

Estudio computacional de flavonoides con actividad anti-VIH1: aproximación QSAR a partir de descriptores moleculares, electrónicos, termodinámicos y topológicos

José Alexander Malavé¹, Edgar Alexander Brazón^{1,2*}, Felix Oscar Rosas^{2,3},
Jesús Antonio Lezama¹, Fernando Cabarcas²

¹) Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Escuela de Ciencias, Departamento de Química, Laboratorio de Físicoquímica Orgánica y Química Computacional, Cumaná, Venezuela

²) Grupo de Investigación en Toxicología y Farmacología, Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia.

³) Laboratorio de Físicoquímica Orgánica, IVIC, Caracas, Venezuela.

(*) eamarquez@udo.edu.ve

Recibido: 13/09/2016

Revisado: 08/12/2016

Aceptado: 30/12/2016

Resumen

Una de las etapas fundamentales para el descubrimiento y diseño de compuestos guías, es el estudio de la relación cuantitativa estructura-actividad en una serie homóloga, mediante técnicas computacionales. Para un grupo de compuestos de flavonoides con actividad anti-VIH1 fueron calculados sus propiedades electrónicas, termodinámicas y estéricas a través de los programas GAUSSIAN 09W y CHEMBIOFFICE 2012, usando el método DFT, con el conjunto de base 6-31++G(d,p). Once modelos matemáticos fueron obtenidos mediante análisis de regresión múltiples y, éstos sugieren que el coeficiente de partición octanol/agua, carga atómica en el carbono C5, número de enlaces rotables, entalpía de formación y superficie de área polar, están fuertemente relacionados con la actividad anti-VIH-1 de los flavonoides.

Palabras claves: HIV-1, DFT, QSAR, flavonoide.

Abstract

Computational study of flavonoids with anti-HIV1 activity: QSAR approach from molecular, electronic, thermodynamic and topological descriptors. One of the fundamental steps for the discovery and design guidelines compounds is the study of quantitative structure-activity relationship in a homologous series using computational techniques. Electronic, thermodynamic and steric properties of several flavonoids with anti-HIV-1 activity, were calculated using GAUSSIAN 09W and CHEMBIOFFICE 2012, carried out DFT calculations, combining the method B3LYP with the basis 6-31++G(d,p). Eleven mathematic models were obtained by multiple regression analysis and suggest that the partition coefficient octanol / water, molar atomic charge, rotatable bond number, and enthalpy are strongly related to anti-HIV-1 activity of flavonoids.

Key words: HIV-1, DFT, QSAR, flavonoid

Introducción

A partir de 1981, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida o SIDA se ha convertido en la mayor epidemia mundial. El SIDA es causado por el virus de inmunodeficiencia humana, VIH. Este virus destruye progresivamente la habilidad del cuerpo humano de resistir las infecciones y ciertos tipos de cáncer, ya sea por apoptosis o dañando las células del sistema inmunológico del ser humano¹.

Se sabe que en el ciclo de vida del retrovirus participan, fundamentalmente, tres enzimas: transcriptasa reversa, proteasa reversa e integrasa. La transcriptasa reversa depende de una polimerasa de ADN, que transcribe ARN genómico viral dentro del ADN proviral. La proteasa reversa VIH-1 se encar-

ga de hidrolizar las proteínas virales y convertirlas en proteínas funcionales o productos peptídicos que son esenciales para el ensamble viral y la subsecuente replicación. Por último, la integrasa está asociada con una serie de factores celulares y el ADN proviral para formar el complejo de preintegración (PIC, por sus siglas en inglés). Este complejo migra al núcleo, donde toma lugar la integración, lo cual envuelve, por ejemplo, el rompimiento de dos nucleótidos a partir de cada terminal 3'- del ADN proviral, siendo este proceso catalizado por la enzima viral. Este proceso es esencial para la replicación del virus y, por lo tanto, es un blanco válido e importante para el diseño de inhibidores^{2,3}.

El estudio de la estructura y la bioquímica de la integrasa ha conducido al desarrollo de ensayos in vitro, usados,

posteriormente, para identificar posibles inhibidores de esta enzima⁴⁻⁷. Entre los inhibidores reportados, se encuentran algunas hidrazidas y salicilhidrazidas que no poseen grupos catecol en su estructura. Los estudios encontrados en este campo, demuestran que es necesaria la presencia de grupos salicílicos para lograr la actividad contra el retrovirus. La actividad reportada fue atribuida a la posibilidad de que los grupos aromáticos presentes en la estructura de estos compuestos podrían actuar como agentes quelantes de metales divalentes presentes en la estructura de la enzima integrasa del VIH⁸⁻¹⁰. Existe también la posibilidad de una interacción típica carga-carga entre los iones metálicos y cargas parciales o iones presentes en el ligando. Se ha demostrado que ambas clases de interacciones pueden coexistir en sitios de enlace¹¹⁻¹⁵.

Más recientemente, estudios de SAR y QSAR han demostrado que la hidrofobicidad y algunas características electrónicas de los ligandos tienen un rol principal en la actividad anti-VIH1¹⁶⁻¹⁹.

Hoy en día, aunque se han identificado varios inhibidores de la enzima integrasa que son capaces de evitar la replicación del virus en ensayos celulares así como en modelos de animales, aún no se ha aprobado alguno para ensayos clínicos. Probablemente, las altas toxicidades y una bioquímica indefinida, dificulta este proceso. De aquí que, actualmente, se continúa investigando en este campo³.

Entre los compuestos que presentan actividad anti-VIH, destacan los flavonoides. Su biocompatibilidad, conjuntamente con su origen natural y su baja citotoxicidad, representan un ligando importante de partida para estudios posteriores en este campo. A pesar de las características de este tipo de compuestos, existen pocos trabajos reportados donde se estudie la relación entre la estructura y la actividad anti-VIH de flavonoides.

Alves y colaboradores, emplearon el método semi-empírico PM3 para realizar un estudio computacional de 21 flavonoides con actividad anti-VIH1. Usando el método del análisis de los componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) sobre un número de descriptores moleculares, sugirieron que la energía del LUMO (orbital no ocupado de menor energía, por sus siglas en inglés), la electronegatividad y las cargas atómicas sobre los átomos 2, 3 y 7, podrían estar relacionadas con la actividad mostrada por estos compuestos²⁰.

