

DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE DERIVADOS TRIAZÓLICOS DA VANILINA COM POTENCIAL ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

Rodrigo Antônio Lopes da Silva¹; Róbson Ricardo Teixeira²; Poliana Aparecida Rodrigues Gazolla³; Fabrício Marques de Oliveira⁴

1 Bolsista PIBIC/CNPq, Engenharia Metalúrgica, IFMG Campus Ouro Branco, Ouro Branco - MG; lopesrodrigo091@gmail.com

2 Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa – MG

3 Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa – MG

4 Orientador: Pesquisador do IFMG, Campus ouro Branco; fabricio.marques@ifmg.edu.br

RESUMO

A busca por novos fármacos tem se baseado na utilização de metabólitos secundários (produtos naturais) produzidos por plantas e outros organismos. Esses metabólitos podem ser utilizados diretamente como compostos-modelos que podem ser quimicamente modificados para a obtenção de substâncias ainda mais eficientes. Além disso, a presença de anel 1,2,3-triazólico na estrutura molecular possui grande relevância na química medicinal. Sendo assim, objetivou-se unir a estrutura da substância natural vanilina com grupos triazólicos na busca por compostos mais ativos. O conhecimento da estrutura tridimensional de uma molécula é de fundamental importância, pois a partir de descritores energéticos e estruturais é possível analisar a interação da substância com seu alvo biológico. A estrutura de 8 compostos que estão sendo sintetizados em laboratório no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV) foram otimizadas e os parâmetros como energia dos orbitais moleculares de fronteiras HOMO e LUMO, GAP e momento de dipolo foram determinados utilizando o software Spartan. No estudo *in silico* foram avaliadas as propriedades ADMET (Administração, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade) a fim de analisar a biodisponibilidade dos compostos candidatos a fármaco. A análise de toxicidade *in silico*, especificamente o risco de causar genotoxicidade, mutagenicidade, efeitos irritante e sobre sistema reprodutor, foi realizada através do programa computacional Osiris Property Explorer. Parâmetros importantes no desenvolvimento de fármacos, e previstos pela “Regras de Lipinski” foram calculados utilizando a ferramenta online Molinspiration, bem como aqueles parâmetros estabelecidos por Veber e colaboradores. Nenhum dos compostos violou qualquer regra, apontando para a boa obediência aos parâmetros desejáveis para que um fármaco possa ter melhor permeabilidade e difusão no meio celular, bem como para a biodisponibilidade por via oral. Os compostos encontram-se em fase de síntese na UFV e posteriormente serão avaliados com relação a atividades fungicida, citotóxica e leishmanicida. Na sequência, os parâmetros estudados serão correlacionados com as atividades biológicas.

INTRODUÇÃO:

Alvo de grande interesse da comunidade científica, os óleos essenciais tem se tornado uma importante fonte de moléculas modelo para a descoberta de novos fármacos e agroquímicos ainda mais eficientes (AYAZ et al., 2017).

Um exemplo de substância natural popularmente conhecida e que apresenta grande importância, devido suas diversas aplicações e atividades biológicas, é a vanilina (**Figura 1**). Obtida tradicionalmente das sementes da vagem da *Vanilla planifolia*, a vanilina representa um dos aromatizantes mais importantes do mundo, sendo largamente utilizada em alimentos como bolos, doces, sorvetes, chocolates, bebidas e também em perfumes, tabacos, e fármacos (BAQUEIRO-PENA & GUERRERO-BELTRÁN, 2017).

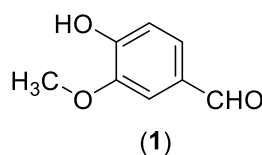


Figura 1. Orquídea *Vanilla planifolia* e estrutura química da molécula de vanilina (1).

Outras utilizações incluem desodorizantes de ambientes e ceras para pisos e assoalhos, além de atuarem como intermediários em sínteses de herbicidas, agentes antiespumantes, agentes antimicrobianos ou drogas como papaverina (antiespasmódica), L-dopa (antiparkinsoniano), L-metildopa (anti-hipertensivo) (PACHECO E DAMASIO, 2010; BAQUEIRO-PENA & GUERRERO-BELTRÁN, 2017).

