

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Química
Departamento de Físico-Química
Programa de Pós Graduação em Química

**Estudos Teóricos das Propriedades Estruturais e da
Solvatação de Fármacos utilizando a Teoria de
Perturbação Termodinâmica**

Aline Thaís Bruni

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Gomide Freitas

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP

B836e Bruni, Aline Thais
 Estudos teóricos das propriedades estruturais e da sol-
vatação de fármacos utilizando a teoria de perturbação
termodinâmica / Aline Thais Bruni -- Campinas [SP : s.n.].
1996.

Orientador: Luiz Carlos Gomide Freitas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química.

1. Simulação. 2. Fármaco. 3. Monte Carlo. 4.
Perturbação termodinâmica. I. Freitas, Luiz C. Gomide.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Quími-
ca. III. Título.

Bruni, Aline Thais

Estudos teóricos das proprieda
des estruturais e da solvataçã
o de fármacos utilizando a teo
T/UNICAMP/B836e (29144/96)

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Química
Departamento de Físico-Química
Programa de Pós Graduação em Química

**Estudos Teóricos das Propriedades Estruturais e da
Solvatação de Fármacos utilizando a Teoria de
Perturbação Termodinâmica**

Aline Thaís Bruni

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração em Físico-Química.

Campinas-SP
Setembro, 1996

Aos meus pais Nando e
Dola e aos irmãos Lúgia e Fernandinho

Agradecimentos

Ao Luiz Carlos, pela orientação e pela amizade.

À Ana Luiza, pela amizade e pelas inúmeras hospedagens em São Carlos.

À todos os meus amigos, especialmente à Christiane, Cláudia, Andréa, Denise, Valéria, Luciana, Claudinha, Luiza e Giovani, pela lealdade e pelo compartilhamento dos bons e maus momentos.

Aos funcionários de Secretaria de Pós Graduação, especialmente à Denise, por toda a sua paciência.

Aos professores da Química Teórica, especialmente Márcia, Rogério e Bruns, pela agradável convivência. Também ao Hermes, Ednalva, Júlio, Marlon, Fabiane e Sayuri, meus companheiros de sala e responsáveis por um ambiente extremamente gostoso e divertido.

Aos que inicialmente participavam deste grupo e aos que continuam participando: Beto, Luciene, Fábio, Paulo, Vânia. Agradeço a todos pela amizade e ótimo convívio, além dos conhecimentos compartilhados e principalmente à paciência do Beto que sempre me ajudou muito não só na pós graduação, mas também na graduação.

Ao Instituto de Química e ao Cenapad, pelos recursos computacionais e bibliográficos utilizados para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida no período de dois anos.

RESUMO

O método de Monte Carlo com Algoritmo de Metropolis foi usado para estudar efeitos da solvatação sobre a estabilidade conformacional de moléculas em soluções de água e clorofórmio. Os cálculos foram realizados para um ensemble NpT a 298K e 1.0 atm. Os sistemas investigados foram modelados para uma caixa cúbica contendo o soluto e mais 800 moléculas do solvente e condições periódicas de contorno foram utilizadas. As interações moleculares foram calculadas utilizando a combinação dos potenciais de Coulomb e Lennard-Jones. A contribuição da interação soluto-solvente para a energia livre de solvatação foi obtida pela Teoria de Perturbação Termodinâmica. Estes resultados foram utilizados para avaliar as contribuições de grupo para o coeficiente de partição entre soluções de água e clorofórmio. Os presentes resultados mostram que as interações soluto-solvente em meio aquoso aumentam pela substituição de grupos polares, em concordância com teorias clássicas de solvatação. A contribuição da interação de Lennard-Jones é predominante quando o solvente é clorofórmio. Para uma dada geometria do soluto, os resultados mostram uma significativa contribuição para a interação soluto-solvente na energia total do soluto. A conformação molecular com maior estabilidade em fase gasosa não é necessariamente a mais estável após a solvatação. Os resultados apresentados nesse trabalho mostram a importância de considerar a interação soluto-solvente no cálculo das propriedades moleculares. Como estas propriedades são importantes para a investigação das reações entre estrutura e atividade molecular, a

metodologia discutida no presente trabalho é de grande interesse para farmacologia e trabalhos correlatos.

ABSTRACT

The Monte Carlo method with Metropolis algorithm was used to study solvation effects on the conformational stability of molecules in water and chloroform solutions. The calculations were performed in the NpT ensemble at 298K and 1.0 atm. The systems investigated were modelled by cubic box containing the solute molecule plus 800 solvent molecules and cubic box boundary conditions were used. The molecular interactions were calculated using a suitable combination of Lennard-Jones and Coulomb potential. Contribution from solute-solvent interaction to the free energy of solvation were obtained using statistical perturbation theory. These results were then used to evaluate group contributions to the partition coefficient between water and chloroform solutions. The present results shows that solute-solvent interaction in aqueous media is enhanced by the substitution of polar groups, in agreement with classical theories for solvation. The contribution of Lennard-Jones interaction is predominant when the solvent is chloroform. For a given solute geometry, the present results shows a significant contribution of solute-solvent interaction to the total solute energy. Therefore, the molecular conformation with greater stability in gas phase is not necessarily the one more stable after solvation. The results presented in this work shows the importance of considering solute-solvent interaction in the calculation of molecular properties. As such properties are important for the investigation of relationships between structure and molecular activity, the methodology discussed in the present work are of great interest for pharmacology and related works.

ÍNDICE

Capítulo 1

Introdução.....	1
Metodologia.....	6
Método de Monte Carlo.....	11
Condições de Contorno Periódicas.....	16
Algoritmo de Metropolis.....	19
Teoria de Perturbação Termodinâmica.....	21

Capítulo 2

Cálculo do Coeficiente de Partição	25
Sistemas Estudados.....	29
Detalhes Computacionais	33
Resultados.....	43
Discussões e Conclusões	52
Conclusões Finais.....	62

Apêndice A

Tabela A.1. Parâmetros da função potencial e Coulomb e Lennard-Jones para o ácido platânico no mínimo 1	64
Tabela A.2. Parâmetros da função potencial e Coulomb e Lennard-Jones para o ácido platânico no mínimo 2.....	65

Tabela A.3. Parâmetros da função potencial e Coulomb e Lennard-Jones para o Ácido Betulínico no mínimo 1.....	66
Tabela A.4. Parâmetros da função potencial e Coulomb e Lennard-Jones para o Ácido Betulínico no mínimo 2.....	67
Tabela A.5. Resultados referentes aos cálculos de rotação realizados para o ácido betulínico para a obtenção do Diagrama correspondente à Figura 2.5.....	68
Tabela A.6. Resultados referentes aos cálculos de rotação realizados para o ácido platânico para a obtenção do Diagrama correspondente à Figura 2.5.....	68
Tabela A.7. Resultados referentes aos cálculos de rotação simultânea de diedros do ácido betulínico realizados para a obtenção do Diagrama apresentado na Figura 2.6.....	69
Tabela A.8. Resultados referentes aos cálculos de rotação simultânea de diedros do ácido platânico realizados para a obtenção do Diagrama apresentado na Figura 2.7.....	70

Apêndice B

Figura B.1. Acido betulínico em interações com moléculas de água em duas visões diferentes.....	71
Figura B.2. Ácido betulínico em interações com moléculas de clorofórmio em duas visões diferentes.....	72
Figura B.3. Acido platânico em interações com moléculas de água em duas visões diferentes.....	73

Figura B.4. Ácido platânico em interações com moléculas de clorofórmio em duas visões diferentes.....	74
Figura B.5. Representação da caixa cúbica que contém cerca de 800 moléculas de água, e o soluto é a estrutura carbônica básica.....	75
Figura B.6. Representação da caixa cúbica que contém cerca de 800 moléculas de clorofórmio, e o soluto é a estrutura carbônica básica.....	76
Referências Bibliográficas.....	77

Capítulo 1

1.1. Introdução

Estudos sobre sistemas líquidos têm cada vez mais despertado o interesse de vários grupos de pesquisa em química e áreas afins. Aplicações na interface da termodinâmica estatística e química quântica para estudar processos químicos são particularmente importantes. Entre estas aplicações, citamos a pesquisa de propriedades de moléculas com aplicações em farmacologia, uma área de pesquisa denominada correntemente de química medicinal.

A química medicinal compreende a síntese e/ou isolamento de compostos com atividade biológica, a elucidação ou confirmação da estrutura, a caracterização das propriedades físico-químicas, a determinação da atividade biológica, a exploração dessa atividade a nível molecular e o estudo das relações entre a estrutura química e a atividade biológica⁽¹⁾. Assim, a análise das propriedades físico-químicas de compostos com potencialidades farmacológicas é um fator importantíssimo para a elucidação das propriedades de um determinado fármaco.

Com o desenvolvimento computacional registrado nas últimas décadas, a química teórica tornou-se indubitavelmente uma ferramenta poderosa para investigar a estrutura e a dinâmica de sistemas biomoleculares. A literatura registra numerosos exemplos onde cálculos teóricos contribuíram para produzir detalhes mais precisos (e/ou complementares) das propriedades moleculares obtidas em experimentos de laboratório⁽²⁾. Considerando-se que vários métodos experimentais demandam tempo e custo elevado para serem realizados,

é compreensível o interesse dos laboratórios de pesquisa desta área em absorver/desenvolver métodos teóricos aplicáveis ao estudo de compostos com potencialidade em farmacologia. Entre estes, citamos os esforços para o desenvolvimento de campos de força, utilizados para descrever as interações interatômicas e a mecânica de deformação das moléculas⁽³⁾. Uma outra conquista importante para a área foi o aperfeiçoamento dos métodos quânticos semi-empíricos, utilizados para a obtenção de informações eletrônicas sobre moléculas poliatômicas. Estas técnicas computacionais estão sendo crescentemente utilizadas para investigar a geometria de moléculas relativamente grandes⁽²⁾, a conformação e a energia de dímeros, interações entre moléculas e um sítio ativo, efeito do meio na estabilidade conformacional, etc. Ressaltamos porém que, em geral, estas metodologias têm sido aplicadas com sucesso para estudar moléculas isoladas.

Por tratarem sistemas isolados, independentes da interação com moléculas vizinhas, e omitirem também possíveis efeitos da temperatura e da pressão no mecanismos de interação, esses métodos não são suficientes para descrever as propriedades de um fármaco, uma vez que não refletem todos os componentes de um sistema realístico. Para superar estas limitações, é necessário introduzir no formalismo a representação do meio externo. Esta representação leva a um problema de muitos corpos, envolvendo equações que não podem ser resolvidas através de métodos numéricos convencionais. Para resolver estas questões, cada vez mais têm sido utilizadas técnicas de simulações de mecânica estatística, utilizando a dinâmica molecular e o método de Monte Carlo. Aplicações particularmente relevantes para o estudo de

sistemas biomoleculares e solventes não iônicos têm sido apresentadas na literatura.^(4,5,6)

A mecânica estatística, inicialmente introduzida por Maxwell, Boltzmann e Gibbs⁽⁷⁾, contém os princípios fundamentais para fornecer uma explanação mecânica para os fenômenos termodinâmicos observáveis⁽⁸⁾. Neste trabalho vamos utilizar a abordagem da mecânica estatística para estudar alguns compostos com potencialidades farmacológicas.

Há muitas propriedades químicas, físicas e estruturais que podem ser estudadas pela abordagem QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship), e as mais comumente estudadas são as hidrofóbicas, eletrônicas e estéricas.

Descrições tradicionais da estabilidade conformacional de estruturas macromoleculares biologicamente importantes têm se baseado no conceito de uma interação hidrofóbica que representa alguma espécie de atração efetiva entre os componentes apolares destas estruturas^(1,9). Devemos considerar que sobre a denominação geral ‘efeitos solvofóbicos’ estão embutidos uma série de fenômenos complexos, que dependem da estrutura molecular do soluto e da interação deste com o solvente. Em biorgânica, uma atividade atual importante é a pesquisa para o desenvolvimento de receptores sintéticos com capacidade para ligar seletivamente moléculas orgânicas neutras em solventes orgânicos ou água⁽¹⁰⁾.

Em particular, as propriedades hidrofóbicas podem ser quantificadas para moléculas completas ou para substituintes individuais com uma certa facilidade. Entretanto, devido à especificidade do

comportamento eletrônico, relacionada com a impossibilidade de localizar os elétrons em partes específicas de uma molécula, as propriedades eletrônicas e estéricas são mais difíceis de se quantificar. Para superar esta dificuldade, esforços têm sido efetuados para quantificar a ação de substituintes individuais. Neste caso, estudam-se as modificações que são observadas pela substituição de grupos em uma estrutura básica mantida inalterada.

O caráter hidrofóbico é um dos principais parâmetros para a análise de estrutura-atividade na pesquisa farmacológica e pode ser medido pelo coeficiente de partição, que é a distribuição de um soluto entre dois meios diferentes^(1,11,12). O coeficiente de partição está relacionado com a energia livre de transferência de um determinado soluto entre dois solventes diferentes, de acordo com a equação⁽¹¹⁾:

$$P_{B \rightarrow A} = \exp[-\Delta G_{A \rightarrow B}/RT] \quad (1.1)$$

Em geral, na pesquisa farmacológica é interessante conhecer propriedades de um conjunto de moléculas que possuem uma estrutura básica comum, e que diferem entre si pela presença de alguns substituintes. Nestes casos, importa conhecer como as propriedades físico-químicas destas moléculas variam ao longo de uma série de substituintes.

Este trabalho tem como objetivo utilizar ferramentas de química teórica, implementadas com métodos computacionais, para calcular algumas propriedades de uma série de moléculas que possuem uma estrutura básica em comum. Estes métodos serão utilizados para

elucidar a estrutura geométrica destes fármacos, bem como para representar efeitos do solvente sobre as propriedades físico-químicas destes. Entre os cálculos realizados destacamos:

- a utilização de métodos teóricos para obter e quantificar a diferença na energia conformacional de moléculas isoladas.
- o cálculo da energia de interação soluto-solvente para quantificar o efeito deste na estabilidade dos conformeros obtidos em fase gasosa.
- cálculo do coeficiente de partição entre um meio hidrofóbico e hidrofílico para racionalizar como este coeficiente varia ao longo de uma série de modificações na estrutura básica de um conjunto de compostos.

No próximo tópico será descrita a metodologia utilizada para realizar estes estudos.

1.2. Metodologia

A mecânica quântica é a ciência que pode ser utilizada para obter propriedades de moléculas individuais e interações intermoleculares a partir de primeiros princípios. A termodinâmica clássica estabelece as relações matemáticas entre observáveis macroscópicas de um sistema em equilíbrio, mas não fornece uma interpretação molecular para estudar os sistemas em questão. Para que se possa estabelecer uma relação entre as forças intermoleculares e o comportamento termodinâmico de um sistema é necessário estabelecer um elo de ligação entre os formalismos de mecânica quântica e a termodinâmica clássica. Esta ligação é o objetivo principal do formalismo de mecânica estatística^(13,14,15). Entretanto, a utilização deste formalismo para sistemas de interesse para a química é dificultado devido ao elevado número de graus de liberdade para os sistemas moleculares em geral⁽¹⁶⁾.

