

00571



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

APLICACIONES DE LA QUIMICA COMPUTACIONAL EN EL ESTUDIO DE RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD BIOLOGICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE: MAESTRO EN CIENCIAS (F I S I C O Q U I M I C A) P R E S E N T A QUIM. MARCO ANTONIO BELMONT VIDAL



MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

Capítulo		Página
	Resumen	<i>i</i>
	Abstract	<i>ii</i>
1	INTRODUCCIÓN GENERAL.	
1.0	La Química computacional y el diseño molecular	1
1.1	Método de Hansch para el análisis cuantitativo de la relación estructura actividad. ACUARESA.	3
1.1.0	Actividad biológica.	6
1.1.1	Caracter hidrofóbico.	7
1.1.2	Parámetros estéricos.	8
1.1.3	Parámetros electrónicos.	10
1.1.4	Modelos estadísticos.	10
1.1.5	Estrategia para la optimización del fármaco.	13
1.2	Técnicas de química computacional aplicadas al estudio de las relaciones estructura-actividad biológica.	
1.2.0	Métodos de análisis conformacional.	18
1.2.1	Teoría de orbitales moleculares.	20
1.2.2	Métodos semiempíricos de orbitales moleculares.	24
1.2.2.0	Aproximaciones CNDO, INDO y NDDO.	24
1.2.2.1	Métodos MNDO y AM1.	26
1.3	Potencial de ionización, calor de formación y momento dipolar.	32
1.3.0	Potencial de ionización.	32
1.3.1	Calor de formación.	33
1.3.2	Momento dipolar.	34

2	ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE 3-OCTAHIDRO-1H-PIRANO(4,3-c)PIRIDIN-8a-IL FENOLES	
2.0	Introducción.	35
2.1	Metodología y resultados.	
2.1.0	Análisis conformacional.	38
2.1.1	Propiedades fisicoquímicas calculadas.	44
2.1.2	Densidades electrónicas.	45
2.2	Relaciones estructura-actividad biológica.	45
2.3	Discusión.	53
2.4	Conclusiones.	57
3	ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LA HIDRÓLISIS DE ÉSTERES DE N-BENZOILGLICINA POR PAPAÑA.	
3.0	Introducción .	59
3.1	Metodología y resultados.	61
3.2	Relaciones estructura-actividad biológica.	62
3.3	Discusión.	67
3.4	Conclusiones.	69
4	ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LA HIDRÓLISIS DE 3-PIRIDIL-ÉSTERES DE N-BENZOILGLICINA POR PAPAÑA.	
4.0	Introducción .	70
4.1	Metodología y resultados.	73
4.2	Relaciones estructura-actividad biológica.	74
4.3	Discusión.	77
4.4	Conclusiones.	78

5	ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LA HIDRÓLISIS DE 3-PIRIDIL Y 3 FENIL-ÉSTERES DE N-BENZOILGLICINA POR PAPAÍNA.	
5.0	Introducción .	80
5.1	Metodología y resultados.	82
5.2	Relaciones estructura-actividad biológica.	82
5.3	Discusión.	83
5.4	Conclusiones.	84
6	CONCLUSIONES GENERALES.	85

APENDICE

	Resumen del trabajo presentado en el XXVIII Congreso Mexicano de Química Pura y Aplicada y artículo publicado.	87
--	--	----

REFERENCIAS

RESUMEN

Este trabajo muestra la aplicación de varias de las técnicas usadas en química computacional para el estudio de las relaciones estructura-actividad biológica. Los casos estudiados son: la actividad analgésica de 3-octahidro-1H-pirano(4,3-c)piridin-8a-Il fenoles y la hidrólisis enzimática de ésteres de N-benzoilglicina. Se muestra la aplicación de los métodos de cálculo de mecánica molecular y semiempíricos al análisis conformacional, y el uso de diversos programas como QSAR, CHEMLAB II, MEDCHEM, QUANTA y MOPAC 6.0 para establecer relaciones cuantitativas estructura-actividad biológica. Se presentan ecuaciones que predicen la actividad y que involucran tanto parámetros experimentales como calculados. Se encuentra que en el caso de los 3-octahidro-1H-pirano(4,3-c)piridin-8a-Il fenoles los cálculos de orbitales moleculares no aportan información, mientras que en los otros tres sistemas, la energía del orbital HOMO está involucrada en la ecuación que predice la actividad biológica.

Además, se demuestra la importancia de los factores estéricos e hidrofóbicos.

ABSTRACT

This work shows the application of several computational chemistry techniques that are used in the study of the relationships between chemical structure and biological activity. The analgesic activity of 3-octahydro-1H-pyrano(4,3-c)pyridin-8a-il phenols and enzymatic hydrolysis of N-benzoylglycine esters were studied.

Molecular Mechanics and semiempirical calculations were applied to perform conformational analysis. The software packages QSAR, CHEMLAB II, MEDCHEM, QUANTA y MOPAC 6.0 were used in this study.

Several quantitative structure-activity relationships equations were obtained. These equations use not only experimental parameters but also calculated properties. It was shown that semiempirical calculations do not explain the biological activity of 3-octahydro-1H-pyrano(4,3-c)pyridin-8a-il phenols. On the other hand, for the enzymatic hydrolysis of N-benzoylglycine esters we can appreciate that HOMO energy is very important in explaining the biological activity.

In addition, the importance of hydrophobic and steric factors were also demonstrated.

CAPÍTULO 1

Introducción general

1.0 LA QUÍMICA COMPUTACIONAL Y EL DISEÑO MOLECULAR.

En el diseño molecular por computadora (que se denotará como DMC de aquí en adelante), la química computacional se enfoca en el descubrimiento de nuevos compuestos con propiedades específicas deseadas. Se han escrito libros completos sobre DMC¹, sin embargo, muchos investigadores desconocen los logros actuales de éste.

Es frecuente escuchar el equivocado comentario de que no se ha obtenido ningún compuesto comercial con ayuda de las computadoras. Algunos químicos computacionales argumentan, defensivamente, que es inapropiado preguntar qué productos se han producido por la química computacional. Su razonamiento es que ésta es una herramienta de investigación, y si uno no pregunta que productos químicos comerciales pueden atribuirse directamente a otras herramientas de investigación tales como espectrómetros de masas, espectroscopía RMN o cristalografía de rayos X; ¿Por qué entonces preguntan que productos pueden atribuirse directamente a la química computacional? No obstante, la literatura química muestra casos en donde la computadora ha ayudado en el diseño de compuestos que se han convertido en productos comerciales.

Las herramientas que pueden utilizarse para hacer DMC incluyen mecánica cuántica (tanto métodos *ab initio* como semiempíricos), mecánica molecular y otras simulaciones empíricas, graficación, manejo de base de datos y Análisis Cuantitativo de la Relación Estructura-Actividad (que se abreviará ACUARESA). Los compuestos que se diseñan pueden ser fármacos, proteínas, polímeros,

catalizadores, materiales cromatográficos, pesticidas y otros. Cuando los compuestos estudiados son productos farmacéuticos, se dice comúnmente que se está haciendo *Diseño de Fármacos por Computadora*.

Debido a la disponibilidad de computadoras más poderosas (software y hardware) y a la creciente cantidad de datos cristalográficos relevantes, ha aumentado el número de científicos interesados en DMC. Esta tendencia seguramente continuará.

La estructura molecular y electrónica de compuestos biológicamente activos son de gran importancia para comprender cómo y por qué las moléculas producen eventualmente una respuesta biológica.

Asimismo una suposición fundamental es que las interacciones fármaco-receptor siguen los mismos principios que las reacciones orgánicas clásicas. Sin embargo, las interacciones fármaco-receptor involucran muchos aspectos desconocidos.

A pesar de que la mayor parte de los receptores han permanecido sin caracterizar durante muchos años, el concepto de receptor ha resultado de gran valor al discutir los posibles modos de acción de fármacos (el término receptor se usa para describir una macromolécula con la que interactúa un fármaco para producir su efecto biológico característico²).

El simple hecho de que los enantiomorfos de una molécula de fármaco presentan con frecuencia diferente grado de actividad biológica, es una razón fuerte para suponer que los receptores interactúan con su complemento estructural.

Debido a que los receptores son estructuras macromoleculares que a menudo se encuentran unidos a membranas biológicas, pierden su funcionalidad al aislarlos, por lo que difícilmente pueden someterse a una determinación directa de su estructura.

Mientras no se cuente con la información estructural detallada sobre los receptores, una etapa lógica es considerar la estereoisomería, estructura electrónica, flexibilidad, hidrofobicidad y tamaño de sus grupos.

El análisis conformacional involucra la determinación de las características tridimensionales de una molécula. Recientemente,

muchos trabajos de investigación se han interesado en determinar la conformación de moléculas con actividad biológica. Esto es de gran importancia debido a que la conformación tiene una influencia importante sobre las interacciones moleculares. El análisis conformacional en el diseño de fármacos no es el resultado final, sino el principio y la base para saber cuál podría ser la conformación preferida en el sitio receptor³.

Son dos las razones por la que estudiamos la conformación de una molécula de fármaco. Primero, sabiendo más acerca de la anatomía tridimensional de los fármacos, estamos en mejor posición para caracterizar a los farmacóforos (estos se definen como átomos o grupos de átomos en una orientación mutua imprescindible para el reconocimiento e interacción con el receptor). Segundo, ya que los farmacóforos son considerados como los complementos estructurales del receptor, sabiendo cuál es el farmacóforo en cuestión se puede contribuir a resolver la estructura del fragmento de receptor que interactúa con él. El enorme beneficio que brindaría el hecho de conocer precisamente la anatomía del receptor es obvio, ya que haría posible el diseño de fármacos " hechos a la medida " que se ajustarían perfectamente al sitio receptor, conduciendo así a fármacos más específicos y con menores efectos colaterales. Sin embargo, esto es todavía un sueño. A decir verdad, actualmente nos encontramos en la situación de: "tratar de adivinar la anatomía del receptor a partir del estudio del fármaco".

1.1 MÉTODO DE HANSCH PARA EL ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD: ACUARESA.

Cuando estamos haciendo diseño de fármacos, cada modelo requiere una evaluación de riesgo y beneficio. Decidir qué estrategia seguir requiere un balance de los elementos indicados en la figura 1.1. Para cada modelo patrón hay millones de análogos y derivados que pueden ser estudiados. Por ejemplo, si hay 3 posiciones no equivalentes para la sustitución en un modelo y si consideramos solo

una serie de 130 sustituyentes, de los cuales conocemos todos los parámetros de lipofilicidad (π), efecto electrónico (σ , F, etc) y de tamaño (refractividad molar, volúmenes, etc.); entonces habrá 130^3 o 2.2 millones de posibles derivados de este modelo⁴. Tal vez solo uno de estos compuestos podría ser comercial o quizá ninguno.

Como no podemos hacer todos los derivados del modelo patrón, nunca podremos estar seguros de que algún compuesto comercial existe o de que no ha sido incluido en nuestra serie. Debido a la imposibilidad de estar seguro de que hemos encontrado el mejor fármaco o de que un compuesto comercial existe en la clase de compuestos que estamos estudiando, debemos utilizar el conocimiento probabilístico para balancear el riesgo y los recursos; debemos desarrollar y seguir estrategias que incrementen la posibilidad de encontrar el mejor compuesto y en consecuencia reducir el riesgo de perder algo en el proceso.

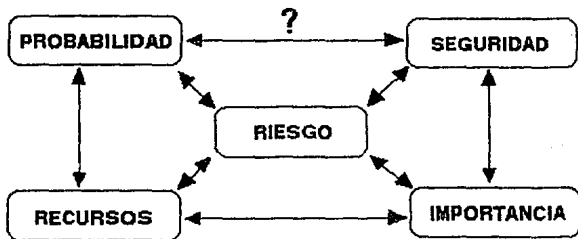


Figura 1.1. El dilema del desarrollo.

El método estadístico más efectivo para hacer diseño de fármacos es el método de Hansch o de regresión lineal múltiple. Siguiendo los pasos mostrados en la figura 1.2 se debe alcanzar eficientemente la meta de optimizar el modelo mientras que simultáneamente se

desarrolla un modelo para la propiedad que está siendo optimizada. El método de Hansch es comúnmente conocido como Análisis Cuantitativo de la Relación Estructura-Actividad. ACUARESA⁵ es la abreviación que se utiliza para describir el Análisis Cuantitativo de la Relación Estructura-Actividad. Las siglas corresponden a la traducción de QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships.

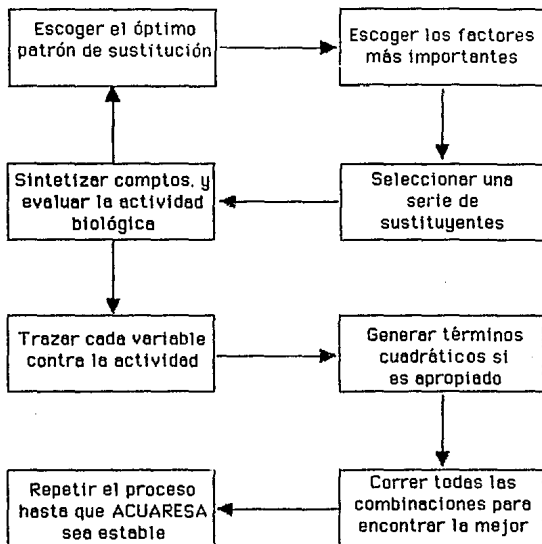


Figura 1.2. Estrategia para la optimización del modelo patrón usando regresión lineal múltiple.

La prueba de actividad biológica que se utilizará en un proyecto tiene un profundo efecto sobre la selección de la estrategia para la optimización. La experiencia ha demostrado que la optimización de las pruebas de actividad y el establecimiento del ACUARESA es relativamente exitoso en sistemas enzimáticos aislados. Sin embargo, el problema se hace más difícil conforme el sistema de prueba se hace más complejo.

Hansch⁶ recientemente hizo una revisión de su investigación en ACUARESA y señaló importantes caminos para futuras aplicaciones. ACUARESA puede expresarse como una ecuación⁴:

$$\text{ACTIVIDAD BIOLÓGICA} = f(\text{EFECTOS HIDROFÓBICO, ESTÉRICO, ELECTRÓNICO})$$

donde se considera a la actividad biológica como una función (f) de propiedades fisicoquímicas del compuesto. Aunque esta aproximación puede parecer simplista, su utilidad ha sido demostrada repetidas veces, cuando es aplicada correctamente. Cada uno de los términos de esta ecuación será discutido brevemente a continuación.

1.1.0 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Todos los organismos, a cualquier nivel de organización (es decir, cuerpo, órgano, tejido, célula, etc.) consiste de un increíble y complejo arreglo de sistemas interconectados e interactivos. Ningún compuesto puede tener sólo un efecto; por lo tanto, definir la actividad biológica de un compuesto es muy artificioso. En la práctica, nosotros podemos tratar con ciertas interacciones aisladamente, sólo si usamos múltiples replicados para tomar en cuenta la variación natural en la respuesta exhibida por cada sistema biológico. Mientras más simple sea un sistema biológico, más simple será derivar una relación entre la

estructura química y la actividad, sin embargo se han desarrollado modelos exitosos para efectos burdos tales como la letalidad en ratones.

Para el análisis ACUARESA la actividad biológica se expresa generalmente en términos de la concentración molar de un compuesto orgánico que produce una respuesta biológica estándar en un sistema bien definido en un intervalo de tiempo constante. Ejemplos de esto pueden ser: dosis letal (DL_{50}), dosis efectiva (DE_{50}) y concentración del Inhibidor (CI_{50}) requeridas para tener un efecto específico sobre el 50% de la población del organismo probado o reducir la actividad al 50% de la máxima actividad. Estos valores deben ser determinados por métodos estadísticos apropiados, tales como el análisis Probit⁷.

1.1.1 CARACTER HIDROFOBICO.

En la consideración de las propiedades fisicoquímicas de un compuesto biológicamente activo, debe establecerse primero que estas propiedades están interrelacionadas y son afectadas por su ambiente. Por ejemplo, los efectos hidrofílico, electrónico y estérico del sustituyente sobre la molécula principal, pueden ser significativamente colineales en alguna serie particular de datos, haciendo imposible considerar más de un factor en la ecuación de regresión⁸; en otras palabras, se requiere que los factores considerados en la ecuación de regresión sean linealmente independientes.

La hidrofobicidad puede ser afectada por el grado de ionización del compuesto, por lo tanto el pH del medio y el pK_a de los grupos ionizables de la molécula deben también tomarse en cuenta.

La hidrofobicidad es uno de los factores primordiales que influyen sobre el transporte pasivo de un compuesto biológicamente activo desde su fuente hasta su sitio de acción. Además, se ha demostrado que la hidrofobicidad es muy importante en la regulación de la interacción de compuestos biológicamente activos con sus bioreceptores⁹. La influencia de la hidrofobicidad sobre la actividad de un fármaco y en el análisis ACUARESA ha sido extensamente revisada^{10,11 y12}.

La hidrofobicidad se describe generalmente en términos del coeficiente de partición entre octanol y agua. El coeficiente de partición octanol/agua puede medirse usando los métodos tradicionales de equilibrio, seguidos por determinaciones espectrofotométricas o por cromatografía de gases^{13,14}.

Los coeficientes de partición pueden predecirse a partir de tablas de constantes hidrofóbicas del sustituyente (π)^{9,10}, o calcularse por medio del método de adición de fragmentos usando el programa CLOGP3, que está incluido en el software MedChem¹⁵. Sin embargo, es necesario remarcar que todos los métodos para medir o estimar los coeficientes de partición tienen problemas cuando se aplican a compuestos extremadamente hidrofóbicos o hidrofílicos.

La constante π para la contribución de un sustituyente a la hidrofobicidad de la molécula se deriva de la siguiente ecuación:

$$\pi_X = \log P_X - \log P_H$$

donde P_X es el coeficiente de partición de un derivado y P_H el del compuesto patrón. Un valor positivo de π significa que, comparado con H, el sustituyente confiere mayor hidrofobicidad, mientras que un valor negativo indica que el sustituyente confiere menos hidrofobicidad. Los valores de π no son en realidad constantes. Por ejemplo, los valores de π de los grupos OH, OCH₃ y NH₂ aumentan por la presencia de grupos electroatrayentes NO₂ o CN, y disminuyen debido a grupos electrodonadores; también los valores de π de halógenos se afectan fuertemente. Sin embargo, debido a que los efectos de hidrofobicidad de los sustituyentes se consideran generalmente aditivos, se puede calcular el logP de los derivados si se conoce el logP de la molécula patrón⁹.

1.1.2 PARÁMETROS ESTÉRICOS.

Todas las moléculas tienen un tamaño y una forma tridimensional que influye en su habilidad para interactuar con otras moléculas. La mayoría de las moléculas no son rígidas, y pueden

tener muchas conformaciones, aunque exista una conformación de mínima energía que puede ser "preferida". El adicionar un sustituyente a una molécula, cambia el tamaño y la conformación de ésta, pudiendo aumentar, disminuir o quizá no tener efecto alguno sobre la interacción con alguna otra molécula tal como una proteína receptora. Estos efectos estéricos del sustituyente han sido extensamente estudiados por su influencia sobre la rapidez de reacciones químicas, pero la complejidad de los efectos estéricos sobre la interacción de moléculas orgánicas con macromoléculas y receptores de drogas es mucho mayor. A pesar de esto, se han obtenido buenas correspondencias entre modelos de correlación estadística basados en parámetros de cinética enzimática de reacciones en solución con modelos gráficos moleculares basados en información obtenida del análisis de bioreceptores por cristalografía de rayos X^{6,7}.

La refractividad molar (RM) es el parámetro estérico más comúnmente usado en estudios de ACUARESA^{6,9,11 y 16}. La refractividad molar de una sustancia se define por la ecuación de Lorenz-Lorenz:

$$RM = [(n^2-1)/(n^2+2)]M/d$$

donde n = índice de refracción, M = masa molar y d = densidad del compuesto. Dado que el índice de refracción no varía mucho para la mayoría de los compuestos orgánicos y M/d es el volumen molar, RM es una medida burda del volumen⁶. Esta conclusión es soportada por estudios detallados en los que se utilizaron ACUARESA y gráficos moleculares de interacciones enzima-sustrato⁷. Se han publicado extensas tablas con valores de RM para una diversidad de sustituyentes^{9,11}. Además, se pueden calcular otros valores de RM usando el programa CMR que está incluido en el programa MedChem¹⁵. Los efectos estéricos pueden también modelarse utilizando el parámetro estérico de Taft (E_s)¹⁷ o los parámetros de Verloop (L, B₁, 4)^{15,22} o por cálculo directo de volúmenes o medidas moleculares⁷.