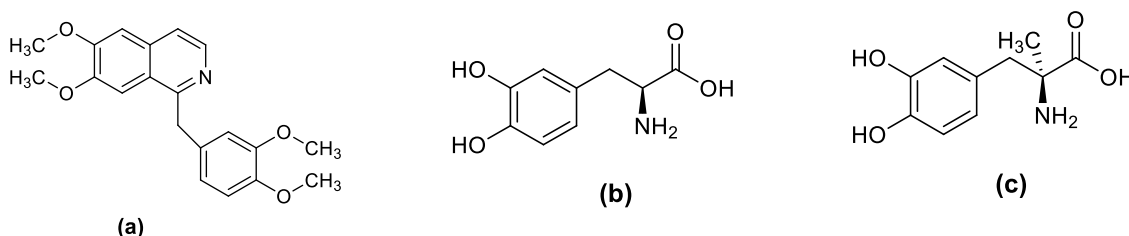


Figura 2. Estruturas químicas da papaverina (a), L-dopa (b) e L-metildopa (c).

Além do seu potencial antimutagênico (ANGELO E JORGE, 2007), suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes despertam grande interesse dos químicos sintéticos (BAQUEIRO-PENA & GUERRERO-BELTRÁN, 2017).

A vanilina pode ser sintetizada a partir do eugenol encontrado no óleo de cravo, da lignina contida no licor negro e através do uso de precursores derivado de petróleo tais como: guaiacol e *p*-cresol.

Compostos contendo o anel 1,2,3-triazólico possuem grande relevância na química medicinal pois, além de corresponderem ao grupo farmacofórico (MANETSCH et al., 2004; WHITING et al., 2006), são utilizados em estratégias de acoplamento de duas ou mais substâncias de interesse.

Atualmente, os grandes avanços na química computacional tem permitido obter grande desenvolvimento na área farmacêutica no que diz respeito ao racionamento de fármacos. Utilizam-se algoritmos de cálculos químico-quânticos que permitem obter parâmetros moleculares, expressando propriedades geométricas e eletrônicas das moléculas e suas interações em curto intervalo de tempo (ARROIO et al., 2010). Dessa forma, é possível utilizar modelos matemáticos para realizar o cálculo de propriedades moleculares e para a simulação do comportamento molecular, possibilitando o fomento no desenvolvimento de novos fármacos, a partir de fármacos pré-existentes e de novas substâncias que apresentam atividade biológica (SANT'ANNA et al., 2009). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar *in silico* derivados da vanilina contendo núcleos 1,2,3-triazólicos por modelo quântico, como etapa fundamental para futuros estudos de *drug design*. Esses compostos encontram-se em fase de síntese no Departamento de Química na Universidade Federal de Viçosa (UFV-MG), e terão suas atividades fungicida, citotóxica e leishmanicida avaliadas. Posteriormente, esses parâmetros serão correlacionados com a atividade biológica avaliada.

METODOLOGIA:

À medida que a etapa de síntese orgânica se encontra em execução e novas moléculas são obtidas, cálculos DFT foram realizados de forma a determinar as propriedades físico-químicas dos compostos. Tal estudo foi realizado no Instituto Federal de Minas Gerais (IFMG), campus Ouro Branco. A determinação do valor preciso destes parâmetros é importante para uma investigação no sentido de entender de maneira qualitativa e quantitativa a relação existente entre estrutura dos compostos sintetizados *versus* atividade biológica, bem como as características toxicológicas dos compostos.

Os cálculos DFT dos compostos foram realizados usando os softwares Spartan 14 (SPARTAN, 2014) e Gaussian 09 (FRISCH et al., 2009). A geometria molecular foi otimizada com cálculos de mecânica molecular com o pacote de ferramentas do Spartan 14 empregando-se o método MMFF. Na sequência, foi identificada a conformação de menor energia para cada caso. Os *outputs* obtidos com o software Spartan 14 foram utilizados para gerar os *inputs* para os cálculos com o software Gaussian 09. Os conformeros de menor energia foram otimizados em fase gasosa empregando-se o nível de teoria B3LYP/6-31(d), onde B3LYP é o parâmetro funcional híbrido Becke's usando a correlação funcional de Lee-Yang-Parr (BECKER, 1993). O método DFT/B3LYP é recomendado para cálculos de propriedades moleculares relacionadas a reatividade de moléculas, como as energias do orbital molecular ocupado mais alto (HOMO, em inglês *highest occupied molecular orbital*) e orbital molecular não ocupado mais baixo (LUMO, em inglês *lowest unoccupied molecular orbital*), bem como do momento de dipolo (ZHANG E MUSGRAVE, 2007;

KHAJEZHADEH e MOGHADAM, 2018; KURUVILLA et al., 2018). Os valores de energia de HOMO/LUMO e os momentos de dipolo foram obtidos a partir das geometrias resultantes dos cálculos DFT usando Gaussian 09 e Chemcraft 1.8 como ferramenta gráfica. Estes softwares vem sendo amplamente utilizados pela comunidade científica, sendo conhecidos mais de 23 mil estudos publicados que fizeram uso dos referidos softwares.