Para uma descrição completa do sistema macroscópico devem-se especificar as substâncias que o compõem e suas interações e as relações entre o sistema e sua vizinhança. Em geral, o estado de um sistema é completamente definido pelo valor de quantidades termodinâmicas, tais como pressão, volume, temperatura e outras⁽¹⁷⁾. Neste trabalho vamos considerar estados macroscópicos definidos por pressão, temperatura e número de partículas constantes. Para uma descrição desta natureza, existe uma quantidade extremamente elevada de estados microscópicos que são compatíveis com o estado termodinâmico, ou seja, existe uma enormidade de configurações

espaciais das moléculas do sistema compatíveis com os valores especificados para pressão e temperatura⁽¹⁸⁾.

Um estado microscópico é definido em termos da posição (\mathbf{r}) e do momento (\mathbf{p}) de todas as partículas que o constituem. Estes estados são determinados pelo Hamiltoniano clássico que, para um sistema de N moléculas, pode ser expresso como⁽¹⁹⁾:

$$H(r, p) = K(p) + U(r) \quad (1.2)$$

onde K é a energia cinética e U é a energia potencial do sistema em questão.

A energia cinética é dada pela expressão

$$K(p) = \sum_{i=1}^N \frac{p_i^2}{m_i} \quad (1.3)$$

onde m_i é a massa da molécula i .

A energia potencial de um sistema é o somatório de todas as interações que ocorrem entre as partículas constituintes. Esta energia é acrescida da energia interna de cada molécula i . Considerando as partículas rígidas, a energia potencial escrita em termos das coordenadas de cada partícula é dada como:

$$U(r) = U_0 + \sum_i U_1(r_i) + \sum_i \sum_{j>i} U_r(r_i, r_j) + \dots \quad (1.4)$$

onde U_0 é a energia interna da molécula, U_1 é a energia potencial devida a efeitos externos e os termos seguintes são as interações entre dois ou mais corpos.

A soma de todos os potenciais é conhecida como energia potencial configuracional U_c .

Para os sistemas a serem estudados neste trabalho, a interação entre dois corpos, em termos práticos, é considerada suficiente para representar a superfície de potencial. Isto porque as interações que ocorrem entre três ou mais corpos contribuem muito pouco para a energia configuracional total do sistema. Em geral, a contribuição para a energia destas interações de muitos corpos é menor que a variação da energia interna quando a molécula é considerada não-rígida.

Assim, é possível definir um potencial de pares efetivos e obter valores confiáveis para a energia configuracional de um sistema molecular. Em geral, este potencial é representado pela soma dos potenciais de Coulomb e Lennard-Jones, conforme mostrado abaixo^(19,20,22):

$$U_c = \sum_i \sum_j \left[\frac{q_i q_j}{r_{ij}} + \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right] \quad (1.5)$$

onde r_{ij} é a distância entre os sítios em questão, A_{ij} e B_{ij} são termos representativos do potencial de interação. Observa-se que na equação acima o potencial de interação é escrito como uma combinação da interação entre sítios moleculares. Geralmente, os parâmetros de potencial são definidos para cada sítio e a interação entre sítios cruzados A_{ij} e B_{ij} é obtida por regras de combinação dos valores para a interação entre sítios iguais:

$$A_{ij} = (A_i A_j)^{1/2} \quad B_{ij} = (B_i B_j)^{1/2} \quad (1.6)$$

Os termos $[ii]$ e $[jj]$ são expressos em função dos parâmetros de Lennard-Jones $\{\varepsilon$ e $\sigma\}$, de acordo com as expressões:

$$A_{ii} = 4\varepsilon_i \sigma_i^{12} \quad B_{ii} = 4\varepsilon_i \sigma_i^6 \quad (1.7)$$

Um *ensemble* é uma terminologia utilizada em mecânica estatística para representar uma coleção imaginária de estados, geralmente estados quânticos, que têm parâmetros termodinâmicos comuns. As posições e momentos de cada estado microscópico são associados a coordenadas em um espaço multidimensional, chamado de espaço de fase $\Omega^{(20)}$.

Assim, uma propriedade macroscópica é representada pelos valores médios dos estados microscópicos do sistema, ou seja, a média do *ensemble*^(14,18). Sendo A a representação de uma propriedade termodinâmica qualquer, a média do *ensemble* pode ser escrita como:

$$\langle A \rangle = \int_{\Omega} A(x)P(x)dx \quad (1.8)$$

onde $P(x)$ é a densidade de probabilidade, que depende explicitamente do tipo de ensemble e do sistema considerado.

Para um ensemble NpT^\dagger , os valores médios observáveis podem ser calculados de acordo com a equação⁽²³⁾:

[†] Ensemble NpT : Ensemble com número de partículas, pressão e temperatura constantes.

$$\langle A \rangle = \frac{1}{Z} \int_0^\infty A Z_N(V, T) \exp\left(\frac{-PV}{kT}\right) dV \quad (1.9)$$

onde V é o volume, P é a pressão, T é a temperatura e k a constante de Boltzmann. A função de partição para este tipo de ensemble é obtida como a integração sobre a variação do volume:

$$Z = \int_0^\infty Z_N(V, T) \exp\left(\frac{-PV}{kT}\right) dV \quad (1.10)$$

Nesta equação Z_N é a função de partição para o ensemble NVT^\ddagger , é definida como:

$$Z_N(V, T) = \frac{1}{N!} \frac{1}{h^{3N}} \int \dots \int \exp[-H(\vec{r}, \vec{p})/kT] d\vec{r} d\vec{p} \quad (1.11)$$

Para potenciais representativos de sistemas moleculares, as equações acima não podem ser integradas analiticamente ou com a utilização de métodos numéricos convencionais. Devido a esta dificuldade numérica, foram desenvolvidos métodos alternativos, capazes de resolver com precisão estas equações para sistemas envolvendo muitos corpos. Na próxima seção será discutido o método de Monte Carlo, que tem sido utilizado com sucesso para calcular valores médios de observáveis termodinâmicas em sistemas moleculares.

[‡] Ensemble NVT: Ensemble com número de partículas, volume e temperatura constantes

1.3. Método de Monte Carlo

Em mecânica estatística, uma propriedade de equilíbrio pode ser expressa como uma média sobre microestados do sistema⁽²⁵⁾. Contudo, nem sempre as equações envolvidas podem ser obtidas por um cálculo matemático direto e a computação numérica é uma alternativa para se obter os valores médios a partir do formalismo de mecânica estatística⁽²⁶⁾.

O método de Monte Carlo é uma técnica numérica que pode ser utilizada para calcular valores de integrais em espaços multidimensionais⁽²⁴⁻²⁸⁾. Para um sistema molecular, o número de pontos para especificar todas as posições moleculares é da ordem no número de Avogadro. Considerando-se que o potencial de interação depende das coordenadas relativas de todas as moléculas do sistema, compreende-se que as integrais apresentadas nas equações [1.8-1.11] não podem ser resolvidas analiticamente ou por métodos numéricos convencionais. Logo, o método a ser utilizado no presente problema deve ser particularmente indicado para calcular as integrais que aparecem no tratamento teórico de muitos corpos, como é o caso da termodinâmica de líquidos.

Em resumo, o método de Monte Carlo aplicado para a resolução das equações citadas na seção anterior consiste em gerar um conjunto de configurações representativas do sistema, utilizando técnicas de probabilidade. Os valores médios das propriedades que devem ser encontradas são então calculados utilizando este conjunto de pontos (configurações) que foram gerados. Quando a amostragem efetuada é

bem representativa, a média amostral obtida converge para o valor médio esperado da resolução exata da integral correspondente.

Para formular com simplicidade como funciona o método de Monte Carlo, podemos tomar como exemplo o cálculo de uma integral para uma função monodimensional $g(x)$ no intervalo $a \leq x \leq b$. Uma aproximação do Teorema do Valor Médio permite escrever a relação:

$$I = \int_a^b g(x) dx = \langle g \rangle (b - a) \quad (1.12)$$

o que torna possível o conhecimento do valor da integral I a partir do valor médio de $g(x)$ no intervalo $[a, b]$.

Quando o método de Monte Carlo seleciona as configurações do sistema aleatoriamente, a técnica é conhecida como amostragem simples. Contudo, com esta técnica de amostragem simples nem sempre é possível a convergência para o valor médio. Isto ocorre porque esse tipo de amostragem nem sempre gera configurações representativas dos estados microscópicos relevantes para o estado de equilíbrio termodinâmico correspondente. Para resolver este problema, toma-se então uma função peso $p(x) > 0$ definida de tal forma que:

$$\int_a^b p(x) dx = 1 \quad (1.13)$$

Aplicando a função peso na integral I , temos que:

$$I = \int_a^b \frac{g(x)}{p(x)} p(x) dx \quad (1.14)$$

Assim, calcula-se o valor da integral I utilizando-se os pontos x_i escolhidos de acordo com a distribuição $p(x)dx$. A convergência é acelerada se as configurações x_i escolhidas forem representativas para o cálculo do valor médio da função $g(x)$ no intervalo especificado. Neste caso, os pontos constituintes do espaço amostral não foram escolhidos totalmente ao acaso, mas de acordo com uma distribuição de probabilidade onde os pontos que contribuem mais para o valor médio terão maior influência. Dessa forma é então introduzido o conceito de amostragem preferencial^(25.29).

No problema que estamos interessados, uma configuração do sistema difere de outra com relação às posições relativas das moléculas. Portanto, partindo-se de uma configuração inicial, novas configurações podem ser obtidas movimentando-se as moléculas que constituem o sistema que está sendo estudado. O problema básico consiste então em movimentar as moléculas e gerar uma sequência de configurações que sejam representativas dos estados microscópicos que ocorrem no estado de equilíbrio termodinâmico do sistema.

Seja $\langle A \rangle$ um valor médio de uma observável macroscópica, tal como dado na equação (1.8). A partir da definição da integral de Riemann, a quantidade $\langle A \rangle$ pode ser aproximada como um somatório tipo^(25.27):

$$\langle A \rangle = \frac{\sum_{i=1}^M A_{x_i} \exp[-H_{x_i}/kT]}{\sum_{i=1}^M \exp[-H_{x_i}/kT]} \quad (1.15)$$

Na equação acima, cada ponto ' i ' representa uma configuração do sistema, ou seja, um conjunto de coordenadas moleculares. No entanto, na equação acima os pontos são escolhidos aleatoriamente, e como já foi dito essa não é a melhor forma de se fazer uma amostragem. Escolhendo esse conjunto de pontos de acordo com uma distribuição de probabilidade, a média (1.9) pode ser descrita como:

$$\bar{A}_x = \frac{\sum_{i=1}^M A_{x_i} \exp[-H_{x_i}/kT] P_{x_i}}{\sum_{i=1}^M \exp[-H_{x_i}/kT] P_{x_i}} \quad (1.16)$$

onde P_{x_i} representa a distribuição de probabilidade.

A forma mais simples e natural para escolher P_{x_i} é considerar esta distribuição proporcional ao fator de Boltzmann, como mostra a equação abaixo:

$$P_{x_i} \propto \exp[-H_{x_i}/kT] \quad (1.17)$$

Para reduzir a variância de $\langle A \rangle$ praticamente zero, P_{x_i} deve ser reescrita como uma distribuição de equilíbrio:

$$P_{eq} = \frac{1}{Z} \exp[-H_{x_i}/kT] \quad (1.18)$$

onde Z é a função de partição, dada de acordo com a equação a seguir:

$$Z = \int_{\Omega} \exp[-H_{xi}/kT] dx \quad (1.19)$$

Assim, substituindo-se o valor de P_{xi} na equação (1.16) pelo valor definido na equação (1.18), os fatores k e Boltzmann se cancelam e a equação (1.15) se reduz a uma média aritmética simples:

$$\bar{A} = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M A_{xi} \quad (1.20)$$

Entretanto, deve-se ressaltar que para utilizar a equação acima, as configurações escolhidas devem ser representativas para o estado de equilíbrio do sistema. O algoritmo utilizado para gerar esta sequência de configurações será discutido em uma seção posterior.

1.4. Condições de contorno periódicas

A reprodução de dados termodinâmicos em simulação computacional não é possível sem algumas aproximações.

Quando aproximamos a média $\langle A \rangle$ como uma soma na forma de (1.15), duas grandes dificuldades aparecem. A primeira delas está relacionada com a geração do conjunto de configurações do sistema. Para um sistema com N átomos, uma configuração significa um conjunto de $3N$ coordenadas, e isso não é facilmente calculável se N é da ordem de 10^{23} , ou seja, da ordem do número de Avogadro. Isto ocorre devido às limitações encontradas para o cálculo do potencial de interação e também da capacidade de armazenamento das coordenadas moleculares. Estes problemas podem ser contornados com uma escolha para o valor de N da ordem de algumas centenas. Esta solução implica em um questionamento, ou seja, se é possível reproduzir as propriedades de um sistema macroscópico utilizando um número pequeno de partículas.

A segunda dificuldade está relacionada com o número de configurações M geradas para calcular o espaço amostral, um número que também deve ser finito ($\sim 10^7$), o que pode também gerar problemas para a convergência da somatória⁽²⁰⁻²²⁾. Na maioria dos cálculos, N é tomado da ordem de 10^3 ou menos partículas. Contudo, um sistema com esse número de partículas apresentará problemas com efeitos de superfície. Para minimizar esses efeitos são então introduzidas condições de contorno periódicas⁽²⁵⁾. Estas condições de contorno consistem em tomar uma cela, cujas paredes são fictícias,

contendo da ordem de 10^2 a 10^4 partículas. Esta cela, chamada de cela de referência, é então recoberta em todas as direções por celas idênticas (réplicas), formando um sistema com infinito número de moléculas, como mostra a Figura 1.1.

As laterais das celas são fictícias e não oferecem qualquer resistência para o movimento das partículas. Em um sistema isolado com condições de contorno periódicas, massa, momento e energia são conservados. Quando uma partícula sai da cela central do sistema atravessando uma borda, uma “partícula-imagem” passa através da lateral oposta, dirigindo-se para o interior da cela central. Na nova posição, a “partícula-imagem” passa a pertencer ao conjunto de partículas da cela central. Assim, o problema de efeitos de superfície é eliminado e todas as partículas interagem com vizinhanças semelhantes. Para partículas que interagem segundo um potencial de curto alcance, as dimensões da cela de referência devem ser escolhidas com tamanho suficiente para evitar a interação entre uma dada partícula e suas imagens nas celas réplicas.

A quantidade de interações a ser calculada entre as partículas é muito grande, o que torna a convergência do cálculo da energia potencial muito lenta. Para resolver esse problema pode ser introduzido um raio de corte com o objetivo de se restringir o número de interações a ser calculado para cada partícula. Com o raio de corte é definida uma região esférica centrada em uma partícula e somente aqueles que estão dentro desta esfera interagem com a partícula central. Nesta aproximação, assume-se que as partículas que estão fora da região esférica contribuem de forma residual para o cálculo das propriedades

do sistema. Assim, o número de interações torna-se menor e o cálculo pode ser então efetuado com redução no tempo de computação.

