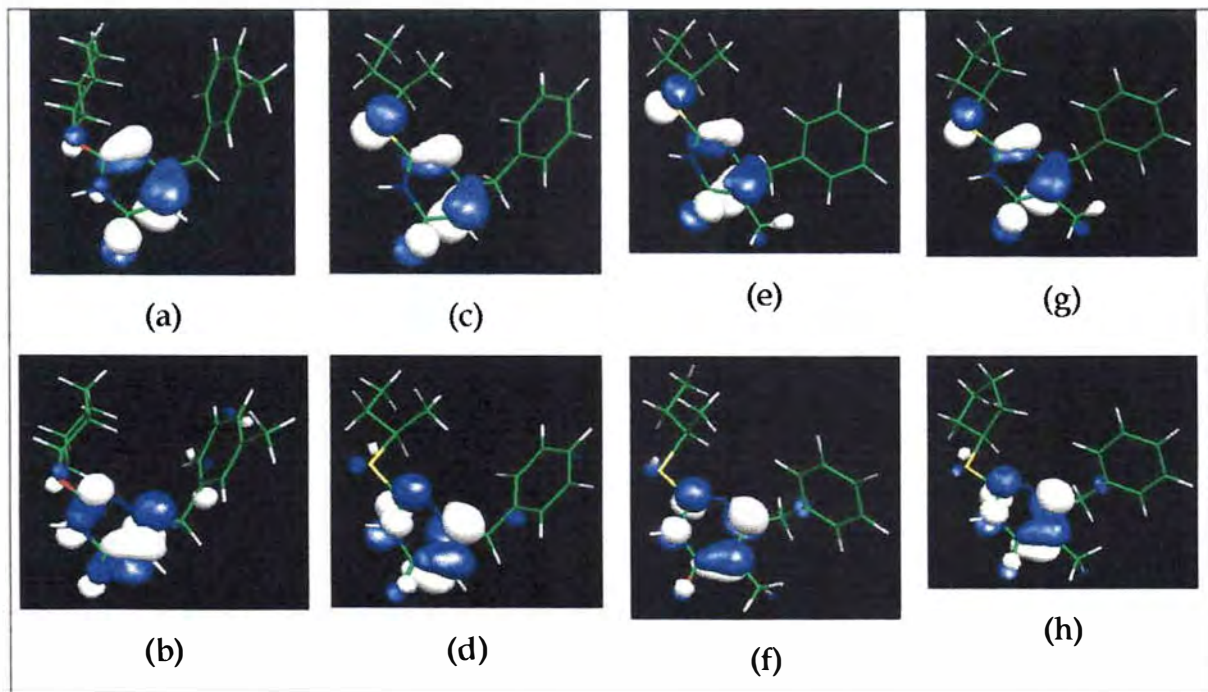


Figura 95 – Orbitais HOMO (acima) e LUMO (abaixo) para as moléculas da família DABO. (a) e (b) DABO1, (c) e (d) DABO2, (e) e (f) DABO3 e (g) e (h) DABO5.

As moléculas DABO possuem os orbitais HOMO e LUMO localizados predominantemente sobre seis átomos uma mesma região molecular. Tanto o HOMO como o LUMO são antiligantes e apresentam recobrimento apenas entre dois átomos, C(2) e N(3), C(4) e C(5) para o HOMO e C(5) e C(6) para o LUMO, que caracterizam o Plano A destas moléculas, formada pelo grupo alcóxi (DABO) ou tioalquil (S-DABO) juntamente com o anel funcional oxopirimidínico.

As moléculas de TIBO também apresentam estes orbitais com características surpreendentemente semelhantes (figura 96). Todos estão localizados predominantemente sobre a região planar e aromática das TIBO, ou seja, sobre o sistema benzoimidazol. Os autovalores mais significativos também se alternam de sinal, como já foi comentado para outros NNRTI.

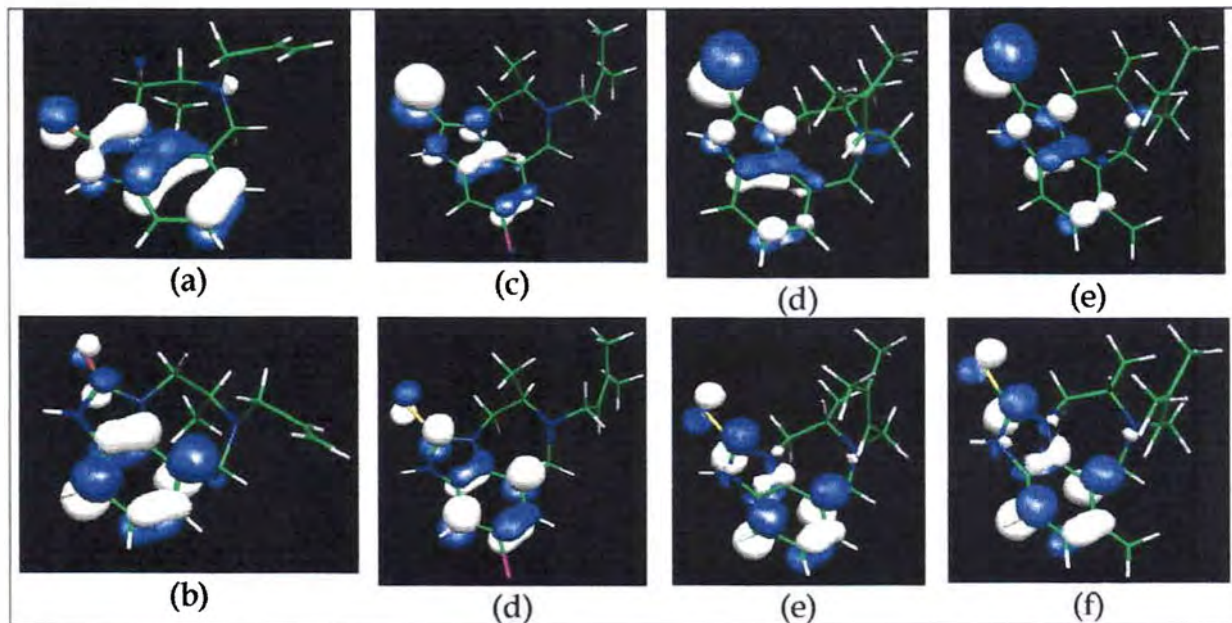


Figura 96 - Orbitais HOMO (acima) e LUMO (abaixo) para as moléculas da família TIBO. (a) e (b) TIBO1, (c) e (d) TIBO2, (e) e (f) TIBO4 e (g) e (h) TIBO7.

