

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por ANDERSON COSER GAUDIO e aprovado pela comissão julgadora.

UNICAMP (SP), 13 de agosto de 1992



Prof. Dr. Yuji Takahata

Presidente da Comissão Julgadora

**Estudo Teórico das Relações entre Estrutura
Química e Atividade Biológica de Antagonistas do
Cálcio da Classe 1,4-Diidropiridinas**

Mestrando: Anderson Coser Gaudio

Orientador: Prof. Dr. Yuji Takahata

Co-orientador: Prof. Dr. Andrejus Korolkovas[†]

[†] Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo

Eu não poderia deixar de dedicar este trabalho à melhor amiga que jamais tive na vida, ela que é um raro exemplo de bondade, compreensão e carinho, pessoa de quem tive o privilégio de ser filho ... Maria.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar ao Prof. Dr. Yuji Takahata pela confiança depositada em minha pessoa. Mesmo sendo o assunto de meu trabalho não exatamente coincidente com sua linha de pesquisa, o Prof. Takahata foi meu grande incentivador e aceitou de bom grado o desafio da orientação numa área de conhecimento ainda pouco explorada em nosso meio. Agradeço-lhe por sua infinita paciência nos momentos de discussão e confesso-me grande admirador de seu jeito simples e amigo. Se mais ele não pode me ajudar é porque em certos momentos estivemos trilhando juntos por caminhos desconhecidos, e o conhecimento chegava a nós quase que simultaneamente. De muito valeram sua experiência científica e seu bom senso oriental.

Agradeço também ao Prof. Dr. Andrejus Korolkovas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela ajuda oferecida. Seus conselhos e observações foram de enorme valia para mim e sempre vieram nos momentos certos. Agradeço-lhe por ter aceito o encargo de tornar-se meu co-orientador de tese e pelo interesse demonstrado em dar rumo correto a este trabalho. Aliás, não posso me esquecer de que o assunto deste trabalho surgiu de uma gentil sugestão do Prof. Korolkovas. Apesar de seus numerosos compromissos com o mundo científico e sua agenda extremamente *apertada*, ele nunca se furtou a correr em meu auxílio quando dele precisei. Sou profundo admirador de sua pessoa.

Agradeço aos colegas de trabalho do famoso bloco H do Instituto de Química da UNICAMP. Em particular gostaria de agradecer aos amigos Marcelo Giordan Santos, Nelson Henrique Morgon e Paolo Roberto Livotto pela ajuda oferecida e que sempre foi oportuna e também pelas discussões não menos proveitosas. O apoio e os ensinamentos que deles recebi, calcados em pura amizade, foram para mim inestimáveis. Agradeço também aos professores Rogério Custódio, Roy Edward Bruns, Pedro Antônio Muniz Vazquez, Yoshiyuki Hase e Márcia Miguel Castro Ferreira pelo auxílio prestado. Agradeço a colaboração das funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação Eliete de Sousa Brassolotto, Eliene de Fátima Pinheiro Nasciben e Elenice Maria da Silva. Agradeço também às funcionárias do setor de fotocópia Iara de Assis Desorde, Normelia Custódio Egydio e Maria Paula Nogueira de Carvalho pelo excelente padrão de trabalho, competência e bom atendimento. Meu eterno agradecimento aos funcionários anônimos responsáveis pela limpeza e manutenção das dependências do Instituto

de Química, sem o que este trabalho não teria sido possível.

Agradeço ao Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine pelas discussões que tivemos a respeito dos fundamentos de química quântica. Seus ensinamentos forneceram-me a base mais fundamental para que eu pudesse iniciar este trabalho com a devida confiança. Agradeço também à Profa. Dra. Antonia Tavares do Amaral do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e também ao Prof. Dr. Hugo Kubinyi da Universidade de Heidelberg - Alemanha - pelos ensinamentos valiosos na área de relações estrutura-atividade de fármacos. A contribuição oferecida por estes dois pesquisadores foi de enorme importância durante a elaboração de minha tese.

Finalmente agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa (FAEP) pelo suporte financeiro que tornou possível este trabalho de pesquisa.

Índice

Resumo	vii
Abstracts	viii
Legenda dos Quadros	ix
Legenda das Figuras	x
Legenda das Tabelas	xiv
Abreviaturas e Símbolos Utilizados	xvi
Introdução	1
Antagonistas do Cálcio	4
Histórico	5
Cálcio e Fisiologia Humana	9
Atividade Biológica das DHPs	16
Objetivos e Métodos	20
Objetivos	20
Método	21
Seleção dos Derivados da 1,4-Diidropiridina	21
Análise Conformacional	22
Cálculo de Propriedades Físico-Químicas	23
Relações Estrutura-Atividade	24
Mapeamento do Receptor Farmacológico das DHPs	24
Análise Conformacional	26
Análise das Curvas de Potencial da Ligação 8-7-4-3	27
Mínimos Absolutos de Energia Conformacional	30
Regiões Termodinamicamente Permitidas de Estabilidade Conformacional	32
Determinação da Geometria de Menor Energia	40
Geometria Molecular Selecionada Através das Curvas de Potencial	45
Características Geométricas Globais	48
Propriedades Físico-Químicas	54
Energias do HOMO e LUMO	56
Eletronegatividade de Mulliken	60
Dureza Absoluta	61
Índices Baseados na Teoria dos Orbitais de Fronteira	63
Cargas Atômicas Líquidas	66

Momentos Dipolares Total e Parciais	68
Polarizabilidade Molecular	71
Volume Molecular de van der Waals	73
Relações Estrutura-atividade	82
Histórico	82
Revisão dos Estudos Estrutura-Atividade das DHPs	94
Estudo QSAR Envolvendo Parâmetros Teóricos das DHPs	105
Análise dos Derivados <i>Orto</i>	111
Análise dos Derivados <i>Meta</i>	115
Análise dos Derivados <i>Para</i>	115
Análise dos Derivados <i>Orto e Meta</i>	116
Análise dos Derivados <i>Orto e Para</i>	119
Análise dos Derivados <i>Meta e Para</i>	122
Análise de Todos os Derivados Monossustituídos	123
Análise dos 45 Derivados das DHPs	124
Considerações Finais	126
Conclusões	129
Referências	131

Resumo

Fizemos um estudo teórico com o objetivo de correlacionar os aspectos geométricos e físico-químicos, de uma série de 45 moléculas, com as respectivas atividades biológicas. Os compostos utilizados neste estudo foram os derivados da 2,6-dimetil-3,5-dicarbometoxi-4-fenil-(substituído)-1,4-diidropiridina (DHP), por substituição de diversos grupos funcionais em posições variadas do anel fenílico. Utilizamos valores quantitativos da medida da atividade biológica das DHPs publicados alhures.

Primeiramente fizemos a análise conformacional das moléculas da série, onde determinamos a barreira rotacional do anel fenílico em torno do anel piridínico com o método semiempírico AM1. Usando cálculos de mecânica estatística, determinamos, para cada espécie química, o nível energético abaixo do qual existe uma população molecular de 99%. Sobreposmos cada um desses níveis às curvas de potencial e selecionamos regiões comuns de estabilidade conformacional para o ângulo torsional que une os dois anéis.

A partir daí otimizamos a geometria de cada molécula com o AM1 e calculamos diversas propriedades físico-químicas tais como potencial de ionização, afinidade eletrônica, momentos dipolares total e parciais, polarizabilidade e volume moleculares e diversos índices de fronteira. Ao correlacionarmos as diversas propriedades com a atividade biológica através de regressão linear múltipla, várias correlações interessantes surgiram e foram utilizadas para esclarecer alguns fatores que influenciam o mecanismo de ação das DHPs. Além disso, as correlações obtidas, juntamente com a análise conformacional, foram de ajuda para que pudéssemos propor um modelo simplificado para o receptor desses fármacos.

Abstracts

We have made a theoretical study whose purpose is to correlate the geometrical and physico-chemical properties of a series of 45 compounds to their biological activities. The compounds used in this study were the 2,6-dimethyl-3,5-carbomethoxy-4-(substituted)-phenyl-1,4-dihydropyridine (DHP) derivatives, where a large variety of functional groups were substituted in many positions of the phenyl ring. We used quantitative values of the DHP biological activity published elsewhere.

Fistly we analysed conformation of the series of molecules and determined the AM1 rotational barrier of the phenyl ring in relation to the pyridine ring. Using some statistical mechanics calculation, we constructed conformational percentage maps that indicate the level of energy which would encompass 99% of the molecules at 37° C. We superposed each of these maps, separated in groups of five compounds according to their biological activities, and it was possible to select common conformational stability regions for the torsional angle linking the two rings.

After that, we optimized the geometry of each molecule and calculated many physico-chemical properties like ionization potential, electronic affinity, total and partial dipolar moments, net atomic charges of the phenyl carbons, molecular polarizability, van der Waals volume, some frontier indices and some others. We correlated this properties to the biological activity through linear regression analysis. Many interesting correlations have emerged from the regression analysis and they were used to clarify some aspects that influence the DHP biological mechanism of action. Moreover, the obtained correlations, associated to the conformational analysis, helped us to propose a simplified model for the receptor site of this drugs.

Legenda dos Quadros

Quadro 1.1 - Metais presentes em algumas enzimas que atuam em organismos animais.	9
Quadro 1.2 - Principais características que distinguem os canais de cálcio do tipo T, L e N, presentes em tecidos musculares e neuronais.	12
Quadro 1.3 - Principais características que distinguem os canais de cálcio do tipo T, L e N, presentes nos tecidos neuronais.	13
Quadro 1.4 - Principais características das subunidades do canal de cálcio dependente de voltagem.	14

Legenda das Figuras

- Figura 1.1** - Gênese da nifedipina. 7
- Figura 1.2** - Representação esquemática da regulação de Ca^{2+} no plano celular. Estão desenhados os processos de captação e soltura intracelulares na mitocôndria (MI) e no retículo sarcoplasmático (SR), ligação do Ca^{2+} nas superfícies interna e externa da membrana plasmática, permuta $\text{Na}^+:\text{K}^+$ na membrana plasmática, expulsão do Ca^{2+} via Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática, entrada de Ca^{2+} via canais de íons incluindo o canal de Na^+ e os canais de íons voltagem-dependentes e os operados por receptor e a entrada de Ca^{2+} via processos de escoamento ou mediado por ionóforo (Ion. Ca^{2+}). 11
- Figura 1.3** - Estrutura subunitária do canal de cálcio do músculo esquelético do coelho, em que se representam as ligações dissulfeto, os locais de glicosidação e os locais de fosforilação. Notem-se as cinco subunidades constituintes do receptor dos diidropiridínicos bloqueadores dos canais de cálcio: α_1 , α_2 , β , γ e δ . As moléculas das DHPs ligam-se à subunidade α_1 14
- Figura 1.4** - Representação esquemática das características estruturais comuns ao receptor das DHPs e o CDP de Na^+ . As quatro unidades homólogas (I-IV), que se supõe estejam dispostas em torno do canal de cálcio, são mostradas linearmente. As subunidades α -helicoidais S1-S6 (da esquerda para a direita) em cada repetição (I-IV) também são mostradas. Os resíduos Arg (R) e/ou Lis (K) que são conservados nas repetições individuais do receptor das DHPs e nos três canais e nos três canais de Na^+ de sequência conhecida são mostrados em cada subunidade S4. Outros aminoácidos comuns aos dois tipos de receptores presentes em outras subunidades também são mostrados [Asp (D), Gli (G), Glu (E), Phe (F) e Asn (N)]. 15
- Figura 1.5** - Arranjo transmembrana proposto da subunidade α_1 do canal de cálcio do músculo esquelético de coelho. O esquema mostra o arranjo linear, embora os elementos I-IV envolvam o canal de cálcio, formando na realidade um arranjo aproximadamente circular, onde o elemento I está próximo ao elemento IV. 16
- Figura 1.6** - Fórmula estrutural da molécula da DHP. Os grupos substituintes, representados por X, são mostrados na Tab. 1.1. 18

Figura 3.1 - Numeração adotada para os átomos não hidrogenóides, presentes na molécula da DHP.	27
Figura 3.2 - Tipos básicos de perfis encontrados para as curvas de potencial das DHP.	29
Figura 3.3 - Localização dos mínimos de energia conformacional revelados pela análise das curvas de potencial de rotação do anel fenílico em relação ao anel piridínico.	31
Figura 3.4 - Curvas de potencial de rotação do ângulo torsional 8-7-4-3, juntamente com os níveis de energia abaixo dos quais ocorre uma população molecular de 99%.	34
Figura 3.5 - Curvas de potencial de rotação do ângulo torsional 8-7-4-3, juntamente com os níveis de energia abaixo dos quais ocorre uma população molecular de 99%.	35
Figura 3.6 - Curvas de potencial de rotação do ângulo torsional 8-7-4-3, juntamente com os níveis de energia abaixo dos quais ocorre uma população molecular de 99%.	35
Figura 3.7 - Curvas de potencial de rotação do ângulo torsional 8-7-4-3, juntamente com os níveis de energia abaixo dos quais ocorre uma população molecular de 99%.	36
Figura 3.8 - Curvas de potencial de rotação do ângulo torsional 8-7-4-3, juntamente com os níveis de energia abaixo dos quais ocorre uma população molecular de 99%.	36
Figura 3.9 - Curvas de potencial de rotação do ângulo torsional 8-7-4-3, juntamente com os níveis de energia abaixo dos quais ocorre uma população molecular de 99%.	37
Figura 3.10 - Curvas de potencial de rotação do ângulo torsional 8-7-4-3, juntamente com os níveis de energia abaixo dos quais ocorre uma população molecular de 99%.	37
Figura 3.11 - Curvas de potencial de rotação do ângulo torsional 8-7-4-3, juntamente com os níveis de energia abaixo dos quais ocorre uma população molecular de 99%.	38
Figura 3.12 - Curvas de potencial de rotação do ângulo torsional 8-7-4-3, juntamente com os níveis de energia abaixo dos quais ocorre uma população	

molecular de 99%.	38
Figura 3.13 - Resumo esquemático dos intervalos do ângulo torsional 8-7-4-3 permitidos a 99% das moléculas, a 37° C . Cada intervalo refere-se ao intervalo comum a cada grupo de cinco compostos apresentados nas Figs. 3.4-3.12.	39
Figura 3.14 - Comprimento médio, em Å , e os respectivos desvios padrões das principais ligações na molécula da DHP. Cada valor corresponde à média de 45 valores individuais.	40
Figura 3.15 - Angulos médios e os respectivos desvios padrões para as principais ligações dos derivados da DHP. Cada valor corresponde à média de 45 valores individuais.	41
Figura 3.16 - Comprimento médio, em angstrom, e os respectivos desvios padrões das principais ligações na molécula da DHP, segundo o critério das regiões termodinamicamente permitidas a 99% da população molecular (seção 3.3). Cada valor corresponde à média de 45 valores individuais.	46
Figura 3.17 - Angulos médios e os respectivos desvios padrões para as principais ligações na molécula da DHP, segundo o critério das regiões termodinamicamente permitidas a 99% da população molecular. Cada valor corresponde à média de 45 valores individuais.	47
Figura 3.18 - Características angulares médias do anel piridínico.	50
Figura 3.19 - Algumas distâncias médias de interesse, em Å Os desvios padrões são mostrados entre parênteses.	50
Figura 3.20 - Angulo disponível para rotação do anel fenílico e o intervalo de ângulos efetivamente utilizado por 95% das moléculas da série.	51
Figura 3.21 - Altura e largura médias do grupo fenil substituído. A altura foi tomada em relação ao átomo de hidrogênio ligado a C4.	52
Figura 3.22 - Representação esquemática de duas possíveis dimensões do receptor das DHPs. Esta suposição é possível graças ao conhecimento do comportamento da atividade biológica frente a substituições em certas posições da molécula.	53
Figura 4.1 - Comportamento da energia eletrônica em função do número de elétrons.	62
Figura 4.2 - Procedimento adotado para computar o volume molecular. A molécula é acomodada numa caixa retangular, que é dividida em cubos de 2 Å de aresta no	

primeiro nível. Os cubos são sucessivamente divididos à medida que processo de cálculo avança.	74
Figura 5.1 - Sobreposição das estruturas cristalográficas das 1,4-diidropiridina-lactonas mostrando as diversas orientações do anel fenílico conseguidas.	97
Figura 5.2 - Característica do ambiente do receptor do músculo do íleo de cobaias, na região de interação com o grupo fenil das DHPs, segundo Mahmoudian e Richards. O anel fenil liga-se ao receptor por meio de interações hidrofílicas (W) e lipofílicas (O).	102
Figura 5.3 - Representação esquemática da região do receptor das DHPs que interage com o substituinte presente na posição <i>para</i> . Quando o substituinte é pouco volumoso, seu encaixe na cavidade proporciona interação ótima do restante da molécula com os respectivos grupos complementares do receptor (a). No caso de um grupo substituinte volumoso o restante da molécula desloca-se da posição ideal de interação e a resposta biológica é reduzida (b).	117
Figura 5.4 - Representação esquemática da região do receptor que interage com o substituinte em <i>meta</i> . A região que ocasiona impedimento estérico aos derivados <i>para</i> deve estender-se até parte da região que interage com o substituinte ligado em <i>meta</i> . A ausência de equações específicas para os derivados <i>meta</i> -substituídos apóia esta hipótese.	119

Legenda das Tabelas

Tabela 1.1 - Medida quantitativa da atividade biológica dos derivados da DHP.	19
Tabela 3.1 - Energia da barreira rotacional da ligação 8-7-4-3 calculada pelo AM1. Os valores foram medidos a partir de gráficos de ΔH_f em função do ângulo torsional 8-7-4-3. Os perfis indicados referem-se à Fig. 3.2.	30
Tabela 3.2 - Nível de energia correspondente a 99% da população de cada uma das espécies químicas cujas curvas de potencial encontram-se nas Figs. 3.4-3.12. Os valores de E_{99} correspondem à coordenada Y das linhas horizontais tracejadas dessas figuras.	34
Tabela 3.3 - Principais ângulos torsionais médios e os respectivos desvios padrões calculados pelo AM1, na molécula da DHP, segundo o critério do mínimo absoluto de estabilidade conformacional. Cada ângulo citado corresponde à média de 45 valores individuais.	42
Tabela 3.4 - Valores (V) experimentais (E) e calculados (C) de alguns ângulos torsionais, para efeito de comparação. Os valores experimentais foram extraídos da referência 9.	43
Tabela 3.5 - Diferença energética, em kcal/mol, entre as possíveis conformações dos grupos carbometoxi, para cinco derivados da DHP.	44
Tabela 3.6 - Principais ângulos torsionais médios e respectivos desvios padrões calculados pelo AM1, na molécula da DHP. Cada ângulo citado corresponde à média de 45 valores individuais.	47
Tabela 4.1 - Energias do HOMO (ϵ_{HOMO}) e LUMO (ϵ_{LUMO}), momentos dipolares total (μ) e parciais (μ_{carga} e μ_{hibr}) e polarizabilidade molecular (α) para os 45 compostos da série.	76
Tabela 4.2 - Constante de hidrofobicidade de Hansch-Fujita (π), constante de Hammett dos substituintes na posição <i>meta</i> (σ_m), constantes de Verloop indicando a largura mínima (B_1) e o comprimento (L) do substituinte, eletronegatividade de Mulliken (χ_s), dureza (η) e volume molecular de van der Waals (V_{vdw}) para os 45 compostos da série.	77

Tabela 4.3 - Carga elétrica líquida sobre os átomos de carbono do anel benzênico dos 45 derivados da DHP, calculada a partir da função de onda fornecida pelo AM1.	78
Tabela 4.4 - Densidade eletrônica de fronteirados átomos de carbono do anel benzênico dos 45 derivados da DHP, calculada a partir da função de onda fornecida pelo AM1.	79
Tabela 4.5 - Densidade do orbital de fronteirados átomos de carbono do anel benzênico dos 45 derivados da DHP, calculada a partir da função de onda fornecida pelo AM1.	80
Tabela 4.6 - Densidade do radical de fronteira dos átomos de carbono do anel benzênico dos 45 derivados da DHP, calculada a partir da função de onda fornecida pelo AM1.	81

Abreviaturas e Símbolos Utilizados

- Å → Angstrom
AB → Atividade biológica
AE → Afinidade eletrônica
Arg → Arginina
Asn → Asparagina
Asp → Acido aspártico
AVA → Canal ativado por voltagem alta
AVB → Canal ativado por voltagem baixa
 B_1 → Parâmetro de Verloop correspondente à largura mínima do substituinte
 c → Coeficiente de expansão de orbitais atômicos
 c_k^{HOMO} → k-ésimo coeficiente de expansão do HOMO
 c_k^{LUMO} → k-ésimo coeficiente de expansão do LUMO
C → Concentração molar
CDP → Canal dependente de potencial
COR → Canal operado por receptor
DHP → 2,6-dimetil-3,5-dicarbometoxi-4-X-fenil-1,4-diidropiridina
 e → Carga do elétron / Base de Euler
E → Energia / Enzima
 E_{el} → Energia eletrônica
 E_{rot} → Energia da barreira rotacional
 E_s → Constante estérica de Taft
 $E_{(\tau)}$ → Energia estrutural definida pelo ângulo torsional τ
 E_{99} → Nível de energia abaixo do qual habitam 99% da população molecular
 EC_{50} → Concentração molar correspondente a 50% da concentração efetiva
 ED_{50} → Concentração molar correspondente a 50% da dose efetiva
F → Teste de variância / Campo elétrico
 $F_k^{(e)}$ → Densidade do elétron de fronteira do k-ésimo átomo
 $F_k^{(o)}$ → Densidade do orbital de fronteira do k-ésimo átomo
 $F_k^{(r)}$ → Densidade do radical de fronteira do k-ésimo átomo
Glu → Acido glutâmico
Gly → Glicina
HOMO → *Highest occupied molecular orbital*

I → Inibidor

I_o → Variável indicadora da presença de substituinte na posição *orto*

I_p → Variável indicadora da presença de substituinte na posição *para*

IC_{50} → Concentração molar do fármaco capaz de inibir 50% da contração de peças anatômicas de cobaias

k → Constante de Boltzmann

K → Kelvin / Constante cinética ou de equilíbrio

L → Parâmetro de Verloop correspondente ao comprimento do substituinte

LD_{50} → Concentração molar do fármaco capaz de matar 50% da população de cobaias

ln → Logaritmo neperiano

LUMO → *Lowest unoccupied molecular orbital*

Lys → Lisina

MI → Mitocôndria

mV → Milivolt

n → Número de objetos analisados pela equação de regressão

N → Número de elétrons

p → Pressão

P → Coeficiente de partição / Nível de significância estatística da regressão / Probabilidade

Phe → Fenilalanina

PI → Potencial de ionização

pS → Picosiemen

q → Carga atômica líquida

Q → Carga atômica total

QSAR → *Quantitative structure-activity relationships*

R → Coeficiente de correlação

R-H → Composto não substituído

R-X → Composto substituído pelo grupo X

RM → Refratividade molar

$r_{v,p}$ → Raio de van der Waals do substituinte, considerado esférico, localizado na posição *para*

s → Desvio padrão

SAR → *Structure-activity relationships*

SAS → *Statistical analysis system*

SCF → *Self consistent field*

SR → Retículo sarcoplasmático

T → Temperatura absoluta

V_{vdw} → Volume de van der Waals

X → Grupo substituinte do anel fenílico das 1,4-diidropiridinas

Z → Carga nuclear

Z_{conf} → Função de partição

Z_{conf}^{novo} → Função de partição normalizada

Z_{conf}^{velho} → Função de partição não normalizada

Z_0 → Função de probabilidade não normalizada integrada

Z_1 → Função de probabilidade normalizada integrada

α → Polarizabilidade molecular

β → Hiperpolarizabilidade de primeira ordem

γ → Hiperpolarizabilidade de segunda ordem

δ_k → Carga líquida do k-ésimo átomo

ΔH → Variação da entalpia de reação

ΔH_f → Variação da entalpia de formação

ΔU → Variação da energia interna

ΔV → Variação do volume

ϵ_{HOMO} → Energia do orbital molecular ocupado de mais alta energia

$\epsilon_{HOMO_{AMI}}$ → ϵ_{HOMO} calculado pelo método AM1

$\epsilon_{HOMO_{HAM/3}}$ → ϵ_{HOMO} calculado pelo método HAM/3

ϵ_{LUMO} → Energia do orbital molecular desocupado de mais baixa energia

$\epsilon_{LUMO_{AMI}}$ → ϵ_{LUMO} calculado pelo método AM1

$\epsilon_{LUMO_{HAM/3}}$ → ϵ_{LUMO} calculado pelo método HAM/3

ζ → Média da atividade biológica de uma série de compostos

ζ_H → Atividade biológica do composto não substituído

η → Dureza absoluta

Θ → Grau de rotação livre do anel fenil

μ → Momento dipolar total

μ_{carga} → Momento de carga pontual

μ_{hibr} → Momento de hibridização

ν → Constante de Zahradnik, similar a σ

ξ → Potencial químico

π → Parâmetro hidrofóbico de Hansch-Fujita

π_m → π do substituinte localizado na posição *meta*

ρ → Susceptibilidade de uma reação química ao efeito eletrônico do substituinte

σ_m → Parâmetro eletrônico de Hammett do substituinte localizado na posição *meta*

τ → Ângulo torsional

ϕ → Orbital atômico / Grupo fenil

χ → Eletronegatividade de Mulliken

χ_s → Eletronegatividade do substituinte

ψ → Orbital molecular

Ψ → Função de onda total

ω → Constante de Zahradnik, similar a ρ

Capítulo 1 - Introdução

A cada dia que passa a indústria farmacêutica mundial está mais preocupada com o planejamento racional de fármacos (Brown, 1985). E não é para menos. Para se colocar um novo medicamento no mercado, uma indústria farmacêutica de porte consome cerca de 10 anos de trabalho e mais de 230 milhões de dólares entre pesquisa e marketing[†]. No passado, boa parte do tempo e recursos eram desperdiçados em experimentos conduzidos à base de pura intuição e métodos empíricos, quando não ao acaso. Portanto, além do interesse científico natural que tal assunto desperta, existe enorme interesse comercial no sentido de que os esforços para tornar viável tal planejamento vinguem.