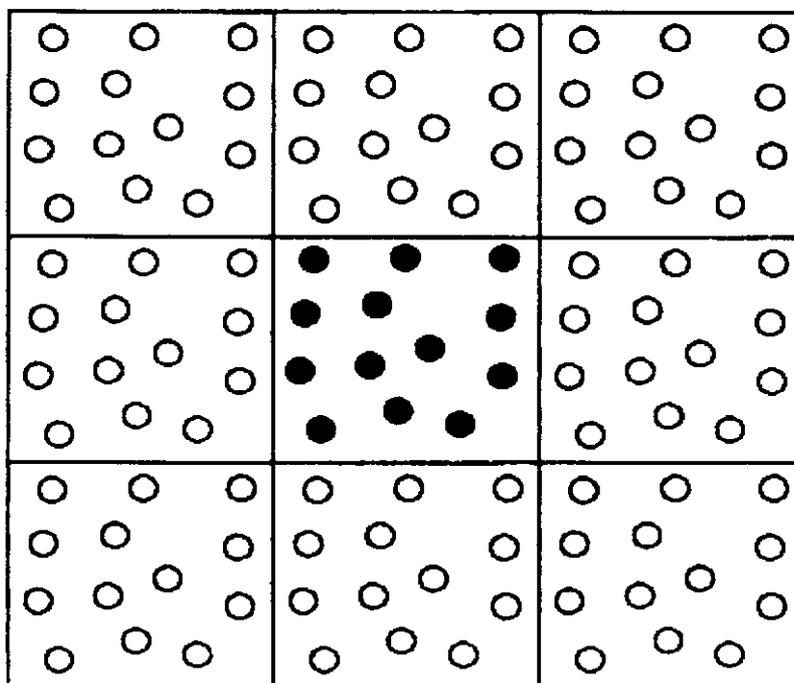


Figura 1.1. Condição de contorno periódica para um sistema bidimensional. As paredes das caixas são fictícias. Dependendo do potencial de interação, moléculas contidas na cela central podem interagir com moléculas das celas imagens.

1.5. Algoritmo de Metropolis

Metropolis e colaboradores desenvolveram um algoritmo para gerar uma sequência de configurações necessárias para a convergência do somatório apresentado na equação (1.20)^(22, 25, 29). Este algoritmo está baseado na geração de movimentos moleculares aleatórios, que podem ou não ser aceitos:

1. Escolhe-se uma configuração N inicial;
2. Calcula-se a energia total desta configuração;
3. Gera-se uma nova configuração ao acaso;
4. Calcula-se a energia total desta nova configuração;
5. Calcula-se a diferença de energia potencial entre as duas configurações (n) e (n+1)

$$\Delta U = U_{n+1} - U_n$$

6. Se $\Delta U < 0$, a nova configuração é aceita. Vai para o passo 9.
7. Se $\Delta U > 0$, seleciona-se um número randômico no intervalo $0 \leq \xi \leq 1$:
8. Se $\exp[-\Delta U/kT] > \xi$, a nova configuração é aceita.
Se $\exp[-\Delta U/kT] < \xi$, a nova configuração é rejeitada e a configuração inicial é contada novamente.
9. Calcula-se o valor de A para a configuração em questão, e volta-se ao passo 3.

Este algoritmo gera um conjunto de configurações para efetuar o cálculo do valor médio de uma variável mecânica qualquer. Na prática,

uma nova configuração é gerada pela translação e rotação de uma molécula escolhida ao acaso. Estes movimentos moleculares são efetuados de tal forma a garantir que, em média, 40% das tentativas tenham sucesso. Isto requer que os valores máximos para os deslocamentos sejam fixados durante uma etapa do cálculo conhecida como “fase de equilíbrio”. Desde que em cada instante do cálculo as posições moleculares são conhecidas, pode-se calcular também correlações espaciais médias das moléculas. Estas correlações espaciais são úteis para a análise do grau de organização molecular existente no sistema que está sendo investigado.

Cabe considerar que com a equação (1.20) pode-se calcular valores médios de variáveis mecânicas, ou seja, aqueles cujo valor é definido para uma dada configuração molecular. Este é o caso particular da energia interna, entalpia, densidade, volume, etc. Variáveis termodinâmicas como a energia livre e a entropia não podem ser associadas a um valor configuracional e não podem ser calculadas segundo o algoritmo acima. Na próxima seção discutiremos de que forma a variação de energia livre pode ser obtida ao longo de uma transformação qualquer.

1.6. Teoria de Perturbação Termodinâmica

Para sistemas com temperatura e pressão constantes, uma condição que pode ser aplicada a sistemas metabólicos, a condição de espontaneidade pode ser obtida pelo uso da Energia Livre de Gibbs⁽³⁴⁾.

Os fundamentos da termodinâmica estatística necessários para calcular a variação de energia livre em uma transformação já existem há muitos anos, mas só recentemente estes foram implementados através de técnicas de simulação computacional^(35,36).

O método de Monte Carlo, ou qualquer método que associe dados de uma configuração molecular com uma grandeza termodinâmica, não pode ser utilizado diretamente para calcular valores médios de variáveis não mecânicas, como é o caso da energia livre e da entropia. Isto ocorre porque, dada uma distribuição espacial de moléculas, não é possível associar a esta um valor para a entropia, ou para a energia livre.

Segundo a mecânica estatística, a energia livre de um sistema pode ser escrita de acordo com a função de partição:

$$G = -kT \ln Z \quad (1.21)$$

onde Z é a função de partição para sistemas contínuos, definida como na equação (1.11):

$$Z = \sum \exp[-\varepsilon_i/kT] = \frac{1}{N!} \frac{1}{h^{3N}} \int \dots \int \exp[-H(\vec{r}, \vec{p})/kT] d\vec{r} d\vec{p}$$

A primeira parte desta equação corresponde à definição para um sistema quantizado, enquanto a integral define a função de partição para um sistema onde a energia é contínua.

Sendo dois sistemas X e Y, é fácil demonstrar que^(30,31) a variação de energia livre para a transformação $X \rightarrow Y$ é dada pela relação entre as funções de partição abaixo:

$$\Delta G = -kT \ln \frac{Z_Y}{Z_X} \quad (1.22)$$

Substituindo a definição de função de partição na equação anterior, temos que:

$$\Delta G = -kT \left[\frac{\int \dots \int \exp[-H_Y/kT] d\vec{r} d\vec{p}}{\int \dots \int \exp[-H_X/kT] d\vec{r} d\vec{p}} \right] \quad (1.23)$$

Na equação anterior, devido aos motivos delineados anteriormente, nem numerador e nem denominador podem ser calculados por métodos de integração convencionais. Assim, para que o cálculo da energia livre torne-se possível, é necessário introduzir um acoplamento entre os sistemas X e Y, isto é, admitir que X e Y não são muito diferentes entre si. Em linguagem matemática, isto significa que o sistema Y é obtido a partir do sistema X via uma transformação matemática (perturbação). O formalismo da teoria de perturbação em mecânica estatística foi inicialmente introduzido por Zwanzig, em 1954⁽³²⁾. A essência deste formalismo consiste em escrever o hamiltoniano do sistema Y em função do hamiltoniano do sistema X, conforme a equação abaixo:

$$H_Y = H_X + \Delta H \quad (1.24)$$

onde ΔH é o termo perturbativo. Substituindo-se esse hamiltoniano na equação da energia livre (1.23), temos que:

$$\Delta G = -kT \left[\frac{\int \dots \int \exp[-H_X/kT] \exp[-\Delta H/kT] d\bar{r} d\bar{p}}{\int \dots \int \exp[-H_X/kT] d\bar{r} d\bar{p}} \right] \quad (1.25)$$

Na equação (1.25), o primeiro exponencial no numerador, dividido pelo denominador, é definido como a probabilidade de distribuição de configurações para o sistema X. Logo a equação (1.25) pode ser interpretada como o cálculo do valor esperado do termo $[\exp(-\Delta H/kT)]$ em relação à distribuição de probabilidades definida pelo sistema X. Obtém-se assim um equação que relaciona a diferença de energia livre entre os sistemas X e Y com o termo $[\exp(-\Delta H/kT)]$. Desde que ΔH é uma diferença de energia mecânica, o valor esperado acima pode ser calculado pelo método de Monte Carlo. Assim, a equação anterior pode ser reescrita como:

$$\Delta G = -kT \ln \langle \exp[-\Delta H/kT] \rangle_X \quad (1.26)$$

onde $\langle \dots \rangle_X$ é a média configuracional sobre configurações possíveis para o sistema de referência X, de acordo com a densidade de probabilidade. A aplicação prática da Teoria de Perturbação Termodinâmica está limitada a casos onde a diferença de energia livre entre os sistemas X e Y é pequena. Uma tal situação é obtida quando os dois sistemas são muito similares. Contudo, este não é o caso para a maioria dos processos químicos de interesse. Assim, quando a diferença de energia entre os sistemas X e Y for muito grande, é necessário que a

perturbação seja conduzida através de estados intermediários entre X e Y. É então necessário utilizar um parâmetro de acoplamento λ , associado aos estados inicial e final, que define então estados intermediários híbridos:

$$H_{\lambda} = \lambda H_Y + (1 - \lambda) H_X \quad (1.27)$$

Na Equação (1.27), λ assume valores discretos no intervalo entre [0,1], e a média é determinada entre sistemas definidos por λ_i e λ_{i-1} , de modo que a diferença de energia livre entre estes seja pequena, em geral, não ultrapassando 2kcal/mol. Assim, podemos reescrever a equação (1.26) como:

$$\Delta G_{\lambda_i} = -kT \ln \left\langle \exp \left[- \left(H_{\lambda_{i-1}} - H_{\lambda_i} \right) / kT \right] \right\rangle \quad (1.28)$$

Como as simulações ao longo do caminho definido pela variação de λ são realizadas separadamente, a energia livre total é obtida com o somatório de todos os valores médios calculados em cada etapa da perturbação:

$$\Delta G = \sum_{i=0}^{i=1} \Delta G_{\lambda_i} \quad (1.29)$$

A escolha do parâmetro de acoplamento depende do tipo de sistema que está sendo investigado, e muitas vezes o caminho utilizado para conduzir a perturbação pode não ter significado físico. Desde que a energia livre é uma função de estado, a escolha do parâmetro de acoplamento não interfere no valor final calculado.

Capítulo 2

2.1. Cálculo do Coeficiente de Partição

O coeficiente de partição é definido como a relação entre a distribuição relativa de uma determinada droga entre um meio hidrofílico e outro hidrofóbico, conforme a expressão abaixo^(1,11,12):

$P = \text{Concentração da droga no meio hidrofóbico} / \text{Concentração da droga no meio hidrofílico}$

Assim, o coeficiente de partição é considerado uma constante de equilíbrio para a distribuição da droga entre o meio hidrofóbico e hidrofílico⁽³⁹⁾. Assim, este coeficiente está relacionado com a energia livre de transferência através da equação:

$$\Delta G = -2.3RT \log P \quad (2.1)$$

Segundo a definição do potencial de interação intermolecular utilizado neste trabalho, equação (1.5), a energia de interação é obtida pela soma de contribuições de potenciais de Lennard-Jones e Coulomb. Para comodidade de discussão, vamos denominar estas energias segundo os termos usuais, interação de Van der Waals e interação eletrostática. Desde que a energia de interação pode ser dividida em dois termos distintos, esta divisão se propaga para definição da energia livre, segundo as equações (1.23) e (1.26). Logo, podemos considerar que a energia livre de solvatação para uma molécula é a soma das contribuições das energias livre de interação eletrostática e de Van der Waals. Logo, pode-se considerar que a energia livre de transferência

entre dois solventes é também decomposta nas contribuições de Van der Waals e eletrostática, obtendo-se a equação abaixo:

$$\Delta G_t = \Delta G_t^{elet} + \Delta G_t^{vdW} \quad (2.2)$$

onde ΔG_t é a energia livre de transferência.

Substituindo a equação (2.2) na equação (2.1), podemos obter:

$$P = \exp \left[- \left(\frac{\Delta G_t^{elet} + \Delta G_t^{vdW}}{kT} \right) \right]$$

$$P = \exp \left(\frac{-\Delta G_t^{elet}}{kT} \right) \exp \left(\frac{-\Delta G_t^{vdW}}{kT} \right)$$

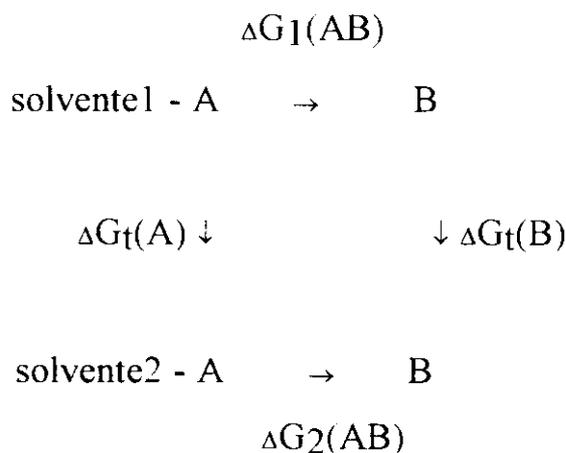
$$P = P_{elet} P_{vdW} \quad (2.3)$$

Esta equação mostra que o coeficiente de partição pode ser analiticamente decomposto em contribuições distintas. Ao que sabemos, a equação (2.3) não foi observada por outros autores que trabalham nesta área. Isto se deve, supomos, ao fato de grande parte dos pesquisadores da área estarem interessados em relacionar medidas experimentais com resultados termodinâmicos diretamente, sem utilizar a mecânica estatística para fazer a ligação entre propriedade molecular e dado termodinâmico. A equação (2.3) é importante pois fornece elementos numéricos para modelar o coeficiente de partição. Através desta equação pode-se inferir que tipo de grupo químico deve ser

substituído em uma estrutura básica para modificar a distribuição relativa entre o meio hidrofílico e o hidrofóbico.

A seguir, mostraremos como a Teoria de Perturbação Termodinâmica pode ser utilizada para calcular a variação do coeficiente de partição ao longo de uma série de compostos que possuem a mesma estrutura básica e diferem em algum substituinte.

Vimos que o coeficiente de partição pode ser calculado se a energia livre de transferência for conhecida. Vamos mostrar como a teoria de perturbação implementada com a mecânica estatística pode ser utilizada para calcular a energia livre de transferência de um soluto entre dois solventes diferentes. Este procedimento pode ser demonstrado através do ciclo termodinâmico apresentado abaixo:



onde A e B são dois solutos. De acordo com o ciclo acima, temos que :

$$\Delta G_t(B) - \Delta G_t(A) = \Delta G_2(AB) - \Delta G_1(AB) \quad (2.4)$$

$$\Delta \log P = \log P_B - \log P_A = \frac{\Delta G_1(AB) - \Delta G_2(AB)}{2,3RT} \quad (2.5)$$

Neste ponto chamamos a atenção para o fato que muitas vezes interessa conhecer para um conjunto de compostos, o comportamento relativo das propriedades físico-químicas ao longo de uma série. Desde que valores relativos são úteis para uma análise do comportamento de uma série de compostos, o valor da energia livre de transferência para a estrutura básica pode ser tomado como referência, ou arbitrado como sendo zero. Assim, a modificação soluto $A \rightarrow B$ pode ser entendida como a troca, na estrutura básica, do substituinte A pelo substituinte B. Com este procedimento, obtém-se ao longo de uma série, o valor relativo para o coeficiente de partição em função do substituinte que é introduzido.

