

PRÁCTICA III.3
MODELAGEM MOLECULAR COM O AUXÍLIO DO COMPUTADOR
MOLECULAR MODELING WITH THE AID OF A COMPUTER

Thais Horta Álvares da Silva

*Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de
Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 30180-112, Brasil;
thais@farmacia.ufmg.br*

INTRODUÇÃO

Modelos são representações simplificadas de objetos e fenômenos físicos reais. A modelagem consiste na construção e manipulação de modelos com objetivo de compreender mais profundamente as entidades por eles representadas.

A modelagem molecular consiste na geração, manipulação e/ou representação realista de estruturas moleculares e cálculo das propriedades físico-químicas associadas. Ela pode ser assistida por computadores. O instrumento matemático usado é a química teórica e a computação gráfica é a ferramenta para manusear os modelos. Atualmente, os sistemas de modelagem molecular estão munidos de poderosas ferramentas para construção, visualização, análise e armazenamento de modelos de sistemas moleculares complexos que auxiliam na interpretação das relações entre a estrutura e a atividade biológica.

A modelagem molecular pode ser aplicada ao planejamento de fármacos de modo direto ou indireto. Indiretamente, quando não se dispõe da estrutura do receptor, na tentativa de se obter parâmetros eletrônicos e estéricos que elucidem as relações estrutura-atividade biológica. Diretamente, quando se conhece a estrutura tridimensional do alvo biológico, na tentativa de compreender as interações dos complexos ligante-receptor. Ambos os modos tentam otimizar o encaixe da molécula com o receptor. A modelagem molecular e suas representações gráficas permitem explorar aspectos tridimensionais de reconhecimento molecular e gerar hipóteses que levam ao planejamento e síntese de novos ligantes.

São objetivos do planejamento de fármacos assistido por computador: calcular as propriedades de moléculas individuais (conformações estáveis com descrição completa da geometria e suas energias relativas, cargas, interações atômicas, potenciais eletrostáticos, orbitais, calores de formação, pKa's, coeficientes de partição, momentos dipolo); calcular as propriedades e as energias de moléculas associadas (descrever as interações entre moléculas como solvatação e interação fármaco-receptor); exibir, sobrepor e comparar modelos moleculares geométricos e eletrônicos; encontrar e exibir relações quantitativas e qualitativas entre representações de moléculas e atividade biológica; acessar, manusear e gerenciar bancos de dados químicos e biológicos.

A modelagem molecular aplicada ao planejamento de fármacos tem como um dos seus objetivos a descoberta do farmacóforo, que é definido como a coleção mínima de átomos espacialmente dispostos de maneira a levar a uma resposta biológica. Esta definição tem sido refinada para incluir restrições topográficas e tridimensionais.

O conhecimento que os sítios ativos de enzimas e certos sítios receptores são estereosseletivos e estéreo-específicos justifica o estudo das conformações das moléculas de fármacos que podem interagir com estes sítios. A interação da molécula do fármaco com o receptor leva a uma mudança conformacional que é ultimamente observada como a resposta farmacológica. Um sítio receptor pode ligar-se a apenas uma das várias conformações de uma molécula flexível. Esta conformação farmacofórica tem o arranjo espacial correto de todos os grupos ligantes da molécula do fármaco para o alinhamento com os sítios de ligação do receptor. Aquelas moléculas que podem adotar uma conformação que é capaz de se ligar ao receptor podem agir como agonistas ou como antagonistas. Os antagonistas ligam-se ao receptor mas não são capazes de promover a resposta biológica.

Isomerismo conformacional é definido como o arranjo espacial não idêntico de átomos numa molécula resultante da rotação em torno de uma ou mais ligações simples. Conformações diferentes resultam apenas de rotações em torno de átomos tendo pelo menos um outro substituinte.

No etano a rotação em torno da ligação C-C leva a diferentes conformações. A conformação eclipsada é aquela em que os átomos de hidrogênio estão mais próximos e, portanto, é a conformação menos estável. A conformação alternada é aquela em que os átomos de hidrogênio estão mais distanciados e, portanto, é a conformação mais estável. A barreira de rotação da ligação C-C, que é de 2,8 kcal/mol, é devida à diminuição da distância entre os átomos de hidrogênio de carbonos adjacentes (Figura 1). Entre estas duas conformações existe um número infinito de conformações de estabilidade intermediária.

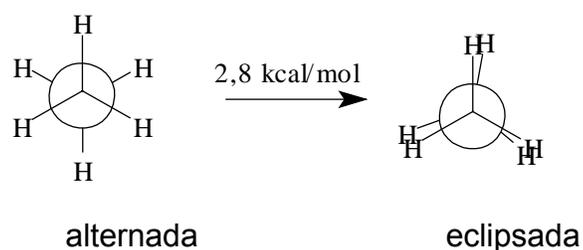


Figura 1- Conformações do etano

Para o butano observam-se as conformações mostradas na Figura 2.

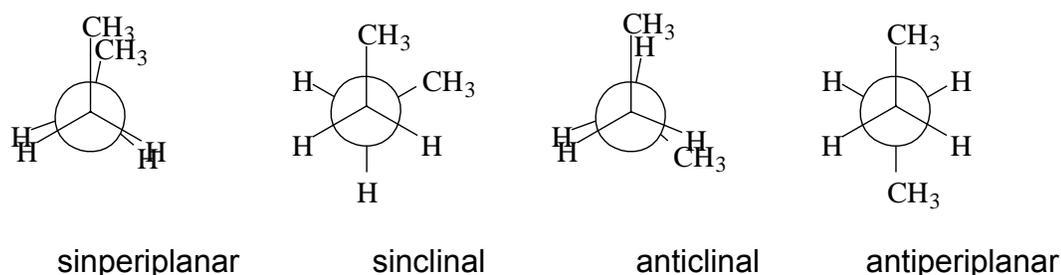


Figura 2- Conformações do *n*-butano

Moléculas cíclicas também apresentam isomeria conformacional (Figura 3). O anel ciclopropano é planar. Os anéis ciclobutano e ciclopentano desviam um pouco da planaridade. As principais conformações do ciclopentano são envelope e

meia-cadeira. Já o cicloexano pode existir em duas conformações em que cada carbono tem ligações tetraédricas com ângulos de $109^{\circ}28'$, cadeira e barco, e uma outra conformação, o barco torcido. A conformação em cadeira é de 6,9 kcal/mol mais estável que a em bote, porque na última os hidrogênios estão em posição eclipsada e dois deles estão apontados um para o outro, com interação de van der Waals repulsiva. A conformação em barco torcido minimiza estas interações e é apenas 5,3 kcal/mol menos estável que a conformação em cadeira (Figura 3). À temperatura ambiente o anel cicloexano prefere a conformação em cadeira em relação ao bote torcido em uma proporção de 1000:1.

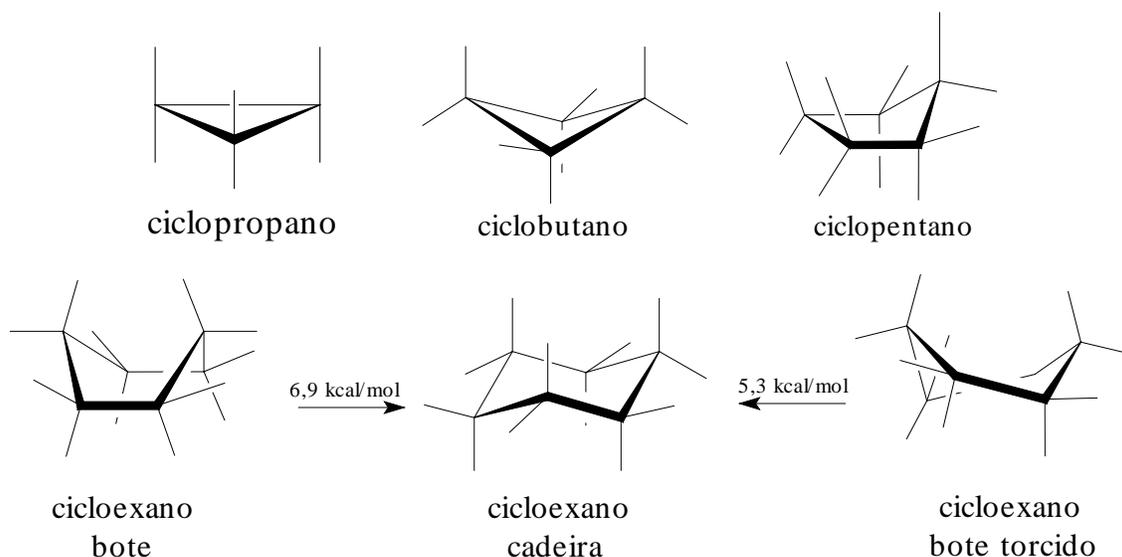


Figura 1- Conformações do ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano e cicloexano.

Os métodos de cálculo usados na modelagem molecular podem ser clássicos, como a mecânica molecular (MM), ou quânticos, como os métodos *ab initio* e semi-empírico.

Os cálculos de MM são também chamados cálculos de campo de força. A MM trata as moléculas como uma coleção de átomos que pode ser descrita por forças newtonianas, ou seja, são tratadas como uma coleção de partículas mantidas unidas por forças harmônicas ou elásticas. Estas forças podem ser descritas em termos de funções de energia potencial de características estruturais

como comprimentos de ligação, ângulos de ligação, interações não ligantes e outras. A combinação destas funções de energia potencial é o campo de força. A energia potencial total, ou energia estérica (EE), da molécula é representada na forma mais simples pela Equação de Westheimer (Figura 4).

$$E = E_s + E_b + E_w + E_{nb}$$

E_s - energia de estiramento (ou compressão) de uma ligação,

E_b - energia de deformação angular,

E_w - energia de torção em torno de ligações, e

E_{nb} - energia de interação não ligante

$$E = \sum_l \frac{K_l (l - l_0)^2}{2}$$

K_l - constante de força

l - comprimento de ligação

l_0 - comprimento de ligação livre de tensão

$$E_b = \sum_\theta \frac{K_\theta (\theta - \theta_0)^2}{2}$$

K_θ - constante de força

θ - ângulo de ligação

θ_0 - ângulo de ligação livre de tensão

$$E_w = \sum_w \frac{V_w (1 \pm \cos nw)}{2}$$

V_w - constante de força

w - ângulo torsional

n - periodicidade de V_n

$$E_{nb} = \sum F_r \left\{ -\frac{2}{\alpha^6} + \exp[12(1-\alpha)] \right\}$$

F_r - constante de força

$$\alpha = \frac{r}{r_1^* + r_2^*}$$

r - distância interatômica entre átomos não ligados

r_1^* e r_2^* - constantes de van der Waals

Figura 4- Equação de Westheimer e suas componentes.