1.1.3 PARÁMETROS ELECTRÓNICOS.

El parámetro clásico que se utiliza para describir efectos electrónicos en ACUARESA es la constante σ de Hammett^{18,19}. Las constantes electrónicas σ fueron inicialmente desarrolladas para modelar la reactividad química, y son definidas por la siguiente ecuación:

$$\sigma = \log K_X - \log K_H$$

donde la K_H es la constante de ionización del ácido benzoico y K_X la correspondiente al ácido benzoico con el sustituyente X, ambas medidas en agua a 25°C

1.1.4 MODELOS ESTADÍSTICOS.

La fuerza de la técnica ACUARESA radica en el uso de la estadística para describir las relaciones estructura-actividad. El modelo más simple es una relación lineal entre la actividad biológica y algún parámetro fisicoquímico x. Tal relación estaría descrita por la ecuación:

$$\log 1/C = ax + b$$

donde C es la concentración molar activa (e.g. EC₅₀) y la pendiente a y la ordenada al origen b se determinan con una regresión lineal. La ecuación anterior puede explicar la actividad de una determinada serie de compuestos, pero no puede, por supuesto, extenderse al infinito, pues no existen compuestos con actividad infinita.

Para la hidrofobicidad (logP) la relación no es lineal, porque la actividad biológica se incrementa con el incremento de la hidrofobicidad hasta que se alcanza un máximo, después del cual la

actividad decrece con un aumento de la hidrofobicidad. Un modelo parabólico que relaciona la actividad con el $\log P$, descrito por la ecuación:

$$\log 1/C = a \log P + b(\log P)^2 + c$$

frecuente y exitosamente utilizado, y puede servir como una buena primera aproximación, pero la curvatura del lado izquierdo de la parábola falla en predecir con precisión la linealidad de la relación actividad-hidrofobicidad.

El modelo "bilineal" es un refinamiento posterior hecho por Kubinyi²⁰ y está descrito por la siguiente ecuación:

$$\log 1/C = a \log P - b \log (\beta P + 1) + c$$

donde β es un término no lineal, usualmente en el intervalo de 1 a 10^{-10} . El modelo bilineal produce curvas asimétricas con lados lineales ascendentes y descendentes, conectados por una porción parabólica en el rango de hidrofobicidad óptima (figura 1.3).

La pendiente ascendente está dada por el coeficiente lineal a , la pendiente descendente por $(a - b)$, y cuando $b > a$, el máximo de la curva, que representa el óptimo $\log P$ para la actividad biológica de este sistema, está dado por la ecuación⁸:

$$\log P_0 = \log [a/\beta(b-a)]$$

Una comparación del modelo en más de 300 ejemplos de relaciones estructura-actividad no-lineales sugiere que en la mayoría de los casos el modelo bilineal nos da un mejor ajuste a los datos experimentales⁸.

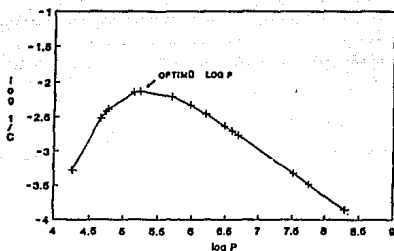


Figura 1.3. Modelo bilineal de la relación actividad-hidrofobicidad.

Las relaciones entre la actividad biológica y otros factores diferentes de la hidrofobicidad pueden ser lineales o no-lineales, y esos factores pueden interactuar con la hidrofobicidad de una manera simplemente aditiva o más compleja. Por lo tanto, el modelo final de ACUARESA involucra el uso de análisis de regresión múltiple.

Por otra parte, los grados de libertad del sistema deben reducirse y además se necesita una serie de compuestos grande para asegurar la significancia estadística. Una regla útil es la de tener al menos 5 compuestos en la serie por cada variable de la regresión.

1.1.5 ESTRATEGIA PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL FÁRMACO.

En esta sección se presenta una visión de la optimización de un modelo de fármaco utilizando el método de Hansch.

ESCOGER EL PATRÓN ÓPTIMO DE SUSTITUCIÓN.

La actividad de muchos fármacos depende del patrón de sustitución en la molécula. Uno de los primeros problemas que se enfrenta el diseño de fármacos es decidir que posición o posiciones deben investigarse.

Es demasiado caro determinar el efecto de la sustitución en diferentes sitios utilizando una serie de sustituyentes en cada posición. Una estrategia más efectiva es probar cada posición con el mismo sustituyente y determinar cuáles de éstas producen el mayor cambio en la actividad. Con esto, se puede preparar una serie de sustituyentes para esa posición. El problema radica en decidir qué sustituyente usar como prueba. Wooldridge²¹ sugirió que "la mejor posición para la modificación puede establecerse preparando por ejemplo, todos los isómeros con el sustituyente cloro". Similarmente, Ganellin²² usó metilo "como un grupo modelo para ver donde se pueden tolerar las sustituciones en histamina" y "todas las posibles monometil histaminas fueron sintetizadas y probadas" en su programa de desarrollo de fármacos análogos a la cimetidina. Si establecemos como un criterio para un buen grupo la disponibilidad comercial de intermediarios, otros candidatos para probar el efecto de la sustitución pueden ser el átomo de flúor y el grupo metoxilo.

El flúor puede causar la menor perturbación de las propiedades fisicoquímicas. Esta propiedad puede ser una desventaja porque el propósito es encontrar rápidamente la sensibilidad de una posición a la sustitución. El cloro es un grupo muy electroatrayente, mientras que el metoxilo es el caso opuesto. Los dos son de aproximadamente el mismo tamaño, pero el metoxilo es asimétrico, adicionando otro factor que

puede acrecentar el efecto de sustitución en orto. Quizá la más importante deficiencia del grupo metilo es el hecho de que en los sistemas *in vivo* se oxida fácilmente, especialmente cuando está unido a un anillo aromático.

Colocar un átomo de prueba en cada una de las posiciones no equivalentes del modelo no nos dice nada del efecto de la sustitución múltiple. Por ejemplo, no hay manera de averiguar el efecto de la sustitución en la posición 5 o 6 sobre un anillo bencénico sin usar al menos una molécula disustituida.

Utilizar una sola serie de átomos de prueba también tiene un serio riesgo porque de nuevo todo el error de medida está incluido en la comparación del compuesto patrón y el de prueba.

Si varias posiciones resultan ser sensibles a la sustitución, se debe considerar una estrategia de múltiple sustitución.

ESCOGER LOS FACTORES (PARÁMETROS) QUE SON PROBABLEMENTE LOS MÁS IMPORTANTES.

Para evitar la posibilidad de una correlación debido al uso de muchos parámetros, podemos comenzar utilizando la serie de parámetros que más probablemente influyen a la actividad y por lo tanto evitar la búsqueda aleatoria de parámetros hasta que alguno funciona²³. La serie de parámetros que se escoja dependerá de la estrategia que se siga y del conocimiento que uno tenga del mecanismo de acción del compuesto patrón o de los estudios de relación estructura actividad que existan de compuestos muy relacionados a éste. También dependerá de los recursos disponibles. Si los recursos son limitados y no se tiene conocimiento del mecanismo de acción, la mejor serie general de parámetros para representar lipofilicidad, efecto electrónico, y tamaño será π , σ y refractividad molar (RM) respectivamente.

Es importante reconocer que hay factores significantes para la actividad que pueden no estar adecuadamente representados por los

parámetros descritos arriba. Algunos de estos parámetros pueden ser clasificados como *estereoquímicos*. Por ejemplo, en los insecticidas piretroides, los isómeros *cis* y *trans* de los ácidos difieren mucho en su potencia para diversos organismos. Es muy importante representar esta información cuando ambos isómeros están presentes en una serie de compuestos. Quizá la mejor aproximación para esto es el uso de un *indicador de variable* para representar la presencia o ausencia de los isómeros individuales.

Existen otros factores además de la estereoquímica, como lo es el potencial para la aceptación o donación de puentes de hidrógeno²⁴. En el diseño de las primeras series, se debe examinar la estructura del patrón para la fisonomía tal como se describió arriba e incluir estos factores en el diseño. La completez es importante aquí. Después, la economía puede imponerse cuando posteriormente la inclusión de estas variables no se justifica por los datos experimentales.

SELECCIONAR UNA SERIE DE SUSTITUYENTES

La selección de una serie ideal de sustituyentes es ahora el objetivo. La tarea de seleccionar una serie que cumpla con el criterio establecido es algo que ha sido estudiado por varios autores. Una contribución reciente en esta área es la de Craig²⁵, quien demostró que ciertos factores están altamente correlacionados mientras que otros son, al menos estadísticamente, independientes. En consecuencia, él sugirió que "podemos evitar conclusiones incorrectas resultantes del uso de parámetros inadecuados", seleccionando sustituyentes de gráficas de dos dimensiones hechas con los parámetros. Para evitar una correlación cruzada, él aconseja que "debemos ser cuidadosos en evitar el uso de los sustituyentes que están sobre o cerca de una línea recta" en las gráficas.

El concepto de trazar los parámetros y escoger de la gráfica es muy útil para obtener una buena serie de sustituyentes. Claramente, los sustituyentes resultantes deben representar parámetros que están

bien separados en el espacio y que son ortogonales. Sin embargo, las gráficas de dos dimensiones no representan todos los factores potencialmente importantes en una serie inicial. Aun cuando usáramos gráficas tridimensionales, la información más relevante accesible sería π , σ y RM, pero no podríamos incluir otros parámetros importantes como F y R.

Una aproximación alternativa para la selección de sustituyentes fue sugerida por Hansch y sus colaboradores²⁶. Ellos proponen que el criterio para seleccionar sustituyentes que representen todos los factores pertinentes y a la vez estén poco correlacionados puede lograrse con la aplicación del análisis jerárquico de cúmulos. Se pueden usar programas como BMDP2M²⁷ o SAS CLUS²⁸ para seleccionar grupos de sustituyentes por su semejanza en algún factor. El investigador necesita seleccionar sólo un sustituyente en cada cúmulo en un nivel apropiado de agrupación para asegurar que estos criterios se han cumplido. Los autores reconocen que el método en realidad no satisface todos los requisitos de una serie ideal de sustituyentes. Es de particular importancia el hecho de que este método no garantiza ortogonalidad para los sustituyentes seleccionados. El análisis de cúmulos es muy exitoso como herramienta para diseñar una serie de sustituyentes bien dispersos en el espacio de parámetros. Su debilidad más grande es la imposibilidad de garantizar completa ortogonalidad; esto nos obliga a una búsqueda de prueba y error para que nuestra serie cumpla con este criterio.

HACER EL ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL DE TODAS LAS POSIBLES CORRELACIONES DE LOS PARÁMETROS ESCOGIDOS.

Los parámetros utilizados en el diseño deben ser los usados en la evaluación inicial de los datos biológicos. Se puede usar cualquier programa de regresión, Purcell y sus colaboradores²⁹ publicaron un programa en FORTRAN para todas las regresiones. Debe haber por lo menos tres observaciones experimentales por cada variable incluida

en el modelo final. Sin embargo, 4 o 5 observaciones es la usual "regla de los tontos". La salida de estos programas contienen información específica que puede ser utilizada para decidir cuál es el mejor modelo. Esta información es r (o r^2), s , F , y la prueba t de Student para los coeficientes de cada parámetro. La regla para escoger el mejor modelo es fijarse en el modelo que no es mejorable por la adición de términos adicionales. Un modelo de un parámetro es mejor que uno de dos.

El mejor modelo obtenido con ACUARESA se convierte en una hipótesis que *debe* ser probada. Se pueden tomar varias posibles aproximaciones para los nuevos pasos del proceso. De cualquier forma que se haga, es muy importante no tener prejuicios en la selección de los siguientes sustituyentes. Hay que escoger una nueva serie para probar la hipótesis. El concepto de una serie ideal de sustituyentes debe ser mantenido. Se deben llenar los espacios en la actividad observada y extender el área probada hacia una mayor actividad biológica. Debemos recordar que no se puede predecir la actividad fuera de los límites que se hayan probado.

Debemos reconsiderar los factores incluidos en la serie diseñada originalmente para decidir si es importante incluirlos en la nueva serie.

REPETIR EL PROCESO HASTA QUE EL ACUARESA SEA ESTABLE.

La estrategia de análisis se convierte ahora en un proceso de repetición de los pasos descritos anteriormente hasta que el ACUARESA sea estable, es decir, hasta que la predicción de la actividad sea correcta entre los límites estadísticos normales.

1.2 TECNICAS DE QUIMICA COMPUTACIONAL APLICADAS AL ESTUDIO DE LAS RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD.

1.2.0 METODOS DE ANALISIS CONFORMACIONAL.

Existen fundamentalmente tres métodos para determinar la conformación de moléculas relativamente grandes: 1) difracción de rayos X, 2) cálculos cuánticos y empíricos para sistemas aislados y 3) resonancia magnética nuclear (RMN) para el estado líquido o en solución.

La difracción de rayos X es el método de elección para una determinación precisa de la estructura tridimensional de una molécula. Específicamente, este método proporciona las coordenadas de cada átomo dentro del espacio de la celda unitaria cristalográfica. A partir de esta información se pueden calcular fácilmente las longitudes de enlace, ángulos de valencia y ángulos diedros. Además, existen programas de cómputo capaces de producir dibujos en perspectiva de la molécula en estudio que facilitan la apreciación de sus rasgos conformacionales. No obstante, se debe hacer hincapié en que este método proporciona únicamente una toma instantánea de alguna conformación particular que una molécula puede adoptar en el cristal, que debe estar poco hidratado. El problema más serio es que esta información no se puede siempre extrapolar a condiciones biológicas debido a otros factores como la presencia del disolvente, ionización, fuerza iónica, temperatura, etc.. En otras palabras, la difracción de rayos X nada nos dice acerca de otras posibles conformaciones isoenergéticas y su estabilidad relativa. Por ejemplo, en el caso de moléculas flexibles, es muy posible que éstas (o algunos de sus fragmentos) adopten diferentes conformaciones, todas ellas igualmente probables. De lo anterior se desprende que la conformación de una molécula determinada a partir del análisis de difracción de rayos X no necesariamente es la conformación biológicamente importante, es decir, aquella que adopta la molécula cuando interactúa con el receptor.

Debido a la complejidad molecular de muchos fármacos, la interpretación de un espectro de RMN es en ocasiones difícil y en muchos casos conduce a un conocimiento parcial de la conformación de la molécula en solución. A menudo las técnicas de difracción de rayos X y RMN coinciden en la existencia de un mismo conformero tanto en solución como en estado sólido.

Desde el punto de vista del diseño de fármacos, una situación ideal sería aquella en la que pudiéramos predecir tanto la conformación como todas las propiedades fisicoquímicas asociadas a una molécula antes de realizar su síntesis. Esto es exactamente lo que se puede hacer cuando disponemos de computadoras poderosas y esquemas computacionales apropiados. En la actualidad, las dos aproximaciones teóricas más usadas en el estudio de aspectos tridimensionales de fármacos son la mecánica molecular y la mecánica cuántica. Aunque estas aproximaciones se describirán con detalle más adelante, diremos brevemente que dentro del esquema de mecánica molecular se considera a una molécula como un conjunto de átomos que se mantienen unidos por fuerzas elásticas, las cuales se describen mediante funciones clásicas de energía potencial, comprendiendo: alargamiento y doblamiento de longitudes de enlace y ángulos de valencia, interacciones de no-enlace y electrostáticas, torsión a través de enlaces, etc. El método de mecánica molecular es muy usado en aquellos casos en los que solamente se requiere saber cuáles son las conformaciones energéticamente preferidas. Por otro lado, los cálculos de mecánica cuántica no sólo proporcionan las conformaciones preferidas, sino también la distribución de cargas y muchas otras cantidades que se pueden obtener (con un tiempo de cómputo mayor) a partir de las funciones de onda.

En el análisis teórico conformacional contemporáneo no hay rivalidad entre los dos esquemas teóricos mencionados; por el contrario, se complementan el uno al otro. Ambos son muy valiosos en la evaluación a priori de compuestos potencialmente activos.

La inspección y comparación de las diversas conformaciones de una serie de fármacos pueden ofrecer una guía en la síntesis de

nuevos compuestos que tengan una conformación definida como factor importante para la presencia de actividad biológica.

Es importante señalar que también existen a menudo discrepancias entre los resultados obtenidos teóricamente y aquellos obtenidos de manera experimental. En muchos casos estas diferencias se pueden aminorar cuando el método teórico toma en cuenta las condiciones ambientales que predominan en solución o en el estado sólido.

Por lo tanto, tenemos tres formas de determinar la conformación de una molécula en tres diferentes ambientes. No hay razón *a priori* para suponer que alguna de éstas es una aproximación válida del ambiente en el sitio receptor. Por ejemplo, se puede poner en duda si el agua o el cloroformo, usados en los experimentos de RMN, son compuestos modelo adecuados para imitar el ambiente receptor. Asimismo, en el caso de los métodos teóricos resulta también dudosa la suposición de una constante dieléctrica $\epsilon=1$ del medio en el cual ocurren las interacciones fármaco-receptor.

1.2.1 TEORÍA DE ORBITALES MOLECULARES.

Dentro del ACUARESA, tradicionalmente se considera el efecto electrónico de los compuestos de interés utilizando propiedades fisicoquímicas experimentales tales como la constante de Hammett del sustituyente. En este trabajo se pretende demostrar la utilidad de la teoría de orbitales moleculares en la descripción del efecto electrónico en el análisis cuantitativo de relaciones estructura-actividad no clásico. Por lo anterior, a continuación se presentan algunos conceptos básicos de la teoría de orbitales moleculares.

El objetivo de la mayoría de los cálculos mecánico-cuánticos moleculares es evaluar una función de onda molecular Ψ .

Para construir Ψ , utilizando la aproximación orbital, necesitamos conocer todos los orbitales moleculares, Ψ_P que constituyen la función de onda molecular. La mayoría de los métodos utilizados para cálculos

moleculares, desarrollan los orbitales moleculares desconocidos como una combinación lineal de orbitales atómicos^{30,31}; a esta aproximación se le conoce como CLOA (Combinación Lineal de Orbitales Atómicos). Entonces, el orbital molecular Ψ_p queda:

$$\Psi_p = \frac{1}{(N_p)^{\frac{1}{2}}} \sum_k C_k^p \phi_k \quad (1)$$

en la que ϕ_k representa orbitales atómicos (serie de funciones base), C_k^p son parámetros de variación y $(N_p)^{\frac{1}{2}}$ es la constante de normalización obtenida con la igualdad

$$N_p = \sum_l C_l^p C_l^p S_{kl}$$

donde S_{kl} es la interpenetración de los orbitales atómicos k y l

Nuestro problema de encontrar la función de onda para la molécula, se reduce entonces a determinar los coeficientes C_k^p del desarrollo, lo que a su vez se hace aplicando el método variacional.

$$F\Psi = E\Psi \quad (2)$$

Haciendo uso de la ecuación (2) del desarrollo, Roothaan³² dedujo las ecuaciones que llevan su nombre y que pueden escribirse como:

$$\sum_l F_{kl} C_l^p = E^p \sum_l S_{kl} C_l^p \quad l = 1, 2, 3, \dots, n$$

E^p es la energía de cada orbital molecular, $S_{kl} = \langle \phi_k / \phi_l \rangle$ y C_l^p son los coeficientes del desarrollo matemático.

Los términos F_{kl} son llamados elementos de la matriz de Fock y tienen la forma de la expresión

$$F_{kl} = H_{kl} + \sum_m \sum_n P_{mn} \left[\langle kl/mn \rangle - \frac{1}{2} \langle kn/lm \rangle \right]$$

en donde H_{kl} son los elementos de matriz del operador Hamiltoniano monoeléctrico

$$H_{kl} = \int \phi_k^*(i) H_u \phi_l(i) d\tau_i$$

que representan la energía cinética y de atracción nuclear de un electrón que se encuentra en la región de interpenetración $k-l$; los términos de matriz P_{mn} representan la población electrónica total presente en la región de interpenetración de las funciones base ϕ_k y ϕ_l :

$$P_{kl} = 2 \sum_p C_k^p C_l^p$$

$\langle kl/mn \rangle$ es la integral de repulsión Coulómbica entre dos electrones que se encuentran en las regiones de interpenetración $k-l$ y $m-n$, respectivamente; mientras que $\langle kn/lm \rangle$ es la integral de intercambio.