2.2. Sistemas Estudados

Na procura de produtos naturais como agentes que interferem na reprodução do vírus que provoca a AIDS, foram descobertos dois compostos que apresentaram significativa atividade anti-HIV *in vitro*⁽³⁷⁾. Estes compostos são os ácidos betulínico [1] e platânico [2]. Foram inicialmente extraídos da *Syzygium Claviflorum* e também estão contidos nas folhas de *Eugenia Florida DC* (árvores da família Myrtaceae) e foram isolados no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSCar⁽³⁸⁾. Ambos se mostraram como inibidores da replicação do HIV em células linfócitas H9. Estes dois ácidos mostraram-se capazes, em teste de laboratório, de impedir ou bloquear a entrada do vírus na célula, determinando a morte deste por envelhecimento⁽³⁴⁾. Existem ainda outros 18 compostos estruturalmente relacionados a estes ácidos, que são então apresentados na Tabela 2.1⁽³⁷⁾. Outros dados explicativos estão apresentados na Figura 2.1.

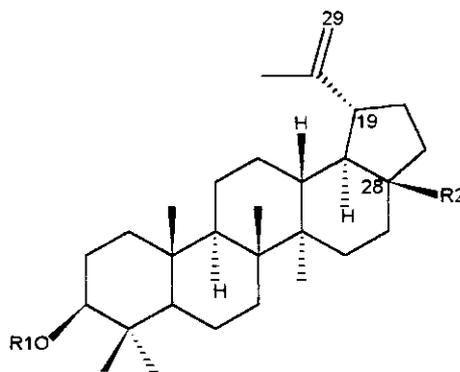
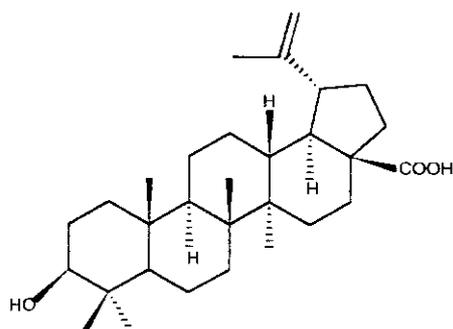
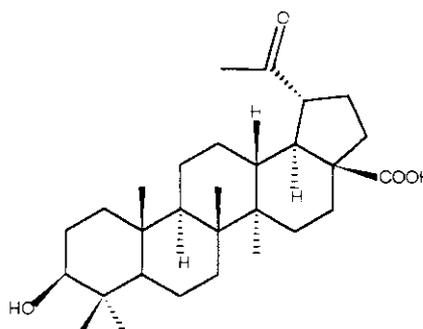


Figura 2.1 - Estrutura carbônica básica dos compostos estudados



[1]

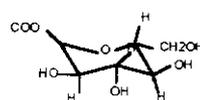


[2]

Figura 2.2 - [1]: ácido betulínico, [2] ácido platânico

Tabela 2.1 - Derivados dos ácidos betulínico e platânico a partir da estrutura básica

Compostos	R=19	R1	R2
3	CH ₃ CHCH ₃	H	COOH
4	CH ₃ C=CH ₂	H	CH ₂ OH
5	CH ₃ C=CH ₂	H	COCH ₂ COOCH ₃
6	CH ₃ C=CH ₂	AcO	COOH
7	CH ₃ C=CH ₂	C ₆ H ₅ CO	COOH
8	CH ₃ C=CH ₂	COCH=CHCH ₃	COOH
9	CH ₃ C=CH ₂	SO ₃ K	COOH
10	CH ₃ C=CH ₂	CO(CH ₂) ₂ COOH	COOH
11	CH ₃ C=CH ₂	=O	COOCH ₃
12	CH ₃ C=CH ₂	H	COOCH ₃
13	COCH ₃	=O	COOCH ₃
14	COCH ₃	H	COOCH ₃

15	COCH ₃	AcO	COOH
16		H	COOCH ₃
17	COCH ₃	H	COOH
18	CH ₃ C=CH ₂ /OH	H	COOH
19	HOCH ₂ CO	H	

O composto 20 tem a estrutura carbônica ligeiramente diferente de todos os outros, conforme indica a figura a seguir:

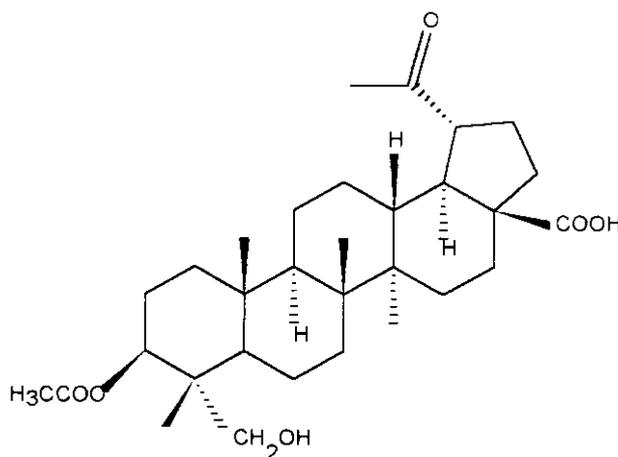


Figura 2.3 - Estrutura carbônica do composto 20.

Neste trabalho estamos utilizando métodos de Química Teórica para encontrar dados físico-químicos que permitam relacionar estrutura e propriedade nestes compostos. A metodologia que estamos utilizando é geral, sendo que alguns aspectos da mesma foram desenvolvidos no presente trabalho. O desenvolvimento metodológico, que será apresentado a seguir, envolveu o reconhecimento de possibilidades de cálculo em mecânica estatística e a obtenção de dados importantes para a elucidação de relações entre estrutura e propriedades de moléculas com possíveis atividades farmacológicas.

Foram realizados estudos com a estrutura carbônica básica comum a todos os compostos apresentados na Tabela 2.1 e também com os ácidos betulínico e platânico. Inicialmente, estudos foram realizados para as moléculas em fase gasosa, e as estruturas conformacionais mais estáveis foram identificadas. Em seguida, procedeu-se a um estudo da influência do meio sobre a estabilidade das estruturas obtidas em fase gasosa. Estes cálculos foram realizados, considerando-se a solvatação em água e clorofórmio. Para a modelar a solvatação, foram consideradas 800 moléculas do solvente. A escolha deste dois solventes está relacionada com a representação de dois meios com propriedades distintas, hidrofílicas (água) e hidrofóbicas (clorofórmio). O clorofórmio possui constante dielétrica baixa, razão pela qual foi escolhido como modelo para o meio hidrofóbico. Como já dito anteriormente este trabalho tem como objetivo calcular propriedades de moléculas farmacológicas com uma estrutura básica comum. Métodos de mecânica molecular e mecânica quântica foram utilizados para elucidar a estrutura geométrica dos compostos em questão. Os métodos de mecânica estatística foram aplicados para representar os efeitos do solvente sobre as propriedades físico-químicas destes fármacos e a teoria de perturbação termodinâmica foi utilizada para o cálculo do coeficiente de partição entre dois solventes. Todo o procedimento metódico e computacional utilizado será apresentado a seguir.

2.3. Detalhes Computacionais

2.3.1) Determinação da Geometria

Considerações Gerais

Geralmente, quando se deseja realizar um estudo de um composto por simulação computacional, é necessário que a geometria molecular seja determinada. Este estudo é ainda mais relevante quando a molécula investigada apresenta várias conformações espaciais. Assim, é necessário então investigar quais são as conformações possíveis, e entre estas, qual é a que apresenta menor energia. Para isso, um procedimento adequado deve ser determinado e seguido.

No caso deste trabalho, o procedimento utilizado para a determinação da estrutura de menor energia segue três passos, que serão apresentados a seguir.

Procedimento Computacional

Passo 1

Os dados iniciais das estruturas estudadas foram criados pelo programa PCModel⁽⁴⁰⁾, que é um programa de modelagem molecular que utiliza potenciais empíricos em seu campo de força. Todas as estruturas criadas foram minimizadas inicialmente de acordo com o campo de força contido neste programa. No entanto, não se pode dizer

que este é o mínimo global da molécula, já que o programa finaliza a sua minimização no primeiro mínimo local encontrado. Assim, torna-se necessário um estudo mais aprofundado para a determinação do mínimo de energia global.

Passo 2

As moléculas estudadas apresentam substituintes com rotação livre em algumas posições dos anéis que formam a estrutura carbônica básica. A rotação destes substituintes é importante para se determinar em que ângulo dos diedros de rotação livre estão os confórmeros de menor energia. Além disso, devem ser observados os substituintes que estão próximos entre si, pois a rotação de um substituinte pode interferir na rotação do outro. Quando isso ocorre, um estudo de rotação simultânea de diedros deve ser realizado.

Assim, cálculos de mecânica molecular foram utilizados para a determinação da estrutura de menor energia entre todos os confórmeros existentes de cada molécula. Foi utilizada a técnica de rotação simultânea de diedros, e o método de mecânica molecular utilizado foi o MM3^(41,42,43). Esta técnica consiste em variar em unidades de grau a rotação dos ângulos diedro e obter-se então os valores de energia correspondente. Assim, uma superfície bidimensional (dupla variação de ângulos diedro) é mapeada e os valores de energia são determinados para formar um diagrama tridimensional.

Passo 3

Tendo sido determinada a estrutura de menor energia de acordo com o estudo realizado no passo 2, as estruturas foram submetidas a um cálculo semi-empírico para se obter os valores de energia para as estruturas em fase gasosa. O método semi-empírico AM1^(44,45) foi utilizado para esse estudo.

As moléculas estudadas neste trabalho possuem em comum uma estrutura básica, formada por anéis interligados. Esta estrutura está representada na Figura 2.4 presente na seção dos resultados. Para verificar a estabilidade da estrutura obtida, procedeu-se a uma simulação da interação desta estrutura básica com um ‘banho térmico’, utilizando para isso o programa HYPERCHEM⁽⁴⁶⁾. Este cálculo foi feito permitindo que os átomos da estrutura adquirissem energia cinética média proporcional à temperatura absoluta do banho térmico. Colocou-se a molécula em contato com um ‘banho térmico’ de 500K e procedeu-se ao ‘resfriamento’ gradativo do sistema. O mesmo procedimento foi efetuado de forma reversa, aquecendo-se o sistema até 500K. Não foi verificada nenhuma alteração na configuração molecular, ao que concluímos que não deve ocorrer inversão na conformação dos anéis que compõem a estrutura básica, que é, portanto, rígida.

2.3.2. Simulação de líquidos

Considerações Gerais

Em um processo geral de solvatação, a energia do sistema é resultante das interações soluto-soluto, soluto-solvente e solvente-solvente. No caso deste trabalho, as interações envolvidas ocorrem entre os sítios do soluto e as moléculas do solvente, e estas interagem entre si. O presente estudo foi realizado com somente uma molécula de soluto, as interações soluto-soluto foram assim desprezadas, pois o sistema é considerado suficientemente diluído para que não existam essas interações. Logo, a energia obtida engloba qualquer possível relaxação na energia de interação entre moléculas de solvente devido à presença do soluto, possíveis modificações na densidade do sistema, etc.

Todas as moléculas do soluto e solvente foram modeladas como uma coleção de sítios de interação, os quais são dispostos sobre uma geometria molecular rígida. Estes sítios podem ser átomos, grupos de átomos ou regiões espaciais da molécula.

Todos os cálculos envolvendo simulações representativas do meio líquido foram realizados pelo programa DIADORIM⁽⁴⁷⁾.

Para a realização deste cálculo, é necessária a introdução da molécula de soluto em uma caixa de referência contendo moléculas de solvente. Quando este procedimento é efetuado, os efeitos repulsivos na configuração inicial são muito intensos. Para evitá-los, é necessário que algumas moléculas do solvente sejam retiradas da caixa as contém para abrir um espaço inicial para a acomodação da molécula de soluto.

As caixas de solvente utilizadas neste cálculo foram preparadas inicialmente para o líquido puro.

As caixas de referência contendo o líquido puro foram preparadas e estudadas pela versão DIADORIM.MIX. Através deste programa é gerada uma caixa com as dimensões apropriadas, e que contém as coordenadas cartesianas das N moléculas de solvente que compõem o sistema que será investigado.

O restante dos cálculos foram realizados com o programa DIADORIM.TPT. Esta versão é uma modificação do programa para líquidos que incorpora a interação soluto-solvente. Com estas duas versões do programa, é possível calcular as seguintes propriedades:

- Energia Interna
- Volume molar
- Densidade
- Entalpia de Vaporização
- Capacidade calorífica a pressão constante
- Coeficiente de compressibilidade isotérmica
- Coeficiente de expansão isobárica.

A versão DIADORIM.TPT calcula também a energia livre de Gibbs em um processo, além das propriedades já descritas. A energia livre de Gibbs é calculada através da Teoria de Perturbação Termodinâmica.

Resumindo, a versão DIADORIM.MIX é utilizada para o cálculo de líquidos puros e misturas binárias, enquanto que o cálculo das energias de interação soluto-solvente bem como a energia livre de Gibbs são calculadas pela versão DIADORIM.TPT.

A simulação computacional de líquidos é processada em duas etapas: a de equilíbrio e a do cálculo dos valores médios das propriedades termodinâmicas. Na etapa de equilíbrio, a energia varia rapidamente. No decorrer da simulação, as moléculas são movimentadas até que a variação de energia reduza-se a pequenas oscilações em torno de um valor médio. O número de configurações é escolhido de acordo com o que se está querendo calcular, ou seja, varia conforme o sistema estudado, até que se atinja a estabilização dos valores médios. Os valores das propriedades calculados nesta etapa são descartados e então é iniciado o cálculo dos valores médios das propriedades termodinâmicas. Nesta nova fase do cálculo os valores das observáveis termodinâmicas em cada configuração são acumulados para a obtenção das médias estatísticas termodinâmicas segundo a equação (1.20)^(48,49,50).

Procedimento Computacional

Para este trabalho, foram utilizadas duas caixas diferentes de solvente para conduzir as simulações em meios hidrofílico e hidrofóbico. A caixa para reproduzir o meio hidrofílico, foi constituída por cerca de 800 moléculas de água. As moléculas de água foram representadas pelo modelo TIP4P, de uso corrente na literatura^(52,53). Neste modelo, cada molécula de água é representada por 4 sítios, localizados nos três núcleos e em um ponto de carga M disposto na bissetriz do ângulo HOH, a 0.15Å do oxigênio, em direção aos hidrogênios.

A Tabela 2.2 contém os parâmetros utilizados para o cálculo do potencial utilizado para este modelo representativo da água:

Tabela 2.2. Parâmetros da função potencial de Coulomb e Lennard-Jones para o modelo TIP4P da água.

Sítio	$\sigma/\text{\AA}$	$\epsilon/\text{kcalmol}^{-1}$	q/e
O	3.154	0.155	0.000
H	0.000	0.000	0.520
M	0.000	0.000	-1.040

O meio hidrofóbico foi representado por uma caixa de referência contendo 800 moléculas de clorofórmio. Geralmente, em química medicinal utiliza-se o 1-octanol para representar o meio hidrofóbico. No entanto, esse solvente é muito difícil de ser simulado, devido à existência de rotações internas na parte carbônica da molécula de 1-octanol. Estas rotações internas demandam um tempo de computação muito elevado para a simulação, o que impossibilita a utilização deste solvente em estudos teóricos, levando em consideração o alcance dos recursos computacionais atuais. Assim, o clorofórmio foi escolhido para representar o meio hidrofóbico devido à sua baixa constante dielétrica e a conveniências de cálculo.