Para se levar a termo tarefa dessa envergadura é preciso descer ao nível molecular em busca de possíveis soluções. É bastante razoável começar a olhar para a molécula do fármaco em busca de propriedades físico-químicas que possam explicar sua atividade biológica. Ainda mais quando são conhecidos dois grandes grupos de fármacos, classificados quanto ao modo de ação: os fármacos estruturalmente inespecíficos e os estruturalmente específicos (Korolkovas & Burckhalter, 1988). Os primeiros são aqueles em que a ação biológica não está diretamente ligada à estrutura química, mas apenas na medida em que esta afeta as propriedades físico-químicas, sendo estas as responsáveis pelo efeito farmacológico que eles produzem. Um exemplo dessa classe de drogas são os antiácidos estomacais. A estrutura química destes compostos é importante apenas na medida em que eles possam agir como bases, sendo capazes de neutralizar o ácido clorídrico produzido no estômago. Os fármacos estruturalmente específicos, por sua vez, são aqueles cuja ação biológica está subordinada primordialmente à sua estrutura química, que deve adaptar-se à estrutura química tridimensional dos receptores existentes no organismo. Aliás, foi justamente o modo de ação desses fármacos que aventou a hipótese da existência dos receptores farmacológicos (Korolkovas & Burckhalter, 1988).

Os fármacos estruturalmente específicos são eficientes em concentrações mínimas, que são bem inferiores às dos estruturalmente inespecíficos. Eles apresentam uma estrutura química fundamental em comum, em que certos grupos químicos estão espacialmente orientados de forma semelhante. Pequenas variações em sua estrutura química podem ocasionar enormes alterações na atividade biológica. Acrescente-se a isso a especificidade

[†] Segundo dados do Center for the Study of Drug Development, Tafts University.

biológica. Certas drogas podem atuar de maneira intensa no músculo liso e ter pouca ou nenhuma ação sobre o músculo estriado, como por exemplo a epinefrina (Korolkovas & Burckhalter, 1988).

Portanto é bastante plausível acreditar-se na existência de regiões, ao nível molecular, que teriam estrutura complementar à do fármaco. Este teria seu modo de ação baseado na formação de um complexo com o correspondente receptor que, ao ser formado, desencadearia a ação biológica. Assim, o estudo dos fatores físico-químicos que influenciam a formação do complexo fármaco-receptor parece ser o caminho mais indicado para quem está interessado em desenvolver um planejamento racional de fármacos.

Dentro dessa linha de raciocínio, a questão seguinte seria especular sobre que fatores físico-químicos teriam importância na formação de tal complexo. Não faria mal algum tentar estabelecer pequena analogia entre as reações orgânicas ordinárias e o sistema que estamos tentando modelar. Uma vez que nos sistemas biológicos alguns parâmetros, tais como temperatura, pH dos fluidos orgânicos, etc, permanecem aproximadamente constantes e fora de nosso controle, vamos considerar apenas aqueles que podem ser manipulados independentemente do sistema homeostático animal.

Não devemos nos esquecer de que no fundo estamos interessados em propriedades que determinem a afinidade e a capacidade de ligação de uma molécula por outra, não importando seu tamanho ou complexidade. Surgem então em nossa mente os fatores eletrônicos e estéricos. Os primeiros seriam os responsáveis pela afinidade de uma molécula por outra. Os efeitos indutivo e de ressonância ocasionam o aparecimento de cargas parciais em regiões localizadas da molécula (Katrizky & Topsom, 1971). Desse modo, a molécula polarizada fica mais reativa, pois estará mais sujeita à atração eletrostática de outras moléculas igualmente polares. Os fatores estéricos estariam relacionados com a viabilidade física da ocorrência da ligação entre as moléculas reagentes. Todos sabemos que um grupo químico volumoso pode bloquear o acesso de um reagente ao centro de reação, e com isso dificultar ou até mesmo impedir que ela ocorra.

Da mesma forma, a molécula de um fármaco está sujeita a esses mesmos fatores quando consideramos a formação do complexo fármaco-receptor. A diferença entre este processo e uma reação química ordinária é que os parâmetros eletrônicos e estéricos são mais cruciais. Isto porque devemos considerar a necessidade de um encaixe de toda ou de grande parte da molécula do fármaco na estrutura do receptor, ao contrário de uma simples reação, em que

nossa atenção está voltada para o centro de reação e suas circunvizinhanças imediatas. A estereoquímica do processo fármaco-biológico é absolutamente fundamental. Não são raros os casos em que isômeros ópticos de substâncias biologicamente ativas não apresentam qualquer efeito farmacológico. Alguns isômeros possuem até atividade totalmente inversa (Miller, 1987).

Por outro lado, as condições particulares dos sistemas biológicos fazem com que uma outra propriedade seja relevante para a atividade biológica. Quando consideramos a aproximação entre a molécula de um fármaco e seu receptor, devemos levar em conta o seguinte aspecto. A molécula da droga encontra-se mais ou menos interagida com diversas moléculas do solvente (Kubinyi, 1979). Estas conseguem organizar-se ao redor da molécula do fármaco com uma intensidade que depende das características elétricas de ambas. Por outro lado, os diversos sítios do receptor também encontram-se interagidos com moléculas do solvente. Portanto, para que a formação do complexo fármaco-receptor seja viável, a droga deve apresentar mais afinidade pelo receptor do que pelo solvente. Quando o complexo é formado, as moléculas do solvente localizadas na interface do mesmo são liberadas. Esse ganho de entropia é um dos responsáveis pela energia de estabilização do complexo fármaco-receptor (Rekker, 1977 e Tanford, 1973). Sabemos também que durante a absorção e o transporte através do organismo, as drogas devem transpor inúmeras barreiras compostas principalmente por membranas fosfolipídicas. Conseqüentemente, estão constantemente sujeitas a serem dissolvidas em meios hidrofílicos e lipofílicos. Como em geral não podemos introduzir o fármaco diretamente no seu local de ação, a absorção e o transporte do mesmo é um novo fator a ser considerado. Quanto mais complexo é o sistema biológico, mais importante será a influência da absorção e distribuição. A lipofilicidade é o principal fator que governa o transporte e distribuição dos fármacos em sistemas biológicos (Kubinyi, 1979).

Dessa forma, o planejamento racional de fármacos envolve o conhecimento das propriedades físico-químicas que governam os fatores eletrônicos, estéricos e hidrofóbicos, assim como deve ser capaz de estabelecer relações quantitativas entre essas propriedades e a atividade biológica (Hansch & Fujita, 1964; Hansch, 1969 e Purcell & Testa, 1977). Esse relacionamento normalmente é feito através de ferramentas estatísticas, comumente regressão linear múltipla. Por isso o planejamento de experimentos dessa natureza deve obedecer aos princípios gerais dos métodos estatísticos (Martin, 1978). Os modelos obtidos devem resistir aos testes de validade, limites de confiabilidade e análise de resíduos (Box *et al.*, 1978 e Draper & Smith, 1981). Todo rigor é necessário para que cheguemos a conclusões que possam ser sustentadas. Nesse caso, a análise sistemática dos resultados orienta a escolha de novos derivados do grupo de drogas

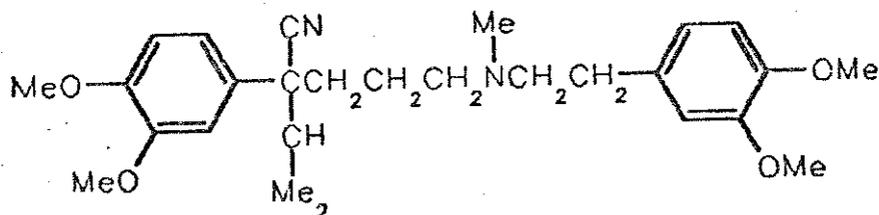
sob estudo para subsequente investigação. O processo continua de maneira ordenada e direcionada. Os objetivos maiores de todo esse esforço são caracterizar as diversas interações que ocorrem entre fármaco e receptor, conhecer melhor o mecanismo de ação das drogas, mapear a topografia dos receptores e eventualmente chegar a derivados mais potentes e que exerçam mínimos de efeitos colaterais indesejáveis.

1.1 - Antagonistas do Cálcio

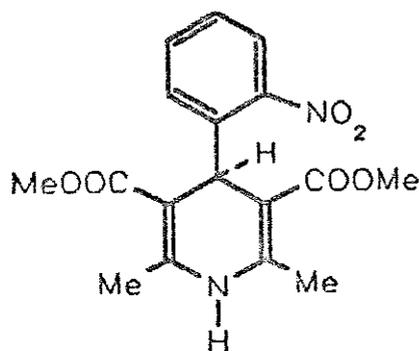
O grupo de compostos descritos como antagonistas do cálcio, antagonistas dos canais de cálcio, bloqueadores dos canais de cálcio e bloqueadores da entrada de cálcio foram introduzidos na clínica médica nos últimos quinze anos (Fleckenstein, 1977 e 1983). Este grupo de agentes, que incluem os fármacos clinicamente disponíveis verapamil, nifedipina e diltiazem, é usado com muito êxito em inúmeros distúrbios cardiovasculares incluindo angina em suas diversas formas, hipertensão arterial, distúrbios cardiovasculares periféricos e algumas arritmias cardíacas (Buhler *et al.*, 1984 e Opie *et al.*, 1984). Adicionalmente, estes agentes estão sendo empregados experimentalmente numa variedade de distúrbios que vão desde acalasia (falta de relaxamento de esfíncteres) até tonturas (Vanhouste, 1987). A recente classificação introduzida pela Organização Mundial da Saúde descreve verapamil (1.I) (fenilalquilamina), nifedipina (1.II) (1,4-diidropiridina) e diltiazem (1.III) (benzotiazepina) como representativos dos Grupos I, II e III de antagonistas específicos do cálcio, respectivamente.

Numerosos estudos que vão desde as primeiras observações de que os efeitos dos antagonistas do cálcio assemelhavam-se àqueles produzidos pela remoção de cálcio (e que seus efeitos poderiam ser superados pela adição de excesso de cálcio) até os últimos estudos eletrofisiológicos têm confirmado amplamente que as ações primárias dos antagonistas do cálcio são exercidas numa categoria de canal de membrana, o canal de cálcio dependente de potencial. Apesar da conhecida significância dos canais de cálcio dependentes de voltagem para a função neuronal, é notável que os antagonistas do cálcio correntemente disponíveis não exerçam maiores efeitos, experimentalmente ou terapêuticamente, em tecidos nervosos (Triggle, 1990).

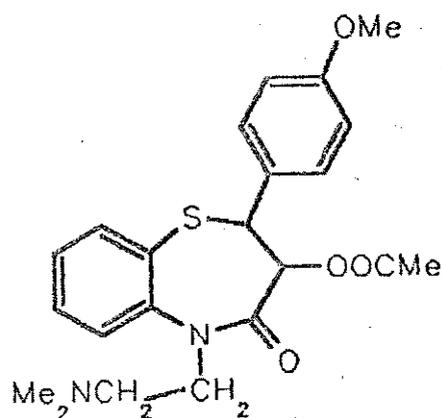
Os antagonistas do cálcio clinicamente disponíveis compreendem um conjunto de moléculas quimicamente heterogêneas. Desta forma, esses agentes não exibem espectro idêntico de efeitos farmacológicos e terapêuticos. A maior diferença é que a nifedipina e



(1.I)



(1.II)



(1.III)

outras 1,4-diidropiridinas são predominantemente espécies vasodilatadoras, enquanto que verapamil e diltiazem compartilham propriedades vasodilatadoras e cardiodepressivas. O efeito anti-hipertensivo da nifedipina e a atividade antiarrítmica do verapamil são diferenças particularmente óbvias. Essas diferenças são devido, no mínimo em parte, não a diferenças nos receptores dos músculos liso e cardíaco, mas sim às características especiais de cada interação fármaco-receptor (Triggle, 1990).

1.2 - Histórico

Recentemente Korolkovas *et al.* (1991) compilaram um breve histórico das etapas de síntese e desenvolvimento que originaram a nifedipina e os demais agentes 1,4-diidropiridínicos. Achemos interessante inclui-lo neste trabalho e vamos reproduzi-lo com

pequenas modificações.

Os fármacos do Grupo II, derivados da 1,4-diidropiridina, resultaram de extensa variação estrutural da molécula de quelina (estrutura I da Fig. 1.1), princípio ativo extraído das sementes de *Ammi visnaga*, da família das umbelíferas e que manifestou atividade dilatadora coronariana.

A primeira modificação consistiu de simplificação molecular: o anel furânico foi eliminado e substituído por um grupo éster carboxílico, resultando em derivados cromônicos (II). A substituição isostérica do átomo de oxigênio por nitrogênio e enxofre levou, respectivamente, a quinolonas (III) e tiocromonas (IV). Ambas as classes de compostos manifestaram alta atividade coronariana, mas são eficazes apenas por administração parenteral. A administração por via oral é inadequada, pois por esta via os compostos sofrem biotransformação, por hidrólise rápida do grupo éster, liberando o grupo carboxilato e resultando em compostos inativos.

Para impedir essa hidrólise, introduziram-se ésteres resistentes à hidrólise e reduziram-se os compostos a monocíclicos, como V, compostos que se mostraram inativos, talvez por redução drástica do volume do composto matriz. Reintroduziu-se o anel aromático, embora em outra posição, obtendo-se compostos do tipo VI, que manifestaram alta atividade. Estes compostos serviram de modelo às diidropiridinas (VII), algumas das quais exibiram atividade coronariana e eficácia por via oral.

Dos primeiros dois mil derivados sintetizados, a nifedipina (VIII) provou ser o mais interessante e foi introduzida na terapêutica em 1975. Hoje é disponível em mais de 50 países, devido à sua grande utilidade em cardiologia, no tratamento de angina de esforço, angina vasospástica e hipertensão essencial. Sua eficácia nestes quadros clínicos decorre principalmente de sua potente dilatação dos leitos periférico e arteriais coronarianos, conquanto possa também apresentar efeitos cardioprotetores durante a isquemia. No Brasil é comercializada sob os nomes de *Adalat*, *Adalat Retard*, *Cardalin Retard*, *Dilaflux*, *Dilaflux Retard*, *Nifedipina*, *Oxcord* e *Oxcord Retard*.

Os demais diidropiridínicos bloqueadores do canal de cálcio foram planejados também pelo método da modificação molecular, mas menos extensa. O protótipo foi a própria nifedipina. As alterações efetuadas na nifedipina, considerada de *primeira geração*, foram principalmente as seguintes: a) mudança do grupo nitro da posição 2 para a posição 3, ou substituição deste grupo por outro; b) aumento do volume dos grupos alquílicos (metil)

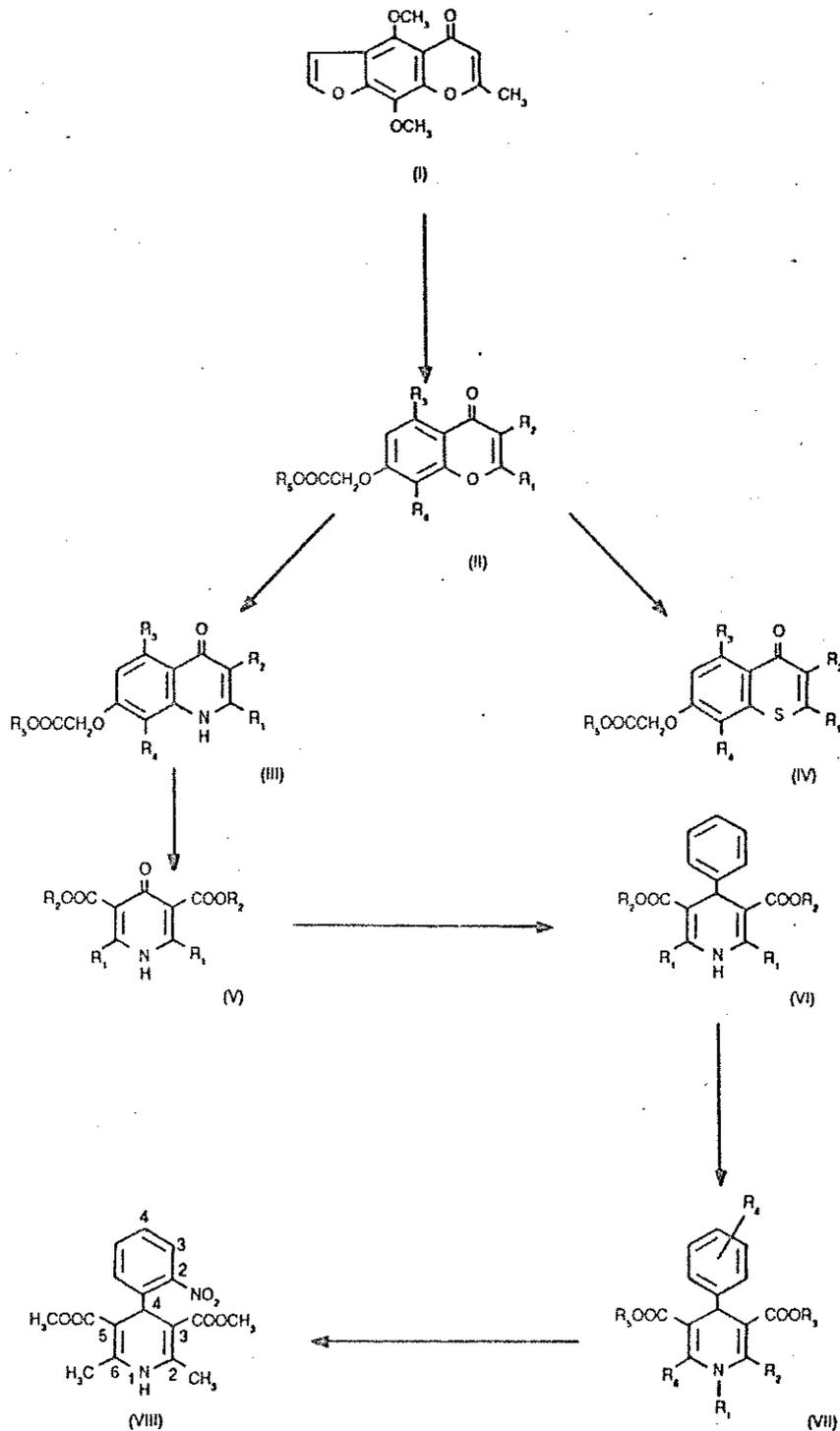
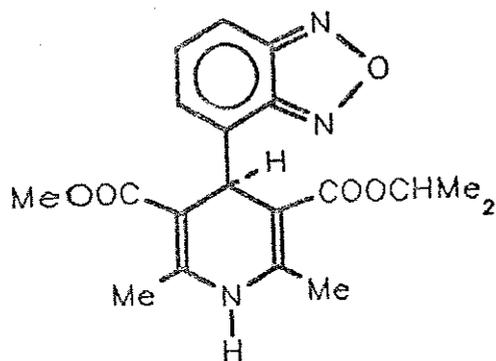
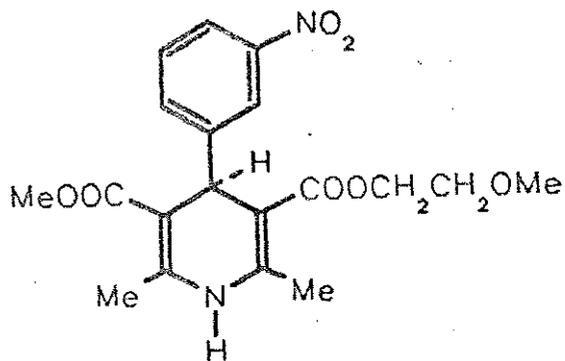


Figura 1.1 - Gênese da nifedipina.

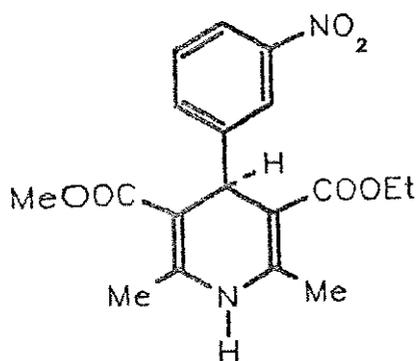
constituintes dos grupos éster do anel diidropiridínico; c) substituição dos grupos metílicos das posições 2 e 6 do anel diidropiridínico por outros grupos, geralmente isósteros; d) substituição do hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel diidropiridínico.



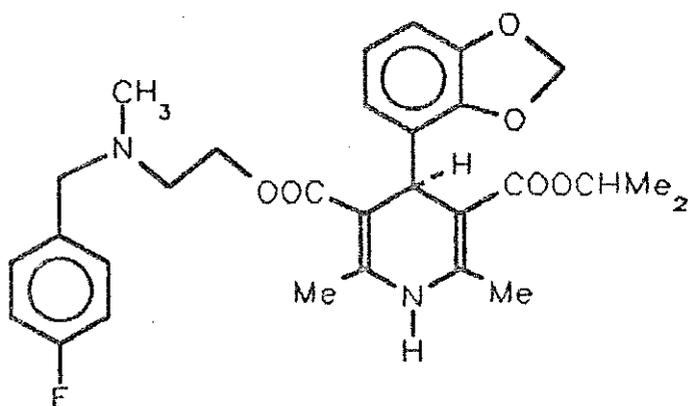
(1.IV)



(1.V)



(1.VI)



(1.VII)

Como resultado dessa pesquisa intensiva, que ainda prossegue, obtiveram-se novos fármacos que, embora estruturalmente aparentados à nifedipina, proporcionam maior seletividade vascular e utilidade clínica mais ampla. Por isso, receberam o qualificativo de antagonistas de cálcio de *segunda geração*. No Brasil já são comercializados os seguintes: 1) isradipina (1.IV) (*Lomir*); 2) nimodipina (1.V) (*Nimotop*, *Norton* e *Oxigen*) e 3) nitrendipina (1.VI) (*Caltren* e *Nitrencord*). Variação estrutural mais profunda resultou na elgodipina (1.VII), o primeiro membro da *terceira geração*, ora em estudos na França e Espanha.