Cada uma destas funções de energia (Figura 4) representa a diferença de energia entre uma molécula real e uma molécula hipotética onde todos os parâmetros estruturais, como comprimentos de ligação e ângulos de ligação, estão exatamente em seus valores ideais ou naturais.

Algumas das vantagens da mecânica molecular são a rapidez e a economia de tempo de computação, a facilidade de compreensão em relação aos métodos de mecânica quântica. Quando um tratamento mais refinado é requerido, a geometria otimizada pela MM pode ser usada como ponto de partida para cálculos quanto-mecânicos de orbitais moleculares.

Algumas desvantagens dos métodos de MM são que algumas classes de moléculas de interesse não estão correntemente parametrizadas e a MM não é apropriada para a determinação de propriedades onde efeitos eletrônicos (por exemplo interações de orbitais, quebra de ligações, etc) são predominantes.

A geometria de uma molécula é especificada em termos de suas coordenadas atômicas. Assim, a partir de um conjunto de dados de entrada, uma geometria inicial é especificada e sua energia estérica é calculada. Todos os

parâmetros que definem a geometria do sistema são modificados em incrementos pequenos e, através do uso de métodos de abaixamento de gradiente, a geometria é otimizada (ou seja, a EE é minimizada). É importante lembrar que a minimização é um método iterativo de otimização geométrica que depende da geometria de partida. A minimização usualmente leva ao mínimo local mais próximo e não ao mínimo global. Vários problemas em estudos de relação estrutura-atividade requerem soluções que podem não ser o mínimo global da molécula isolada. A varredura completa da superfície de energia potencial (SEP) de uma molécula é chamada de análise conformacional. Para que a análise conformacional seja feita com alguma segurança alguns procedimentos têm sido desenvolvidos.

Na análise conformacional por busca sistemática são feitos incrementos nos valores dos ângulos diedro de todas ligações passíveis de rotação para explorar o espaço conformacional da molécula. Desta forma o espaço conformacional de moléculas pode ser varrido.

Os cálculos de dinâmica molecular simulam o movimento baseado em cálculos de energia potencial usando o campo de força e as equações de Newton para o movimento, assumindo cada átomo como uma partícula. As equações do movimento de Newton são usadas para calcular a posição e a velocidade de todos os átomos a cada intervalo de tempo. O método consiste em simular a colocação da molécula em um banho de temperatura e viscosidades definidos. É dado um intervalo de tempo em que ocorre a transferência de calor entre o banho e a molécula (da ordem de 1fs) e um intervalo de tempo em que a molécula equilibra a sua energia (da ordem de 300 fs). O processo é repetido o número de vezes especificado. A dinâmica molecular é capaz de ultrapassar pequenas barreiras energéticas e, portanto, é mais eficiente na localização de um mínimo local mais profundo que a minimização simples.

Moléculas muito flexíveis, com muitas ligações passíveis de giro livre, apresentam uma hipersuperfície de energia potencial complexa, que pode ter um número extraordinário de mínimos, difíceis de serem localizados. A análise conformacional ao acaso, ou método de Monte Carlo foi idealizada para este tipo

de molécula. Uma estrutura inicial é escolhida e variações ao acaso em certas coordenadas e/ou em certos ângulos diedros são aplicadas, a estrutura é minimizada e o resultado é comparado com os mínimos achados durante os passos de busca conformacional anteriores. As conformações são selecionadas considerando critérios geométricos (comparação das estruturas para excluir as duplicatas) e critérios de energia. A estrutura obtida é armazenada como nova ou rejeitada como duplicata e o ciclo é repetido.

Alguns métodos físicos podem ser usados para a determinação de conformações de moléculas em diferentes estados. Para determinação de conformação em solução o método mais usado é a ressonância magnética nuclear (RMN). A informação detalhada sobre a estrutura da molécula em estado sólido é obtida por métodos de cristalografia de raios X. Outros métodos podem ser úteis, fornecendo alguns fragmentos de informação sobre a conformação das moléculas e devem ser usados em conjunto com outros métodos. Informações completas sobre a conformação de moléculas no estado gasoso podem ser obtidas pela difração eletrônica e pela espectroscopia por microondas. Entretanto as conformações preferidas das moléculas no estado sólido e gasoso não são necessariamente as mesmas preferidas em solução.

Os métodos quanto-mecânicos ab initio e semi-empírico são baseados no uso de um conjunto de leis chamadas de Mecânica Quântica. A aplicação da mecânica quântica a problemas de química é chamado de Química Quântica. A mecânica quântica permite o cálculo da energia de átomos e moléculas e portanto forma a base de sistemas de modelagem química. Para descrever o estado de um sistema, em mecânica quântica, foi postulada a existência de uma função de coordenadas chamada função de onda ou função de estado Ψ , que é a solução da equação de Schrödinger (Figura 5).

$$H\psi = E\psi$$

Figura 5- Equação de Schrödinger.

Iniciando com uma geometria nuclear, com os cálculos de mecânica quântica a equação de Schrödinger é solucionada. São obtidas a energia da molécula e a função de onda associada, para este arranjo de elétrons e núcleos. A função de onda contém todas informações sobre a molécula e a partir dela podem ser calculadas todas propriedades eletrônicas da molécula. A energia da estrutura, calculada quanto-mecanicamente, pode ser usada na análise conformacional da mesma forma que a energia da mecânica molecular é usada.

Os métodos *ab initio* são aqueles em que se resolve com maior aproximação a equação de Schrödinger. Nos métodos semi-empíricos é feita uma simplificação na resolução da equação de Schrödinger na qual algumas integrais são substituídas por parâmetros cujos valores são ajustados para reproduzir propriedades moleculares obtidas por dados experimentais ou calculadas por métodos *ab initio*.

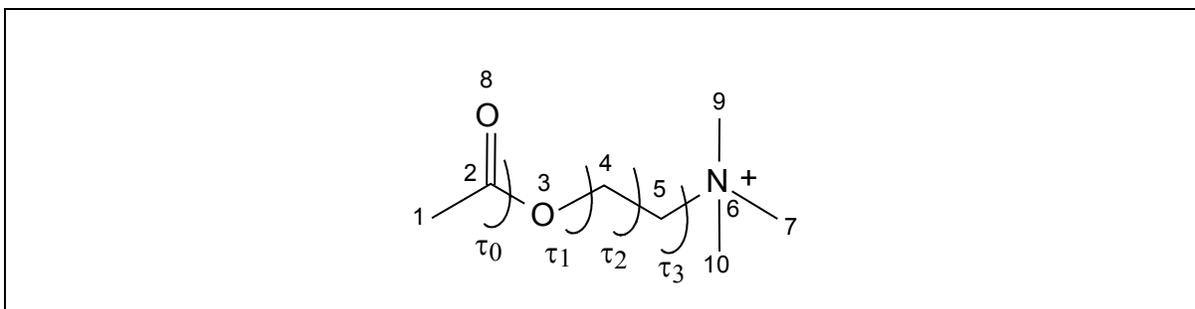
Devido às dificuldades encontradas na aplicação de métodos *ab initio* para moléculas médias e grandes, vários métodos semi-empíricos foram desenvolvidos. Os métodos semi-empíricos são rápidos e precisos o suficiente para permitir aplicações rotineiras em sistemas moleculares maiores. O objetivo fundamental dos métodos semi-empíricos é o desenvolvimento de um tratamento quantitativo de propriedades moleculares com precisão, confiabilidade e custo computacional suficiente para ser de valor prático em química.

Neste capítulo descrevem-se o desenho da molécula de acetilcolina e sua análise conformacional pela método de busca sistemática, usando o programa PCMODEL versão 7.0. O campo de força usado pelo programa PCMODEL, denominado MMX, é derivado do campo de força MM2 de N. L. Allinger. A versão corrente do MMX reconhece 60 tipos de átomos diferentes, incluindo radicais, ânions, cátions e metais de transição, alguns dos quais não estão incluídos no MM2.

Para se obter uma estrutura química no computador procede-se por umas das seguintes formas: desenhando na tela usando as ferramentas de desenho disponíveis no programa, inclusive as livrarias de desenho (no PCMODEL existem livrarias de sistemas anelares, aminoácidos, açúcares e nucleosídeos); lendo um

arquivo gerado em outro programa, em um tipo de arquivo que é aceito pelo programa que está sendo usado (no PCMODEL arquivos dos tipos MMX, MM3, PDB, MOPAC, ALCHEMY, SYBYL, X-RAY, MDL_MOL, MACROMODEL, GAUSSIAN, JAGUAR, CAMBRIDGE STRUCTURE DATA, GAMESS E CHEM-3D são aceitos) ou por meio de busca em bancos de dados de estrutura disponíveis na web (copia-se o arquivo em um formato que esteja disponível no banco de dados e que possa ser lido pelo PCMODEL).

