

VALIDAÇÃO LATERAL EM RELAÇÕES QUANTITATIVAS ENTRE ESTRUTURA E ATIVIDADE FARMACOLÓGICA, QSAR

Maria Luiza C. Montanari e Carlos A. Montanari*

Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, CP 702, 31270-901 Belo Horizonte - MG

Anderson C. Gaudio

Departamento de Física, CCE, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória - ES

Recebido em 27/11/00; aceito em 6/7/01

COMPARATIVE QSAR OF ANTIMICROBIAL HYDRAZIDES. The comparative QSAR is a tool for validating any statistical model that seems to be reasonable in describing an interaction between a bioactive new chemical entity, BIONCE, and the biological system. In order to deeper the understanding of the relationships and the meaning of parameters within the model it is necessary some kind of lateral validation. This validation can be accomplished by chemical procedures using physicochemical organic reactions and by means of biological systems. In this paper we review some of such comparisons and also present a lateral validation between the same set of antimicrobial hydrazides acting against *Saccharomyces cerevisiae* yeast and *Escherichia coli* bacterium cells. QSARs are presented to shed light in this important way of stating that the QSAR model is not the endpoint, but the beginning.

Keywords: QSAR; antimicrobial hydrazides; lateral validation.

INTRODUÇÃO

Uma análise da interação vida-química facilmente resulta em benefícios à saúde humana porque se está tentando estimar os efeitos tóxicos necessários e não-necessários de fármacos, pesticidas e substâncias químicas naturais e industriais em várias formas e partes da vida. A interação é um processo de duas mãos: enquanto as substâncias químicas afetam processos na vida, organismos vivos apresentam suas armas para atacar xenobióticos.

Uma maneira de compreender estas interações dá-se por relações entre a estrutura e a atividade, SAR. O principal aspecto inerente a esta observação vem da equação de Hammett

$$\log k = \rho\sigma + \text{constante} \quad (1)$$

onde os valores de σ são as constantes eletrônicas obtidas do (i) efeito do substituinte na ionização de ácidos benzóicos, (ii) da ionização de fenóis (σ^-) e (iii) da solvólise de $\text{XC}_6\text{H}_4\text{CClMe}_2$ (σ^+); k é uma constante de equilíbrio ou de rapidez, enquanto ρ é a medida da suscetibilidade da reação aos efeitos dos substituintes. Embora muitas dúvidas existam quanto ao funcionamento desta equação, a mesma trata de um dos conceitos de maior sucesso na elucidação dos mecanismos de reações.

Taft ampliou a equação de Hammett com a inclusão do parâmetro estéreo, E_s , que proporciona informações sobre a natureza do efeito do substituinte quando este estiver próximo do centro de reação. Hansch também ampliou a mesma equação quando introduziu o conceito de constantes lipofílicas em que sistemas biológicos são considerados.

Não obstante, a simples obtenção de uma relação quantitativa entre a estrutura química e a atividade farmacológica, QSAR, pode significar muito pouco no que diz respeito à sua validade e significado. A validação estatística do modelo constitui apenas a primeira

aproximação do significado enquanto que a correlação por validação lateral em termos de várias outras QSARs pode introduzir maior robustez ao modelo antes que ele seja testado na prática. Neste contexto, por exemplo, a busca das relações que apresentem reações de substituição nucleofílica com valores de ρ identificados em ordem crescente; a busca de todas as QSARs sobre bactérias; as reações em físico-química orgânica que contenham determinados coeficientes estéreis, E_s ; a busca de todas as equações de QSAR em tópicos individuais como microsomas, cloroplastos, oxidoredutases, plantas, insetos, humanos; substituições eletrofílicas, nucleofílicas ou adições; reações que ocorram via radical livre, etc, podem constituir importantes bancos de dados capazes de consubstanciá-las de forma a propiciar uma validação lateral apropriada¹⁻⁴.

Há, pelo menos, duas possibilidades de se realizar uma validação lateral: uma baseada em físico-química orgânica e outra em QSARs biológicas. A principal justificativa para isso pode ser encontrada no fato de que é muito pouco provável que uma QSAR apenas seja suficiente para imprimir um enorme significado nas interações vida-química - um sistema tão complexo que somente a mãe natureza é ainda capaz de entendê-lo em sua plenitude.

VALIDAÇÃO DA QSAR^{1, 5-10}

A validação da QSAR através da físico-química orgânica esbarra, inicialmente, nos parâmetros estatísticos. Embora os parâmetros sejam eventualmente satisfatórios ao entendimento de qualquer pessoa especializada em estatística, a questão importante a ser respondida é: o modelo foi obtido por correlação por chance, e caso contrário, o que ela significa? Parece óbvio, portanto, que a estatística sozinha não é capaz de responder a essa questão. Logo, uma validação lateral pode introduzir novas perspectivas em seu significado.

A Tabela 1 apresenta alguns exemplos ilustrativos da validação baseada em físico-química orgânica.

Embora as estruturas e as condições de reações bem como os substituintes sejam distintos para a equações A-C, Tabela 1, os valores de ρ estão na média $2,25 \pm 0,25$. O significado deste resultado

*e-mail: montana@dedalus.lcc.ufmg.br

Tabela 1. Validações em físico-química orgânica

No.	Tipo de reação	Condições experimentais	Equação	n	r ²	s	Ref.
A	Hidrólise alcalina de XC ₆ H ₄ COOCMe ₃	Etanol 50% a 20 °C	log k = 2,18σ + 0,62	5	0,994	0,041	5
B	Hidrólise alcalina de XC ₆ H ₄ COOC ₂ H ₅	Etanol 87%, a 30 °C	log k = 2,51σ - 1,28	18	0,986	0,105	5
C	Hidrólise alcalina de XC ₆ H ₄ CN	Etanol 60% a 82 °C	log k = 2,13σ - 1,00	5	0,962	0,184	5
D	Desacilação de XC ₆ H ₄ COO-quimotripsina	pH 7,07, 25 °C	log k = 1,73σ - 2,07	7	0,943	0,177	5
E	Idem	pH 8,5	log k = 1,73σ - 3,48	11	0,922	0,275	5
F	Hidrólise alcalina de XC ₆ H ₄ COOCH ₃	Solução aquosa	log k = 1,66σ + 1,92	14	0,998	0,022	5
G	Inibição I ₅₀ de <i>E. coli</i> por XC ₆ H ₄ N=C=S	-	log 1/C = 2,27σ + 4,31	9	0,927	0,161	5
H	XC ₆ H ₄ N=C=S + C ₂ H ₅ OH @ XC ₆ H ₄ NHC(=S)OC ₂ H ₅	-	log k = 2,16σ - 4,80	8	0,951	0,181	5
I	XC ₆ H ₄ N=C=S + C ₆ H ₅ NH ₂ @ XC ₆ H ₄ NHC(=S)NHC ₆ H ₅	-	log k = 2,14σ - 3,13	4	0,988	0,060	5

*Vide o texto para as explicações.

está, obviamente, aquém da físico-química orgânica clássica. Ele estabelece um ponto de referência para o estudo de hidrólise enzimática de ésteres. Por exemplo, na hidrólise do éster XC₆H₄OCOCH₂NHCOC₆H₅ em tampão, ρ = 1,91, mas ρ para a hidrólise enzimática por tiol hidrolases no mesmo tampão é da ordem de 0,6⁵. A polarização da ligação éster pela enzima é o principal fator, e os efeitos polares dos substituintes contribuem muito pouco. Em outros casos, entretanto, a hidrólise enzimática valida hidrólises em sistemas não enzimáticos (ou vice-versa), Tabela 1, equações D, E.

Nesses dois exemplos de hidrólises (do que pode ser considerado como ésteres de ácidos benzóicos) baseadas em diferentes séries de compostos, há uma boa concordância nos valores de ρ, embora sejam inferiores a aqueles mostrados nas equações A-C. Essas equações podem ser comparadas com a equação F, Tabela 1.

As validações laterais em QSARs baseadas em sistemas biológicos incluem mudanças estruturais complexas em termos de fatores (i) eletrônico, (ii) estérico, (iii) lipofílico e (iv) topológico, que estão sendo analisadas em sistemas não-homogêneos.

Considere as seguintes equações⁵:

$$\log 1/C = 3,55\sigma - 3,88\sigma^2 + 1,62(^3\chi_p^v) - 5,11$$

(n = 13, r² = 0,762) (2)

$$\log 1/C = 0,92\pi + 2,08\sigma - 3,26$$

(n = 12, r² = 0,794, s = 0,314) (3)

para a atividade mutagênica de XC₆H₄CH₂N(Me)N=O em *Salmonella tifimurium* TA 1535.

O parâmetro ³χ_p^v é complexo. Ele é obtido da teoria de grafos cujo significado não é claro. Entretanto, é lícito considerar que seja colinear com a constante lipofílica, π. Não obstante, a questão importante a ser respondida é: qual das equações deve ser escolhida para futuros trabalhos? Os coeficientes de correlação são similares; a equação (2) tem três variáveis independentes enquanto que a (3) tem apenas dois, mas tem um objeto (composto) a menos. Questões como estas podem ser respondidas apenas com o estudo ampliado da validação lateral do modelo QSAR.