Souza y colaboradores, usaron el método semi-empírico AM1, para calcular algunos descriptores moleculares electrónicos en 22 flavonas que presentaron actividad anti-VIH-1. Usando el método estadístico del análisis de clúster jerárquico (HCA, por sus siglas en inglés), reportaron que las variables coeficiente de partición, volumen molecular y la afinidad electrónica, podrían ser usadas para distinguir entre

las flavonas activas y no activas contra el virus de inmunodeficiencia adquirida²¹.

Lameira y colaboradores, usaron la teoría del funcional de la densidad, (DFT/B3LYP 6-31G*) para calcular los descriptores moleculares electrónicos en 26 flavonoides. Usando el método de regresión lineal múltiple encontraron un modelo matemático bastante significativo y predictivo. En dicho trabajo, se encontró una alta correlación entre los valores de la actividad anti-VIH de flavonoides, con propiedades como la hidrofobicidad, la electronegatividad y las cargas en alguno de los átomos pertenecientes a la estructura, mientras que la toxicidad de los mismos, estaba correlacionada a la afinidad electrónica, y la carga en el átomo 8 del flavonoide. Este resultado demostraba que los parámetros electrónicos y termodinámicos, juegan un papel importante en la actividad anti-VIH1 de los flavonoides²².

Poco tiempo después, Lameira y colaboradores, retomaron el trabajo realizado por Souza y colaboradores, y realizaron un estudio computacional de flavonas, usando la teoría del funcional de la densidad (B3LYP/6-31G*). A través de un análisis discriminante por pasos (SDA, por sus siglas en inglés) un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) y un análisis de clúster jerárquico (HCA, por sus siglas en inglés), sugirieron que los descriptores de hidrofobicidad (ClogP), carga en el oxígeno del grupo carbonilo, y el índice de electrofilia son responsables para discriminar entre las flavonas activas y no activas contra este tipo de virus²³.

Más recientemente, Malavé y colaboradores realizaron un estudio DFT de 30 flavonoides (que incluían flavonas, flavanonas, aminoflavonoides así como sustituyentes halogenados en su estructura), encontrando que los descriptores estéricos o topológicos como área de superficie polar, combinados con descriptores termodinámicos como ClogP y refractividad molar describen aceptablemente, la actividad anti-VIH-1 de este grupo de flavonoides²⁴.

A pesar de los múltiples intentos de desarrollar modelos matemáticos en compuestos que presentan actividad anti-VIH, no existe hasta ahora, en el mejor de nuestro conocimiento, un modelo que combine descriptores moleculares electrónicos, termodinámicos y estéricos. Tomando en cuenta de que el proceso de interacción ligando-receptor es sumamente complejo y que depende de factores que involucran procesos moleculares diversos, así como múltiples conformaciones posibles, es imperativo estudios en este campo, que permitan tener un modelo confiable y que sean usados como herramienta predictiva de nuevas estructuras potencialmente activas.

En el presente trabajo empleamos la teoría del funcional de la densidad (DFT) usando el funcional híbrido de Becke, Lee, Yang y Park, combinados con la base 6-31++G(dp), para explorar y calcular varios descriptores moleculares electró-

nicos a partir de los orbitales frontera de cada molécula estudiada; asimismo, con el propósito de aportar mejoras a los modelos QSAR reportados, se calcularon distintos descriptores termodinámicos y estéricos para posteriormente realizar un estudio estadístico hasta obtener la mejor descripción matemática de la relación cuantitativa entre la estructura y la actividad de los flavonoides estudiados.

Metodología

Selección de los flavonoides con actividad anti-HIV1

La selección de los flavonoides a estudiar fue basada en la búsqueda de la literatura de estructuras de flavonoides con actividad anti-HIV1, inhibidores de la enzima integrasa. Veinte estructuras de flavonoides (flavonas, flavonoles y aminoflavonoides) con sus correspondientes datos de IC₅₀ fueron seleccionados de la literatura, tomando en cuenta los datos del parámetro IC₅₀ y la estructura química^{25,26}. Para preservar la homogeneidad de los datos a usar, se tuvo en cuenta que las pruebas biológicas que dieron origen al parámetro IC₅₀ fueran realizadas usando el mismo método.

Estructuras de mínima energía para los flavonoides estudiados

Los cálculos de estructura electrónica fueron llevadas a cabo usando la teoría del funcional de la densidad, mediante el empleo del funcional híbrido de tres parámetros de Lee, Yang y Parr, combinado con la base 6-31++G(d,p), implementados en el software GAUSSIAN 09W. Las funciones difusas y polarizadas fueron agregadas debido a la presencia de sustituyentes electro-atractores como halógenos, hidroxilos, aminos, entre otros. Para la optimización geométrica, se usó la rutina del gradiente analítico de Berny, con los valores de convergencia de 10⁻⁹ unidades atómicas, el valor crítico para el desplazamiento máximo fue de 0,0018 Å, y para la fuerza máxima de 0,00045 Hartree/Bohr. Los valores termodinámicos para la energía vibracional del punto cero (ZPVE, por sus siglas en inglés), la energía térmica y las entropías absolutas, fueron obtenidas por cálculos de frecuencias para cada estructura de mínima energía. Este tipo de cálculo fue realizado considerando comportamiento ideal a partir de las frecuencias armónicas y los momentos de inercia estándar usando el valor de 1 atmósfera para la presión, y 298 K para la temperatura. Los valores para la corrección de la frecuencia y la energía del punto cero, fueron obtenidos a partir de la literatura²⁷⁻³⁰.

Cálculo de funciones termodinámicas, electrónicas y estéricas (topológicas):

Los valores de entalpía, entropía y energía libre de Gibbs para cada flavonoide estudiado, fueron obtenidos a partir de cálculos vibracionales. Las funciones de partición fueron obtenidas a 1 atmósfera de presión y 298 K.

A excepción de las cargas NBO, todos los descriptores electrónicos fueron obtenidos a partir de la teoría del funcional de la densidad conceptual³¹⁻³², empleando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Electronegatividad}(x) = \frac{(PI+AE)}{2} \quad (1)$$

$$\text{Hardness}(h) = \frac{(PI-AE)}{2} \quad (2)$$

$$\text{Softness}(s) = \frac{(1)}{2h} \quad (3)$$

$$\text{Índice electrofílico}(\omega) = \frac{\mu^2}{2h} \quad (4)$$

$$\text{Potencial electrónico}(\mu) = -\frac{(PI + AE)}{2} \quad (5)$$

El potencial de ionización (PI) vertical y la energía de afinidad electrónica vertical (EA), fueron calculados a partir de las siguientes fórmulas:

$$PI = E^+ - E^0 \quad (6)$$

$$EA = E^- - E^0 \quad (7)$$

Donde E⁺ corresponde a la energía de la especie catiónica, E⁰ es la energía de la especie neutra y E⁻ es la energía de la especie aniónica.