Como características gerais dos orbitais de fronteira dos NNRTI pode-se destacar que os mesmos são orbitais π e se localizam preferencialmente sobre as regiões planares aromáticas e funcionais de cada composto, caracterizando dois planos principais. Em geral estes orbitais apresentam regiões ligantes apenas entre dois átomos. A localização preferencial destes orbitais também corresponde às regiões de MEP em vermelho, localizadas predominantemente nos planos A (figuras 76 a 90). Estas características avaliadas em conjunto destacam que as regiões chamadas de plano A e plano B, apresentam grande similaridade molecular. O plano A se destaca por concentrar o HOMO e o LUMO. O plano B por sua vez se destacou ao apresentar as regiões de MEP com concentração de cargas positivas. É importante ressaltar que estas regiões devem ser importantes para o reconhecimento destas moléculas pela enzima. Um estudo aprofundado das interações destas regiões com os aminoácidos Tyr181, Tyr188, Phe227 e Trp229 da cavidade hidrofóbica de interação compreende um dos aspectos futuros do trabalho.

Por último, procurou-se identificar a presença de similaridade molecular em orbitais localizados dos NNRTI. Para isto empregou-se o método NBO. Em todos os casos estes cálculos apresentaram valores significativos de interação para um grupo amida, presente em um dos planos de cada um destes NNRTI e que já foi identificada como um dos padrões de similaridade destes compostos. [Ártico, 1996]. A análise NBO efetuada indicou uma forte interação do tipo $n(\text{N}) \rightarrow \pi^*(\text{C}=\text{O})$ nesta região. Esta característica está localizada no plano A das moléculas de NNRTI estudadas, sendo a única interação deste tipo que se mostrou significativa. É bem possível que este grupo amida seja uma característica importante para o reconhecimento pela RT, juntamente com outras características de similaridade molecular estudadas. Outras interações entre orbitais naturais de ligação comuns não foram observadas, com exceção da presença de um nitrogênio em uma região aromática de um dos planos de alguns NNRTI, que possibilitou a identificação de interações entre orbitais naturais de ligação localizados em uma das regiões planares das moléculas destes compostos.

CAPÍTULO 5

Considerações finais

Encontra-se muito bem estabelecido que os NNRTI se ligam a RT do vírus HIV-1 “imitando uma borboleta” sobre um único sítio ativo predominantemente hidrofóbico, localizado próximo ao sítio de ação catalítica desta enzima, apesar de cada classe destes compostos possuir diferenças estruturais e interagir por suas próprias características físico-químicas [DeClerck, 1998, 2000]. Os padrões de resistência viral, desenvolvidos pela enzima pelo uso destas substâncias apresentam semelhanças [Schinazi, Larder e Mellors, 1997], o que reforça ainda mais a hipótese de os NNRTI apresentarem grande similaridade, tanto molecular como também conformacional.

Os estudos apresentados nesta tese utilizaram-se de métodos computacionais diversos para a pesquisa de informações úteis para se entender a ação dos NNRTI, independentemente de se considerar as interações com a RT diretamente nos cálculos efetuados.

O segundo capítulo demonstrou o comportamento conformacional de moléculas de TIBO, após a parametrização completa a partir de cálculos mecânico-quânticos destas moléculas no campo de força AMBER94. As conformações mais prováveis se correlacionaram com aquelas encontradas no monocristal [Liaw et al., 1991], em complexos cristalinos com a RT [Kohlstaedt, et al., 1992; Ding et al., 1995A; Ren et al., 1995, 1999], além da distribuição de confôrmeros em solução, obtidas a partir de experimentos envolvendo RMN [Caldwell et al., 1993].

No terceiro capítulo estudou-se comparativamente alguns campos moleculares gerados por seis classes distintas de NNRTI. Em primeiro lugar realizou-se uma seleção criteriosa de quarenta e nove NNRTI com informações homogêneas de índices de atividade biológica disponíveis na literatura. Em seguida efetuou-se o tratamento destes dados, de acordo com a metodologia CoMFA e vários dados publicados foram confirmados. Pode-se dizer que “colorimos as asas da borboleta” com informações sobre as similaridades de várias classes de NNRTI. As publicações sobre correlações estrutura-atividade (SAR) existentes para estas seis classes de NNRTI fornecem informações semelhantes às obtidas neste estudo, caso sejam comparados os campos moleculares para cada classe, individualmente, com os diferentes padrões de substituições efetuadas nestas séries de compostos, e cuja informação é disponível na literatura [Pauwels et al., 1994; Mellors, 1992 e 1993; Balzarini, 1993; Pauwels et al., 1993; Kukla et al., 1991A-1991B; Breslin et al., 1995; Tanaka et al., 1991e 1992; Hopkins et al., 1996; Merluzzi et al., 1990; Koup, 1991; Hargrave et al., 1991; Klunder et al., 1992; Saari et al., 1991 e 1992; Hoffman et al., 1992 e 1993; Wai, et al., 1993; Mai et al., 1995, 1997 e 1999]. Isto indica que a metodologia CoMFA mostrou-se útil para a sugestão de substituintes em NNRTI, pois conseguiu identificar regiões de similaridade das moléculas estudadas, de acordo com os campos estéricos e eletrostáticos destas moléculas, logo, as contribuições dadas por uma classe de NNRTI podem fornecer informações para a sugestão de modificações moleculares em outra classe, como forma de contornar o aparecimento de padrões de resistência pontual sem alterar significativamente a atividade biológica.

Por último, apresenta-se um estudo qualitativo da similaridade molecular, realizado a partir de cálculos com o método B3LYP/6-31G(d) para quinze

moléculas de NNRTI em suas conformações bioativas (obtidas de acordo com as considerações dos capítulos anteriores). Os cálculos realizados foram comparados utilizando não apenas os valores numéricos obtidos, mas também de recursos de visualização gráfica. Dessa forma pode-se localizar diversos aspectos de similaridade molecular em planos de contorno isopotenciais do MEP, traçados especificamente sobre os planos correspondentes às asas da conformação tipo borboleta. Além disto os orbitais de fronteira, HOMO e LUMO foram analisados em conjunto e também demonstraram grande semelhança. Um grupamento amida, presente em um dos planos de cada um dos NNRTI estudados também pode ser considerada como um padrão farmacofórico destes compostos. Para enfatizar este resultado, uma análise NBO efetuada indicou uma forte interação do tipo $n(N) \rightarrow \pi^*(C=O)$ nesta região.