Así, la energía total de una molécula con capa llena es la siguiente expresión:

$$E = \sum_a \sum_b \frac{Z_a Z_b}{R_{ab}} + \sum_k \sum_l P_{kl} \left[H_{kl} - \frac{1}{2} \sum_m \sum_n P_{mn} (\langle kl/mn \rangle - \frac{1}{2} \langle kn/lm \rangle) \right]$$

Pueden calcularse los términos de repulsión nuclear, así como los términos monoeléctricos, H_{kl} , y bielectrónicos, $\langle \rangle$ (métodos *ab initio*), o utilizar términos estimados con datos experimentales (métodos semiempíricos).

Al minimizar la energía total con respecto a cada uno de los parámetros de variación C_k^p , haciendo $\frac{dE}{dC_k^p} = 0$ para cada índice k y p se obtiene una serie de ecuaciones lineales homogéneas para cada índice k :

$$\frac{dE}{dC_k^p} = \sum_l C_l^p (F_{kl} - E^p S_{kl}) = 0 \quad (3)$$

en donde E_p son las energías orbitales definidas por la expresión:

$$E^p = \sum_m \sum_n \frac{C_m^p C_n^p}{N_p} F_{mn}$$

La ecuación (3) tendrá una solución no trivial únicamente si se cumple la siguiente condición:

$$|F_{kl} - E^p S_{kl}| = 0$$

Al determinante $|F_{kl} - E^p S_{kl}|$ se le llama *determinante secular*. A la ecuación anterior se le conoce como *ecuación secular* y es la base de todos los métodos de orbitales moleculares. Su solución nos permite conocer la energía E^p de cada orbital molecular y al sustituir estas energías en la serie de ecuaciones lineales, se obtienen los coeficientes C_k^p y los términos de distribución electrónica P_{kl} .

Para resolver el determinante secular se requiere la evaluación de los elementos de la matriz de Fock, F_{kl} , que a su vez están en función de coeficientes desconocidos C_n y C_m , a través de P_{mn} . Una forma de evitar esta dificultad es utilizar el método Hartree. La idea fundamental es que el movimiento de un electrón en el campo de los núcleos y de los demás electrones puede reemplazarse de manera aproximada por el movimiento de un electrón en el campo de los núcleos y la distribución de carga promedio de los otros electrones. De esta forma es posible determinar una serie de valores P_{mn} . Con esto se calculan los elementos de la matriz de Fock y se resuelve la ecuación secular. La solución de valores de E^p que se sustituyen en las ecuaciones seculares para obtener nuevos valores de los coeficientes C_p , los que a su vez se usan para establecer una serie de valores P_{mn} . El procedimiento se repite hasta que los P_{mn} resultantes de un ciclo, sean iguales, dentro de los límites prescritos, a los usados en el ciclo anterior o, en otras palabras, hasta que se alcance la "autoconsistencia".

1.2.2 MÉTODOS SEMIEMPÍRICOS DE ORBITALES MOLECULARES.

1.2.2.0 APROXIMACIONES CNDO, INDO Y NDDO.

Los primeros métodos semiempíricos de orbitales moleculares, denominados CNDO, INDO y NDDO, fueron desarrollados por J. A. Pople y colaboradores³³. El objetivo de estos métodos no es reproducir resultados experimentales, sino tratar de imitar los resultados obtenidos con los métodos a primeros principios.

Klopman³⁴ y Pople^{35,36} modificaron en 1965 el tratamiento cuántico de los electrones π ^{37,38}, incluyendo en los cálculos todos los electrones de valencia, suponiendo que estos se mueven en una capa fija compuesta del núcleo y de los electrones internos. Dichos electrones se describen usando un conjunto de funciones base mínimo y se desprecian las integrales de repulsión electrónica. Se calculan las integrales restantes en función de parámetros empíricos conocidos.

Pople consideró tres aproximaciones de este tipo:

- a) NDDO^{26,39}, en esta sólo se desprecia la interpenetración diferencial* diatómica.
- b) CNDO^{26,29}, aquí se desprecian todas las integrales de dos electrones que dependen de la interpenetración de las densidades de carga de orbitales base diferentes.
- c) INDO^{25,40}, la cual difiere de la CNDO sólo por la inclusión de las integrales monocéntricas de intercambio.

Dewar^{41,42,43} modificó el formalismo matemático del método INDO y de esa forma desarrolló el método denominado MINDO (Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap). La filosofía de este método es totalmente diferente al de Pople, quien calculó los

* En este trabajo, *diferencial* no tiene el significado que se le da en cálculo. Aquí se refiere a densidades de carga de orbitales base diferentes.

parámetros de sus métodos semiempíricos (NDDO, CNDO e INDO) con el fin de reproducir los resultados obtenidos por los métodos a primeros principios. Así, el objetivo específico de esta nueva forma de deducir los parámetros, fue diseñar un método que reprodujese en forma precisa varios resultados experimentales.

Se han desarrollado tres formas sucesivas de determinar los parámetros de esta aproximación, cada una superior a la anterior. En la primera versión, MINDO/1³¹, no fue posible reproducir simultáneamente los calores de atomización y geometrías moleculares. En la segunda versión, MINDO/2, se lograron reproducir mejor los resultados experimentales, aunque todavía estaban presentes algunas diferencias. Finalmente, otra redefinición de los parámetros condujo a la versión final del método llamado MINDO/3³³.

Con las diferentes versiones del método MINDO pueden hacerse buenas estimaciones de los calores de atomización, geometrías moleculares, momentos dipolares, potenciales de ionización y constantes de fuerza.

Dewar y Thiel introdujeron en 1977 el método MNDO²². La motivación para desarrollar este método surgió cuando estos investigadores advirtieron que los métodos, como MINDO/3, que se basan en el formalismo INDO, no reproducían adecuadamente los efectos debidos a las repulsiones entre pares electrónicos libres. Por consiguiente, a fin de evitar muchas de las debilidades del método MINDO/3, los autores fundamentaron el método MNDO sobre las aproximaciones efectuadas en el esquema NDDO.

La diferencia principal entre las aproximaciones INDO y NDDO estriba en el tratamiento de las integrales de repulsión bicéntricas y las de atracción core-electrón bicéntricas. El esquema NDDO proporciona una mejor aproximación a la matriz de Fock total ya que contiene todos los términos bicéntricos que consideran a la interpenetración diferencial monoatómica.

Desde el punto de vista físico, en la aproximación INDO solamente se considera el monopolo de una distribución de carga mientras que en la aproximación NDDO, el tratamiento de los términos bicéntricos

Incluye términos multipolares y sus interacciones. En otras palabras, dentro del esquema INDO las repulsiones electrón-electrón bicéntricas y las atracciones core-electrón se promedian esféricamente, mientras que en NDDO éstas muestran una dependencia angular debido a las diferentes orientaciones que pueden adoptar los multipolos superiores. Asimismo, en el esquema INDO la direccionalidad del enlace químico se describe solamente en las integrales de resonancia $\beta_{\mu\nu}$, mientras que en NDDO se incluye también en las repulsiones electrónicas bicéntricas y las atracciones core-electrón.

Por las razones expuestas anteriormente, se espera que un método basado en el esquema NDDO será superior a uno basado en el esquema INDO, siempre y cuando los efectos direccionales sean importantes en una molécula.

1.2.2.1 MÉTODOS MNDO Y AM1.

Los métodos MNDO (Modified Neglect of Diatomic Overlap) y AM1 (Austin Model 1) pertenecen a una serie de métodos de orbitales moleculares desarrollados por M. J. S. Dewar y colaboradores^{44,45}, cuyo objetivo fue producir métodos de cálculo capaces de proporcionar resultados precisos de interés para el químico orgánico a un costo computacional razonable. Debido a que en general los requisitos de precisión química y economía computacional no son compatibles, se tuvo que establecer un equilibrio entre economía y precisión.

Para disminuir el costo de los cálculos, es necesario modificar el tratamiento de Roothan-Hall. Dewar y Thiel, crearon modificaciones basándose en las aproximaciones realizadas por Pople, sobre todo para el método INDO²⁵, donde se reduce el número de integrales de repulsión electrónica usando la aproximación del core, lo cual implica una reducción en las series de funciones base correspondientes a los orbitales atómicos de los electrones de valencia, y el desprecio de todas las integrales que involucran interpenetración diferencial,

excepto las integrales monoeléctricas del core de resonancia. ($\beta_{\mu\lambda}$) y las integrales monocéntricas de intercambio $\langle \mu\nu/\mu\nu \rangle$

La aproximación del core es ciertamente razonable, y se puede justificar al igual que el desprecio de las integrales de repulsión electrónica que involucran traslape diferencial diatómico⁴⁶.

Las consideraciones anteriores son las que hizo Pople en la aproximación NDDO^{25,29}. Por otra parte, el desprecio de las integrales de repulsión monoeléctricas efectuadas en INDO, no son justificables³⁴, en consecuencia, Dewar y colaboradores consideran que NDDO debe ser la base lógica de un tratamiento semiempírico.

Una de las aproximaciones utilizadas en CNDO^{23,26,47} e INDO^{23,25} es que las integrales de repulsión $\langle \mu\mu/\nu\nu \rangle$ entre un orbital ϕ_μ del átomo A y otro orbital atómico ϕ_ν del átomo B se consideran iguales ($=\gamma_{\lambda}$). Esta simplificación es esencial, si los resultados de los cálculos deben ser invariantes con la rotación de los ejes cartesianos^{23,29}. En el método NDDO, no se supone que las integrales sean iguales. Además, NDDO no considera un número adicional de integrales bicéntricas, las cuales involucran un traslape diferencial monocéntrico, y que por lo tanto, son despreciadas en CNDO e INDO. En consecuencia, el problema de la parametrización de NDDO es mayor que para CNDO, ya que deben evaluarse 22 integrales bicéntricas distintas.

Dewar y Thiel desarrollaron un procedimiento para estimar las integrales de repulsión de NDDO y utilizaron éstas, para una completa reparametrización de NDDO para H, C, N y O. Este nuevo tratamiento es llamado MNDO.

La aproximación del core consiste en considerar que los electrones del core de valencia se mueven en el campo de un core fijo, el cual está compuesto del núcleo y los electrones del core interno

Los orbitales moleculares del core de valencia (ψ_i) se representan mediante combinaciones lineales de un conjunto mínimo de funciones base (ϕ_ν):

$$\psi_i = \sum_{\nu} C_{\nu i} \phi_{\nu} \quad (4)$$

Los coeficientes C_{vi} se encuentran a partir de las ecuaciones de Roothaan²¹-Hall⁴⁸; las cuales, dentro de la aproximación NDDO, adquieren la forma:

$$\sum_{\nu} (F_{\mu\nu} - E_i \delta_{\mu\nu}) C_{\nu i} = 0$$

en la que E_i es el valor de la energía del orbital molecular, Ψ_i y $\delta_{\mu\nu}$ es la delta de Kronecker. Los elementos de la matriz de Fock ($F_{\mu\nu}$) son la suma de una parte monoeléctronica ($H_{\mu\nu}$) y una bioeléctronica ($F_{\mu\nu}$).

La energía electrónica es:

$$E_{el} = \frac{1}{2} \sum_{\mu} \sum_{\nu} P_{\mu\nu} (H_{\mu\nu} + F_{\mu\nu})$$

en esta ecuación, $P_{\mu\nu}$ es un elemento de la matriz de orden de enlace.

En lo sucesivo, supondremos que los orbitales atómicos ϕ_{μ} y ϕ_{ν} están centrados en el átomo A y los orbitales atómicos ϕ_{λ} y ϕ_{σ} en el átomo B ($A \neq B$). Los índices A o B se usarán para asignar un símbolo particular al átomo A o B, respectivamente.

Considerando esta notación, los elementos de la matriz de Fock dentro del esquema NDDO son:

$$F_{\mu\mu} = U_{\mu\mu} + \sum_B V_{\mu\mu,B} + \sum_{\nu}^A P_{\nu\nu} \left[\langle \mu\mu/\nu\nu \rangle - \frac{1}{2} \langle \mu\nu/\mu\nu \rangle \right] + \sum_B \sum_{\lambda,\sigma} P_{\lambda,\sigma} \langle \mu\mu\lambda\sigma \rangle$$

$$F_{\mu\nu} = \sum_B V_{\mu\nu,B} + \frac{1}{2} P_{\mu\nu} + [3 \langle \mu\nu/\mu\nu \rangle - \langle \mu\mu/\nu\nu \rangle] + \sum_B \sum_{\lambda,\sigma} P_{\lambda,\sigma} \langle \mu\nu\lambda\sigma \rangle$$

$$F_{\nu\nu} = \beta_{\nu\nu} - \frac{1}{2} \sum_{\mu}^A \sum_{\sigma}^B P_{\mu\sigma} \langle \mu\nu\lambda\sigma \rangle$$

En la matriz de Fock aparecen los siguientes términos:

- Energías monoeléctricas monocéntricas, $U_{\mu\mu}$, las cuales representan la suma de la energía cinética de un electrón en el orbital atómico ϕ_{μ} del átomo A y su energía potencial debida a la atracción por el core del átomo A.
- Integrales de repulsión bioeléctricas monocéntricas; por ejemplo, integrales de Coulomb $\langle \mu\mu|\nu\nu \rangle = g_{\mu\nu}$ e integrales de intercambio $\langle \mu\nu|\mu\nu \rangle = h_{\mu\nu}$.
- Integrales de resonancia monoeléctricas bicéntricas $\beta_{\mu\lambda}$.
- Atracciones monoeléctricas bicéntricas, $V_{\mu\nu,B}$ entre un electrón en la distribución ψ_{μ} ψ_{ν} del átomo A y el core del átomo B.
- Integrales de repulsión bioeléctricas bicéntricas $\langle \mu\nu|\lambda\sigma \rangle$.

La energía total de la molécula, E_{tot} , es la suma de la energía electrónica, E_{el} , y las repulsiones, E_{AB} , entre los cores de los átomos A y B.

$$E_{\text{tot}} = E_{\text{el}} + \sum_A \sum_{< B} E_{\text{AB}}$$

El calor de formación de la molécula, ΔH_f , se obtiene restando a la energía total las energías electrónicas de cada átomo, E_{el}^A , y sumando los calores de formación experimentales, ΔH_f^A , de los átomos que constituyen la molécula.

$$\Delta H_f = E_{\text{tot}} - \sum_A E_{\text{el}}^A + \sum_A \Delta H_f^A$$

En el método MNDO, los diversos términos de la matriz de fock y las repulsiones E_{AB} , no se evalúan analíticamente. Éstos se determinan a partir de datos experimentales o de expresiones semilempíricas, las cuales contienen parámetros numéricos que se pueden ajustar con el fin de reproducir algunos datos experimentales. Se espera que la introducción de parámetros ajustables compense el menosprecio de la correlación electrónica y los errores debidos a las suposiciones hechas en el esquema NDDO.

La incapacidad de reproducir los puentes de hidrógeno fue fatal para la aplicación de MNDO en el estudio de sistemas biológicos interesantes. Dewar comenzó inmediatamente a trabajar para corregir este problema. La reparametrización no fue la solución, porque no existen términos en MNDO que puedan corregir la excesiva repulsión a distancias de van der Waals. En lugar de esto, se asignó a cada átomo un número de gaussianas esféricas para simular los efectos de correlación. El término core-core en AM1 se transformó a

$$E_{AB} = Z_A Z_B (s_A s_B | s_B s_B) + Z_A Z_B / R_{AB} \sum_i^4 [a_i(A) e^{-b_i(A) |R_{AB} - c_i(A)|^2} + a_i(B) e^{-b_i(B) |R_{AB} - c_i(B)|^2}]$$

en el cual $a_i(A)$, $b_i(A)$ y $c_i(A)$ son parámetros.

Esto incrementa el número de parámetros de 7 originales a entre 13 y 16 por átomo.

Con AM1 se reprodujo el enlace de hidrógeno del dímero de agua con una energía de 5.5 kcal/mol⁴⁹.

Por 1985⁵⁰ cuatro elementos fueron parametrizados: C, H, N y O. Actualmente son diecisiete los elementos parametrizados, estos incluyen F, Cl, Al, P, S, B, Zn, Hg, Ge, y Sn.

Las barreras de reacción calculadas con MNDO son generalmente muy altas, mientras que las obtenidas con AM1 son considerablemente mejores, aunque también son frecuentemente altas. Los cálculos a primeros principios de las barreras de

activación calculadas a nivel Hartree-Fock son también demasiado grandes. Esto se corrige usualmente por un moderado grado de correlación. Las barreras no pueden calcularse por este método si el estado de transición no es estable a nivel Hartree-Fock esto es, si hay un cruce de dos estados de muy diferente carácter, o si los enlaces covalentes son rotos o formados, etc.

MNDO predice poca estabilidad para moléculas estéricamente impedidas, este efecto es muy marcado en neopentano. En contraste, predice mucha estabilidad para los anillos de 4 miembros. El ΔH_f predicho para el cubano, por ejemplo, tiene un error de -49.6 kcal/mol. Estos errores son corregidos por AM1.

AM1 funciona mejor que MNDO para hidrocarburos.

MNDO no predice bien los calores de formación de compuestos hipervalentes; consecuentemente no debe usarse cuando se involucren sistemas hipervalentes.

Los errores en el ΔH_f de cationes son ligeramente mayores que los errores equivalentes en moléculas neutras. Por esto, se debe tener cuidado en cualquier cálculo que involucre especies cargadas.

Ambos métodos reproducen las geometrías de estado basal adecuadamente. Los errores promedio son: para longitudes de enlace 0.054 Å en MNDO y 0.050 Å en AM1, para ángulos de valencia 4.3° en MNDO y 3.3° en AM1 y para ángulos diedros 21.6° en MNDO y 12.5° en AM1.

Actualmente, los métodos semiempíricos están evolucionando aceleradamente. Los promedios de error se reducen aproximadamente el 50% por década. En realidad, algunos resultados de cálculos semiempíricos sugieren que ciertos datos experimentales tienen una exactitud cuestionable.

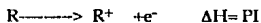
1.3 POTENCIAL DE IONIZACIÓN, CALOR DE FORMACIÓN Y MOMENTO DIPOLAR.

Los métodos MNDO y AM1 que se utilizaron en este trabajo nos proporcionan, además de la conformación de mínima energía y de la estructura electrónica, otros parámetros fisicoquímicos como el momento dipolar, potencial de ionización y calor de formación.

Estas propiedades pueden relacionarse con su reactividad, estabilidad o actividad biológica. Por esta razón, a continuación discutiremos brevemente estas propiedades.

1.3.0 POTENCIAL DE IONIZACIÓN.

Desde hace varios años se ha tratado de relacionar la teoría con el experimento a través de ciertas propiedades moleculares, por ejemplo el potencial de ionización (PI), el cual se define como la energía necesaria para eliminar un electrón de una molécula en fase gaseosa.



El primer potencial de ionización se refiere al electrón menos unido a la molécula. Desde un punto de vista teórico, los potenciales de ionización son importantes debido a que su valor corresponde, de manera aproximada, a la energía del orbital molecular ocupado de mayor energía (HOMO) del sistema y por consiguiente, su determinación ha sido útil para evaluar teorías de orbitales moleculares. En reciprocidad, estas teorías son frecuentemente útiles para entender los efectos de la estructura sobre el PI. A partir del valor de P.I. obtenemos indicios importantes acerca del estado electrónico de una molécula.

T.C. Koopmans⁵¹ probó que la energía necesaria para sustraer un electrón de orbital en un átomo o molécula con capa cerrada, tiene un

valor aproximado al negativo de la energía de Hartree Fock, e_i , del orbital. Ya que esta cantidad es, en general negativa, el PI (comúnmente llamado PI vertical) es un número positivo que se aproxima al PI observado. Por lo tanto, la energía de ionización molecular o PI, puede estimarse tomando $-e_i$ del HOMO. El teorema de Koopman da generalmente buenos resultados para la energía de orbitales, aunque no siempre proporciona buenos valores para los PI.

Al aplicar este teorema, suponemos que los orbitales del ion son idénticos a los del sistema de capa cerrada, esto es una aproximación; no obstante, el teorema de Koopman se cumple en muchos casos con sorprendente precisión. Ahora bien, aunque no se entiende completamente la razón de esto, se afirma que el cambio de energía producido por la distorsión de los orbitales del ion, es compensado, por un cambio de energía de correlación⁵². Así, aunque es erróneo suponer el comportamiento de orbital constante en los estados basal y ionizado, tal suposición funciona bien.

1.3.1 CALOR DE FORMACIÓN.

Otra propiedad molecular de importancia, es el calor de formación estándar, definido como el cambio de entalpía para la reacción en la que un mol de un compuesto determinado se produce a partir de sus elementos en sus formas más estables.