La topología molecular ha sido ampliamente utilizada como descriptor para caracterizar una estructura química; su importancia radica en la posibilidad de describir la forma de una molécula y relacionarla con la interacción del sitio receptor. De esta manera, en este estudio, se calcularon varios descriptores topológicos, fundamentalmente los índices de conectividad molecular. Estos índices codifican la información acerca del tamaño, la ramificación, la ciclización, la insaturación y el contenido de heteroátomos en las moléculas. Ello implica que los índices de conectividad codifican no solamente que átomo está unido con otro, sino también la información electrónica de cada uno de ellos, información necesaria para describir numéricamente el comportamiento químico y biológico de una molécula³³. De esta manera, los descriptores topológicos ClogP, índice de Balaban, índice topológico molecular, número de enlaces rotables, área de superficie polar, diámetro topológico, índice de Wiener, entre otros, fueron calculados a partir de las estructuras optimizadas al nivel de teoría B3LYP/6-31++G(d,p) usando el software CHEMBIOFFICE 2012.

Cálculos estadísticos

El parámetro IC₅₀ y los diferentes descriptores moleculares de cada flavonoide estudiado, fueron utilizados para generar el modelo matemático-estadístico, mediante análisis de regresión simple y múltiple, empleando la respuesta biológica como IC₅₀, ln(IC₅₀) y -ln(IC₅₀), evaluando la relación lineal a un nivel de probabilidad del 99 %. Para esto, se utilizó el programa Excel de Microsoft Office 2010. En el caso de

correlaciones sencillas entre un descriptor y la actividad, se consideró la relación lineal cuando el coeficiente de regresión, r era mayor a 0,80. El análisis de regresión lineal múltiple se basó en el método de validación cruzada³⁴, tomando en cuenta cuatro criterios: el coeficiente de correlación (r), el valor de Fisher (F), el error estándar de predicción y la habilidad predictiva. La ecuación para calcular la habilidad de predicción, tiene la siguiente forma:

$$Q^2 = 1.0 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (8)$$

donde \bar{y} = y media. Aquí, mientras más cercano a la unidad es el valor de Q^2 , mayor será su habilidad predictiva.

El error estándar de predicción, fue calculado a partir de la siguiente expresión:

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (9)$$

donde y = Log (1/IC₅₀) experimental; \hat{y} = Valor de predicción y n = número de muestras usadas.

Resultados y discusión

A partir de diferentes trabajos reportados, se escogieron 20 flavonoides cuyos valores de actividad tomaran en cuenta los criterios señalados^{25,26}. Entre estas estructuras fueron seleccionadas flavonas y flavanoles, así como amino-flavonoides. La diferencia en la estructura, permite tener una idea de las características topológicas y electrónicas

necesarias para que la molécula sea biológicamente activa. La variación en la estructura del esqueleto de los flavonoides estudiados se muestra en la tabla 1. Estas están basadas en el esqueleto básico de un flavonoide, el cual se muestra en la figura 1 para una flavona.

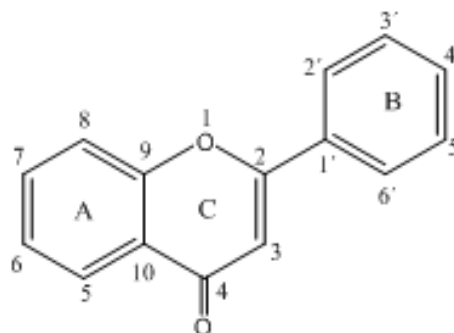


Fig. 1: Estructura química básica de una flavona.

De la tabla 1, se observa que los flavonoides más activos, poseen un grupo hidroxilo en la posición 5, así como un halógeno en la posición 4'. Los cálculos teóricos al nivel de teoría B3LYP/6-31G++(d,p) demuestran que el grupo hidroxilo en esta posición, se encuentra formando enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo en posición 4, a través de una estructura cíclica de seis miembros, tal como se muestra en la figura 2. Esta estructura cíclica es, en promedio, 135 kJ/mol más estable que la estructura análoga sin la formación del enlace de hidrógeno. El fragmento difenílico del flavo-

Tabla 1: Estructura química de los 20 compuestos de flavonoides bajo estudio.

Molécula	2	3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'	Log (1/IC ₅₀)
1	Ar	OH	H	OH	H	H	H	H	OH	H	H	3,914
2	CH ₃	H	OH	H	OH	H	--	--	--	--	--	4,310
3	Ar	H	OH	H	OH	H	Cl	H	H	H	H	5,301
4	Ar	H	OH	H	OH	H	H	H	Cl	H	H	5,398
5	Ar	H	OH	H	OH	H	H	H	Br	H	H	5,301
6	Ar	OH	H	NH(COCH ₃)	H	H	H	H	H	H	H	4,189
7	Ar	OH	H	NH(COCH ₃)	H	H	OCH ₃	H	H	H	H	3,415
8	Ar	OH	H	NH(COCH ₃)	H	H	H	H	OCH ₃	H	H	4,006
9	Ar	OH	H	NH(COCH ₃)	H	H	H	H	CF ₃	H	H	4,577
10	Ar	OH	H	NH ₂	H	H	OCH ₃	H	H	H	H	3,655
11	Ar	OH	H	NH ₂	H	H	H	H	OCH ₃	H	H	3,622
12	Ar	OH	H	NH ₂	H	H	H	CF ₃	H	H	H	4,352
13	Ar	OH	H	NH ₂	H	H	H	H	CF ₃	H	H	4,452
14	Ar	OH	H	NH ₂	H	H	F	H	H	H	H	4,033
15	Ar	H	OH	H	OH	H	H	H	F	H	H	5,398
16	Ar	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H	5,046
17	Ar	H	H	NH ₂	H	H	H	F	H	H	H	4,213
18	Ar	OCH ₃	H	NH ₂	H	H	H	H	OCH ₃	H	H	3,699
19	Ar	OCH ₃	H	NH ₂	H	H	F	H	H	H	H	4,350
20	Ar	OCH ₃	H	NH ₂	H	H	H	F	H	H	H	3,949

noide, con la formación del enlace de hidrógeno mencionado arriba, ya fue propuesto como parte de un posible farmacóforo contra el virus VIH³⁵. Otros trabajos han sugerido la relación de la actividad de flavonoides con la capacidad de interaccionar con cationes divalentes, como el Mg^{2+} , presente en los sitios activos de la enzima integrasa. Esta interacción bien podría ser como agente quelante o una interacción tipo catión- π . De acuerdo a esto, el hidrógeno presente en la estructura cíclica, podría ser sustituido por un metal divalente, donde el flavonoide pudiese actuar como un ligando bidentado³⁶⁻⁴⁰.