A acetilcolina (Ach) é uma molécula flexível com 4 ângulos torsionais (τ_0 , τ_1 , τ_2 e τ_3) passíveis de giro livre (Figura 6). Entretanto são ângulos τ_1 e τ_2 que determinam as principais mudanças conformacionais na molécula. O ângulo torsional τ_2 vai ser girado com incrementos de 10° usando a opção “*dihedral driver*” do programa PCMODEL. No “*dihedral driver*” um a quatro ângulos torsionais são marcados e, então, rodados com passos do valor determinado. A cada rotação todos os ângulos marcados são mantidos fixos e todos os outros graus de liberdade da molécula são deixados livres para que a geometria da molécula seja otimizada. As geometrias encontradas são armazenadas em um arquivo de múltiplas estruturas. Com os dados obtidos (ângulos torsionais e energia estérica) é traçada a superfície de energia potencial (SEP). Através da análise da SEP são identificadas as geometrias em mínimos de energia (cada geometria corresponde a um ângulo torsional τ_2). As geometrias em mínimo de energia serão localizadas no arquivo de múltiplas estruturas gerado pelo *dihedral driver* e serão tomadas como ponto de partida para minimização completa e obtenção dos confôrmeros da acetilcolina. Estes confôrmeros serão analisados (distâncias e ângulos diedros serão medidos) para que os dados obtidos nesta análise conformacional possam ser comparados com dados da literatura.



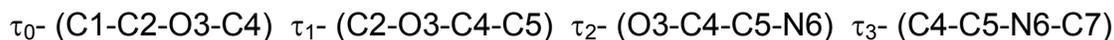
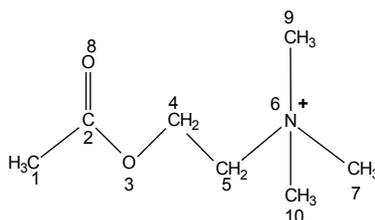


Figura 6- Numeração e definição dos ângulos diedro da molécula de acetilcolina

PROCEDIMENTOS

A tela do PCMODEL é um plano em 2D. O primeiro ponto a ser desenhado será o 0 do eixo Z. A tela é o plano XY. Para mover os átomos para frente e para trás no eixo Z devem se usar as ferramentas *in* e *out*. Para selecionar uma opção do menu basta posicionar o mouse na opção e clicar com o botão da esquerda. O botão da direita do mouse serve para girar a molécula. Ele está sempre ativado. Movendo o mouse para a direita ou para a esquerda, com o botão da direita apertado, a molécula é girada em torno do eixo Y. Movendo o mouse para cima ou para baixo, com o botão da direita apertado, a molécula é girada em torno do eixo X.

a) Desenho da estrutura da acetilcolina e modos de visualização



- 1) Na tela do *windows* abrir o programa PCMODEL 7.0.
- 2) Selecione o botão DRAW (**desenhar**) no menu TOOLS (uma linha tracejada indicará que você está no modo de desenho DRAW).
- 3) Mova o cursor para a janela de desenho e clique o botão do mouse uma vez. Um ponto aparecerá na tela indicando um átomo de carbono (o carbono é o tipo de átomo padrão *-default*).
- 4) Afaste o cursor para direita e clique novamente. Aparece uma linha que significa uma ligação entre dois carbonos já desenhados.
- 5) Repita a operação até obter uma cadeia com sete átomos de carbono.

- 6) Volte ao menu TOOLS, selecione UPDATE (este comando **renova a tela redesenhando a estrutura**, o que é necessário para continuar o desenho de um ponto diferente do último átomo desenhado) e selecione novamente DRAW. Selecione o átomo 2 da cadeia e um ponto acima na tela para desenhar o átomo 8. Selecione UPDATE e, em seguida, DRAW para desenhar os átomos 9 e 10 ligados ao átomo 6.
- 7) Para **transformar C em outros tipos de átomo**:
Selecione no menu TOOLS a opção PT (Tabela Periódica). Aparece uma caixa de diálogo "*Periodic Table*". Selecione o O (oxigênio) e, em seguida, os átomos 3 e 8. Selecione N⁺ (nitrogênio positivo) e, em seguida, o átomo 6.
- 8) Para **introduzir a ligação dupla**:
Selecione no menu TOOLS a opção ADD_B e, em seguida, o centro da ligação correspondente (entre os átomos 2 e 8). Selecione UPDATE.
- 9) Para adicionar hidrogênios e pares de elétrons livres:
Selecione no menu TOOLS a opção H/AD.
- 10) Para **otimizar a estrutura** (minimizar a EE): No menu FORCE FIELD selecione o campo de força (MMX). No menu ANALYSE selecione MINIMIZE. Aparece uma janela ao lado (OUTPUT). Nela são fornecidos os seguintes dados sobre a energia estérica da molécula (em Kcal/mol), o calor de formação (em Kcal/mol) e o momento de dipolo.
- 11) Gire a molécula para verificar se a estrutura minimizada apresenta uma conformação adequada. Caso apresente uma conformação pouco provável mova os átomos para posições mais adequadas usando a ferramenta MOVE (Selecione o átomo a ser movido, seleione MOVE e selecione a nova posição).
Otimize novamente a estrutura.
- 12) Para **salvar**:
Selecione no menu FILE a opção SAVE. Aparece na tela a caixa de diálogo SALVAR COMO. Nesta caixa de diálogo selecione o diretório onde o arquivo vai ser salvo, escreva o nome do arquivo e selecione o tipo de arquivo. O PCMODEL é capaz de salvar o arquivo em diferentes formatos (PCM, próprio

do PCMODEL, MMX, MM3, MOPAC, ALCHEMY, SYBYL, MACROMODEL, CHEM-3D, PDB, JAGUAR, GAUSSIAN e GAMES). Selecione SALVAR.

13) Obtendo novos **modos de visualização**:

No menu EDIT selecione HIDE HYDROGENS (os hidrogênios são escondidos).

No menu VIEW selecione BALL STICK.

No menu EDIT selecione HIDE HYDROGENS (os hidrogênios são mostrados novamente).

No menu LABELS selecione BONDS ONLY.

Movimente o mouse com o botão do lado direito apertado (a molécula é girada).

No menu VIEW selecione PLUTO.

No menu VIEW selecione TUBULAR BONDS.

No menu VIEW selecione CPK.

No menu VIEW selecione DOTS SURFACE.

14) Para **sair** do PCMODEL:

No menu FILE selecione EXIT.

b) Análise conformacional da acetilcolina

No início da análise conformacional os ângulos τ_0 , τ_1 e τ_3 vão ser girados para os seus valores mais prováveis, de acordo com o descrito na literatura e baseado em premissas estéricas: $\tau_0=180^\circ$, devido ao carácter parcial de dupla da ligação C2-O3 e τ_1 e $\tau_3=180^\circ$ correspondendo a uma cadeia distendida.

1) Abrir o programa PCMODEL.

2) Abrir o arquivo que contém a estrutura da acetilcolina, usando a opção OPEN do menu FILE.

3) Selecionar a opção SEL-ATM da barra TOOLS e selecionar os átomos C1, C2, O3 e C4 (τ_0). Selecionar a opção ROT-B da barra TOOLS. Aparece uma caixa

de diálogo com o valor atual do ângulo τ_0 . Movimentar a barra de rolagem até um valor próximo a 180° ou -180° . Repetir a operação para τ_1 , τ_2 e τ_3 .

- 4) Na barra de ferramentas de desenho (TOOLS) selecionar a opção SEL-ATM e selecionar os átomos O3, C4, C5 e N6 (que formam τ_2).
- 5) No menu ANALYSE selecionar DIHEDRAL DRIVER. Aparece uma caixa de diálogo que informa o valor, em graus, do ângulo diedro atual (*current angle*). Entrar com os dados pedidos para este ângulo:

ângulo inicial (start angle): X (X é o valor inteiro, múltiplo de 5, mais próximo ao ângulo inicial)

ângulo final (final angle): X + 350 (de forma que seja feito um giro completo de 360° em torno da ligação C4-C5).

Passo (step): 10

e selecionar OK.

- 6) Vai aparecer uma caixa de diálogo na qual se deve atribuir um nome ao arquivo em que o resultado do *dihedral driver* será gravado (por exemplo o nome: ACHDDxx.PCM). Selecionar OK. O cálculo se inicia.
- 7) Ao final do cálculo aparece uma janela com resultado gráfico do *dihedral driver* (DIHEDRAL MAP). Este mapa de contornos refere-se à superfície de energia potencial (PES) que relaciona a geometria definida pelo ângulo τ_2 e a energia estérica em kcal/mol. No cálculo serão obtidos 36 valores de energia correspondentes.
- 8) Selecionar a opção PRINT para imprimir a PES.
- 9) Localizar na PES os pontos em mínimo de energia e preencher a **tabela 1** com os valores de τ_2 e EE encontrados em pontos de mínimo de energia na superfície de energia potencial.

Tabela 1- Dados das conformações em mínimo de energia da Ach

Conformação	ângulo τ_2	classificação da geometria (O3 e N6)
A		
B		
C		

10) Localizar os pontos em máximo de energia e preencher **tabela 2**.

Tabela 2- Dados das conformações em máximo de energia da Ach

Conformação	ângulo τ_2	EE kcal/mol	classificação da geometria (O3 e N6)
1			
2			
3			

11) Classificar as conformações como sendo *sinperiplanar* (SP), *sinclinal* (SC), *anticlinal* (AC) e *antiperiplanar* (AP), colocando os resultados nas **Tabelas 1 e 2**.

c) Obtenção das conformações em mínimos de energia e medidas de distâncias entre átomos, ângulos e ângulos diedro:

1) Para colocar na tela as conformações de menor energia deve-se procurá-las no arquivo em que elas foram guardadas durante o *dihedral driver*:

A- Selecionar OPEN no menu FILE.

B- Selecionar na caixa de diálogo o arquivo ACHDDxx.PCM, que contém o resultado do *dihedral driver*.

C- Aparece uma caixa de diálogo denominada STRUCTURE LIST, onde estão listadas todas conformações (#dihd 0 a #dihd 35) com os respectivos valores de EE.

