

ESTUDO SEMI-EMPÍRICO DE ÁCIDOS HIDROXÂMICOS: ÁCIDO FORMOIDROXÂMICO E DERIVADOS DO ALELOQUÍMICO DIMBOA

Carlos Mauricio R. Sant'Anna*

Departamento de Química, ICE, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23851-970 Seropédica - RJ

Departamento de Fármacos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, CCS, 21949-910 Rio de Janeiro - RJ

Vivian Passos de Souza

Departamento de Química, ICE, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23851-970 Seropédica - RJ

Recebido em 22/3/00; aceito em 5/2/01

A SEMIEMPIRICAL STUDY ON HYDROXAMIC ACIDS: FORMOHYDROXAMIC ACID AND DERIVATIVES OF THE ALLELOCHEMICAL DIMBOA. Open chain hydroxamic acid (Hx) can exist as *Z* and *E* diastereomers of two tautomers, hydroxamic acid and hydroximic acid. The conformational stability of the formohydroxamic acid isomers evaluated by PM3 compared better to *ab initio* results from the literature than AM1 results. Structural data of the cyclic Hx 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-one (DIMBOA) obtained by both semiempirical methods compared well to *ab initio* results. pK_a data from the literature for derivatives of the aldolic isomer of DIMBOA were compared to the stability of the anions resulting from the loss of protons of their phenol and hydroxamic acid groups, determined as the difference in heat of formation between anionic and neutral forms, calculated by AM1 and PM3 methods. Good correlations between theoretical and experimental data were obtained for both semiempirical methods.

Keywords: semiempirical; hydroxamic acids; acidity.

INTRODUÇÃO

Todos os anos a produção mundial de grãos sofre grandes perdas, tanto em quantidade quanto em qualidade, devido à infestação por pragas, principalmente insetos. Além do custo elevado, o uso em larga escala de inseticidas sintéticos para o controle dos insetos tem resultado na perda de eficiência devido ao desenvolvimento de resistência pelos insetos e em efeitos danosos sobre o meio ambiente. A investigação dos mecanismos naturais de defesa das plantas contra organismos agressores é uma possível fonte de alternativas para o desenvolvimento de novas classes de inseticidas. As plantas produzem metabólitos secundários, chamados substâncias alelopáticas ou aleloquímicos, que atuam na sua defesa contra herbívoros, patógenos ou mesmo contra plantas competidoras¹.

Estudos têm demonstrado que ácidos hidroxâmicos (Hx) cíclicos do tipo 4-hidróxi-1,4-benzoxazin-3-onas (benzoxazinóides), presentes em cereais na forma de 2- β -*O*-D-glicosídeos, atuam sobre insetos, fungos e bactérias²⁻⁵. Os glicosídeos são biologicamente inativos, mas a ruptura das células vegetais libera β -glicosidases que degradam os glicosídeos enzimaticamente, liberando as agliconas tóxicas⁶.

O Hx predominante no trigo e no milho é a 2,4-diidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona (DIMBOA, **1**, Figura 1), isolada sob a forma do glicosídeo (2*R*)-2- β -glicopiranosiloxi-4-hidroxi-7-metoxi-2*H*-1,4-benzoxazin-3-ona⁶. Em solução aquosa, **1** está em equilíbrio com a forma aldólica **2** (Figura 1)⁷. A participação desse Hx na defesa do trigo contra insetos é sugerida pelo aumento de seus níveis na planta após infestação por afídios^{3,5} e pelo seu efeito anti-alimentar em insetos alimentados com dietas artificiais contendo **1**⁸. Existem várias indicações quanto aos possíveis sítios bioquímicos de ação dos ácidos hidroxâmicos. Foi demonstrado que **1** inibe enzimas envolvidas na síntese de ATP⁹, a acilcolinaesterase (acilcolina hidrolase)¹⁰, a enzima destoxicante UDP-glicose transferase¹¹

e as proteinases papaina¹² e α -quimotripsina¹³. Apesar das duas últimas não serem enzimas de insetos, os resultados sugerem que enzimas digestivas de insetos podem estar entre os sítios de ação dos Hx.