Outros aspectos sobre NNRTI deveram ser enfocados na continuidade desta pesquisa. Cálculos de parâmetros que representam a reatividade de moléculas, como dureza, regiões de ataque eletrofílico, nucleofílico e radicalar, hiperporizabilidade, etc. [Roy et al., 1998, Safi, Choho e Geerlings, 2001] deveram ser efetuados e possivelmente correlacionados com propriedades estruturais que se apresentem similares principalmente sobre os planos A e B da conformação tipo borboleta com a atividade biológica dos NNRTI.

Um estudo aprofundado das interações destas regiões moleculares dos NNRTI com os aminoácidos Tyr181, Tyr188, Phe227 e Try229 da cavidade hidrofóbica de interação compreende um dos aspectos mais promissores para a continuidade deste trabalho. Para isso, o campo de força AMBER 94 poderá ser modificado para outros ligantes, tal como o trabalho apresentado como o capítulo II desta tese. [Abrahão-Júnior, Nascimento e Galembeck, 2001] Em seguida as

interações avaliadas pelo método NBO ou por outras técnicas existentes, [Kubinyi, H., Folkers G., Martin, 1998] seriam comparadas com estudos cristalográficos destas interações. Além disto as regiões caracterizadas com um maior número de interações significativas poderiam ser correlacionadas com campos moleculares estéricos, eletrostáticos e hidrofóbicos de modelos CoMFA propostos para os NNRTI, tal como os resultados do trabalho apresentado como o terceiro capítulo desta tese. Além disto, pode-se destacar que a reunião de uma boa quantidade de parâmetros moleculares calculados com métodos computacionais mais sofisticados, tal como os cálculos utilizando a teoria DFT apresentados no quarto capítulo desta tese, é de crucial importância para o estabelecimento das características mais importantes para a ação de inibição dos NNRTI.

Enfim, este trabalho destacou a grande possibilidade de se realizar estudos computacionais para o entendimento da ação de fármacos, caracterizando a importância e o progresso dos estudos da química computacional no campo da química medicinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, D. J., Leo, A. J. *Proteins: Struc. Funct. Genetics* **1987**, *2*, 130.
- Abrahão-Júnior, O., Alemán, C. E Galembeck, S. E. *J. Mol. Structure (Theochem)* **1999**, *464*, 249.
- Abrahão Júnior, O., Nascimento, P. G. B. D., Galembeck, S. E. "Conformational Analysis of Non-Nucleosides Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTI): TIBO and nevirapine" - *Journal of Computational Chemistry*, **2001**, aceito para publicação.
- Ahgren, C., K., Backo, Bell, F. W., Cantrell, A. S., Clemens, M., Colacino, J. M., Deeter, J. B., Enghelhard, J. A., Högberg, M., Jaskunas F. R., Johansson, N. G., Jordan C. L., Kadher, J. S., Knnick, M. D., Lind, P., Lopez, C., Morin-Jr, J. M., Muesing, M. A., Noreen, R., Öberg, B., Paget, C. J., Palkovitz, J. A., Parrish, C. A., Prank, P., Ripppy, M., K., Rydergard, C., Sahlberg, C., Swanson, S., Ternansky, R. J., Unge, T., Vasileff, R. T., Vrang, L., West, S. J., Zhang, H., Zhou, X, X. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **1995**, *39*, 1329.
- Alemán, C., Canfla, E. I., Franco, R., Orozco, M. *J. Comp. Chem.* **1991**, *12*, 664.
- Alemán, C., Orozco, M., *J. Comp. Aided. Mol. Design* **1992**, *6*, 331.
- Alemán, C., Orozco M., *Biopolymers* **1994**, *34*, 941.
- Alemán, C., Muñoz-Guerra, S. *J. Polym. Sci. - Part B: Polym. Phys.* **1996**, *34*, 963.
- Alemán, C. Casanovas, J. Galembeck, S. E. *J. Comp. Aided. Mol. Design* **1998**, *12*, 259.
- Allinger, N. L. *J. Am.Chem. Soc.* **1977**, *99*: (25) 8127.
- Allinger N. L., Yuh Y. H., Lii J. H. *J. Am.Chem. Soc.* **1989**, *111*:(23) 8551.

- Artico, M., Massa, S., Mai, A., Marongiu, M. E., Pirras, G., Tramontano, E., La-Cola, P. *Antiviral Chem. Chemotherapy* **1993**, 4, 361.
- Artico, M., *Il Farmaco*, **1996**, 51(5), 305.
- Artico M, Mai A, Sbardella G, Massa S, Novellino E, Greco G, Loi AG, Tramontano E, Marongiu ME, La Colla P. *J. Med. Chem.* **1999**, 42:(4) 619.
- Baba, M., De Clercq, E., Tanaka, H., T., Ubasawa, M., Takashima, H., Sekiya, Nitta, I., Umezo, K., Nakashima, H., Mori, S., Shigeta, S., Walker, R. T., Miyasaka, T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991a**, 88, 2356.
- Baba, M., De Clercq, E., Tanaka, H., T., Ubasawa, M., Takashima, H., Sekiya, Nitta, I., Umezo, K., Walker, R. T., Mori, S., Ito, M., Shigeta, S., Miyasaka, T., *Mol. Pharmacol.* **1991b**, 39, 805.
- Baba, M., Yuasa, S., Niwa, T., Yamamoto, M., Yabuuchi, S., Takashima, H., Ubasawa, M., Tanaka, H., Miyasaka, T., Walker, R. T., Balzarini, J., De clercq, E., Shigeta, S. *Biochem. Pharmacology* **1993**, 45, 2507.
- Baker, J. *J. Comput. Chem.* **1986**, 7, 385.
- Balani, S. K., Lin, J. H., Chen, I. W., Schleif, W. A., Sardana. V. V., Long, W. J., Byrnes, V. W., Emini, E. A. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* **1995**, 39, 2602.
- Balzarini, J., Hao, Z., Herdewijn, P., Jhons, D. G., De Clercq, E. *Proc. Natl. Acad. Sci Usa* **1991a**, 88, 1499.
- Balzarini, J., Holy, A., Jindrich, J., Dvorakova, H., Hao, Z., Snoeck, R., Herdewijn, P. *Proc. Natl. Acad. Sci Usa* **1991b**, 88, 4961.
- Balzarini, J., Pérez-Pérez, M. J., San-Felix, A., Schols, D., Perno, C. F., Vandamme, A. M., Camarasa, M. J., De Clercq, E. *J Biol. Chem.*, **1992**, 267, 11831.