O estudo das interações hidrofóbicas em mutagêneses ilustra essa questão. O coeficiente angular (h) em log P de oito QSARs diferentes para uma variedade de compostos atuando em uma variedade de sistemas biológicos em teste pode ser encontrado na Tabela (2)⁵:

Os valores dos coeficientes angulares (h) estão na magnitude de 1 em termos do parâmetro lipofílico. Por isso, parece razoável assu-

Tabela 2. Coeficientes angulares (h) em π ou log P para diferentes tipos de compostos agindo em testes de mutagênese bacteriana

Tipo do composto	Teste	h
Composto nitro-aromáticos e heteroaromáticos	TA98	0,65
Composto nitro-aromáticos e heteroaromáticos	TA100	1,10
Aminas aromáticas e heteroaromáticas	TA98	1,08
Aminas aromáticas e heteroaromáticas	TA100	0,92
Compostos nitro-aromáticos	<i>E. coli</i>	1,07
XC ₆ H ₄ N=NN(R)CH ₃	TA92	0,95
XC ₆ H ₄ CH ₂ N(Me)N=O	TA1535	0,92
Quinolinas	TA100	1,14

mir que a equação (3) deva ser escolhida para futuros estudos, pelo menos até que o parâmetro ³χ_p^v seja adequadamente validado!

Uma maneira diferente de correlação lateral pode ser encontrada por comparação de sistemas biológicos diferentes interagindo com a mesma série de compostos químicos. As duas equações abaixo servem como exemplo para ilustrar a validação⁵.

$$\log 1/C = 0,92\log P + 0,53$$

(n = 12, r² = 0,996, s = 0,101) (4)

para a inibição de 50% do crescimento de leveduras e,

$$\log 1/C = 0,91\log P + 0,19$$

(n = 12, r² = 0,986, s = 0,162) (5)

para a concentração inibitória mínima (MIC) na condução nervosa de baratas.

Os coeficientes angulares das duas equações acima são muito parecidos, sugerindo que compostos lipofílicos perturbam a membrana de maneira similar.

A validação lateral também pode ser realizada em sistemas em que fatores eletrônicos e/ou estéreos estejam envolvidos. As equações G-I da Tabela 1 mostram os resultados.

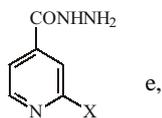
A concordância entre os valores de ρ sugere que a inibição do crescimento de *E. coli* por isotiocianatos acontece em reações com fragmentos nucleofílicos dentro da célula. A falta de um termo hidrofóbico indica que não há uma barreira lipofílica entre os isotiocianatos e os nucleófilos necessários para a inibição. Compare, ainda, estas equações com aquelas A-C da mesma Tabela 1.

Um exemplo que evidencia a importância de fatores eletrônicos e estéreos pode ser visto a seguir⁵.

$$\log 1/C = -3,70F + 0,89E_s + 5,78$$

(n = 17, r² = 0,835, s = 0,368) (6)

para a concentração inibitória mínima, MIC, de *Mycobacterium tuberculosis* por



$$\log k = -3,02F + 0,61E_s + 0,11$$

(n = 17, r² = 0,870, s = 0,275) (7)

para a rapidez relativa na alquilação de 2-X-piridinas por iodeto de metila em metanol.

A concordância entre os termos indutivo (campo) e estéreo é razoável do ponto de vista que um sistema homogêneo está sendo comparado a um heterogêneo.

O significado de um parâmetro padrão relativo ao grau de lipofilia de substâncias químicas pode ser ilustrado de maneira geral. Uma QSAR clássica mostrou que os valores ótimos de log P para a penetração de uma série de ácidos fenilborônicos no cérebro de camundongos era 2,3. Posteriormente, foi mostrado que uma grande variedade de substâncias químicas atuando como depressoras do sistema nervoso central, CNS, também possuía um log P próximo de dois. Dessa forma, o planejamento de novas substâncias com ação em CNS deve buscar o coeficiente de partição igual ou similar a dois, desde que outros fatores sejam similares ou iguais. Por outro lado, é bom enfatizar que esse resultado também ajuda na manutenção de outras substâncias fora do CNS.

Neste trabalho a mesma série de hidrazidas antimicrobianas foi testada, através da microcalorimetria biológica, frente à *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli*. A validação das QSARs obtidas foi estabelecida.

MATERIAIS E MÉTODOS

A síntese das hidrazidas (X-C₆H₄-C(O)NHNHC(O)C₆H₅, X = H, Br, NO₂, OMe, Me, C₆H₅, Pent, *t*-Bu) já está descrita¹¹. Os estudos da atividade farmacológica¹² bem como do coeficiente de partição¹³ também já foram descritos previamente.

Os cálculos dos parâmetros físico-químicos e topológicos para as oito hidrazidas em estudo foram realizados através do programa TSAR¹⁴, operando em uma estação de trabalho SiliconGraphics O2. As QSARs foram obtidas através do mesmo programa. As estruturas tridimensionais das hidrazidas em estudo foram obtidas por modelagem molecular através do programa Sybyl v.6.5.3¹⁵. As cargas foram geradas através do modelo de Gasteiger-Huckel, no mesmo programa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A equação 8 mostra a QSAR para a dependência da potência de acilidrazinas frente à *S. cerevisiae*, através do descritor lipofílico π e, a Tabela 3, os parâmetros originais. Os parâmetros estatísticos são significativos para a atividade das acilidrazinas, mas a validação cruzada (capacidade de predição) não é boa, já que apenas cerca de 38% da variância total está sendo predita pelo referido descritor. Para apenas um único descritor esse percentual pode ser considerado pequeno.

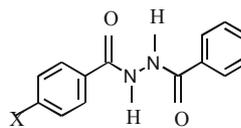
$$\log 1/C_{(50) Sc} = -0,210 (\pm 0,13) \pi + 3,745 (\pm 0,18)$$

(n = 8; r² = 0,728; s = 0,153; F = 16,073; r²_{cv} = 0,382) (8)

O resultado indicado na equação 8 mostra que, quanto maior a lipofilia do substituinte *menor* a potência da droga, ou seja, a potência aumenta com a hidrofília da molécula. Esse resultado é obtido por uma análise do coeficiente angular da reta, que é negativo. O efeito hidrófobo é detrimental para a ação biológica, o que não é comum^{16, 17}. É bem sabido que o aumento da concentração na fase lipóide provoca um aumento da potência da droga, mas não o contrário, ou seja, o aumento do caráter hidrofílico da droga é que está provocando o aumento da potência.

O coeficiente angular da equação 8 não está próximo da unidade, o que sugere uma relação não *homo-energética* da potência com

Tabela 3. Parâmetros biológicos e lipofílicos das hidrazidas em estudo



X	π^1	σ_p^1	MR^1	$\log D_{50}^2$ (Ec) ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	$\log D_{50}^2$ (Sc) ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	$\log P_{TA}^3$ (Ec)	$\log P_{TA}^3$ (Sc)	π_{TA}^4 (Sc)	π_{TA}^4 (Ec)	$\log k_w^5$
Br	0,86	0,23	8,88	2,73	2,47	-0,879	-0,693	0,201	0,215	2,754
CH ₃	0,56	-0,17	5,65	2,54	2,54	-0,956	-0,782	0,112	0,138	2,516
C(CH ₃) ₃	1,98	-0,20	19,62	3,21	2,75	-0,799	-0,516	0,378	0,295	2,726
C ₆ H ₅	1,96	-0,01	25,36	3,23	2,90	-0,787	-0,532	0,362	0,307	2,871
H	0,00	0,00	1,03	2,28	2,14	-1,094	-0,894	0,000	0,000	2,052
NO ₂	-0,28	0,78	7,36	2,41	2,22	-1,140	-0,944	-0,005	-0,046	2,250
OC ₂ H ₅	-0,02	-0,27	7,87	2,60	2,33	-1,001	-0,833	0,061	0,093	2,344
C ₅ H ₁₁	2,67	-0,16	24,26	3,05	2,62	-0,652	-0,439	0,455	0,442	2,936

¹Valores obtidos da referência Hansch, C.; Leo, A.; Hoekman, D.; In *Exploring QSAR. Hydrophobic, Electronic and Steric Constants*; ACS, Washington, 1995.

²Concentração necessária para inibir 50% do metabolismo das células de *E. coli* e *S. cerevisiae*, respectivamente.

³Valores relativos do coeficiente de partição obtido através da difusão modificada de Taylor-Aris, em sistemas celulares constituídos de meios de cultura apropriados para *E. coli* e *S. cerevisiae*.

⁴Constante lipofílica de Taylor-Aris: $\pi_{TA} = \log P_X - \log P_H$.