Para a molécula que está sendo estudada podemos escrever o seguinte quadro:

#dihd	EE	τ_2
#dihd 0	6,848	X
#dihd 1	6,878	X+10
#dihd 2	8,548	X+20
#dihd 3	.	X+30
.	.	.
.	.	.
#dihd 35	.	X+350

D- Selecionar a conformação desejada e OK. (para se localizar um mínimo basta comparar as energias estéricas de correspondentes a cada ângulo torsional-ela deve ser inferior às energia estéricas das conformações anterior e posterior). Aparece na tela a conformação selecionada.

E- Desmarcar os átomos do dihedral driver usando a opção RESET do menu MARK.

F- Fazer a minimização da estrutura usando a opção MINIMIZE do menu ANALYSE .

2) Fazer as medidas selecionando a opção QUERY no menu TOLLS e, em seguida selecionar 2, 3 ou 4 átomos (2 átomos para medir distância, 3 para medir ângulo e 4 para medir um diedro) e um ponto vazio na tela. A medida aparece na tela.

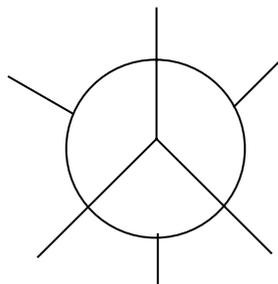
3) Com os dados obtidos de cada um dos mínimos preencher a **tabela 3**:

Tabela 3: Dados dos confôrmeros de menor energia da Ach.

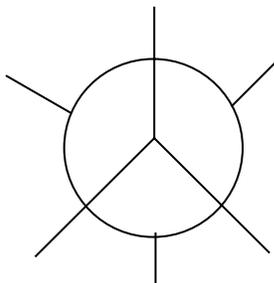
Conformação	#dihd	τ_2	O3-N6 (A)	<u>CH</u> ₃ -N6(A)	N6-O8(A)	EE
A						
B						
C						

4) Desenhar as **projeções de Newman** para τ_2 para os pontos em mínimo de energia:

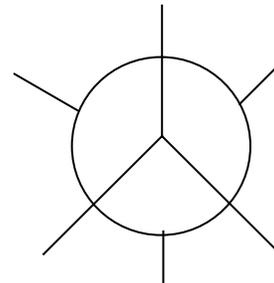
mínimo A

 $\tau_2 =$ 

mínimo B

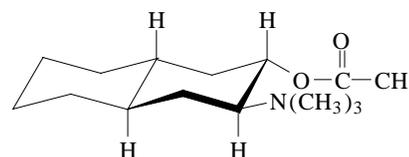
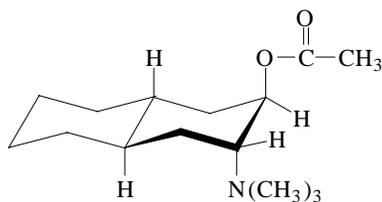
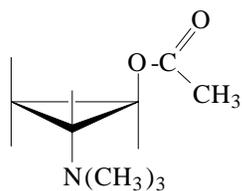
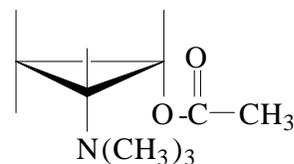
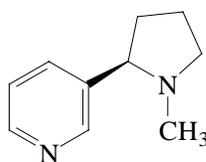
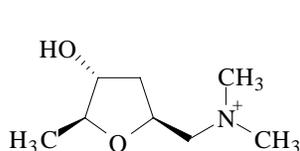
 $\tau_2 =$ 

mínimo C

 $\tau_2 =$ 

Exercícios

- 1) Fazer o desenho da acetilcolina usando diferentes ferramentas do menu TOOLS (por exemplo, construa a cadeia de átomos usando a ferramenta BUILD).
- 2) Fazer a projeção de Newman da acetilcolina em relação aos átomos O3,C4,C5,N6.
- 3) Desenhar a estrutura das seguintes moléculas: (observar a estereoquímica)



Após o desenho, otimizar a geometria e calcular a energia estérica.

- 5) Na estrutura cristalina da ACh a distância encontrada entre O3 e N7 foi de 3,26 Å (CANEPA *et al.*, 1966). A distância encontrada usando o método semi-empírico PCILO foi de 3,02 Å (PULLMAN *et al.*, 1971). O resultado aqui obtido está de acordo com o previsto? Comente.
- 6) Segundo CHOTIA *et al.*(1970) a ACh interage com os receptores muscarínicos numa conformação em que τ_2 é *sinclinal*. Através da análise conformacional realizada aqui, você acha que esta é uma conformação energeticamente favorável? Discuta.
- 7) Através de estudos de RMN, PARTINGTON *et al.* (1972) concluíram que, em solução aquosa, a Ach está 100% na conformação em que τ_2 é *sinclinal*. Esta também é a conformação encontrada na estrutura cristalina (CANEPA *et al.*, 1966). Comentar.

CONCLUSÃO

A prática proposta permite ao aluno de Química Farmacêutica utilizar um programa de modelagem molecular para desenhá-la e estudar as conformações de uma molécula com atividade biológica. Introduz o estudante no uso de meios computacionais no estudo de moléculas.

BIBLIOGRAFIA

- 1- FRÜHBEIS, H.; KLEIN, R.; WALLMEIER, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, v. 26, p. 403-418, **1987**.
- 2- BOYD, D. B.; LIPKOWITZ, K. B. *J. Chem. Educ.*, v. 59, n. 4, p. 269-274, **1982**.
- 3- CANEPA, F. G. ; PAULING, P.; SÖRUM, H. *Nature*, v. 210, p. 907-909, **1966**.
- 4- COHEN, N. C. , BLANEY, J. M.; HUMBLET, C.; GUND, P.; BARRY, D. C. *J. Med. Chem.*, v. 33, n.3, p. 883-894, **1990**.
- 5- COX, P. J. *J. Chem. Educ.*, v. 59, n. 4, p. 275-277, **1982**.
- 6- DOWEYKO, A. M. *J. Med. Chem.*, v. 37, p. 1769-1778, **1994**.
- 7- FERGUSON, D. M.; RABER, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* , v. 111, p. 4371-4378, **1989**.
- 8- HÖLTJE, H. D.; FOLKERS, G. *Molecular Modeling- Basic principles and applications*. NewYork: VHC, **1996**. 194 p.

- 9- LEVINE, I. R. *Quantum Chemistry*. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 4. Ed., **1991**. 629 p.
- 10- PCMODEL 1993 Serena Software - First edition. The force field used in PCMODEL is called MMX and is derived from MM2 (QCPE-395, **1977**) force field of N. L. Allinger, with the pi-VESCF routines taken from MMP1 (QPCE-318), also by N. L. Allinger.
- 11- PARTINGTON *et al. Molecular Pharmacology*, v.8, p. 269-270, **1972**.
- 12- PULLMAN, B. *et al., Mol. Pharmacol.* V. 7, p. 397-405, **1971**.

MATERIAL SUPLEMENTAR

SUMÁRIO RÁPIDO DAS FUNÇÕES DA BARRA DE MENU DO PCMODEL 7.0

Menu File

Open	Lê um arquivo a partir do disco
Save	Salva um arquivo para o disco
Save graphic	Salva a imagem gráfica para o disco
Print	Imprime a estrutura corrente e a janela de energia
Exit	Sai do PCMODEL

Menu Edit

Draw	Recupera o menu TOOLS
Erase	Apaga todas estruturas
Structure Name	Edita ou entra com o nome da estrutura
Hide hidrogens	Faz os hidrogênios da estrutura ficarem invisíveis, mas presentes
Epimer	Epimeriza o átomo selecionado através da troca de dois ligantes selecionados
Enantiomer	Reflete a estrutura através de um eixo especificado
Remove LP	Remove os pares de elétrons livres
Copy_To_Clipboard	Copia a imagem da estrutura para a memória
Orient_XY	Orienta três átomos selecionados no plano XY (XZ ou YZ) com o primeiro átomo na origem, o segundo no eixo e o terceiro no plano
Orient_XZ	
Orient_YZ	

Menu View

Control Panel	Carrega a caixa de diálogo para mudar a escala, fazer translações e rotações de estruturas
Labels	Carrega a caixa de diálogo para mudança dos rótulos das estruturas
Mono/Stereo	Alterna entre a visão mono e estéreo
Stick Figure	Mostra todas estruturas como figuras stick (bastão)
Ball Stick	Mostra todas estruturas como figuras pau e bola
Pluto	Mostra todas estruturas no modo Pluto de pau e bola
Tubular bonds	Mostra todas estruturas como tubos
CPK Surface	Mostra todas ou as estruturas selecionadas com superfície CPK

Dot Surface	Mostra todas ou as estruturas selecionadas com superfície de pontos
Ribbon	Mostra diagrama Ribon para peptídeos ou ácidos nucleicos
Compare	Compara estruturas diferentes
Dihedral Map	Mostra os resultados dos cálculos de dihedral drive
Movie	Mostra, em sequência, as estruturas de um arquivo de estruturas múltiplas

Menu Analyze

Minimize	Minimiza a estrutura atual
Single point	Calcula a energia da estrutura atual
Mopac	Roda o programa de química quântica MOPAC
Ampac	Roda o programa de química quântica AMPAC
GMMX	Roda o programa de busca conformacional GMMX
Gaussian	Roda o programa de química quântica <i>ab initio</i> Gaussian
Orbitals	Roda o programa Orbdraw para visualizar os orbitais moleculares e as densidades eletrônicas
Vibrations	Roda o programa Vibrator para visualização dos modos vibracionais
Dynam	Simulação de dinâmica molecular
Dock	Busca das energias de interação mais baixas entre duas estruturas através da anelação simulada
Batch	Lê um arquivo de estruturas múltiplo e minimiza todas estruturas
Rot_E	Avalia a barreira de energia rotacional obtida por rotor rígido
Dihedral Driver	Avalia a barreira de energia rotacional obtida por busca sequencial com minimização
Surface Area	Calcula a área da superfície da molécula
Volume	Calcula o volume da molécula