Os valores de propriedades físico-químicas como coeficiente de partição (miLogP), área de superfície polar topológica (TPSA), número de átomos (nAtom), de acceptor (nON) ou de doador de ligações de hidrogênio (nOHNH), e de rotações das ligações (nRot), volume e massa molecular, associadas a Regra dos cinco de Lipinski (LIPINSKI, 1997), foram determinados e calculados com o emprego do software Molinspiration, disponível online. Foi utilizado o software Osiris Property Explorer para predição de toxicidade. O programa Osiris prediz o risco da toxidade aos efeitos mutagênico, cancerígenos, tumorigênico, irritante e sobre o sistema reprodutor.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Os compostos **2-9** estão sendo sintetizados pelo grupo de pesquisa do Prof. Róbson Ricardo Teixeira, no Departamento de Química da UFV (**Figura 3**). Paralelamente, o grupo de pesquisa do IFMG determinou alguns parâmetros físico-químicos que possam ser correlacionados com as atividades biológicas a serem avaliadas, bem como os parâmetros desejáveis para obtenção de fármacos.

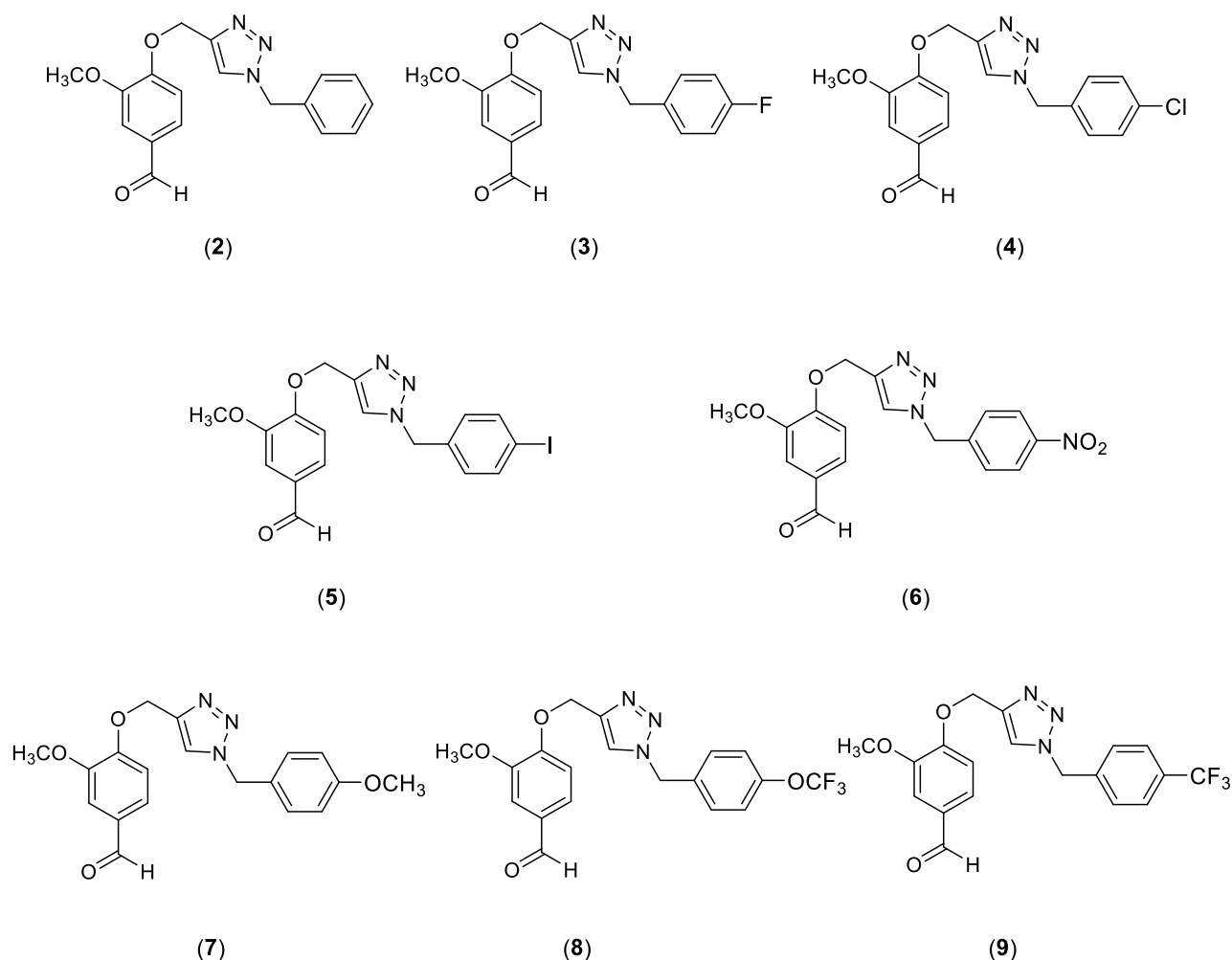


Figura 3. Compostos derivados da vanilina (1) propostos neste trabalho.

As estruturas dos compostos **2-9** foram submetidas à busca conformacional usando o software Spartan e o método de mecânica molecular MMFF. Foram encontrados de 18 a 22 confôrmeros possíveis