⁵Valores absolutos do coeficiente cromatográfico de partição, determinados via RP-HPLC.

o coeficiente lipofílico. É bem provável, como anteriormente ressaltado, que a descrição da potência necessite de outro mecanismo que não puramente o de partição.

A inclusão de termos eletrônicos e estéreos não melhorou a correlação, mas o uso da refratividade molar, MR , demonstra que há uma melhora do modelo. Veja discussão abaixo para o uso de MR como melhor descritor físico-químico para a atividade biológica das acilidrazinas. Observa-se, entretanto, que não se trata de um termo aditivo, mas sim de um termo que descreve sozinho a atividade farmacológica.

Como mencionado acima, é pouco comum que o uso da lipofilia não seja discernível ou pelo menos pouco discernível nos estudos de QSAR em sistemas celulares. O exemplo mais notável é aquele mostrado pelas sulfas, que descrevem a potência através de um coeficiente negativo para a partição^{16, 18, 19}. Seydel e colaboradores, no entanto, encontraram outro exemplo no caso de hidrazidas do ácido nicotínico atuando frente a *M. tuberculosis*. Seydel e colaboradores usaram valores de R_m para a obtenção das propriedades lipofílicas e Hansch e Leo²⁰ usaram $\log P$, mas nenhum dos parâmetros descreveu os dados adequadamente. As duas proposições de Hansch e Leo que parecem ser adequadas ao presente estudo são: o transporte ativo por um sistema com propriedades hidrofílicas poderia transportar a droga através da membrana lipídica e/ou o receptor poderia estar localizado próximo da superfície de modo que, como consequência, a droga poderia alcançá-lo através de um canal polar.

A constante lipofílica, π , representa apenas a contribuição fragmental do substituinte. Na descrição da dependência linear da potência de acilidrazinas frente a *S. cerevisiae*, o coeficiente para $\log P$ está próximo da unidade, o que reflete uma interação *homogênea*. Veja a equação 13. Então, é bem provável também que esse outro mecanismo represente a natureza global da molécula em termos de sua capacidade de particionar, ou seja, o balanço hidratação-desidratação envolve toda a molécula e não apenas uma subunidade lipofílica. O coeficiente angular de $\log P$ versus π (veja a equação 14) é relativamente próximo, embora menor, daquele mostrado na equação 8, mas é, certamente, muito distante da unidade. Isso demonstra que o próprio $\log P$ não está sendo definido *apenas* pela constante lipofílica do substituinte e, portanto, o fenômeno de transporte não está sendo governado apenas por uma subunidade molecular, mas sim pela molécula global. É provável ainda que π esteja descrevendo apenas a "cavidade" *eletrofílica* do sítio de interação que reconhece e engalinha essa subunidade estrutural. O seu intercepto (equação 8) também é bem elevado e demonstra que no início, ou seja, quando π é zero, a resposta biológica ainda é muito sensível. Esse resultado também confirma a expectativa de que as substâncias mais potentes estejam alinhadas com as substâncias mais hidrofílicas da série em estudo.

A lipofilia é considerada através das mudanças na energia livre da dessolvatação de um composto no seu movimento da fase aquosa para a biofase. A água de solvatação é mantida junto ao soluto^{21,22} de diferentes maneiras: estruturada ao redor do fragmento não polar, por ligações de hidrogênio e por interações dipolares. Nesse contexto, π poderia representar apenas a identificação da cavidade lipofílica (hidrofílica no presente estudo), ao nível do receptor.

Descritores Físicos da Estrutura Tridimensional (3D)

A importância da estereosseletividade na ação de um fármaco é bem conhecida. Há muitos exemplos que mostram a atividade dependente da sua configuração e geometria. Um dos exemplos é a diferença estabelecida entre isômeros ópticos, devido às suas capacidades de interagir seletivamente com um sistema biológico. Foram os físico-químicos orgânicos que definiram inúmeros parâmetros estéreos para

a descrição dos efeitos estéreos de substituintes em centros de reações de moléculas orgânicas. O mesmo tipo de efeito estéreo pode ser estabelecido e observado em estudos da variação das propriedades físicas e químicas, assim como a reatividade química, com a estrutura, quando um fármaco está envolvido em um sistema biológico.

Os descritores estéreos são classificados entre: (a) índices topológicos baseados na caracterização da estrutura química pela teoria de grafos, (b) descritores geométricos que resultam da visão de moléculas orgânicas em três dimensões, (c) descritores químicos que são derivados da influência estérea sobre reações padrões, (d) descritores físicos que resultam quando moléculas orgânicas são consideradas como objetos em três dimensões e seus tamanhos são determinados por propriedades físicas e (e) descritores diferenciais que resultam quando uma molécula orgânica é considerada como um objeto em três dimensões e que varia como resultado das diferenças com uma estrutura referência, através do método da sobreposição. Não é o objetivo deste artigo a discussão de cada um desses métodos, para o que se recomenda a referência²³. Ao contrário, apenas alguns descritores físicos serão estudados e, em particular, o de refratividade molar, MR .

Charton²⁴ mostrou que os volumes de van der Waals, V_w , são, em geral, muito correlacionados com a MR , que também pode representar fatores de polarizabilidade ao invés de fatores estéreos. Esta observação não é, entretanto, surpreendente, já que a MR está relacionada com o volume molar pela equação de Lorenz-Lorentz ($MR = (n^2 - 1/n^2 + 2).MW/d$). O intervalo de variação do índice de refração é pequeno e, conseqüentemente, MR é, em essência, o volume molar ajustado que contém uma contribuição eletrônica. Na realidade, a polarização de uma substância é dada pela equação 9, pois quando a relação de Maxwell $n^2 = \epsilon$ é estabelecida, a refratividade molar iguala-se à polarização molar.

$$P_M = (\epsilon - 1)/(\epsilon - 2).MW/d \quad (9)$$

onde ϵ representa a constante dielétrica.

Além disso, Dunn²⁵ mostrou que a polarizabilidade de uma molécula está relacionada com a polarização molar e a refratividade molar²⁶, enquanto que Cammarata²⁷ mostrou a dependência com o parâmetro lipofílico $\log P$ ²⁸. Como consequência natural, MR também pode ser dependente de π , já que ambos dependem do volume molar. Apesar disso, dependendo de uma escolha apropriada dos substituintes, MR pode ser ortogonal a π e, nesse caso, suas importâncias relativas podem ser estabelecidas.

Parece evidente que o papel de MR para um ligante pode ser ambivalente. Ele pode representar forças dispersivas que ajudam a interação do ligante ao receptor²⁹. Nesses casos esperar-se-ia um coeficiente positivo para MR . Alternativamente, uma vez que MR é, até um certo grau, uma medida de volume, ele pode medir a capacidade de o ligante distorcer a conformação do receptor para assim evitar a interação com o substrato. Como a mudança conformacional é detrimental, poder-se-ia esperar um sinal negativo para esse termo. Os coeficientes angulares negativos refletem, portanto, o impedimento estereoquímico.

Os dados biológicos quantitativos descritos acima podem ser avaliados em termos de MR . A equação 10 mostra os resultados obtidos para a dependência linear de MR frente a *S. cerevisiae*.

$$\log 1/C_{(50) s.c} = -0,273 (\pm 0,11) (0,1)MR + 3,883 (\pm 0,17) \quad (10)$$

(n = 8; r² = 0,857; s = 0,111; F = 36,66; r²_{cv} = 0,712)

A primeira hipótese que pode ser estabelecida a partir da equação acima é que as perturbações causadas pelos substituintes estão

correlacionadas com MR , sendo relativas às interações com resíduos polares do sítio receptor ou seu tamanho. O coeficiente angular negativo é uma indicação de que esse último é o fenômeno que está operando.

Como MR também é uma medida do volume do substituinte, ele pode ser responsável por mudanças conformacionais no receptor. MR é negativo e não é substituído por E_s (um descritor químico) já que há uma perda da qualidade do modelo. Portanto, é bem provável a existência de uma contribuição estereoquímica dos substituintes na posição-*para* da benzoilidrazina.

A equação 10 mostra que 86% da potência pode ser explicada pela refratividade molar. Uma comparação entre as equações 8 e 10 mostra que a melhor correlação é encontrada através do uso de MR como descritor físico-químico e não π . Entretanto, uma análise mais detalhada evidencia um elevado grau de similaridade entre ambas ($r^2 = 0,876$). A inclusão dos descritores π e MR no mesmo modelo não produz qualquer correlação significativa em π e um efeito aditivo entre ambos não está sendo estabelecido. Não obstante, essa aditividade não seria esclarecedora devido à elevada colinearidade entre ambos os descritores. Os coeficientes angular e intercepto são muito parecidos em ambos os modelos. Isso estabelece um grau de dificuldade na distinção entre ambos, apesar de, estatisticamente, o modelo representado pela equação 10 ser melhor. A capacidade de predição da equação 10 é muito superior àquela estabelecida pela equação 8, o que leva a optar pela equação 10.