1.3 - Ca²⁺ e Fisiologia Humana

Muitos íons desempenham importantes funções na fisiologia normal do organismo humano. Os íons Na⁺, K⁺ e Cl⁻ são os principais responsáveis pela manutenção da polaridade das membranas celulares e pela condução do estímulo nervoso através da rede neuronal. Fe^{2+/3+}, presente nas hemoproteínas, citocromos e peroxidases, é protagonista no transporte de oxigênio através do organismo, eliminação de dióxido de carbono e transporte de elétrons na cadeia respiratória celular. Outros íons metálicos estão associados a diversas enzimas importantes, como mostra o Quadro 1.1 (Guyton, 1989).

Quadro 1.1 - Metais presentes em algumas enzimas que atuam em organismos animais.

Metal	Enzima
Cobre	Tirosinase, ascórbico oxidase
Zinco	Peptidase, anidrase carbônica
Magnésio	Fosfatases e quinases
Manganês	Quinases, peptidases e arginases
Molibdênio	Xantina oxidase, nitrato redutase
Cobalto	Complexos coenzimáticos da vitamina B ₁₂

O cálcio é o íon metálico mais abundante e um dos elementos mais abundantes no corpo humano. Mais de 90% do cálcio encontrado no organismo encontra-se na forma do fosfato mineral hidroxiapatita, que ocorre nos ossos e dentes. É a parcela restante de cálcio solúvel, íon Ca²⁺, que é responsável pelos inúmeros processos que ocorrem ao nível intra e extracelular. Os principais fenômenos nos quais o cálcio solúvel participa ativamente e onde sua presença é crítica são: acoplamento do processo excitação-contração (muscular), acoplamento do processo estímulo-secreção (glandular), crescimento celular e locomoção, comunicação intercelular, fusão de membranas, estabilidade de membranas, coagulação sanguínea, e fecundação. Os fenômenos Ca²⁺-dependentes que ocorrem ao nível intracelular são caracterizados pela alta afinidade que ocorre entre seus integrantes. Nesses fenômenos, tais como os acoplamentos excitação-contração e estímulo-secreção, a concentração de Ca²⁺ é de ordem micromolar e, às vezes, submicromolar (Guyton, 1989).

Os eventos intracelulares Ca²⁺-dependentes são possíveis graças à existência de um elevado gradiente de concentração de Ca²⁺ através da membrana celular, canais seletivos ao Ca²⁺, bombas de Ca²⁺ e processos de sequestro que regulam o influxo, efluxo e depósito

intracelular de Ca^{2+} . São possíveis também devido à presença de proteínas, como a calmodulina, que apresentam alta afinidade pelo Ca^{2+} e que servem de receptores para o Ca^{2+} , ligando o estímulo à resposta celular (Guyton, 1989).

Para a célula no estado de repouso, ou seja, quando não sujeita a estímulos químicos, elétricos ou mecânicos, a concentração intracelular de Ca^{2+} é $<10^{-7}\text{M}$. No meio extracelular, a concentração de Ca^{2+} é de ordem milimolar, ou seja, existe um gradiente de concentração de aproximadamente quatro ordens de magnitude através da membrana celular, gradiente este muito maior do que para Na^+ e K^+ . O abrupto aumento de sua concentração até 10^{-6}M , em resposta a um estímulo celular, caracteriza o Ca^{2+} como mensageiro. Esta característica pode ser creditada à existência dos processos específicos de mobilização e armazenamento de Ca^{2+} . Logo em seguida à entrada de grandes quantidades de Ca^{2+} na célula, os mecanismos de sequestro e armazenamento entram rapidamente em ação, fazendo com que a concentração intracelular de Ca^{2+} volte ao nível da situação inicial de repouso. Esses mecanismos que controlam a atividade celular do Ca^{2+} são de importância crítica para a saúde da célula (Guyton, 1989).

Existem diversos mecanismos de controle do Ca^{2+} intracelular. Esses mecanismos, representados esquematicamente na Fig. 1.2, agem de forma harmoniosa a fim de regular a concentração intracelular de Ca^{2+} e também de modular os fenômenos Ca^{2+} -dependentes que ocorrem no plano celular. É importante notar que nem todos esses processos são de igual importância para todos os tipos de células. Algumas células podem não possuir ou não serem capazes de utilizar um ou mais desses processos. Também não devemos assumir que existe uma importância hierárquica única dos processos de controle do Ca^{2+} . Se considerarmos um determinado tipo de célula, diferentes estímulos podem disparar diferentes mecanismos de mobilização e sequestro de Ca^{2+} . Inversamente, um tipo de estímulo pode disparar diferentes processos de controle de Ca^{2+} , dependendo do tipo de célula ou do evento fisiológico ao qual o estímulo é direcionado. Podemos apreciar diversos exemplos dessas diferenças em sistemas envolvendo músculos lisos (Bolton, 1979). Em geral, não é possível modular os processos de controle de Ca^{2+} em um único estágio. Ao invés disso, sítios múltiplos de intervenção devem ser investigados e, por isso, classes múltiplas de fármacos devem existir (Janis *et al.*, 1987).

Podemos considerar duas fontes primárias de mobilização de Ca^{2+} : extracelular e intracelular. O Ca^{2+} extracelular provém basicamente de duas fontes: o Ca^{2+} livre, dissolvido no meio aquoso extracelular, e o Ca^{2+} ligado à membrana celular. O Ca^{2+} extracelular pode

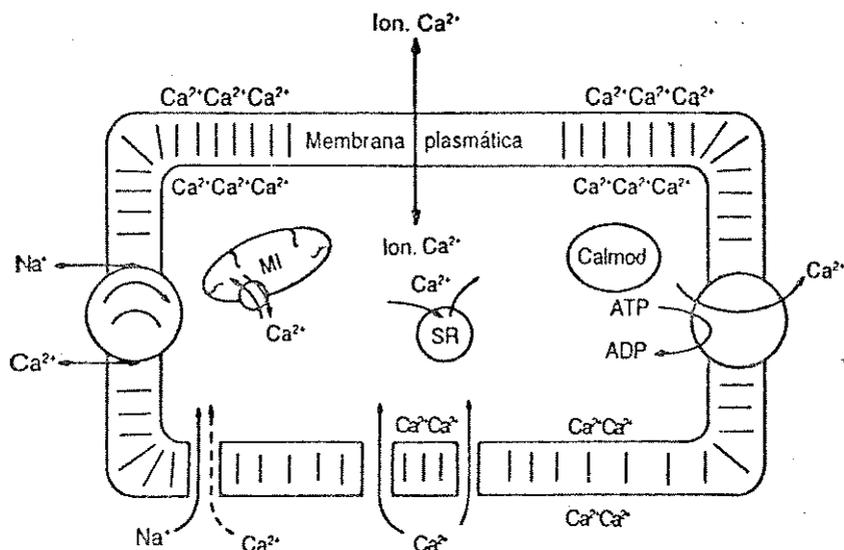


Figura 1.2 - Representação esquemática da regulação de Ca^{2+} no plano celular. Estão desenhados os processos de captação e soltura intracelulares na mitocôndria (MI) e no retículo sarcoplasmático (SR), ligação do Ca^{2+} nas superfícies interna e externa da membrana plasmática, permuta $\text{Na}^+:\text{K}^+$ na membrana plasmática, expulsão do Ca^{2+} via Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática, entrada de Ca^{2+} via canais de íons incluindo o canal de Na^+ e os canais de íons voltagem-dependentes e os operados por receptor e a entrada de Ca^{2+} via processos de escoamento ou mediado por ionóforo (Ion. Ca^{2+}) (Janis *et al.*, 1987 e Korolkovas, 1991).

adentrar a célula via processos de escoamento, via canais de cálcio e através da permuta de $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$ na membrana plasmática (Fig. 1.2). As interações e a ligação do Ca^{2+} às proteínas superficiais da membrana celular são reconhecidamente um componente crítico na manutenção da integridade e excitabilidade da membrana. O Ca^{2+} ligado à membrana celular tem sido sugerido como uma importante fonte de Ca^{2+} no processo de excitação-contração dos músculos liso e cardíaco (Chang & Triggle, 1973; Philipson *et al.*, 1980 e Langer, 1984). A célula também pode dispor das reservas intracelulares de Ca^{2+} que se localizam nas mitocôndrias e, principalmente, no retículo endoplasmático (Guyton, 1989).

Do ponto de vista farmacológico, os canais de cálcio são muito importantes como meio de entrada de Ca^{2+} na célula. Esses canais possuem natureza protéica, atravessam toda a membrana ligando o meio intra ao extracelular e podem ser de dois tipos (Miller, 1987; Bolton, 1979; Cauvin *et al.* 1983 e 1985; Hagiwara & Byerly, 1981; Reuter, 1983; Catterall, 1988 e Saccomano & Ganong, 1991): canal dependente de potencial (CDP) e canal operado por receptor (COR). Os CDPs são ativados pelas variações no potencial de membrana ocasionados a partir de estímulos químicos ou elétricos. Os CORs são controlados por receptores específicos localizados na membrana

celular e são ativados por estímulos químicos mas não elétricos. Os CORs permitem o influxo de Ca^{2+} sem que ocorra a despolarização da membrana, ou ela se dê com pequenas alterações do seu potencial (Korolkovas, 1991). Para os propósitos do presente trabalho interessa apenas reportar detalhes dos CDPs, pois são neles que agem os fármacos antagonistas do Ca^{2+} , como as DHPs. Os CDPs podem ser encontrados em variedade enorme de células, como por exemplo neurônios do sistema nervoso central e periférico, músculos lisos dos vasos sanguíneos, vísceras e coração, músculo esquelético, células secretoras, etc..

Quadro 1.2 - Principais características que distinguem os canais de cálcio do tipo T, L e N, presentes em tecidos musculares e neuronais (Triggle, 1990).

Propriedade	T	L	N
Intervalo de ativação (mV)	>-70	>-10	>-30
Intervalo de inativação (mV)	-100 a -60	-60 a -10	-120 a -30
Velocidade de inativação	Rápida	Muito lenta	Moderada
Condutância (pS)	8	25	13
Permeabilidade	$Ba^{2+} = Ca^{2+}$	$Ba^{2+} > Ca^{2+}$	$Ba^{2+} > Ca^{2+}$
Sensibilidade ao Cd^{2+}	Não	Sim	Sim
Sensibilidade às diidropiridinas	Não	Sim	Não
Sensibilidade à ω -conotoxina ^(a)	Não	Sim (neurônios) e Não (músculos)	Sim

(a) Corresponde à ω -Conotoxina GVIA, veneno de um animal marinho.

Com base nas condutâncias e sensibilidades à voltagem, os CDPs foram divididos em três subtipos, chamados T, L e N (Miller, 1987; Saccomano & Ganong, 1991; Schwartz *et al.*, 1988 e van Amsterdam & Zaagsma, 1988). As principais características dos canais T, L e N podem ser vistas nos Quadros 1.2 e 1.3. Podemos notar que as características fundamentais dos canais T, L e N presentes nos músculos e neurônios são fundamentalmente as mesmas. De maneira geral, os CDPs podem ser divididos em canais ativados por voltagem baixa (AVB) e canais ativados por voltagem alta (AVA), como mostra o Quadro 1.3.

Os CDPs do tipo AVB são encontrados em neurônios de uma variedade de áreas cerebrais e também em tecidos não neuronais, incluindo diversos tipos de músculos e uma variedade de células periféricas (Saccomano & Ganong, 1991). As características fisiológicas que distinguem os canais T são sua baixa voltagem limiar de ativação e a breve duração de

Quadro 1.3 - Principais características que distinguem os canais de cálcio do tipo T, L e N, presentes nos tecidos neuronais (Saccomano & Ganong, 1991).

Característica	T	L	N
	Ativados por vol- tagem baixa	Ativados por voltagem alta	
Despolarização exigida para ativação	Fraca	Forte	Forte
Cinética de ativação	Transitória	Ininterrupta	Transitória
Sensibilidade às diidropiridinas	Não	Sim	Não
Sensibilidade à ω -conotoxina	Não	Sim	Não
Tecido	Neuronal e não- neuronal	Neuronal e não- neuronal	Neuronal

abertura devido à rápida inativação. Assim, os canais T são abertos durante despolarizações relativamente pequenas em relação ao potencial de repouso e inativados num tempo da ordem de dezenas de mili-segundos após a ativação. Os canais T presentes em tecidos neuronais e não neuronais são geralmente resistentes às diidropiridinas e outros bloqueadores de cálcio. No entanto, recentemente verificou-se que os canais T parecem ser sensíveis à flunarizina e nicardipina (Saccomano & Ganong, 1991).

Os CDPs do tipo AVA foram subdivididos em duas categorias. A primeira categoria, canais L, são encontrados no músculo cardíaco, músculo liso dos vasos sanguíneos e tecidos neuronais. É necessário grau mais elevado de despolarização para ativar os canais L do que o necessário para ativar os canais T. Uma vez abertos, os canais L conseguem sustentar a resposta por muitas centenas de mili-segundos. Atualmente aceita-se a idéia de que os canais L são os responsáveis pela entrada do Ca^{2+} que será utilizado nos principais processos Ca^{2+} -dependentes, como por exemplo contração dos músculos cardíacos e vasculares. A segunda categoria, canais N, foi descrita inicialmente em neurônios periféricos (Nowycky *et al.*, 1985). Os canais N, assim como os canais L, requerem despolarizações mais fortes para sua ativação do que a requerida para os canais T. Os canais N distinguem-se dos canais L devido à menor duração de seu período de ativação e também devido à falta de sensibilidade que eles apresentam aos agentes diidropiridínicos. O tempo requerido para inativar os canais N está entre aquele requerido para os canais T e para os canais L. No entanto, a estrita separação dos canais N e L é difícil devido à sobreposição dos níveis de despolarização necessários para

ativação. Assim, é difícil ajustar os parâmetros de simulação para ativar apenas um desses canais, em experimentos com a célula inteira (Saccomano & Ganong, 1991).

A partir de agora vamos concentrar nossa atenção nos CDPs do tipo L, que são os canais de cálcio predominantemente sensíveis às DHPs.

Quadro 1.4 - Principais características das subunidades do canal de cálcio dependente de voltagem.

Subunidade	Peso Molecular	Característica
α_1	175 kDa	Polipeptídio não-glicosídico; contém múltiplos sítios de fosforilação; substrato para quinases; sítio de ligação para as DHPs
α_2	145 kDa	Polipeptídio N-glicosídico
β	54 kDa	Glicopeptídio; substrato para quinases
γ	30 kDa	Glicopeptídio
δ	24-27 kDa	Glicopeptídio unido a α_2 através de pontes dissulfeto

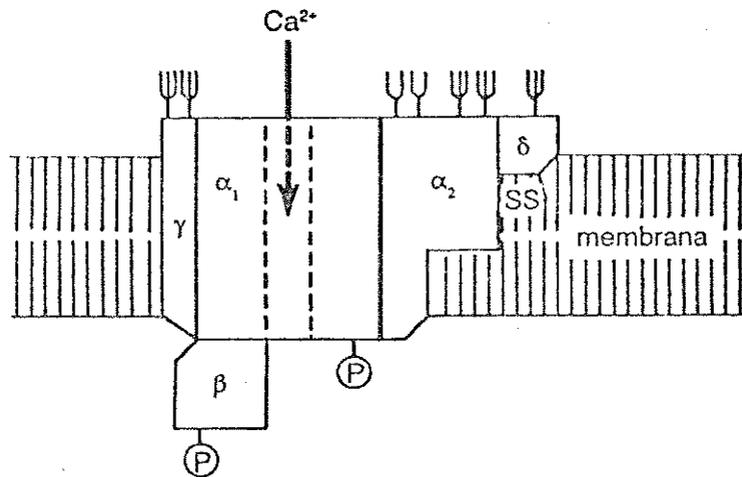


Figura 1.3 - Estrutura subunitária do canal de cálcio do músculo esquelético do coelho, em que se representam as ligações dissulfeto, os locais de glicosilação (Ψ) e os locais de fosforilação (P). Notem-se as cinco subunidades constituintes do receptor dos dihidropiridínicos bloqueadores dos canais de cálcio: α_1 , α_2 , β , γ e δ . As moléculas das DHPs ligam-se à subunidade α_1 (Catterall, 1988).

A caracterização bioquímica e a determinação da estrutura primária dos CDPs foram feitas recentemente (Catterall, 1988; Hosey & Lazdunski, 1988; Maelicke, 1988; Campbell *et al.*, 1988; Triggle & Langs, 1989; Glossmann & Striessnig, 1990 e Guy & Conti, 1990). A membrana dos túbulos T (não confundir com os canais do tipo T) dos músculos esqueléticos são as fontes mais ricas em receptores das DHPs (Fosset *et*

al., 1983 e Glossmann & Ferry, 1983) e tem conseqüentemente servido de modelo para estudos estruturais dos canais de Ca^{2+} do tipo L (Campbell *et al.*, 1988; Glossmann & Striessnig, 1990 e Catterall *et al.*, 1988). Os receptores, que apresentam alta afinidade pelas DHPs, purificados destes tecidos, formam um complexo de cinco subunidades distintas α_1 , α_2 , β , γ e δ (Fig. 1.3). As principais características dessas subunidades podem ser vistas no Quadro 1.4.

A subunidade α_1 é a mais importante pois é nela que se localiza o canal de Ca^{2+} propriamente dito e também é nela que se localiza o sítio de ligação das DHPs e demais antagonistas e agonistas do Ca^{2+} . Portanto devemos investigar a subunidade α_1 de maneira um pouco mais pormenorizada.

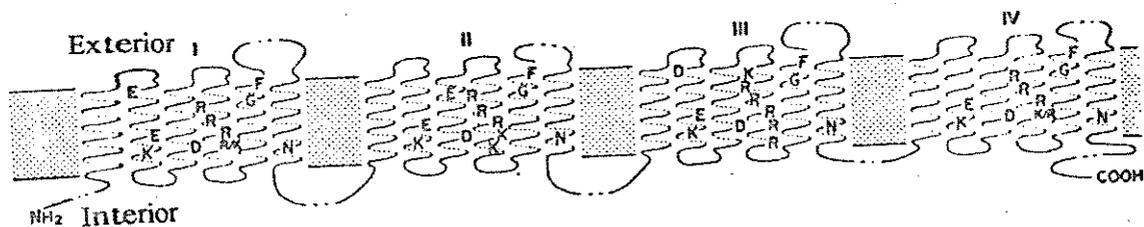


Figura 1.4 - Representação esquemática das características estruturais comuns ao receptor das DHPs e o CDP de Na^+ . As quatro unidades homólogas (I-IV), que se supõe estejam dispostas em torno do canal de cálcio, são mostradas linearmente. Também são mostradas as subunidades α -helicoidais S1-S6 (da esquerda para a direita) em cada repetição (I-IV). Os resíduos Arg (R) e/ou Lys (K) que são conservados nas repetições individuais do receptor das DHPs e nos três canais e nos três canais de Na^+ de seqüência conhecida são mostrados em cada subunidade S4. Também são mostrados outros aminoácidos comuns aos dois tipos de receptores presentes em outras subunidades [Asp (D), Gly (G), Glu (E), Phe (F) e Asn (N)] (Tanabe *et al.*, 1987).

Um esquema para a topologia das dobras e da região transmembrana da subunidade α_1 foi desenvolvido (Tanabe *et al.*, 1987) (Figs. 1.4 e 1.5) e é similar àquele proposto para o canal de Na^+ (Catterall, 1986). As repetições homólogas internas (I-IV) contêm elementos hidrofóbicos (α -helicoidais, S1-S6) que se espalham pelo interior da membrana celular. Os seis segmentos compartilham aspectos estruturais característicos com os correspondentes segmentos do canal de Na^+ . Os 24 elementos α -helicoidais são conectados por ramos ligantes de variados comprimentos localizados no citoplasma (por exemplo, I S6 \rightarrow II S1) e no meio extracelular (por exemplo, III S5 \rightarrow III S6). As regiões S2 são carregadas negativamente. As regiões S4 contêm aminoácidos carregados positivamente (Lys/Arg) a cada três (ou quatro) resíduos. Os domínios repetidos (I-IV) foram propostos de modo a formar quatro agrupamentos (*clusters*) em hélice organizados ao redor de um canal condutor de cátions que é alinhado com os quatro segmentos S2 (Maelicke, 1988; Glossmann & Striessnig, 1990 e Tempel *et al.*, 1987). A hélice S4 é um elemento

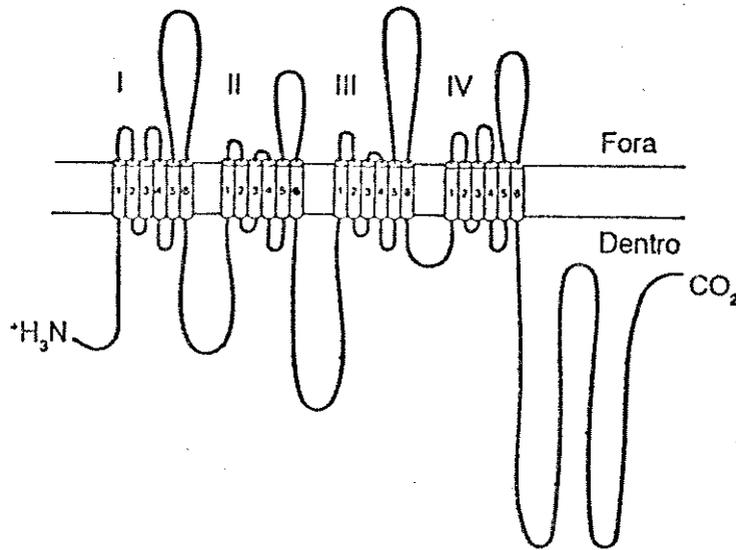


Figura 1.5 - Arranjo transmembrana proposto da subunidade α_1 do canal de cálcio do músculo esquelético de coelho. O esquema mostra o arranjo linear, embora os elementos I-IV envolvam o canal de cálcio, formando na realidade um arranjo aproximadamente circular, onde o elemento I está próximo ao elemento IV (Saccomano & Ganong, 1991).

cuja estrutura é encontrada em CDPs de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} (Glossmann & Striessnig, 1990), de forma quase que inalterada. Acredita-se que S4 participa como sensor de voltagem no processo de ativação dependente de potencial desses canais (Glossmann & Striessnig, 1990 e Guy & Conti, 1990). Muitas das cargas positivas desse segmento muito presumivelmente formam dipolos. Quando no potencial de repouso, a hélice S4 é forçada a um arranjo de emparelhamento de íons em que os resíduos carregados negativamente localizam-se em outras seções transmembranas. A despolarização induz cada hélice S4 a um rotação de cerca de 60° e a uma propagação externa de cerca de 5 Å ao longo do eixo da hélice. Este movimento conserva o registro das interações dos pares de íons para S4, transfere várias unidades de cargas portais (*gating charge*) através da bicamada lipídica e produz uma distorção conformacional que resulta na ativação do canal (Armstrong, 1981).

1.4 - Atividade Biológica das DHPs

O principal modo de ação das DHPs consiste em bloquear a entrada de Ca^{2+} para o interior da célula muscular lisa. Isto é possível graças à capacidade de essas drogas ligarem-se reversivelmente a sítios receptores existentes na subunidade α_1 do CDP do tipo L (Schwartz *et al.*,

1988 e van Amsterdam & Zaagsma, 1988). No momento em que o complexo DHP-proteína é formado, o sensor de voltagem do canal de Ca^{2+} (segmento S4 da subunidade α_1) parece perder a capacidade de ativar a abertura do canal no momento em que a membrana é despolarizada. A partir daí o Ca^{2+} não pode mais ter acesso ao interior do sarcômero para recompor os depósitos intracelulares de cálcio, situados nas mitocôndrias e retículo endoplasmático. Visto que os íons Ca^{2+} desempenham papel vital na manutenção da função dos tecidos cardíacos e do músculo liso vascular, a redução da concentração intracelular de Ca^{2+} nas células cardíacas e no músculo liso vascular resulta na dilatação das artérias coronarianas e das artérias e arteríolas periféricas e pode reduzir a frequência cardíaca, diminuir a contratilidade miocárdica (efeito inotrópico negativo) e a condução nodal atrioventricular lenta (Korolkovas *et al.*, 1991).