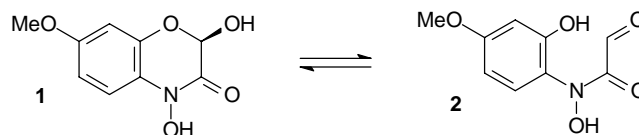


Figura 1. 2,4-diidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona (DIMBOA) (**1**) e sua forma aldólica (**2**).

Os métodos semi-empíricos têm características interessantes para o estudo de mecanismos enzimáticos. Diferente dos métodos de campo empírico, a metodologia semi-empírica pode avaliar a formação e a quebra de ligações covalentes, por considerar explicitamente os elétrons através da resolução da equação de Schrödinger¹⁴. Em comparação com os métodos *ab initio*, simplificações introduzidas nos métodos semi-empíricos tornam viável o cálculo em computadores de baixo custo de sistemas moleculares com várias centenas de orbitais¹⁵, que podem abranger o substrato e os aminoácidos que compõem o sítio ativo e suas vizinhanças imediatas. Estas simplificações incluem a consideração apenas dos elétrons de valência, a restrição do conjunto de bases à representação mínima e a negligência, em graus variáveis, do recobrimento dos orbitais atômicos localizados em átomos diferentes^{14,15}. Nos métodos desenvolvidos por Dewar e colaboradores, parâmetros empíricos foram introduzidos na busca da melhor correlação com dados experimentais, que incluem, por exemplo, geometrias de equilíbrio, calores de formação, potenciais de ionização e momentos de dipolo¹⁵. Resultados satisfatórios foram obtidos para várias propriedades, mas deve-se ter em mente que os resultados são melhores quanto mais relacionados são os dados experimentais com aqueles que se deseja calcular¹⁵.

*e-mail: santanna@ufrj.br

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho é avaliar o desempenho dos métodos semi-empíricos na modelagem de moléculas que contêm o grupamento ácido hidroxâmico em comparação com cálculos *ab initio* e dados experimentais da literatura, visando fornecer subsídios para futuros estudos da interação de Hx com modelos de sistemas enzimáticos de insetos com a metodologia semi-empírica. Estudos com campos empíricos foram feitos para sistemas enzimáticos inibidos por inibidores do tipo Hx, mas os resultados limitam-se às etapas iniciais de interação¹⁶.

RESULTADOS

Avaliação dos métodos semi-empíricos para a produção de dados estruturais

Inicialmente, foi avaliado o desempenho dos métodos semi-empíricos AM1¹⁷ e PM3¹⁸ na modelagem de estruturas simples contendo a função ácido hidroxâmico. Os Hx de cadeia aberta podem existir como diastereoisômeros Z/E das formas tautoméricas ácido hidroxâmico e ácido hidroxímico¹⁹. A estabilidade relativa das estruturas **3a** a **3d** (Figura 2) foi avaliada com os métodos semi-empíricos para o ácido formoidroxâmico. Os ângulos diedros em destaque foram avaliados com incrementos de 30° entre -180° e 180°.

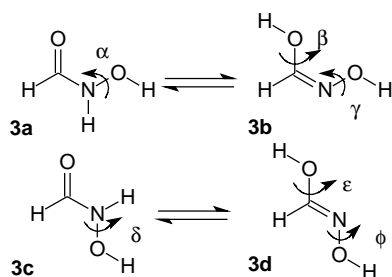


Figura 2. **3a**, ácido formoidroxâmico, isômero Z; **3b**, ácido formoidroxâmico, isômero Z; **3c**, ácido formoidroxâmico, isômero E; **3d**, ácido hidroxímico, isômero E.

A estrutura de menor energia pelo método PM3 é a conformação *anti*-clinal do ângulo δ (H-O-N-C) do estereoisômero *E* da forma ácido hidroxâmico (**3c ac**). Pelo método AM1, a estrutura mais estável é o estereoisômero *Z* da forma aldólica ácido hidroxímico, nas conformações *anti*-periplanar para o ângulo γ (H-O-N-C) e *sin*-periplanar para o ângulo β (H-O-C-N) (**3b ap,sp**). De forma geral, o desempenho do método PM3 é superior ao do método AM1: com exceção da estabilidade relativa das estruturas **3b ap,sp** e **3d ap,sp**, a ordem de estabilidade prevista pelo método PM3 está de acordo com resultados da literatura¹⁹ obtidos pela otimização da estrutura com o método *ab initio* MP2/6-31G(d), seguida do cálculo de energia de ponto único com um conjunto de bases maior, 6-311G(d,p) (Tabela 1).