Menu Substr

Read	Lê um arquivo de estrutura e rotula a estrutura como substrutura
Create	Rotula a estrutura selecionada como substrutura
Move	Move a substrutura selecionada
Connect	Liga duas estruturas
Erase	Apaga a substrutura selecionada
Hide	Oculto da tela a substrutura selecionada
Don't Minimize	Marca a substrutura selecionada e esta não será minimizada nos cálculos de mecânica molecular

Menu Mark

H Bonds	Marca as ligações de hidrogênio
Pi atoms	Marca os átomos pi
Metal Coord	Estabelece a soma de elétrons, carga e coordenação de átomos metálicos
TS_BondOrders	Estabelece as ordens de ligação para ligações de estados de transição
Fix Atoms	Fixa átomos para não moverem durante a minimização
Fix Distance	Fixa uma distância entre quaisquer dois átomos- acima de 10 pares
Fix Torsions	Fixa ângulos diedro
Resert	Apaga qualquer uma das marcações acima e também subestrutura associada

Menu Options

Printout	Estabelece a quantidade de saída no arquivo de saída, PCMOD.OUT
Dielc	Apaga a constante dielétrica
DPDP	Troca entre os cálculos dipolo-dipolo e os eletrostáticos
Minimizer	Estabelece opções para a minimização
MMX_Pi Calc	Estabelece opções para cálculos pi
Standard Constants	Força o uso do conjunto de dados padrão (default)
Added Constants	Permite o uso de constantes adicionais armazenadas em um arquivo
Stereo	Muda a direção de rotação do mostrador estéreo
Pluto	Estabelece opções para a visualização Pluto
VDW surface	Estabelece opções para a visualização VDW
Dot surface	Estabelece opções para a visualização de superfície de pontos

Menu Help

About	Versão corrente do PCMODEL
--------------	----------------------------

SUMÁRIO RÁPIDO DO MENU TOOLS

Select	Seleciona átomos
Draw	Desenha um esqueleto de carbonos ou no plano da tela ou no plano do primeiro átomo selecionado
Build	Gera uma estrutura 3-D pela substituição de hidrogênios selecionados por grupos metila. Iniciando do etano, qualquer hidrogênio selecionado será substituído por metila
Update	Atualiza a estrutura e redesenha a tela
H/AD	Adiciona e deleta hidrogênios e pares de elétrons livres
Add_B	Aumenta a ordem de ligação da ligação selecionada
In	Empurra um átomo para dentro do plano da tela
Out	Puxa um átomo para fora do plano da tela

Del	Deleta um átomo ou ligação
Move	Move um átomo. Selecione Move, selecione o átomo e selecione a nova posição.
RotB	Roda a ligação central de quatro átomos selecionados
Query	Pergunta distâncias, ângulos e diedros selecionados. Primeiro selecione Query, então selecione 2, 3 ou 4 átomos seguidos de um espaço branco na janela de desenho. As respostas são removidas pela seleção do botão Update duas vezes.
PT	Caixa de diálogo para escolher tipos de átomos
Metals	Caixa de diálogo para escolher tipos de metal
Rings	Caixa de diálogo para ler sistemas cíclicos selecionados
AA	Caixa de diálogo para ler (e conectar) aminoácidos
Su	Caixa de diálogo para ler (e conectar) açúcares
Nu	Caixa de diálogo para ler nucleosídeos
Cancel	Apaga a caixa de diálogo Tools. A caixa de diálogo pode ser recuperada usando a opção Draw do menu Edit.

Thais Horta Álvares da Silva

thais@farmacia.ufmg.br

O trabalho em laboratórios de Química Medicinal requer cuidado e uso de boas práticas de laboratório. O manuseio de instrumentos eletrônicos, a utilização de calor, o uso de vidrarias e de solventes não representam problemas especiais, desde que sejam seguidas, de forma cuidadosa, as instruções do supervisor.

Este documento foi supervisionado pelo Prof. Thais Horta Álvares da Silva (thais@farmacia.ufmg.br) que informou sobre a inexistência de riscos específicos na realização deste exercício (e.g., toxicidade, inflamabilidade, riscos de explosão, etc.), fora aqueles comuns a execução de toda e qualquer prática em laboratórios de Química Medicinal.

Se seu exercício ou prática envolver qualquer risco específico, favor informar ao Editor.

EXERCISE III.3

MOLECULAR MODELING WITH THE AID OF A COMPUTER

Thais Horta Álvares da Silva

Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 30180-112, Brasil

E-mail: thais@farmacia.ufmg.br

INTRODUCTION

Models are simple representations of real objects and physical phenomena. Modeling comprises building and manipulation of models with the objective of acquiring a more thorough comprehension of the represented entities. Molecular modeling involves the construction, manipulation, and representation of realistic molecular structures and the calculation of physicochemical properties. Computational modeling takes advantage of theoretical chemistry as a mathematical instrument and computational graphics as a valuable tool in handling models. Nowadays, molecular modeling systems are equipped with powerful tools for the construction, visualization, analysis, and storage of molecular models to facilitate the interpretation of the relationships between structure and biological activity.

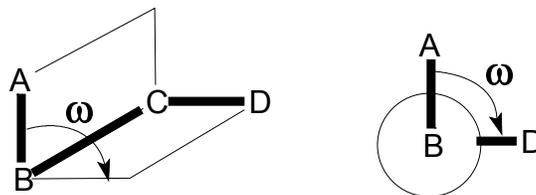
Molecular modeling can be applied to the development of drugs using the indirect or direct approach. The former is useful when the receptor structure is not available and aims to obtain electronic and steric parameters to study structure–biological activity relationships, whereas the direct approach is used when the three-dimensional structure of the target molecule is known and it focuses on the attempt to understand interactions of the ligand-receptor complex. Both approaches aim to optimize the docking of the molecule with the receptor. Molecular modeling and its graphical representations make possible the exploration of three-dimensional aspects of molecular recognition, the formulation of hypotheses concerning the drug development, and proposals of new ligands to be synthesized in a more advanced stage.

The goals of computer-assisted drug design are to calculate properties for individual molecules (including a complete description of the geometry of stable conformations and their energies, charges, atomic interactions, electrostatic potentials, orbitals, heats of formation, pK_a values, partition coefficients, dipole moments); calculate the properties and energies of associated molecules (to describe the interactions between molecules, e.g., solvation and drug–receptor interaction); exhibit, superimpose, and compare geometric and electronic molecular models; find and exhibit quantitative and qualitative relationships between molecular representations and biological activity; manipulate and manage biological and chemical databases.

Molecular modeling applied to drug development has pharmacophore discovery as one of its objectives. A pharmacophore can be defined as the minimum collection of atoms adequately positioned in space to produce a biological response. This definition has been refined to include three-dimensional and topographic restrictions.

The knowledge about specific stereochemistry of enzyme active sites and some receptor sites justifies the conformational study of drugs, which can interact with these sites. The drug–receptor interaction produces a conformational change that is ultimately observed as the pharmacological response. A receptor site can only bind to a single conformation from many possible conformations. This pharmacophoric conformation has all the atoms of the drug correctly positioned in space to fit the receptor-binding site. Molecules adopting a conformation capable of binding to the receptor can act as either agonists or as antagonists. The former mimic the action of receptor's normal substrate, while the latter bind to the receptor without being able to produce a biological response.

Conformational isomerism is defined as the non-identical spatial arrangement of the atoms in a molecule. It is the result of rotation through one or more single bonds. A torsion angle requires four atoms (A, B, C, and D) to describe a conformation. The torsion angle ω is defined as the angle between two planes formed by these four atoms (ABC and BCD).

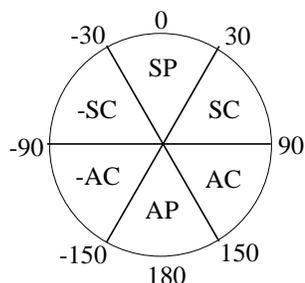


Scheme 1

An appropriate system of classification of conformations proposed by Klyne and Prelog is based on the torsion angle values (Scheme 2 and Table 1).

Table 1 Specification of torsion angle (Klyne–Prelog).

Designation	Torsion angle, ω
synperiplanar	-30° to $+30^\circ$
+synclinal	-30° to $+90^\circ$
+anticlinal	$+90^\circ$ to $+150^\circ$
antiperiplanar	$+150^\circ$ to -150°
-anticlinal	-150° to -90°
-synclinal	-90° to -30°



Scheme 2

The rotation about the C–C bond in the ethane carries to different conformations (Fig. 1). In the eclipsed conformation, the hydrogens are closest and, therefore, this is the less stable conformation. The staggered conformation, where the hydrogens are more distant, is the more stable conformation. The C–C bond rotational barrier to ethane is 2.8 kcal/mol. This barrier can be considered arising from antibonding interactions between the hydrogen atoms on opposite ends of the molecule. The H–H interactions are minimized when the conformation is staggered and are at maximum when the conformation is eclipsed. There are an infinite number of conformations between staggered and eclipsed ethane conformations. The *n*-butane conformations are shown in Fig. 2.

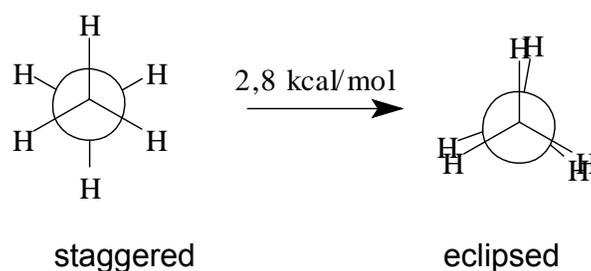


Fig. 1 Ethane conformations.