Os parâmetros utilizados para representar este solvente foram desenvolvidos em nosso laboratório e compõem um modelo de 5 sítios⁽⁵¹⁾. Estes parâmetros são apresentados na Tabela 2.3:

Tabela 2.3. Parâmetros da função potencial de Coulomb e Lennard-Jones para o modelo de 5 sítios do clorofórmio.

Sítio	$\sigma/\text{Å}$	$\epsilon/\text{kcalmol}^{-1}$	q/e
C	3.800	0.075	-0.050
H	0.000	0.000	0.185
Cl	3.470	0.300	-0.045

O quantidade de 800 moléculas de solvente foi escolhida para garantir que toda a superfície das moléculas de soluto estudadas fossem recobertas pelo solvente. Em um estudo sistemático, deveriam ser construídas várias caixas de solvente variando-se o número de moléculas para 'testar' em qual delas o soluto já estaria recoberto. No entanto, cada uma dessas caixas leva um tempo computacional considerável para ser construída e estabilizada, e os resultados que seriam obtidos não diferem de modo significativo daqueles utilizados com um valor que irá recobrir com certeza toda a superfície. Assim o número de 800 moléculas foi utilizado para garantir todo o recobrimento da superfície molecular.

Os solutos utilizados nas simulações, como já dito anteriormente, tiveram suas estruturas criadas no PCModel.

Para este trabalho, foi necessário também calcular a carga sobre cada átomo das moléculas estudadas, para a obtenção dos parâmetros da parte coulômbica do potencial utilizado. Estes cálculos foram realizados com o programa Gaussian, versão 94⁽⁵⁵⁾, utilizando a opção CHELPG, com o cálculo Hartree-Fock na base 4-31G**. Este cálculo

de cargas consiste em mapear o potencial eletrostático na vizinhança da molécula utilizando a função de onda molecular obtida pela solução da equação de Schrödinger. Em seguida, são determinados os valores das cargas pontuais, dispostas sobre as posições nucleares, que geram um potencial eletrostático tão próximo quanto possível do obtido com a função de onda. A escolha da base 4-31G** é um compromisso entre tamanho da base e o número de átomos na molécula de soluto. Para o cálculo de cargas essa base foi perfeitamente satisfatória.

Após o cálculo das cargas, alguns átomos foram agrupados para formar sítios. Cada grupo [-CH₂] e [-CH₃] foi considerado um único sítio, devido às vantagens computacionais. Para montar a interação soluto-solvente os potenciais de Lennard-Jones foram transferidos de grupos semelhantes^(4,52,54). As tabelas que contém todos os valores dos parâmetros utilizados estão apresentadas no Apêndice A. Todos os cálculos para a interação soluto-solvente foram efetuados no *ensemble* NpT a 298K e 1,0 atm. Na fase de equilíbrio, foram geradas cerca de 1.000.000 de configurações. Para a obtenção dos valores médios das observáveis termodinâmicas, foram utilizadas 5.400.000 configurações. Note-se que os dados gerados na fase de equilíbrio são descartados, a menos das coordenadas para o soluto e as moléculas de solvente.

O cálculo da energia livre de solvatação pode ser dividido em duas etapas:

- 1- Obtenção da energia livre de solvatação devido à interação eletrostática.
- 2- Cálculo de contribuição de Van der Waals para a energia livre de solvatação.

Para a primeira contribuição, ou seja, para a obtenção da energia livre de solvatação devido à interação eletrostática, o cálculo foi efetuado ‘descarregando-se’ a molécula na presença do solvente. Isto é feito perturbando-se todas as cargas do valor inicial obtido com o método de Hartree-Fock (e opção CHELPG) para zero. Todo o procedimento foi realizado utilizando-se um valor de $\Delta\lambda=0.125$ para a variação do parâmetro de acoplamento. Segundo razões que serão apresentadas no decorrer das discussões, foram realizadas perturbações para as cargas a fim de se encontrar a magnitude da contribuição eletrostática para o valor de ΔG de transferência. Para cada valor de $\Delta\lambda$, foram geradas 800.000 configurações na parte de equilíbrio e 1.500.000 configurações para a fase de obtenção das médias termodinâmicas.

Em seguida foram feitos os cálculos para a segunda contribuição, ou seja, para a contribuição de Van der Waals. Neste caso, foi feita a transformação da estrutura do ácido platânico para a estrutura do ácido betulínico, a fim de se obter um valor relativo entre os dois ácidos.

Este cálculo foi realizado em quatro etapas, a serem explicadas posteriormente. Para estes cálculos, as perturbações foram realizadas com um valor de $\Delta\lambda=0.125$ para a variação do parâmetro de acoplamento. Em cada etapa de equilíbrio foram utilizadas 800.000 configurações e 1.500.000 configurações para a fase de obtenção das médias termodinâmicas.

2.4. Resultados

2.4.1. Resultados relativos à determinação da geometria

2.4.1.1. Estrutura carbônica comum a todos os compostos

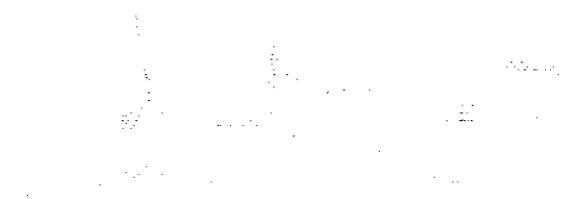
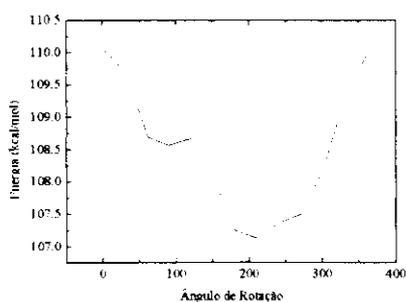
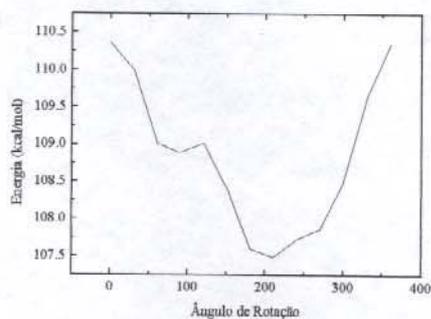


Figura 2.4 - Esqueleto principal dos derivados dos ácidos betulínico e platânico.

2.4.1.2. Variação da energia com o ângulo de rotação do substituinte na posição R1



1) Curva relativa ao ácido betulínico



2) Curva relativa ao ácido platânico

Figura 2.5 - Diagramas de energia X ângulo de rotação.

2.4.1.3. Resultados relativos ao ácido betulínico

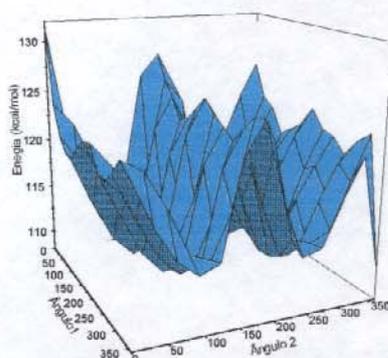


Figura 2.6 - Diagrama de energia obtido com a rotação simultânea dos ângulos diedro.

2.4.1.4. Resultados relativos ao ácido platânico

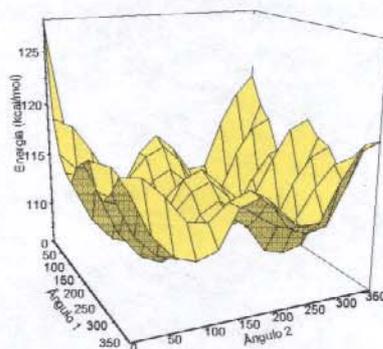


Figura 2.7 - Diagrama de energia obtido com a rotação simultânea dos ângulos diedro.

Os resultados numéricos referentes a todos os diagramas estão apresentados em tabelas no apêndice A.

2.4.2. Resultados parciais obtidos para a energia de solvatação

Inicialmente as moléculas em questão foram colocadas sucessivamente nas caixas contendo moléculas de água e clorofórmio, e as energias de interação soluto-solvente foram calculadas. Os resultados dessas energias são apresentados na tabela a seguir.

2.4.2.1. Resultados para a energia de solvatação em água

Tabela 2.10

Soluto	Energia/kcal.mol ⁻¹	Erro
Estrutura Básica	-40.46	±0.31
Ácido Betulínico(min1)	-75.73	±0.40
Ácido Betulínico(min2)	-78.72	±0.48
Ácido Platânico(min1)	-87.07	±0.48
Ácido Platânico(min2)	-89.35	±0.50

2.4.2.2. Resultados para a energia de solvatação em clorofórmio

Tabela 2.11

Soluto	Energia/kcal.mol ⁻¹	Erro
Estrutura Básica	-51.07	±0.38
Ácido Betulínico(min1)	-64.38	±0.59
Ácido Betulínico(min2)	-65.47	±0.40
Ácido Platânico(min1)	-68.55	±0.42
Ácido Platânico(min2)	-71.03	±0.41

2.4.3. Estabilidade relativa das diferentes estruturas

Tabela 2.12

Soluto	$\Delta H_{\text{formação}}/\text{kcal.mol}^{-1}$	E. total em $\text{CHCl}_3/\text{kcal.mol}^{-1}$	E. total em água/ kcal.mol^{-1}
Estrutura Básica	-78.96	-130.03	-119.42
Ácido Betulínico(min1)	-170.75	-235.43	-252.02
Ácido Betulínico(min2)	-171.19	-236.65	-249.90
Ácido Platânico(min1)	-220.35	-288.90	-307.42
Ácido Platânico(min2)	-219.04	-289.91	-308.39

2.4.4. Contribuição da interação eletrostática para a energia livre de solvatação. Cálculo efetuado com a Teoria de Perturbação Termodinâmica

2.4.4.1. Perturbação realizada em água

Tabela 2.13

Soluto	$\Delta G_{\text{elet}}/\text{kcal.mol}^{-1}$	Erro
Estrutura Básica	-2.25	± 0.32
Ácido Betulínico(min1)	-14.63	± 1.08
Ácido Betulínico(min2)	-20.99	± 0.74
Ácido Platânico(min1)	-20.45	± 0.50
Ácido platânico(min2)	-23.01	± 0.36

2.4.4.2. Perturbação realizada em clorofórmio

Tabela 2.14

Soluto	$\Delta G_{\text{elet}}/\text{kcal.mol}^{-1}$	Erro
Estrutura Básica	-0.64	± 0.20
Ácido Betulínico(min1)	-4.64	± 0.55
Ácido Betulínico(min2)	-4.55	± 0.52
Ácido Platânico(min1)	-3.66	± 0.23
Ácido platânico(min2)	-6.11	± 0.24

2.4.5. Cálculos efetuados com a Teoria de Perturbação Termodinâmica para a ‘transformação’ do ácido platânico em ácido betulínico: contribuição dos parâmetros de Lennard-Jones para a variação da energia livre total.

2.4.5.1. Cálculo realizado para a perturbação dos parâmetros de Lennard-Jones

Legenda:

A = Ácido Platânico

B = Ácido Betulínico

2.4.5.2. Perturbação em água

Tabela 2.15

Soluto	$\Delta G_{\text{LJ}}/\text{kcal.mol}^{-1}$	Erro
A→B(mínimo1)	-0.926	± 0.146
A→B(mínimo2)	-1.827	± 0.256

2.4.5.3 Perturbação em clorofórmio

Tabela 2.16

Soluto	$\Delta G_{LJ}/\text{kcal.mol}^{-1}$	Erro
A→B(mínimo1)	-1.52237	± 0.09911
A→B(mínimo2)	-1.79193	± 0.07590

2.4.6. Cálculos efetuados com a Teoria de Perturbação Termodinâmica para a ‘transformação’ do ácido platânico em ácido betulínico: contribuição da modificação da geometria para a obtenção da energia livre total.

2.4.6.1. Perturbação em água

Tabela 2.17

Soluto	$\Delta G_{\text{geometria}}/\text{kcal.mol}^{-1}$	Erro
A→B(mínimo1)	-0.327	± 0.164
A→B(mínimo2)	-0.367	± 0.096

2.4.6.2. Perturbação em clorofórmio

Tabela 2.18

Soluto	$\Delta G_{\text{geometria}}/\text{kcal.mol}^{-1}$	Erro
A→B(mínimo1)	-1.603	± 0.114
A→B(mínimo2)	-1.652	± 0.159

2.4.7. Cálculo do valor total das contribuições para a energia livre

2.4.7.1. Solvente: água

Tabela 2.19

Soluto	$\Delta G_{total}/kcal.mol^{-1}$	Erro
A→B(mínimo1)	4.467	±1.210
A→B(mínimo2)	4.935	±0.867

2.4.7.2. Solvente: clorofórmio

Tabela 2.20

Soluto	$\Delta G_{total}/kcal.mol^{-1}$	Erro
A→B(mínimo1)	-3.805	±0.615
A→B(mínimo2)	-1.884	±0.599

2.4.8. Cálculo dos valores das energias livre de transferência e respectivos coeficientes de partição

2.4.8.1 Contribuição da interação eletrostática para a energia livre de transferência

Tabela 2.21

Soluto	$\Delta G_{elet}/kcal.mol^{-1}$
Estrutura Básica	1.61
Ácido Betulínico(min1)	9.99
Ácido Betulínico(min2)	16.44
Ácido Platânico(min1)	17.19
Ácido platânico(min2)	16.90

2.4.8.2 Contribuição da interação de Van der Waals relativa para a energia livre de transferência

Tabela 2.22

Soluto	$\Delta G_{\text{transferência}}/\text{kcal.mol}^{-1}$
A→B(mínimo1)	-8.37
A→B(mínimo2)	-6.13

2.4.8.3 Contribuição da interação eletrostática relativa para a energia livre de transferência

Tabela 2.23

Soluto	$\Delta G_{\text{transferência}}/\text{kcal.mol}^{-1}$
A→B(mínimo1)	-6.8
A→B(mínimo2)	0.46

2.4.8.4. Coeficiente de Partição eletrostático das diferentes estruturas

Tabela 2.24

Soluto	P_{elet}
Estrutura Básica	6.59×10^{-2}
Ácido Betulínico(min1)	4.70×10^{-8}
Ácido Betulínico(min2)	8.75×10^{-13}
Ácido Platânico(min1)	4.86×10^{-13}
Ácido platânico(min2)	4.02×10^{-13}

2.4.8.5. Coeficiente de Partição de Van der Waals (relativo)

Tabela 2.25

Soluto	P_{vdw}
A→B(mínimo1)	$\cong 1$
A→B(mínimo2)	$\cong 1$

2.4.8.6. Coeficiente de Partição eletrostático (relativo)

Tabela 2.26

Soluto	P_{elet}
A→B(mínimo1)	$\cong 1$
A→B(mínimo2)	$\cong 1$

2.4.8.7. Coeficiente de Partição Total (P_{elet} , P_{vdw})

Tabela 2.27

Soluto	P_{total}
A→B(mínimo1)	$\cong 1$
A→B(mínimo2)	$\cong 1$

2.5. Discussões e Conclusões

Em relação aos resultados referentes à determinação da geometria (seção 2.4.1)

O cálculo para o ângulo de rotação que o diedro do substituinte em R1 (posição definida na Figura 2.1) faz com o anel de seis membros para todos os compostos em questão foi feito separadamente da rotação dos outros diedros devido à distância existente entre estes substituintes. Para os dois ácidos encontrou-se um valor semelhante, ou seja, as moléculas estudadas possuem uma energia mínima no ângulo correspondente a 210° . Esta semelhança pode ser verificada nas curvas de potencial apresentadas.