Para levar adiante nossa tarefa, precisamos dispor de um grupo de moléculas que possuam atividade biológica quantitativamente conhecida. Esse grupo de moléculas deve possuir esqueleto molecular comum a todas elas. Elas devem diferir entre si por um ou mais grupos substituintes em posições definidas do esqueleto comum. Além disso, deve ser um grupo numeroso bastante para que possamos testar diversas variáveis nos modelos quantitativos. Se a substituição der-se em anel aromático, deve haver número razoável de substituições nas posições *orto*, *meta* e *para*, a fim de que modelos em separado para as diversas posições possam ser testados. Por outro lado, deve haver grande variação da resposta biológica ao longo da série (de preferência maior do que duas unidades de $\log(1/C)$, onde C é a concentração molar do fármaco capaz de reproduzir uma resposta biológica definida). Todos as moléculas da série devem exercer sua atividade biológica pelo mesmo mecanismo de ação. Os substituintes presentes em cada posição do esqueleto fundamental do grupo devem, em conjunto, possuir razoável variação dos efeitos eletrônico e estérico do substituinte e de sua hidrofobicidade. Outra coisa, a medida quantitativa da atividade biológica deve ser feita de tal forma que se obtenha a medida do efeito farmacológico desejado de forma isolada. Deve-se cuidar para que esta medida seja feita em termos de resposta biológica fixa, de modo que a medida efetivamente realizada em laboratório seja a da concentração molar de cada derivado capaz de reproduzir aquela resposta biológica padrão (Martin, 1978 e Jurs *et al.*, 1985). Finalmente, e muito importante, as medidas quantitativas da atividade biológica devem ser confiáveis, ou seja, devemos impor a condição de que o grupo de pesquisa responsável por elas tenha realmente experiência no assunto e seja reconhecido internacionalmente.

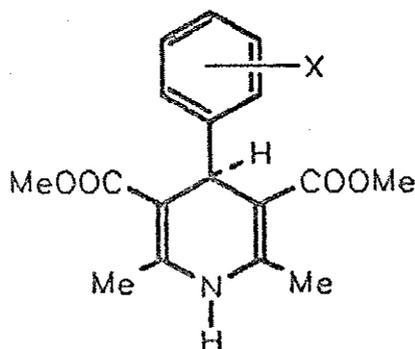


Figura 1.6 - Fórmula estrutural da molécula da DHP. Os grupos substituintes, representados por X, são mostrados na Tab. 1.1.

Conseguimos selecionar um grupo de derivados das 1,4-diidropiridinas que satisfizesse todas essas condições. A atividade biológica de um grupo de 46 derivados da nifedipina, por substituição do grupo nitro fenílico, foi medida por Coburn *et al.* (1988). Quimicamente, o grupo de substâncias selecionadas é 2,6-dimetil-3,5-dicarbometoxi-4-X-fenil-1,4-diidropiridina (DHP). Desse grupo de 46 derivados, não iremos utilizar apenas um composto: 3-N⁺Me₃. Como nosso trabalho é de natureza teórica e envolve cálculos quânticos semiempíricos, achamos mais prudente eliminar o derivado 3-N⁺Me₃ de nossa série. Os métodos semiempíricos não são muito confiáveis quando aplicados a compostos eletricamente carregados. Vamos fazer uso das medidas da atividade biológica desses derivados para estabelecer relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade biológica dos 45 compostos selecionados. A estrutura química fundamental dos derivados da DHP é mostrada na Fig. 1.6.

A atividade biológica das DHP é expressa quantitativamente em termos de $\log (1/IC_{50})$, em que IC_{50} corresponde à concentração molar da droga necessária para promover 50% de inibição da contração, em peças anatômicas intestinais de cobaias, promovida pelo uso de soluções-padrão de agonistas muscarínicos (metilfurmetida). Quanto mais potente for o derivado, menor a concentração molar necessária para obter o efeito padrão e, portanto, maior será o valor de $\log (1/IC_{50})$. A técnica detalhada da medição dessa grandeza é descrita ao final do artigo de Coburn *et al.* (1988). Cada valor publicado corresponde à média de 4-10 determinações individuais. Os desvios-padrões não foram maiores do que 5% em relação às

Tabela 1.1 - Medida quantitativa da atividade biológica dos derivados da DHP.

Num.	Substit.	-log (IC ₅₀)	Num.	Substit.	-log (IC ₅₀)
1	3-Br	8,89	24	3-OH	6,00
2	2-CF ₃	8,82	25	3-NH ₂	5,70
3	2-Cl	8,66	26	3-OAc	5,22
4	3-NO ₂	8,40	27	3-OCOϕ	5,20
5	2-CH=CH ₂	8,35	28	2-NH ₂	4,40
6	2-NO ₂	8,29	29	4-F	6,89
7	2-Me	8,22	30	4-Br	5,40
8	2-Et	8,19	31	4-I	4,64
9	2-Br	8,12	32	4-NO ₂	5,50
10	2-CN	7,80	33	4-NMe ₂	4,00
11	3-Cl	7,80	34	4-CN	5,46
12	3-F	7,68	35	4-Cl	5,09
13	H	7,55	36	2,6-Cl ₂	8,72
14	3-CN	7,46	37	F ₅	8,36
15	3-I	7,38	38	2-F,6-Cl	8,12
16	2-F	7,37	39	2,3-Cl ₂	7,72
17	2-I	7,33	40	2-Cl,5-NO ₂	7,52
18	2-OMe	7,24	41	3,5-Cl ₂	7,03
19	3-CF ₃	7,13	42	2-OH,5-NO ₂	7,00
20	3-Me	6,96	43	2,5-Me ₂	7,00
21	2-OEt	6,96	44	2,4-Cl ₂	6,40
22	3-OMe	6,72	45	2,4,5-(OMe) ₃	3,00
23	3-NMe ₂	6,05			

médias. Os valores das medidas quantitativas da atividade biológica dos 45 derivados selecionados são mostrados na Tab. 1.1.

Capítulo 2 - Objetivos e Métodos

Trata-se de um trabalho essencialmente teórico. As principais ferramentas que aqui utilizaremos são o cálculo de orbitais moleculares semi-empírico e estatística, além de uma boa dose de imaginação e bom senso. Não vamos ao laboratório para efetuar medidas de espécie alguma. Porém, vamos utilizar em algumas oportunidades resultados experimentais obtidos em outros centros de pesquisa. Obviamente não estamos tentando insinuar que os procedimentos experimentais não sejam necessários, ou que possam ser relegados a segundo plano. Isso nunca será verdadeiro. A ciência farmacológica não irá prescindir do auxílio de um laboratório de pesquisa. O que pretendemos é verificar as potencialidades e limitações do uso de cálculos teóricos no estudo das relações entre estrutura química e atividade biológica.

De antemão podemos imaginar que as limitações sejam grandes. Afinal, em nosso estudo determinaremos algumas propriedades físico-químicas de moléculas situadas no vácuo, ou seja, sem que influência externa de espécie alguma perturbe o arranjo de sua geometria. Isso é algo que não observaremos em sistemas biológicos. Podemos dizer que estes são sistemas *sujos*. Com isso queremos dizer que além das espécies químicas reagentes sobre as quais depositamos nosso interesse, existe uma infinidade de outras espécies que *contaminam* o processo em estudo. Com toda a certeza várias das propriedades do fármaco são influenciadas pela presença dessa gama de espécies, a princípio indesejáveis, mas que são indissociáveis do processo biológico. Aliás é justamente essa complexidade que desafia nossa capacidade de reproduzir suas características através de modelos simples.

2.1 - Objetivos

Em resumo, as principais etapas deste trabalho consistem em:

- a) Estudar as principais características geométricas dos compostos investigados, como comprimentos e ângulos de ligação, ângulos torsionais e conformação preferida em seu estado de menor energia.
- b) Propor a geometria bioativa com base na análise termodinâmica estatística das curvas de potencial da rotação do anel fenílico em torno do anel piridínico.

- c) Comparar as conformações preferidas em seu estado de menor energia com aquelas obtidas a partir do estudo das curvas de potencial. Verificar as potencialidades do uso de ambas no estudo das relações estrutura-atividade.
- d) Fazer o cálculo teórico de diversas propriedades físico-químicas, tais como potencial de ionização, afinidade eletrônica, momentos dipolares total e parciais, polarizabilidade molecular, cargas líquidas, índices de fronteira, etc.
- e) Estabelecer relações qualitativas e quantitativas entre as propriedades físico-químicas calculadas e a atividade biológica. Com isso pretendemos inferir algo sobre o mecanismo de ação das 1,4-diidropiridinas. Ou seja, quais propriedades, e de que forma, são importantes para o desenvolvimento da resposta farmacológica. Conseqüentemente será possível *visualizar* algumas das interações que ocorrem durante a formação do complexo droga-receptor.
- f) Propor a topografia simplificada do receptor farmacológico dessa classe de fármacos, mapeando os possíveis grupos funcionais nele presentes. Isso poderá ser possível através da investigação sobre a natureza das interações fármaco-receptor.

2.2 - Método

Apresentamos o método de trabalho com o qual pretendemos atingir os objetivos enumerados na seção anterior. As técnicas e programas que pretendemos utilizar também estão indicados nas próximas seções.

2.2.1 - Seleção dos derivados da 1,4-diidropiridina

A primeira fase do trabalho consiste em selecionar, a partir da literatura disponível, um grupo de análogos da DHP cuja atividade biológica seja quantitativamente determinada. Isto é necessário para que possamos estabelecer relações entre estrutura química e atividade biológica em termos quantitativos. Os critérios utilizados para selecionar tais análogos já foram discutidos na seção 1.4.

2.2.2 - Análise conformacional

Compreende o estudo das características geométricas globais dos compostos selecionados e também a investigação de conformações termodinamicamente permitidas. A análise conformacional também objetiva a formação de uma imagem mental (modelar) acerca da estrutura geométrica das DHPs.

Faremos a determinação teórica das curvas de potencial de rotação do anel fenílico em relação ao anel piridínico. Através das curvas de potencial localizaremos os mínimos absolutos de energia conformacional. Os cálculos teóricos que se referem à geometria molecular serão feitos com o método AM1 (Dewar *et al.*, 1985) que se encontra disponível no pacote computacional semiempírico MOPAC 6.0 (Stewart, 1990). Além disso, pretendemos identificar as regiões das curvas de potencial capazes de abrigar 99% da população molecular. Para isto usaremos alguns princípios de mecânica estatística (Richards, 1983).

Adotamos dois critérios diferentes para abordar o problema da otimização geométrica dos compostos. Pelo critério do mínimo absoluto de energia conformacional a geometria bioativa estaria relacionada à conformação mais estável, independentemente da orientação de grupos funcionais. De forma diferente, podemos também imaginar como geometria bioativa aquela emergente da análise grupal das regiões termodinamicamente permitidas a certas parcelas de população molecular (Richards, 1983). Este critério parece-nos mais significativo que o primeiro. Os parâmetros geométricos calculados, como comprimentos e ângulos de ligação e ângulos torsionais, de algumas das moléculas da série serão comparados com os respectivos valores experimentais obtidos a partir de cristalografia de raios-x. Esta é uma forma, ainda que aproximada, de averiguarmos o quão dentro ou fora da realidade estaremos trabalhando. Examinaremos também como variam os valores dos comprimentos e ângulos de ligação e ângulos torsionais ao longo da série de compostos. Isto nos possibilitará concluir se esses valores são ou não importantes para o desenvolvimento da resposta biológica.

Faremos alguns cálculos que nos fornecerão as características geométricas globais do grupo de análogos da DHP. Por exemplo, delinearemos o perfil geométrico médio do grupo, determinaremos distâncias aproximadas entre grupos funcionais, comprimento, altura e largura médios das moléculas, etc. Utilizaremos nesse cálculo o programa ATCOOR (Nordlander *et al.*, 1985).

Porém, nenhuma análise conformacional estará completa se não pudermos visualizar a distribuição espacial dos grupos funcionais através de modelos moleculares. Vamos utilizar para isto desenhos moleculares gráficos para obtermos essa visão. Dispomos atualmente de um programa denominado MINDTOOL[†], que é capaz de desenhar e manipular estruturas moleculares com facilidade.

2.2.3 - Cálculo de propriedades físico-químicas

Na seção 2.2.2 adotamos dois critérios para analisarmos o padrão de geometria molecular. Após a análise cuidadosa dos resultados obtidos e comparação com os resultados experimentais disponíveis, teremos condições de decidir qual dos dois é mais adequado. Feito isto, vamos calcular as propriedades físico-químicas, citadas acima, apenas para a geometria que corresponder ao melhor critério.

Vamos calcular os valores de diversas propriedades físico-químicas, também utilizando o AM1. Propriedades tais como energia do HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) e LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), momentos dipolares total e parciais (hibridização e carga pontual) (Pople & Beveridge, 1970), cargas elétricas líquidas em posições estratégicas da molécula, dureza (Paar & Yang, 1989), eletronegatividade de Mulliken (Paar & Yang, 1989 e Mulliken, 1934) e polarizabilidade molecular. Todas estas propriedades serão determinadas pelo AM1.

Propriedades que medem a reatividade de certas porções da molécula (Bradley & Guerrans, 1973), tais como densidade do orbital de fronteira, densidade do elétron de fronteira e densidade do radical de fronteira (Fukui, 1970) podem ser úteis na compreensão de possíveis interações entre fármaco e receptor. Por esse motivo vamos efetuar o cálculo dessas propriedades. Como não dispomos de programas que façam estes cálculos, teremos de construir uma rotina especial que utilizará os coeficientes da função de onda total, fornecidos pelo AM1, e procederá ao cálculo dos índices de fronteira. Feito isto, utilizaremos os resultados desses cálculos no estudo das relações quantitativas entre estrutura e atividade.

[†] MINDTOOL foi criado por Julian Tirado-Rives e James F. Blake da Universidade de Yale, USA, e colocado sob domínio público.

Finalmente estimaremos o volume molecular, que pode nos dar a idéia do efeito estérico provocado pela presença dos grupos substituintes. O volume molecular será estimado pelo programa SURF, construído por nós a partir do algoritmo de Higo & Go (1989).

2.2.4 - Relações estrutura-atividade

Consiste em correlacionar estatisticamente a atividade biológica com propriedades físico-químicas diversas. Isto tem por finalidade determinar quais dessas propriedades são importantes durante a absorção e transporte do fármaco através do organismo, bem como na interação do fármaco com o receptor. Utilizaremos as propriedades físico-químicas calculadas na seção anterior para serem correlacionadas com a atividade biológica citada na seção 2.2.1. As propriedades físico-químicas a serem calculadas são aquelas correspondentes à geometria molecular definida pelo melhor dos dois critérios mencionados na seção 2.2.2. Utilizaremos a regressão linear múltipla (Draper & Smith, 1981) como ferramenta para estabelecer as relações quantitativas entre estrutura e atividade. Dispomos do excelente pacote computacional estatístico SAS - *Statistical Analysis System*,[†] que iremos utilizar em nossos cálculos.

2.2.5 - Mapeamento do receptor farmacológico das DHPs

Consiste em determinar a natureza dos grupos funcionais complementares do receptor que interagem com cada porção do fármaco, bem como suas respectivas localizações espaciais. O mapeamento do receptor pode ser feito somando-se os resultados da análise conformacional, análise das características eletrônicas e, principalmente, das relações estrutura-atividade. Sabemos que o mapeamento do receptor resultante de um trabalho exclusivamente teórico não pode revelar muitos detalhes. São dois os motivos que justificam esta afirmação: a) o fator hidrofóbico não pode ser adequadamente parametrizado por cálculos teóricos (a não ser que use no mínimo três parâmetros teóricos só para isso) (Lewis, 1989) e b) as propriedades físico-químicas utilizadas não caracterizam interações específicas ao nível do complexo fármaco-receptor, embora possuam outras vantagens (Martin, 1978). Por esses motivos

[†] © SAS Inc., Cary, USA - Todos os direitos reservados.

utilizaremos algumas constantes de substituintes clássicas combinadas com parâmetros físico-químicos calculados. Utilizaremos o trabalho de Coburn *et al.* (1988) como base para selecionar os parâmetros clássicos. Assim, dentro das possibilidades, procuraremos obter o máximo de informações possível para realizar ao menos o mapeamento inicial e um tanto quanto rústico mas que sirva como ponto de partida para trabalhos mais avançados.

Capítulo 3 - Análise Conformacional

Vamos analisar a partir de agora os diversos aspectos da estrutura geométrica das DHPs. Em primeiro lugar vamos determinar a curva de potencial da rotação do anel fenílico em relação ao anel piridínico, para cada um dos 45 derivados da série. Queremos localizar os valores do ângulo torsional responsável por essa rotação onde existam mínimos de energia conformacional. Além disso, estamos interessados em saber se a rotação é termodinamicamente permitida, bem como verificar o efeito da rotação anelar sobre o restante da molécula. Uma informação adicional que pretendemos obter através da análise das curvas de potencial é sobre o farmacóforo do grupo, ou seja, a geometria e orientação na qual a família da droga liga-se a um receptor específico. A seguir vamos proceder à otimização da geometria de cada uma das moléculas das DHPs.

Antes de mais detalhes, porém, é preciso esclarecer algumas coisas. Quando alguém aplica os métodos de química quântica à resolução de problemas ligados à química médica, como é nosso caso, o termo *otimização de geometria molecular* adquire um significado que transcende aquele que é comum aos químicos teóricos. A estes importa conhecer a geometria molecular que acumula menor energia conformacional, excetuando algumas situações específicas. No caso da química médica, o pesquisador não está particularmente interessado nesse aspecto. A ele interessa a geometria bioativa, que não é necessariamente a geometria energeticamente mais estável. Daí a necessidade de manter um olho nas listagens liberadas pelo computador e outro no possível perfil do receptor. É fundamental que não percamos de vista esse aspecto. De nada vale agarrar-se às montanhas de números produzidas pelos programas semiempíricos e ignorar o outro lado da questão. Neste caso o trabalho pode até sair bem organizado e asseado, mas não passará de um calhamaço de papéis totalmente inútil.

Para não ignorarmos esse aspecto, vamos abordar o problema da otimização da geometria molecular de duas formas diferentes. Numa primeira aproximação adotaremos como geometria bioativa aquela correspondente à de menor energia conformacional. Em seguida tentaremos melhorar o tratamento teórico adotando como geometria bioativa aquela resultante da análise global das curvas de potencial, quando verificaremos regiões comuns de estabilidade conformacional. Mais tarde, ao compararmos os perfis geométricos correspondentes às duas geometrias obtidas com alguns resultados experimentais, teremos a oportunidade de averiguar qual abordagem é mais adequada.

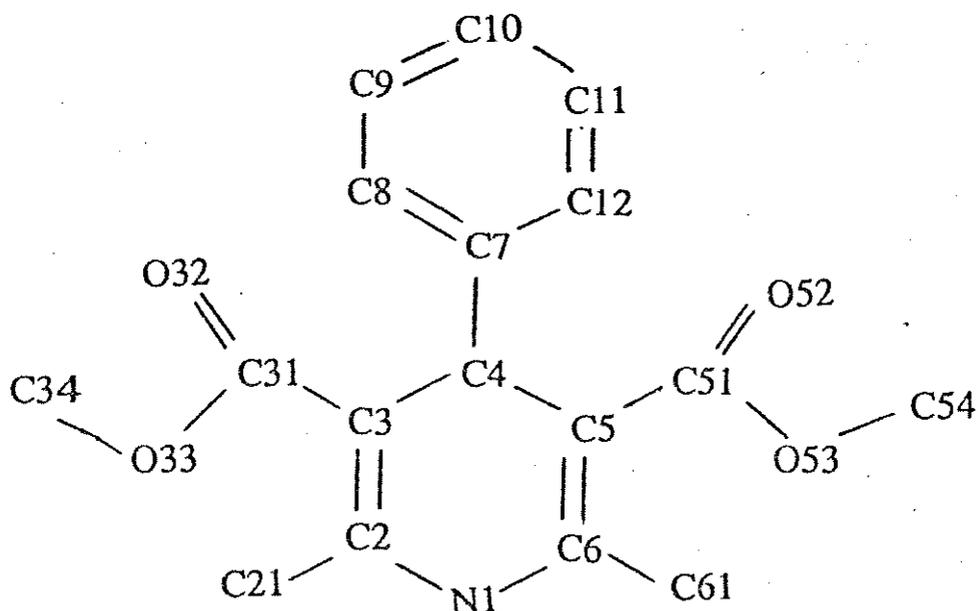


Figura 3.1 - Numeração adotada para os átomos não hidrogenóides, presentes na molécula da DHP.

De agora em diante consideraremos a numeração dos átomos presentes na molécula da DHP como sendo aquela apresentada na Fig. 3.1. Toda a análise conformacional será feita com o método AM1.

3.1 - Análise das Curvas de Potencial da Ligação 8-7-4-3

A determinação das barreiras rotacionais pode ser útil na concepção do farmacóforo (Richards, 1983). A técnica normalmente utilizada consiste em comparar os perfis das curvas de potencial de moléculas com grande variedade de intensidade de respostas biológicas. Se alguma espécie de padrão de interrelacionamento for descoberto, pode-se propor um tipo de geometria bioativa (Farnell *et al.*, 1975). Pode também acontecer de as curvas de potencial *per se* não serem úteis nessa tarefa. Devemos então promover a análise global dos dados geométricos em busca de um possível padrão de comportamento.

A determinação teórica da barreira energética de rotação de uma ligação química não é uma tarefa das mais difíceis (Christoffersen, 1976). Na verdade trata-se apenas da otimização da

geometria molecular mantendo-se fixo, no valor desejado, o ângulo de rotação da ligação que estamos estudando. Assim que a estrutura molecular chegar ao mínimo de energia conformacional para aquele valor de ângulo torsional selecionado, calculamos a energia da molécula (normalmente isto é feito automaticamente pelo programa AM1). Repetindo-se o mesmo cálculo para diversos valores do ângulo em questão, separados por intervalos regulares, teremos chegado a um conjunto de valores de energia em função do ângulo torsional. Daí basta construir um gráfico da energia total em função do ângulo torsional, cujos pontos devem ser unidos por uma curva suave, e medir a altura da barreira rotacional. Quanto mais numerosos forem os valores dos ângulos torsionais utilizados na construção do gráfico, mais precisa será a determinação dos pontos de máximo e mínimo, cuja diferença em energia constitui a própria barreira.

É interessante mencionar que utilizaremos como unidade de medida da energia conformacional a entalpia de formação (ΔH_f). A utilização de ΔH_f é equivalente ao uso da variação de energia interna (ΔU), pois conhecemos a relação simples guardada entre essas duas grandezas [Eq. (3.1)].

$$\Delta H = \Delta U + p\Delta V \quad (3.1)$$

Como sabemos que o volume molecular não varia apreciavelmente com as alterações conformacionais, ΔH_f torna-se uma grandeza legítima para estimar a energia estrutural molecular (Richards, 1983).

No caso das DHPs, optamos por determinar a barreira de rotação da ligação 8-7-4-3 a intervalos de 10° . Para os derivados cuja curva de potencial seja previsivelmente simétrica (-F₃, 4-Br, 4-Cl, etc.) variamos esse ângulo de 0° a 180° . No caso das assimétricas (2-Cl, 3-NO₂, 2-CN, etc.), de 0° a 360° .

Para iniciar o cálculo, submetemos ao AM1 uma geometria aproximada para cada molécula em que fixamos apenas o ângulo diedro 8-7-4-3 em 10° . Utilizamos o recurso denominado *coordenada de reação* para o cálculo sequencial das geometrias moleculares. Por este processo, assim que a geometria molecular é otimizada e ficamos conhecendo sua entalpia de formação, o programa automaticamente acrescenta 10° , ou outro valor predeterminado, ao ângulo torsional 8-7-4-3 e refaz todo o cálculo. Para cada novo valor deste ângulo, o programa utiliza a geometria otimizada do cálculo anterior como entrada para o cálculo seguinte. Dessa forma, apenas pequenas modificações na geometria total normalmente serão necessárias para obtermos o resultado seguinte. Assim o cálculo caminha mais

rapidamente do que se submetêssemos a mesma geometria molecular para cada novo valor do ângulo torsional 8-7-4-3.