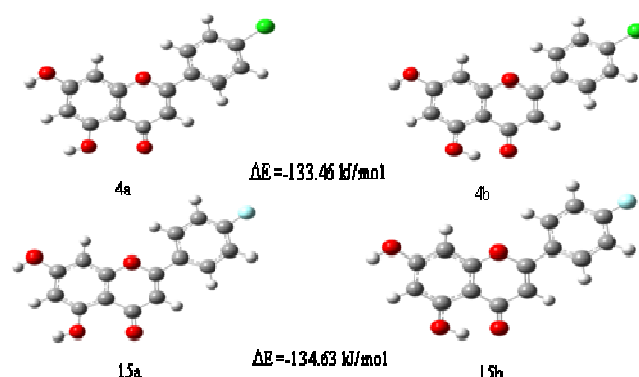


Fig. 2: Estructuras optimizadas al nivel de teoría B3LYP/6-31G++(d,p) para los flavonoides más activos contra VIH1; a = Optimizado sin formación de enlace de hidrógeno; b = Optimizado con formación de enlace de hidrógeno.

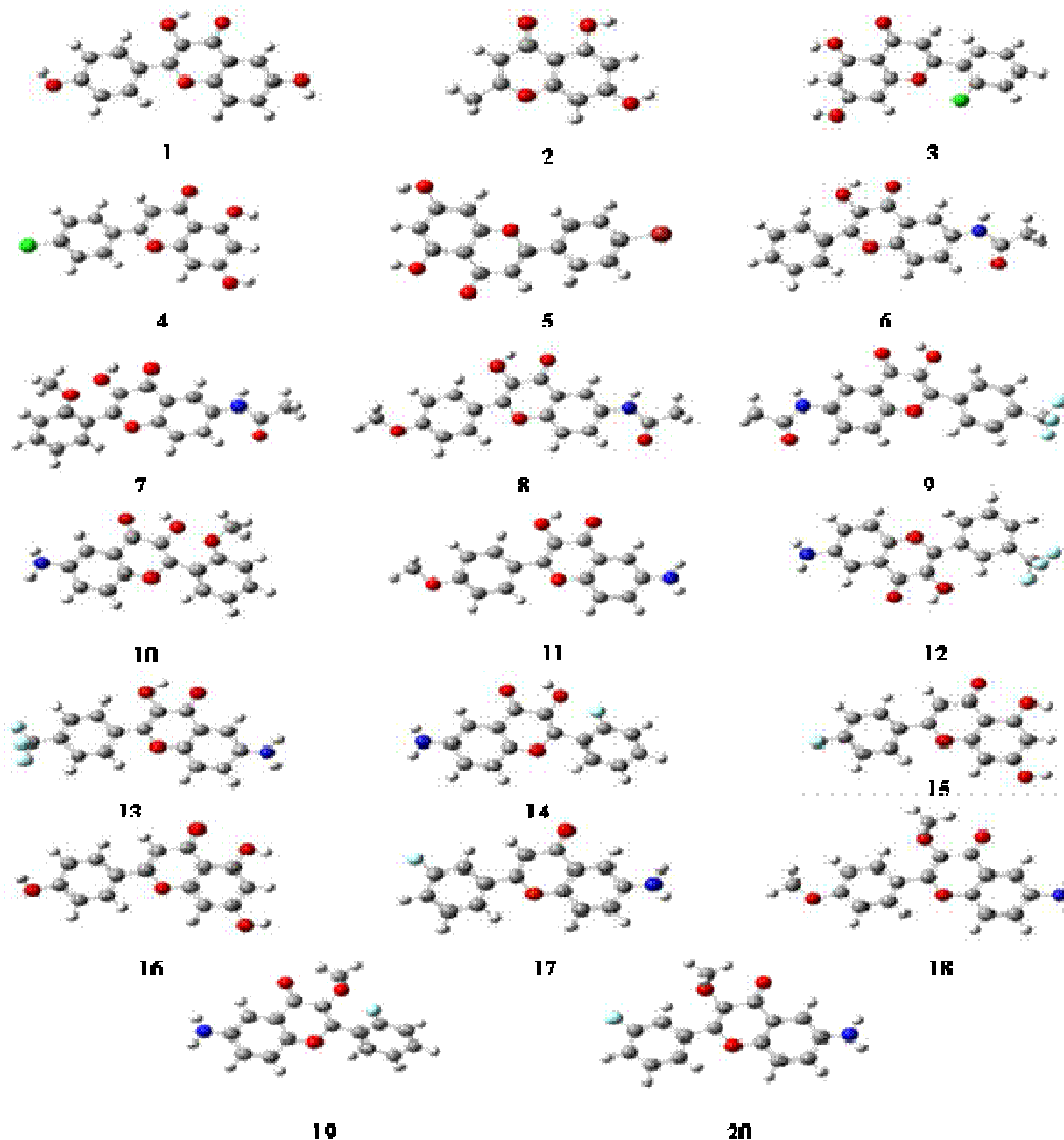


Fig. 3: Estructuras optimizadas de los flavonoides estudiados, al nivel de teoría B3LYP/6-31G++(d,p).

Descriptores moleculares

La tabla 2 muestra los descriptores más relevantes y sus valores numéricos, cuya combinación lineal describe la actividad biológica de los compuestos estudiados. Estos descriptores fueron obtenidos a través de regresión lineal múltiple por pasos (*stepwise multiple regression*, por su nombre en inglés), basado en el método estadístico *forward-selection* y *backward-elimination*. En este método, cada variable independiente (descriptores) es añadida o eliminada en cada paso de la regresión de acuerdo a tres criterios estadísticos: el valor de coeficiente de regresión, r , el valor del estadístico de Fischer, F y el valor de la desviación estándar de la regresión obtenida. De acuerdo a estos criterios, los mejores modelos estadísticos incluyen solo seis descriptores moleculares: ClogP, C_5 (carga en el carbono C_5), número de

enlaces rotables, área de superficie polar, entalpía de formación (ΔH_f) y diferencia de energía entre los orbitales fronteras (GAP). Los valores obtenidos para cada flavonoide, son mostrados en la tabla 2.