Los calores de formación estándar, ΔH_f° , se obtienen en algunos casos de manera directa por medición en un calorímetro, pero por lo general, se determina indirectamente usando calores de combustión junto con la ley de Lavolsler-Laplace y la de Hess.

Los compuestos para los cuales ΔH_f° es negativo son, por lo general, más estables con respecto a sus elementos, porque se libera energía en su formación. Por otra parte, un valor positivo de ΔH_f° indica que el compuesto puede formarse a partir de sus elementos solo cuando se proporciona energía al sistema reaccionante; estos compuestos son menos estables que los elementos puros.

1.3.2 MOMENTO DIPOLAR

La distribución de carga eléctrica en una molécula se encuentra estrechamente relacionada con un gran número de propiedades o fenómenos observables, tal como el momento dipolar eléctrico μ .

En general, las medidas de momento dipolar no se usan para obtener longitudes de enlace, ni para conocer con exactitud la separación de cargas. Sin embargo, el conocimiento de los momentos dipolares de un compuesto resulta muy útil para determinar la conformación molecular e informa acerca de la posición atómica relativa en el espacio, de una especie; es decir, de su simetría.

CAPITULO 2

*Estudio de la relación estructura-actividad
analgésica de 3-octahidro-1H-pirano
(4,3-c)piridin-8a-il fenoles*

2.0 INTRODUCCIÓN.

Este capítulo presenta los resultados obtenidos del estudio de la relación estructura-actividad analgésica de 3-octahidro-1H-pirano(4,3-c)piridin-8a-il fenoles mostrados en la figura 2.1:

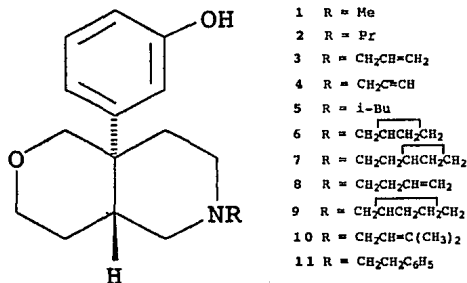


Figura 2.1. Compuestos estudiados.

La actividad analgésica de los compuestos antes mencionados fue probada por D. E. Bays y colaboradores⁵³. Con los resultados de actividad biológica obtenidos por estos autores, nosotros realizamos un estudio ACUARESA. Para esto, primero se realizó el análisis conformacional de la serie de compuestos mencionada, utilizando para

tal efecto cálculos de mecánica molecular, por medio del programa MMX87, y cálculos cuánticos semilempíricos de orbitales moleculares con el método de cálculo MNDO.

Se han estudiado muchos análogos subestructurales del esqueleto o núcleo de la morfina (12); de entre los que se han descrito⁵⁴, los trans-4a-aril-decahidro-isoquinolinas (13) representan una clase de compuestos que recientemente se han investigado tanto por químicos orgánicos⁵⁵, como por químicos medicinales⁵⁶. Estos compuestos conservan la estructura del anillo rígido trans C/D y la media aromaticidad axial de la morfina. Para ciertos derivados (por ejemplo (14)⁴³) se ha reportado que tienen propiedades opioides analgésicas. El reciente descubrimiento de que los 6-oxamorfianos (por ejemplo proxorfan (15)⁵⁷) presentan buena actividad analgésica, pero con reducidos efectos colaterales, estimuló el interés por sintetizar y evaluar un sistema que es un fragmento estructural análogo: trans-8a-ariloctahidropirano (4, 3-c) piridina (16)⁴⁵.

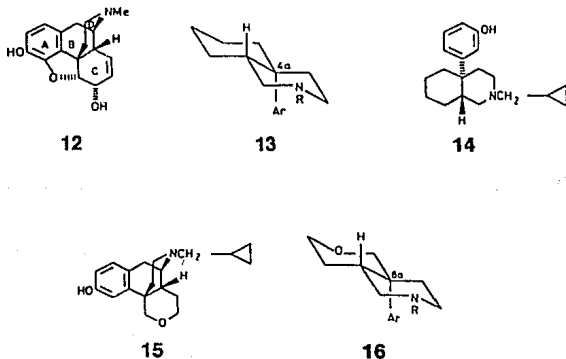


Figura 2.2

D. E. Bays y colaboradores⁵⁸ sintetizaron nuevos *cis*- y *trans*-3-(octahidro-1-H-pirano(4,3-c)piridin-8a-il)-fenoles (17) y los sistemas tiopirano equivalentes (18). Los compuestos que sintetizaron fueron tales que les permitieron cambiar la naturaleza del nitrógeno y del carbono C4 del anillo piránico; esto con el objetivo de estudiar el perfil farmacológico de algunos morfínicos que sostienen sustituyentes en el anillo C⁵.

Está bien establecido que los opioides exógenos e indógenos interactúan con tres distintos tipos de receptores de opioides, designados como receptores μ , κ , y δ ⁶⁰. Para los diferentes tipos de perfiles farmacológicos de μ y κ -agonista, se ha sugerido que opioides con prominente componente κ -agonista deben ser analgésicos más seguros que los tradicionales parecidos a la morfina o μ -agonistas⁶¹. Bays y colaboradores probaron la actividad antinociceptiva de estos compuestos y, hasta donde les fue posible, su interacción con los subtipos de receptores de opioides μ y κ .

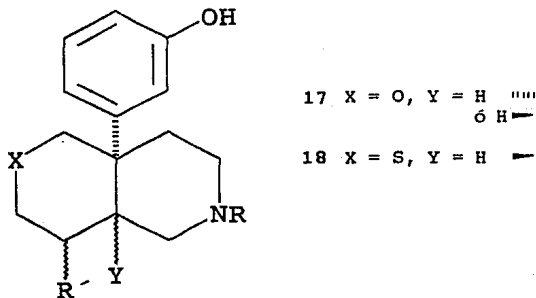


Figura 2.3. Compuestos 17 y 18

Se probó en vivo la actividad antinociceptiva de los trans-3-(octahidro-1-H-pirano-(4,3-c)-piridina-8a-yl) fenoles (1-11) en rata usando el examen de constricción abdominal acetilcolina-inducida⁶² y el efecto sobre la orina excretada. Este examen demostró ser un modelo muy útil para la caracterización *in vivo* de diferentes tipos de receptores oploides agonistas: los μ -agonistas inducen antidiuresis mientras los κ -agonistas causan diuresis⁶³. Además, los κ -agonistas con alta actividad producen una marcada diuresis mientras los parcialmente κ -agonistas producen una máxima disminución de diuresis⁶⁴. Los compuestos que tienen actividad tanto sobre receptores μ como κ producen un efecto bifásico (2 fases) : Un efecto inicial antidiurético seguido por una diuresis más sostenida.

In vitro se evaluó la selectividad de μ/κ de los compuestos mencionados utilizando preparaciones de fleón de conejillo de indias. El bloqueo del μ -receptor fue producido por el oploide antagonista irreversible β -funaltrexamina (b-FNA). Un bloqueador efectivo de receptores κ fue producido usando el antagonista irreversible no selectivo β -cloraltrixamina (β -CNA), con protección concurrente receptor μ usando el agonista selectivo μ (D-Ala,⁶⁵ MePhe,⁶⁶ Gly(ol)⁶⁷) enkefalin (DAGO)⁶⁸.

2.1 METODOLOGÍA Y RESULTADOS.

2.1.0 ANÁLISIS CONFORMACIONAL.

Se obtuvo la conformación de mínima energía del compuesto 1 utilizando el programa MMX87⁶⁹ instalado en una computadora PC, el cual realiza un cálculo de Mecánica Molecular MM2 para obtener esa estructura.

Esta estructura fue alimentada al programa MNDO⁷⁰, efectuándose un proceso exhaustivo de optimización. Estos cálculos se

realizaron en una computadora A12 de UNISYS. La figura 2.4 muestra la conformación, optimizada con MNDO, del compuesto 1 dibujado a partir de las coordenadas finales. En ésta podemos observar que los anillos fusionados presentan conformación de silla.

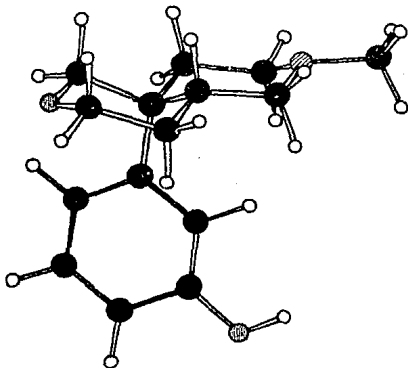


Figura 2.4. Estructura final del compuesto 1.

Para tener la seguridad de haber obtenido la conformación de mínima energía, se calculó la barrera de inversión del metilo para el compuesto 1 (figura 2.5).

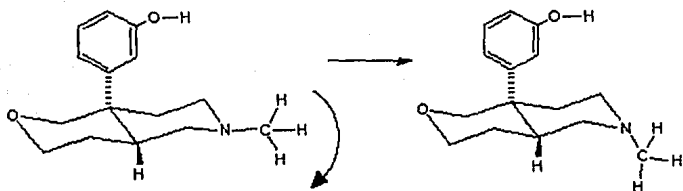
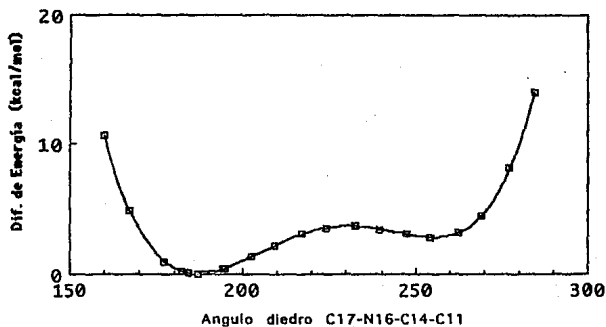


Figura 2.5. Inversión del metilo

Los resultados se presentan en la figura 2.6. La diferencia de energía (ΔE) que se presenta en esta gráfica, corresponden a la diferencia entre la energía total generada para cada uno de los diversos valores del ángulo diedro y el menor valor de energía total obtenida.

Inversión del metilo



Gráfica 2.6. Barrera de energía para la Inversión del metilo.

La numeración utilizada se presenta en la figura 2.7.

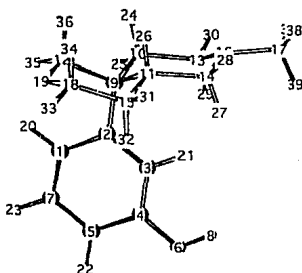


Figura 2.7. Numeración utilizada.

También se calculó la barrera de inversión del oxígeno (figura 2.8), para saber qué tan difícil es la conversión al otro conformero. Para esto, se fue cambiando el ángulo diedro O19-C18-C15-C11 (ver figura 2.7) optimizando cada vez los hidrógenos de los átomos C12 y C18 (carbonos adyacentes al oxígeno). Los resultados se presentan en la figura 2.9. La diferencia de energía que se traza en esta gráfica, corresponde a la diferencia entre la energía total generada para cada uno de los valores diversos del ángulo diedro y el menor valor de energía total obtenida.

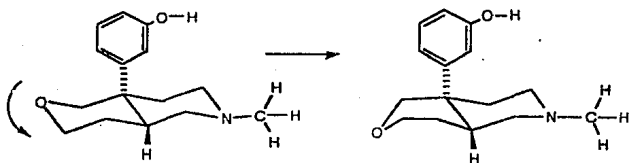


Figura 2.8 Inversión del oxígeno.

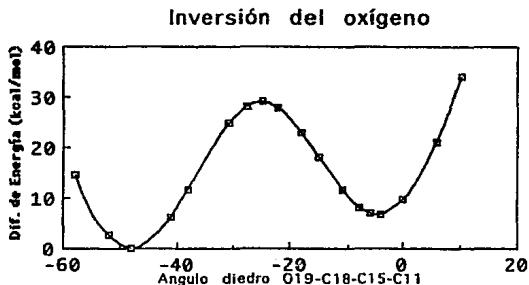


Figura 2.9. Barrera de Inversión del oxígeno.

También se calculó la barrera de rotación del anillo aromático en el compuesto 1 cambiando el valor del ángulo diedro C10-C9-C2-C3. La figura 2.10 presenta los resultados obtenidos.

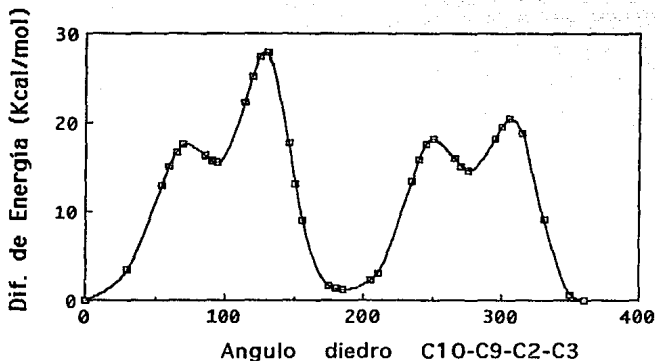


Figura 2.10. Barrera de rotación del anillo aromático.

Utilizando como base la estructura del compuesto 1, optimizada con MNDO, y algunos datos de la literatura⁷¹, se construyeron las conformaciones iniciales de todos los compuestos; éstas se optimizaron con el cálculo MNDO obteniéndose así la conformación de mínima energía para todos los derivados.

2.1.1 Propiedades fisicoquímicas calculadas.

Se calcularon las densidades electrónicas en cada átomo, calor de formación, potencial de ionización, momento dipolar, energía total y energía LUMO (tabla 2.1).

N-SUSTITUYENTE	ΔH_f (kcal/mol)	μ (Debye)	PI (eV)	$-E_{LUMO}$ (eV)	E_{total} (eV)
Me	-37.12	1.97	8.86	0.12645	-3066.13
Pr	-44.84	1.89	8.87	0.11775	-3378.95
CH ₂ CH=CH ₂	170.29	1.30	7.35	-2.4526	-3341.29
CH ₂ C=CH	19.24	2.00	8.87	0.11524	-3319.51
t-Bu	-43.27	1.95	8.86	0.12506	-3535.13
CH ₂ CHCH ₂ CH ₂	23.47	1.95	8.86	0.11874	-3503.90
CH ₂ CH ₂ CHCH ₂ CH ₂	135.17	2.29	8.84	0.14418	-3655.30
CH ₂ CH ₂ CH=CH ₂	41.31	1.97	8.86	0.12499	-3503.13
CH ₂ CHCH ₂ CH ₂ CH ₂	-37.29	1.92	8.86	0.12320	-3662.78
CH ₂ CH=C(Me) ₂	57.87	1.98	8.86	0.12199	-3658.65
CH ₂ CH ₂ Ph	-12.76	1.94	8.86	0.12010	-4045.45

Tabla 2.1. Propiedades fisicoquímicas calculadas con MNDO.

2.1.2 Densidades electrónicas.

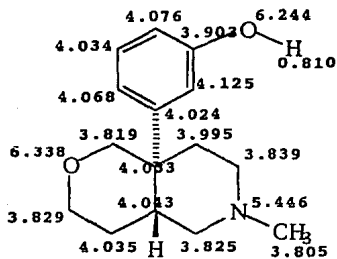
Al comparar las densidades electrónicas de todos los compuestos estudiados, observamos que la presencia de los grupos sustituyentes no afecta notablemente la estructura electrónica de los diversos compuestos.

En las figuras 2.11-2.16 se presentan las densidades electrónicas calculadas con MNDO.

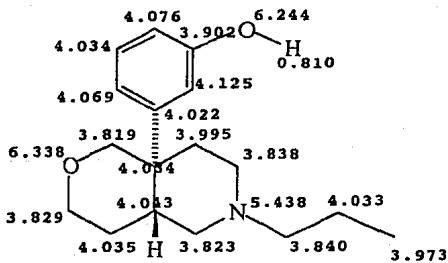
2.2 RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Se buscó una relación entre la actividad analgésica de los compuestos de interés con algún parámetro fisicoquímico calculado o reportado para éstos. Para esto, se calculó el $\log(1/DE_{50})$ y se hizo un análisis ACUARESA utilizando los resultados obtenidos con los cálculos MNDO, mostrados en la tabla 2.1 y con el coeficiente de partición y la refractividad molar (RM). Estas dos últimas propiedades se calcularon con el programa desarrollado por Leo y sus colaboradores⁷² en una computadora VAX 8530, los valores obtenidos se presentan en la tabla 2.2.

Figura 2.11. Densidades electrónicas de los compuestos 1 y 2.



1



2

Figura 2.12. Densidades electrónicas de los compuestos 3 v 4.

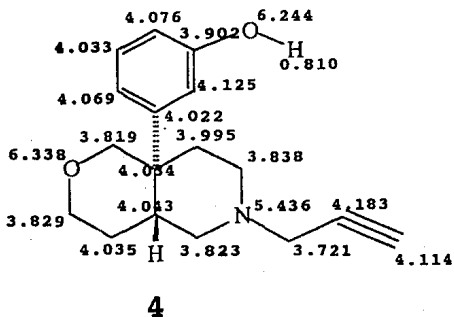
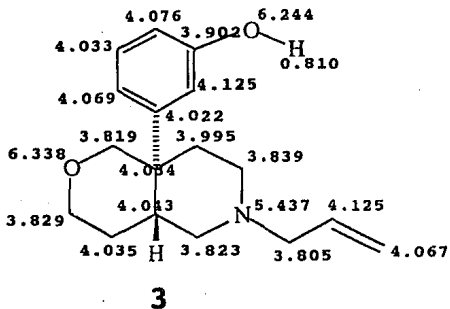


Figura 2.13. Densidades electrónicas de los compuestos 5 y 6.

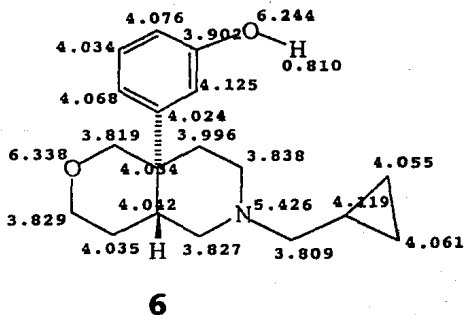
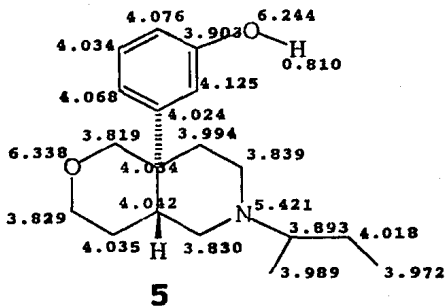


Figura 2.14. Densidades electrónicas de los compuestos 7 y 8.

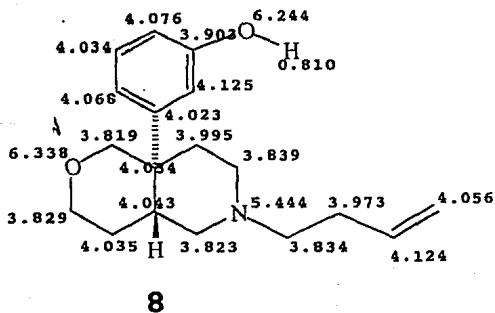
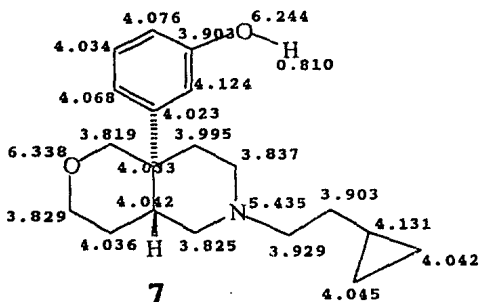
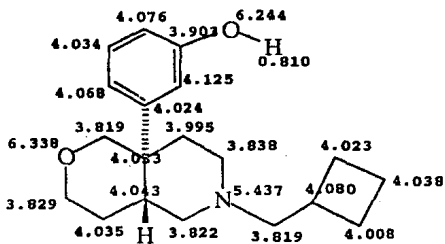
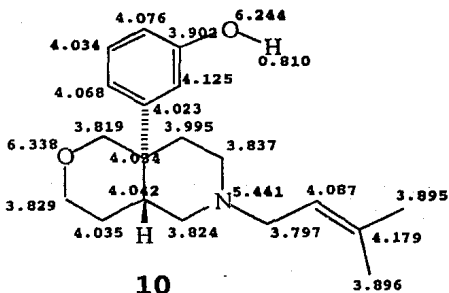


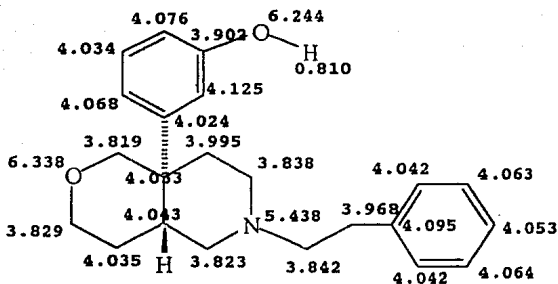
Figura 2.15. Densidades electrónicas de los compuestos 9 y 10.