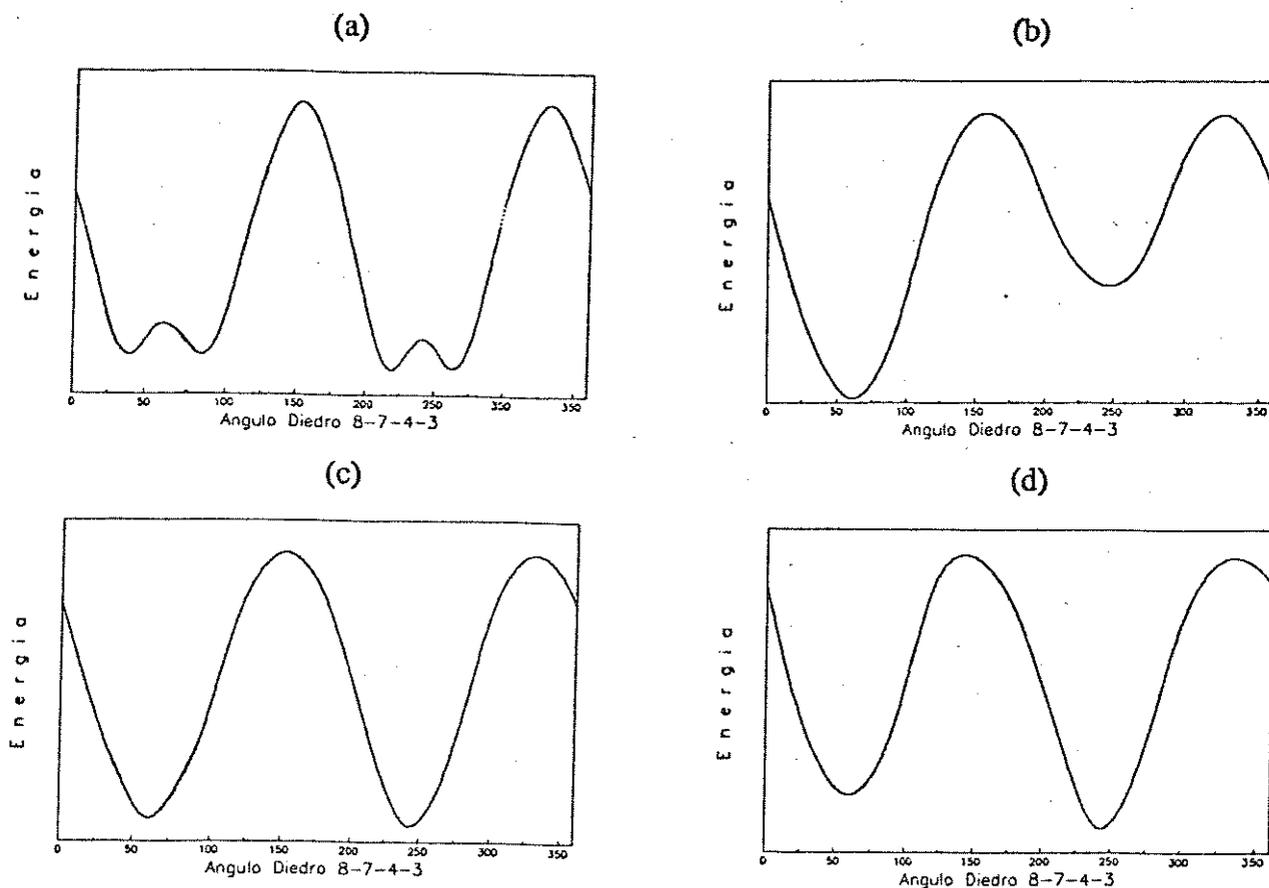


Figura 3.2 - Tipos básicos de perfis encontrados para as curvas de potencial das DHP.

A análise dos resultados mostrou que existem quatro tipos fundamentais de perfis para as curvas de potencial. Estes podem ser vistos na Fig. 3.2. O perfil (a) é característico dos *meta* e *para* derivados, que possuem baixa barreira rotacional. As pequenas saliências nos locais de mínimo correspondem às interações entre o substituinte fenílico e os grupos metilas ligados diretamente ao anel piridínico; (b) é característico de grupos volumosos presentes na posição *orto*, ou ainda grupos que exerçam forte repulsão ao par eletrônico de N1, ligados nessa mesma posição (OMe, OEt, Me, NH₂, etc.); (c) e (d) são típicos de grupos eletronegativos que possuem volume não muito grande, ligados na posição *orto* (Cl, NO₂, CN, etc.). Na Tab. 3.1 podemos ver os valores calculados para a energia da barreira rotacional da ligação 8-7-4-3 para os 45 derivados da série. Utilizaremos estes valores mais adiante (Cap. 5), no estudo das relações quantitativas entre estrutura química e atividade biológica.

Tabela 3.1 - Energia da barreira rotacional da ligação 8-7-4-3 calculada pelo AM1. Os valores foram medidos a partir de gráficos de ΔH_f em função do ângulo torsional 8-7-4-3. Os perfis indicados referem-se à Fig. 3.2.

Num.	Energia ^a	Perfil	Num.	Energia	Perfil	Num.	Energia	Perfil
1	1,66	a	16	4,80	b	31	1,40	a
2	9,73	b	17	6,20	c	32	1,40	a
3	4,73	c	18	3,88	b	33	1,55	a
4	2,05	a	19	1,80	a	34	1,41	a
5	6,36	b	20	1,49	a	35	1,47	a
6	6,54	c	21	5,27	b	36	9,24	c
7	6,67	b	22	1,61	a	37	8,52	c
8	7,41	b	23	1,67	a	38	9,44	b
9	5,60	d	24	1,41	a	39	4,99	c
10	5,82	c	25	1,54	a	40	5,25	c
11	1,58	a	26	1,51	a	41	1,63	a
12	1,97	a	27	1,57	a	42	4,37	d
13	1,48	a	28	5,82	b	43	6,66	b
14	1,71	a	29	1,52	a	44	4,71	c
15	1,65	a	30	1,43	a	45	3,84	b

(a) Dada em kcal/mol.

3.1.1 - Mínimos absolutos de energia conformacional

A análise minuciosa das curvas de potencial revelou a localização dos mínimos absolutos de energia. Estes locais encontram-se irregularmente distribuídos ao longo da série de compostos. Aparentemente não existe nenhum padrão de distribuição para eles, considerando-se que os compostos foram numerados aproximadamente em ordem decrescente de atividade biológica. A Fig. 3.3 dá-nos a idéia de onde estão localizados os mínimos de energia para os 45 derivados da DHP. Podemos notar que em alguns compostos há mais de um mínimo de energia, como por exemplo em H, 4-F, 4-Br, 4-I, etc. Isto ocorre devido à simetria global da molécula do composto.

Não podemos dizer que ficamos satisfeitos com os resultados mostrados na Fig. 3.3. Bom seria se, de imediato, descobríssemos um comportamento regular e previsível da distribuição dos valores do ângulo torsional 8-7-4-3. Ora, porque isto é tão importante? O ângulo diedro 8-7-4-3 define a situação espacial do anel fenílico em relação ao anel piridínico. Na maioria dos casos define também a localização espacial do substituinte do anel aromático. É certo que o receptor das DHPs possui sítios específicos de interação para com as diversas partes das moléculas (Coburn *et al.*, 1988; Seidel *et al.*, 1985 e Bolger *et al.*, 1983). Além disso, é razoável supor que a região do receptor que interage com o substituinte fenílico tenha extensão bastante limitada

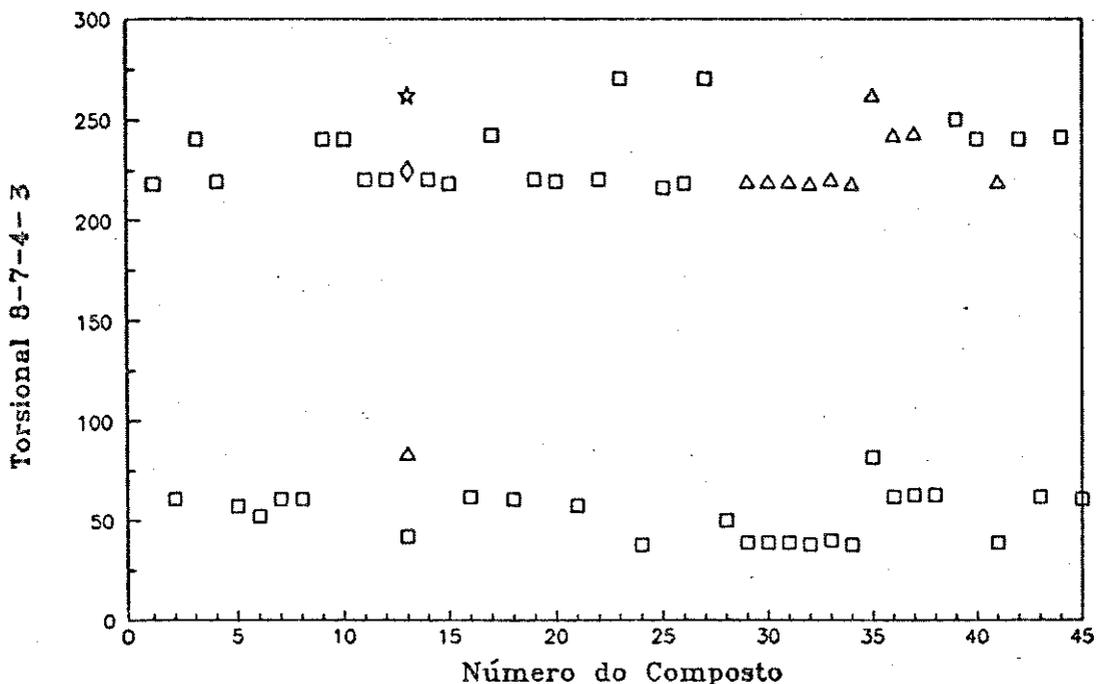


Figura 3.3 - Localização dos mínimos de energia conformacional revelados pela análise das curvas de potencial de rotação do anel fenílico em relação ao anel piridínico. Símbolos diferentes foram utilizados para assinalar a presença de mais de um mínimo absoluto para o mesmo composto.

(Coburn *et al.*, 1988). Isto acarretaria no fato de que o substituinte, quando da formação do complexo com o receptor, deva estar espacialmente orientado aproximadamente na mesma direção, independentemente do composto. Com base nesse argumento, talvez fosse de se esperar um comportamento mais regular para as conformações moleculares em função do mínimo absoluto de energia. Daí nossa insatisfação com os resultados obtidos.

Porém, a análise imparcial dos resultados, sob o prisma do método pelo qual foram obtidos, revela que mesmo que obtivéssemos correlação significativa entre o ângulo torsional 8-7-4-3 e a atividade biológica, teria sido por pura coincidência. Como já abordamos anteriormente, a otimização da geometria molecular pelo método AM1 é feita sem que influências externas interfiram no processo. Somente as interações intramoleculares são relevantes no trabalho de otimização da geometria. Não há porque esperar que durante a otimização as moléculas comportem-se como se houvesse por perto um receptor farmacológico invisível. Isto infelizmente não é possível. As moléculas têm total liberdade para assumir conformações próprias, sendo que as únicas forças que limitam o procedimento

vêm das interações intramoleculares. Assim, devemos mudar a abordagem de análise das curvas de potencial.

3.1.2 - Regiões termodinamicamente permitidas de estabilidade conformacional

Um método que nos parece interessante é a localização das regiões, ao longo de cada curva de potencial, capaz de abrigar a população molecular de 99% da total (Richards, 1983). Esta estimativa pode ser conseguida através de uns poucos cálculos de mecânica estatística (Richards, 1983 e Christoffersen, 1976). A vantagem de tal procedimento é que poderíamos selecionar, dentre uma gama enorme de valores do ângulo torsional 8-7-4-3, apenas alguns intervalos do mesmo. Estas regiões selecionadas corresponderiam às poucas conformações preferidas que seriam estatisticamente permitidas a cerca de 99% da população molecular. Nós estamos interessados em conhecer, para uma série de compostos similares, conformacionalmente flexíveis, o quão flexíveis eles são e quais intervalos de conformações são possíveis para cada molécula, à temperatura corporal.

A função de partição Z_{conf} é um número que indica como as moléculas estão distribuídas entre os níveis de energia disponíveis. Para o caso de apenas um ângulo torsional, τ , a função de partição pode ser definida como

$$Z_{conf} = \sum_{\tau} e^{-E(\tau) / kT} , \quad (3.2)$$

onde $E(\tau)$ é a energia calculada para a conformação definida por τ ; k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta (normalmente 310 K, que corresponde à temperatura do corpo humano).

A função de probabilidade pode então ser integrada sobre toda a curva, resultando em Z_0 , e a seguir normalizada pela correção de cada ponto,

$$Z_{conf}^{novo} = \frac{Z_{conf}^{velho}}{Z_0} , \quad (3.3)$$

de forma que a nova função de probabilidade total, Z_1 , quando integrada resulte em unidade.

Agora podemos gerar níveis de probabilidade que, quando sobrepostos às curvas de potencial, fornecem-nos os intervalos de valores para o ângulo torsional τ que seriam permitidos a uma dada população de moléculas (99% em nosso caso). Podemos mostrar de

forma analítica como calcular o valor do nível de energia, E_{99} , abaixo do qual concentra-se 99% da população molecular. Sabemos que a função Z_1 quando integrada deve resultar em unidade. Logo

$$Z_1 = \int_0^{E_{rot}} \lambda e^{-E/kT} dE = 1, \quad (3.4)$$

onde E_{rot} corresponde à altura máxima, em unidades de energia, da curva de potencial, sendo que ao valor mais baixo é atribuído o valor zero, λ é uma constante de ajustamento e utilizamos E ao invés de $E_{(t)}$ apenas para simplificar. Integrando e resolvendo em função de λ , temos

$$\lambda = \frac{1}{kT} \left(1 - e^{-E_{rot}/kT} \right)^{-1}. \quad (3.5)$$

Agora queremos determinar o nível de energia que, quando integrado, resulta na probabilidade de 0.99. Ou seja,

$$\int_0^{E_{99}} \lambda e^{-E/kT} dE = 0.99. \quad (3.6)$$

Efetando temos

$$E_{99} = -kT \ln \left(1 - \frac{0.99}{\lambda kT} \right). \quad (3.7)$$

Utilizamos o procedimento descrito acima e determinamos E_{99} para cada um dos compostos da série. Os valores de E_{99} são mostrados na Tab. 3.2.

Agora podemos analisar as curvas de potencial de cada um dos 45 compostos, juntamente com os respectivos níveis de energia que correspondem a 99% da população molecular (Figs. 3.4-3.12). Nas Figs. 3.4-3.12 os compostos estão organizados em rigorosa ordem decrescente de atividade biológica. Na Fig. 3.4 estão os cinco derivados mais ativos, na Fig. 3.5 os cinco mais ativos dentre os quarenta restantes e assim por diante. Em cada uma dessas figuras a relação dos compostos que aparece no alto à esquerda também nos dá a ordem decrescente de atividades. O mais ativo é o que aparece no alto da relação. As linhas tracejadas horizontalmente mostram os níveis de energia E_{99} para cada curva. A associação entre cada curva de potencial e o respectivo nível de energia é mostrado com símbolos próprios.

Tabela 3.2 - Nível de energia correspondente a 99% da população de cada uma das espécies químicas cujas curvas de potencial encontram-se nas Figs. 3.4-3.12. Os valores de E_{99} correspondem à coordenada Y das linhas horizontais tracejadas dessas figuras.

Comp.	$E_{99}^{(a)}$	Comp.	E_{99}	Comp.	E_{99}
1	1,57	16	2,81	31	1,36
2	2,84	17	2,83	32	1,34
3	2,81	18	2,74	33	1,47
4	1,90	19	1,70	34	1,36
5	2,83	20	1,43	35	1,39
6	2,84	21	2,75	36	2,84
7	2,84	22	1,53	37	2,84
8	2,84	23	1,56	38	2,84
9	2,83	24	1,35	39	2,82
10	2,83	25	1,47	40	2,82
11	1,52	26	1,45	41	1,55
12	1,50	27	1,48	42	2,78
13	1,40	28	2,83	43	2,84
14	1,62	29	1,46	44	2,81
15	1,57	30	1,36	45	2,73

(a) Dado em kcal/mol.

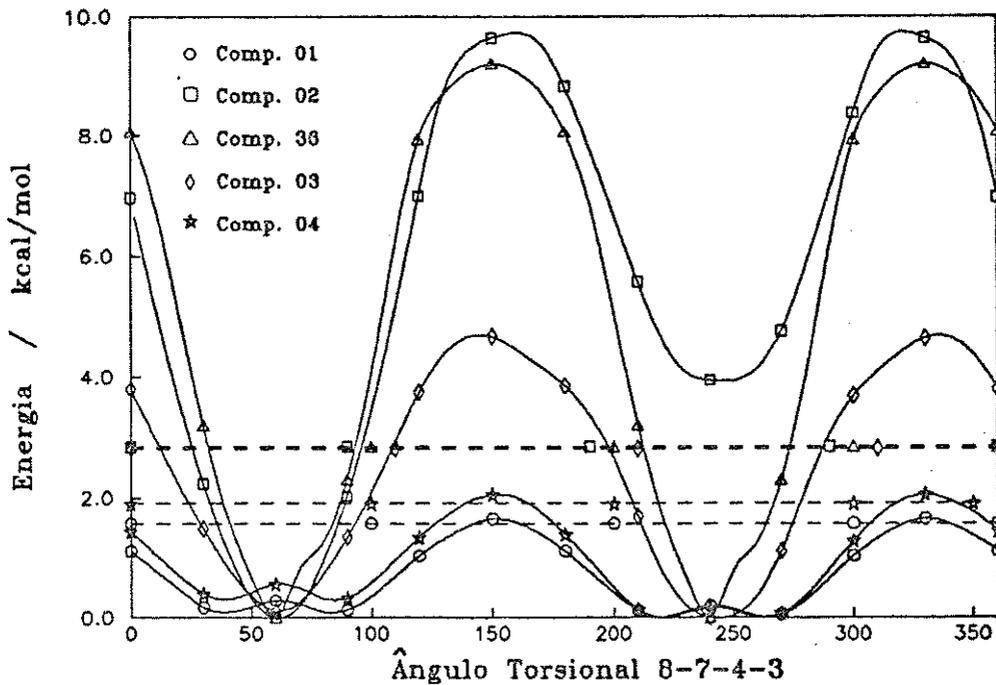


Figura 3.4 - Curvas de potencial de rotação do ângulo torsional 8-7-4-3, juntamente com os níveis de energia abaixo dos quais ocorre uma população molecular de 99%.

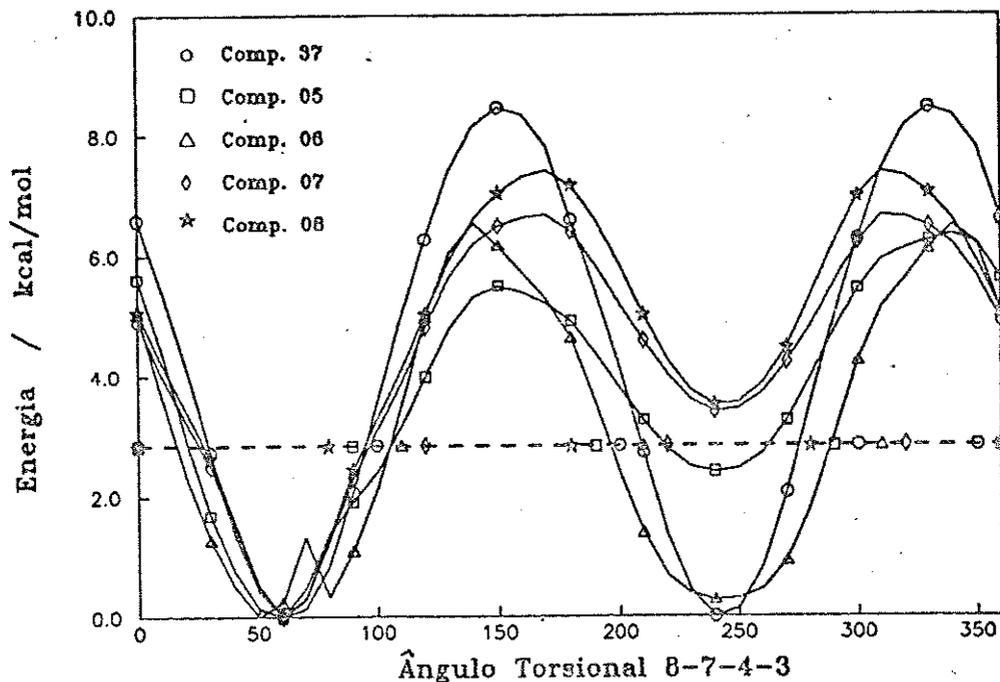


Figura 3.5 - Curvas de potencial de rotação do ângulo torsional 8-7-4-3, juntamente com os níveis de energia abaixo dos quais ocorre uma população molecular de 99%.

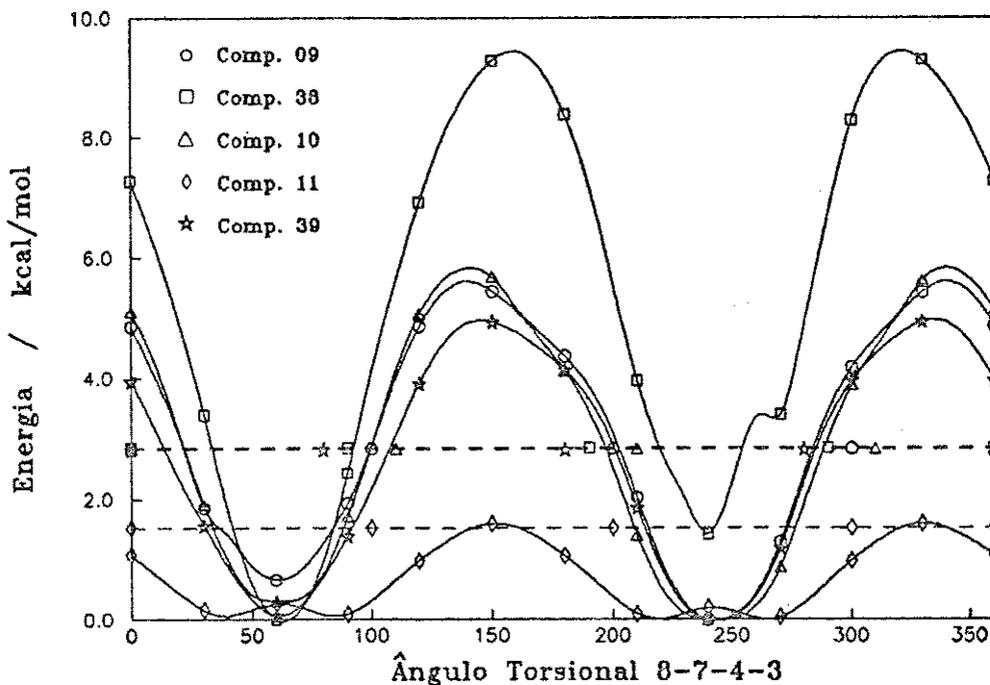


Figura 3.6 - Curvas de potencial de rotação do ângulo torsional 8-7-4-3, juntamente com os níveis de energia abaixo dos quais ocorre uma população molecular de 99%.