Apesar de E_s não ser importante para a descrição da potência das acilidrazinas em estudo, outros parâmetros estereoquímicos, tais como E_s^c , STERIMOL, volume molar, podem ser usados no lugar de MR^4 .

Uma tentativa de correlacionar MR com o parâmetro STERIMOL, L , resultou na equação 11.

$$(0,1)MR = 0,515(\pm 0,21)L - 0,906(\pm 0,94) \\ (n = 8, r^2 = 0,857, s = 0,377, F = 35,96, r_{cv}^2 = 0,769) \quad (11)$$

Hansch e Leo³⁰ mostraram que MR de 101 substituintes diferentes também são correlacionados aos parâmetros esterimol $B1$, $B5$ e L . Entretanto, como se pode observar pela equação 11 apenas L descreve MR . Os demais parâmetros não são significativos. É interessante observar que o coeficiente angular de L na equação de Hansch-Leo, 0,4, é próximo daquele mostrado na equação 11, ou seja 0,5.

O parâmetro esterimol L também descreve a potência das acilidrazinas em estudo, mas o coeficiente de correlação é 0,6, enquanto que o coeficiente angular é -0,127, relativamente próximo daquele mostrado na equação 8. Como L representa o comprimento do substituinte ao longo do eixo da ligação a partir do carbono-4 do grupo fenila da acilidrazina, é provável que a cavidade do receptor não seja alongada, já que o *n*-pentila, por exemplo, o substituinte mais longo, apresenta uma das menores potências relativas, enquan-

to que os menores grupos H e Me, são os mais potentes. Π também é descrito por L ($r^2 = 0,674$) e o coeficiente angular é 0,547. Apesar disso, a potência das acilidrazinas continua sendo mais bem descrita por MR , sozinho. Mas parece óbvio que MR contém uma dependência estérea intrínseca e isso está sendo refletido na dependência da potência sobre o descritor geométrico L , elucidando uma característica extremamente importante sobre a natureza do receptor, assim mapeado.

Para uma série homóloga, $\log P$ e o tamanho do substituinte seriam perfeitamente colineares. Portanto, não é, em geral, muito fácil o planejamento de uma série congênica em que ambos não sejam parcialmente colineares. No presente estudo, $\log P_{TA}$,¹³ é bem correlacionado com MR ($r^2 = 0,821$) e também é relacionado com L ($r^2 = 0,635$). Entretanto, o que é surpreendente é o fato de que o coeficiente angular de L , 0,094, estabelece que $\log P_{TA}$ é muito pouco susceptível a L . O coeficiente de MR também é muito pouco significativo (0,192) e ambos são relativamente semelhantes, mas ambos não têm qualquer significado quando considerados aditivamente pela equação de Hansch/Fujita⁴. Uma possibilidade de descrever o tamanho dos substituintes dá-se através do uso da massa molar. Mas uma tentativa de correlacionar $\log P_{TA}$ com MW não levou a qualquer resultado significativo. O mesmo aconteceu para $\log 1/D_{50}(Sc)$ versus MW .

O volume dos substituintes pode ser usado no lugar de MR . Estes volumes calculados por dois métodos diferentes são aqueles representados por MG-Vol^{4, 31} e SA-Vol^{4, 32} e podem ser encontrados, juntamente com alguns outros, na Tabela 4.

MR é colinear com MG-Vol, $r^2 = 0,974$, e L também é, $r^2 = 0,826$. Então, embora as correlações acima sejam relativamente ineficazes está claro que tanto MR como L apresentam uma constituição de volume molar intrínseca.

Efeito Eletrônico

A equação 12 mostra os resultados da análise estatística para as potências frente à *S. cerevisiae* estabelecidas, quando o parâmetro eletrônico de Hammett ρ_p foi usado como descritor físico-químico. Como se pode observar, não há uma correlação estabelecida entre σ_p e $\log 1/C_{50}$. A capacidade de predição do modelo não tem qualquer significado.

$$\log 1/C_{(50) S.c} = 0,245 (\pm 0,75)\sigma_p + 3,536 (\pm 0,24) \\ (n = 8; r^2 = 0,095; s = 0,279; F = 0,632; r_{cv}^2 = -0,440) \quad (12)$$

A seleção do intervalo de variação de σ_p é: $-0,27 \leq \sigma_p \leq 0,78$. Isso mostra que apesar do intervalo relativamente bom, esse descritor eletrônico não foi necessário para descrever a atividade farmacológica em estudo. O valor de ρ da QSAR mostrada na equação 12 é posi-

Tabela 4. Alguns descritores físico-químicos em uso

Descritor/ Substituinte	Br	NO ₂	H	Me	OMe	<i>t</i> -Bu	C ₅ H ₁₁	C ₆ H ₅
E_s	-1,16	-1,765	0	-1,24	-0,55	-2,78	-1,64	-1,66
F	0,44	0,67	0	-0,02	0,26	-0,07	-0,06	0,08
r	-0,17	0,16	0	-0,13	-0,51	-0,13	-0,09	-0,08
L	3,82	3,44	2,06	2,83	3,98	4,11	6,97	6,28
$B1$	1,95	1,70	1,00	1,52	1,35	2,60	1,52	1,71
$B5$	1,95	2,44	1,00	2,04	3,07	3,17	4,94	3,11
MW	319,3	286,3	240,3	254,3	270,3	290,3	310,3	316,3
MG-VOL	0,197	0,196	0,022	0,163	0,221	0,585	0,726	0,630
SA-VOL	23,51	24,5	1,48	18,78	27,24	86,99	85,27	72,20

vo e descreve o aumento da potência através do aumento de σ_p . Compare seu valor absoluto com os coeficientes das equações 8 e 10. O aumento desse descritor implica, necessariamente, em que grupos elétron-retiradores sejam importantes para, provavelmente, aumentar a ionização dos grupos -NHR das acilidrazinas. Mas a pouca dependência de σ_p sobre a potência revela outra informação sobre o mecanismo de ação dessas acilidrazinas. A natureza da interação da droga atuando no receptor ao nível da extensão de cargas desenvolvidas no estado de transição não leva em consideração a transmissão dos efeitos eletrônicos dos substituintes para a composição da atividade farmacológica. Este resultado corrobora o fato de que somente o parâmetro de refratividade molar (e/ou lipofílico) é necessário para descrever a atividade farmacológica, já que σ_p também não é significativo no modelo aditivo.

Como a equação de Hansch/Fujita permite a inclusão de outros parâmetros eletrônicos que não apenas o σ_p de Hammett, os seguintes também foram estudados: σ^+ , σ^- , σ^0 , σ^* , σ_1 , σ_R , e, \Re e f de Swain-Lupton, sem resultar, entretanto, em modelos significativos.

S. cerevisiae: Relação Linear Atividade-Lipofilia ($\log 1/C_{50} = a \log P_{TA} + b$)

A equação 13 mostra os resultados obtidos quando as acilidrazinas foram estudadas frente à *S. cerevisiae* e sua dependência com $\log P_{TA}$, obtido a partir do método de Taylor-Aris¹³.

$$\log 1/C_{(50) S.c} = -1,223 (\pm 0,67) \log P_{TA} + 2,673 (\pm 0,49) \quad (13)$$

(n = 8; $r^2 = 0,771$; s = 0,141; F = 20,147; $r^2_{cv} = 0,532$)

onde $\log P_{TA}$ representa o coeficiente de partição obtido diretamente do sistema celular através do método de Taylor-Aris, e não do modelo octanol-água¹³.

A dependência linear de $\log P$ não constitui qualquer novidade, já que é bem sabido sobre esse comportamento e a literatura está repleta de exemplos dessa natureza. Entretanto, é bom ressaltar que o aumento linear da potência não permanece assim infinitamente com o aumento dos valores de $\log P_{TA}$, já que dependências parabólicas e bilineares também são encontradas.

É importante enfatizar que o modelo mostrado pela equação 13 constitui o primeiro exemplo que demonstra o uso do coeficiente de partição obtido diretamente em sistemas celulares. Esse modelo demonstra que a determinação de $\log P$ diretamente em sistemas celulares é viável e constitui um grande avanço na tecnologia atual.

O coeficiente angular da equação 13 é, virtualmente, 1, o que estabelece uma relação *homo-energética* entre a potência e a partição das drogas. Esse coeficiente angular é muito diferente daquele estabelecido pela equação 8 mas também é negativo. Portanto, considerações similares podem ser estabelecidas. Um coeficiente angular próximo da unidade, mas negativo, implica que as moléculas estejam quase completamente hidratadas e/ou engalfinhadas em uma cavidade hidrofílica ou em uma fenda de biomacromoléculas hidrofílicas no ponto crítico de suas ações.