para cada composto, considerando nível populacional acima de 1%. As conformações diferem-se devido à rotação livre nas ligações simples. Como exemplo, pode-se citar o grupo metoxi (-OCH₃) do composto **7**, direcionado para a parte externa da conformação (confôrmero à esquerda, mais estável), enquanto na conformação à direita, o grupo metoxi (-OCH₃) está direcionado para a parte interna da conformação (**Figura 4**). Para a etapa de determinação dos valores do momento de dipolo, energias de HOMO e LUMO, foram considerados os confôrmeros mais estáveis (menor energia).

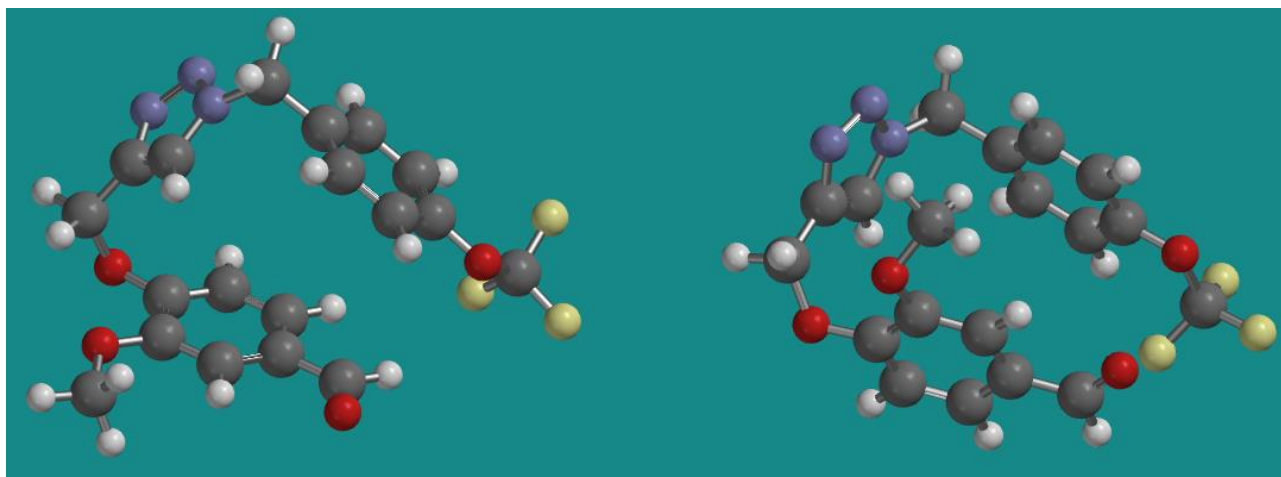


Figura 4. Exemplo de diferentes conformações para o composto (**8**)

O orbital HOMO atua como um doador de elétrons (nucleófilo) e o LUMO como aceitador de elétrons (eletrófilo). Estes orbitais de fronteira determinam a forma como as moléculas interagem com outras espécies e ajudam a caracterizar sua reatividade química. Moléculas com baixo GAP ($E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$) são mais polarizáveis e geralmente apresentam alta reatividade química (FLEMING, 2010). Pelos dados da Tabela 2 observa-se que houve pequena variação nos valores de energia de HOMO, oscilando de -6,07 a -6,29. Em contrapartida, o composto **6**, contendo o grupo -NO₂, apresentou menor valor de energia, -2,69, o que refletiu em menor valor de GAP (3,40). O composto **6** também apresentou o maior valor de momento de dipolo (7,20) dentre os compostos estudados. O momento de dipolo é um importante descritor molecular que dá a medida de polaridade de ligação e separação de carga em toda a molécula.