A Tabela 2 compara os dados dos métodos semi-empírico PM3 e *ab initio* MP2/6-311G(d,p)//MP2/6-31G(d) para as distâncias de ligação, ângulos de ligação e ângulos diedros da estrutura mais estável encontrada¹⁹. Há, de modo geral, uma boa semelhança entre os valores calculados pelos dois métodos; as maiores diferenças são observadas para a distância N-H (9,80%), para o ângulo H-C-N (5,93%) e para o ângulo diedro H-N-C-O (17,89%).

A Tabela 3 compara os dados de distâncias e ângulos de ligação para o Hx cíclico **1**, obtidos pelo método *ab initio* HF/6-31G* e pelos métodos semi-empíricos AM1 e PM3. Ambos os métodos semi-empíricos reproduzem de forma razoável os resultados do cálculo *ab initio*. As maiores diferenças para as

Tabela 1. Estabilidade relativa calculada do ácido formoidroxâmico^a.

Isômero	AM1	PM3	MP2/6-311G(d,p)
3c ac	-48,16 ^b	-45,85 ^b	-1,534 . 10 ⁵ ° ^c
3a sc	0,85	1,33	0,31
3a ac	1,87	2,60	1,29
3b ap,sp	-2,84	3,47	1,31
3d ap,sp	1,34	2,41	5,10
3b ap,ap	2,35	6,06	8,54
3d ap,ap	7,51	6,16	9,69
3b sp,ap	2,59	10,31	10,02

^aEnergias e entalpias para todas as estruturas são relativas à estrutura **3c ac**, cujos valores de energia total e ΔH_f são apresentados; ^b ΔH_f , em kcal/mol; valores relativos em kcal/mol; ^cEnergia, em kcal/mol; valores relativos em kcal/mol²².

Tabela 2. Comparação dos parâmetros estruturais da estrutura, **3c ac**, encontrada pelos métodos MP2/6-31G(d), PM3 e AM1

Parâmetro ^{a,b}	MP2/6-31G(d) ²²	AM1	Diferença ^c	PM3	Diferença ^c
C-O	1,221	1,236	-0,015	1,213	0,008
C-N	1,388	1,404	-0,016	1,429	-0,041
N-O	1,420	1,325	0,095	1,437	-0,017
C-H	1,102	1,109	-0,007	1,101	0,001
N-H	1,102	1,012	0,090	0,994	-0,108
Média	-	-	0,045	-	0,035
O-C-N	122,96	120,29	2,67	116,75	6,21
C-N-O	113,36	116,36	-3,00	114,17	-0,81
H-C-N	111,89	114,79	-2,90	118,52	-6,63
H-N-O	110,20	112,71	-2,51	110,42	-0,22
H-O-N	103,06	105,73	-2,67	101,25	1,81
Média	-	-	2,75	-	3,14
O-C-N-O	156,80	159,3	-2,50	158,02	-1,22
H-C-N-O	-26,96	-25,49	-1,47	-26,16	-0,80
H-N-C-O	29,55	21,40	8,15	24,56	4,99
H-O-N-C	119,27	120,10	-0,83	118,52	0,75
Média	-	-	3,31	-	1,94

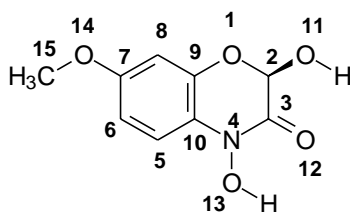
^aDistância de ligações em Å, ângulos e diedros em graus; ^bAs médias referem-se às diferenças, em módulo, para o conjunto de cada tipo de parâmetro (distância de ligação, ângulo de ligação e ângulo diedro); ^cParâmetro(*ab initio*) - Parâmetro(semi-empírico)

distâncias das ligações são observadas em C3-N4, 0,0884 Å (6,53%) e 0,0811 Å (5,99%) mais longas de acordo com os métodos PM3 e AM1, respectivamente, e N4-O13, 0,0888 Å (6,49%) mais longa pelo método PM3. O ângulo O1-C2-O11 é 7,70° (7,00%) maior de acordo com o método AM1 e 11,34° (10,31%) maior pelo método PM3 e o ângulo C3-N4-C10 é 6,97° (5,72%) maior de acordo com o método AM1 e 5,32° (4,37%) maior pelo método PM3.