9



10



11

Figura 2.16. Densidades electrónicas del compuesto 11.

El análisis ACUARESA se realizó utilizando el programa QSAR de Pomona College⁷³ en la misma computadora VAX 8530. Durante el proceso se observó que las propiedades calculadas con MNDO no estaban relacionadas con la actividad biológica pero se apreciaba un efecto estérico del sustituyente. Se decidió calcular el volumen y las dimensiones de la caja que contiene al sustituyente, orientando la molécula en la misma forma para todos los derivados (figura 2.17).

Estos cálculos se llevaron a cabo con el programa CHEMLAB II versión 9.0 en una computadora VAX 8530.

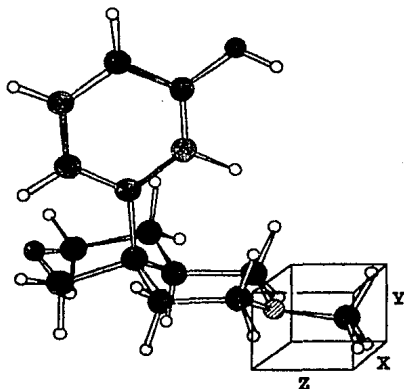


Figura 2.17. Dimensiones de la caja que contiene al sustituyente.

Del análisis ACUARESA se obtuvo una relación de la actividad con la constante hidrofóbica y la "altura de la caja". Esta relación se presenta en la ecuación 2.1.

$$\log 1/DE_{50} = 1.097 (0.359) \pi - 0.772 (0.413) Y - 0.332 (1.033) \quad (2.1)$$

$$n = 11, r = 0.928, s = 0.271 .$$

Los valores entre parentesis indican los intervalos de confianza construidos para el 95%. n es el número de datos usados, r el

coeficiente de correlación y s la desviación estándar. La correlación entre las variables π y Y de la ecuación 2.1 es: $r = 0.654$.

La tabla 2.2 presenta los valores utilizados para obtener esta ecuación, los valores predichos y las desviaciones con respecto a los valores observados. También se muestran los valores de refractividad molar calculados.

Tabla 2.2. Datos utilizados para obtener la ecuación 2.1.

N-SUSTITUYENTE	$\log(1/DE_{50})$ observado	$\log(1/DE_{50})$ calculado	$\Delta \log$ $1/ED_{50}$	RM calc.	π calc.	Y calc.
Me	-1.16	-0.91	-0.251	0.552	0.876	1.933
Pr	-0.44	-0.29	-0.150	1.480	2.054	2.867
$CH_2CH=CH_2$	-0.56	-0.87	0.314	1.454	1.510	2.850
$CH_2C=CH$	-1.68	-1.80	0.120	1.277	0.646	2.822
l-Bu	-0.68	-0.65	-0.033	1.944	2.583	4.081
$CH_2CHCH_2CH_2$	-1.10	-1.21	0.112	1.806	1.969	3.941
$CH_2CH_2CHCH_2CH_2$	-0.73	-0.35	-0.382	2.270	2.498	3.573
$CH_2CH_2CH=CH_2$	-0.24	-0.38	0.138	1.918	2.039	2.959
$CH_2CHCH_2CH_2CH_2$	-0.13	-0.03	-0.163	2.230	2.528	3.122
$CH_2CH=C(Me)_2$	-0.86	-0.74	-0.117	2.382	2.438	4.000
CH_2CH_2Ph	0.83	0.42	0.411	3.527	2.943	3.211

2.3 DISCUSION.

En la figura 2.6 se puede observar que la estructura de la que se partió para calcular la barrera de rotación si es la de mínima energía, porque aunque se presenta el otro mínimo en la gráfica, su energía total es 2.86 kcal/mol mayor y además no es una

conformación estable pues la energía de ésta no es muy diferente a la del máximo, por lo que preferentemente el sustituyente del nitrógeno estará en posición ecuatorial.

Esto es importante porque, comparando con la morfina⁷⁴, se observa que el sustituyente del nitrógeno está también en posición ecuatorial (figura 2.18).

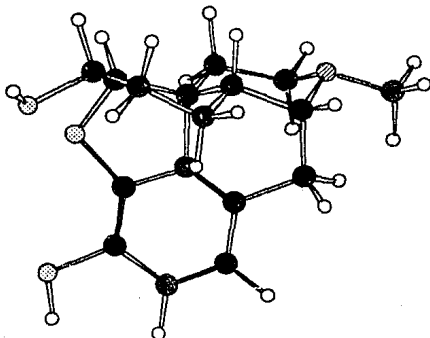


Figura 2.18. Estructura de la morfina.

En la figura 2.9 podemos observar que la estructura de mínima energía es la que se obtuvo inicialmente con el cálculo MNDO, pero existe otra conformación estable donde el ángulo diedro del O19 tiene un valor de -5.769° . En esta conformación el anillo que contiene al

oxígeno presenta una conformación de bote. Es pertinente aclarar que esta última conformación se relajó totalmente, asegurándonos de que ésta corresponde realmente al mínimo de energía.

La diferencia de energía entre la conformación inicial y la correspondiente a la del otro mínimo de energía es de 5.55 kcal/mol siendo esta conformación bastante estable, pues para pasar al otro conformero tiene que vencer una barrera de energía de 34.14 kcal/mol.

Si comparamos la estructura del compuesto 1 con la de la morfina (figura 2.19) podemos observar que el sustituyente del nitrógeno es ecuatorial en ambos compuestos. Con respecto al otro anillo, aunque en la morfina el anillo tiene conformación de bote y en el compuesto 1 de silla, en ambos compuestos, el oxígeno (de éter en el 1 y de alcohol en la morfina) está dirigido hacia el anillo aromático.

Por otra parte, en la morfina el anillo que tiene al grupo alcohol, no puede tener conformación de silla por la rigidez impuesta por los otros anillos. Esto sí puede ocurrir en el compuesto 1.

Una observación interesante que surge al comparar las estructuras anteriores es que la posición del anillo aromático es muy semejante (figura 2.18). En efecto, aun cuando en el compuesto 1 este anillo puede girar libremente, toma una posición muy parecida a la de la morfina, en la cual el anillo aromático no puede girar porque está unido a los otros ciclos.

Debemos observar que en las estructuras anteriores el plano del anillo aromático es muy semejante, pero la posición del -OH del anillo aromático es diferente.

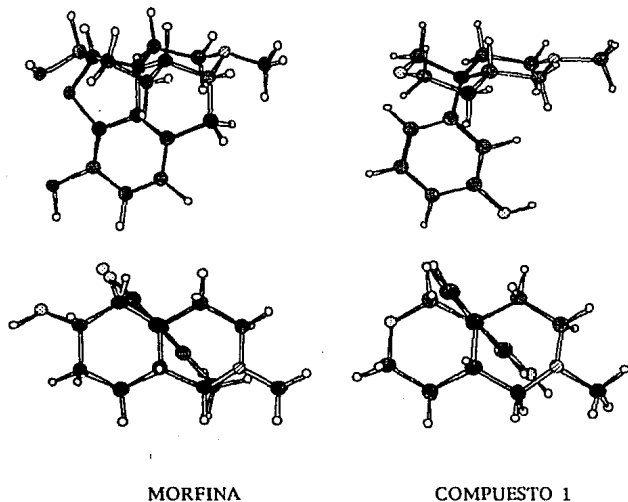


Figura 2.19. Comparación de la morfina con el compuesto 1.

Esto es muy importante si consideramos que la actividad biológica de los compuestos estudiados depende de su semejanza estructural con la morfina; además, si giramos 180 grados el anillo aromático del compuesto 1 para tener al -OH en la misma posición que en la morfina, la energía no debe cambiar sustancialmente.

En la figura 2.10 se puede observar que la diferencia de energía entre la conformación inicial que se tenía y la conformación con el

anillo aromático girado 180° es casi nula, como se había pensado inicialmente. De tal forma, que es igual de probable que el anillo tenga estas dos posibles posiciones.

Del análisis ACUARESA podemos observar de la ecuación 2.1 que ni la distribución electrónica ni las propiedades fisicoquímicas calculadas con MNDO forman parte de la ecuación de correlación, sin embargo es clara la influencia de la hidrofobicidad y el tamaño del sustituyente sobre la actividad biológica.

Podemos observar que la correlación entre las variables involucradas: constante hidrofóbica (π) y la dimensión Y de la caja que contiene al sustituyente, es un poco alta: $r = 0.654$, $r^2 = 0.428$; pues, como ya se menciona en el capítulo 1, en el estudio cuantitativo de relaciones estructura-actividad se pretende tener variables ortogonales, con un r^2 no mayor de 0.30. Sin embargo, la correlación entre las variables no es excesivamente alta, y como el coeficiente de correlación de la ecuación 2.1 es bastante bueno, $r=0.928$, podemos decir que esta ecuación es aceptable y que el ACUARESA muestra que la diferencia entre la actividad biológica de los diferentes compuestos estudiados se debe al diferente efecto estérico e hidrofóbico de los sustituyentes y no a un efecto electrónico.

2.4 CONCLUSIONES.

Se realizó el análisis conformacional de los 11 compuestos estudiados y se obtuvo la conformación de mínima energía de éstos, observándose que la conformación de estos optoides es muy semejante

a la de la morfina. Especialmente llama la atención que, en nuestros compuestos, el anillo aromático toma la misma posición que el anillo de la morfina, aun cuando en la morfina esta fijo y en nuestros compuestos no.

El hecho de que el anillo aromático, en una conformación bastante estable, tenga la misma posición que en la morfina, puede indicar una cierta interacción del receptor con esa parte de la molécula.

Se calcularon, con el método de cálculo MNDO, la distribución electrónica, las energías de los orbitales moleculares, calor de formación, momento dipolar, potencial de ionización y la energía total.

Utilizando el programa MEDCHEM se calcularon las constantes hidrofóbicas y la refractividad molar de los sustituyentes.

Se realizó el análisis ACUARESA con las propiedades calculadas y se observó que la actividad biológica depende de la hidrofobicidad y las dimensiones del sustituyente y no del efecto electrónico de éste. En efecto, utilizando el programa CHEMLAB II, se calcularon las dimensiones de la caja que contiene al sustituyente y el volumen de ésta, separándose así el efecto de volumen del sustituyente en sus componentes X, Y y Z, observándose que la dimensión Y es la que influye en la actividad biológica.

El estudio ACUARESA nos dio una buena correlación entre la actividad biológica y las constantes π y Y. Sin embargo, estas variables están correlacionadas, lo que sugiere estudiar derivados que tengan sustituyentes como -EtOH, -AcOH, etc, que rompan la correlación entre π y Y.

CAPÍTULO 3

Estudio de la relación estructura-actividad de la hidrólisis de ésteres de N-benzoilglicina por papaína.

3.0 INTRODUCCIÓN.

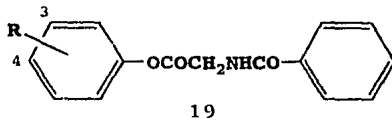
Un problema de mucha importancia en bioquímica, y en general en toda la biología, es entender los parámetros estructurales que gobiernan el enlace de sustratos e inhibidores con biorreceptores. Aunque hay muchas maneras de atacar este problema, nosotros escogimos estudiar la interacción de ligandos con enzimas cuyas estructuras se han determinado por cristalografía de rayos X. Teniendo esta información podemos utilizar dos poderosas herramientas, con bases independientes, para enfrentar este problema: relaciones cuantitativas estructura-actividad ACUARESA (quantitative structure-activity relationships, QSAR) y análisis gráfico molecular tridimensional^{75,76}.

La aproximación ACUARESA se basa en el uso de descriptores numéricos de las propiedades electrónicas, hidrofílicas y estéricas de los ligandos⁷⁷ y en el empleo de métodos estadísticos para relacionar estas propiedades con parámetros de cinética enzimática (K_m , k_{cat} , etc.) obtenidos del estudio de la enzima en solución. Esto nos da una ecuación (ACUARESA) la cual puede usarse para comparar la interacción del ligando en solución amortiguadora con la interacción en la célula viva o bien, el organismo completo⁷⁸.

La papaína es una molécula interesante para el estudio de cómo los ligandos se enlazan a las enzimas. Es una enzima barata, es fácil trabajar con ella, se conoce su estructura cristalográfica⁷⁹ y presenta un extenso intervalo de actividad hidrolítica con una amplia variedad

de ésteres, amidas y peptidos. Walsh ha conjuntado muchas referencias que discuten el mecanismo de acción de la papaína⁸⁰.

Un ejemplo de ACUARESA lo podemos obtener del estudio de la hidrólisis de ésteres de R-N-benzoilglicina (de aquí en adelante compuestos 19) por papaína. Esto se ilustra con la ecuación 3.1⁸¹.



$$\log 1/K_m = 0.57\sigma + 1.03\pi_3' + 0.61RM_4 + 3.80 \quad (3.1)$$

$$n = 25, r = 0.907, s = 0.202$$

En los ligandos 19, R representa polisustitución o monosustitución. En la ec. 3.1 K_m es la constante de Michaelis, σ es la constante de Hammett⁸² para efectos electrónicos de R, π_3' es la constante hidrofóbica del más hidrofóbico de los posibles sustituyentes en la posición 3 de 19, RM_4 es la refractividad molar de los sustituyentes en 4, n es el número de compuestos utilizados, r es el coeficiente de correlación y s es la desviación estándar. La prima de π_3' denota que de los dos posibles sustituyentes en meta solo el más hidrofóbico es parametrizado en la ecuación 3.1. El valor de π para el sustituyente menos hidrofóbico se establece igual a cero porque es -H.

El poder de la metodología involucrada en la ecuación 3.1 es que se puede aplicar a cualquier receptor se conozca o no su estructura. La debilidad de esta, actualmente, es que no se tiene una base teórica sólida para ésta. No tendremos esta base teórica hasta que no entendamos exactamente como trabajan las enzimas y los receptores.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos del análisis ACUARESA de la hidrólisis de 3-fenil hipuratos (19) por papaína. Se han realizado varios estudios de cinética enzimática de esta reacción con diversos sustratos. Hansch y colaboradores⁸³ midieron k_{cat} , K_m y k_{OH} (constante de rapidez de la hidrólisis no-enzimática) para 25 derivados de 19. Los resultados obtenidos en ese trabajo son los que se utilizaron para nuestro estudio.

Se han estudiado análisis ACUARESA de esta hidrólisis enzimática, en los cuales se han obtenido buenas correlaciones de $\log(1/K_m)$ con parámetros fisicoquímicos como σ y π^{84} así como con relaciones entre el $\log(k_{cat}/K_m)$ con la longitud del anillo sustituido y con el parámetro de efecto de campo F^{85} .

En los trabajos anteriormente mencionados solo se presentan relaciones con propiedades medidas experimentalmente. En este trabajo se utilizan además resultados de mecánica cuántica. Se estudio la relación de la actividad biológica con algunos parámetros experimentales y con la energía de los orbitales HOMO y LUMO calculadas con el método semiempírico de orbitales moleculares AM1. Esto muestra la aplicación de la mecánica cuántica al estudio de relaciones estructura-actividad biológica. Esto es lo que denominamos ACUARESA no-clásico

3.1 METODOLOGÍA Y RESULTADOS.

Utilizando el programa QUANTA⁸⁶ se construyo el compuesto 19 con $R = H$ y se obtuvo la estructura de mínima energía utilizando

CHARMM, el cual es un programa de mecánica molecular. Después de la minimización, se fijaron los ángulos diedros de la glicina iguales a los valores del residuo alanil-metileno, obtenidos de la estructura de rayos X del complejo oxibenzolil carbonil-L-fenilalanil-L-alanilmetileno-papaína⁸⁷ (cristalografía de rayos X). Con esta estructura se realizó un cálculo AM1 minimizando las longitudes de enlace y los ángulos de valencia. Los ángulos diedros no se optimizaron para conservar la conformación que debe tener el sustrato cuando está ligado a la enzima.

Con la estructura obtenida del procedimiento anterior se realizaron los cálculos AM1 de los otros compuestos, optimizando únicamente el sustituyente.

Todos los cálculos AM1 se realizaron desde el programa QUANTA, después de haber arreglado la interfase entre QUANTA y MOPAC 6.0, ambos programas instalados en una computadora Silicon Graphics 4D25.

3.2 RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Para el análisis ACUARESA se utilizaron los valores de la energía del HOMO y del LUMO obtenidas con los cálculos AM1, los resultados de K_m y K_{cat} obtenidos por Hansch y colaboradores⁷² y los valores de π , σ y RM reportados en la literatura^{9,10}. Estos datos son los mismos que utilizaron Hansch *et al* en su trabajo. Los tomamos así para que nuestras ecuaciones pudieran compararse con las de ese trabajo.

La tabla 3.1 presenta los valores utilizados para el análisis ACUARESA.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa QSAR de Pomona College⁸⁸ en una computadora VAX 8530.

Tabla 3.1. Datos utilizados para las ecuaciones 3.2-3.7.

	log (k_{cat}/K_m) observado	σ	-E _{HOMO} (eV)	-E _{LUMO} (eV)	RM ₄	π_3^a
-H	4.40	0.00	9.600	0.281	0.10	0.00
4-NH ₂	4.19	-0.66	8.687	0.241	0.54	0.00
4-OCH ₃	4.62	-0.27	9.178	0.286	0.79	0.00
4-CN	4.83	0.66	9.961	0.840	0.63	0.00
4-F	4.35	0.60	9.586	0.388	0.09	0.00
4-CH ₃	4.54	-0.17	9.352	0.270	0.56	0.00
4-CONH ₂	5.01	0.36	9.903	0.679	0.98	0.00
4-Cl	4.68	0.23	9.566	0.404	0.60	0.00
4-COCH ₃	5.39	0.50	9.885	0.771	1.12	0.00
4-NO ₂	5.47	0.78	10.220	1.419	0.74	0.00
5-NHCOCH ₃	4.41	0.21	9.132	0.336	0.10	0.00
5-CONH ₂	4.54	0.28	9.867	0.566	0.10	0.00
5-CN	4.92	0.56	10.001	0.719	0.10	0.00
5-NO ₂	5.02	0.71	10.114	1.359	0.10	0.00
3-F	4.59	0.34	9.778	0.382	0.10	0.14
3-CH ₃	5.13	-0.07	9.497	0.270	0.10	0.56
3-Cl	5.34	0.37	9.724	0.357	0.10	0.71
3-CF ₃	5.70	0.43	10.099	0.745	0.10	0.88
5-NH ₂	4.43	-0.16	8.941	0.255	0.10	0.00
4-SO ₂ NH ₂ ^b	4.83	0.57	10.173	0.959	1.23	0.00

^a π_3 tiene el mismo significado que en la ecuación 3.1.

^b No se tomó en cuenta para las correlaciones.

Para el análisis ACUARESA primero se estudiaron los compuestos con sustituyentes en la posición 4. El compuesto con R=SO₂NH₂ no se

ajustó a la correlación. Esto se explica por el hecho de que este compuesto presenta problemas cuando se trabaja experimentalmente. Su baja solubilidad y su pequeña $\Delta\epsilon$ dificultan obtener un valor preciso de K_m ⁸⁹. Además, el método de cálculo AM1 no tiene buenos parámetros para azufre⁹⁰, esto es, tanto los resultados experimentales como los cálculos AM1 son malos. Así pues, se descartó este compuesto en todas las correlaciones.

Para esta serie, se obtuvieron las siguientes ecuaciones:

$$\log(k_{cat}/K_m) = 0.628 (0.286) \sigma + 0.647 (0.387) RM_4 + 4.256 (0.253) \quad (3.2)$$

$n = 10, r = 0.950, s = 0.152$

$$\log(k_{cat}/K_m) = -0.777 (0.358) E_{LUMO} + 0.560 (0.406) RM_4 + 3.970 (0.268) \quad (3.3)$$

$n = 10, r = 0.949, s = 0.153$

$$\log(k_{cat}/K_m) = -0.629 (0.258) E_{HOMO} + 0.720 (0.345) RM_4 - 1.728(2.430) \quad (3.4)$$

$n = 10, r = 0.958, s = 0.140$

Los valores entre paréntesis indican los intervalos de confianza construidos para el 95%.