- Balzarini, J., Holy, A., Jindrich, J., Naesens, L., Snoeck, R., Schols, D., De Clercq, E. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **1993**, 37, 332.
- Balzarini, J., Brouwer, W. G., Felauer, E. E., De Clercq, E., Karlsson, A. *Antiviral Research* **1995**, 27, 219.
- Bayly, C. I., Cieplack, P., Cornell, W. D., Kollman, P. A. *J Phys Chem* **1993**, 97, 10269.
- Becke, A. D. *Phys. Rev. A* **1988**, 38, 3098.
- Berendsen H. J. C., Grigera, J. R., Straatsma, T. P. *J. Phys. Chem.* **1987**. 91: (24) 6269.
- Breslin, H., Kukla, M., Ludovici, D. W., Mohrbacher, R., Miranda, M., Rodgers, J. D., Hitchens, T. K., Leo, G., Gauthier, D. A., Ho, C. Y., Scott, M. K., De Clercq, E., Pauwels, R., Andries, K., Janssen, M. A. C., Janssen, P. A. J. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 771.
- Buckheit-Jr., R. W., Hollingshead, M. G., Germany-Decker, J., White, E. L., McMahon, J. B., Allen, L. B., Ross, L. J., Decker, W. D., Westbrook, L., Shannon, W. M., Weislow, O., Bader, J. P., Boyd, M. R. *Antiviral Res.* **1993**, 21, 247.
- Burns, C. L., Stclair, M. H., Frick, L. W., Spector, T., Averett, D. R., English, M. L., Holmes, T. J., Krenitsky, T. A., Koszalka, G. W. *J. Med. Chem.* **1993**, 36: (3) 378.
- Bush, B. L., Nachbar, R. B. *J. Comput. Aid. Mol. Design* **1993**, 7: (5) 587.
- Caldwell, G. W., Gautier, A. D., Leo, G. C., Kukla, M. J. *Tetrahedron Letters*, **1993**, 34, 2063.
- Campiane, G., Nacci, V., Fiorini, I., De Filippis, M. P., Garofalo, A., Greco, G. Novellino, E., Altamura, S., Di Renzo, L. *J. Med. Chem.* **1993**, 39, 2672.
- Chang, G., Guida, W. C., Still, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 4379.
- Cramer, R. D. III, Bunce, J. D., Patterson, D. E., Frank, I. E. *Quant. Struct-Act. Relat.*, **1988**, 7, 18, erratum **1988**, 7, 91.

- Cremer, D., Pople, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1354.
- Cremer, D., *Ring: A Coordinate Transformation Program For Evaluating The Degree And Type Of Puckering Of A Ring Compound.* **1985**, QCPE, Code: qcmp110.
- Cremer, D. *Acta. Cryst. B* **1984**, *40*, 498.
- Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Kollman, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*: (21) 9620.
- Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K.M., Ferguson, D.M., Spellmeyer, D. C., Fox, T., Caldwell, J.W., Kollman, P.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179.
- Das, K., Ding, J., Hsiou, Y., Jr Clark, A. D., Moereels, H., Koymans, L., Andries, K., Pauwels, R., Janssen, P. A. J., Boyer, P. L., Clark-Jr., P., Smith, R. H., Smith, M. B. K., Michejda, C. J., Hughes, S. H., Arnold, E. *J. Mol. Biol.*, **1996**, *264*, 1085.
- Debyser, Z., Pauwels, R., Andries, K., Desmyter, J., Kukla, M., Janssen, P. A. J., De Clercq, E. *Proceedings of the national Acad. of Sci. USA*, **1991**, *88*, 1451.
- De Clercq, E. *Farmacology* **1999**, *54*, 26.
- De Clercq, E. *Med. Res. Rev.* **1996**, *16*, 125.
- De clercq, E. *Med. Res. Rev.* **1993**, *13*, 229.
- De Clercq, E. *Aids Res. Hum. Retrov.* **1992**, *8*, 119.
- Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. J., Healy, E. F., Stewart, J. J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902.
- Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G. *J. Mol. Struct.(Theochem)* **1988**, *49*, 1-21.
- Dewar, M. J. S., Yuan, Y-C. *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 3881.

- Ding, J., Das, K., Tantillo, C., Zhang, W., Clarck, Jr., A. D., Jessen, S., Lu, X., Hsiou, Y., Jacobo-Molina, A., Andries, K., Pauwels, R., Moereels, H., Koymans, L., Janssen, P.A.J., Smith Jr, R. H., Koepke, M. K., Michejda, C. J., Hughes, S. H., Arnold, E. *Structure* **1995A**, 3, 365.
- Ding, J. P., Das, K., Moereels, H., Koymans, L., Andries, K., Janssen, P. A. J., Hughes, S. H., Arnold, E. *Nat. Struct. Biol.* **1995**, 2: (5) 407.
- Di Santo, R., Costi, R., Ártico, M., Massa, S., Marongiu, M., E., Loi, A. G., De Montis, A., La Colla, P., *Antiviral Chem. Chemother.* **1998**, 9, 127.
- Ditchfield, R., Hehre, W. J., Pople, A. J. *Chem. Phys.* **1971**, 54, 724.
- Dueweke, T. J., Poppe, S. M., Romero, D.L., Swaney, S. M., So A. G., Downey, K. M., I. W. Althaus, Reuser, F., Busso, M. Resnick, L., Mayers, D. L., Lane, J., Aristoff, P. A., Thomas, R. C., Tarpley, W. G., *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, 37, 1127.
- Esnouf, R., Ren, J., Ross, C., Jones, Y., Stammers, D., Stuart, D. *Nature Struct. Biol.* **1995**, 2, 303.
- Faraj, A., Agrofolio, L. A., Wakenfield, J. K., Mcpherson, S., Morrow, C. D., Gosselin, G., Mathé C., Imbach, J.-L., Schinazi, R. F., Sommadossi, J-P *Antimicrob. Agents Chemoter.* **1994**, 38, 2300.
- Fauci, A. S. *Science* 239: 617.
- Francl, M. M., Pietro, W. J., Hehre, W. J., Binkley, J. S., Gordon, M. S., DeFrees, D. J., Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1982**, 77, 3654.
- Francl, M. M., Pietro, W. J., Hehre, W. J., Binkley, J. S., Gordon, M. S., DeFrees, D. J., Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1982**, 77, 3654.

Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Zakrzewski, V. G., Montgomery, J. A., Stratmann, R. E., Burant, J. C., Dapprich, S., Millam, J. M., Daniels, A. D., Kudin, K. N., Strain, M. C., Farkas, O., Tomasi, J., Barone, V., Cossi, M., Cammi, R., Mennucce, B., Pomelli, C., Adamo, C., Clifford, S., Ochterski, J., Petersson, G. A., Ayala, P. Y., Cui, Q., Morokuma, K., Malick, D. K., Rabuck, A. D., Raghavachari, K., Foresman, J. B., Cioslowski, J., Ortiz, J. V., Stefanov, B. B., Lui, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Gomperts, R., Martin, R. L., Fox, D. J., Keith, T., Al-Laham, M. A., Peng, C. Y., Nanayakkara, A., Gonzalez, C., Challacombe, M., Gill, P. M. W., Johnson, B. G., Chen, W., Wong, M. W., Andres, J. L., Head-Gordon, M., Replogle, E. S., Pople, J. A. *Gaussian 98, Revision A.1.*, Gaussian, Inc., Pittsburgh Pa, **1998**.

Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Gill, P. M. W., Johnson, B. G., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Keith, T., Petersson, G. A., Montgomery, J. A., Raghavachari, K., Al-Laham, M. A., Zakrzewski, V. G., Ortiz, J. V. Foresman, J. B., Cioslowski, J., Stefanov, B. B., Nanayakkara, A., Challacombe, M., Peng, C. Y., Ayala, P. Y., Chen, W., Wong, M. W., Andres, J. L., Replogle, E. S., Gomperts, R., Martin, R. L., Fox, D. J., Binkley, J. S., Defrees, D. J., Baker, J., Stewart, J. P., Head-Gordon, M., Gonzalez, C., Pople, J. A. *Gaussian 94, Revision D.2*, Gaussian, Inc., Pittsburgh Pa, **1995**.

Gallo, R. C., Montagnier, L. Aids In 1998. *Sci. Amer.* **1998**, 259, 41.

Gasteiger, J., Marsili, M. *Tetrahedron* **1980**, 36, 3219.

Goldman, M.E., Nunberg, J. H., Obrien, J. A., Quintero, J. c., Schleif, W. A., Freund., K. F., Gaul. S. L., Saari, W. S., Wai. J. S., Hoffman, J. M, Anderson, P.S., Hupe, D. J., Emini, E. A. Stern, A. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 6863.

Goodman, J.M., Still, W.C. *J. Comp. Chem.* **1991**, 12, 1110.

- Gordon, M. S. *Chem. Phys. Lett.* **1980**, 76, 163.
- Gund, P. *Prog. Mol. Subcell Biol.*, **1977**, 5, 117.
- Gussio, R., Pattabiraman, N., Zaharevitz, D. W., Kellogg, G. E., Topol, I. A., Rice, W. G., Schaeffer, C. A, Erickson, J. W., Burt, S. K. *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 1645.
- Hagler, A. T., Huler, E., Lifson, S. J. *Am. Chem. Soc.* **1974**, 96: (17) 5319.
- Halgren, T. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7827.
- Halgren, T. A. *J. Comp. Chem.* **1996**, 17, 520.
- Hansch, C., Leo, A., Taft, R. W. *Chem. Rev.* **1991**, 91: (2) 165.
- Hariharan, P. C. , Pople, J. A. *Theor. Chim. Acta.* **1973**, 28, 213.
- Hargrave, K. D., Proudfoot, J. R., Grozinger, K. G., Cullen, E., Kapadia, S. R., Patel, U. R., Fuchs, V. U., Mauldin, S. C., Vitous, J., Behnke, M. L., Klunder, J. M., Pal, K., Skiles, J. W., McNeil, D. W., Rose, J. M., Chow, G. C., Skoog, M. T., Wu, J. C., Schmidt, G, Engel, W. W., Eberlein, W. G., Saboe, T. D., Campbell, S. J., Rosenthal, A. S., Adams, J. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 2231.
- Hao, Z., Cooney, D. A., Hartman, N. R., Perno, C. F., Fridland, A., Devico, A. L., Sarngadharan, M. G., Broder, S., Johns, D. G. *Mol. Pharmacol.* **1989**, 34, 431.
- Hannongbua, S., Pungpo, P., Limtrakul, J., Wolschann, P. *J. Comput. -Aided Mol. Des.* **1999**, 13, 563.
- Hasel, W., Hendrickson, T. F., Still, W. C. *Tetrahedron Comput. Method* **1988**, 1, 103.
- Hoffman, J. M., Wai, J.S., Thomas, C. M., Levin, R. B., O'Brien, J. A., Goldman, M. E. *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 3784.
- Hehre, W. J., Ditchfield, R., Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1972**, 56, 2257.

- Hehre, W. H., Shusterman, A. J., Nelson, J. E. *The molecular Modeling Workbook for Organic Chemistry* **1998**, Wavefunction, Inc., Irvine, CA 92612.
- Honenberg, P., Kohn, W. *Phys. Rev. B*, **1964**, 136, 864.
- Hopfinger, A. J., Pearlstein, R. A. *J. Comp. Chem.* **1984**, 5, 486.
- Hopfinger, A. J. *J. Med. Chem.* **1985**, 28: (9) 1133.
- Hopkins, A. L, Ren, J. S., Esnouf, R. M., Willcox, B. E., Jones, E. Y., Ross, C., Miyasaka, T., Walker, R. T., Tanaka, H., Stammers, D. K., Stuart, D. I. *J. of Med. Chem.* **1996**, 39, 1589.
- Ishiki, H. M., Dissertação de Mestrado, 25/11/1999, FFCLRP-USP.
- Jaeger, J., Restle, T., Steitz, T. A. *Embo Journal* **1998** 17: (15) 4535.
- Jacobo-Molina, A., Arnold, E. *Biochemistry* **1991**, 30, 6351.
- Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R. G., Clark Jr., A. D., Lu, X., Tantillo, C., Williams, R. L., Kamer, R., Ferris, A. L., Clark, P., Hizi, A., Hughes, S. H., Arnold, E. *Proc. Natl. Acad. Sci Usa* **1993**, 90, 6320.
- Jensen, F. *Introduction to Computational Chemistry* **1999**, John Willey e Sons, Ltd, Baffins Lane, England.
- Johnson, M., Basak, S., Maggiora, G. *J. Math. And Comput. Mod* **1988**, 11: 630.
- Jorgensen, W. L., Tiradorives, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110: (6) 1666.
- Karplus, M. *J. Chem. Phys.* **1959**, 30, 11.
- Karplus, M. *J. Phys. Chem.* **1960**, 64, 1793.
- Karplus, M. *J Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2870.
- Kearsley, S. K., Smith, G. M. *Tetrahedron Comput. Methodol.* **1990**, 3, 615.