Os dados de carga obtidas por ajuste ao potencial eletrostático são apresentados na Tabela 4. Diferenças consideráveis são observadas entre as cargas calculadas por ambos os métodos semi-empíricos e o método *ab initio*, mas o método PM3 produz, mesmo para os heteroátomos, resultados mais próximos aos obtidos com o método HF/6-31G*.

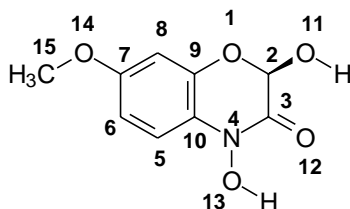
Estudo dos efeitos eletrônicos sobre pK_a de Hx pelos métodos semi-empíricos

Uma segunda avaliação do desempenho dos métodos semi-empíricos foi feita por comparação com dados experimentais²⁰ de acidez dos grupos ácido hidroxâmico (pK_{a1}) e fenol (pK_{a2}) de análogos de **2** com diferentes substituintes em C7. Os valores de pK_a se relacionam com o ΔG_r das reações de desprotonação de acordo com a conhecida relação:

Tabela 3. Comparação das estruturas obtidas pelos métodos HF/6-31G*, AM1 e PM3.

Parâmetro ^{a,b}	HF/6-31G*	AM1	Diferença ^c	PM3	Diferença ^c
O1-C2	1,408	1,432	-0,024	1,421	-0,013
C2-C3	1,530	1,533	-0,003	1,541	-0,011
C3-N4	1,354	1,436	-0,082	1,443	-0,089
N4-C10	1,416	1,442	-0,026	1,455	-0,039
C2-O11	1,354	1,390	-0,036	1,379	-0,025
C3-O12	1,195	1,235	-0,040	1,215	-0,020
N4-O13	1,369	1,339	0,030	1,457	0,088
C7-O14	1,359	1,379	-0,020	1,380	-0,021
C9-O1	1,356	1,384	-0,028	1,380	-0,024
O14-C15	1,408	1,424	-0,016	1,409	-0,001
H-O11	0,952	0,961	-0,009	0,951	0,001
H-O13	0,950	0,978	-0,028	0,949	0,001
Média	-	-	0,029	-	0,028
O1-C2-C3	107,51	111,69	-4,18	112,61	-5,10
O1-C2-O11	110,00	102,30	7,70	98,66	11,34
C2-C3-N4	112,79	115,07	-2,28	115,58	-2,79
C2-C3-O12	122,33	122,25	0,08	124,23	-1,90
C3-N4-C10	121,17	114,20	6,97	115,85	5,32
C3-N4-O13	117,02	113,90	3,12	114,25	2,77
C7-O14-C15	115,64	116,29	-0,65	116,65	-1,01
Média	-	-	3,57	-	4,32

^aDistância de ligações em Å, ângulos em graus.

Tabela 4. Comparação das cargas eletrostáticas obtidas pelos métodos HF/6-31G*, AM1 e PM3.

átomo ^a	HF/6-31G*	AM1	Diferença ^b	PM3	Diferença ^b
O1	-0,408	-0,258	-0,150	-0,274	-0,134
C2	0,613	0,061	0,552	0,150	0,463
C3	0,512	0,792	-0,280	0,774	-0,262
N4	-0,170	-0,494	0,324	-0,373	0,203
C5	-0,212	0,012	-0,224	-0,045	-0,167
C6	-0,296	-0,365	0,069	-0,278	-0,018
C7	0,410	0,407	0,003	0,377	0,033
C8	-0,451	-0,322	-0,129	-0,343	-0,108
C9	0,333	0,162	0,171	0,198	0,135
C10	0,056	0,083	-0,027	0,055	0,001
O11	-0,669	-0,458	0,211	-0,477	-0,192
O12	-0,557	-0,479	0,078	-0,518	-0,039
O13	-0,377	-0,255	-0,122	-0,260	-0,117
O14	-0,443	-0,355	-0,088	-0,381	-0,062
C15	0,187	0,036	0,151	0,271	-0,084
Média	-	-	0,172	-	0,135
		0,047		0,023	