Los valores de $\log(k_{cat}/K_m)$ medidos experimentalmente, los valores predichos y las desviaciones con respecto a los valores observados, para las ecuaciones 3.2, 3.3 y 3.4, se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Valores observados, calculados y desviaciones entre estos dos. obtenidos con las ecuaciones 3.2, 3.3 y 3.4.

	log k_{cat}/K_m obs.	log k_{cat}/K_m calc. Ec. 3.2	Δ log k_{cat}/K_m Ec. 3.2	log k_{cat}/K_m calc. Ec. 3.3	Δ log k_{cat}/K_m Ec. 3.3	log k_{cat}/K_m calc. Ec. 3.4	Δ log k_{cat}/K_m Ec. 3.4
-H	4.40	4.32	0.079	4.25	0.155	4.38	0.019
4-NH ₂	4.19	4.19	-0.001	4.46	-0.270	4.12	0.066
4-OCH ₃	4.62	4.60	0.022	4.64	-0.015	4.61	0.007
4-CN	4.83	5.08	-0.249	4.98	-0.146	4.99	-0.160
4-F	4.35	4.35	-0.002	4.32	0.028	4.37	-0.015
4-CH ₃	4.54	4.51	0.028	4.49	0.046	4.56	-0.017
4-CONH ₂	5.01	5.12	-0.107	5.05	-0.036	5.21	-0.195
4-Cl	4.68	4.79	-0.109	4.62	0.060	4.72	-0.040
4-COCH ₃	5.39	5.30	0.094	5.20	0.194	5.30	0.095
4-NO ₂	5.47	5.23	0.245	5.49	-0.017	5.23	0.238

La correlación entre las variables utilizadas para las ecuaciones 3.2, 3.3 y 3.4 se presenta en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Correlación entre las variables utilizadas para 10 compuestos. Ecuaciones 3.2, 3.3 y 3.4.

	σ	-E _{HOMO} (eV)	-E _{LUMO} (eV)	RM ₄
log (k_{cat}/K_m)	0.828	-0.796	-0.867	0.728
σ		-0.974	-0.858	0.352
-E _{HOMO} (eV)			0.814	-0.269
-E _{LUMO} (eV)				-0.438

Despues se realizo el análisis ACUARESA con los compuestos restantes. Obteniendose para 19 compuestos las siguientes ecuaciones:

$$\log(k_{\text{cat}}/K_m) = 0.664 (0.201) \sigma + 0.536 (0.227) \text{RM}_4 + 1.140 (0.295) \pi_{3'} + 4.337 (0.130) \quad (3.5)$$

$n = 19, r = 0.950, s = 0.148$

$$\log(k_{\text{cat}}/K_m) = -0.722 (0.205) E_{\text{LUMO}} + 0.440(0.220)\text{RM}_4 + 1.255 (0.280) \pi_{3'} + 4.103 (0.155) \quad (3.6)$$

$n = 19, r = 0.954, s = 0.142$

$$\log(k_{\text{cat}}/K_m) = -0.573 (0.209) E_{\text{HOMO}} + 0.501 (0.262) \text{RM}_4 + 1.020 (0.346) \pi_{3'} - 1.008 (1.997) \quad (3.7)$$

$n = 19, r = 0.933, s = 0.170$

La prima de $\pi_{3'}$ denota que de los dos posibles sustituyentes en meta solo el mas hidrofóbico es parametrizado en la ecuación.

La tabla 3.4 presenta los valores observados, calculados y desviaciones entre estos dos, correspondientes a las ecuaciones 3.5, 3.6 y 3.7. La correlación entre las variables utilizadas para las ecuaciones 3.5, 3.6 y 3.7 se presenta en la tabla 3.5.

Tabla 3.4. Valores observados, calculados y desviaciones entre estos dos obtenidos con las ecuaciones 3.5, 3.6 y 3.7.

	log k_{cat}/K_m obs.	log k_{cat}/K_m calc. Ec. 3.5	Δ log k_{cat}/K_m Ec. 3.5	log k_{cat}/K_m calc. Ec. 3.6	Δ log k_{cat}/K_m Ec. 3.6	log k_{cat}/K_m calc. Ec. 3.7	Δ log k_{cat}/K_m Ec. 3.7
-H	4.40	4.39	0.009	4.35	0.050	4.54	-0.139
4-NH ₂	4.19	4.19	0.001	4.52	-0.325	4.24	-0.047
4-OCH ₃	4.62	4.58	0.038	4.66	-0.037	4.64	-0.023
4-CN	4.83	5.11	-0.283	4.99	-0.157	5.01	-0.182
4-F	4.35	4.43	-0.075	4.42	-0.073	4.53	-0.176
4-CH ₃	4.54	4.53	0.015	4.54	-0.004	4.63	-0.088
4-CONH ₂	5.01	5.10	-0.092	5.02	-0.014	5.15	-0.144
4-Cl	4.68	4.81	-0.132	4.66	0.022	4.77	-0.090
4-COCH ₃	5.39	5.27	0.120	5.15	0.238	5.21	0.176
4-NO ₂	5.47	5.25	0.218	5.45	0.017	5.21	0.255
5-NHCOCH ₃	4.41	4.53	-0.120	4.39	0.020	4.27	0.139
5-CONH ₂	4.54	4.58	-0.037	4.56	-0.016	4.69	-0.153
5-CN	4.92	4.76	0.157	4.67	0.254	4.77	0.151
5-NO ₂	5.02	4.86	0.158	5.13	-0.108	4.83	0.186
3-F	4.59	4.78	-0.186	4.60	-0.008	4.78	-0.194
3-CH ₃	5.13	4.98	0.147	5.05	0.085	5.05	0.079
3-Cl	5.34	5.45	-0.106	5.30	0.044	5.34	0.005
3-CF ₃	5.70	5.68	0.021	5.79	-0.089	5.72	-0.023
5-NH ₂	4.43	4.28	0.145	4.33	0.099	4.16	0.268

3.3 DISCUSIÓN.

Las ecuaciones 3.2-3.3 obtenidas del análisis ACUARESA con los compuestos que tienen los sustituyentes en 4, muestran claramente que el efecto de los sustituyentes sobre la actividad biológica de los compuestos estudiados se debe a la suma de un efecto electrónico mas una contribución estérica. Además, se aprecia que las energías de los orbitales HOMO y LUMO describen adecuadamente el efecto electrónico

de los sustituyentes sobre la actividad biológica de los compuestos estudiados. Es interesante notar que para esta serie de compuestos las energías del HOMO y del LUMO son tan útiles como la sigma de Hammett para explicar los efectos electrónicos de los sustituyentes.

Tabla 3.5. Correlación entre las variables utilizadas para 19 compuestos. Ecuaciones 3.5, 3.6 y 3.7.

	σ	$-E_{\text{HOMO}}$ (eV)	$-E_{\text{LUMO}}$ (eV)	RM_4	π_3
$\log(k_{\text{cat}}/K_m)$	0.652	-0.707	-0.599	0.206	0.608
σ		-0.908	-0.809	0.045	0.081
$-E_{\text{HOMO}}$ (eV)			0.768	-0.050	-0.199
$-E_{\text{LUMO}}$ (eV)				-0.221	0.092
RM_4					-0.359

Las ecuaciones 3.2 y 3.4 explican bien la actividad biológica. Esto nos muestra que podemos aplicar los cálculos de mecánica cuántica para obtener buenas relaciones estructura-actividad. En este caso, podemos prescindir de los datos de σ de Hammett, que no son siempre disponibles y usar las energías de HOMO y LUMO.

Los resultados que nos presenta el análisis ACUARESA cuando tomamos en cuenta todos los compuestos, representados en las ecuaciones 3.5-3.7, nos permiten ver que la actividad biológica de los compuestos estudiados se puede describir como la suma de un efecto electrónico, un efecto estérico del sustituyente en 4 y una interacción hidrofóbica del sustituyente en posición 3.

Lo anterior es equivalente a adicionar la interacción hidrofóbica del sustituyente en 3 a las ecuaciones 3.2-3.4 en donde solo tenemos sustituyentes en 4.

Las ecuaciones 3.5-3.7, nos confirman que se pueden utilizar los valores calculados con mecánica cuántica en vez de parámetros experimentales como σ ; tal como se aprecia en el estudio de los compuestos con sustituyentes en 4 (ecs. 3.2-3.4).

3.4 CONCLUSIONES.

Se realizaron cálculos AM1 de los compuestos de interés, con la conformación que, según los resultados experimentales, deben tener cuando están interactuando con la enzima.

También se realizó el ACUARESA utilizando parámetros experimentales como σ , π y RM, y utilizando las energías de los orbitales HOMO y LUMO obtenidas de cálculos semilempíricos de orbitales moleculares.

ACUARESA muestra que el efecto de la actividad biológica de los compuestos con sustituyentes en 4 se puede explicar, con bastante precisión, por una relación entre la actividad biológica con la sigma de Hammett y la RM del sustituyente, o mejor aún, con la energía del orbital HOMO y con la RM del sustituyente.

Para la serie de compuestos sustituidos en posición 3 y en 4, se obtuvo una buena correlación entre la actividad biológica y la RM del sustituyente en 4, la constante de hidrofobicidad del sustituyente en 3 y un parámetro electrónico, el cual puede ser sigma de Hammett (ecuación 3.5), energía del orbital HOMO (ecuación 3.6) o la energía del orbital LUMO (ecuación 3.7). Con esto se aprecia que el efecto de los sustituyentes sobre la actividad biológica de estos ésteres de N-benzoil glicina se debe a la suma de una interacción estérica, una hidrofóbica y el efecto electrónico del sustituyente.

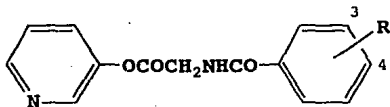
Los resultados de ACUARESA nos muestran que se pueden utilizar satisfactoriamente cálculos de orbitales moleculares en vez de parámetros experimentales que monitorean el efecto electrónico del sustituyente.

CAPÍTULO 4

Estudio de la relación estructura-actividad de la hidrólisis de 3-piridil-ésteres de N-benzoilglicina por papaína.

4.0 INTRODUCCIÓN.

Este capítulo presenta el estudio de la relación estructura-actividad de la hidrólisis enzimática de 3-piridinil hipuratos (de aquí en adelante 20) por papaína.



20

C. M. Compadre y colaboradores⁹¹ estudiaron la cinética enzimática de la reacción anterior. Los resultados de este trabajo se presentan en la tabla 4.1. Con los valores presentados en esa tabla se obtuvo, del ACUARESA, la ecuación 4.1.

Tabla 4.1. Datos utilizados en la ecuación 4.1.

	log (k_{cat}/K_m) observado	log (k_{cat}/K_m) calculado ^b	σ	π_4^a
-H	4.65	4.60	0.00	0.00
4-CH ₃	4.78	4.73	-0.17	0.54
4-C(CH ₃) ₃	4.81	5.21	-0.20	1.87
4-SO ₂ NH ₂	4.23	4.30	0.57	-1.43
4-NH ₂	3.73	3.92	-0.66	-1.05
4-CN	4.74	4.82	0.66	-0.16
4-NO ₂	5.04	5.00	0.78	0.18
4-N(CH ₃) ₂	4.57	4.43	-0.83	0.50
4-Cl	5.07	5.04	0.23	0.91
4-I	5.21	5.18	0.18	1.35
4-O(CH ₂) ₃ CH ₃	5.20	5.15	-0.32	1.84
4-O(CH ₂) ₅ CH ₃	5.68	5.60	-0.32	3.02
4-O(CH ₂) ₇ CH ₃	6.02	6.04	-0.32	4.20
3-CN	5.17	4.83	0.56	0.00
3-I	4.95	4.74	0.35	0.00
3-OCH ₃	4.55	4.65	0.12	0.00
3-CH ₃	4.66	4.57	-0.07	0.00
3-NO ₂	5.20	4.90	0.71	0.00
3-NH ₂	4.43	4.53	-0.16	0.00
3,5-(Cl) ₂	4.99	4.91	0.74	0.00
3,5-(NO ₂) ₂	4.81	5.20	1.42	0.00
3,5-(CH ₃) ₂	4.37	4.54	-0.14	0.00

^a De la referencia 9

^b Obtenidos con la ecuación 4.1.

$$\log(k_{cat}/K_m) = 0.38 (0.08) \pi_4 + 0.43 (0.18) \sigma + 4.60 (0.10) \quad (4.1)$$

$$n = 22, r = 0.926, s = 0.193.$$

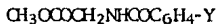
En la ecuación 4.1, σ es la constante de Hammett⁹² para efectos electrónicos del sustituyente y π_4 es la constante hidrofóbica de los

sustituyentes en la posición 4^{9,10}, n es el número de compuestos utilizados, r el coeficiente de correlación y σ la desviación estándar. Esta ecuación solo presenta la relación entre los resultados de cinética enzimática con parámetros medidos experimentalmente. En este estudio utilizamos los valores de k_{cat} y K_m obtenidos en el trabajo antes mencionado y las relacionamos con algunas propiedades calculadas con métodos de mecánica cuántica y con parámetros experimentales. Se presenta una correlación entre la actividad biológica con la constante de hidrofobicidad π del sustituyente en posición 4 y con la energía del orbital HOMO calculada con el método de cálculo semiempírico AM1. Al igual que en el capítulo 3, esto se hizo para mostrar la aplicación de la mecánica cuántica al estudio de relaciones estructura-actividad biológica.

La papaína es una enzima atractiva para tratar de extender sistemáticamente el alcance del ACUARESA en reacciones enzimáticas. Su estructura cristalográfica es conocida con una resolución de 1.65Å, su estabilidad es buena y su bien delineado sitio activo ha permitido desarrollar buenos ACUARESA de los ésteres 21 y 22⁹³.



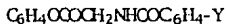
21



22



23



24

Varios estudios de 20 y 21 con varias cisteínas hidrolasas han producido ecuaciones con consistente correlación tal que el moderado efecto del tamaño de X sobre los grupos salientes en la hidrólisis es relativamente claro. Por lo tanto, debemos utilizar propiedades estéricas, electrónicas e hidrofóbicas de X y también considerar las orientaciones posibles de los sustituyentes en meta para obtener satisfactorios análisis ACUARESA.

Con el objetivo de extender el estudio de análogos de 22 a un intervalo mas amplio de sustituyentes Y, Compadre y colaboradores¹ decidieron usar un grupo saliente que fuera visible en la región del ultravioleta para facilitar el estudio de la cinética de la hidrólisis y manteniendo a la vez una razonable solubilidad en agua, de tal forma que se pudieran examinar sustituyentes Y más hidrofóbicos. Se encontró que los análogos 20 cumplen estos requisitos al mismo tiempo que mantienen la misma geometría del grupo saliente al igual que 21 y 23. En ese trabajo se estableció un exitoso ACUARESA de 22 variaciones de 3-piridinil hipuratos (20).

Ahora nosotros continuamos este estudio incluyendo cálculos de mecánica cuántica.

4.1 METODOLOGÍA Y RESULTADOS.

La conformación inicial del compuesto 20 con R=H se obtuvo a partir de la estructura final de 19 (capítulo 3) sustituyendo un carbono del anillo aromático por nitrógeno para obtener el 3-piridinil hipurato.

Con esta estructura se realizó un cálculo AM1 minimizando las longitudes de enlace y los ángulos de valencia. Los ángulos diedros no se optimizaron para conservar la estructura que, según los resultados experimentales, debe tener el sustrato cuando esta ligado a la enzima.

Estos cálculos se realizaron con el programa QUANTA con la interfase para el programa MOPAC 6.0. Ambos programas instalados en una computadora Silicon Graphics 4D25.

Con la estructura obtenida del procedimiento anterior se calcularon, con los mismos programas, los demás compuestos, optimizando únicamente el sustituyente.

4.2 RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

El ACUARESA se realizó utilizando el programa QSAR de Pomona College⁷⁷ en una computadora VAX 8530. Para esto se utilizaron los valores de la energía de los orbitales de frontera (HOMO y LUMO) que se obtuvieron con los cálculos AM1 y los resultados de K_m y K_{cat} obtenidos por Compadre y colaboradores¹ y los valores de π reportados en la literatura⁹.

Del ACUARESA se obtuvieron las ecuaciones 4.2 y 4.3.

$$\log(k_{cat}/K_m) = -0.457 (0.228) E_{HOMO} + 0.334 (0.078) \pi_4 + 0.221 (2.228) \quad (4.2)$$

$n = 22, r = 0.928, s = 0.214$

$$\log(k_{cat}/K_m) = -0.212 (0.185) E_{LUMO} + 0.342 (0.097) \pi_4 + 4.515 (0.198) \quad (4.3)$$

$n = 22, r = 0.861, s = 0.260$

En las ecuaciones 4.2 y 4.3, E_{HOMO} es la energía del orbital HOMO y π_4 es la constante hidrofóbica de los sustituyentes en la posición 4^{9,10}. n es el número de compuestos utilizados, r el coeficiente de correlación y σ la desviación estandar.

Tabla 4.2. Datos utilizados para las ecuaciones 4.2 y 4.3.

	log (k_{cat}/K_m) observado	$-E_{\text{HOMO}}$ (eV)	$-E_{\text{LUMO}}$ (eV)	π_4^a
-H	4.65	9.958	0.376	0.00
4-CH ₃	4.78	9.827	0.363	0.54
4-C(CH ₃) ₂	4.81	9.842	0.352	1.87
4-SO ₂ NH ₂	4.23	10.113	1.181	-1.43
4-NH ₂	3.73	8.809	0.307	-1.05
4-CN	4.74	10.068	1.082	-0.16
4-NO ₂	5.04	10.147	1.636	0.18
4-N(CH ₃) ₂	4.57	8.695	0.320	0.50
4-Cl	5.07	9.991	0.655	0.91
4-I	5.21	10.009	0.736	1.35
4-O(CH ₂) ₃ CH ₃	5.20	9.469	0.361	1.84
4-O(CH ₂) ₅ CH ₃	5.68	9.489	0.364	3.02
4-O(CH ₂) ₇ CH ₃	6.02	9.502	0.366	4.20
3-CN	5.17	10.037	0.869	0.00
3-I	4.95	10.008	0.630	0.00
3-OCH ₃	4.55	9.701	0.456	0.00
3-CH ₃	4.66	9.816	0.362	0.00
3-NO ₂	5.20	10.066	1.371	0.00
3-NH ₂	4.43	9.013	0.378	0.00
3,5-(Cl) ₂	4.99	10.033	0.827	0.00
3,5-(NO ₂) ₂	4.81	10.264	3.214	0.00
3,5-(CH ₃) ₂	4.37	9.648	0.355	0.00

^a De la referencia 9

La tabla 4.2 presenta los valores que se utilizaron para obtener estas ecuaciones. Los valores predichos y las desviaciones con respecto a los valores observados por estas ecuaciones se muestran en la tabla 4.3

Tabla 4.3. Valores de $\log(k_{\text{cat}}/K_m)$ observados, calculados y la desviación entre estos, obtenidos con las ecuaciones 4.2 y 4.3.

	\log (k_{cat}/K_m) observado	\log (k_{cat}/K_m) calculado ^a	$\Delta \log$ ^a (k_{cat}/K_m)	\log (k_{cat}/K_m) calculado ^b	$\Delta \log$ ^b (k_{cat}/K_m)
-H	4.65	4.77	-0.12	4.77	-0.12
4-CH ₃	4.78	4.89	-0.11	4.89	-0.11
4-C(CH ₃) ₃	4.81	5.34	-0.54	5.34	-0.54
4-SO ₂ NH ₂	4.23	4.37	-0.14	4.37	-0.14
4-NH ₂	3.73	3.90	-0.17	3.90	-0.17
4-CN	4.74	4.77	-0.03	4.77	-0.03
4-NO ₂	5.04	4.92	0.12	4.92	0.12
4-N(CH ₃) ₂	4.57	4.36	0.21	4.36	0.21
4-Cl	5.07	5.09	-0.02	5.09	-0.02
4-I	5.21	5.25	-0.04	5.25	-0.04
4-O(CH ₂) ₃ CH ₃	5.20	5.16	0.04	5.16	0.04
4-O(CH ₂) ₅ CH ₃	5.68	5.57	0.11	5.57	0.11
4-O(CH ₂) ₇ CH ₃	6.02	5.97	0.53	5.97	0.53
3-CN	5.17	4.81	0.36	4.81	0.36
3-I	4.95	4.80	0.15	4.80	0.15
3-OCH ₃	4.55	4.66	-0.11	4.66	-0.11
3-CH ₃	4.66	4.71	-0.05	4.71	-0.05
3-NO ₂	5.20	4.82	0.38	4.82	0.38
3-NH ₂	4.43	4.34	0.09	4.34	0.09
3,5-(Cl) ₂	4.99	4.81	0.18	4.81	0.18
3,5-(NO ₂) ₂	4.81	4.91	-0.10	4.91	-0.10
3,5-(CH ₃) ₂	4.37	4.63	-0.26	4.63	-0.26

^a Obtenidos con la ecuación 4.2.