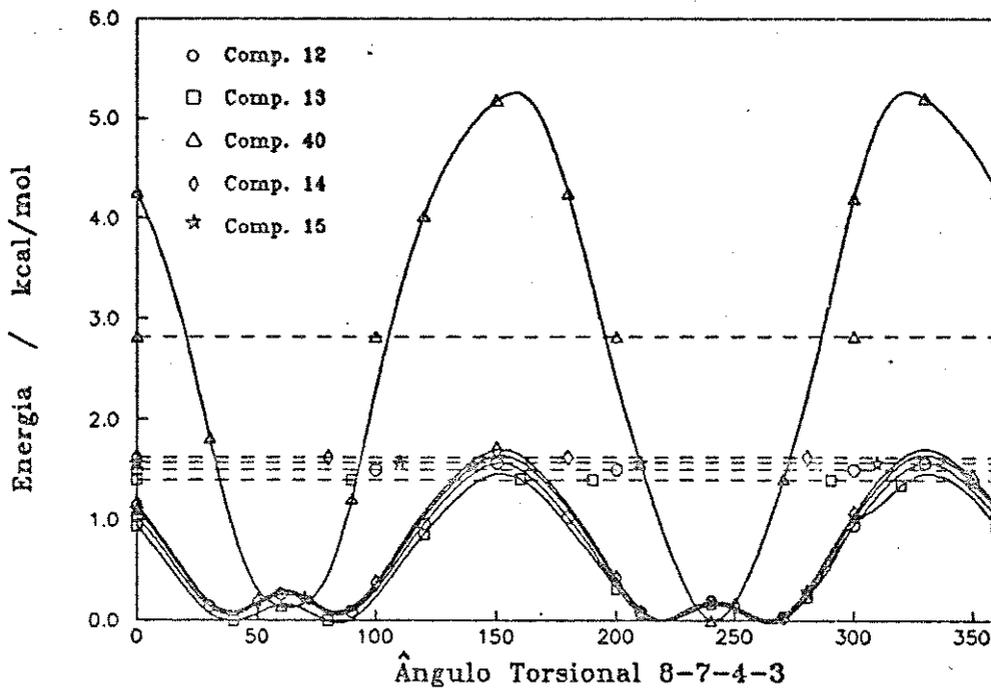


Figura 3.7 - Curvas de potencial de rotação do ângulo torsional 8-7-4-3, juntamente com os níveis de energia abaixo dos quais ocorre uma população molecular de 99%.

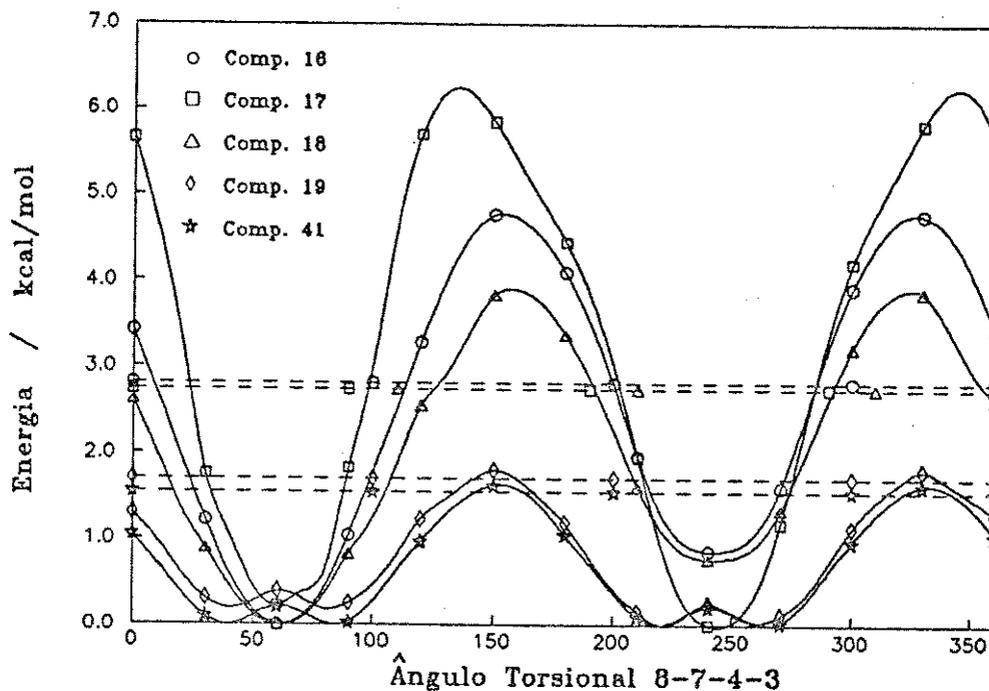


Figura 3.8 - Curvas de potencial de rotação do ângulo torsional 8-7-4-3, juntamente com os níveis de energia abaixo dos quais ocorre uma população molecular de 99%.

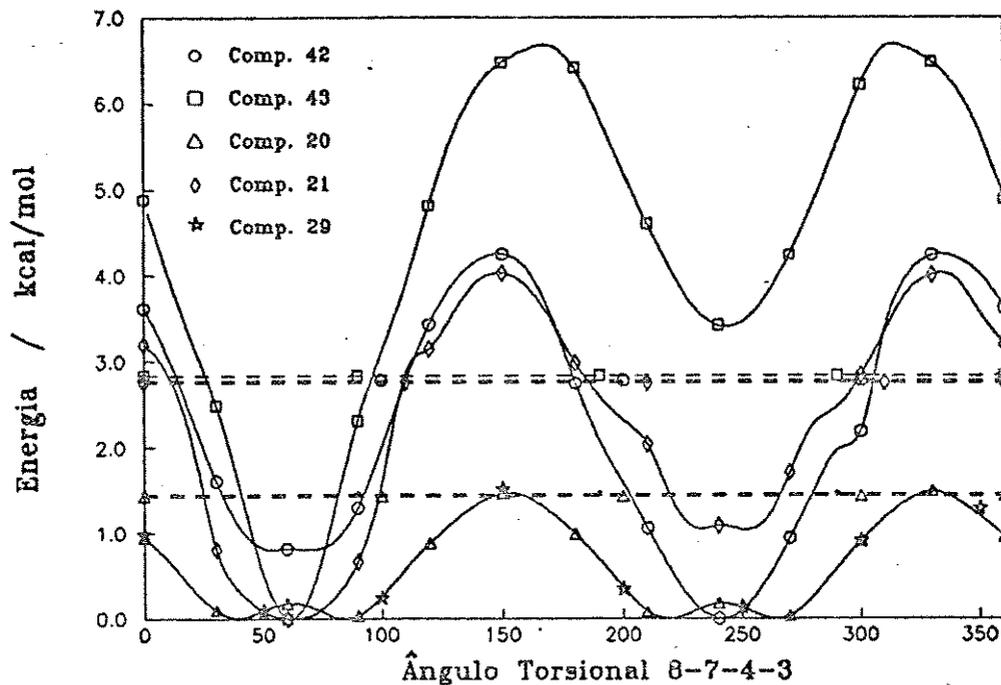


Figura 3.9 - Curvas de potencial de rotação do ângulo torsional 8-7-4-3, juntamente com os níveis de energia abaixo dos quais ocorre uma população molecular de 99%.

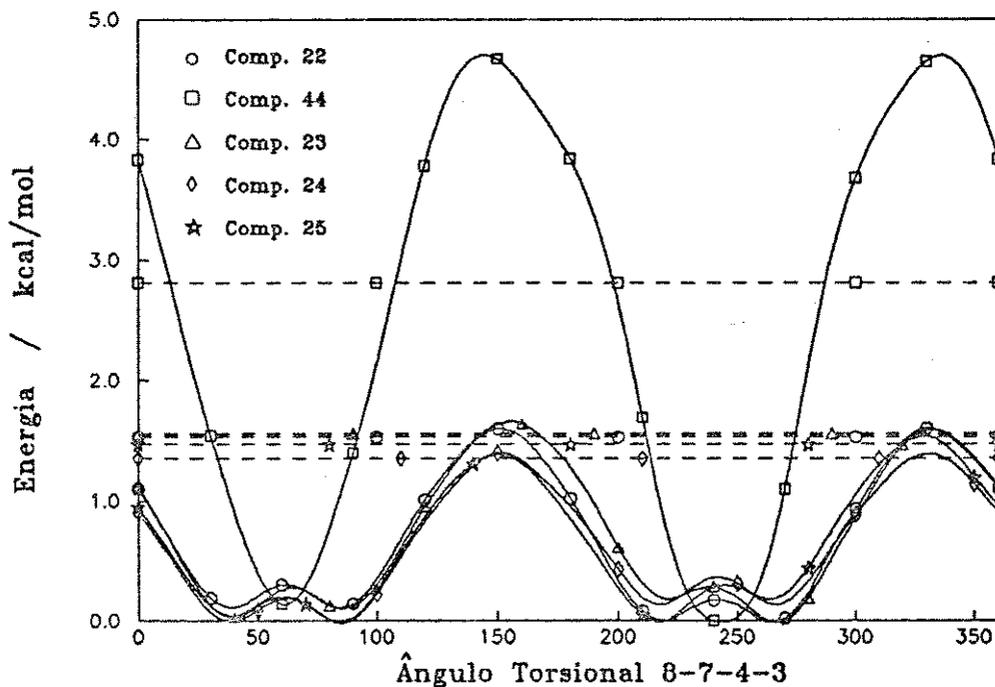


Figura 3.10 - Curvas de potencial de rotação do ângulo torsional 8-7-4-3, juntamente com os níveis de energia abaixo dos quais ocorre uma população molecular de 99%.

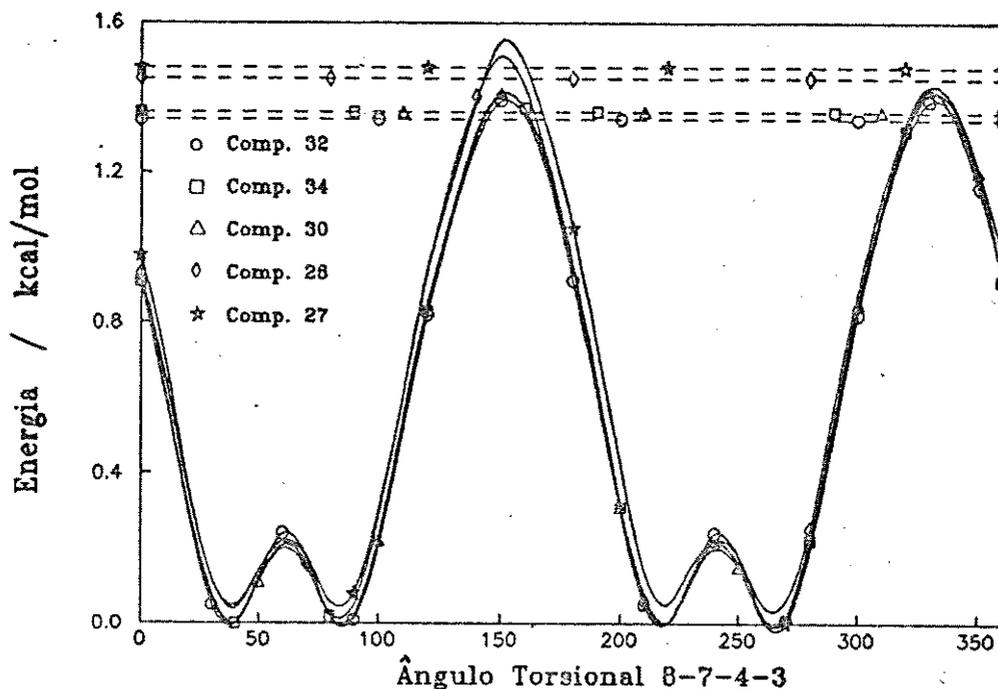


Figura 3.11 - Curvas de potencial de rotação do ângulo torsional 8-7-4-3, juntamente com os níveis de energia abaixo dos quais ocorre uma população molecular de 99%.

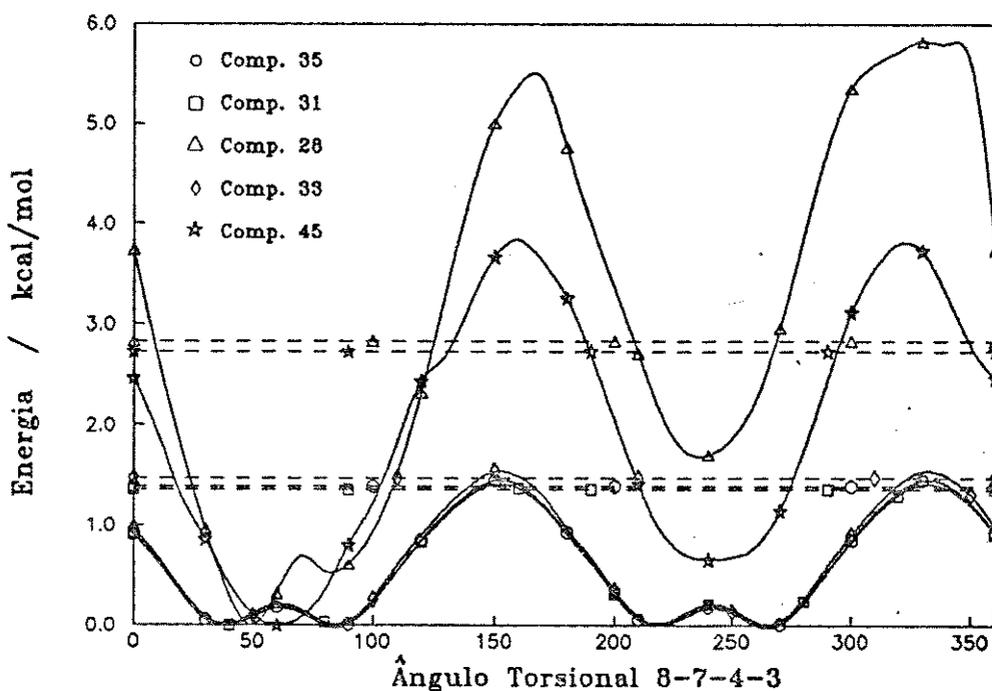


Figura 3.12 - Curvas de potencial de rotação do ângulo torsional 8-7-4-3, juntamente com os níveis de energia abaixo dos quais ocorre uma população molecular de 99%.

Nossa intenção é comparar os intervalos do ângulo torsional 8-7-4-3 permitidos a cada conjunto de cinco compostos e verificar a existência de padrões de comportamento. Note que selecionaremos somente intervalos de ângulos comuns aos cinco compostos. A razão para isso é que, por hipótese, a orientação do substituinte aromático é importante para a atividade biológica. Portanto, desejamos saber quais intervalos do ângulo torsional 8-7-4-3 são permitidos aos grupos mais ativos, moderadamente ativos, bem como aos compostos menos ativos.

Um esquema contendo os intervalos encontrados nas Figs. 3.4-3.12 pode ser visto na Fig. 3.13. Podemos notar que de maneira geral a flexibilidade dos compostos mais ativos é menor do que a dos compostos menos ativos. Vemos que os intervalos permitidos para o ângulo 8-7-4-3 vai gradativamente aumentando, até que não haja praticamente restrições quanto a seus limites. Outra observação importante é que a única região comum a todos os compostos, sem exceção, é a que vai de 30° a 90°, aproximadamente. Finalmente, vemos que esses resultados são compatíveis com nossa suposição inicial de que a região do receptor que interage com o substituinte fenílico deva ter extensão, ou pelo menos largura, limitada.

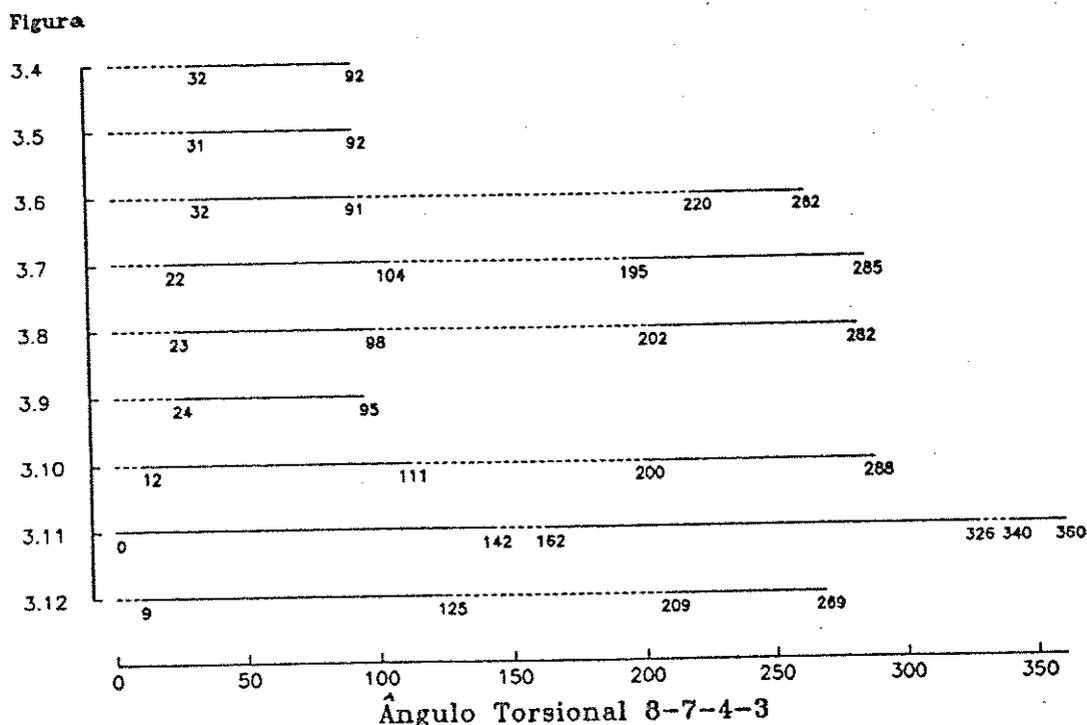


Figura 3.13 - Resumo dos intervalos do ângulo torsional 8-7-4-3 permitido a 99% das moléculas, a 37° C. Cada intervalo refere-se à região comum a cada grupo de cinco compostos apresentados nas Figs. 3.4-3.12.

3.2 - Determinação da geometria de menor energia

Para cada um dos compostos do grupo, submetemos ao programa AM1 uma geometria inicial aproximada para subsequente otimização. Esta foi composta por uma matriz de entrada composta pelos comprimentos e ângulos de ligação e ângulos torsionais aproximados correspondentes à geometria mais próxima do mínimo absoluto detectado pelas curvas de potencial, além de outras informações pertinentes. Deixamos livres todos esses parâmetros para fins de otimização, ou seja, permitimos que toda a geometria ficasse flexível, de forma que o conjunto chegasse à conformação que representasse a situação de menor energia conformacional para a molécula.

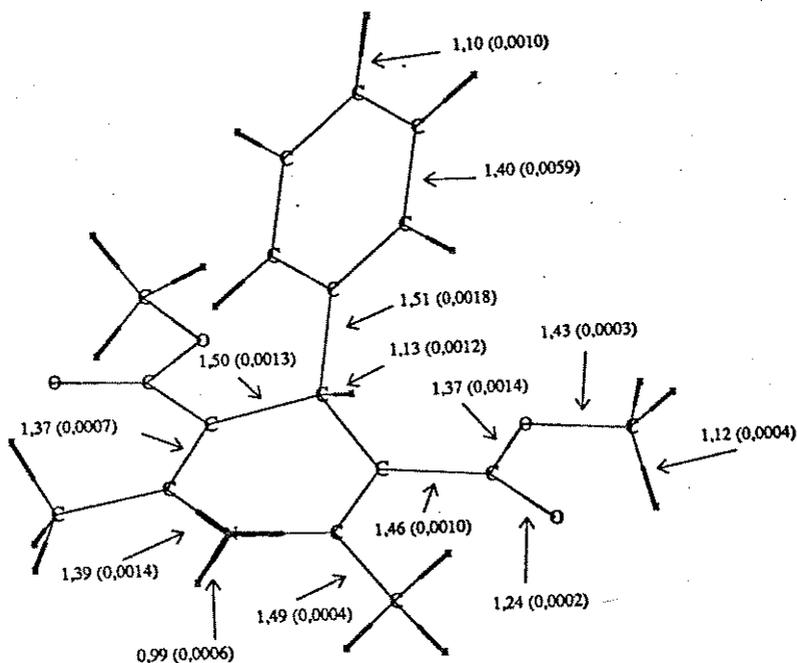


Figura 3.14 - Comprimento médio, em Å, e os respectivos desvios padrões das principais ligações na molécula da DHP, segundo o critério do mínimo absoluto de estabilidade conformacional (seção 3.2). Cada valor corresponde à média de 45 valores individuais.

Após o cálculo da geometria otimizada de cada uma das moléculas, determinamos o valor médio dos parâmetros geométricos e os respectivos desvios padrões. Queremos conhecer a extensão do intervalo de variação a que cada valor médio está sujeito. Devemos observar que esses valores representam a geometria média de uma série de moléculas com uma gama muito grande de atividade biológica. A Fig. 3.14 mostra os valores do comprimento médio

das principais ligações químicas dos derivados da DHP, juntamente com os respectivos desvios padrões. Cada uma dessas médias foi computada a partir de 45 valores individuais. As médias dos comprimentos de ligação equivalentes, em cada lado do anel piridínico, foram computadas em separado e comparadas logo a seguir. A coincidência foi quase perfeita. Por esse motivo apresentamos apenas os valores para uma das metades do anel piridínico. O cálculo demonstrou que a simetria do anel piridínico, e seus substituintes, ainda continua elevada mesmo após a substituição no anel benzênico. Podemos notar, analisando a Fig. 3.14, que os comprimentos de ligação calculados permanecem aproximadamente constantes ao longo da série de moléculas. Observe a grandeza dos desvios padrões em relação aos comprimentos de ligação. Não nos preocupamos em fazer concordar o número de decimais da medida do comprimento de ligação com o do desvio padrão. Este foi mostrado apenas para dar-nos a idéia da invariância dos comprimentos de ligação ao longo da série.

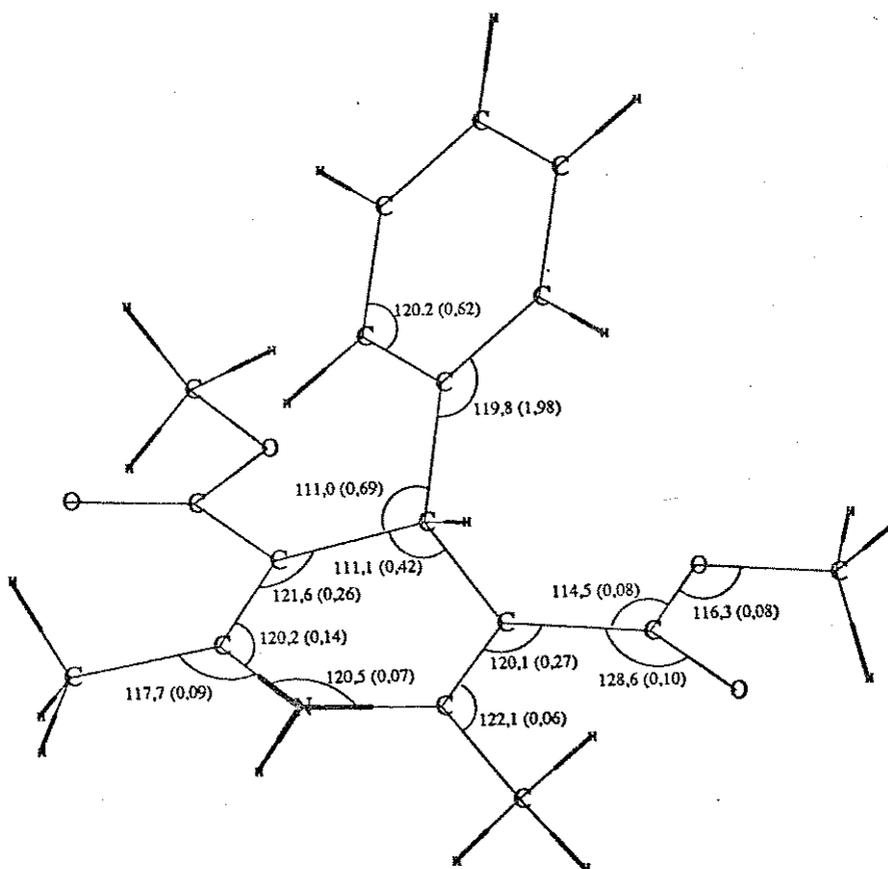


Figura 3.15 - Ângulos médios e os respectivos desvios padrões para as principais ligações dos derivados da DHP, segundo o critério do mínimo absoluto de estabilidade conformacional (seção 3.2). Cada valor corresponde à média de 45 valores individuais.

Na Fig. 3.15 encontramos os valores médios dos principais ângulos de ligação, que foram calculados de maneira idêntica aos comprimentos de ligação. Aqui também podemos observar que esses ângulos não variam apreciavelmente ao longo da série. O ângulo 8-7-4 é aquele cuja média possui o maior desvio padrão, influência natural da presença dos diversos substituintes que se ligam ao grupo fenil. Observando a amplitude da variação dos valores calculados dos comprimentos e ângulos de ligação, chegamos à conclusão obrigatória de que eles não podem ser importantes na explicação da atividade biológica desses compostos.