^aCargas calculadas pelo ajuste ao potencial eletrostático; ^bParâmetro(ab initio) – Parâmetro(semi-empírico)

$$\Delta G_r = -RT \ln K_a = -2,303RT \log K_a \quad (1)$$

ou,

$$\Delta H_r - T\Delta S_r = 2,303RT \text{ p}K_a \quad (2)$$

Assumindo o equilíbrio de dissociação dos derivados HA de **2** no próton H^+ e no ânion A^- , quer seja pela perda do próton da hidroxila fenólica ou do grupo ácido hidroxâmico, temos que

$$\Delta H_r = \Delta H_f(A^-) + \Delta H_f(H^+) - \Delta H_f(HA) \quad (3)$$

Substituindo (3) em (2),

$$\Delta H_f(A^-) + \Delta H_f(H^+) - \Delta H_f(HA) - T\Delta S_r = 2,303RT \text{ p}K_a \quad (4)$$

ou,

$$\Delta H_f(A^-) - \Delta H_f(HA) = 2,303RT \text{ p}K_a + T\Delta S_r - \Delta H_f(H^+) \quad (5)$$

Se o termo $T\Delta S_r$ não for muito diferente para a série de ácidos HA estudados, a equação (5), que representa a diferença entre ΔH_f entre o ânion e a forma protonada em função do $\text{p}K_a$ do ácido HA, deve ser uma equação aproximadamente linear. As diferenças de ΔH_f calculado entre os ânions hidroxamato e as moléculas neutras dos análogos ($\Delta\Delta H_{f1}$) e entre os ânions fenolato e as moléculas neutras dos análogos ($\Delta\Delta H_{f2}$), foram comparadas, respectivamente, com os dados de $\text{p}K_{a1}$ e $\text{p}K_{a2}$, na Tabela 5.

Os gráficos das Figuras 3 e 4 mostram que o aumento da estabilidade relativa calculada dos ânions em relação às moléculas neutras acompanha o aumento da acidez, com uma correlação linear comparável para os métodos AM1 e PM3, no caso de $\Delta\Delta H_{f1}$ em função de $\text{p}K_{a1}$, e ligeiramente superior para o método PM3, no caso de $\Delta\Delta H_{f2}$ em função de $\text{p}K_{a2}$. Esta avaliação mostra que os métodos semi-empíricos são capazes de representar o efeito eletrônico relativo de diferentes substituintes sobre uma propriedade química experimental das benzoxazinonas.

METODOLOGIA

Todas as etapas foram realizadas em computadores Pentium II 333 Mhz, sob o sistema operacional Windows98. A construção das matrizes correspondentes às estruturas estudadas e o cálculo no nível *ab initio* 6-31G* foram feitos com o programa

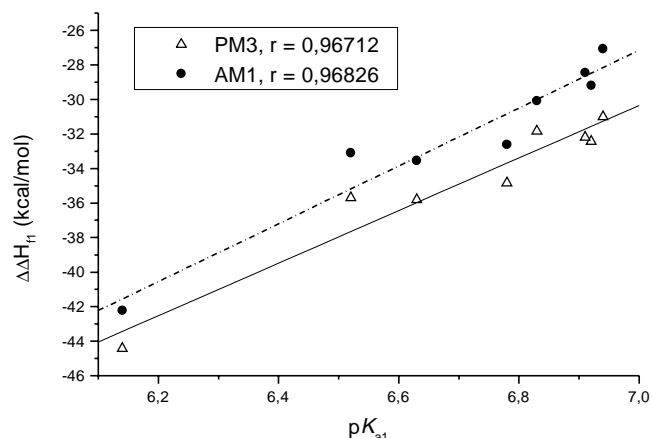


Figura 3. Gráfico de $\Delta\Delta H_{f1}$ [$\Delta H_f(\text{hidroxamato}) - \Delta H_f(\text{enol})$] calculado pelos métodos PM3 e AM1 contra $\text{p}K_{a1}$ para a série de 2,4-diidróxi-1,4-benzoxazin-3-onas²⁰.