- Kellogg, G. E., Semus, S. F., Abraham, D. J. *J. Comput. aided Mol. Des.* **1994**, 5, 545.
- Kilby, J. M., Saag, M. S. *Infect. Agent. Dis.* **1994**, 3, 313.
- Klein, J. P., Bender, R., Kirsch, R., Meichsner, C., Paessens, A., Rosner, M., Rubsamenwaigmann, H., Kaiser, R., Wichers, M., Schneeweis, K. E., inkler, I., Riess, G. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* **1995**, 39, 2253.
- Klunder, J. M., Hargrave, K. D., West, M., Cullen, E., Pal, K., Behnke, M. L., Kapadia, S. R., McNeil, D. W., Wu, J. C., Chow, G. C., Adams, J. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 1887.
- Kohlstaedt, L. A., Wang, J., Friedman, J. M., Rice, P. A, Steitz, T. A. *Science* **1992**, 256, 1783.
- Kubinyi, H., Hamprecht F. A., Mietzner, T. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 2553.
- Kubinyi, H. *3D QSAR in drug design. Theory, methods and applications.* **1993**, ESCOM Science Publishers B.V.: Leiden.
- Kubinyi, H., Folkers G., Martin Y. C. *3D QSAR in Drug Design. Vol.2 - Ligand Protein Interactions and Molecular Similarity. Vol. 3 - Recent Advances*, **1998**, Kluwer/ESCON: Dordrecht.
- Kubinyi, H. In *The Quantitative Analysis of Structure-Activity Relationships in Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery Volume 1: Principles and Practice* Wolff, M. E., Ed., 5th edition , John Wiley e Sons, Inc.: New York, **1994**.
- Kroeger-Smith, M. B., Rouzer, C. A., Taneyhill, L. A., Smith, N. A., Hughes, S. H., Boyer, P. L., Janseen, P. A. J., Moereels, H., Koymans, L., Arnold, E., Ding, J., Das, K., Zhang, W., Michejda, C. J., Jr Smith, R. H., *Protein Science*, **1995**, 4, 2203.
- Klebe, G. *J. Mol. Biol.* **1994**, 237, 212.
- Klebe, G., Mietzner T., Weber, F., *J. Computer - Aided Mol. Des.* **1999**, 13, 35.

- Kolossvary, I., Guida, W. C. *J. Comp. Chem.* **1992**, *14*, 691.
- Kohlstaedt, L. A., Wang, J., Friedman, J. M., Rice, P. A., Steitz, T. A. *Science* **1992**, *256*, 1783.
- Kukla, M., Breslin, H., Pauwels, R., Fadde, C. L., Miranda, M., Scott, M. K., Scherrill, R. G., Andries, K., Raeymaekers, A., Van Gelder, J., Andries, K., Janssen, M. A. C., De Clercq, E., Janssen, P. A. J. *J. Med. Chem.* **1991a**, *34*, 746.
- Kukla, M., Breslin, H., Diamond, C. J., Grous, P. P., Ho, C. Y., Miranda, M., Rodgers, J. D., Scherrill, R. G., De Clercq, E., Pauwels, R., Andries, K., Moens, L. J., Janssen, M. A. C., Janssen, P. A. J. *J. Med. Chem.* **1991b**, *34*, 3187.
- Kroeger Smith, M. B., Rouzer, C. A., Taneyhill, L. A., Smith, N. A., Stephen H. H., Boyer, P. L., Janssen, P. A., Moereels, H., Koymans, L., Arnold, E., Ding, J., Das, K., Zhang, W., Michejda, C. J., Smith-Jr. R.H. *Protein Science*, **1995**, *4*, 2203.
- Langtry, H.D., Campoli-Richards, D. M. *Drugs* **1989**, *37*, 408.
- Lee, C., Yang, W., Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1993**, *37*, 785.
- Leo, G. C., Gauthier, A. D., Caldwell, G. W., Kukla, M. J. *Magn. Reson. Chem.* **1992**, *30*, 185.
- Liaw, Y. C., Gao, Y. G., Robinson, H., Wang, A. H. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1857.
- Lin, T.S., Schinazi, R. F., Prusoff, W. H. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *1*, 2713.
- Lowdin, P. O. *Phys. Rev.* **1955**, *97*, 1474.
- Mai, A., Ártico, M., Sbardella, G., Massa, S., Loi, A. G., Tramontano, E., Scano, P., La Colla, P. *J. Med. Chem.* **1995**, *18*, 3258.
- Mai, A., Ártico, M., Sbardella, G., Quartarone, S., Massa, S., Loi, A. G., De Montis, A., Scintu, F., Putzolu, M., La Colla P. *J. Med. Chem.* **1997**, *9*, 1447.

- Mai, A., Ártico, M., Sbardella, G., Massa, S., Novellino, E., Greco, G., Loi, A. G., Tramontano, E., Marongiu, M. E., La Colla, P **1999** *J. Med. Chem.* **25**, 619.
- Hagler, A. T., Maple, J. R., Hwang, M. J., Stockfisch, T. P., Dinur, U., Waldman, M., Ewig C. S. *J. Comp. Chem.* **1994**, **15**, 162.
- Martin, Y. C. In *3D QSAR: Current State, Scope, and Limitations in Perspectives in Drug Discovery and Design*, Kubinyi, H., Folkers, G., Martin, Y. C., *Kluwer Academic Publishers, Great Britain* **1998**, 12-14.
- Massa, S., Mai, A., Artico, M., Sbardella, G., Tramontano, E., Loi, A. G., Scano, P., La-Cola, P. *Antiviral Chem. Chemotherapy* **1995**, **6**, 1.
- Mathé, C., Périgaud, C., Gosselin, G., Imbach, J.-L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1994**, 1019.
- Mellors, J. W., Dutschman, G. E., Im, G. J., Tramontano, E., Winkler, S. R., Cheng, Y. C. *Molecular Pharmacology* **1992**, **41**, 446.
- Mellors, J.W., Im, G.J., Tramontano, E., Winkler, S.R., Medina D. J., Dutschman, G. E., Bazmi, H. Z., Piras, G., Gonzalez, C. J., Cheng, Y. C. *Molecular Pharmacology* **1993**, **43**, 11.
- Merluzzi, V. J., Hargrave, K. D., Labadia, M., Grozinger, K., Skoog, M., Wu, J. C., Shih, C. K., Eckner, K., Hattox, S., Adams, J., Rosethal, A. S., Faanes, R., Eckner, R. J., Koup, R. A., Sullivan, J. L. *Science* **1990**, **250**, 1411.
- Mestres, J., Rohrer, D. C., Maggiora, G. M. *J. Computer-Aided Mol Design* **1999**, **13**, 79.
- Mitsuya, H., Yarchoan, R., Broder, S. *Science* **1990**, **249**, 1533.
- Mohamadi, F., Richards, N. G. J., Guida, W. C., Liskamp, R., Lipton, M., Caufield, C., Chang, G., Hendrickson, T., Still, W.C. *J Comput. Chem.* **1990**, **11**, 440.