Tabela 2 - Valores de energia de HOMO, LUMO e GAP, e momento de dipolo dos compostos **2-9**

Composto	Energia do HOMO	Energia do LUMO	GAP	Momento de Dipolo (D)
2	-6,26	-1,61	4,66	4,13
3	-6,24	-1,62	4,63	3,49
4	-6,29	-1,63	4,66	3,67
5	-6,23	-1,58	4,65	3,59
6	-6,09	-2,69	3,40	7,20
7	-6,08	-1,59	4,48	4,49
8	-6,24	-1,57	4,66	3,98
9	-6,07	-1,51	4,55	4,99

Os derivados **2-9** foram analisados *in silico* pelo software molinspiration (MOLINSPIRATION, 2018a) em relação as suas propriedades físico-químicas e bioatividade e pelo software OSIRIS (ORGANIC CHEMISTRY PORTAL, 2018) quanto a possível toxicidade. O software molinspiration calcula as propriedades físico-químicas relevantes para solubilidade e permeabilidade do fármaco, tais como: aceptores de ligações de hidrogênio (nON), doadores de ligações de hidrogênio (nOHNH), massa molecular (MM), área e superfície polar topológica (TPSA), coeficiente de partição água/octano (miLogP), número de átomos (nAtom), volume e número de ligações rotativas (nRot). As propriedades físico-químicas descritas acima foram avaliadas de acordo com o emprego da Regra de Lipinski (LIPINSKI, 2004). De acordo com essa regra, também conhecida como “Regra dos Cinco”, uma molécula bioativa para ser utilizada e absorvida por difusão passiva deve apresentar coeficiente de partição (miLogP) inferior a 5,0, a massa molecular (MM) não deve ultrapassar 500 Daltons, não deve ter mais que 5 grupos funcionais doadores (nOHNH) e 10 grupos aceptores de ligação de hidrogênio (nON). Esta regra foi formulada para avaliar a semelhança ou determinar se um composto químico com certa atividade biológica ou farmacológica tem propriedades que o

tornam um provável fármaco a ser usado por via oral em humanos (LIPINSKI, 2004). Observa-se pela Tabela 1 que nenhum dos compostos violou qualquer uma das regras.

As estruturas químicas **2-9** sofreram avaliação na base OSIRIS Property Explorer para estimar o risco de efeitos tóxicos, tais como: tumorigênico, mutagênico, irritante e de efeitos reprodutivos. A ferramenta Osiris funciona através do uso de bases de dados que contém moléculas tóxicas e não tóxicas. A calibração do modelo é realizada com os fragmentos das moléculas, a partir da quebra de ligações simples, o que ocasiona fragmentos que constitui o efeito indesejado na molécula. Nas análises de predição de toxicidade *in silico* os resultados obtidos, dispostos na Tabela 1, indicaram que nenhum composto apresentou atividade tóxica para os riscos mutagênico, tumorigênico e sistema reprodutor, mas todos apresentaram sinalização para potencial efeito irritante. No entanto, acredita-se que esse efeito não confere maiores preocupações, uma vez que o método é baseado no sistema de fragmentos, e o fragmento responsável pelo efeito negativo é correspondente ao fragmento presente na estrutura da vanilina, que é comprovadamente utilizada em diferentes usos farmacológicos (BAQUEIRO-PENA & GUERRERO-BELTRÁN, 2017). Sendo assim, os compostos **2-9** mostraram-se promissores para o planejamento e desenvolvimento de novos fármacos devido ao baixo risco de toxicidade.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas e bioatividade dos derivados da vanilina (**2-9**) estimadas pelo software molinspiration e a toxicidade pelo software OSIRIS (*in silico*)