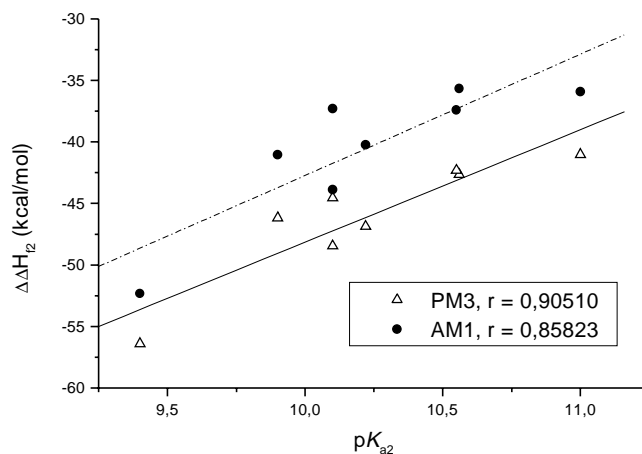


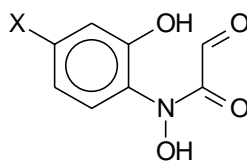
Figura 4. Gráfico de $\Delta\Delta H_{f2}$ [$\Delta H_f(\text{fenolato}) - \Delta H_f(\text{enol})$] calculado pelos métodos PM3 e AM1 contra $\text{p}K_{a2}$ para a série de 2,4-diidróxi-1,4-benzoxazin-3-onas²⁰.

PC Spartan Plus 1.5²¹. As cargas atômicas foram calculadas por ajuste ao potencial eletrostático. A otimização das estruturas dos Hx com os métodos semi-empíricos AM1 e PM3 foi

Tabela 5. Comparação entre resultados experimentais²⁰ de acidez dos grupos ácido hidroxâmico ($\text{p}K_{a1}$) e fenol ($\text{p}K_{a2}$) e dados de ΔH_f relativo para benzoxazinonas, calculados pelos métodos AM1 e PM3

X	$\Delta\Delta H_{f1}^b$		$\text{p}K_{a1}^a$	$\Delta\Delta H_{f2}^c$		$\text{p}K_{a2}^a$
	AM1	PM3		AM1	PM3	
t-Bu	6,94	-27,061	-30,993	11,0	-35,937	-41,026
H	6,91	-28,448	-31,847	10,55	-37,412	-42,655
MeO	6,92	-29,187	-32,195	10,1	-37,299	-42,333
Me	6,83	-30,068	-32,443	10,56	-35,659	-44,554
Cl	6,78	-32,614	-34,834	10,22	-40,241	-46,867
CO ₂ Me	6,52	-33,084	-35,688	9,90	-41,059	-46,169
F	6,63	-33,534	-35,815	~10,1	-43,879	-48,455
NO ₂	6,14	-42,211	-44,418	9,40	-52,311	-56,408

^aRef. 20; ^b $\Delta H_f(\text{ânions hidroxamato}) - \Delta H_f(\text{moléculas neutras})$, kcal/mol; ^c $\Delta H_f(\text{ânions fenolato}) - \Delta H_f(\text{moléculas neutras})$, kcal/mol.



feita através do programa *Mopac 6.0²²* até uma norma de gradiente menor do que 0,1 kcal/(Å ou °).