- Møller, C., Plesset, M. S. *Phys. Rev.* **1934**, 46, 618.
- Mui, P. W., Jacober, S. P., Hargrave, K. D., Adams, J. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 201.
- Norrby, P. O., Liljefors, T. *J. Comput. Chem.* **1998**, 19, 1146.
- Norinder, U. *Recent Progress in CoMFA Methodology and Related Techniques in Perspectives in Drug Discovery and Design*, Kubinyi, H., Folkers, G., Martin, Y. C., ed, Kluwer Academic Publishers, Great Britain, **1998**, 12-14, 25-39.
- Orozco, M., Alemán, C., Luque, F. J. *Models Chem.* **1993**, 130, 695.
- Oprea, T. I., Waller, C. L., Marshall, G. R. *J. Med. Chem.*, **1994**, 37, 2206.
- Parreira, R. L. T., Abrahão Júnior, O., Galembeck, S. E. *Tetrahedron*, **2001**, 57(16), 3243-3253.
- Patel, P. H., Jacobo-Molina, A., Ding, J., Tantillo, C., Clark Jr, A. D., Raag, R., Nanni, R. G., Hughes, S. H., Arnold, E. *Biochemistry* **1995**, 25, 5351.
- Palmö, K., Pietila, L. O., Krimm, S. *Comput. Chem.* **1991**, 15, 249.
- Pauwels, R., Balzarini, J., Baba, M., Snoeck, R., Schols, D., Herdewijn, P., Desmyter, J., De Clercq, E. *J. Virol. Methods* **1988**, 20, 309.
- Pauwels, R., Andries, K., Desmyter, J., Schols, D., Kukla, M., Breslin, H., Raeymaekers, A., Van Gelder, J., Woestenborghs, R., Heykants, J., Schellenkens, K., Janssen, M. A. C., De Clercq, E., Janssen, P. *Nature* **1990A**, 343, 470.
- Pauwels, R., Andries, K., Desmyter, J., Schols, D., Kukla, M., Breslin, H., Raeymaekers, A., Van Gelder, J., Woestenborghs, R., Heykants, J., Schellenkens, K., Janssen, M. A. C., De Clercq, E., Janssen, P. *Nature* **1990**, 343, 470.
- Gelder J, Woestenborghs R, Heykants J, Pauwels, R., Andries, K., Desbyser, Z., Van Daele, P., Schols, D., Stoffels, P., DE Vreese, A., Woestenborghs, R., Desmyter,

- J., Heycants, J., Janssen, M. A. C., De Clercq, E., Janssen, P. A. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 1711.
- Pauwels, R., Andries, K., Debyser, Z., Kukla, M. J., Schols, D., Breslin, H. J., Woestenborghs, R., Desmyter, J., Janssen, M. A. C., De Clercq, E., Janssen, P. A. J. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **1994**, *38*, 2863.
- Pauwels, R., Balzarini, J., Baba, M., Snoeck, R., Schols, D., Herdewijn, P., Desmyter, J., DeClerck, E. J. *Viol. Methods* **1988**, *20*, 309.
- Pialoux, G., Youle, M., Dupont, B., Gazzard, B., Cauwenbergh, G. F., Stoffels, P. A., Davies, S., de Saint Martin, J., Janssen, P. A. *Lancet* **1991**, *20*, 140.
- Pople, J. A. *J Chem Phys* **1982**, *77*, 3654-3665.
- Proudfoot, J. R., Hargrave, K. D., Kapadia, S. R., Patel, U. R., Grozinger, K. G., McNeil, D. W., Cullen, E., Cardozo, M., Tong, L., Kelly, T. A., Rose, J., David, E., Mauldin, S. C., Fuchs, V. U., Vitous, J., Hoermann, M., Klunder, J. M., Raghavan, P., Skiles, J. W., Mui, P., Richman, D.D., Sullivan, J. L., Shih, C. K., Grob, P. M., Adams, J. J. *Med. Chem.* **1995**, *38*, 4830.
- Peeters, A., Van Alsenoy, C., Dillen, J., Geise, H.J. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **1995**, *333*, 99.
- Rachlis, A. R. *CMAJ* **1990**, *1*, 143, 1177.
- Reed, A. E., Curtiss, L. A., Weinhold, F. *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 899.
- Ren, J., Esnouf, R., Garman, E., Somers, D., Ross, C., Kirby, I., Keeling, J., Darby, G., Jones, Y., Stuart, D., Stammers, D. *Nature Struct. Biol.*, **1995**, *2*, 293.
- Ren, J., Esnouf, R., Hopkins, A., Ross, C., Jones, Y., Stammers, D., Stuart, D. *Structure* **1995**, *3*, 915.