Uma explicação provável para isso pode ser encontrada no fato de que a constante lipofílica da equação 8 foi obtida do sistema octanol-água, enquanto a partição mostrada na equação 13 foi obtida do próprio sistema celular. Ou seja, a lipofilia da fase biolipídica é menor do que aquela encontrada no sistema octanol-água. Este resultado está amparado pela correlação estabelecida entre $\log P_{TA}$ e π através da equação 14. É possível também que as moléculas ou suas subunidades lipofílicas sejam mantidas na superfície da biomacromolécula.

$$\log P_{(TA) S.c} = 0,176 (\pm 0,018) \pi - 0,880 (\pm 0,025) \quad (14)$$

(n = 8; $r^2 = 0,990$; s = 0,021; F = 586,67; $r^2_{cv} = 0,979$)

Está evidente a partir da equação 14 que a contribuição lipofílica do substituinte é suficiente para descrever o coeficiente de partição em *S. cerevisiae*, embora em pequena extensão.

Relação Linear Atividade-Lipofilia Calculada

O conceito de aditividade e constitutividade permite que os coeficientes de partição para inúmeras moléculas sejam calculados. Os $\log P_{calc}$ das hidrazidas foram correlacionados com as suas potências e a equação 15 mostra o resultado.

$$\log 1/C_{(50) S.c} = -0,232 (\pm 0,16) \log P_{calc} + 4,272 (\pm 0,53) \quad (15)$$

(n = 8; $r^2 = 0,674$; s = 0,168; F = 12,381; $r^2_{cv} = 0,095$)

A equação 15 é similar às demais equações que estabelecem a dependência das potências das acilidrazinas frente à *S. cerevisiae* e a constante lipofílica, π . Entretanto, há também uma consideração de extrema relevância que se refere às magnitudes dos coeficientes angulares. Para a dependência sobre $\log P_{TA}$, o coeficiente é próximo da unidade, mas inferior aos valores calculados, derivados da constante lipofílica ou mesmo do parâmetro cromatográfico (veja abaixo). Parece evidente que o sistema octanol-água como mimetizador da membrana biológica é mais lipofílico do que aquele experimentado pelo sistema celular. O coeficiente negativo, apenas enfatiza uma vez mais que as substâncias mais hidrofílicas é que produzem as maiores potências.

Relação Linear Atividade-Lipofilia Cromatográfica ($\log 1/C_{50} = a \log P_{oct} + b$, $\log 1/C_{50} = a \log k + b$ e $\log 1/C_{50} = a \log k_w + b$)

O parâmetro cromatográfico pretende descrever o coeficiente de partição octanol-água e o fez, mais uma vez, adequadamente. Entretanto, tem sido postulado que esse descritor também pode, naturalmente, ser incluído na análise da QSAR³⁴. A equação 16 mostra a dependência das acilidrazinas em estudo frente à *S. cerevisiae*.

$$\log 1/C_{(50) S.c} = -0,633 (\pm 0,43) \log k_{(w)} + 5,084 (\pm 1,06) \quad (16)$$

(n = 8; $r^2 = 0,682$; s = 0,166; F = 12,854; $r^2_{cv} = 0,474$)

A correlação mostrada na equação 16 é apenas razoável, apesar de ser estatisticamente válida. O coeficiente angular também é negativo e sua magnitude é da ordem de 0,6, um coeficiente menor do que a unidade, mas comum para sistemas celulares corroborando os resultados prévios. É interessante a sensibilidade da potência frente ao parâmetro cromatográfico. O elevado valor do intercepto indica essa sensibilidade.

Tem também sido postulado que a atividade farmacológica pode ser correlacionada com o parâmetro cromatográfico $\log k$ e a equação 17 mostra a correlação da potência de acilidrazinas frente à *S. cerevisiae* sobre $\log k(75\% \text{ MeOH}/25\% \text{ H}_2\text{O})$.

$$\log 1/C_{(50) S.c} = -0,534 (\pm 0,35) \log k_{(75\% \text{ MeOH}/25\% \text{ H}_2\text{O})} + 3,467 (\pm 0,15) \quad (17)$$

(n = 8; $r^2 = 0,694$; s = 0,162; F = 13,620; $r^2_{cv} = 0,188$)

Embora seja difícil estabelecer qual é a melhor entre as equações 16 e 17, está evidente que ambas são muito similares. Considerando-se, entretanto, a capacidade preditiva, r^2_{cv} , a equação 16 tem melhor significado. Portanto, parece ser real o argumento de que $\log k$ também pode ser usado como parâmetro cromatográfico para a partição e consequente descrição da potência biológica.

E. coli

As equações 18 a 22 mostram os resultados obtidos para a mesma série de acilidrazinas frente à *E. coli*. Muitos dos resultados dis-

cutidos para *S. cerevisiae* são válidos para *E. coli* e, portanto não serão abordados novamente.

$$\log 1/C_{(50) Ec} = -0,298 (\pm 0,14) p + 3,529 (\pm 0,20) \\ (n = 8; r^2 = 0,815; s = 0,169; F = 26,635; r_{cv}^2 = 0,597) \quad (18)$$

$$\log 1/C_{(50) Ec} = -0,374 (\pm 0,13) (0,1)MR + 3,708 (\pm 0,20) \\ (n = 8; r^2 = 0,893; s = 0,128; F = 50,503; r_{cv}^2 = 0,815) \quad (19)$$

$$\log 1/C_{(50) Ec} = -0,176 (\pm 0,13) L + 3,976 (\pm 0,59) \\ (n = 8; r = 0,797; s = 0,238; F = 10,461; r_{cv}^2 = 0,359) \quad (20)$$

$$\log 1/C_{(50) Ec} = -1,939 (\pm 1,03) \log P_{(TA)(E.c)} + 1,468 (\pm 0,96) \\ (n = 8; r^2 = 0,779; s = 0,185; F = 21,132; r_{cv}^2 = 0,535) \quad (21)$$

$$\log 1/C_{(50) Ec} = -0,900 (\pm 0,50) \log k_w + 5,431 (\pm 1,23) \\ (n = 8; r^2 = 0,734; s = 0,192; F = 19,353; r_{cv}^2 = 0,626) \quad (22)$$

Analisando comparativamente essas equações, o primeiro aspecto que parece de extrema relevância é que há nos estudos realizados, o encontro de uma situação reversa: ou seja, tanto para *S. cerevisiae* como para *E. coli* as diacilidrazinas têm um coeficiente angular negativo para π , $\log P$ e MR e, somente $\log P_{TA}$ e MR descrevem a QSAR com uma validação estatística mais apropriada. Veja a discussão abaixo sobre a validação cruzada.

O coeficiente negativo implica em que as acilidrazinas mais hidrofílicas e/ou menos volumosas sejam as mais tóxicas para a levedura e para a bactéria Gram-negativa.

Um dos primeiros exemplos sobre este comportamento, e possivelmente um dos mais esquecidos foi mostrado por Enders e Rohr³⁵, em 1942, quando a QSAR ainda não havia nascido!

Esses pesquisadores mostraram que a bactéria Gram-negativa *E. coli* sobreviveria um tempo suficientemente grande em tetracloreto de carbono para que a toxidez de álcoois pudesse ser investigada e, mostraram o que se conhece como *efeito hidrofóbico reversível*. A equação 23 mostra este resultado.

$$\log 1/C = -0,42 (\pm 0,20) \log P - 0,67 (\pm 0,12) \\ (n = 4; r^2 = 0,976; s = 0,054) \quad (23)$$

O coeficiente negativo da equação 23 estabelece que os álcoois mais hidrofílicos são mais tóxicos para a bactéria. Os álcoois polares são empurrados para fora do CCl_4 na direção da membrana bacteriana mais polar. Eles observaram ainda que os álcoois são mais tóxicos em CCl_4 do que em água, mas quando *Staphylococcus aureus* (uma bactéria Gram-positiva) foi usada, o meio praticamente não afetou a toxidez dos álcoois.

Talvez a primeira correlação envolvendo dados sobre atividade antibacteriana tenha sido desenvolvida por Bell e Roblin³⁶, através de uma relação parabólica entre pK_a e a potência de sulfas. Posteriormente, Silipo e Vittoria³⁷ mostraram que a inibição de *E. coli* pelas sulfas era descrita por uma relação bilinear, mostrada na equação 24.

$$\log 1/C = 0,97(\pm 0,10)pK_a - 1,56(\pm 0,52)\log(b.10^{pK_a} + 1) + 0,56(\pm 0,55) \\ (n = 87, r^2 = 0,878, s = 0,256; pK_a \text{ ideal} = 6,26) \quad (24)$$

A equação 24 está baseada nos dados de Bell e Roblin e Seydel e colaboradores^{38, 39}.

Uma primeira análise enfatiza que os efeitos hidrofóbicos podem não ter qualquer importância e 88% da variância em $\log 1/C$ não contém um termo em $\log P$ ou π .

Embora haja uma dificuldade com a determinação experimental de $\log P$ (ou mais precisamente $\log D$)^{18, 39}, porque boa parte dos compostos estaria ionizada em pH fisiológico, pode ser provável a existência de colinearidade entre pK_a e $\log P$ em seus valores extremos. Ou seja, compostos ionizados terão pequenos valores de $\log D$.⁴⁰ Entretanto, separar pK_a da lipofilia seria mais difícil do que sugere a equação 24^{41, 42}.