CONCLUSÕES

Com relação à avaliação da estabilidade relativa das conformações dos diastereoisômeros *Z* e *E* das formas ácido hidroxâmico e ácido hidroxímico do ácido formoidroxâmico, o método semi-empírico PM3 mostrou um desempenho superior ao método AM1, em comparação com dados do método *ab initio* MP2/6-31G (d). Ambos os métodos, em comparação com dados do método *ab initio* HF/6-31G*, produziram previsões razoáveis da estrutura de DIMBOA, mas os dados de cargas eletrostáticas apresentam grandes diferenças para ambos os métodos semi-empíricos, embora o desempenho do método PM3 tenha sido melhor. Foram encontradas boas correlações entre a estabilidade relativa, calculadas pelos métodos AM1 e PM3, dos ânions fenolato e hidroxamato e das formas protonadas de derivados da forma aldólica de DIMBOA, e dados experimentais de pK_a . Esta avaliação mostra que os métodos AM1 e PM3 são capazes de representar o efeito eletrônico relativo de substituintes sobre uma propriedade química experimental das benzoxazinonas. O conjunto dos resultados sugere que os métodos semi-empíricos avaliados podem, com algumas restrições, serem aplicados ao estudo de sistemas que contenham a função ácido hidroxâmico, com alguma vantagem para o método PM3 em relação ao método AM1. Somada à velocidade dos métodos semi-empíricos, esta conclusão aponta para o seu uso em estudos da interação entre enzimas e Hx.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao programa PIBIC (CNPq/UFRRJ) pela bolsa de Iniciação Científica e à Faperj pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Berenbaun, M.R.; Radovsky, F. J.; Resh, V. H.; *Ann. Rev. Entomol.* **1998**, *43*, 1.
2. Niemeyer, H. M.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 3349.
3. Niemeyer, H. M.; Pesel, E.; Copaja, S. V.; Bravo, H. R.; Franke, S.; Francke, W.; *Phytochemistry* **1989**, *28*, 447.
4. Niemeyer, H. M.; Pesel, E.; Franke, S.; Francke, W.; *Phytochemistry* **1989**, *28*, 2307.
5. Gianoli, E.; Niemeyer, H. M.; *J. Chem. Ecol.* **1997**, *23*, 2695.
6. Hashimoto, Y.; Shudo, K.; *Phytochemistry* **1996**, *43*, 551.
7. Copaja, S. V.; Bravo, H. R.; Niemeyer, H. M.; *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3542.
8. Queirolo, C. B.; Andreo, C. S.; Niemeyer, H. M.; Corcuera, L. J.; *Phytochemistry* **1983**, *22*, 2455.
9. Yamamoto, M.; Tsujishita, H.; Hori, N.; Ohishi, Y.; Inoue, S.; Ikeda, S.; Okada, Y.; *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1209.
10. Cuevas, L.; Niemeyer, H. M.; *Phytochemistry* **1993**, *34*, 983.
11. Leszczynski, B.; Matok, H.; Dixon, A. F. G.; *J. Chem. Ecol.* **1992**, *18*, 1189.
12. Perez, F. J.; Niemeyer, H. M.; *Phytochemistry* **1989**, *28*, 1597.
13. Cuevas, L.; Niemeyer, H. M.; Perez, F. J.; *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1429.
14. Pople, J. A. e Beveridge, D. L.; *Approximate Molecular Orbital Theory*; McGraw-Hill, New York, 1970. Segal, J. A. (Ed.); *Semi-empirical Methods of Electronic Structure Calculation*; Plenum Press, New York, 1977.
15. Clark, T. A.; *A Handbook of Computational Chemistry*; Wiley, New York, 1985. Hirst, D. M.; *A Computational Approach to Chemistry*; Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1990; p 85.
16. Manunza, B.; Deiana, S.; Pintore, M.; Solinas, V.; Gessa, C.; *J. Mol. Struct. (Theochem)* **1997**, *419*, 33; Wasserman, Z. R.; Hodge, C. N.; *Proteins-Struct. Func. Gen.* **1996**, *24*, 227.
17. Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902.
18. Stewart, J. J. P.; *J. Comput. Chem.* **1989**, *1*, 209.
19. Brink, C. P.; Crumbliss, A. L.; *J. Mol. Struct. (Theochem)* **1996**, *370*, 25.
20. Atkinson, J.; Morand, P.; Arnason, J. T.; *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1788.
21. Deppmeier, B. J.; Driessen, A. J.; Hehre, A. J.; Hume, T. T.; Johnson, J. A.; Klunzinger, P. E.; Lou, L.; Yu, J.; Wavefunction, Inc., Irvine, EUA.
22. Stewart, J. J. P., QCPE 455, disponível pela Indiana University, Bloomington, EUA.