- Rodgers, D. W., Gamblin, S. J., Harris, B. A., Ray, S., Culp, J. S., Hellmig, B., Woolf, D. J., Debouck, C., Harrison, S. C. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **1995**, 92, 1222.
- Romero, D.L., Morge, R. A., Genin, M. J., Biles, C., Busso, M., Resnick, L., Althaus, I. W., Reuser, F., Thomas, R. C., Tarpley, W. G., *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 1505.
- Romero, D. L. *Ann. Rep. Med. Chem.* **1994**, 29, 123.
- Roy, R. K., Krishnamurti, S., Geerlings, P., Pal. S. *J. Phys. Chem. A* **1998**, 102, 3746.
- Saari, W. S., Hoffman, J. M., Wai, J.S., Fisher, T. E., Rooney, C. S., Smith, A. M., Thomas, C. M., Goldman, M. E., O'Brien, J. A., Numberg, J. H, Quintero, J. C, Schleif, W. A., Emini, E. A., Stern, A. M., Anderson, P. S. *J. Med. Chem.*, **1991**, 34, 2925.
- Saari, W. S., Wai, J.S., Fisher, T. E., Thomas, C. M., Hoffman, J. M., Rooney, C. S., Smith, A. M., Jones, J. M., Bamberger, D. L., Goldman, M. E., O'Brien, J. A., Numberg, J. H, Quintero, J. C, Schleif, W. A., Emini, E. A., Anderson, P. S. *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 3792.
- Safi, B., Choho, K., Geerlings, P. *J. Phys. Chem. A* **2001**, 105, 591.
- Sarin, P. S. *Ann. Rev. Pharmacol.* **1988**, 28, 411.
- Schäfer, W., Friebe, W. -G., Leinert, H., Mertens, A., Poll, T., Saal, W., Zilch, H., Nuber, B., Ziegler, M. L. *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 726.
- Senderowitz, H., Guarnieri, F., Still, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 8211.
- Shenkin, P.S., Mcdonald, Q., *J. Comp. Chem.* **1994**, 15, 899.
- Singh, U. C., Kollman, P.A. *J.Comp. Chem.* **1984**, 5, 129.
- Smerdon, S. J., Jäger, J., Wang, J., Kohlstaedt, L. A., Chirino, A. J., Friedman, J. M., Rice, P. A. *Proc. Natl. Acad. Sci Usa* **1994**, 91, 3911.

- Stewart, J. J. P. *J. Computer-Aided Mol. Des.* **1990**, *4*, 1-105.
- Stewart, J. J. P. *MOPAC: A general molecular orbital package*, QCPE 10, **1990**, 86.
- Smith, R. H., Michejda, C. J., Hughes, S. H., Arnold, E., Janssen, P. A. J., Smith, M. B. K. *J. Mol. Struc. (Theochem)* **1998**, *423*, 67.
- Schmidt, M.W., Baldridge, K.K., Boatz, J.A., Elbert, S.T., Gordon, M.S., Jensen, J. H. Koseki, S., Matsunaga, N., Nguyen, K. A., Su, S. J., Windus, T. L., Dupuis, M. E Montgomery, J. . *J.Comp. Chem.* **1993**, *14*, 1347.
- Spence, R. A., Kati, W. M., Anderson, K. S., Johnson, K. A. *Science* **1995**, *267*, 988.
- Still, W.C., Tempczyk, A., Hawley, R. C., Hendrickson, T.F. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6127.
- Stryer, L. *Bioquímica, Quarta edição*, **1996**, Ed. Guanabara Koogan S. A..
- SYBYL Molecular Modeling System, version 6.5. Tripos Associates Inc., 1699 South Hanley Rd, St. Louis, MO 63144.
- Tanaka, H., Baba, M., Hayakawa, M., Sakamaki, T., Miyasaka, T., Ubasawa, H., Takashima, H., Sekiya, K., Nitta, I., Shigeta, S., Walker, R. T., Balzarini, J., De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 349.
- Tanaka, H., Nakashima, H., Ubasawa, M., Sekiya, K., Nitta, I., Baba, M., Shigeta, S., Walker, R. T., De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 337.
- Tanaka, H., Baba, M., Saito, S., Miyasaka, T., K., Takashima, Sekiya, K., Ubasawa, M., Nitta, I., Walker, R. T., Nakashima, H., De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1508.
- Thomas, W.A. *Progress In Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **1997**, *30*, 183-207.
- GrignonDubois, M., Laguerre, M., Fayet, J.P., Léger, J.M. *J. Of Molecular Structure* **1997**, *415*, 101.

Tramontano, E., Cheng, Y. C. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, 43, 1371.

Wai, J. S., Williams, T. M., Bamberger, D. L., Fisher, T. E., Hoffman, J. M., Hudcosky, R. J., Mactough, S. C., Rooney, C. S., Saari, W. S., Thomas, C. M., Goldman, M. E., Obrien, J. A., Emini, E. A., Nunberg, J. H., Quintero, J. C., Schleif, W. A., Anderson P.S. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 249.

Varmus, H. *Sci. Am.* **1987**, 257, 48.

Veerapandian B. in *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, Fifth edition, Volume 1: Principles and Practice, Edited by Manfred E. Wolff., John Wiley and Sons, Inc. **1995**, 303.

Vinter, J. G., Davis, A., Saunderson, M. R. *J. Comput.-Aided Mol. Design*, **1987**, 1, 31.

Walters, P., Stahl, M. *Babel version 1.1*, **1994**, Department of Chemistry, University of Arizona, Tucson, AZ 85721.

Weiner, S.J., Kollman, P.A., Case, D.A., Singh, U.C., Guio, C., Alagona, G., Profeta, S. Jr., Weiner P. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 765.

Weiner, S.J., Kollman, P.A., Nguyen, D.T. Case, D.A. *J.Comp. Chem.* **1986**, 7, 230.

White, E. L., Burkeheit-Jr., R. W., Ross, L. J., Et Al. *Antiviral Res.* **1991**, 16, 257.

Whittington, R., Brogden, R. N. *Drugs* **1992**, 44, 656.

Williams, R. W., Weaver, J. L., Lowrey, A. H. *Biopolymers* **1990**, 30, 599.

Wold, S., Ruhe, A., Wold, H., Dunn, W. J. *J. Sci. Stat. Comput.*, **1994**, 5, 735.

Young S. D., Britcher S. F., Tran L. O., Payne L. S., Lumma, W. C., Lyle, T A., Huff, J. R., Anderson, P. S., Olsen, D. B., Carroll, S., Pettibone, D. J., Obrien, J. A., Ball, R. G., Debyser, Z., Pauwels, R., Andries, K., Desmyter, J., Kukla, M., Janssen, P. A. J., De Clercq, E. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 1451.

Young S. D., Britcher S. F., Tran L. O., Payne L. S., Lumma, W. C., Lyle, T. A., Huff, J. R., Anderson, P. S., Olsen, D. B., Carroll, S., Pettibone, D. J., O'Brien, J. A., Ball, R. G., Balani, S. K., Lin, J. H., Chen, I. W., Schleif, W. A., Sardana, V. V., Long, W.J. Byrnes, V. W., Emine, E. A., *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, 39, 2602.

Ziegler, T. *Chem. Rev.*, **1991**, 91, 651.