Inúmeras QSARs têm mostrado que há, pelo menos, dois tipos de coeficientes angulares para os termos $\log P$ e os exemplos mostrados a seguir servem para evidenciar muitas similaridades com os resultados obtidos, que os suportam claramente. Então, algumas limitações como o número de compostos ($n = 8$) passam a não ter muita importância já que os resultados refletem uma validação lateral ou pelo menos hipoteticamente lateral do modelo encontrado.

(i) Inibição do crescimento de *E. coli* por $ArCOO$ ⁴³

$$\log 1/C = 0,63 (\pm 0,26) \log P + 3,65 (\pm 0,54) \\ (n = 6; r^2 = 0,919; s = 0,138) \quad (25)$$

(ii) Inibição do crescimento de *E. coli* por amidinas: $X-C_6H_4CH_2NH(NH_2^+)NHR$ ⁴⁴

$$\log RBR = 0,67(\pm 0,17) \log P - 1,73(\pm 0,52)\log(\beta.10^{\log P} + 1) + 0,75 \\ (\pm 0,59)\sigma_x + (\pm 0,49) \\ (n = 20; r^2 = 0,854; s = 0,315; \log P_0 = 4,59 (\pm 1,4)) \quad (26)$$

Os coeficientes angulares das duas equações 25 e 26 são muito similares para diferentes compostos químicos. Por isso, é bem provável que ambas as séries de compostos experimentem uma mesma biofase.

A média entre ambos os coeficientes angulares é de 0,65, mas, obviamente que não se poderia imaginar que todos os coeficientes angulares fossem próximos dessa média para as células Gram-negativas. Os dois exemplos das equações G da Tabela 1 e 27 mostram que esses coeficientes podem ser bem diferentes⁴⁵.

$$\log 1/C = 0,42 (\pm 0,12) CLOGP + 6,39 (\pm 0,33) \\ (n = 11; r^2 = 0,865; s = 0,249) \quad (27)$$

para a inibição do crescimento de *E. coli* por alquilisotiocianatos.

No caso da QSAR mostrada pela equação G da Tabela 1 parece que todos os efeitos lipofílicos estão ausentes e apenas o efeito eletrônico parece ser importante. Entretanto, como sugere a própria equação 27, onde o efeito lipofílico é importante, a QSAR prévia pode precisar de uma melhor análise.

A inibição de 50% de células de *E. coli* por sulfonas¹⁸ é mostrada na equação 28.

$$\log 1/C = 0,61(\pm 0,13)CLOGP - 1,56(\pm 0,40)\log(\beta.10^{CLOGP} + 1) - \\ 0,48(\pm 0,24)\sigma + 4,45(\pm 0,21) \\ (n = 17, r^2 = 0,912, s = 0,220; \log P_0 \text{ ideal} = 1,15) (\pm 0,53) \quad (28)$$

Essa equação já apareceu no formato da equação 24, mas foi reescrita por Hansch e Leo⁴⁶. O modelo bilinear mostrado na equação 28 pode ser escrito na forma da equação modificada (29) quando os substituintes COO^- , $NHCH_2COO^-$ e $CONHNH_2$ são excluídos.

$$\log 1/C = -0,60(\pm 0,29)CLOGP - 0,47(\pm 0,31)\sigma + 5,34(\pm 0,60) \\ (n = 14; r^2 = 0,792; s = 0,249) \quad (29)$$

Embora a QSAR da equação 29 não apresente uma excelente correlação, ela é estatisticamente válida e seus coeficientes estão em concordância com aqueles da equação 28 e mostram que o efeito hidrofóbico não é artificial. O coeficiente de partição ideal da equação 28 é pequeno e o coeficiente angular de CLOGP na equação 29 é negativo. Parece que o significado reside no fato de as sulfonas não penetrarem na célula por difusão passiva, mas, provavelmente, através de um canal polar.

Os processos pelos quais substâncias químicas entram nas células não são entendidos claramente. Há pelo menos três caminhos que são bem aceitos: a difusão passiva através da membrana (parede celular), transporte ativo por um sistema dependente de energia, e a difusão através de canais especiais. O transporte passivo parece favorecido pelo aumento da lipofilia em uma série de substâncias congênicas. O transporte ativo depende do sistema de transporte que reconhece certas características estruturais, através do transporte por proteínas. Células Gram-negativas contêm canais construídos por uma tríade de proteínas chamadas porinas, que podem ser isoladas e reconstituídas em lipossomos para a realização de experimentos extra-celulares⁴⁷⁻⁵¹.

Essas porinas existem em uma camada extra na estrutura da parede celular e não estão presentes em células Gram-positivas. As células Gram-negativas parecem desenvolver resistência a certos tipos de substâncias tóxicas limitando a produção de porinas ou produzindo porinas com o tamanho do canal limitado. Com exceção do tamanho, as porinas atuam de maneira não específica já que permitem que uma variedade de moléculas hidrofílicas entre para o interior da célula. O limite máximo parece ocorrer para moléculas com massa molar até 500-600⁵².

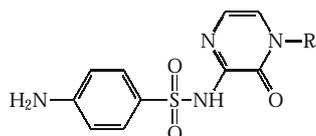
A superfície do canal da porina deve ser bem hidrofílica em natureza, já que Nikaido e colaboradores mostraram que a passagem através das porinas está correlacionada com o $\log P$ negativo^{49, 50}. Infelizmente, entretanto, os valores de $\log P$ de muitas substâncias estudadas não estão disponíveis, mas esses pesquisadores mostraram que a interação de porinas em lipossomos com açúcares e seus derivados era dependente do tamanho, medido pela massa molar das substâncias. Nenhum termo hidrofóbico foi necessário para a descrição da interação. Entretanto, Yoshimura e Nikaido⁵³ estudaram uma série de β -lactamas difundindo através de canais da porina de *E. coli* K-12 e Hansch e Leo⁵⁴ derivaram a QSAR respectiva mostrada na equação 30.

$$\log k = -3,09(\pm 2,3)\log MW - 0,37(\pm 0,38)\text{CLOGP} + 9,72(\pm 6,2) \quad (30)$$

(n = 9; r² = 0,687; s = 0,195)

Hansch e Leo sugeriram que embora a equação 30 não apresente uma correlação muito boa, ela é estatisticamente válida e estabelece que tanto o tamanho quanto a lipofilia são fatores importantes. Sugerem ainda, que essa equação tem o objetivo de motivar pesquisas que confirmem essa expectativa. Mas, em nosso entendimento, o termo CLOGP não é significativo uma vez que ele pode assumir o valor zero.

Doub e colaboradores⁵⁵ estudaram o efeito de sulfonamidas sobre *E. coli* em camundongos e, a partir de seus dados, Hansch e Leo⁵⁶ derivaram a equação 31.



$$\log 1/C = -0,79(\pm 0,18)\pi + 5,74(\pm 0,33) \quad (31)$$

(n = 7; r² = 0,962; s = 0,083)

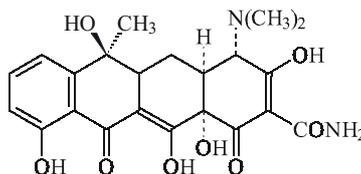
Apesar de os experimentos terem sido realizados em animais, a dependência da lipofilia é similar àquelas mostradas nas QSARs das equações 30 e 31. Ou seja, quanto mais hidrofílica a sulfonamida mais potente o fármaco.

Os coeficientes angulares também são próximos da unidade para diferentes moléculas frente à *E. coli*.

As tetraciclínas constituem uma classe importante de antibióticos de uso clínico e vários estudos têm sido realizados para elucidar suas SARs⁵⁷⁻⁵⁹.

Um resultado interessante foi mostrado por Miller e colaboradores⁵⁹: embora não haja qualquer correlação da potência de tetraciclínas com $\log P_{app}$, a inibição de células resistentes de *E. coli* por $\log P_{app}$ (determinado em pH 6,6) existe e está mostrada na equação 32.

A equação 32 mostra que quanto mais lipofílica for a tetraciclina, mais tóxica ela será para as células resistentes. Como as células são resistentes à tetraciclina, uma molécula polar - $\log P_{app} = -1,05$, parece que as células resistentes "ergueram" uma parede hidrofóbica para sua proteção, que somente pode ser penetrada por substâncias mais lipídeo-solúveis.

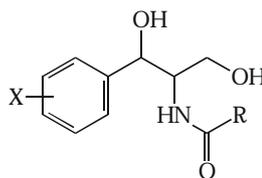


$$\log k = 1,30(\pm 0,52)\log P_{app} - 7,31(\pm 0,36) \quad (32)$$

(n = 12; r² = 0,750; s = 0,442)

Logo após sua descoberta em 1948, o cloranfenicol tornou-se um antibiótico importante. Tem sido estimado que entre os anos de 1950 e 1970 cerca de 40 milhões de pessoas usaram-no, mas devido a efeitos colaterais indesejáveis não tem sido mais usado com tanta frequência. Apesar disso, ainda há muito interesse científico nessa molécula, já que ela é capaz de inibir a síntese de proteínas por ribossomos bacterianos.