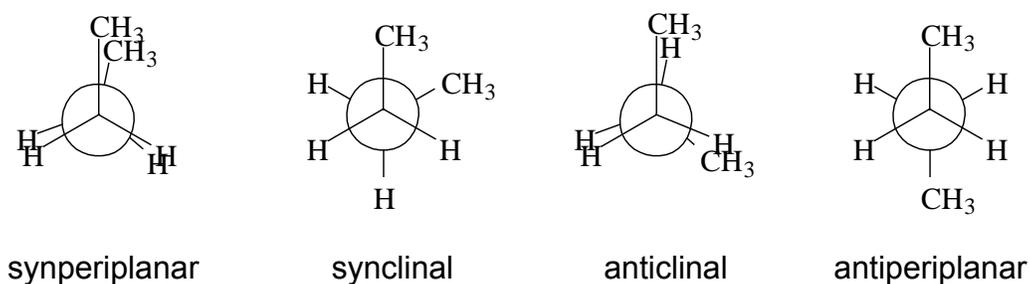


Fig. 2 *n*-Butane conformations.

Cyclic molecules also present conformational isomerism. The cyclopropane ring is plane. The cyclobutane and cyclopentane ring divert of the planarity. The cyclopentane main conformations are envelope and half-chair. The cyclohexane may exist in two conformations where each carbon has

tetrahedron bounds $109^{\circ}29'$ angles, chair and boat, and in another conformation with different angles, the twist-boat. The chair conformation is 6.9 kcal/mol more stable than the boat, because in the last the hydrogens are eclipsed, and two of them are pointed to one another with repulsive van der Waals interaction. The twist-boat minimizes these repulsive interactions and is 5.3 kcal/mol less stable than the chair conformation (Fig. 3). At room temperature, cyclohexane prefer the chair conformation in relation of the twist-boat in a 1000:1 ratio.

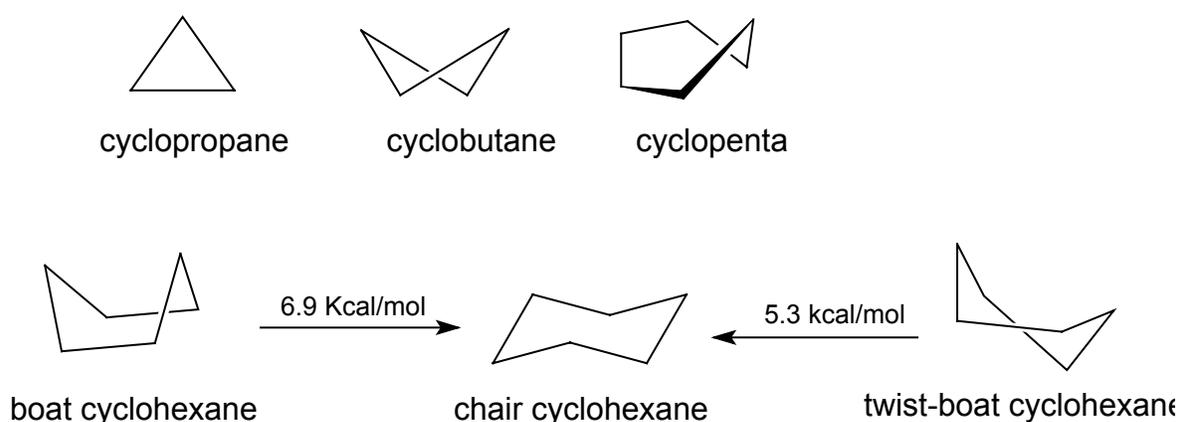


Fig. 3 Conformations of cyclopropane, cyclobutane, cyclopentane, and cyclohexane.

Calculation methods used in molecular modeling can be classic such as molecular mechanics (MM) or quantum such as ab initio or semi-empirical.

The MM calculations are also known as force field calculations. Molecular mechanics consider molecules as a collection of atoms that can be described by Newtonian forces, that is, they are regarded as a collection of particles joined by harmonic and elastic forces. These forces can be described based on potential energy functions among other structural characteristics such as bond length, bond angles, and non-binding interactions. The combination of these functions is the force field. The total potential energy (E_{tot}) or steric energy of a molecule can be simply represented by Westheimer's equation:

$$E_{\text{Tot}} = E_s + E_b + E_w + E_{\text{nb}} + E_E$$

E_s - energy of bond deformation (stretching or compression of a bond),

E_b - energy of bending (angular deformation),

E_w - torsional energy (w is the bond torsional angle),

E_{nb} - energy of non-bonding interactions, and

E_E - electrostatic energy.

$$E = \sum_l \frac{K_l (l - l_0)^2}{2}$$

K_l - bond stretching force constant

l - actual bond length

l_0 - unstrained bond length

$$E_b = \sum_{\theta} \frac{K_{\theta} (\theta - \theta_0)^2}{2}$$

K_{θ} - angle bending force constant

θ - actual angle

θ_0 - unstrained angle

$$E_w = \sum_w \frac{V_w (1 \pm \cos nw)}{2}$$

V_w - torsional force constant

w - torsional angle

n - periodicity of V_n

$$E_{\text{nb}} = \sum F_r \left\{ -\frac{2}{\alpha^6} + \exp[12(1 - \alpha)] \right\}$$

F_r - force constant

$$\alpha = \frac{r}{r_1^* + r_2^*}$$

r - nonbonded atoms distance

r_1^* and r_2^* - van der Waals distances

$$E_{\text{elect}} = Q_1 Q_2 / \epsilon r$$

Q_1 and Q_2 - atomic charges

ϵ - dielectric constant

r - interatomic distance

Fig. 4 Westheimer's equation and its components.

Each of these energy functions of the Westheimer's equation represents a energy difference between the real and a hypothetical molecule where all structural parameters such as bond lengths and angles are exactly in their ideal or natural values.

Some molecular mechanics (MM) advantages are: the quick and computational saving of time and the ease of understanding compared with quantum-mechanical methods. When a more accurate method is needed, MM optimized geometry can be used as starting point to quantum-mechanical molecular orbital calculations.

Some MM method disadvantages are that some interest classes of molecules are not currently parameterized and MM is not appropriate for determination of properties where electronic effects are predominant (e.g., orbital interactions, bond breaks, etc...)

The molecular geometry is determined on the basis of its atomic coordinates, and an initial geometry can be created from a set of entry data. The molecule can reach a minimum energy conformation and achieve geometry optimization by making minor changes in all parameters of the initial geometry and using gradient methods. Minimization is an interactive process that depends on the initial geometry, and it usually produces the nearest local minimum rather than the global minimum. Nonetheless, many problems in the study of structure–activity relationships require solutions that do not correspond to the global minimum of the molecule.

The process of conformational analysis represents a complete search on the potential energy surface (PES) of a molecule. Many algorithms were devised to generate structures of low energy and better explore the conformational space.

In conformational analysis using systematic search, each of the torsion angles of a molecule is rotated. If the angle increment is appropriately small, the procedure yields a complete image of the conformational space of any molecule. This method has proved to be reliable, but rather slow.

Conformational analysis using molecular dynamics is based on molecular mechanics. It is assumed that the atoms in the molecule interact with each other according to the rules of the force field employed and Newton's equations of movement. According to the initial atom coordinates of the system, new positions and velocities of the atoms can be calculated and at the time t the atoms will move to these new positions. Dynamics simulates the molecule in a bath with defined temperature and viscosity. A time step of 1 fs is generally used for heat transfer from the bath to the molecule, and a step of approximately 300 fs for energy equilibration is used. The number of repetition cycles of heating and equilibration is another important parameter in the simulation. The intention is to provide the molecule with energy enough to cross minor energy barriers to reach the global minimum conformation. This method mimics the way a molecule actually explores its conformational space and is particularly useful for large systems.

More flexible molecules with many degrees of freedom present a complex PES with an extraordinary number of minimum conformations. Random searching or Monte Carlo methods represent a valuable tool to explore the conformational space of these molecules. The process starts with an optimized structure and follows with random alterations to the conformation either by moving one atom relatively to the others or by rotating one or more torsion angles. The resulting new conformation is optimized using molecular mechanics and compared with the previously generated structures. It is only stored if it is unique, considering geometric and energetic criteria. Thus, the new conformation can be accepted and stored, or rejected if it is considered duplicated. Random search techniques are very suitable for conformational analysis of many types of molecules.

Physical methods can also be used to determine molecular conformation in different states. In solution, for instance, nuclear magnetic resonance (NMR) is the most useful. More detailed structure information emerges from X-ray crystallography of solids. Electronic diffraction and microwave spectroscopy provide thorough information about gas molecules. Apart from these, other resourceful methods are used together to study molecular conformation.

Nevertheless, the preferable conformations in gas and solid state are not necessarily the same as in solution.

Ab initio and semi-empirical quantum-mechanical methods are based on a set of laws known as quantum mechanics. The application of quantum mechanics to chemical problems is known as quantum chemistry. To describe the state of a system in quantum mechanics, the existence of a function of coordinates called wave function, or state function Ψ , was postulated, that is the solution of Schrödinger's equation (Fig. 5). The wave function contains all possible information about the system that it describes and, from it, we can calculate all the electronic properties of the molecule.

$$H_{\psi} = E_{\psi}$$

Fig. 5 Schrödinger's equation.

Ab initio quantum-mechanical methods are that where Schrödinger's equation is solved with more approximation. At the semi-empirical quantum-mechanical methods, some integrals used to solve Schrödinger's equation are substituted by empirical parameters that fit as closely as possible to experimental data. The semi-empirical methods were created in order to reduce the high cost of computer time. They are applied to medium molecular systems.

This chapter describes the conformational analyses of acetylcholine and muscarine using the systematic search method, and the superimposition of their preferred conformations using the PCMODEL 7.0 software. As a supplemental exercise, we also have students match these conformations with the proposed structure of the muscarinic acetylcholine receptor.

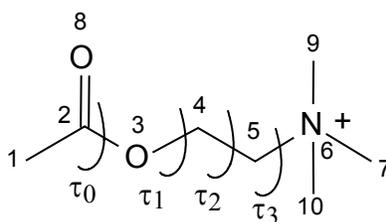
The force field used in PCMODEL is called MMX, and it is derived from the MM2 force field of N. L. Allinger. The current version of MMX recognizes nearly 60 different atom types including radicals, anions, cations, transition metals, and transition-state atoms, some of which are not handled in MM2.