Modelos para la actividad anti-HIV1 de flavonoides

En este trabajo, se empleó el procedimiento de regresión múltiple por pasos sucesivos, complementado con el procedimiento “*leave-one-out*”, con el propósito de obtener la mejor ecuación.

En este sentido, con el propósito de evitar sobre estimaciones así como la dificultad para interpretar los resultados obtenidos, pares de variables con $r \geq 0,70$ fueron clasificadas como inter-correlacionadas.

Tabla 2: Valores de los descriptores moleculares, calculados para cada uno de los flavonoides estudiados.

Compuesto.	ClogP	Enlaces rotables	A.S.Polar (\AA^2)	ΔH_f (Hartree)	GAP	C_5	Log (1/IC ₅₀)
1	1,838	1,000	86,990	-953,514	-0,135	-0,239	3,914
2	1,964	0,000	66,760	-686,603	-0,187	0,400	4,310
3	4,026	1,000	66,760	-1337,883	-0,171	0,400	5,301
4	4,276	1,000	66,760	-1337,890	-0,162	0,400	5,398
5	4,426	1,000	66,760	-3449,399	-0,161	0,404	5,301
6	2,165	3,000	75,630	-1011,048	-0,094	-0,218	4,189
7	1,542	4,000	84,860	-1125,531	-0,143	-0,219	3,415
8	2,102	4,000	84,860	-1125,539	-0,134	-0,219	4,006
9	3,085	4,000	75,630	-1348,075	-0,138	-0,217	4,577
10	1,305	2,000	81,780	-972,907	-0,140	-0,243	3,655
11	1,865	2,000	81,780	-972,916	-0,135	-0,243	3,622
12	2,848	2,000	72,550	-1195,452	-0,134	-0,242	4,352
13	2,848	2,000	72,550	-1195,452	-0,133	-0,242	4,452
14	2,092	1,000	72,550	-957,658	-0,266	-0,242	4,033
15	3,706	1,000	66,760	-977,527	-0,165	0,400	5,398
16	2,905	1,000	86,990	-953,504	-0,164	0,399	5,046
17	2,771	1,000	52,320	-882,444	-0,141	-0,240	4,213
18	2,038	3,000	70,780	-1012,177	-0,145	-0,242	3,699
19	2,259	2,000	61,550	-996,921	-0,145	-0,242	4,350
20	2,259	2,000	61,550	-996,925	-0,141	-0,241	3,949

ΔH_f : Entalpía de formación; s: Superficie; ClogP: coeficiente de partición

Tabla 3: Matriz correlación para los descriptores moleculares incluidos en los modelos QSAR obtenidos.

	GAP	ClogP	ΔH_f (hartree)	C_5	A.S.Polar (\AA^2)	E. Rot	Log(1/IC ₅₀)
GAP	1,000	0,131	0,012	0,334	0,161	0,503	0,199
ClogP	0,131	1,000	0,604	0,691	0,430	0,353	0,932
ΔH_f	0,012	0,604	1,000	0,342	0,120	0,051	0,441
C_5	0,334	0,631	0,342	1,000	0,183	0,602	0,822
A. S. Polar	0,161	0,430	0,120	0,183	1,000	0,394	0,348
E. Rot	0,503	0,353	0,051	0,602	0,394	1,000	0,477
Log (1/IC ₅₀)	0,199	0,932	0,442	0,822	0,348	0,477	1,000

E. Rot: enlaces rotables

La tabla 3 muestra la matriz correlación entre los descriptores moleculares en estudio y la actividad anti VIH1. Se observa que no existen descriptores inter-correlacionados entre sí.

Se observa que los descriptores moleculares que mejor correlacionan con la actividad son el coeficiente de partición ClogP y la carga en el carbono C5. Considerando que el descriptor ClogP expresa la lipofilia del compuesto, los resultados sugieren una fuerte interacción de los flavonoides con la membrana lipídica de las células infectadas. Cabe resaltar que el carbono C5 presenta valores positivos cuando se encuentra unido a un grupo hidroxilo. Este resultado está en concordancia con la hipótesis de que la estructura de un enlace de hidrógeno en esa parte de la molécula, juega un papel fundamental en la actividad.

El resto de los descriptores, presenta una correlación moderada con la actividad, por lo que su influencia en la actividad es algo más complejo.

De acuerdo a los criterios de “*forward-selection* y *backward-elimination*” así como una validación cruzada en los datos, se obtuvieron los siguientes modelos cuantitativos de estructura-Actividad anti-VIH1:

$$\text{Log}(1/IC_{50}) = 3,152 + 0,634C_5 + 0,491\text{ClogP} - 0,025 \text{ N.E.R} \quad (10)$$

$r = 0,963; F = 68,556; Q^2 = 0,928; SEP = 0,164; N = 20$

$$\text{Log}(1/IC_{50}) = 2,928 + 0,0001\Delta H_f + 0,678\text{ClogP} - 0,075 \text{ N.E.R} \quad (11)$$

$r = 0,953; F = 50,500; Q^2 = 0,908; SEP = 0,186; N = 20$

$$\text{Log}(1/IC_{50}) = 3,010 + 0,692C_5 + 0,494\text{ClogP} + 0,001 \text{ A.S.Polar} \quad (12)$$

$r = 0,963; F = 67,395; Q^2 = 0,927; SEP = 0,163; N = 20$

$$\text{Log}(1/IC_{50}) = 2,128 + 0,0002\Delta H_f + 0,768\text{ClogP} + 0,007 \text{ A.S.Polar} \quad (13)$$

$r = 0,949; F = 48,044; Q^2 = 0,900; SEP = 0,193; N = 20$

$$\text{Log}(1/IC_{50}) = 2,934 - 0,039\text{GAP} + 0,608\text{ClogP} - 0,089 \text{ N.E.R} \quad (14)$$