A inibição de *E. coli* por cloranfenicóis está mostrada na equação 33, onde R = CHCl₂.



$$\log k = 0,93(\pm 0,27)\log P - 1,5(\pm 0,94)\log(\beta \cdot 10^{\log P} + 1) + 1,30(\pm 0,81)\sigma^2 + 0,12(\pm 0,32) \quad (33)$$

(n = 16; r² = 0,867; s = 0,280; log P₀ = 1,92(±0,51))

Na equação 33, k representa a constante de rapidez do crescimento microbiano. O valor de $\log P_0$ é relativamente pequeno para culturas de células, sugerindo que algo mais do que a penetração celular associada ao aumento da lipofilia das moléculas pode estar participando do processo. Possivelmente, o sítio de ação tenha uma capacidade hidrofóbica limitada.

Tem sido sugerido que as células de leveduras parecem ser mais sensíveis a compostos hidrofóbicos do que bactérias⁶⁰. De qualquer maneira, parece evidente que os resultados obtidos e que consideram a atividade biológica de acilidrazinas frente à *E. coli* estão amparados em alguma evidência experimental de outras séries de compostos, validando dessa forma as QSARs propostas.

Correlação entre $\log P_{\text{bio}}$ e $\log P_{\text{oct}}$

A existência de correlações extratermodinâmicas entre as potências das acilidrazinas e os coeficientes de partição obtidos do sistema octanol-água, do sistema cromatográfico que o mimetiza e até mesmo aquele determinado no próprio sistema celular ($\log P_{\text{TA}}$) pode ser resumida através da Figura 1.

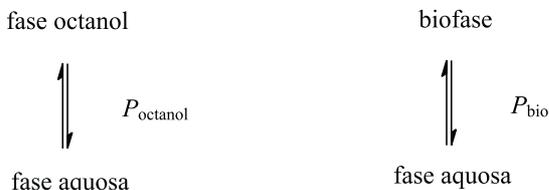


Figura 1. Modelagem de $\log P$ em octanol e biofase com a fase aquosa

Um postulado semelhante ao de Hammett (Collander⁶¹) estabelece a correlação entre $\log P_{\text{bio}}$ e $\log P_{\text{oct}}$, mostrada na equação 34.

$$\log P_{\text{bio}} = a \log P_{\text{oct}} + b \quad (34)$$

Postulando-se o modelo da equação 34, obtém-se as equações 35 e 36, para *S. cerevisiae*.

$$\log P_{\text{Sc}} = 0,2 (\pm 0,038) \log P_{\text{calc}} - 1,338 (\pm 0,12) \\ (n = 8; r^2 = 0,964; s = 0,039; F = 166,57; r_{\text{cv}}^2 = 0,899) \quad (35)$$

$$\log P_{\text{Sc}} = 0,512 (\pm 0,2) \log P_{\text{Kw}} - 1,958 (\pm 0,49) \\ (n = 8; r^2 = 0,867; s = 0,077; F = 38,82; r_{\text{cv}}^2 = 0,711) \quad (36)$$

Equações similares podem ser encontradas quando *E. coli* é usada como sistema biológico. As equações 37 e 38 mostram os resultados.

$$\log P_{\text{Ec}} = 0,169 (\pm 0,037) \log P_{\text{calc}} - 1,446 (\pm 0,12) \\ (n = 8; r^2 = 0,954; s = 0,038; F = 128,49; r_{\text{cv}}^2 = 0,920) \quad (37)$$

$$\log P_{\text{Ec}} = 0,446 (\pm 0,15) \log k_{\text{w}} - 2,000 (\pm 0,36) \\ (n = 8; r^2 = 0,904; s = 0,056; F = 56,35; r_{\text{cv}}^2 = 0,781) \quad (38)$$

Todas as correlações são excelentes e podem ser consideradas como representativas do fato de que a partição na biofase é mimetizada pelo sistema octanol-água. Entretanto, não se tratam de relações tipicamente *homo-energéticas*.

Validação Cruzada: *E. coli* versus *S. cerevisiae*

O correto entendimento das relações entre estrutura química e atividade biológica depende da validação lateral da QSAR^{1, 5-10}, ou seja, através de sua relação com uma matriz de relações autoconsistentes.

Como a atividade biológica de um composto é a combinação de vários efeitos distintos conhecidos e desconhecidos, é importante a determinação de diferentes efeitos biológicos em diferentes sistemas. A agregação desses efeitos e um “número mágico” - atividade biológica, reduz o conteúdo da informação e, portanto, faz-se mister a validação lateral.

A validação lateral realizada e agora mostrada está usando o seguinte conceito: a *mesma* série de compostos é estudada frente a *diferentes* sistemas celulares⁵.

A equação 39 mostra a dependência linear da potência de acilidrazinas frente à *S. cerevisiae* versus a potência frente a *E. coli* em uma relação de validação lateral.

$$\log 1/C_{50}(\text{Sc}) = 0,489(\pm 0,16) \log 1/C_{50}(\text{Ec}) + 2,065(\pm 0,49) \\ (n = 8; r^2 = 0,904; s = 0,093; F = 56,44; r_{\text{cv}}^2 = 0,788) \quad (39)$$

A equação acima representa uma relação extratermodinâmica entre atividades biológicas, ou seja, a atividade frente a leveduras e a atividade frente a bactérias, para a mesma série de compostos.

O processo de transporte é, aparentemente, o mesmo. A equação 40 estabelece uma correlação entre os coeficientes de partição em *S. cerevisiae* e *E. coli*.

$$\log P_{\text{Sc}} = 1,147 (\pm 0,25) \log P_{\text{Ec}} + 0,338 (\pm 0,23) \\ (n = 8; r^2 = 0,954; s = 0,045; F = 125,22; r_{\text{cv}}^2 = 0,921) \quad (40)$$

A equação 40 indica a existência de uma relação extratermodinâmica na partição entre a mesma série de compostos em diferentes sistemas celulares. Os coeficientes da equação 40 são positivos: o coeficiente angular tende a um enquanto que o linear tende a zero. O coeficiente angular próximo da unidade revela uma relação *homo-energética* entre as partições e pode ser uma consequência de modos de transportes similares. Ou seja, como a propriedade lipofílica não difere para compostos correspondentes, o efeito dos substituintes no processo de transporte é similar. Portanto, o processo de transporte da mesma série de compostos através de dois sistemas celulares diferentes deve experimentar um ambiente físico-químico similar. Este resultado sugere que os compostos perturbam a membrana para produzir o resultado final da mesma maneira.

O intercepto revela que, provavelmente, no início do processo as células de *S. cerevisiae* são mais sensíveis ao efeito lipofílico dos substituintes.

CONCLUSÃO

Os resultados acima descritos aliados a aqueles obtidos da literatura sugerem que a obtenção de um modelo em QSAR não é o suficiente para descrever um sistema heterogêneo como o biológico. Muitas vezes, um sistema homogêneo definido dentro dos limites da físico-química orgânica é usado comparativamente a esses sistemas biológicos heterogêneos. O fato de sua comparação ser possível estabelece um critério mais apropriado e robusto para a validação da QSAR, principalmente quando ela for usada como modelo de predição para a atividade farmacológica de substâncias jamais sintetizadas.

Os resultados apresentados neste artigo, entretanto, constituem apenas algumas intuições às possíveis relações de interação química-sistema biológico. Elucidar essas interações extremamente complexas não pode estar resumida a uma simples questão polinomial. Serão necessários que trabalhos cuidadosos de químicos(as) medicinais, juntamente com uma miríade de outras especialidades, sejam realizados e validados em bioquímica e/ou farmacologia antes mesmo que seus efeitos sejam delineados apropriadamente.

Dessa forma, este trabalho tem também o objetivo de incentivar a outros(as) pesquisadores(as) preocupações relativas às validações cruzadas, com características impressas de tal forma que os modelos não sejam apenas modelos, mas, muito mais do que isso, que sirvam para descrever a mãe natureza um pouco mais de perto.