There are several ways of accessing a chemical structure on the computer. Drawing it on the screen using the program drawing tools and the libraries

available (PCMODEL displays ring, amino acid, sugar, and nucleotide libraries), reading a file saved in another program that the actual program reads (PCMODEL opens MMX, MM3, PDB, MOPAC, ALCHEMY, SYBYL, X-RAY, MDL_MOL, MACROMODEL, GAUSSIAN, JAGUAR, CAMBRIDGE STRUCTURE DATA, GAMESS, and CHEM-3D files) or searching on structure databases on the Internet (the file copy must be saved on one of those formats that PCMODEL reads).

Acetylcholine is a flexible molecule with four torsional angles (τ_0 , τ_1 , τ_2 , and τ_3) that can be rotated (Scheme 1). Among these angles, τ_1 and τ_2 determine the major conformational changes in the molecule. Nonetheless, it is τ_2 (O3, C4, C5, N6) that determines the relative position between the two atoms (O3 and N6) that bind to the muscarinic cholinergic receptor. As such, we have students set all τ angles to 180° initially, then vary only τ_2 .

In the procedure, the torsional angle τ_2 is rotated by 10° increments using the “*dihedral driver*” option in the program. In the “*dihedral driver*”, one to four torsional angles can be marked and rotated by steps with determined values. For each rotation, all marked atoms are kept rigid and all other degrees of freedom of the molecule are totally flexible to permit the geometry optimization. The geometries obtained are stored in a multiple structure file, and the PES graph with the data output (torsional angle and steric energy) is plotted. Based on the analysis of the PES, it is possible to identify the geometries according to a minimum of energy (each geometry corresponds to a τ_2 angle). Minimum-energy geometries are located in the multiple structure file produced by *dihedral driver*. These are used as the starting point for complete minimization and acquisition of acetylcholine conformers. Analysis of these conformers (measurements of distance and dihedral angle) permits comparison with literature data.



τ_0 - (C1-C2-O3-C4) τ_1 - (C2-O3-C4-C5) τ_2 - (O3-C4-C5-N6) τ_3 - (C4-C5-N6-C7)

Fig. 6 Torsional angles of acetylcholine molecule.

PROCEDURES

The PCMODEL screen is a 2D plane. The first point to be drawn is the 0 of Z-axis, and the screen is the XY plane. Use in and out tools to move atoms back and forth along Z-axis and just left-click with the mouse cursor to select a menu option. The right mouse button rotates the molecule, and it is always activated. The molecule rotates along the y-axis by right-click-dragging the mouse left and right in the workspace. It rotates along the x-axis by right-click-dragging up and down.

(A) Drawing the structure of acetylcholine and visualizing

- (1) Open PCMODEL 7.0 by clicking on the icon in the initial WindowsTM screen.
- (2) Select BUILD button on the TOOLS menu with the mouse (a dotted line indicates that you are in Draw mode). The structure of ethane appears.
- (3) Move the cursor into one of the hydrogens and then left-click. A methyl group substitutes the hydrogen.
- (4) Repeat the operation to produce a 7-carbon chain.
- (5) Repeat the operation by selecting both hydrogens on C6.
- (6) Select H/AD button on the TOOLS menu. The hydrogens are deleted.
- (7) Select DRAW button on the TOOLS menu. Left-click on C2 and left-click at any point on the workspace. A line representing a bond appears. Left-click on C2 again. This increases the bond order from single to double.
- (8) **Changing C atom to other atom types.** Select PT (periodic table) button on the TOOLS menu.

This command calls up the PERIODIC TABLE dialog box. Choose oxygen and left-click on C3 and C8. After that, choose N⁺ (positive nitrogen) and left-click on C6.

(9) Adding hydrogens and non-bonding electron pairs. Click on H/AD on the TOOLS menu.

(10) Optimizing the isolated molecule (energy minimization). Select MMX force field on the FORCE FIELD menu and MINIMIZE on the ANALYSE menu. The OUTPUT dialog box opens.

It shows information about steric energy (Kcal/mol), heat of formation (Kcal/mol) and dipole moment.

(11) Saving the structure. Select SAVE on the FILE menu. The SAVE AS dialog box opens. Select the folder where you want to save the file, write its name and select the format. Available formats: PCMODEL format (PCM), MMX, MM3, MOPAC, ALCHEMY, SYBYL, MACROMODEL, CHEM-3D, PDB, JAGUAR, GAUSSIAN e GAMES. Finally, select SAVE.

(12) Using different molecular renderings.

Select HIDE HYDROGENS on the EDIT menu.

Select BALL STICK on the VIEW menu.

Select again HIDE HYDROGENS on the EDIT menu.

Select BONDS ONLY on the LABELS menu.

Press and hold down the right button while you move the mouse (the molecule rotates).

Select PLUTO on the VIEW menu.

Select TUBULAR BONDS on the VIEW menu.

Select CPK on the VIEW menu.

Select DOT SURFACE on the VIEW menu.

(13) Exiting. Select EXIT on the FILE menu.

(B) Acetylcholine conformational analysis

At the beginning of the conformational analysis of acetylcholine, τ_0 , τ_1 , τ_2 , and τ_3 angles are rotated to values reported and based on steric factors. The angle τ_0 is

180° due to the partial double bond of the C2-O3 bond. The angles τ_1 , τ_2 , and τ_3 are 180° and correspond to a distended chain. This is the initial and standard conformation for all students to start their conformational analysis.

(1) Open PCMODEL.

(2) Open acetylcholine file by choosing OPEN on the FILE menu.

(3) Choose SEL-ATM on the TOOLS menu and mark C1, C2, O3 and C4 (τ_0). Select ROT-B option on the TOOLS menu. A dialog box will appear displaying the current value in degrees of τ_0 . Drag the scroll box until a value next to 180° or -180°. Repeat the procedure for τ_1 , τ_2 , and τ_3 .

(4) Choose SEL-ATM on the TOOLS menu and mark O3, C4, C5 e N6 (τ_2).

(5) Select DIHEDRAL DRIVER on the ANALYSE menu. A dialog box will appear displaying the current dihedral angle value. The required values must be entered.

Start angle: X (X is an integer number multiple of 5 and nearest the initial angle).

Final angle: X + 350 (to complete a 360° rotation along C4-C5 bond).

Step: 10.

And select OK.

(6) A new dialog box will appear for entering the filename for the output structures. This is a multiple structure file where the coordinates for each step are saved (for instance, ACHDDxx.PCM). The filename must be different from the structure name. Click on SAVE to begin the calculation.

(7) In the end, a window with a graphical result (DIHEDRAL MAP) will appear. This contour map represents the surface of potential energy (SEP) that relates steric energy with τ_2 angle. These calculations produce 36 conformations of different energy.

(8) Select PRINT on the file menu.

(9) Find minimum energy points in the SEP, and fill in Table 2 with the values of τ_2 and steric energy (SE).

Table 2 Minimum energy conformations of Ach.

Conformation	τ_2	SE (kcal/mol)	Geometry classification (O3 and N6)
A			
B			
C			

(10) Find maximum energy points in the SEP and fill in Table 3.

(11) Classify the conformations as synperiplanar (SP), *synclinal* (SC), anticlinal (AC), or antiperiplanar (AP) and include this information on Tables 2 and 3.

Table 3 Maximum energy conformations of Ach.

Conformatio n	τ_2	SE (kcal/mol)	Geometry classification (O3 and N6)
1			
2			
3			

(C) Displaying minimum conformations and measuring atomic distances, angles, and dihedral angles.

(1) To display minimum energy conformations on screen, it is necessary to search them on the dihedral driver file.

(a) Select OPEN on the FILE menu.

(b) Select ACHDDxx.PCM on the dialog box.

(c) A STRUCTURE LIST dialog box will appear. This lists all conformations (#dihd 0 to #dihd 35) with their SE values. Below is a table for the molecule in study.

#dihd	SE	τ_2
#dihd 0	6,848	X
#dihd 1	6,878	X+10
#dihd 2	8,548	X+20

#dihd 3	.	X+30
.	.	.
.	.	.
#dihd 35	.	X+350

(d) Select the desired conformation (conformations A, B, and C, Table 2) and click on OK. The selected conformation appears on the workspace (to find minimum conformations, just compare minimum SE values of each conformation, it will be a minimum if the value is smaller than the previous and the next conformations).

(e) De-select dihedral driver atoms by choosing RESET on the MARK menu.

(f) Optimize the structure by choosing MINIMIZE on the ANALYSE menu.

(2) Select QUERY on the TOOLS menu and select 2, 3, or 4 atoms (2 atoms to measure distances, 3 atoms to measure angles and 4 atoms for dihedral angles) and any point on the workspace. The measures appear on the screen.

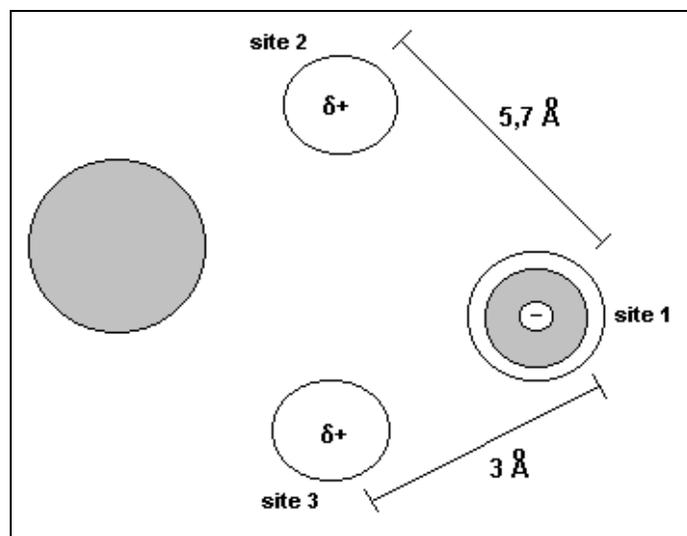
(3) Fill in Table 4 for each minimum conformation of acetylcholine.