$r = 0,945; F = 44,806; Q^2 = 0,894; SEP = 0,200; N = 20$

$$\text{Log}(1/IC_{50}) = 1,991 - 1,650\text{GAP} + 0,665\text{ClogP} + 0,005 \text{ A.S.Polar} \quad (15)$$

$r = 0,938; F = 39,208; Q^2 = 0,880; SEP = 0,212; N = 20$

$$\text{Log}(1/IC_{50}) = 2,889 + 0,576C_5 + 0,512\text{ClogP} - 0,038 \text{ N.E.R} + 0,003 \text{ A.S.Polar} \quad (16)$$

$r = 0,964; F = 49,232; Q^2 = 0,929; SEP = 0,163; N = 20$

$$\text{Log}(1/IC_{50}) = 3,145 + 0,625C_5 + 0,560\text{ClogP} - 0,012 \text{ N.E.R} + \Delta H_f 0,0002 \quad (17)$$

$r = 0,970; F = 57,739; Q^2 = 0,941; SEP = 0,149; N = 20$

$$\text{Log}(1/IC_{50}) = 2,156 + 0,0002\Delta H_f + 0,724\text{ClogP} - 0,095 \text{ N.E.R} + 0,010 \text{ A.S.Polar} \quad (18)$$

$r = 0,961; F = 45,821; Q^2 = 0,924; SEP = 0,168; N = 20$

$$\text{Log}(1/IC_{50}) = 2,291 - 0,029\text{GAP} + 0,6037\text{ClogP} - 0,110 \text{ N.E.R} + 0,008 \text{ A.S.Polar} \quad (19)$$

$r = 0,952; F = 36,090; Q^2 = 0,906; SEP = 0,188; N = 20$

$$\text{Log}(1/IC_{50}) = 3,229 - 0,403\text{GAP} + 0,489\text{ClogP} - 0,031 \text{ N.E.R} + 0,641C_5 \quad (20)$$

$r = 0,964; F = 48,445; Q^2 = 0,928; SEP = 0,164; N = 20$

$$\text{Log}(1/IC_{50}) = 2,912 - 0,086\text{GAP} + 0,679\text{ClogP} - 0,074 \text{ N.E.R} + 0,0002\Delta H_f \quad (21)$$

$r = 0,953; F = 36,921; Q^2 = 0,908; SEP = 0,186; N = 20$

De los doce modelos presentados arriba, la ecuación 17 es la que presenta mejor calidad estadística, dado que tiene un mejor ajuste a los datos experimentales ($r = 0,970$) y mejor valor de coeficiente de predicción ($Q^2 = 0,941$); asimismo, presenta el menor valor del error estándar de predicción (SEP, por sus siglas en inglés).

La tabla 4 muestra una excelente reproducibilidad de los valores experimentales con los valores predichos por la ecuación 17 y la figura 4 muestra una buena linealidad entre estos valores.

La validación de la ecuación 17 fue realizada usando el método “*leave-one-out-cross validation*”, los resultados obtenidos para cada flavonoide se muestra en la tabla 5. Usando éste método se encuentra un coeficiente de predicción, ($Q^2_{C.V}$) de 0,91 con error estándar de estimación de 0,18. Como se observa, no existe diferencia significativa entre los valores arrojados por la ecuación 17 y el método de validación cruzada.

La ecuación 17, muestra que la actividad anti-VIH1 de los flavonoides aumenta apreciablemente con el coeficiente de partición (ClogP) y la carga en el átomo C₅, y ligeramente con el valor de la entalpía de formación. En contraste, dis-

Tabla 4: Actividad anti-VIH1 predicha por la ecuación 17.

Compuestos	Valores experimentales	Valores predichos	Residuos	Residuos estándares
1	3,914	3,848	0,066	0,432
2	4,310	4,373	-0,063	-0,415
3	5,301	5,410	-0,109	-0,716
4	5,398	5,551	-0,153	-1,002
5	5,301	5,290	0,011	0,073
6	4,189	4,012	0,177	1,161
7	3,415	3,631	-0,216	-1,418
8	4,006	3,945	0,061	0,399
9	4,577	4,461	0,116	0,763
10	3,655	3,532	0,123	0,808
11	3,622	3,846	-0,224	-1,469
12	4,352	4,361	-0,009	-0,060
13	4,452	4,361	0,091	0,596
14	4,033	3,988	0,045	0,294
15	5,398	5,290	0,108	0,707
16	5,046	4,845	0,201	1,319
17	4,213	4,382	-0,169	-1,110
18	3,699	3,925	-0,226	-1,483
19	4,350	4,064	0,286	1,877
20	3,949	4,064	-0,115	-0,755

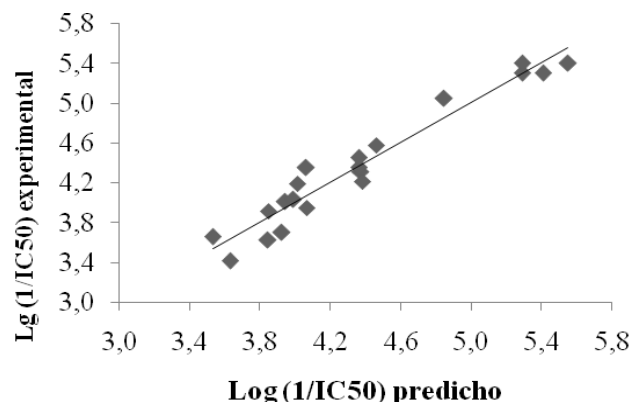


Fig. 4: Log (1/IC₅₀) experimental vs Log (1/IC₅₀) predicho por la ecuación 17.

Tabla 5: Valores obtenidos en la validación estadística de la ecuación 17, usando el método "leave-one-out-cross-validation".

Flavonoide	Actividad experimental	Actividad predicha por ecuación 17	Actividad "Cross-Validation-Leave-one-out"
1	3,914	3,848	3,831
2	4,310	4,373	4,442
3	5,301	5,410	5,443
4	5,398	5,551	5,321
5	5,301	5,290	4,880
6	4,189	4,012	4,172
7	3,415	3,631	3,752
8	4,006	3,945	3,925
9	4,577	4,461	4,401
10	3,655	3,532	3,503
11	3,622	3,846	3,873
12	4,352	4,361	4,368
13	4,452	4,361	4,353
14	4,033	3,988	3,992
15	5,398	5,290	5,270
16	5,046	4,845	4,863
17	4,213	4,382	4,462
18	3,699	3,925	3,941
19	4,350	4,064	4,037
20	3,949	4,064	4,003

minuye levemente con el número de enlaces rotables en la molécula. El aumento de la actividad con el coeficiente de partición sugiere una alta interacción de los compuestos con la membrana lipídica de las células infectadas, mientras que el aumento de la actividad con una baja densidad electrónica en el átomo C₅ (cargas positivas aumentan la actividad) soporta la hipótesis de la formación del enlace de hidrógeno, y/o la interacción de esta parte de la molécula con metales divalentes de la enzima integrasa, como un paso fundamental para la inhibición del virus por este tipo de compuestos. No obstante, son fundamentales estudios adicionales en este campo que permitan distinguir entre el tipo de interacción que toma lugar y su importancia en la actividad anti-VIH1.