Tabela 3.3 - Principais ângulos torsionais médios e os respectivos desvios padrões calculados pelo AM1, na molécula da DHP, segundo o critério do mínimo absoluto de estabilidade conformacional (seção 3.2). Cada ângulo citado corresponde à média de 45 valores individuais.

Ligação	Ângulo	Ligação	Ângulo
4-3-2-1	-4,92 ($\pm 0,71$)	32-31-3-2	14,83 ($\pm 3,76$)
5-4-3-2	19,63 ($\pm 3,04$)	33-31-3-2	-163,80 ($\pm 3,98$)
6-5-4-3	-19,90 ($\pm 3,18$)	34-33-31-3	-179,61 ($\pm 0,67$)
7-4-3-2	-103,90 ($\pm 4,29$)	51-5-4-3	159,63 ($\pm 2,53$)
8-7-4-3	-29,39 ($\pm 94,07$)	52-51-5-4	166,29 ($\pm 4,22$)
9-8-7-4	180,00 ($\pm 0,29$)	53-51-5-4	-15,16 ($\pm 4,42$)
10-9-8-7	-0,02 ($\pm 0,16$)	54-53-51-5	-179,82 ($\pm 0,82$)
21-2-1-6	167,73 ($\pm 3,12$)	61-6-5-4	-174,94 ($\pm 0,80$)
31-3-2-1	174,51 ($\pm 1,03$)		

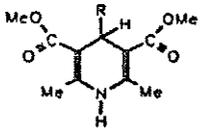
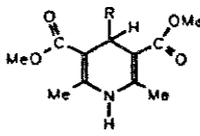
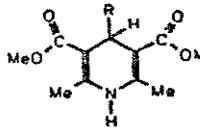
Na Tab. 3.3 exibimos os principais ângulos torsionais médios dos derivados da DHP. Notamos que alguns desses valores já apresentam apreciável variação dentro da série. Como esperado, os ângulos diedros são mais sensíveis à presença dos diversos substituintes da série. A sensibilidade dos ângulos diedros pode ser um parametro útil no estudo das relações estrutura-atividade. A importância dessa utilidade depende da regularidade e do gradiente de sua variação. Podemos avaliar a exatidão dos resultados dos cálculos que estamos apresentando através da comparação com os correspondentes valores experimentais. Embora sejam raras as publicações de dados cristalográficos sobre as DHPs, conseguimos obter os valores experimentais de alguns ângulos torsionais para oito dos derivados da série (Fossheim *et al.*, 1982). Esses valores experimentais, juntamente com os respectivos valores calculados, encontram-se na Tab. 3.4, onde podem ser comparados. Podemos observar que em apenas um dos ângulos torsionais apresentados não há coincidência, em ordem de grandeza, entre os valores experimentais e os calculados. Trata-se do ângulo diedro 6-5-51-52. De acordo com os resultados das análises cristalográficas, em todos os derivados apresentados na Tab. 3.4,

exceto F_5 , um dos grupos carbometoxi encontra-se espacialmente invertido em relação ao outro, no anel piridínico. Outras análises cristalográficas de compostos correlatos também estão disponíveis na literatura (Langs *et al.*, 1987; Fosshem *et al.*, 1988 e Triggle *et al.*, 1980).

Tabela 3.4 - Valores (V) experimentais (E) e calculados (C) de alguns ângulos torsionais, para efeito de comparação. Os valores experimentais foram extraídos da referência 9.

Ligação	V	Derivado							
		3-NO ₂	2-NO ₂	H	3-CN	3-Me	4-NO ₂	4-NMe ₂	F ₅
1-2-3-4	C	-3,3	-3,7	-4,1	-3,8	-4,4	-4,3	-5,5	-5,5
	E	-7,0	-2,9	-6,7	-7,0	-7,6	-8,6	-5,6	-8,4
2-3-4-5	C	19,6	18,3	20,4	20,2	20,7	20,7	21,7	17,1
	E	24,4	17,9	27,7	29,4	25,3	24,2	27,1	18,0
3-4-5-6	C	-19,0	-17,4	-20,3	-20,0	-20,5	-20,4	-20,6	-16,4
	E	-24,1	-22,0	-29,3	-31,1	-25,1	-23,2	-29,0	-16,1
4-5-6-1	C	4,6	3,3	5,6	5,2	5,7	5,4	4,7	5,0
	E	6,5	10,6	10,6	10,3	7,1	6,6	10,5	4,8
6-1-2-3	C	-14,4	-13,3	-14,0	-14,4	-14,0	-14,1	-13,7	-8,5
	E	-14,2	-11,3	-16,3	-18,3	-14,2	-11,1	-17,5	-5,1
5-6-1-2	C	13,7	13,5	13,3	13,7	13,3	13,6	14,2	8,7
	E	14,4	7,4	14,1	16,4	14,4	12,1	14,8	7,0
2-3-31-32	C	13,2	13,0	14,3	13,6	14,0	11,4	12,0	10,5
	E	7,1	9,1	4,1	4,3	11,4	13,0	11,8	5,3
3-31-33-34	C	-179,8	179,7	-179,0	-179,4	-179,0	-179,7	179,4	179,0
	E	-178,5	-179,8	176,6	178,6	-178,8	179,5	178,5	179,6
6-5-51-52	C	-9,8	-7,9	-12,2	-10,7	-12,4	-10,4	-14,3	-10,6
	E	-177,8	-169,9	-177,0	174,2	173,5	165,7	175,4	8,1
5-51-53-54	C	-179,8	179,2	-179,6	-179,4	-179,4	-178,8	178,8	-179,1
	E	-177,9	175,4	177,0	177,3	-177,2	-178,4	-177,0	176,2
21-2-3-31	C	-4,5	-4,3	-4,7	-4,6	-4,6	-4,8	-5,3	-5,8
	E	-2,0	5,6	2,6	-1,1	-3,1	-2,5	-0,1	-4,3
51-5-6-61	C	5,3	4,5	5,5	5,4	5,5	5,9	4,6	5,7
	E	4,8	9,9	5,6	10,5	3,5	2,2	6,3	-0,3
8-7-4-5	C	-84,7	-71,9	-84,0	-84,3	-83,7	-85,7	-40,9	-64,9
	E	-57,8	-73,5	-81,5	-96,3	-58,2	-39,5	-90,1	-62,8
12-7-4-5	C	96,1	108,7	96,5	96,3	96,8	94,7	142,5	120,0
	E	121,0	101,0	96,3	82,8	121,9	142,2	87,5	118,8

Tabela 3.5 - Diferença energética, em kcal/mol, entre as possíveis conformações dos grupos carbometoxi, para cinco derivados da DHP.

Composto	Diferença Energética (kcal/mol)		
			
3-Br	0,0	1,0	2,0
2-NO ₂	0,0	1,8	3,9
4-NMe ₂	0,0	0,9	1,8
2,6-Cl ₂	0,0	0,6	1,4
F ₅	0,0	1,2	2,4

O fato de um dos grupos carbometoxi encontrar-se espacialmente invertido em relação ao outro, na análise cristalográfica (Fossheim *et al.*, 1982), tem-nos preocupado bastante. Em termos puramente energéticos, essa conformação é mais instável do que aquela onde ambas carbonilas encontram-se próximas às duplas ligações do anel piridínico (Fig. 3.14). A experiência tem demonstrado que sempre que dispomos de dados experimentais confiáveis, estes devem substituir e servir como referência para os valores calculados. Portanto, neste momento temos um pequeno impasse. Os dados experimentais disponíveis referem-se a moléculas no estado cristalino, onde à volta de cada uma delas existem diversas outras iguais. Por outro lado, os valores calculados referem-se a moléculas completamente isoladas. Ambas situações são completamente diversas daquela onde o fármaco deverá verdadeiramente atuar, ou seja, dissolvido nos fluidos biológicos, cercado por íons de toda espécie e também por macromoléculas diversas e tendo que interagir com um receptor de natureza protéica. É realmente uma situação complicada. Em nossa maneira de ver as coisas, entendemos que o fato de os grupos carbometoxi encontrarem-se invertidos pode ser uma contingência do estado sólido. Não é difícil imaginar que dessa maneira as moléculas acomodam-se com mais facilidade à rede cristalina do que se os grupos não estivessem invertidos. Agora, na fase líquida a situação pode ser bem outra. Não havendo mais a necessidade de comprimirem-se na rede cristalina, as DHPs podem adotar a conformação energeticamente mais estável, ou seja aquela mostrada na Fig. 3.14. Apenas para termos idéia da estabilidade relativa de cada conformero, otimizamos a geometria de cinco derivados da DHP, onde os grupos carbometoxi estão dispostos nas três formas possíveis, em mínimos locais de energia conformacional.

Podemos ver na Tab. 3.5 que, nos compostos analisados, a conformação mais estável é aquela proposta por nós. Por esses motivos, levaremos nosso trabalho adiante adotando a geometria dos grupos carboretóxi energeticamente mais estável.

Não é difícil notar que os valores calculados, mostrados na Tab. 3.4, apresentam variância bem menor do que os valores experimentais, para os diversos ângulos torsionais. Acontece que os ângulos calculados são apenas a expressão das interações intramoleculares, pois o AM1 considera a molécula isolada, isenta de perturbações externas. Na determinação experimental, os valores observados expressam as interações intermoleculares, além das intramoleculares. Sabemos que a conformação bioativa pode não ser a mesma encontrada na molécula isolada nem na molécula presente no cristal. Por esta razão é igualmente válido correlacionar tanto uma geometria quanto outra com a atividade biológica. Se ambas geometrias estiverem correlacionadas entre si, tanto melhor.

Analisando esses resultados de forma global, vemos que as características geométricas das DHPs, segundo o critério do mínimo absoluto de energia conformacional, são as seguintes:

- Anel piridínico na conformação barco.
- Átomo de H ligado a N1 na posição equatorial.
- Anel fenílico ligado a C4 na posição axial.
- Plano do anel fenílico bissectando o anel piridínico, não exatamente ao meio.
- Substituinte presente no anel fenílico ora em oposição ao anel piridínico, ora não.

3.3 - Geometria molecular selecionada através das curvas de potencial

Vimos na seção 3.1.2 que existe um intervalo para o ângulo torsional 8-7-4-3 que é comum a todos os 45 derivados da DHP. Este intervalo foi determinado com base em cálculos de termodinâmica estatística. Estamos agora interessados em otimizar a geometria dessas moléculas impondo a condição de que o ângulo torsional 8-7-4-3 assuma um valor que esteja contido naquele intervalo (30° a 90°). Vamos submeter ao AM1 uma geometria inicial que esteja próxima ao mínimo local presente no intervalo. Caso haja dois mínimos locais, escolheremos aquele localizado mais próximo de 90°. A razão disto é que existem trabalhos publicados onde o anel fenílico é mantido rígido em relação ao anel piridínico e os compostos

mais ativos apresentavam o ângulo torsional 8-7-4-3 próximo a 90° (Seidel *et al.*, 1985; Kubinyi & Klebe, 1987 e Triggle, 1990).

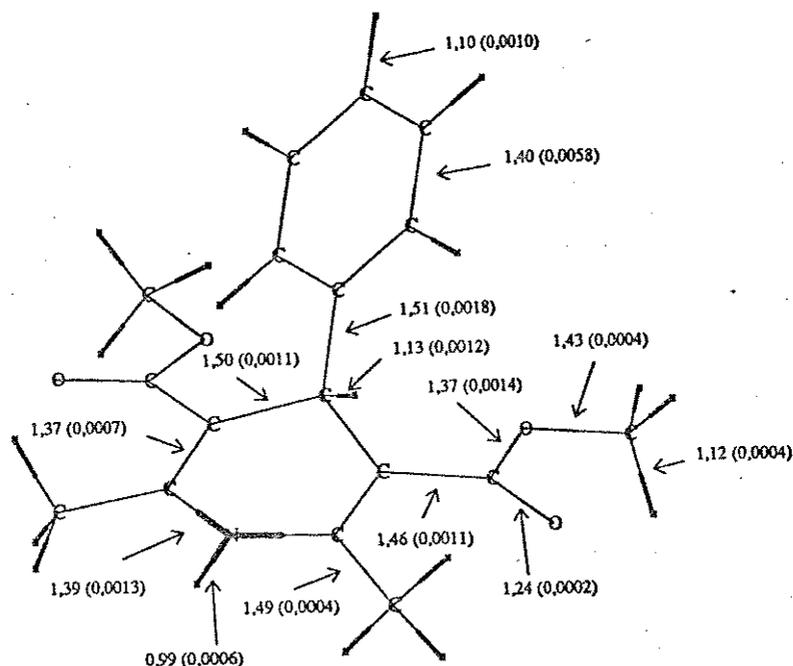


Figura 3.16 - Comprimento médio, em Å, e os respectivos desvios padrões das principais ligações na molécula da DHP, segundo o critério das regiões termodinamicamente permitidas a 99% da população molecular (seção 3.3). Cada valor corresponde à média de 45 valores individuais.

Após efetuarmos os cálculos de otimização de geometria molecular, determinamos novamente os valores médios dos comprimentos e ângulos de ligação e ângulos torsionais juntamente com os respectivos desvios padrões. Para isto adotamos os mesmos critérios utilizados na seção 3.2. As Figs. 3.16 e 3.17 mostram os comprimentos e ângulos médios para as principais ligações presentes nas DHPs, respectivamente. Os principais ângulos torsionais médios podem ser vistos na Tab. 3.6. Pouca diferença pode ser notada entre estes valores e aqueles apresentados nas Figs. 3.14 e 3.15 e Tab. 3.3. Os desvios padrões associados aos valores médios dos comprimentos e ângulos de ligação também não diferem apreciavelmente daqueles apresentados anteriormente. No caso dos ângulos torsionais, apenas o ângulo 8-7-4-3, como era de se esperar, apresenta diferença substancial tanto no valor médio quanto no desvio padrão. Isto nos dá uma idéia da pouca influência da rotação do anel fenílico sobre os três parâmetros geométricos.

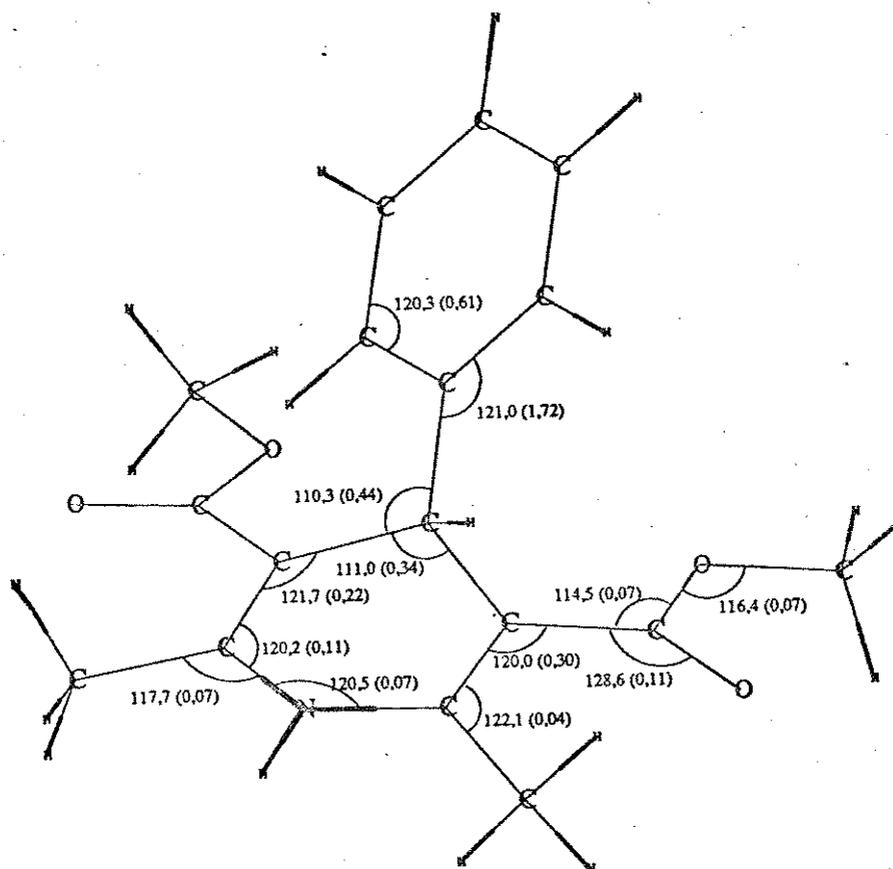


Figura 3.17 - Ângulos médios e os respectivos desvios padrões para as principais ligações na molécula da DHP, segundo o critério das regiões termodinamicamente permitidas a 99% da população molecular (seção 3.3). Cada valor corresponde à média de 45 valores individuais.

Tabela 3.6 - Principais ângulos torsionais médios e respectivos desvios padrões calculados pelo AM1, na molécula da DHP. Cada ângulo citado corresponde à média de 45 valores individuais.

Ligação	Ângulo	Ligação	Ângulo
4-3-2-1	-5,04 (±0,74)	32-31-3-2	15,56 (±5,01)
5-4-3-2	20,15 (±2,24)	33-31-3-2	-162,96 (±5,23)
6-5-4-3	-19,96 (±2,13)	34-33-31-3	-179,91 (±0,83)
7-4-3-2	-103,24 (±2,82)	51-5-4-3	159,64 (±1,71)
8-7-4-3	73,91 (±13,02)	52-51-5-4	164,71 (±4,50)
9-8-7-4	179,93 (±0,33)	53-51-5-4	-16,65 (±4,78)
10-9-8-7	0,02 (±0,19)	54-53-51-5	179,44 (±0,62)
21-2-1-6	167,06 (±2,02)	61-6-5-4	-175,47 (±0,48)
31-3-2-1	174,51 (±0,75)		

As características básicas da geometria molecular média determinada segundo os critérios desta seção são os seguintes:

- Anel piridínico na conformação barco.
- Átomo de H ligado a N1 na posição equatorial.
- Anel fenílico ligado a C4 na posição axial.
- Plano do anel fenílico bissectando o anel piridínico, bem próximo à linha N1-C4.
- Substituinte presente no anel fenílico sempre em oposição ao anel piridínico.

Pelo que acabamos de discutir, fica claro que a análise da geometria molecular tratada nos moldes desta seção, juntamente com a seção 3.1.2, é muito mais elegante e coerente com os resultados experimentais disponíveis. A geometria molecular obtida com base apenas nos mínimos absolutos de energia conformacional são quase que valores estéreis, números desprovidos de significado no que tange às relações estrutura-atividade. Quando introduzimos o tratamento mecânico-estatístico acoplado às categorias de atividade biológica dos compostos, acrescentamos nova dimensão à resolução do problema e portanto, colocamo-nos numa posição mais privilegiada para obter solução coerente para o tratamento da geometria molecular. Sabemos muito bem que isso ainda não é o bastante. O tratamento teórico ideal deveria incluir a simulação dinâmica dessas moléculas em meio solvente apropriado [cuja constante dielétrica esteja em torno de 28, que é o valor médio aproximado dos fluidos intercelulares (Gill, 1965)]. E ainda mais, existem diversos programas computacionais de tratamento molecular gráfico no mercado internacional aos quais ainda não temos acesso[†]. A utilização desses recursos tem agilizado as pesquisas na área das relações estrutura-atividade nos grandes centros científicos universitários e privados pelo mundo afora. Mesmo assim, cientes de nossas limitações, utilizamos uma técnica relativamente simples e cujos resultados, em termos de geometria molecular, são bastante coerentes.

3.4 - Características geométricas globais

Apresentaremos nesta seção características geométricas de natureza mais geral. Descreveremos com mais detalhes a conformação barco do anel piridínico e também o contorno geométrico dos 45 derivados da DHP. Apresentaremos, como anteriormente, os

[†] CONCORD, Tripos Associates, St. Louis, USA; Chem-X, Chemical Design Ltd., Oxford, England; SYBYL, Tripos Associates, St. Louis, USA e UniChem, Cray Research Inc., Minnesota, USA.

resultados na forma de valores médios. Esses valores médios foram computados considerando todos os integrantes da série. Excepcionalmente poderemos apresentar valores para os quais nem todas as moléculas contribuíram. Porém, haverá boa justificativa para tal. Um detalhe importante é que os resultados que apresentaremos nesta seção foram obtidos utilizando-se as geometrias moleculares deduzidas a partir da análise das curvas de potencial (seção 3.3). Acharmos desnecessário estender a presente discussão às geometrias baseadas nos mínimos absolutos de energia conformacional (seção 3.1) porque estas estão pouco correlacionadas com a geometria observada experimentalmente.

O anel piridínico das DHPs não é aromático. Seu átomo C4 apresenta hibridização sp^3 , o que obriga o anel a assumir a conformação não-planar. A hibridização sp^3 de C4 é garantida pela presença de um átomo de hidrogênio ligado ao mesmo, além do grupo fenil-substituído. Em todos os cálculos que efetuamos, o anel piridínico adotou a conformação bote e C7 ligou-se à posição axial do anel. Outra coisa, admitindo-se que o barco esteja virado para cima, o átomo de hidrogênio ligado a N1 encontra-se abaixo do plano N1-C2-C6. Acima e abaixo deste plano localiza-se o orbital que abriga o par eletrônico não compartilhado de N1, com elevado caráter p. Este orbital foi responsável por algumas características especiais das curvas de potencial estudadas atrás. Todas essas características foram confirmadas experimentalmente (Fossheim *et al.*, 1982 e 1988; Langs *et al.*, 1987 e Triggler *et al.*, 1980). Podemos observar na Fig. 3.18 alguns dos aspectos mencionados acima. Os valores entre parênteses correspondem ao desvio padrão da medida.

Os átomos C2, C3, C5 e C6 estão aproximadamente no mesmo plano em quase todos os derivados. As maiores distorções deste plano ocorrem nos compostos 3-OCO ϕ e 2,4,6-(OMe) $_3$, em virtude do volume destes grupos substituintes. Na Fig. 3.18, o ângulo que a ligação C4-C7 faz com o plano C3-C4-C5 equivale a 65,52 ($\pm 7,89$). Acontece que se eliminarmos da média os dois compostos citados acima, o valor passa a ser 67,20 ($\pm 0,79$). Da mesma forma, o ângulo entre os planos C3-C4-C5 e C2-C3-C5-C6, cujo valor é 18,27 ($\pm 7,14$), passa a valer 16,96 ($\pm 1,89$) se não considerarmos os compostos 27 e 45, ou seja, passam a variar substancialmente menos ao longo da série. Como mencionamos antes, os grupos substituintes desses dois compostos ocasionam modificações profundas em toda a extensão das respectivas moléculas. O cálculo dos valores desses ângulos especiais, que não é fornecido pelo AM1, foi executado pelo programa ATCOOR (Nordlander *et al.*, 1985).

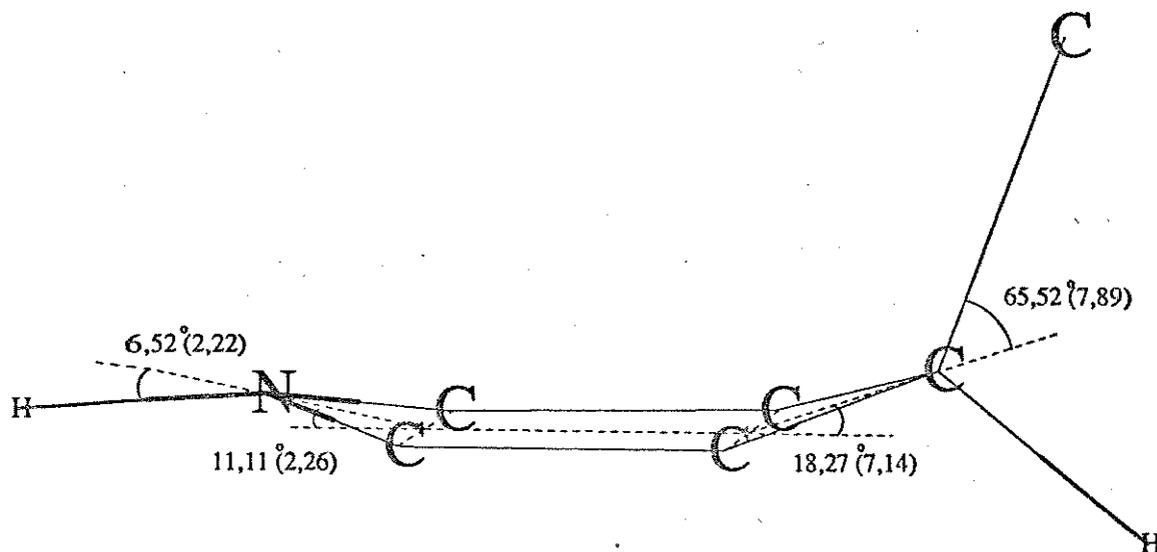


Figura 3.18 - Características angulares médias do anel piridínico.