GLOSSÁRIO DE TERMOS

$\log k$ = constante de rapidez ou equilíbrio de uma reação química; ρ = medida da suscetibilidade de uma reação química ao efeito

eletrônico do substituinte de Hammett; σ = efeito eletrônico do substituinte de Hammett; QSAR, do inglês, relações quantitativas entre estrutura química e atividade farmacológica; ${}^3\chi_p^v$ = índice de conectividade de valência-caminho de ordem três; $\log P$ = coeficiente de partição obtido, em geral, de octanol/água; n = número de objetos (compostos) em estudo; r^2 = coeficiente de correlação que mede a capacidade de ajuste de pontos a uma curva; s = desvio padrão ao ajuste da curva; F = teste de Fisher; r_{cv}^2 = validação cruzada que mede a capacidade preditiva do modelo. Os valores entre parênteses nas equações representam o limite de confiança de 95%; $\log 1/C_{(50)}$ = concentração necessária para inibir 50% do crescimento ou metabolismo celular; MR = refratividade molar; L = mede o comprimento do substituinte ao longo de um eixo; π = constante lipofílica; $\log P_{TA}$ = coeficiente de partição obtido pelo método de Taylor Aris; $\log P_{calc}$ = valores de $\log P$ calculados por método fragmental; $CLOGP$ = valores de $\log P$ calculados pelo programa CLOGP; $\log k$ = fator cromatográfico de capacidade; $\log k_w$ = fator cromatográfico de capacidade obtido por extrapolação para 0% do agente modificador; $\log(\beta \cdot 10^{pKa} + 1)$ = modelo bilinear para a resposta biológica dependente da constante de ionização e de sua fração; $\log(\beta \cdot 10^{CLOGP} + 1)$ = idem, para a fração de partição; $\log P_{bio}$ = coeficiente de partição obtido diretamente em um sistema biológico: Sc para *S. cerevisiae* e Ec para *E. coli*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, FAPEMIG e FINEP pelo apoio financeiro aos projetos em realização no NEQUIM. Também agradecem a Oxford Molecular, Ltd., por fornecer o programa TSAR.

REFERÊNCIAS

- Garg, R.; Gupta, S. P.; Gao, H.; Babu, M. S.; Debnath, A. K.; Hansch, C.; *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 3525.
- Hansch, C.; McKarns, S. C.; Smith, C. J.; Doolittle, D. J.; *Chem-Biol. Interact.* **2000**, *127*, 61.
- Hansch, C.; *Crit. Rev. Toxicol.* **1995**, *25*, 67.
- Hansch, C.; Leo, A. Em *Exploring QSAR. Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*; Heller, S. R., ed.; ACS: New York, 1995.
- Hansch, C.; *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 147.
- Kurup, A.; Garg, R.; Corwin, C.; *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 909.
- Gao, H.; Denny, W. A.; Garg, R.; Hansch, C.; *Chem.-Bio. Interact.* **1998**, *116*, 157.
- Hansch, C.; Gao, H.; *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2995.
- Hansch, C.; Hoekman, D.; Gao, H.; *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1045.
- Garg, R.; Denny, W. A.; Hansch, C. *Bioorgan. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1835.
- Montanari, M. L. C.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 1998.
- Montanari, M. L. C.; Beezer, A. E.; Montanari, C. A.; Piló-Veloso, D.; *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3448.
- Montanari, M. L. C.; Beezer, A. E.; Montanari, C. A.; Piló-Veloso, D.; Volpe, P. L. O.; Mitchell, J. C.; *Quant. Struct.-Act. Relat.* **1998**, *17*, 102.
- TSAR, v. 3.21. Oxford Molecular, Ltd., Oxford: U.K.
- Sybyl, v.6.5.3. Tripos, Inc.
- Seydel, J. K.; Schaper, K. -J.; Wempe, E.; Cordes, H. P.; *J. Med. Chem.* **1976**, *19*, 483.
- Montanari, M. L. C.; Beezer, A. E.; Montanari, C. A.; *Thermochim. Acta* **1999**, *328*, 91.
- Coats, E. A.; Cordes, H. -P.; Kulkarni, V. M.; Richter, M.; Schaper, K. -J.; Wiese, M. Seydel, J. K.; *Quant. Struct.-Act. Relat.* **1985**, *4*, 99.
- Seydel, J. K.; Burger, H.; Saxena, A. K.; Coleman, M. D.; Smith, S. N.; Perris, A. D.; *Quant. Struct.-Act. Relat.* **1999**, *18*, 43.
- Referência 4, p. 435.
- Tsai, R. S.; Fan, W. Z.; El Tayar, N.; Carrupt, P. A.; Testa, B. Kier, L. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9632.
- Schurhammer, R.; Wipff, G.; *J. Mol. Struct.-Theochem.* **2000**, *500*, 139.
- Silipo, C.; Vittoria, A.; Tute, M. S. Em *Comprehensive Medicinal Chemistry, The Rational Design, Mechanistic Study & Therapeutic Applications of Chemical Compounds*, Ed. Ramsden, C. A.; Quantitative Drug Design, 1990, Pergamon Press, vol. 4, p. 153.
- Charton, M.; Charton, B. I.; *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 2284.
- Dunn, W. J. III, *Eur. J. Med. Chem.-Chim. Ther.* **1977**, *12*, 109.
- Domine, D.; Devillers, J.; Chastrette, M.; *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 973; Idem, ibidem, p. 981.
- Cammarata, A.; Yau, S. J.; Rogers, K. S.; *J. Med. Chem.* **1971**, *14*, 1211.
- Bustamante, P.; Escalera, B.; Martin, A.; Selles, E.; *J. Pharm. Sci.* **1989**, *78*, 567.
- Agin, D.; Hersh, L.; Holtzman, D.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1965**, *53*, 952.
- Referência 4, p. 80
- Abraham, M.; McGowan, J.; *J. Chromatogr.* **1987**, *23*, 243.
- Pearlman, R.; University of Texas, Austin: Texas.
- Kubinyi, H. Em *QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches. Methods and Principles in Medicinal Chemistry*; Mannhold, R.; Krosggaard-Larsen, P.; Timmerman, H., eds.; VCH: Weinheim, 1993.
- Montanari, M. L. C.; Veloso, D. P.; Cass, Q. B.; Montanari, C. A.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1997**, *20*, 1049.
- Enders, G.; Rohr, E.; *Liebigs. Ann. Chem.* **1942**, *552*, 167.
- Bell, P. H.; Roblin, Jr., R. O.; *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, *64*, 2905.
- Silipo, C.; Vittoria, A.; *Farmaco* **1979**, *34*, 858.
- Seydel, J. K.; *J. Med. Chem.* **1971**, *14*, 724; Hansch, C.; *Classical and Three-Dimensional Qsar in Agrochemistry* **1995**, *606*, 254.
- Miller, G. H.; Doukas, P. H.; Seydel, J. K.; *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 700.
- Britto, M. M.; Cass, Q. B.; Montanari, C. A.; Aboul-Enein, H. Y.; *Chromatographia* **1999**, *22*, 2139.
- Martin, Y. C.; Hackbarth, J. J.; *J. Med. Chem.* **1976**, *19*, 1033.
- Balaz, S.; *Perspect. Drug Discovery Des.* **2000**, *19*, 157.
- Baldinger, L. H.; Nieuwland, J. A.; *J. Am. Pharm. Assoc.* **1933**, *22*, 711.
- McKay, A. F.; Garamaise, D. L.; Baker, H. A.; Hawkins, R. L.; Falta, B.; Gaudry, R.; Paris, G. Y.; *J. Med. Chem.* **1963**, *6*, 587.
- Vlachova, D.; Drobnica, L.; *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1966**, *31*, 997.
- Referência 4, p. 432.
- Nikaido, H.; Vaara, M.; *Microbiol. Rev.* **1985**, *49*, 1.
- Nikaido, H.; Rosenberg, E. Y.; Foulds, J.; *J. Bacteriol.* **1983**, *153*, 232.
- Fajardo, D. A.; Cheung, J.; Ito, C.; Sugawara, E.; Nikaido, H.; Misra, R.; *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 4452.
- Harder, K. J.; Nikaido, H.; Matsushashi, M.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1981**, *20*, 549.
- Nikaido, H.; Rosenberg, E. J.; *J. Bacteriol.* **1983**, *153*, 241.
- Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J.; *Adv. Drug Del. Rev.* **1997**, *23*, 3; Montanari, C. A.; Bolzani, V. S.; *Quim. Nova*, no prelo.
- Yoshimura, F.; Nikaido, H.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *27*, 84; Simonet, V.; Mallea, M.; Pages, J. M.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 311.
- Referência 4, p. 429.
- Doub, L.; Kroll, U.; Vandelbelt, J. M. e Fischer, M. W.; *J. Med. Chem.* **1970**, *13*, 242
- Referência 4, p. 434.
- Hansch, C. Em *Drug Design*; Ariëns, E. J., ed.; Academic: New York, 1971, vol. 1, p. 271.
- Peradejordi, E.; Martin, A. N.; Cammarata, A.; *J. Pharm. Sci.* **1971**, *60*, 576.
- Miller, G. H.; Smith, H. L.; Rock, W. L.; Hedberg, S.; *J. Pharm. Sci.* **1977**, *66*, 88.
- Hansch, C.; Kim, D.; Leo, A. J.; Novellino, E.; Silipo, C.; Vittoria, A.; *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **1989**, *19*, 185.
- Collander, R.; *Physiol. Plantarum* **1960**, *13*, 179; Montanari, M. L. C.; Montanari, C. A.; Pilo-Veloso, D.; Cass, Q. B.; *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **1997**, *20*, 2495.