^b Obtenidos con la ecuación 4.3.

La correlación entre las variables utilizadas en las ecuaciones 4.2 y 4.3 es presentada en la tabla 4.4.

Tabla 4.4. Correlación entre las variables utilizadas en las Ecuaciones 4.2 y 4.3

	$-E_{\text{HOMO}}$ (eV)	$-E_{\text{LUMO}}$ (eV)	π_4
$\log(k_{\text{cat}}/K_m)$	-0.286	-0.048	0.814
$-E_{\text{HOMO}}$ (eV)		0.561	0.139
$-E_{\text{LUMO}}$ (eV)			0.272

4.3 DISCUSIÓN.

La ecuación 4.2 obtenida por ACUARESA, muestra que el efecto de los sustituyentes sobre la actividad biológica de los compuestos estudiados se debe a la suma de los efectos electrónico e hidrofóbico del sustituyente en la posición 4. Además, si comparamos esta ecuación con la 3.1, podemos observar que la energía del orbital HOMO describe bien, al igual que sigma, el efecto electrónico del sustituyente sobre la actividad biológica de los compuestos estudiados.

De la ecuación 4.3 podemos observar que la energía del orbital LUMO no predice bien el efecto del sustituyente sobre la actividad, pues el coeficiente de correlación de la ecuación 4.3 es muy bajo. En el capítulo 3 pudimos observar que tanto la energía del HOMO como la

del LUMO predecían la actividad biológica (ecuaciones 3.2 y 3.4), y aunque se observó que la energía del HOMO trabajaba mejor que la del LUMO, esta diferencia no era tan marcada como para esta serie de compuestos.

Al igual que en el capítulo 3, estos resultados nos muestran que podemos aplicar los cálculos de mecánica cuántica para obtener buenas relaciones estructura-actividad. En este caso también podemos prescindir de los datos experimentales de σ de Hammett, al utilizar los valores calculados de la energía del HOMO.

4.4 CONCLUSIONES.

Se realizaron cálculos AM1 de los compuestos estudiados, con la conformación que, según los resultados experimentales, deben tener cuando están interaccionando con la enzima.

Se realizó un estudio de ACUARESA utilizando parámetros experimentales como σ , π y RM, y utilizando las energías de los orbitales HOMO y LUMO obtenidas de cálculos semiempíricos de orbitales moleculares.

ACUARESA muestra que el efecto de la actividad biológica de los compuestos estudiados se puede explicar, por una relación entre la actividad biológica con la energía del orbital HOMO y con la constante hidrofóbica del sustituyente. Esta relación es tan buena como en la ecuación 4.1 que se obtiene usando exclusivamente parámetros experimentales.

Se observa que, a diferencia del capítulo 3, la energía del orbital LUMO no explica la actividad biológica.

Al igual que en el capítulo 3 podemos apreciar que los parámetros obtenidos con mecánica cuántica son muy útiles para cuantificar el efecto electrónico. En este caso, es tan buen parámetro la E_{HOMO} como la σ pero a veces no tenemos el valor de σ a la mano, en este caso, los cálculos de mecánica cuántica nos pueden resolver el problema.

CAPÍTULO 5

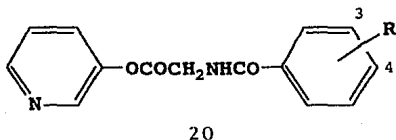
Estudio de la relación estructura-actividad de la hidrólisis de 3-piridil- Y 3-fenil- ésteres de N-benzoilglicina por papaína.

5.0 INTRODUCCIÓN.

Existe en la actualidad una creciente aceptación de la importancia de las proteinasas cisteínicas en varios procesos fisiológicos y patológicos⁹⁴. Esta familia de proteinasas están caracterizadas por la presencia, en el sitio activo, de un residuo de cisteína necesario para la hidrólisis de varios sustratos polipeptidos. La papaína ha sido frecuentemente usada como modelo en el estudio de las propiedades de las proteinasas⁹⁴.

Estudios ACUARESA previos sobre papaína han modelado el efecto de los sustituyentes sobre la hidrólisis de N-benzoil-glicin fenil ésteres (19) (ecuación 5.1)⁹⁵ y N-benzoil-glicin piridil ésteres (20) (ecuación 5.2)⁹⁶.





$$\log(k_{\text{cat}}/K_m) = 0.39 \pi_4 + 0.42 \sigma + 4.61 \quad (5.1)$$

$$n = 20, r = 0.940, s = 0.176.$$

$$\log(k_{\text{cat}}/K_m) = 0.66\sigma' + 0.54RM_4' + 1.14\pi_3' + 4.34 \quad (5.2)$$

$$n = 19, r = 0.950, s = 0.148$$

En los capítulos 3 y 4 discutimos los sistemas anteriores. Realizamos ACUARESA no-clásico utilizando propiedades derivadas de cálculos de mecánica cuántica.

En este capítulo se presenta un ACUARESA más general que considera las variaciones en ambos sitios, en el lado de la amina y en el carboxílico de la glicina.

5.2 METODOLOGÍA Y RESULTADOS.

Las estructuras utilizadas son las presentadas en los capítulos 3 y 4. Los datos usados para nuestro ACUARESA no-clásico son las tradicionales constantes π y RM y las energías del orbital HOMO calculadas con el método de cálculo AM1 tal como se describió en los capítulos 3 y 4.

5.2 RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

El ACUARESA realizado con las dos series de sustituyentes juntas produjo las ecuaciones 5.1, 5.2 y 5.3.

$$\log(k_{cat}/K_m) = 0.42 \pi_4 + 0.59\sigma' + 0.46 \sigma + 0.97\pi_3' + \\ + 0.36 RM_4' + 4.50 \quad (5.3)$$

$$n = 39, r = 0.928, s = 0.183.$$

$$\log(k_{cat}/K_m) = 0.36 \pi_4 - 0.54 E_{HOMO} + 0.95\pi_3' \\ + 0.43 RM_4' - 0.65 \quad (5.4)$$

$$n = 39, r = 0.934, s = 0.173$$

$$\log(k_{cat}/K_m) = 0.38 \pi_4 - 0.32 E_{LUMO} + 1.16\pi_3' \\ + 0.44 RM_4' + 4.36 \quad (5.5)$$

$$n = 39, r = 0.872, s = 0.237$$

La tabla 5.1 presenta los datos utilizados para obtener las ecuaciones anteriores, así como los valores de $\log(k_{cat}/K_m)$ calculados y la desviación con respecto a los valores experimentales para el caso de la ecuación 5.2 que fue la que presento mejor ajuste a los datos experimentales.

5.3 DISCUSIÓN.

El ACUARESA mostró que las constantes específicas para los sustratos estudiados está relacionada a efectos hidrofóbicos y estéricos localizados los cuales están parametrizados por π_3' , π_4 y RM_4' . En contraste, el efecto electrónico parametrizado por E_{HOMO} aparece a un nivel molecular.

En el caso de los compuestos 1-20 la alta colinearidad entre E_{LUMO} y E_{HOMO} producen ecuaciones de casi la misma calidad. Sin embargo, cuando se estudian los compuestos 21-39 y cuando se juntan las dos series, E_{HOMO} es claramente mejor descriptor de los efectos electrónicos (comparense las ecuaciones 5.4 y 5.5). Estos resultados apoyan el hecho de que los descriptores derivados de la mecánica cuántica son particularmente importantes para cuantificar el efecto electrónico de series de compuestos estructuralmente diferentes.

5.4 CONCLUSIONES

Se realizó un ACUARESA utilizando dos series de sustituyentes estructuralmente diferentes. Para esto, se tomaron en cuenta el efecto hidrofóbico parametrizado por π , el efecto estérico parametrizado por RM y el efecto electrónico cuantificado por σ y por las energías de los orbitales HOMO y LUMO calculados con el metodo de calculo semiempirico AM1.

El ACUARESA realizado con las dos series de compuestos mostro claramente la ventaja de utilizar los cálculos de mecánica cuantica, pues mientras que utilizando el parámetro σ para cuantificar el efecto electrónico se tienen que introducir dos variables en el ACUARESA (ecuación 5.3), solo necesitamos una variable cuando utilizamos la energía del orbital HOMO (ecuación 5.4). Esto es importante, porque podemos tener una serie de compuestos más pequeña que cuando utilizamos tres variables que cuando usamos cuatro. Además, tenemos la gran ventaja de combinar compuestos estructuralmente diferentes porque la energía del orbital HOMO esta definida a nivel molecular y no por una posición determinada como es el caso de σ .

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES GENERALES

Se mostró la aplicación de los métodos cuánticos semilempíricos y de mecánica molecular al análisis conformacional de compuestos con actividad biológica.

Se encontró que la aplicación de cálculos de orbitales moleculares al estudio de la hidrólisis enzimática de ésteres de N-benzoil glicina y 3-piridinil-ésteres de N-benzoil glicina es exitosa, sin embargo en el estudio de los 3-octahidro-1H-pirano(4,3-c)piridin-8a-il fenoles, no es útil debido a que el efecto de los sustituyentes es estérico e hidrofóbico, y no electrónico.

Se utilizaron diversas técnicas computacionales que en conjunto nos permiten analizar la relación estructura química-actividad biológica. Con esto se muestra la aplicación de la química computacional al diseño de fármacos por computadora.

Los resultados de los capítulos 3, 4 y 5 muestran claramente la utilidad de los valores calculados de las energías de los orbitales HOMO y LUMO para cuantificar el efecto electrónico. Esto nos permite decir

que los cálculos de mecánica cuántica son muy útiles en los estudios ACUARESA, pues a veces no tenemos los datos experimentales de σ o F o nos es difícil combinar los valores de σ para sustituyentes en diferente posición, y sobre todo, en estructuras sustancialmente diferentes. Esto se puede apreciar muy bien cuando, en el capítulo 5, se combinan las dos series de compuestos, y en lugar de utilizar dos parámetros para el efecto electrónico (uno para cada lado de la molécula), utilizamos sólo E_{LUMO} que está funcionando a nivel molecular. Es muy útil el poder utilizar un parámetro electrónico calculado, que nos dé la información necesaria sin necesidad de que las estructuras de nuestros compuestos en la serie sean muy semejantes.

APENDICE

*Resumen del trabajo presentado en el
XXVIII Congreso Mexicano de Química Pura
y Aplicada y artículo publicado.*

Análisis cuantitativo de la relación estructura-actividad antinociceptiva de 3-octahidro-1H-pirano(4,3-c)piridin-8a-il fenoles

Marco A. Belmont¹, Alejandra Román G.¹, Manuel F. Rubio² y Cesar M. Compador³.
1) Facultad de Química. UNAM, 2) Instituto de Química. UNAM y 3) University of Arkansas for Medical Sciences.

Este trabajo presenta los resultados obtenidos del análisis cuantitativo de la relación estructura-actividad antinociceptiva de 3-octahidro-1H-pirano(4,3-c)piridin-8a-il fenoles mostrados en la figura 1:

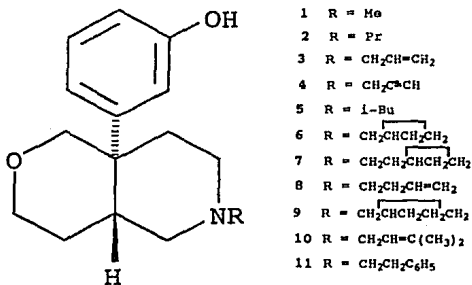


Figura 2.1. Compuestos estudiados.

La actividad antinociceptiva de los compuestos antes mencionados, fue probada por D. E. Bays y colaboradores¹. Con esos resultados nosotros realizamos un estudio ACUARESA. Para esto, primero se realizó el análisis conformacional utilizando el método de cálculo semiempírico de orbitales moleculares MNDO. Las estructuras iniciales se calcularon utilizando el programa PCMODEL, el cual realiza un cálculo MM2. De los cálculos realizados se obtuvieron las densidades electrónicas en cada

átomo, calor de formación, potencial de ionización, momento dipolar, energía total y energía LUMO.

Al comparar las densidades electrónicas, observamos que la presencia de los grupos sustituyentes no afecta notablemente la estructura electrónica de los compuestos estudiados. El análisis ACUARESA se realizó utilizando el programa QSAR², con los resultados obtenidos con los cálculos MNDO, el coeficiente de partición y la refractividad molar (RM). Estas dos últimas propiedades se calcularon con el programa CHEMLAB II³. Durante el proceso se observó que las propiedades calculadas con MNDO no estaban relacionadas con la actividad biológica y sin embargo se apreciaba un efecto estérico del sustituyente. Así pues, se decidió calcular el volumen y las dimensiones de la caja que contiene al sustituyente, orientando éste en la misma forma en todos los derivados, utilizando el mismo programa. Todos estos cálculos se llevaron a cabo en una computadora VAX 8530. Del ACUARESA se obtuvo la ecuación 1.

$$\log 1/DE_{50} = 1.097 (0.359) \Pi - 0.772 (0.413) Y - 0.332 (1.033) \quad (1)$$

$$n = 11, \quad r = 0.928, \quad s = 0.271 .$$

La correlación entre las variables de la ecuación 1 es: $r = 0.654$.

La tabla 1 presenta los valores utilizados para obtener esta ecuación, los valores predichos y las desviaciones con respecto a los valores observados; podemos observar que ni la distribución electrónica ni las propiedades fisicoquímicas calculadas con MNDO forman parte de la ecuación de correlación, sin embargo es clara la influencia de la hidrofobicidad y el tamaño del sustituyente sobre la actividad biológica.

Aunque la correlación entre las variables involucradas en la ecuación 1 es alta: $r = 0.654$, $r^2 = 0.428$ (pues en el estudio de relaciones estructura-actividad se pretende

tener variables ortogonales, con un r^2 no mayor de 0.30) la correlación entre las variables no es excesivamente grande, y como el coeficiente de correlación de la ecuación 1 es bastante bueno, $r=0.928$, podemos decir que esta relación es aceptable y que el ACUARESA muestra que la diferencia entre la actividad biológica de los diferentes compuestos estudiados se debe al diferente efecto estérico e hidrofóbico de los sustituyentes y no a un efecto electrónico.

Tabla 1. Datos utilizados para obtener la ecuación 1.

N-SUSTITUYENTE	log(1/ED ₅₀) observado	log(1/ED ₅₀) calculado	Dlog 1/ED ₅₀	MR calc.	Π calc.	Υ calc.
Me	-1.16	-0.91	-0.251	0.552	0.876	1.933
Pr	-0.44	-0.29	-0.150	1.480	2.054	2.867
CH ₂ CH=CH ₂	-0.56	-0.87	0.314	1.454	1.510	2.850
CH ₂ C=CH	-1.68	-1.80	0.120	1.277	0.646	2.822
i-Bu	-0.68	-0.65	-0.033	1.944	2.583	4.081
CH ₂ CHCH ₂ CH ₂	-1.10	-1.21	0.112	1.806	1.969	3.941
CH ₂ CH ₂ CHCH ₂ CH ₂	-0.73	-0.35	-0.382	2.270	2.498	3.573
CH ₂ CH ₂ CH=CH ₂	-0.24	-0.38	0.138	1.918	2.039	2.959
CH ₂ CHCH ₂ CH ₂ CH ₂	-0.13	-0.03	-0.163	2.230	2.528	3.122
CH ₂ CH=C(Me) ₂	-0.86	-0.74	-0.117	2.382	2.438	4.000
CH ₂ CH ₂ Ph	0.83	0.42	0.411	3.527	2.943	3.211

REFERENCIAS

- 1 Bays, D. E. et al. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1177-86 (1989).
- 2 Corwing Hanch et al. Department of Chemistry, Pomona College, Claremont, CA.
- 3 Ahora se le conoce como Daylight. DAYLIGHT Chemical Information Systems, Inc. 18500 Von Karman, Suite 450. Irvine, CA 92714. USA.

ANALISIS CUANTITATIVO DE LA RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD ANTINOCEPTIVA DE 3-OCTAHIDRO-1H-PIRANO-(4,3-c)-PIRIDIN-8A-II-FENOLES. Marco A. Belmont¹, Alejandra Román G.¹, Manuel F. Rubio² y César M. Compadre. (1) Facultad de Química UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán D. F. 04510. (2) Instituto de Química, UNAM y (3) University of Arkansas for Medical Sciences.

Se presentan los resultados obtenidos del análisis ACUARESA en el cual se utilizaron propiedades calculadas con programas como PCMODEL, MNDO, CHEMLAB, MEDCHEM, QSAR. Se muestra una ecuación que manifiesta la influencia del efecto estérico e hidrofóbico del sustituyente sobre la actividad biológica. No se observa ninguna influencia de las propiedades calculados con el método semiempírico MNDO.

**Application of molecular orbital calculations to the QSAR analysis
of enzyme-ligand interactions**

R. L. Compadre, C. M. Compadre, M. A. Belmont and J. K. Sims

University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, AR 72205

Introduction

There is an increasing awareness of the importance of cysteine proteinases in various pathological and physiological processes [1]. This family of proteinases is characterized by the presence, at the active site, of a cysteine residue necessary for hydrolysis of a variety of polypeptide substrates. Papain has been frequently used as a model in the study of the properties of this proteinases [1]. Here we have used papain to explore the use of quantum mechanics derived parameters for the quantitative structure-activity relationships (QSAR) analysis of enzyme-ligand interactions.

Results and Discussion

Previous QSAR studies of papain have modeled the substituent effects for hydrolysis of substituted *N*-benzoylglycine pyridyl esters (I) (equation 1) [2] and *N*-benzoylglycine phenyl esters (II) (equation 2) [3].



I (compounds 1-19)



II (compounds 20-44)

$$\log k_{cat}/K_m = 0.66 \sigma' + 0.54 MR_4' + 1.14 \pi_3' + 4.34 \quad (1)$$

$$n = 19 \quad r = 0.950 \quad s = 0.148$$

$$\log k_{cat}/K_m = 0.39 \pi_4 + 0.42 \sigma + 4.61 \quad (4)$$

$$n = 20 \quad r = 0.940 \quad s = 0.176$$

In the above equations k_{cat}/K_m is the specificity constant, σ' is the combined Hammett constant for the substituents in the phenyl ester, MR_4' is the molar refractivity for the substituents in position 4', π_3' is the hydrophobic constant for the most lipophilic of the substituents in the 3' or 5' position, π_4 is the hydrophobic contribution of the substituents in position 4, σ is the Hammett constant for the substituents on the benzoyl ring, and n , r and s are the number of compounds, correlation coefficient and standard deviation of the equation respectively. In this work we report a more general QSAR model that accounts for variations in both, the amino and the carboxylic side of glycine. The molecular descriptors used in the analysis included the traditional π and MR constants, as well as the energy of the highest occupied molecular orbital (ϵ_{HOMO}) calculated using the semiempirical molecular orbital method AM1 [4]. Compounds were built and molecular-mechanics minimized using QUANTA/CHARMM (MSI, Waltham, MA). After minimization the dihedral angles of the glycine moiety were fixed to the values shown by the L-alanylmethylene residue, on the X-ray structure of the enzyme-inhibitor complex benzoyloxy-carbonyl-L-phenylalanyl-L-alanylmethylene-papain [5]. Electronic properties were subsequently calculated with the program AM1 [4]. Since the data set (Table 1) contains two different types of derivatives, pyridyl and phenyl esters, each subset was analyzed separately. Then, the subsets were merged together to produce equations 3-5.

$$\log k_{cat}/K_m = 0.42 \pi_4 + 0.59 \sigma' + 0.46 \sigma + 0.97 \pi_3' + 0.36 MR_4' + 4.5 \quad (3)$$

$$n = 39 \quad r = 0.928 \quad s = 0.183$$

$$\log k_{cat}/K_m = 0.36 \pi_4 - 0.54 \epsilon_{HOMO} + 0.95 \pi_3' + 0.43 MR_4' - 0.65 \quad (4)$$

$$n = 39 \quad r = 0.934 \quad s = 0.173$$

$$\log k_{cat}/K_m = 0.38 \pi_4 + 1.16 \pi_3' - 0.32 \epsilon_{LUMO} + 0.44 MR_4' + 4.36 \quad (5)$$

$$n = 39 \quad r = 0.872 \quad s = 0.237$$

This analysis has shown that the specificity constant for substrates studied is related to localized hydrophobic and steric effects parameterized by π_3' , π_4 and MR_4' . In contrast, the electronic effects parameterized by ϵ_{HOMO} appear to be at the molecular level. In the case of compounds 1-19 the high colinearity between ϵ_{LUMO} and ϵ_{HOMO} produced equations of almost equal quality. However, when studying compounds 20-39 and when merging all the compounds ϵ_{HOMO} was clearly a better descriptor of the electronic effects (compare equations 4 and 5). In this example, ϵ_{HOMO} is as effective as σ to account for electronic effects, but requires one variable less in the equation (compare equations 3 and 4). These results support the concept that quantum mechanics derived indices are particularly important to account for the electronic effects of structurally diverse sets [5].