Para os outros ângulos diedro que os demais substituintes fazem com esqueleto rígido dos ácidos em questão foi traçada uma superfície de energia para a rotação simultânea dos mesmos. Essa rotação simultânea foi realizada porque observou-se que a rotação de somente um ângulo por vez não apresentava resultados reais de energia, pois estericamente os dois substituintes têm interferência entre si.

Para o ácido betulínico, foi obtido um valor de energia mínima onde um dos ângulos está em 90° e o outro está em 120° . Já para o ácido platânico o conformero relativo a energia mínima apresenta os dois ângulos em 90° . Nos dados para energia interna dos dois conformeros, apresentados na Tabela 2.12, pode-se observar que os dois mínimos possuem energia muito próxima. Observa-se que isto ocorre para as duas estruturas dos ácidos betulínico e platânico. Os dados mostram que a diferença na energia é da ordem de $\sim 1,0$ kcal/mol. Foram realizados

cálculos da energia de solvatação para as conformações nestes dois mínimos, visto que a interação com o solvente não é necessariamente a mesma para ambas as estruturas.

Em relação aos resultados parciais obtidos para a energia de solvatação (seção 2.4.2)

Resultados para a energia de interação soluto-solvente são apresentados nas Tabelas 2.10 e 2.11. Os resultados mostram que para as estruturas mais polares, a energia de interação com a água é mais negativa. Estes dados concordam com o modelo clássico segundo o qual a estabilidade de moléculas polares é maior no solvente que possui a maior constante dielétrica. É interessante notar que a energia de solvatação da estrutura básica é maior em clorofórmio. Este resultado pode ser explicado quando a energia total de interação soluto-solvente é decomposta nas contribuições dos potenciais de Lennard-Jones e Coulomb. Para a interação com a água obtivemos:

Lennard-Jones : -38.11 kcal/mol

Coulomb: -4.36 kcal/mol

Para a interação com clorofórmio obtivemos:

Lennard-Jones : -51.90 kcal/mol

Coulomb : -0.18 kcal/mol

Logo, o valor da contribuição de Lennard-Jones determina que a energia de solvatação seja maior em clorofórmio, comparativamente a

água. Note-se porém que a contribuição eletrostática obtida em água e aproximadamente 24 vezes maior que em clorofórmio.

Em relação aos estudos da estabilidade relativa das diferentes estruturas (seção 2.4.3)

Apresentamos na Tabela 2.12 valores para a energia total, que inclui a energia interna do soluto e a interação deste com o solvente. Os valores obtidos para a energia total em água mostram que a estabilidade relativa dos conformeros dos ácidos platânico e betulínico é invertida: o conformero mais estável em fase gasosa não é o mais estável no meio aquoso. A mesma observação é válida para o ácido platânico em clorofórmio, onde uma inversão de estabilidade é também observada. Estes dados ilustram as modificações induzidas pelo meio na estabilidade molecular. Eles também mostram que na procura pela estabilidade, em direção à energia mínima, a interação com o solvente pode induzir modificações na conformação molecular. Desde que a estrutura é um dado importante para a modelagem de fármacos, os dados apresentados mostram a necessidade de se introduzir efeitos do meio e comprovam a utilidade da metodologia utilizada na investigação de relações entre estrutura e atividade de moléculas.

Com respeito a este tópico podemos observar que, de uma maneira geral, os parâmetros utilizados para avaliar a atividade de um fármaco dependem da geometria da molécula. Geralmente, no estudo dessa interação são utilizados valores de cargas atômicas, valores da energia de orbitais de fronteira, etc. Estes dados guardam estreita dependência com a

estrutura molecular. Logo, a modelagem da interação hóspede-hospedeiro, para ter um sentido físico comparável à medida experimental, deve ser feita utilizando a conformação real das moléculas que vão interagir. Os dados apresentados neste cálculo mostram que as considerações sobre a estrutura de energia mínima da molécula devem introduzir o efeito do solvente para garantir que a conformação investigada é realmente a mais estável.

Em relação aos estudos referentes aos cálculos de todas as contribuições das interações envolvidas para a obtenção da energia livre total (seções 2.4.4, 2.4.5, 2.4.6 e 2.4.7)

São apresentados nas Tabelas 2.13 e 2.14 resultados obtidos para o valor da contribuição eletrostática para a energia livre de solvatação. Estes cálculos foram realizados com a Teoria de Perturbação Termodinâmica. O valor das cargas sobre os átomos foram gradativamente anulados utilizando o parâmetro de acoplamento definido nas equações [1.27 e 1.28]. O valor obtido para a variação de energia livre corresponde à contribuição eletrostática para a energia livre de solvatação. Para obter a energia livre de solvatação, é necessário um cálculo posterior para avaliar a contribuição de Lennard-Jones para a interação soluto-solvente. Os dados mostram que a contribuição eletrostática obtida para a interação em meio aquoso é mais negativa que a correspondente em clorofórmio. Este resultado concorda com as observações experimentais que a energia livre de solvatação de dipolos e cargas é mais negativa em um meio com constante dielétrica mais alta. No presente estudo, este meio é o aquoso.

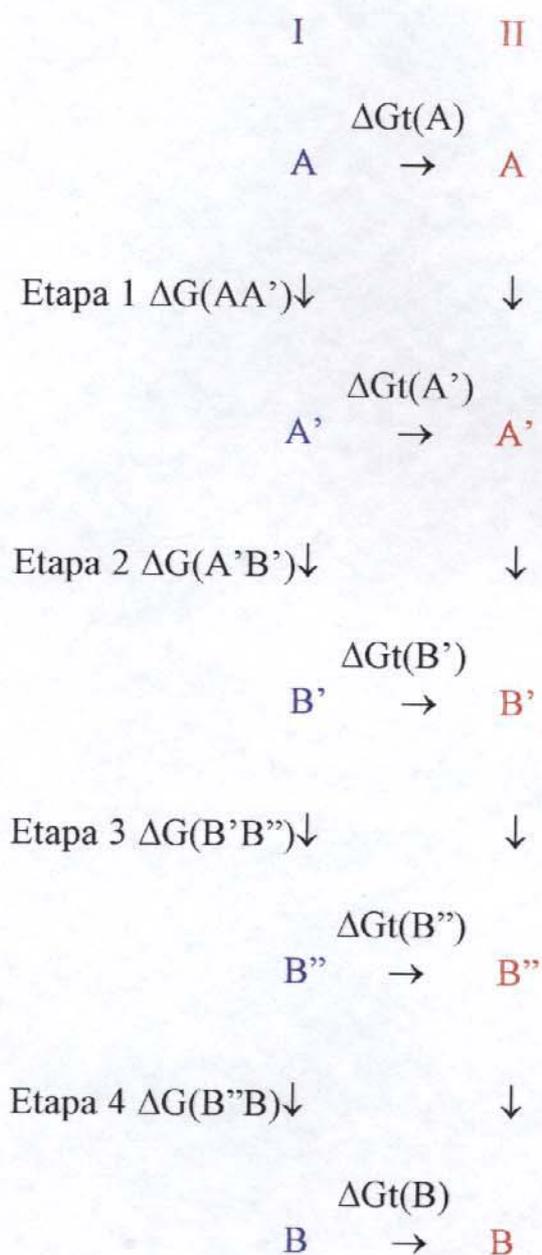
Nestes dois solventes, ao longo das estruturas estudadas, observa-se uma pequena variação da contribuição eletrostática. Para a variação em meio aquoso, da estrutura básica para o ácido platânico, observa-se uma contribuição de aproximadamente 18 kcal/mol. Estes dados mostram que a introdução de grupos polares na estrutura básica contribui fortemente para aumentar a energia de estabilização proporcionada pela interação com o solvente. A mesma substituição induz uma pequena variação na energia livre de interação com o clorofórmio. Logo, a introdução de um grupo polar na estrutura básica modifica o coeficiente de partição, aumentando a concentração do soluto no meio aquoso.

Como já dito no procedimento computacional, os parâmetros do ácido platânico foram transformados para os parâmetros do ácido betulínico. Em argumentos físicos, isto equivale a retirar a molécula de ácido platânico da solução e substituí-la por uma molécula de ácido betulínico.

Para se determinar a energia livre de solvatação absoluta para cada um dos ácidos estudados, seria necessário perturbar os parâmetros de todos os sítios para zero. Isto corresponde a ‘retirar’ o soluto de dentro do solvente. A energia obtida com este procedimento é numericamente igual e de sinal inverso à energia livre de solvatação de uma molécula nos meios considerados. Para o potencial eletrostático, esse cálculo foi possível, ou seja, as cargas sobre cada sítio foram perturbadas para zero. No entanto, perturbar os parâmetros de Lennard-Jones para zero é um pouco mais complicado, pois ocorrem instabilidades numéricas durante o cálculo. Em termos práticos, este procedimento só é computacionalmente possível quando a molécula do soluto é composta por um pequeno número de sítios.

No caso deste trabalho, cada molécula de soluto contém 35 sítios. Não é possível conduzir um cálculo baseado nos fundamentos da teoria de perturbação termodinâmica e ‘retirar’ uma molécula com essas dimensões do líquido. Porém, como já dito anteriormente, é conveniente utilizar valores relativos entre fármacos que possuem a mesma estrutura básica. Desta maneira, foi utilizado então um procedimento alternativo que consiste em transformar os parâmetros correspondentes ao ácido platânico para os parâmetros correspondentes ao ácido betulínico. Como o leitor pode observar na figura 2.2, a única diferença entre as duas estruturas está no substituinte da posição 19 na estrutura básica, ou seja, o ácido platânico contém um grupo COCH_3 nesta posição, enquanto que o ácido betulínico contém um grupo $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}_2$. Os outros sítios componentes da estrutura nas duas moléculas são absolutamente os mesmos. Assim, os parâmetros submetidos à perturbação foram aqueles correspondentes a estes dois grupos. Também foi levado em consideração que a geometria molecular é modificada quando se substitui um grupo pelo outro. Desta forma, a geometria também foi submetida à perturbação. Além disso, a distribuição de cargas por toda a molécula pode ser diferente em alguns pontos, o que significa ter que transformar todas as cargas de todos os sítios de uma molécula para a outra. Algumas tentativas de cálculo demonstraram que não seria possível perturbar os parâmetros de Lennard-Jones, eletrostáticos e geometria ao mesmo tempo, devido a instabilidades numéricas. As perturbações foram então realizadas em várias etapas. Na primeira delas, as cargas do ácido platânico foram perturbadas para zero. Na segunda etapa, os parâmetros de Lennard-Jones do grupo COCH_3 do ácido platânico foram

perturbados para os parâmetros do grupo $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}_2$ do ácido betulínico. Na etapa seguinte, a geometria do ácido platânico foi perturbada para a geometria do ácido betulínico. A última etapa foi a reconstituição de cargas, que estavam em zero. Estas foram então reconstituídas para os valores correspondentes às do ácido betulínico. Todas estas etapas podem ser melhor entendidas de acordo com o ciclo apresentado a seguir:



Neste ciclo, os compostos em azul estão no solvente I que representa a água, e os compostos em vermelho no solvente II que representa o clorofórmio. O composto A é o ácido platânico. O composto A' corresponde ao intermediário com as cargas de todos os sítios em zero, o B' ao intermediário referente ao ácido betulínico com as parâmetros de Lennard-Jones perturbados a partir de A'. B'' corresponde ao intermediário referente ao ácido betulínico com a geometria perturbada, mas com cargas zero em todos os sítios. O composto B é o ácido betulínico reconstituído a partir da perturbação de carga zero para os valores correspondentes a cada sítio desta molécula.

Os valores de ΔG em cada etapa nas setas verticais correspondem aos valores obtidos pelos cálculos realizados.

A mutação de A para A' está apresentada nas tabelas 2.13 e 2.14. Os resultados referentes à tabela 2.15 e 2.16 correspondem à mutação referente à segunda etapa do ciclo, onde os parâmetros de Lennard-Jones são perturbados. Pode-se notar que tanto em água quanto em clorofórmio, este valor para a diferença de energia livre é pequeno. Pode-se também notar que nos dois casos, tanto em água quanto em clorofórmio, a diferença de energia livre é mais negativa para o segundo mínimo de energia.

Os valores nas Tabelas 2.17 e 2.18 correspondem à mutação da geometria, e fornecem os valores de ΔG para a terceira etapa. Pode-se notar nestas duas tabelas que a diferença de energia livre entre as duas geometrias é muito pequena. Isto demonstra também que a geometria não muda significativamente de uma estrutura para a outra. A etapa de

regeneração das cargas também tem seus resultados apresentados nas tabelas 2.13 e 2.14, e correspondem à quarta etapa do ciclo.

Os valores de energia livre correspondentes ao somatório de todas as etapas do ciclo em água e em clorofórmio estão apresentados nas Tabelas 2.19 e 2.20

A seguir serão apresentados alguns comentários sobre a energia livre de transferência.

Em relação aos resultados referentes ao cálculo das energias livre de transferência e respectivos coeficientes de partição(seção 2.4.8)

As tabelas 2.21 e 2.22 apresentam os valores das diferenças de energia livre de transferência eletrostática e de Van der Waals. No entanto, esses dois valores possuem uma diferença fundamental: os valores da tabela 2.21 para o coeficiente de partição eletrostático são para cada molécula separadamente, enquanto os valores da tabela 2.22 estabelecem um valor relativo entre os dois ácidos. Dessa forma, esses valores não podem ser utilizados em conjunto para determinar o coeficiente de partição. Para utilizar os valores eletrostáticos da tabela 2.21 seria necessário que o valor da contribuição de Van der Waals para cada molécula fosse encontrado. Na seção anterior foi discutido que a execução deste cálculo é difícil.

No entanto, foram encontrados os valores relativos de energia livre para as duas contribuições, e estes valores estão apresentados nas tabelas 2.22 e 2.23.

A Tabela 2.24 apresenta os valores da contribuição eletrostática do coeficiente de partição para cada molécula separadamente. Neste caso podemos observar que o coeficiente de partição eletrostático é cada vez menor conforme aumenta o número de grupos polares na molécula.

As Tabelas de 2.25 a 2.27 contém os valores para o coeficiente de partição relativo. Como o valor obtido foi de 1, conclui-se que as duas moléculas têm praticamente o mesmo coeficiente de partição, e portanto a diferença entre as duas estruturas não é significativa em termos das propriedades hidrofóbicas.

2.6. Conclusões finais

Apresentamos neste trabalho uma metodologia de cálculo para estudar a estabilidade de moléculas em um meio. Estes cálculos consideram a estrutura obtida para a molécula no vácuo utilizando métodos de Química Quântica e Mecânica Molecular. Os efeitos do solvente, temperatura e pressão no processo são considerados utilizando métodos de Mecânica Estatística, cujos programas de computação foram desenvolvidos no grupo. A realização dos cálculos para os sistemas apresentados neste trabalho implicou também o descobrimento de técnicas de ‘como fazer’ para considerar moléculas poliatômicas.