Propriedades estimadas	Compostos							
	2	3	4	5	6	7	8	9
Físico-químicas								
miLogP	2,72	2,88	3,40	3,80	2,68	2,77	3,69	3,61
TPSA	66,26	66,26	66,26	66,26	112,08	75,49	75,49	66,26
nAtom	24	25	25	25	27	26	29	28
MM	323,35	341,34	357,80	449,25	368,35	353,38	407,35	391,35
nON	6	6	6	6	9	7	7	6
nOHNH	0	0	0	0	0	0	0	0
N de Violações	0	0	0	0	0	0	0	0
nRot	7	7	7	7	8	8	9	8
Volume	291,03	295,96	304,57	315,02	314,37	316,58	331,31	322,33
Bioatividade								
Ligante GPCR	-0,06	-0,06	-0,07	-0,06	-0,20	-0,07	0,00	0,00
Modulador Canal Ion	-0,12	-0,13	-0,12	-0,12	-0,16	-0,12	-0,02	-0,03
Quinase Inibidor	-0,09	-0,05	-0,10	-0,07	-0,21	-0,09	-0,09	-0,03
Ligante Receptor Nuclear	-0,20	-0,16	-0,21	-0,16	-0,28	-0,17	0,01	-0,04
Inibidor Protease	-0,33	-0,33	-0,35	-0,37	-0,42	-0,29	-0,17	-0,25
Inibidor Enzimático	0,03	0,01	-0,01	-0,03	-0,09	0,02	0,03	0,02
Toxicidade								
Mutagênico	●	●	●	●	●	●	●	●
Tumorigênico	●	●	●	●	●	●	●	●
Irritante	●	●	●	●	●	●	●	●
Efeito reprodutivo	●	●	●	●	●	●	●	●

nON=aceptores de ligações de hidrogênio; nOHNH=doadores de ligações de hidrogênio; MM= massa molecular, TPSA=área e superfície polar topológica; miLogP coeficiente de partição água/octanol; nAtom= número de átomos; nRot=número de ligações rotativas; GPCR = Receptor acoplado à proteína G; ● risco baixo; ● risco médio; ● risco alto

Segundo Singh, Gupta e Verma (2013), para um estudo utilizando Molinspiration, a probabilidade da molécula ser bioativa existe se o *score* for maior do que zero, se o *score* estiver entre 0,00 e -5,00 a probabilidade de bioatividade é moderada e *score* menor do que -5,00 a molécula é considerada inativa. De acordo com os dados da Tabela 1, e com as considerações de Singh, Gupta e Verma (2013), é possível observar que os compostos avaliados tendem a apresentar índice pelo menos moderado para todas as bioatividades testadas. No caso da inibição enzimática os compostos **2, 3, 7, 8 e 9** apresentaram potencial bioativo.

Veber e colaboradores (2002) estabeleceram que compostos com uma TPSA menor ou igual a 140 Å² e um número de ligações rotáveis menor ou igual a 10, apresentaram elevada probabilidade de boa

biodisponibilidade oral. Os valores obtidos para esses parâmetros dos compostos (2-9) encontram-se dentro dos limites estabelecidos (Tabela 1), o que sugere que tendem a apresentar boa absorção se administrados por via oral.

CONCLUSÕES:

A modelagem molecular, com o auxílio da computação moderna, tornou-se uma importante ferramenta no processo do desenvolvimento racional de fármacos. Nesta pesquisa foi realizado o estudo computacional de 8 derivados triazólicos da vanilina com potencial atividade biológica. O trabalho envolveu a avaliação das propriedades físico-químicas e de toxicidade *in silico* dos compostos. Através dos estudos realizados para os compostos foi possível observar que os mesmos não violam os parâmetros da regra de Lipinski, portanto não tendem a apresentar problemas de biodisponibilidade oral. A área superficial polar topológica e o número de bandas rotáveis de todos os compostos avaliados apresentaram valores favoráveis dentro dos parâmetros estabelecidos. Os scores apresentados pelos compostos 2-9 sugerem uma moderada atividade na maioria das bioatividades avaliadas. A partir da predição de toxicidade dos compostos 2-9, todos apresentaram riscos teóricos para o efeito irritante, sendo que os demais parâmetros apresentaram risco teórico baixo. O estudo *in silico* de 2-9 sugere que estes compostos apresentam características e propriedades farmacocinéticas de moléculas bioativas condizentes com um candidato a fármaco. Desta forma, torna-se interessante a síntese e avaliação das atividades biológicas dos compostos para posteriormente terem os valores de energia de HOMO, LUMO e GAP correlacionados com as atividades, de forma a orientar o desenvolvimento de moléculas bioativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ANGELO, P.M. e JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: Uma breve revisão. *Revista Instituto Adolf Lutz*, v. 66, p. 232-240, 2007.
- ARROIO, A.; HONORIO, K. M.; SILVA, A. B. F.; Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. *Química Nova*, v. 33, n. 3, p. 694-699, 2010.
- AYAZ, M.; SADIQ, A.; JUNAID, M.; ULLAH, F.; SUBHAN, F.; AHMED, J. Neuroprotective and Anti-Aging Potentials of Essential Oils from Aromatic and Medicinal Plants, *Front. Aging Neurosci.*, v. 9, p. 1-16, May 2017.
- BAQUEIRO-PENA, I.; GUERRERO-BELTRÁN, J.A.; *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 6, p. 1-9, 2017.
- BECKER, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.*, v. 98, p. 5648-5653, 1993.
- Fleming, I. *Molecular Orbitals and Organic Chemical Reactions*. Reference ed; John Wiley & Sons, Ltd., Department of Chemistry, University of Cambridge, UK, 2010.
- FRISCH, M. J. et al. Gaussian '09, revision A.1; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.
- KHAJEHZADEH, M; MOGHADAM, M. Molecular structure, FT IR, NMR, UV, NBO and HOMO-LUMO of 1-(3-(dimethylamino)propyl)-1-(4-fluorophenyl)-1,3-dihydroisobenzofuran-5-carbonitrile by DFT/B3LYP and PBEPBE methods with LanL2DZ and 6-311++G(d,2p) basis sets. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 180, p. 51-66, 2017.
- KURUVILLA, T. K.; PRASANA, J. C.; MUTHU, S.; GEORGE, J.; MATHEW, S. A. Quantum mechanical and spectroscopic (FT-IR, FT-Raman) study, NBO analysis, HOMO-LUMO, first order hyperpolarizability and molecular docking study of methyl[(3R)-3-(2-methylphenoxy)-3-phenylpropyl]amine by density functional method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 188, p. 382-393, 2018.
- LIPINSKI, C. A. Lead and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, v. 1, n. 4, p. 337-341, 2004.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. S. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Review*, v. 23, p. 3-25, 1997.

MANETSCH, R.; KRASIŃSKI, RADIĆ, Z.; RAUSHEL, J.; TAYLOR, P.; SHARPLESS, B.; KOLB, H. C. In situ click chemistry: enzyme inhibitors made to their own specifications. *Journal of the American Chemical Society*, v. 126, p. 12809-12818, 2004.

MOLINSPIRATION. **Molinspiration Virtual Screening.** Disponível em: <<http://www.molinspiration.com/docu/miscreen/virtualsecreening.html>> Acesso em: 05 de Julho de 2019.

ORGANIC CHEMISTRY PORTAL. Toxicity Risk Assessment. Disponível em: <<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/tox.html>>. Acesso em: 05 de julho de 2019.

PACHECO, S. M. V.; DAMASIO, F. Vanilina: Origem, Propriedades e Produção. *Química Nova na Escola*, v. 32, p. 215-219, 2010.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. *Revista Virtual de Química*, v. 1, n. 1, p. 49-57, 2009.

SINGH, S.; GUPTA, A.K.; VERMA, A. Molecular Properties and Bioactivity score of the Aloe vera antioxidant compounds—in order to lead finding. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, v. 4, n. 2, p. 876-81, 2013.

Spartan'14; Wavefunction Inc: Irvine, CA, USA, 2014.

VEBER, D. F.; JOHNSON, S.R.; CHENG, H. Y.; SMITH, B. R.; WARD, K. W.; KOPPE, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

WHITING, M.; TRIPP, J. C.; LIN, Y.-C.; LINDSTROM, W.; OLSON, A. J.; ELDER, J. H.; SHARPLESS, K. B.; FOKIN, V. V. Rapid discovery and structure-activity profiling of novel inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 protease enabled by the copper (I)-catalyzed synthesis of 1,2,3-triazoles and their further functionalization. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, p. 7697-7710, 2006.

ZHANG, G.; MUSGRAVE, C. B. Comparison of DFT methods for molecular orbital eigenvalue calculations. *J. Phys. Chem. A*, v. 111, p. 1554-1561, 2007.