El valor pequeño asociado a la entalpía de formación sugiere una pequeña contribución de esta variable a la actividad; valores muy grandes de entalpía de formación aumentarán la actividad, mientras que valores negativos la disminuyen. De acuerdo a la mecánica estadística, valores de entalpía de formación negativa se asocian con números de estados energéticos accesibles altos y/o a momento dipolar elevados³⁴, características que dificultan las interacciones tipo metal-ligando, así como las interacciones π - π las cuales son, en naturaleza, de tipo covalente. Por otra parte, una molécula con alto valor de entalpía de formación negativa, sería de naturaleza polar, e hidrofílica, impidiendo así el paso a través de la membrana celular, y, por lo tanto, disminuyendo la actividad de este tipo de moléculas.

El parámetro N.E.R. mide la flexibilidad molecular del ligando en estudio, y está relacionado con el número de estados energéticos rotacionales accesibles³⁴. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, el valor pequeño

asociado a este parámetro (0,012) sugiere que las moléculas con funciones de partición rotacional altas, disminuyen la actividad. En la interacción de un ligando con un receptor, se hallan implicadas muchas fuerzas de asociación intermolecular, entre ellas hidrofóbicas, dispersión o de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, y electrostáticas; sin embargo, la interacción ligando-receptor, de menor energía, también depende de la flexibilidad del ligando. Una molécula muy flexible, tendrá muchas conformaciones de probabilidades y energías similares, siendo más difícil encajar energéticamente en un "bolsillo" (*pocket*) receptor de la proteína y, por lo tanto, menor probabilidad de éxito. De aquí que las moléculas de flavonoides con los menores valores de N.E.R. y, por lo tanto, número pequeño de conformaciones energéticas accesibles, son las más activas contra el virus.

Conclusiones

En general los modelos construidos fueron estadísticamente aceptables, arrojando valores de $r > 0,9$ y $Q^2 > 0,8$. Estas ecuaciones fueron descritas por el método de regresión múltiple por pasos. Esta investigación mostró que la ecuación 17 resultó ser la de mayor significación estadística y valor predictivo, reproduciendo notablemente los valores experimentales de actividad biológica de los compuestos estudiados. De igual manera, los resultados de esta investigación sugieren que la actividad anti-reversa VIH1 posiblemente posee una alta relación con los descriptores moleculares hidrofobicidad (ClogP), carga en el átomo de carbono 5 (C₅), enlaces rotables y entalpía de formación (ΔH_f), es decir, la combinación de propiedades topológicas, cargas en átomos específicos y el coeficiente de partición octanol/agua de los compuestos de flavonoides juegan un papel importante a la hora de estimar la actividad de los mismos.

Referencias

1. W Vershueren, I Dierynk, K Amsoms, H Boonants. Design and optimization of tricyclic phtalimide analogues as novel inhibitors of HIV-1 integrasa. **J. Med. Chem.**, 48, 1930-1940 (2005).
2. N Neamati, H Hong, J Owen, M Sunder, H Winslow. Salicylhidrazine-containing inhibitors of HIV-1 integrase: implication for a selective chelation in the integrase active site. **J. Med. Chem.**, 41, 3202-3209 (1998).
3. SB Singh, DL Zink, GF Bills, F Pelaez, A Teran, J Collado, KC Silverman, RB Linghman, P Felock, DJ Hzauda. Discovery, structure and HIV-1 integrase inhibitory activities of integracins, novel dimeric alkyl aromatics from *Cytonaema* sp. **Tetrahedron Lett.**, 43, 1617-1620 (2002).
4. D Hazuda, J Hastings, A Wolfe, E Emini. A novel assay for the DNA strand-transfer reaction of HIV-1 integrase. **Nucleic Acids Res.**, 22, 1121-1122 (1994).
5. A Mazumder, N Neamati, S Sunder, J Owen, Y Pommier. Retroviral Integrase: A novel Target in antiviral development;