Para os resultados obtidos, conclui-se que a água solvatou melhor as estruturas que contêm grupos polares, devido à formação de pontes de hidrogênio e interações fortes proporcionadas para a interação carga-carga entre sítios de moléculas do solvente e do soluto. No entanto, a estrutura básica foi melhor solvatada pelo clorofórmio, devido à ausência de grupos polares na mesma. Os dados da decomposição da energia total entre as contribuições de Coulomb e Lennard-Jones apresentados na seção de discussões e conclusões em relação a seção 2.4.2 dos resultados comprovam a origem da energia mais negativa para a interação da estrutura carbônica básica com o clorofórmio.

Por todos os resultados obtidos, conclui-se que a metodologia desenvolvida e utilizada é adequada para calcular o coeficiente de partição relativo para um conjunto de moléculas que contenham uma estrutura básica comum. Os resultados obtidos não dependem de considerações sobre o tipo de molécula que está sendo investigada, e portanto, a

metodologia pode ser utilizada para moléculas diversas. Neste sentido, uma ampla variedade de compostos, com propriedades diversas, podem ser investigados. Considerando-se a importância da interação soluto-solvente para o entendimento de processos químicos em solução, a metodologia utilizada neste trabalho, e outros métodos dela derivados, constitui uma ferramenta teórica valiosa para a investigação destes processos.

Apêndice A

Tabela A.1. Parâmetros da função potencial e Coulomb e Lennard-Jones para o ácido platânico no mínimo 1.

Sítio	Grupo	$\sigma/\text{Å}$	$\epsilon/\text{kcalmol}^{-1}$	q/e
1	CH ₃	3.9600	0.14500	-0.221
2	C	3.9411	0.11078	0.463
3	CH	3.9411	0.11078	0.037
4	C	3.9411	0.11078	0.269
5	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.043
6	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.090
7	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.117
8	C	3.9411	0.11078	0.273
9	CH	3.9411	0.11078	-0.127
10	CH ₂	3.9411	0.11078	0.038
11	CH ₃	3.9600	0.14500	-0.192
12	CH	3.9411	0.11078	0.256
13	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.201
14	C	3.9411	0.11078	0.193
15	CH	3.9050	0.11800	-0.096
16	CH ₂	3.9050	0.11800	-0.048
17	C	3.7500	0.10500	0.782
18	CH ₂	3.9050	0.11800	-0.013
19	C	3.7500	0.10500	0.662
20	O	3.0000	0.17000	-0.679
21	CH ₃	3.5000	0.06600	-0.081
22	CH	3.9411	0.11078	0.081
23	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.066
24	CH ₃	3.9411	0.11078	-0.210
25	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.114
26	C	3.9411	0.11078	0.574
27	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.103
28	CH	3.9411	0.11078	0.235
29	CH ₃	3.9600	0.14500	-0.194
30	CH ₃	3.9600	0.14500	-0.197
31	O	3.0700	0.17000	-0.729
32	H	0.0000	0.00000	0.427
33	O	2.9600	0.21000	-0.638
34	O	2.9600	0.21000	-0.590
35	H	0.0000	0.00000	0.454

Tabela A.2. Parâmetros da função potencial e Coulomb e Lennard-Jones para o ácido platânico no mínimo 2.

Sítio	Grupo	$\sigma/\text{Å}$	$\epsilon/\text{kcalmol}^{-1}$	q/e
1	CH ₃	3.9600	0.14500	-0.222
2	C	3.9411	0.11078	0.392
3	CH	3.9411	0.11078	0.100
4	C	3.9411	0.11078	0.307
5	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.111
6	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.016
7	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.119
8	C	3.9411	0.11078	0.430
9	CH	3.9411	0.11078	-0.145
10	CH ₂	3.9411	0.11078	0.008
11	CH ₃	3.9600	0.14500	-0.233
12	CH	3.9411	0.11078	0.175
13	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.173
14	C	3.9411	0.11078	0.142
15	CH	3.9050	0.11800	-0.112
16	CH ₂	3.9050	0.11800	-0.029
17	C	3.7500	0.10500	0.761
18	CH ₂	3.9050	0.11800	-0.007
19	C	3.7500	0.10500	0.683
20	O	3.0000	0.17000	-0.663
21	CH ₃	3.5000	0.06600	-0.081
22	CH	3.9411	0.11078	0.082
23	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.093
24	CH ₃	3.9411	0.11078	-0.215
25	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.122
26	C	3.9411	0.11078	0.561
27	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.087
28	CH	3.9411	0.11078	0.216
29	CH ₃	3.9600	0.14500	-0.196
30	CH ₃	3.9600	0.14500	-0.191
31	O	3.0700	0.17000	-0.719
32	H	0.0000	0.00000	0.426
33	O	2.9600	0.21000	-0.610
34	O	2.9600	0.21000	-0.590
35	H	0.0000	0.00000	0.453

Tabela A.3. Parâmetros da função potencial e Coulomb e Lennard-Jones para o Ácido Betulínico no mínimo 1.

Sítio	Grupo	$\sigma/\text{\AA}$	$\epsilon/\text{kcalmol}^{-1}$	q/e
1	CH ₃	3.9600	0.14500	-0.252
2	C	3.9411	0.11078	0.608
3	CH	3.9411	0.11078	-0.053
4	C	3.9411	0.11078	0.154
5	CH ₂	3.9411	0.11078	0.014
6	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.187
7	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.159
8	C	3.9411	0.11078	0.349
9	CH	3.9411	0.11078	0.047
10	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.079
11	CH ₃	3.9600	0.14500	-0.240
12	CH	3.9411	0.11078	0.070
13	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.096
14	C	3.9411	0.11078	0.145
15	CH	3.9050	0.11800	0.070
16	CH ₂	3.9050	0.11800	-0.084
17	C	3.7500	0.10500	0.780
18	CH ₂	3.9050	0.11800	0.006
19	C	3.7500	0.10500	0.217
20	C	3.0000	0.17000	-0.678
21	CH ₂	3.8500	0.14000	-0.215
22	CH ₃	3.9600	0.14500	-0.058
23	CH	3.9411	0.11078	0.119
24	CH ₂	3.9411	0.11078	0.056
25	CH ₃	3.9600	0.14500	-0.190
26	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.111
27	C	3.9411	0.11078	0.381
28	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.357
29	CH	3.9411	0.11078	0.591
30	CH ₃	3.9600	0.14500	-0.193
31	CH ₃	3.9600	0.14500	-0.189
32	O	3.0700	0.17000	-0.719
33	H	0.0000	0.00000	0.441
34	O	2.9600	0.21000	-0.639
35	H	0.0000	0.00000	0.453

Tabela A.4. Parâmetros da função potencial e Coulomb e Lennard-Jones para o Ácido Betulinico no mínimo 2.

Sítio	Grupo	$\sigma/\text{Å}$	$\epsilon/\text{kcalmol}^{-1}$	q/e
1	CH ₃	3.9600	0.14500	-0.233
2	C	3.9411	0.11078	0.397
3	CH	3.9411	0.11078	0.133
4	C	3.9411	0.11078	0.298
5	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.101
6	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.090
7	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.149
8	C	3.9411	0.11078	0.533
9	CH	3.9411	0.11078	-0.213
10	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.045
11	CH ₃	3.9600	0.14500	-0.260
12	CH	3.9411	0.11078	0.369
13	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.153
14	C	3.9411	0.11078	0.036
15	CH	3.9050	0.11800	0.002
16	CH ₂	3.9050	0.11800	-0.007
17	C	3.7500	0.10500	0.823
18	CH ₂	3.9050	0.11800	-0.069
19	C	3.7500	0.10500	0.168
20	C	3.0000	0.17000	-0.683
21	CH ₂	3.8500	0.14000	-0.168
22	CH ₃	3.9600	0.14500	-0.060
23	CH	3.9411	0.11078	0.038
24	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.072
25	CH ₃	3.9600	0.14500	-0.180
26	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.083
27	C	3.9411	0.11078	0.535
28	CH ₂	3.9411	0.11078	-0.108
29	CH	3.9411	0.11078	0.236
30	CH ₃	3.9600	0.14500	-0.186
31	CH ₃	3.9600	0.14500	-0.185
32	O	3.0700	0.17000	-0.718
33	H	0.0000	0.00000	0.422
34	O	2.9600	0.21000	-0.647
35	H	0.0000	0.00000	0.451

Tabela A.5. Resultados referentes aos cálculos de rotação realizados para o ácido betulínico para a obtenção do Diagrama correspondente à Figura 2.5

Ângulo de Rotação/Graus	Energia/kcal.mol ⁻¹
0	110.0694
30	109.6893
60	108.6996
90	108.5694
120	108.6739
150	108.0740
180	107.2544
210	107.1356
240	107.3700
270	107.4979
300	108.1536
330	109.2631
360	110.1372

Tabela A.6. Resultados referentes aos cálculos de rotação realizados para o ácido platânico para a obtenção do Diagrama correspondente à Figura 2.5

Ângulo de Rotação/Graus	Energia/kcal.mol ⁻¹
0	110.3601
30	109.9865
60	109.0094
90	108.8935
120	109.0115
150	108.4200
180	107.6027
210	107.4912
240	107.7299
270	107.8620
300	108.5234
330	109.6367
360	110.3592

Tabela A.7. Resultados referentes aos cálculos de rotação simultânea de diedros do ácido betulínico realizados para a obtenção do Diagrama apresentado na Figura 2.6

Tabela A.7.1. Rotação deixando a ângulo 1 fixo e variando o ângulo 2 de 0 a 180 graus

Ângulos	Energias/kcal.mol ⁻¹						
	0	30	60	90	120	150	180
0	131.17	119.91	113.00	111.27	114.71	124.94	128.06
30	124.08	121.86	117.73	112.32	111.84	116.80	125.66
60	121.28	116.37	112.15	109.96	111.49	121.03	124.18
90	119.77	115.78	110.75	109.30	109.82	119.29	122.30
120	119.93	115.40	111.47	109.52	110.36	119.35	122.95
150	121.65	117.43	112.61	111.48	112.12	121.60	124.27
180	122.76	117.95	114.12	112.27	113.10	122.13	125.74
210	122.05	118.17	112.99	111.50	112.11	121.76	124.69
240	120.88	116.80	112.92	110.78	111.58	120.34	123.89
270	120.53	116.95	112.50	111.16	111.43	120.01	123.05
300	122.05	117.70	114.10	112.26	112.80	121.22	124.64
330	123.47	119.22	114.81	113.90	114.57	123.76	126.08
360	123.06	118.50	115.26	113.69	114.47	123.21	126.31

Tabela A.7.2. Rotação deixando a ângulo 1 fixo e variando o ângulo 2 de 210 a 360 graus

Ângulos	Energias/kcal.mol ⁻¹					
	210	240	270	300	330	360
0	118.16	111.65	112.51	118.40	122.84	126.28
30	116.80	111.85	112.32	117.73	121.87	124.08
60	116.27	110.56	111.03	115.89	119.24	122.13
90	114.42	109.71	110.11	114.83	118.25	120.12
120	115.18	109.71	110.29	114.62	118.25	120.68
150	116.11	111.57	112.25	116.70	120.30	121.69
180	118.07	112.60	112.92	117.26	120.90	123.70
210	116.80	112.21	112.45	117.05	120.72	123.13
240	116.77	111.35	111.62	115.93	118.93	121.71
270	115.94	111.51	111.85	116.12	119.09	120.85
300	117.33	112.20	112.86	116.95	120.33	122.32
330	118.20	113.92	114.77	119.21	122.58	123.73
360	118.78	113.59	114.21	118.43	122.02	124.33

Tabela A.8. Resultados referentes aos cálculos de rotação simultânea de diedros do ácido platânico realizados para a obtenção do Diagrama apresentado na Figura 2.7

Tabela A.8.1. Rotação deixando a ângulo 1 fixo e variando o ângulo 2 de 0 a 180 graus.

Ângulos	Energias/kcal.mol ⁻¹						
	0	30	60	90	120	150	180
0	127.79	115.66	111.03	110.06	110.88	114.19	115.78
30	118.50	114.07	110.09	109.42	110.12	113.38	115.09
60	116.05	111.64	109.16	108.30	108.97	112.27	113.20
90	114.46	110.67	107.43	106.89	107.43	110.13	111.45
120	114.32	110.48	108.43	107.78	108.38	111.30	112.02
150	116.65	113.01	109.67	109.23	109.90	112.69	113.93
180	117.23	113.48	111.27	110.48	111.16	114.52	115.35
210	117.67	113.60	109.82	109.17	109.82	113.01	114.73
240	115.89	111.90	109.52	108.71	109.27	112.43	113.50
270	115.41	111.75	108.90	108.44	108.91	111.45	112.69
300	116.84	112.95	111.07	110.46	110.99	113.69	114.34
330	118.81	115.14	111.90	111.56	112.31	115.09	116.25
360	118.25	114.46	112.41	111.72	112.36	115.54	116.17

Tabela A.8.2. Rotação deixando a ângulo 1 fixo e variando o ângulo 2 de 210 a 360

Ângulos	Energias/kcal.mol ⁻¹					
	210	240	270	300	330	360
0	114.23	111.74	111.96	116.36	119.36	121.19
30	114.23	112.19	112.14	115.38	118.10	119.03
60	111.57	109.95	110.13	114.04	116.43	117.37
90	110.74	109.16	109.28	111.95	114.14	114.71
120	110.57	109.30	109.54	112.41	114.68	115.26
150	113.13	111.49	111.66	114.06	115.95	116.27
180	113.67	112.01	112.07	115.44	118.07	118.96
210	113.95	112.03	111.86	114.77	117.17	117.94
240	112.02	110.46	110.54	114.09	116.38	117.19
270	112.09	110.65	110.76	113.16	115.00	115.58
300	113.03	111.89	112.14	114.78	116.72	117.11
330	115.49	113.97	114.29	116.64	118.38	118.61
360	114.54	113.04	113.17	116.45	118.87	119.49

Apêndice B



Figura B.1. Acido betulínico em interações com moléculas de água em duas visões diferentes

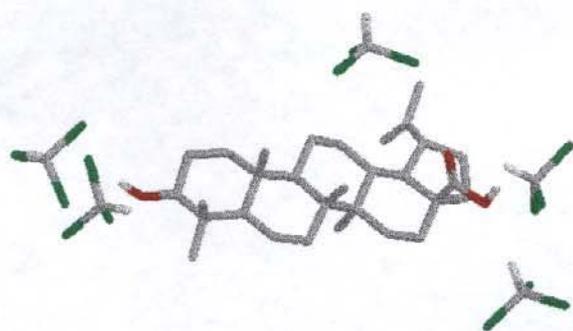
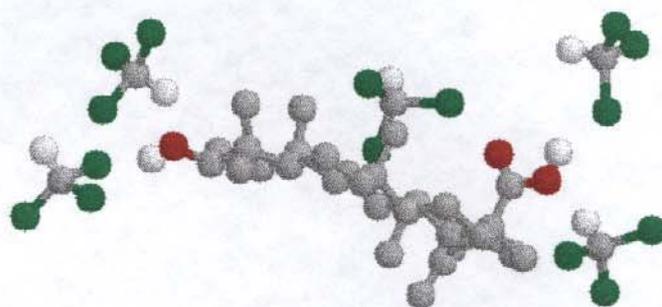