Table 4 Acetylcholine minimum energy conformations after minimization.

Conformation	#dihd	τ_2	O3-N6 (A)	C1-N6(A)	N6-O8(A)	SE
A						
B						
C						

(4) Draw **Newman projections** of τ_2 for each minimum conformation.

- 5) For the crystallographic structure of acetylcholine the distance between O3 and N7 is 3,26 Å (CANEPA *et al.*, 1966) (10). The distance found applying the PCILO semi-empirical method was 3,02 Å (PULLMAN *et al.*, 1971) (11). Is the result of your analysis in agreement with the literature data? Discuss.
- 6) According to CHOTIA (1970) (7) the interaction of Ach with muscarinic receptor occurs when τ_2 angle adopts the synclinal conformation. Based on your results, do you think this conformation is energetically favorable? Discuss.
- 7) PARTINGTON *et al.* (1972) (12) concluded from their NMR study that 100 % of Ach molecules in solution adopt synclinal conformation for τ_2 which is the same as the crystalline conformation (CANEPA *et al.*, 1966) (10). Discuss.
- 8) BECKETT *et al.* (1961) (13) proposed that the muscarinic receptor (Scheme 3) contained an anionic-binding site (site 1) that accommodates the quaternary ammonium group of muscarine approximately 3.0 Å from a hydrogen-bonding site (site 3) for the oxygen of muscarine. A distance of 5.7 Å separates site 1 from another hydrogen-bonding site (site 2). Furthermore, there is a large flat area for van der Waals interaction.
 - (a) Draw the structures of acetylcholine and muscarine interacting with the proposed muscarinic receptor.
 - (b) According to the conformational analysis performed and the measured values for the muscarine and acetylcholine, what are the conformations most likely to interact with the proposed receptor?



Scheme 3

CONCLUSION

The proposed computational procedure represents an opportunity for the pharmaceutical chemistry student to have the very first contact with molecular modeling software. He/she draws biological active molecules, analyzes the conformations, compares the conformations of different molecules, matches the preferred conformations of the Ach with the proposed structure of the acetylcholine receptor, and compares the results with literature data.

REFERENCES

- FRÜHBEIS, H.; KLEIN, R.; WALLMEIER, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, v. 26, p. 403-418, **1987**.
- BECKETT, A.H.; HARPER, N.J.; LESSER, E.; CLINTHEROW, J.W. *Nature* **1961**, 189, 671-673.
- BOYD, D. B.; LIPKOWITZ, K. B. *J. Chem. Educ.*, v. 59, n. 4, p. 269-274, **1982**.
- CANEPA, F. G. ; PAULING, P.; SÖRUM, H. *Nature*, v. 210, p. 907-909, **1966**.
- CHOTIA, C.H. *Nature* **1970**, 225, 36-38.

COHEN, N. C. , BLANEY, J. M.; HUMBLET, C.; GUND, P.; BARRY, D. C. *J. Med. Chem.*, v. 33, n.3, p. 883-894, **1990**.

COX, P. J. *J. Chem. Educ.*, v. 59, n. 4, p. 275-277, **1982**.

DOWEYKO, A. M. *J. Med. Chem.*, v. 37, p. 1769-1778, **1994**.

FERGUSON, D. M.; RABER, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* , v. 111, p. 4371-4378, **1989**.

HÖLTJE, H. D.; FOLKERS, G. *Molecular Modeling- Basic principles and applications*. NewYork: VHC, **1996**. 194 p.

KLYNE, W.; PRELOG, V. *Experientia* **1960**, 16, 521-523.

LATTIN, D.L.; FIFER, K. Drugs Affecting Cholinergic Neurotransmission. In *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*; Willians, D.A., Thomas, L.L., Eds.; 5th ed.; Lippincott: Philadelphia, 2002; pp 264-291.

LEVINE, I. R. *Quantum Chemistry*. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 4. Ed., **1991**. 629 p.

PCMODEL 1993 Serena Software - First edition. The force field used in PCMODEL is called MMX and is derived from MM2 (QCPE-395,**1977**) force field of N. L. Allinger, with the pi-VESCF routines taken from MMP1 (QPCE-318), also by N. L. Allinger.

PARTINGTON *et al.* *Molecular Pharmacology*, v.8, p. 269-270, **1972**.

PATRICK, G.L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 2nd ed.; OUP: Oxford, 2001.

PULLMAN, B. *et al.*, *Mol. Pharmacol.* V. 7, p. 397-405, **1971**.

QUICK SUMMARY OF PCMODEL MENU BAR FUNCTIONS

Menu File

Open	Read a file from disk
Save	Save a file to disk
Save Graphic	Save a graphic image to disk
Print	Print the current structure and energy windows
Exit	Exit from PCMODEL

Menu Edit

Draw	Recover the TOOLS menu
Erase	Erase all structures
Structure Name	Edit or enter name of current structure

Hide Hydrogens	Hide the hydrogens without erase them
Epimer	Epimerize the selected atom by interchanging the two selected attachments
Enantiomer	Reflect the structure from a selected axis
Remove LP	Remove free pairs of electrons
Copy_To_Clipboard	Copy an image to of the structure window to clipboard
Orient_XY	Orient three selected atoms at XY (XZ or YZ) plane, with the first at origin, the second at axis, and the third at plane
Orient_XZ	
<u>Menu View</u>	
Control Panel	Bring up a dialog box to scale, translate, and rotate structure in the structure window
Labels	Bring up a dialog box to change the structure labels
Mono/Stereo	Toggle between mono and stereo display
Stick Figure	Display all structures as stick figures
Ball Stick	Display all structures as ball stick figures
Pluto	Display all structures as pluto figures
Tubular Bonds	Display all structures in tubular bonds
CPK Surface	Display all or selected structures as CPK surface
Dot Surface	Display all or selected structures as dot surface
Ribbon	Display a ribbon diagram of peptide or nucleic acid backbone
Compare	Compare different structures
Dihedral Map	Display the results of dihedral driver calculations
<u>Menu Analyze</u>	
Minimize	Minimize the current structure(s)
Single Point	Calculate the energy of the current structure(s)
Mopac	Run MOPAC calculation
Ampac	Run AMPAC calculation
GMMX	Run GMMX conformational search calculation
Gaussian	Run ab initio Gaussian calculation
Orbitals	Run Orbdraw calculation to visualize molecular orbitals as electronic densities
Vibrations	Run a vibrator to visualize the vibrational modes
Dynam	Molecular dynamics simulation
Dock	Simulated annealing search of lowest energy interactions between two structures
Batch	Read a multiple structure file and minimize all of them
Rot_E	Rigid rotor evaluation of rotational energy barrier
Dihedral Driver	Grid search with minimization evaluation of rotational energy barrier
Surface Area	Calculate surface area of molecule

Volume	Calculate volume of molecule
<u>Menu Substr</u>	
Read	Read a structure file and label the structure as a substructure
Create	Label a selected structure as a substructure
Move	Move a selected substructure
Connect	Connect two structures
Erase	Erase a selected substructure
Hide	Hide from display a selected substructure
Don't Minimize	Mark the selected substructure so that it will not be minimized in a molecular mechanics calculations
<u>Menu Mark</u>	
H Bonds	H bonds
Pi Atoms	Pi atoms
Metal Coord	Set electron count, charge, and coordination of metal atoms
TS_BondOrders	Set the bond orders for transition-state bonds
Fix Atoms	Fix atoms to not move during minimization
Fix Distance	Fix a distance between any two atoms—up to 10 pairs
Fix Torsions	Fix dihedral angle
Reset	Reset any above and also substructure membership
<u>Menu Options</u>	
Printout	Set the amount of output in the output file
Dielc	Reset the dielectric constant
DPDP	Change between dipole-dipole and electrostatic calculations
Minimizer	Set options to minimize
MMX_Pi Calc	Set options to pi calculations
Standard Constants	Force the use of default data set
Added Constants	Allow the use of additional constants stored in a file
Stereo	Change the direction of rotation of stereo display
Pluto	Set options to Pluto
VDW Surface	Set options to VDW
Dot Surface	Set options to dot surface
<u>Menu Help</u>	
About	Current version of PCMODEL

QUICK SUMMARY OF TOOLS MENU

Select	Select atoms
Draw	Draw a carbon skeleton in either the plane of the screen or the plane of the first selected atom

Build	Generate 3D structure by replacing selected hydrogen with methyl group
Update	Update the structure and redraw the screen
H/AD	Add and delete hydrogens and lone pairs
Add_B	Increment the bond order of selected bond
In	Push an atom into plane of the screen
Out	Pull an atom out of plane of the screen
Del	Delete an atom or bond
Move	Move an atom
RotB	Rotate a bond
Query	Query select distances, angle, or dihedral
PT	Dialog box to choose an atom
Metals	Dialog box to choose metal atom type
Rings	Dialog box to read (and connect) ring systems
AA	Dialog box to read (and connect) amino acids
Su	Dialog box to read (and connect) sugars
Nu	Dialog box to read nucleosides
Cancel	Dismiss the dialog box

Thais Horta Álvares da Silva
thais@farmacia.ufmg.br

High standards in safety measures should be maintained in all work carried out in Medicinal Chemistry Laboratories. The handling of electrical instruments, heating elements, glass materials, dissolvents and other inflammable materials does not present a problem if the supervisor's instructions are carefully followed.

This document has been supervised by Prof. Thais Horta Álvares da Silva (thais@farmacia.ufmg.br) who has informed that no special risk (regarding toxicity, inflammability, explosions), outside of the standard risks pertaining to a Medicinal Chemistry laboratory exist when performing this exercise.

If your exercise involves any "special" risks, please inform the editor.