- basic in vitro assays with the purified enzyme. In: **Antiviral Methods and protocols**; **24**, 327-338 (1999); the Humana press: Totowa, NJ, 1999.
- S Chow. In vitro assays for activities of retroviral integrase. **Methods**, **12**, 306-317 (1997).
 - Z Debyser, P Cherepanov, W Pluymers, E De Clercq. Assays for the evaluation of HIV-1 integrase inhibitors. **Methods Mol. Biol.**, **160**, 139-155 (2001).
 - H Hong, N Neamati, S Wang, M Nicklaus, A Mazumder. Discovery of HIV-1 integrase inhibitors by pharmacophore searching. **J. Med. Chem.**, **40**, 930-936 (1997).
 - H Zhao, N Neamati, S Sunders, H Hong, S Wang. Hydrazide-containing inhibitors of HIV-1 integrase. **J. Med. Chem.**, **40**, 937-941 (1997).
 - S Pinheiro, L Soteras, JL Gelpí, F Dehez, C Chipot, F Luque, C Curutchet. Cation- π -cation interactions in structural biology. 2nd. BSC international Doctoral Symposium. Royal Society of Chemistry (1998).
 - D Dougherty. Cation- interactions in chemistry and Biology: A new View of Benzene, Phe, Tyr and Trp. **Science**, **271**, 163-168 (1996).
 - D Hazuda, P Felock, J Hastings, A Wolfe. Differential divalent cation requirements uncouple the assembly and catalytic reactions of human immunodeficiency virus type 1 integrase. **J. Virol.**, **71**, 7005-7011 (1997).
 - A Mazumder, N Neamati, A Pilon, S Sunder, Y Pommier. Chemical trapping of ternary complexes of human immunodeficiency virus type 1 integrase, divalent metal, and DNA substrates containing and abasic site. Implications for the role of lysine 136 in DNA binding. **J. Biol. Chem**, **271**, 27330-27338 (1996).
 - A Sharon, J Deepthi, D Ayan. Do Cation-Interactions Always Need to be 1:1? **ChemPhysChem**, **13**, 695-698 (2012).
 - P Lavanya, S Ramaiah, A Anbarasu. Cation- π Interactions in β -Lactamases: The Role in Structural Stability. **Cellular Biochemical Biophysical**, **66**, 147-155 (2013).
 - MT Makhija, VM Kulkarni. Molecular Electrostatic Potentials as Input for the Alignment of HIV-1 Integrase Inhibitors in 3D QSAR. **J. Comput. Aid. Mol. Des.**, **15**, 961-978 (2001).
 - H Yuang, AL Parrill. QSAR Studies of HIV-1 Integrase Inhibition. **Bioorgan. Med. Chem.**, **1**, 4169-4183 (2002).
 - JK Buolamwini, H Assefa. CoMFA and CoMSIA 3D QSAR and Docking Studies on Conformationally-Restrained Cinnamoyl HIV-1 Integrase Inhibitors: Exploration of a Binding Mode at the Active Site. **J. Med. Chem.**, **45**, 841-852 (2002).
 - CL Kuo, H Assefa, S Kamath, Z Brzozowski, J Slawinski, F Saczewski, JK Buolamwini, N Neamati. Application of CoMFA and CoMSIA 3D-QSAR and Docking Studies in Optimization of Mercaptobenzenesulfonamides as HIV-1 Integrase Inhibitors. **J. Med. Chem.**, **47**, 385-399 (2004).
 - C Alves, J Pinheiro, A Camargo, A de Sousa, R Carvalho, A da Silva. A quantum chemical and statistical study of flavonoid compounds with anti-HIV activity. **J. Molecular Structure (Theochem)**, **491**, 123-131 (1999).
 - J Souza, R Almeida, M Castro, F Molfetta, A Camargo, K Honorio, A Borgues. A quantum chemical and statistical studies of flavonoids compounds (flavones) with anti-HIV activity. **Eur. J. Medicinal Chemistry**, **38**, 929-938 (2003).
 - J Lameira, C Alves, V Moliner, E Silla. A density functional study of flavonoid compounds with anti-HIV activity. **Eur. J. Medicinal Chemistry**, **41**, 616-623 (2006).
 - J Lameria, G Medeiros, M Reis, A Santos, C Alves. Structure-activity relationship study of flavone compounds with anti-HIV-1 integrase activity: A density functional theory study. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, **14**, 7105-7112 (2006).
 - J Malavé, E Márquez, J Lezama. Cálculo de descriptores moleculares topológicos en flavonoides con actividad anti-VIH1. **Saber (Universidad de Oriente, Venezuela)**, **27**, 102-109 (2015).
 - C Hu, Q Chen, R Shi, Y Kilkuskie, K Cheng, K Lee. Anti-AIDS Agent. 10. Acacetin-7-O- β -D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from chrysanthemum morifolium. **J. Natural Products**, **57(1)**, 42-51 (1994).
 - I Pal, S Bharate, K Bhutani. Anti-HIV natural products. **Current Science**, **89(2)**, 269-290 (2005).
 - MJ Frisch, GW Trucks, HB Schlegel, GE Scuseria, MA Robb, JT Cheeseman, *et al.* Gaussian Inc., Wallingford CT, Gaussian 09, Revision A.02, 2009.
 - JB Foresman, AE Frish. Exploring Chemistry with Electronic Methods, Second ed., Gaussian Inc., Pittsburg, PA, 1996.
 - a) Scale factors in <http://cccbdb.nist.gov/vibscalejust.asp>; b) Database of Frequency Scaling Factors for Electronic Structure Methods. http://comp.chem.umn.edu/truhlar/freq_scale.htm.
 - G Lendvay. Bond orders from ab-initio calculations and the test of the principle of bond order conservation, **J. Phys. Chem.**, **93**, 4422-4429 (1989).
 - AE Reed, RB Weinstock, F Weinhold. Natural population analysis. **J. Chem. Phys.**, **83(2)**, 735-746 (1985).
 - P Geerlings, F Prot, W Largenaeker. Conceptual density functional theory. **Chemical Reviews**, **103**, 1793-1873 (2003).
 - G Narvaez, L Lareo, J Rincón. Generación de modelos matemáticos correlacionales entre afinidad y descriptores topológicos moleculares de antagonistas de glicina en receptores de glutamato. **Biomédica**, **27**, 116-132 (2007).
 - P Devijver, J Kittle. Pattern Recognition: A Statistical Approach, Prentice-Hall, Londres, United Kingdom, pp. 448 (1982).
 - M Nicklaus, N Neamati, H Hong, A Mazumder, S Sunder, J Chen, G Milne, Y Pommier. HIV-1 Integrase Pharmacophore: Discovery of Inhibitors through Three-Dimensional Database Searching. **J. Med. Chem.**, **40**, 920-929 (1997).
 - O Cabarcas, C Weinheimer, J Lisy. Size selectivity by cation-interactions: Solvation of K^+ and Na^+ by benzene and water. **J. Chem. Phys.**, **110**, 8429-8435 (1999)

37. R Huber, M Margreiter, J Fuchs, S Grafenstein, C Tautermann, R Klaus, FT Liedland. Heteroaromatic π Stacking Energy Landscapes. **J. Chem. Information and Modeling**, **54**, 1371–1379 (2014).
38. J Zhang, Y Gao, W Yao, S Li, TF Ming. Ab initio study of the π - π interaction in the pyridine dimer: effects of bond functions. **Computational & Theoretical Chemistry**, **1049**, 82-89 (2014).
39. A Yaya, E Tiburu, B Onwona-Agyeman, A Dodoo, J Efavi. A comparative study of DFT/LDA with higher levels of theory on π - π interactions: A typical case for the benzene dimer. **J. Computations & Modelling**, **4(3)**, 27-42 (2014).
40. J Tirado-Rives, W Jorgensen. Performance of B3LYP Density Functional Methods for a Large Set of Organic Molecules. **J. Chem. Theory Comput.**, **4(2)**, 297–306 (2008).
41. N Neamati. Patent small molecule inhibitors of HIV-1 integrase: A 10-year saga. **Expert Opin. Ther. Patents.**, **12(5)**, 709-724 (2002).