Figura B.2. Ácido betulínico em interações com moléculas de clorofórmio em duas visões diferentes

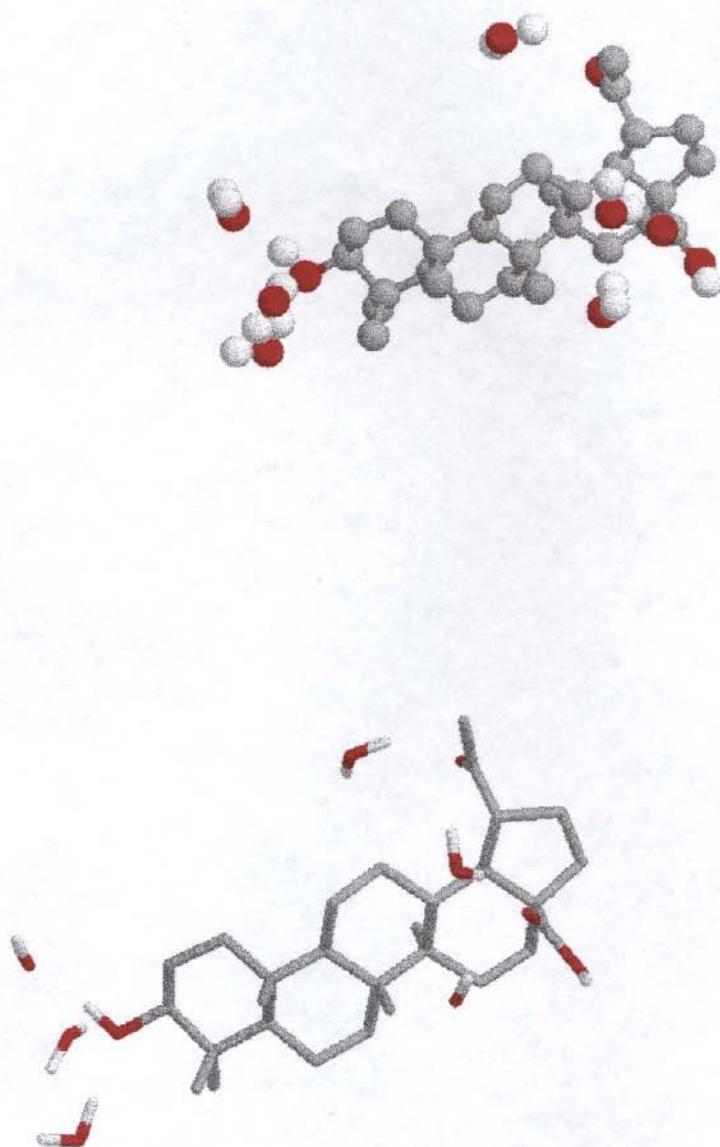


Figura B.3. Acido platânico em interações com moléculas de água em duas visões diferentes

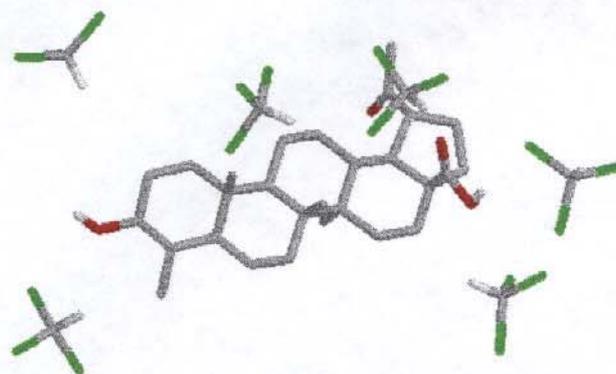
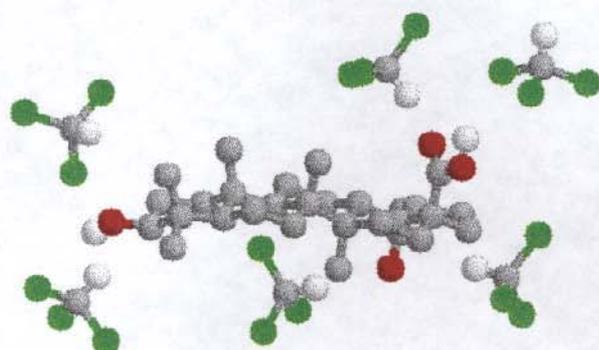


Figura B.4. Ácido platânico em interações com moléculas de clorofórmio em duas visões diferentes

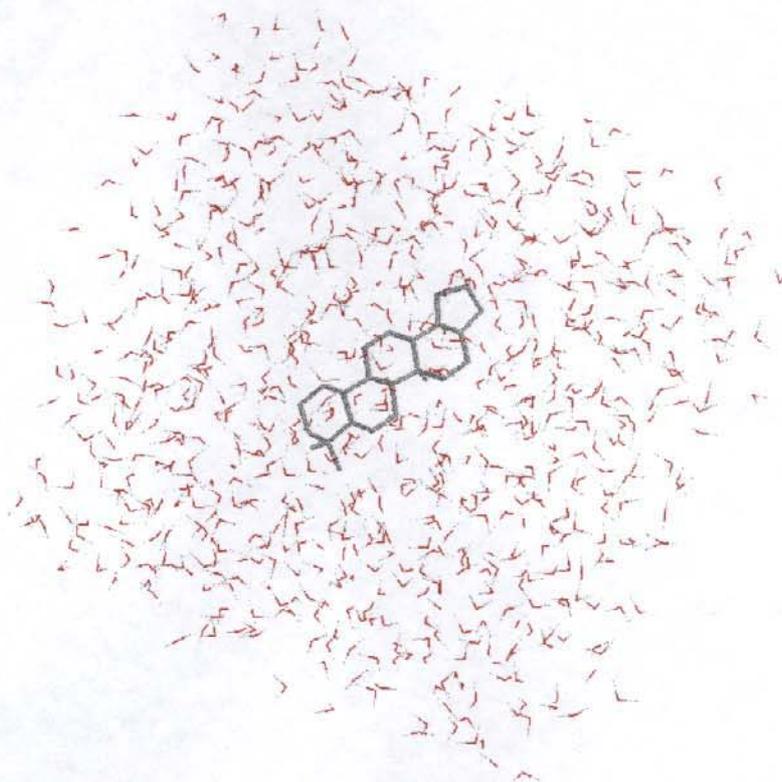


Figura B.5. Representação da caixa cúbica que contém cerca de 800 moléculas de água, e o soluto é a estrutura carbônica básica.

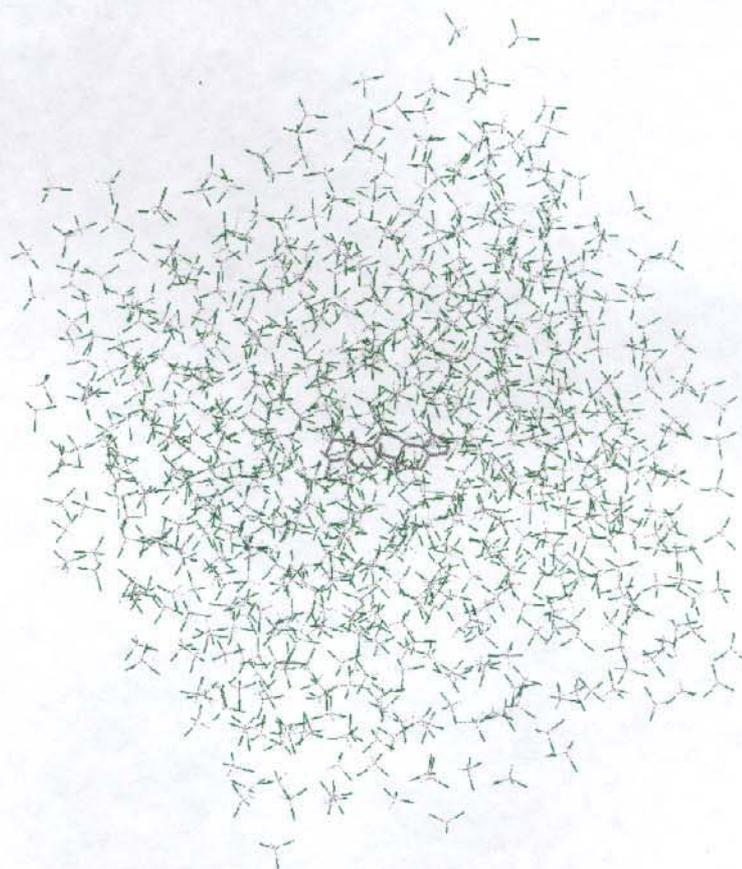


Figura B.6. Representação da caixa cúbica que contém cerca de 800 moléculas de clorofórmio, e o soluto é a estrutura carbônica básica.

Referências Bibliográficas

1. Montanari, C.A, *Química Nova* ,**18** (1995) 56.
2. Richards, W.G; Phil, M.A.D., *Quantum Pharmacology*, London, Butterworth & Co (Publishers) Ltd.(1977).
3. Jorgensen, W.L., *J. Am. Chem. Soc.*,**110** (1988) 1657.
4. Jorgensen, W.L., *J. Am. Chem. Soc.*,**106** (1984) 6638.
5. Jorgensen, *J. Phys. Chem.*, **98** (1994) 13077.
6. Ben-Naim, A.; Marcus, Y.; *J.Chem. Phys.*,**81** (1984) 2016
7. Brush, S.G.; *Statistical physics and the atomic theory of matter from Boyle and Newton to Landau and Onsager*, New Jersey ,Princeton Series in Physics, Princeton University Press,(1983).
8. Tolman, Ricard C., *The Principles of Statistical Mechanics*, New York, Dover Publications, (1979).
9. Chandler,D.; Pratt,L.R.; *J.Chem. Phys.* ,**67** (1977) 3683.
10. Jorgensen, W.L.; Boundoun,S.; Nguyen,T.B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **111** (1989) 755.

11. Jorgensen, W.L.; *J. Phys. Chem.* , **94** (1990) 1683.
12. Patrick, G.L.; *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford, Oxford University Press, (1995).
13. Knox, J.H., *Molecular Thermodynamics - An Introduction to Statistical Mechanics for Chemists*, London, Wiley Interscience (1971).
14. Hill, T.L; *An introduction to Statistical Thermodynamics*, New York, Addison-Wesley Publishing Company, (1960).
15. Ben-Naim, A; *J. Phys. Chem.* **82** (1978) 792
16. Rice, O.K.; *Statistical Mechanics-Thermodynamics and Kinetics*, San Francisco, W.H. Freeman and Company, (1967).
17. McGlashan, M.L., *Chemical Thermodynamics*, London , Academic Press, (1979).
18. McQuarrie, D.A; *Statistical Mechanics*, Harper and Row, New York , (1976)
19. Allen, M.D & Tildesley, D.J. ; *Computer Simulation of Liquids*, Oxford University press, Oxford , (1987)

20. Hansen, J.P. & McDonald I.R.; *Theory of Simple Liquids*, Academic Press, London, (1986)
21. Reynolds, c.A & King, P.M.; *Computer Aided Molecular Design*, G.Richards, IBC,London, cap4 (1989)
22. Ben-Naim; *Water and aqueous Solution*, Plenum Press, New York, (1988)
23. Owicki, J.C; Scheraga, H.A; *J. Am. Chem. Soc.*,**99** (1977) 7403.
24. Atkins, P.W ;*Physical Chemistry*, Oxford University Press, fourth edition, (1990)
- 25.Hoover,Wm.G., *Computational Statistical Mechanics - Studies in Modern Thermodynamics* 11, Elsevier Science Publishers B.V., (1991)
26. Freitas, L.C.G.; *J. Mol. Structure(THEOCHEM)*, **282** (1993) 151
27. Heermann, d.W.; Binder, K. *Monte Carlo Simulations in Statistical Physics*, New York, Springer-Verlag, (1992).
28. Binder, K. ; *Topics in Current Physics - Monte Carlo in Statistical Physics*, Berlin, Springer- Verlag, (1979).

29. Metropolis, N; Rosebluth, A.W.; Rosebluth, M.N.; Teller, A.H; Teller, E.J., *J. Chem. Phys.*, **21** (1953) 1087.
30. Freitas, L.C.G, *Química Nova*, **17** 6 (1994) 489.
31. Freitas, L.C.G ,*Química Nova*, **19** 2 (1996)166.
32. Zwanzig, R.W., *J.Chem.Phys.*, **22** (1954) 1420.
33. Beveridge, D.L. & DiCapua, F.M., *Annu. Rev. Biophys. Biphys. Chem.*, **18** (1989) 431.
34. Jones, M.N; *Biochemical Thermodynamics - Studies in Modern Thermodynamics* 8, Elsevier Science Publishers B.V., (1988).
35. Bash, et alli, *Science*, **236** (1987) 564.
36. Rao, B.G; Murcko, M.A, *J. Comp. Chem.*, **15** (1994) 1241
37. Fujioka,T. et alli, *Journal of Natural Products*, **57**, (1994), 243.
38. Junges, M.J. comunicação pessoal.
39. Warren, S.W., *The Physical Basis of Chemistry*, London, Academic Press, (1994).

40. Programa PCMODEL, Serena Software. Bloomington, IW 40402-3076
41. Allinger, N.L. *et alli*, *Operating Introductions for MM3 Program*, 1989 *Force Field*
42. Burket, U. & Allinger, N.L.; *Molecular Mechanics* (ACS Monography 177), Washington, American chemical Society, (1982).
43. Allinger, N.L. *et alli*, *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, **312** (1994) 69.
44. Dewar, M.J.S., *Journal of Am. Chem. Soc.*, **107** (1985) 3902.
45. Clark.T, *A Handbook of Computational Chemistry*, New York, A Wiley-Interscience Publication, (1985).
46. *HyperChem Computational Chemistry*, Pratical Guide, Autodesk, Inc 1992.
47. Programa DIADORIM, desenvolvido em linguagem Fortran por Luiz Carlos Gomide Freitas, Departamento de Química, UFSCar, São Carlos, S.P, (1993).
48. Sinoti, A. L., *Dissertação de Mestrado*, programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos, 1993.

49. Politi, J.R.S, *Dissertação de Mestrado*, programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos, 1994.
50. Silva, L.B., *Dissertação de Mestrado*, programa de Pós Graduação em Química da Universidade Estadual de Campinas, 1995.
51. Barlette, V.E; Freitas, L.C.G., “ Monte Carlo study of structural and thermodynamical properties of liquid chloroform using a five site model ”, submetido para publicação no J. Mol. Struct. (THEOCHEM) .
52. Jorgensen, W.L., *Journal of Computational Chemistry*, **14** (1993) 1240.
53. Jorgensen, W.L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J.D., *J. Chem. Phys.*, **79** (1983) 926
54. Garbujo, F.L.L, LQT, UFSCar, São Carlos, S.P.
55. Frisch, M. J.; Frish, Æ; Foresman, J.B., *GAUSSIAN 94 User's Reference*, Gaussian, Inc, Carnegie Office Park, Building 6, Pittsburgh, PA 15106