Acknowledgments

This research was supported in part by the American Cancer Society, the National Science Foundation and the Murphy Oil Corporation Research Award.

References

1. Brocklehurst, K., Willenbrock, F., and Salih, E. In Neuberger, A. and Brocklehurst (Eds.) *Hydrolytic Enzymes*, Elsevier, New York, 1987, pp. 39-143.

2. Compadre, C.M., Hansch, C., Klein, T.E., Petridou-Fisher, J., Selassie, C.D., Smith, R.N., Steinmetz, W., Yang, C., Yang, G., *Biochem. Biophys. Acta*, 1079 (1991)43.
3. Compadre, C.M., Hansch, C., Klein, T.E., Langridge, R., *Biochem. Biophys. Acta*, 1038(1990)158.
4. Dewar, M.J.S., Zoebisch, E.G., Healy, E.F. and Stewart, J.J.P., *J. Am. Chem. Soc.*, 107(1985)3902.
5. Drenth, J., Kalk, K.H., and Swen, H.M., *Biochemistry*, 15(1970)3731.
6. Lopez de Compadre, R.L., Debnath, A.K., Shusterman, A.J. and Hansch, C., *Environ. Mol. Mutagen.*, 15(1990)44.

Table 1. Kinetic and physicochemical data for N-benzoyl glycine esters

X	log k_{cat}/K_m			ϵ_{HOMO}	ϵ_{LUMO}
	obs.	calc ^a	dev		
1 H'	4.40	4.59	-0.19	-9.600	-0.281
2 4'-NH ₂	4.19	4.29	-0.10	-8.687	-0.241
3 4'-OCH ₃	4.62	4.66	-0.04	-9.178	-0.286
4 4'-CN	4.83	5.02	-0.19	-9.961	-0.840
5 4'-F	4.35	4.58	-0.23	-9.586	-0.388
6 4'-CH ₃	4.54	4.66	-0.12	-9.352	-0.270
7 4'-CONH ₂	5.01	5.13	-0.12	-9.903	-0.679
8 4'-Cl	4.68	4.79	-0.11	-9.566	-0.404
9 4'-COCH ₃	5.39	5.18	0.21	-9.885	-0.771
10 4'-NO ₂	5.47	5.20	0.27	-10.220	-1.419
11 5'-NHCOCH ₃	4.41	4.34	0.07	-9.132	-0.336
12 5'-CONH ₂	4.54	4.74	-0.20	-9.867	-0.566
13 5'-CN	4.92	4.81	0.11	-10.001	-0.719
14 5'-NO ₂	5.02	4.87	0.15	-10.114	-1.359
15 3'-F	4.59	4.82	-0.23	-9.778	-0.382
16 3'-CH ₃	5.13	5.07	0.06	-9.497	-0.270
17 3'-Cl	5.34	5.34	0.00	-9.724	-0.357
18 3'-CF ₃	5.70	5.70	0.00	-10.099	-0.745
19 5'-NH ₂	4.43	4.24	0.19	-8.941	-0.255
20 4'-SO ₂ NH ₂ ^b	4.83	5.39	-0.56	-10.173	-0.959
21 H	4.65	4.79	-0.14	-9.958	-0.376
22 4-CH ₃	4.78	4.91	-0.13	-9.827	-0.363
23 4-C(CH ₃) ₃ ^b	4.81	5.40	-0.59	-9.842	-0.352
24 4-C ₆ H ₅ ^b	6.02	5.40	0.62	-9.773	-0.404
25 4-SO ₂ NH ₂ ^b	4.23	4.36	-0.13	-10.113	-1.181
26 4-NHCOCH ₃ ^b	5.04	4.30	0.74	-9.484	-0.425
27 4-NH ₂	3.73	3.79	-0.06	-8.809	-0.307
28 4-CN	4.74	4.79	-0.05	-10.068	-1.082
29 4-NO ₂	5.04	4.96	0.08	-10.147	-1.636
30 4-N(CH ₃) ₂	4.57	4.28	0.29	-8.695	-0.320
31 4-Cl	5.07	5.14	-0.07	-9.991	-0.655
32 4-I	5.21	5.30	-0.09	-10.009	-0.736
33 4-OC ₄ H ₉	5.20	5.19	0.01	-9.469	-0.361
34 4-OC ₆ H ₁₃	5.68	5.62	0.06	-9.489	-0.364
35 4-OC ₈ H ₁₇	6.02	6.06	-0.04	-9.502	-0.366
36 3-CN	5.17	4.83	0.34	-10.037	-0.869
37 3-I	4.95	4.82	0.13	-10.008	-0.630
38 3-OCH ₃	4.55	4.65	-0.10	-9.701	-0.456
39 3-CH ₃	4.66	4.71	-0.05	-9.816	-0.362
40 3-NO ₂	5.20	4.85	0.35	-10.066	-1.371
41 3-NH ₂	4.43	4.28	0.15	-9.013	-0.378
42 3,5-(Cl) ₂	4.99	4.83	0.16	-10.033	-0.827
43 3,5-(NO ₂) ₂	4.81	4.95	-0.14	-10.264	-3.214
44 3,5-(CH ₃) ₂	4.37	4.62	-0.25	-9.648	-0.355

^aCalculated using equation 4. ^bCompounds not included in equations 1-5.

REFERENCIAS

- 1 *Reviews In Computational Chemistry*. Lipkowitz, K. B. y Boyd, D. B., Eds., VCH Publishers, New York, Vol. 1.
- 2 Goldstein, A. Aronow, L. y Kalman, S. M., *Farmacología*, Ed. Limusa, México, p.p. 2 (1979)
- 3 Tollenaere, J. P., Moereels, H. y Raymaekers, L. A., *Drug Design*, 10, 71 (1981)
- 4 Goldblum, A., Yoshimoto, M. and Hansch, C., *J. Agric. Food Chem.*, 29, 277 (1981).
- 5 Término sugerido por el Dr. Pedro A. Lehmann. Departamento de Farmacología y Toxicología, Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, A. P. 14-170, México 07000 D. F. México.
- 6 Hansch, C., Kim, D., Leo, A. J., Novellino, E., Sillpo, C., Vittoria, A. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 19: 185226 (1989).
- 7 Finney, D. J. *Probit Analysis: A Statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve*, 2nd ed., University Press, Cambridge (1964).
- 8 Hansch, C., Klein, T. E., *Acc. Chem. Res.*, 19, 392-400 (1986).
- 9 Compadre, C. M., Hansch, C., Klein, T. E., Langridge, R., *Biochim. Biophys. Acta*, 1038, 158-163 (1990).
- 10 Kubinyi, H., *Prog. Drug. Res.*, 23, 97-198 (1979).

- 11 Hansch, C. and Leo, A. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, pp. 339, Wiley-Interscience, New York (1979).
- 12 Leo, A., Hansch, C., Elkins, D., *Chem Rev.*, 71, 525-616 (1971).
13. Ellgehausen, H., D'Homdt, C., Fuerer, R., *Pestic. Sci.*, 12, 219-227 (1981).
14. Konemann, H., Zelle, R., Busser, F. *J. Chromatog.*, 178, 559-65 (1979).
15. Anonimo. Manuales del software MedChem. Daylight Chemical Information Systems, Inc., Claremont, California, pp. 75, (1989).
16. Dunn, W. J. III, *Eur. J. Med. Chem.* 12, 109-112 (1977).
- 17 Hancock, C. K., and Falls, C. P., *J. Am. Chem.Soc.*, 83, 4214 (1961).
- 18 Hammett, L. P. *Physical Organic Chemistry: Reactions Rates, Equilibria, and Mechanism.*, 2nd ed. McGraw-Hill Book Company, N.Y., pp. 420 (1970).
- 19 Shorter, J. *Correlation Analysis of Organic Reactivity, With Particular Reference to Multiple Regression.* Research Studies Press. John Wiley and Sons, Chischester, p.p. 235 (1982).
- 20 Kubinyi, H. *J. Med. Chem.*, 20, 625-29.(1977).

- 21 Wooldridge, K. R. H., *Eur. J. Med. Chem.*, 15, 63 (1980).
- 22 Ganellini, C. R., en *Chronicles of Drug Discovery*, J. S. Bindra and D. Lednicer, Eds. Wiley, New York, 1982. Cimetidine.
- 23 Goodford, P. J., Hudson, A. T., Sheppey, G. C. Wooton, R., Black, M. H., Sutherland, G. J. and Wickham, J. C., *J. Med. Chem.*, 19, 1239 (1976).
- 24 Doweyko, A. M., Bell, A. R., Minatelli, J. A. and Relyea, D. I., *J. Med. Chem.*, 26, 475 (1983).
- 25 Craig, P. N., *J. Med. Chem.*, 14, 680 (1971).
- 26 Hansch, C., *et al.*, *J. Med. Chem.*, 16, 1207 (1973).
- 27 Los programas BMDP están disponibles a través de W. J. Dixon, Chief Editor, University of California Press, 2223 Fulton Street, Berkeley, CA 94720.
- 28 Los programas SAS están disponibles a través de SAS Institute, Inc., Box 8000, Cary, NC 27411-8000.
- 29 Purcell, W. P., Bass, G. E. and Clayton, J. M., *Strategy of Drug Design: A Guide to Biological Activity*. Wiley, New York, 1973.

- 30 Lennard-Jones, J. E., *Trans. Faraday Soc.*, 25, 668 (1929).
- 31 Coulson, C. A. and Longuet-Flggins, J., C., *Proc. Roy. Soc. (London)*, A191, 139 (1947),
- 32 Roothaan, C. C. J., *Rev. Mod. Phys.*, 23, 69 (1977).
- 33 Dewar, M. J. S. and Thiel, W., *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 4899 (1977).
- 34 Dewar, M. J. S., Zoebish, E. G., Healy, E. F., and Stewart, J. J. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 3902 (1985).
- 35 Pople, J. A., Beveridge, D. L. "Aproximate Molecular Orbital Theory", McGraw-Hill Book Co. New York (1970).
- 36 Klopman, G., *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 4550 (1964). 87, 3300 (1965).
37. Pople, J. A., Beveridge, D. L. and Dobosh, P. A., *J. Chem. Phys.*, 47, 2026 (1967).
38. Pople, J. A., and Segal, G. A., *J. Chem. Phys.*, 43, S136 (1965).
39. Pople, J. A., *Trans. Faraday Soc.*, 49, 1375 (1953).
40. Brickstock, a. and Pople, J. A., *Trans. Faraday Soc.*, 50, 901 (1954).
41. Pople, J. A., Santry, D. P. and Segal, G. A., *J. Chem. Phys.*, 43, S129 (1965).
42. Dixon, R. N., *Mol. Phys.* 12, 83 (1967).
43. Balrd, N.C., and Dewar, M. J. S., *J. Chem. Phys.*, 50, 1262 (1969).
44. Dewar, M. J. S., and Haselbach, E., *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 1285 (1975).
45. Bingham, R. C., Dewar, M. J. S., and Lo, D. H., *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 1285 (1975).

46. Dewar, M. J. S., "The Molecular Orbital Theory of Organic Chemistry" p.p. 84. McGraw-Hill. New York (1969).
47. Pople, J. A., and Segal, G. A., *J. Chem. Phys.*, 44, 3289 (1966).
48. Hall, G. G., *Proc. Roy. Soc. (London)*, A205, 541 (1951).
49. Stewart J. J. P., *Comput. Chem.*, 13, 157 (1988).
50. Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G., Healy, E. F., y Stewart, J. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 3902 (1985).
51. Koopmans, T., *Physica*, 1, 104 (1933).
- 52 a) Currie, D. J., Lough, C. E., Silver, R. F. and Holmes, H. L., *Can. J. Chem.*, 44, 1035 (1966).
- b) Fujita, T., Iwasa, J. and Hansch, C., *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 5175 (1964).
- c) Hansch, C. and Anderson S. M., *J. Org. Chem.*, 32, 2583 (1967).
- d) Iwasa, J., Fujita, T. and Hansch, C., *J. Med. Chem. Soc.*, 8, 150 (1965).
- e) Scholtan, W., *Arzneim.-Forsch.* 18, 505 (1968).

- 53 Bays, D. E. et al. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1177-86 (1989).
- 54 A. F. Casy and R. T. Parfitt, *Opioid Analgesics: Chemistry and Receptors*, Plenum Press, New York, 1986.
- 55 (a) D. A. Evans, C. H. Mitch, R. C. Thomas, D. M. Zimmerman, and R. L. Robey, *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 5955 (1980); (b) W. H. Moos, R. D. Gless, and H. Rapoport, *J. Org. Chem.*, 48, 227 (1983); (c) S. Handa, K. Jones, C. G. Newton, and D. J. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 3, 1362 (1985).
- 56 (a) D. M. Zimmerman and W. S. Marshall, *U. S. P.*, 4 029 796; (b) D. R. Brittell and W. C. Ripka, *U. S. P.*, 4 419 517; (c) D. M. Zimmerman, B. E. Cantrell, J. K. Swartzendruber, N. D. Jones, L. G. Mendelsohn, J. D. Leander, and R. C. Wickander, *J. Med. Chem.*, 31, 555 (1988).
- 57 R. Belleau, in *The Chemical Regulation of Biological Mechanisms*, eds. A. M. Creighton and S. Turner, *R. S. C.*, London, 1982, p. 200; *Drugs of the Future*, 1981, 6, 632; A. T. Montzka, D. J. Matiskella, and R. A. Partyka, *B. P. Appl.*, 2 039 908, 1980.
- 58 Bays, D. E. et al. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1177-86 (1989).
- 59 A. F. Casy and R. T. Parfitt, *Opioid Analgesics: Chemistry and Receptors*, Plenum Press, New York, 1986, cap. 3 pag. 146.
- 60 W. R. Martin, *Pharmacol. Rev.*, 35, 238 (1984).
- 61 A. Cowan and D. E. Gmerek, *Trends in Pharmacol. Sci.*, 7, 69 (1986).
- 62 Collier, H. O., Dinneen, L. C., Johnson, C. A., y Schneider, *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, 32, 295 (1968).

- 63 J.D. Leander, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 224, 89 (1983); *ibid.*, 227, 35 (1983).
- 64 J.D. Leander, *Eur. J. Pharmacol.*, 86, 467 (1983).
- 65 (a) D. A. Evans, C. H. Mitch, R. C. Thomas, D. M. Zimmerman, and R. L. Robey, *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 5955 (1980); (b) W. H. Moos, R. D. Gless, and H. Rapoport, *J. Org. Chem.*, 48, 227 (1983); (c) S. Handa, K. Jones, C. G. Newton, and D. J. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1362 (1985).
- 66 R. Belleau, in "The Chemical Regulation of Biological Mechanisms," eds. A. M. Creighton and S. Turner, R. S. C., London, 1982, p. 200; *Drugs of the Future*, 1981, 6, 632; A. T. Montzka, D. J. Matiskeila, and R. A. Partyka, *B. P. Appl.*, 2 039 908, 1980.
- 67 Casy, A. F., y Parfitt, *Opioid Analgesics: Chemistry and Receptors*, Plenum Press, New York, 1986.
- 68 E. L. May and N. B. Eddy, *J. Org. Chem.*, 24, 294 (1959).
- 69 Serena Software, Serena Software, Box 3076, Bloomington, IN 47402-3076.
- 70 La eficacia de este método ha sido ampliamente discutida en: J. J. Stewart, in *Reviews in Computational Chemistry*. K. B. Lipkowitz and D. B. Boyd, Eds. VCH Publishers, New York, pp. 45-118. *Semilempirical Molecular Orbital Methods*.
- 71 Sutton, L. E. y Phil, D. Eds. "Tables of Interatomic distances and configurations in molecules and ions.", Supplement 1956-1959, Special Publication 18., London: The Chemical Society, (1965).

- 72 Ahora se le conoce como Daylight. DAYLIGHT Chemical Information Systems, Inc. 18500 Von Karman, Suite 450. Irvine, CA 92714. USA.
- 73 Corwing Hansch et al. Department of Chemistry, Pomona College, Claremont, CA.
- 74 Casy, A. F. , and Parfitt, R. T., 'Opioid Analgesics: Chemistry and Receptors', Plenum Press, New York, 1986.
- 75 Hansch, C. and Klein, T. E., *Acc. Chem. Res.* 19, 392-400 (1986).
- 76 Morgenstern, L., Recanatini, M., Klein, T. E. Steinmetz, W., Yang, C. Z., Langridge, R. and Hansch, C., *J. Biol. Chem.* , 262, 10767-72 (1987).
- 77 Hansch, C. *Acc. Chem. Res.* 2, 232-9 (1969).
- 78 Selassie, C., Strong, C., Hansch, C., Delcamp. T., Frelsheim, J. and Khawaja, T. *Cancer Res.* 46, 744-56 (1986).
- 79 Drenth, J., Jansonius, J. N., Koekoek, R., Sluyterman , L. A. A., and Wolthers, B. G. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser.*, B257, 231-236 (1970).
- 80 Walsh, C., *Enzymatic Reaction Mechanism*, p. 98, Freeman, San Francisco (1979).
- 81 Smith, R. N., Hansch, C., Kim, K., Omiya, B., Fukumura, G., Salassie, C. D., Jow, Y. C., Blaney, J. M. and Langridge, R., *Arch. Biochem. Biophys.* 215, 319-328 (1982).
- 82 Hansch, C. and Leo, A. *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*, Wiley-Interscience, New York (1979).

- 83 Hansch, C., Smith, R. N., Rockoff, A., Calef, D. F., Jow, P. Y. C., and Fukunaga, J. Y., *Arch. Biochem. Biophys.* 183, 383-392 (1977).
- 84 Smith, R. N., Hansch, C., Kim, K., Omiya, B., Fukumura, G., Salassle, C. D., Jow, Y. C., Blaney, J. M. and Langridge, R., *Arch. Biochem. Biophys.* 215, 319-328 (1982).
- 85 Compadre, C. M., Hansch, C., Klein, T. E., and Langridge, R., *Biochim. Biophys. Acta*, 1038, 158-163 (1990).
- 86 QUANTA/CHARMM. MSI, Waltham, MA.
- 87 a) Drenth, J., Kalk, K. H., and Swen, H. M., *Biochemistry*, 15, 3731 (1970).
- b) Huber, C. P., Carey, P. R., Hsi, C., Lee, H. and Storer, A. C., *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 8263-8 (1984).
- 88 Desarrollado por el grupo de Corwing Hancsh. Department of Chemistry, Pomona College, Claremont, CA. Distribuido por DAYLIGHT Chemical Information Systems, Inc. 18500 Von Karman, Suite 450. Irvine, CA 92714. USA.
- 89 Smith, R. N., Hansch, C., Kim, K. H., Omiya, B., Fukumura, G., Selassle, C. D., Jow, P. Y. C., Blaney, J. M. and Langridge, R., *Arch. Biochem. Biophys.*, 215, 319-28 (1982).
- 90 Stewart, J. J. P., *J. Comput. Aided Mol. Design*, 4, 1 (1990).

- 91 Compadre, C. M., Hansch, C., Klein, T. E., Petridou-Fischer, J., Selassie, C. D., Smith R. N., Steinmetz, W., Yang C. and Yang G., *Biochim. Biophys. Acta*, 1079, 43-52 (1991).
- 92 Hansch, C. and Leo, A. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, Wiley-Interscience, New York (1979).
- 93 Hansch, C. and Klein, T., *Acc. Chem. Res*, 19, 392-400 (1986).
- 94 Brocklehurst, K., Willenbrock, F. and Sallh, E. *Hydrolytic Enzymes*, Neuberger, A. and Brocklehurst (Eds.), Elsevier, New York, p.p. 39-143, 1987.
- 95 Compadre, C. M., Hansch, C., Klein, T. E., Langridge, R., *Biochem. Biophys. Acta*, 1038, 158 (1990).
- 96 Compadre, C. M., Hansch, C., Klein, T. E., Petridou-Fisher, J., Selassie, C. D., Smith, R. N., Steinmetz, W., Yang, G., *Biochem. Biophys. Acta*, 1079, 43 (1990).