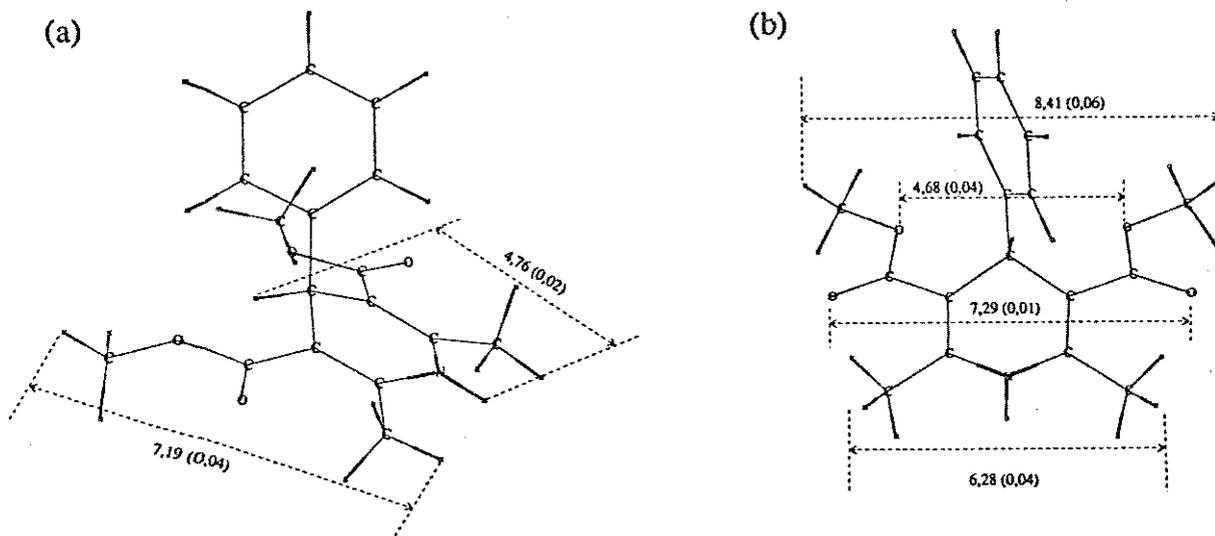


Figura 3.19 - Algumas distâncias médias de interesse, em Å. Os desvios padrões são mostrados entre parênteses.

Alguns valores de comprimentos internos das moléculas apresentaram variância surpreendentemente pequena. A Fig. 3.19 mostra algumas medidas. Apesar da aparente flexibilidade dos grupos carbometoxi, a medida da distância entre as partes metálicas desses

grupos apresentou desvio padrão de apenas 0,06, para os 45 compostos. Da mesma forma, a distância entre esses grupos e os grupos metilas ligados a N1 e C6 apresentou desvio padrão de 0,04. Estas observações demonstram que, de uma forma geral, a substituição fenílica não interfere de maneira contundente na disposição espacial dos ligantes do anel piridínico. A razão para isto é que o anel fenílico possui um grau de liberdade de rotação relativamente grande, sem que seus grupos ligantes interajam substancialmente com os substituintes do anel piridínico. A Fig. 3.20 dá idéia dessa liberdade que representa um arco de cerca de $111,5^\circ$ ($\pm 1,4$). Embora disponha dessa liberdade de rotação, os resultados de cálculos mostrados anteriormente revelaram que em 95% das moléculas a variação do ângulo 8-7-4-3 vai de $47,8^\circ$ a $100,2^\circ$. Ou seja, considerando os resultados da seção 3.3, em 95% das moléculas das DHPs o ângulo torsional 8-7-4-3 varia de apenas $52,4^\circ$. O anel fenílico sempre se acomoda num ângulo de rotação tal que interfira o mínimo possível no esqueleto dos grupos carbometoxi.

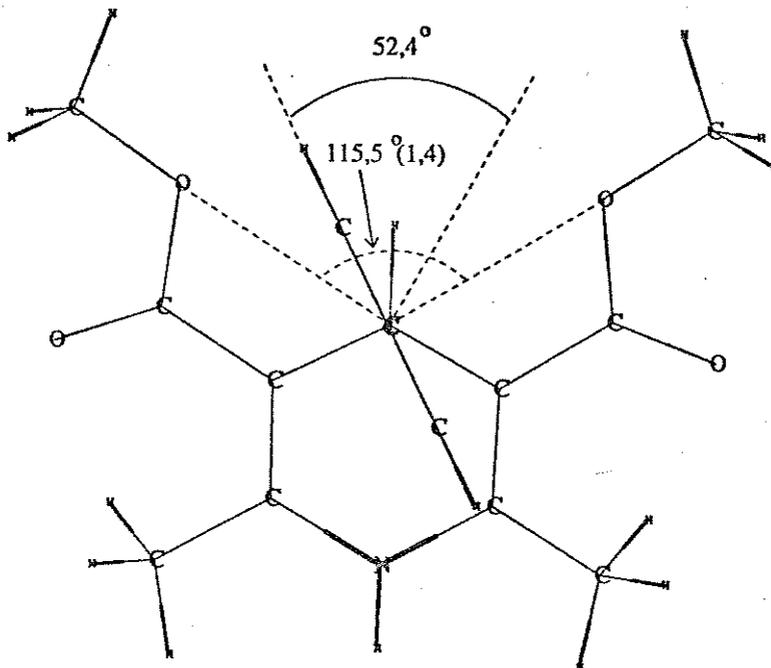


Figura 3.20 - Ângulo disponível para rotação do anel fenílico e o intervalo de ângulos efetivamente utilizado por 95% das moléculas da série.

A Fig. 3.21 mostra outras duas medidas de interesse em nosso trabalho. Considerando que diversos grupos substituintes encontram-se ligados em posições variadas do anel fenílico, podemos esperar que os valores médios de distâncias tomados nessa região apresentem

variâncias maiores. Pois é isto o que acontece. A altura média do grupo fenil substituído é de 6,09 ($\pm 0,49$), que foi tomada em relação ao átomo de hidrogênio ligado a C4. Esta medida ainda não apresenta grande variância porque apenas nove derivados são substituídos na posição *para*. Já a largura média desse anel é de 5,66 ($\pm 1,25$). Uma rápida olhada na gama de substituintes que se ligam às posições *orto* e *meta* explicará a variabilidade observada.

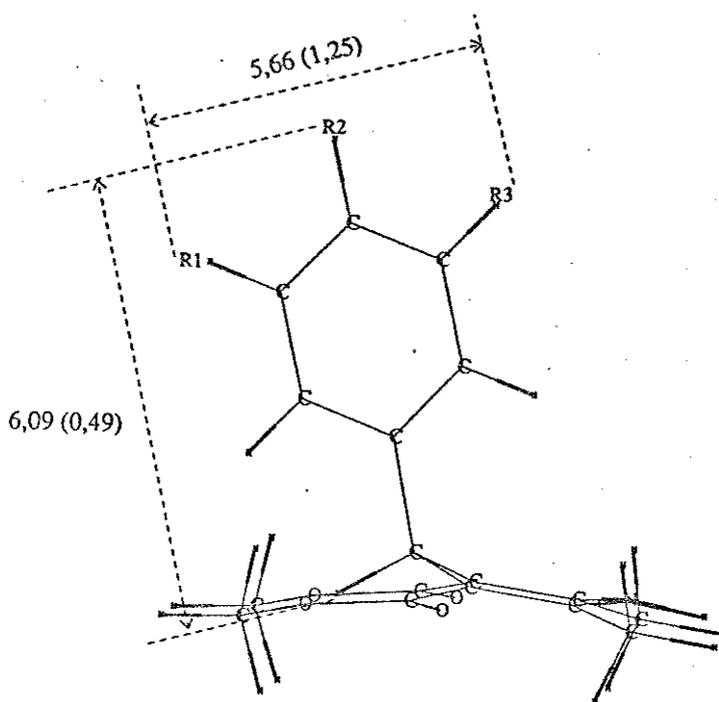


Figura 3.21 - Altura e largura médias do grupo fenil substituído. A altura foi tomada em relação ao átomo de hidrogênio ligado a C4.

As diversas medidas das dimensões médias das DHPs que acabamos de apresentar são úteis para dar-nos idéia das possíveis dimensões do receptor. Considerando a interação fármaco-receptor análoga à interação chave-fechadura, é possível conhecer diversas características da fechadura tendo a chave em mãos. Embora saibamos que nem toda a extensão da molécula do fármaco possa ter complementaridade em relação ao receptor, estudos feitos até o momento indicam com razoável certeza quais são as porções da molécula das DHPs que realmente se encaixam na estrutura do receptor. No momento em que determinado estudo revela que uma dada posição da molécula não pode ser substituída, sob pena de diminuição abrupta da resposta farmacológica, aí está séria candidata à *região de encaixe*. Trabalhos anteriores têm mostrado que N1 e C10 não devem ser substituídos, pois a

resposta farmacológica é bastante reduzida (Loev *et al.*, 1974; Janis & Triggle, 1983; Janis *et al.*, 1987 e Triggle, 1990). Portanto, devemos aproveitar este conhecimento para supor que a região do receptor que interage com o anel piridínico na direção N1-C4 e a que interage com o anel fenílico na direção C4-C10 devam possuir dimensões aproximadamente complementares à do fármaco. Assim, podemos propor a hipótese de que a região do receptor que interage com N1-C4 deve medir aproximadamente 4,8 Å (de acordo com a medida mostrada na Fig. 3.19-a) e que a região que interage com C4-C10 (na verdade a interação deve ocorrer entre H ligado a C4-C10) deve medir aproximadamente 6,1 Å (de acordo com a medida mostrada na Fig. 3.21). Podemos apreciar na Fig. 3.22 a representação esquemática do que dissemos acima.

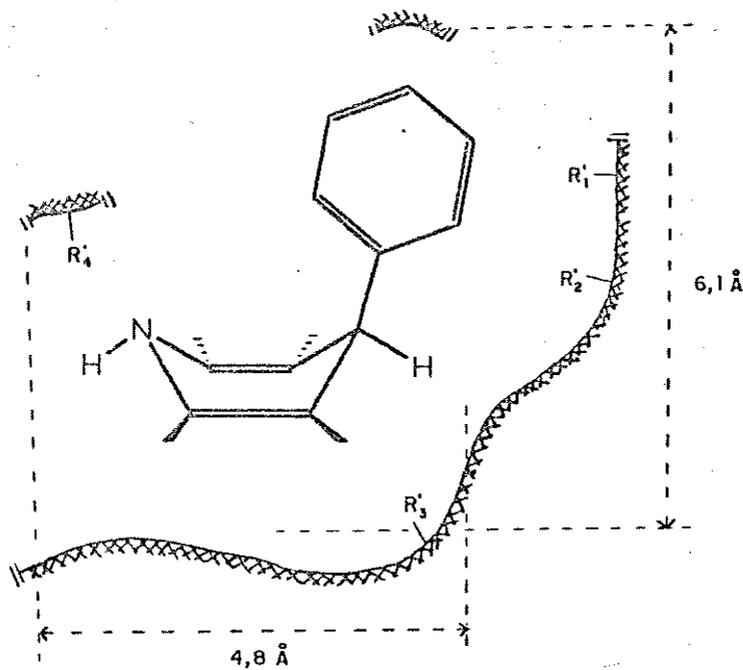


Figura 3.22 - Representação esquemática de duas possíveis dimensões do receptor das DHPs. Esta suposição é possível graças ao conhecimento do comportamento da atividade biológica frente a substituições em certas posições da molécula.

Capítulo 4 - Propriedades Físico-Químicas

No capítulo anterior, discutimos prolongadamente as propriedades geométricas das DHPs. Verificamos que, dos dois critérios citados inicialmente na seção 2.2.2, aquele que determina a geometria molecular através de regiões comuns de estabilidade conformacional foi mais adequado. Apresentamos também alguns dados experimentais que corroboraram nossas conclusões.

Agora que estamos de posse do conhecimento do padrão geométrico dos compostos da série, precisamos determinar diversas propriedades físico-químicas que lhes são inerentes. Embora o programa AM1 possa fornecer uma infinidade de informações e valores de propriedades diversas, faremos uso apenas de pequena parcela desse imenso potencial. O critério adotado para selecionar tais variáveis foi o da frequência com que algumas dessas propriedades têm sido utilizadas em estudos que relacionam a estrutura química à atividade biológica, publicados na literatura especializada. Fizemos um levantamento dos parâmetros teóricos mais usados, a partir de 1988, para estabelecer relações quantitativas entre estrutura química e atividade biológica, e os mais utilizados foram:

- a) Energia do HOMO (de Compadre *et al.*, 1988; Menziani *et al.*, 1989; Dearden *et al.*, 1989; Frecer & Miertus, 1988; Itokawa *et al.*, 1989; de Compadre *et al.*, 1990; Lewis *et al.*, 1990; Schlürmann, 1990; Estiu *et al.*, 1990; Ramos & Neto, 1990; Gombar & Eslein, 1990; Schusterman *et al.*, 1989; Clare, 1990; Wilson & Famini, 1991; Mitchell & Webb, 1991)
- b) Energia do LUMO (de Compadre *et al.*, 1988; Dearden *et al.*, 1989; Frecer & Miertus, 1988; Itokawa *et al.*, 1989; Taskinen *et al.*, 1989; Santos *et al.*, 1989; de Compadre *et al.*, 1990; Schlürmann, 1990; Estiu *et al.*, 1990; Ramos & Neto, 1990; Debnath *et al.*, 1991; Cocchi *et al.*, 1990; Clare, 1990; Wilson & Famini, 1991; Mitchell & Webb, 1991)
- c) Índices de reatividade derivados da teoria dos orbitais de fronteira. (Frecer & Miertus, 1988; Selwood *et al.*, 1990; Ford & Livingstone, 1990; Schlürmann, 1990; Wu *et al.*, 1990; Cocchi *et al.*, 1990; Schusterman *et al.*, 1989; Mekenyan *et al.*, 1991)
- d) Cargas atômicas líquidas (Taylor *et al.*, 1988; den Kelder *et al.*, 1988; de Compadre *et al.*, 1988; Leeson *et al.*, 1989; Carotti *et al.*, 1989; de Benedetti *et al.*, 1989; Frecer & Miertus, 1988; Orozco *et al.*, 1989; Burke & Hopfinger, 1990; Ford & Livingstone, 1990; Lewis *et al.*, 1990; Schlürmann, 1990; Estiu *et al.*, 1990; Ramos & Neto, 1990; Mahmoudian & Richards, 1990; Spanggord *et al.*, 1990; Gombar & Eslein, 1990; Moyer & Jurs, 1990; Cocchi *et al.*, 1990; Yuan *et al.*, 1989; Clare, 1990; Wilson & Famini, 1991; Mekenyan *et al.*, 1991)
- e) Momentos dipolares total e parciais (Abbott & Acheampong, 1988; den Kelder *et al.*, 1988; de Compadre *et al.*, 1988; Ishida *et al.*, 1988; Buchlev & Stepanov, 1989; Ford & Livingstone, 1990; Ramos & Neto, 1990; Moyer & Jurs, 1990; Wang

et al., 1990; Yuan *et al.*, 1989; Clare, 1990)

- f) Polarizabilidade molecular (Wame *et al.*, 1989; Lewis *et al.*, 1990)
- g) Volume molecular de van der Waals (Taylor *et al.*, 1988; Kataoka *et al.*, 1988; Nishimura *et al.*, 1988; Ohtaka *et al.*, 1988a; Aggarwal *et al.*, 1988; Koehler *et al.*, 1988; Takahashi *et al.*, 1988; Nishimura & Fujita, 1989; Ohtaka *et al.*, 1988b; Bushelev & Stepanov, 1989; Wame *et al.*, 1989; Kobayashi *et al.*, 1989; Ford & Livingstone, 1990; Golas *et al.*, 1990; Cocchi *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1990; Clare, 1990; Wilson & Famini, 1991)

Os itens *a*, *b*, *d*, *e* e *f* são fornecidos diretamente pelo programa AM1. O volume molecular de van der Waals será calculado através do programa SURF, construído por nós. Os índices de fronteira serão calculados por uma rotina computacional, também construída por nós, e que utiliza os coeficientes da função de onda fornecidos pelo AM1. Duas outras propriedades derivadas das acima citadas também serão utilizadas. São elas: eletronegatividade de Mulliken e dureza (ver as seções 4.1.1 e 4.1.2).

A partir do momento em que dispomos da geometria otimizada das 45 moléculas da série, o cálculo dessas propriedades é bastante rápido. A confiabilidade dos valores obtidos é uma outra história. A qualidade da maioria das propriedades acima está intimamente ligada à qualidade da função de onda produzida pelo AM1. Esta, por sua vez, é dependente do conjunto de orbitais atômicos iniciais (conjunto de bases) e das aproximações feitas para o cálculo das integrais que surgem no processo de autoconsistência (SCF). O AM1 utiliza o conjunto mínimo de bases para cada átomo, o que significa dizer que ao átomo de hidrogênio é atribuído um orbital *s* e aos demais átomos (C, N, O, F, Cl, Br e I) são atribuídos um orbital *s* e três orbitais *p*. A pobreza do conjunto de bases empregado é compensada pela utilização de certos parâmetros empíricos, incluídos na autoconsistência. As funções desses parâmetros são calibrar os resultados dos cálculos de tal forma que estes reproduzam os valores experimentais das propriedades das moléculas de onde foram extraídos e, naturalmente, apressar sua execução. O que torna o AM1 um bom método semiempírico é que ele é capaz de estimar razoavelmente bem as propriedades de moléculas que não foram diretamente utilizadas em sua parametrização. A utilização de parâmetros empíricos agiliza de tal forma o cálculo, que torna possível, em poucas horas, obter resultados que, de outra forma (*ab initio*) não seriam viáveis.

A concordância entre os valores calculados e experimentais das propriedades assim determinadas pode ser apreciada em alguns trabalhos (Dewar *et al.*, 1985; Stewart, 1989 e 1991; Dewar *et al.*, 1988 e 1991; Dewar & Jie, 1987, 1989a e 1989b; Dewar & Yuan, 1990; Dewar & Holder, 1990 e Dewar & Zebisch, 1988). A

concordância de modo geral é boa, sendo que algumas propriedades são melhor reproduzidas do que outras. Talvez o maior problema esteja no cálculo da energia dos orbitais virtuais. Por serem desocupados, os orbitais virtuais não são levados em consideração no cálculo Hartree-Fock e surgem, ao final deste, quase que como *sobras* da aplicação da matriz de Fock sobre a função de onda inicial (Szabo & Ostlund, 1982). Por esse motivo, quando utilizamos a energia do primeiro orbital desocupado como representação para a energia do LUMO, corremos o risco de estarmos usando apenas um número sem significado físico. Em nosso caso, o problema é um pouco atenuado devido ao fato de estarmos trabalhando com uma série de compostos de elevada similaridade. Não é necessariamente essencial que os valores da energia do LUMO sejam próximos aos observados experimentalmente. É suficiente que eles guardem entre si boa correlação. Isto ocorre porque iremos utilizar esses valores em regressão linear múltipla, onde o que importa são as correlações entre as variáveis e não seus valores absolutos.

Apresentaremos nas seções seguintes os detalhes da forma com que foram calculadas as propriedades físico-químicas citadas há pouco, bem como suas principais características. Também mencionaremos algumas dificuldades e limitações existentes nessas determinações. Finalmente serão mostradas as tabelas contendo os valores numéricos de cada propriedade, para cada um dos compostos da série.

4.1 - Energias do HOMO e LUMO

O cálculo das energias do HOMO (ϵ_{HOMO}) e LUMO (ϵ_{LUMO}) é feito de forma análoga à dos demais orbitais moleculares (Pople & Beveridge, 1970 e Szabo & Ostlund, 1982).

HOMO e LUMO, também denominados orbitais de fronteira (Bradley & Guerrans, 1973), possuem características extraordinárias, que os tornam pontos focais de qualquer análise de reatividade molecular. Um par eletrônico numa molécula neutra ocupando o orbital molecular de mais alta energia, está sujeito à atração mínima pela parte nuclear. Isto torna os elétrons do HOMO mais polarizáveis, mais facilmente ionizáveis e torna o orbital em si fisicamente mais saliente e mais sujeito ao ataque de reagentes eletrófilos. Por outro lado, a energia do LUMO pode dar indicação da facilidade com que a molécula pode aceitar elétrons, quando sujeita ao ataque de reagentes nucleófilos.

A partir do momento em que conhecemos os valores das energias do HOMO e LUMO de duas espécies químicas, previsões interessantes acerca da probabilidade da ocorrência de

algum tipo de interação entre elas podem ser feitas, resguardados os aspectos termodinâmicos. O grande problema que até hoje enfrentamos é a falta de acuracidade no cálculo dessas propriedades. Está claro que as energias do HOMO e LUMO podem perfeitamente ser estimadas através da determinação experimental do potencial de ionização (PI) e da afinidade eletrônica (AE). Acontece que na falta de tais medidas, o que acontece frequentemente, deveríamos ser capazes de avaliar teoricamente as energias de HOMO e LUMO com razoável exatidão. No caso da primeira, previsões teóricas têm sido feitas com sucesso, graças às características especiais envolvidas no processo (ver adiante). Já no caso da segunda, a falta de significado físico dos orbitais virtuais faz com que o valor calculado da energia do orbital molecular desocupado de mais baixa energia seja apenas distante aproximação do valor real da energia do LUMO. No cálculo *ab initio*, a forma final dos orbitais virtuais é muito variável, sendo função do tamanho do conjunto de bases utilizado. A única limitação matemática sobre os orbitais virtuais é a condição de ortogonalidade existente entre estes e os orbitais ocupados (Szabo & Ostlund, 1982).

As energias do HOMO e LUMO estão relacionadas ao potencial de ionização e afinidade eletrônica, respectivamente, através do teorema de Koopmans (Koopmans, 1933). O potencial de ionização pode ser calculado pela diferença entre as energias totais da molécula neutra (E_o^N) e do íon onde foi retirado um elétron (E^{N-1}), em que N é o número total de elétrons e o subscrito representa a neutralidade elétrica da espécie,

$$PI = E^{N-1} - E_o^N . \quad (4.1a)$$

De forma similar,

$$AE = E_o^N - E^{N+1} . \quad (4.1b)$$

Porém, cálculos teóricos em separado para as espécies neutra e seu cátion, ou ânion, raramente são feitos. O que se faz normalmente é aplicar o teorema de Koopmans que diz, resumidamente, que

$$PI = -\epsilon_{HOMO} \quad (4.2a)$$

e

$$AE = -\epsilon_{LUMO} , \quad (4.2b)$$

onde utilizaremos ϵ para representar a energia do orbital molecular.

O problema é que existem dois fatores que não são considerados na aplicação do teorema de Koopmans, quando utilizamos o cálculo *ab initio*. O primeiro é a relaxação eletrônica que ocorre quando um elétron é removido ou adicionado à molécula. Otimizar os orbitais oriundos de determinantes de Slater simples com $N \pm 1$ elétrons através de cálculos Hartree-Fock feitos em separado para estes estados, tende a baixar os valores de E^{N+1} e E^{N-1} . Portanto, ignorar a relaxação eletrônica significa obter potencial de ionização mais positivo e afinidade eletrônica mais negativa (Lowe, 1978).

O segundo problema está relacionado com a energia de correlação, que é desprezada ao nível Hartree-Fock. Sabemos que o movimento de um elétron está correlacionado ao movimento dos demais elétrons. A correlação eletrônica tende a afastar os elétrons uns dos outros, estabilizando o sistema. A energia de correlação é proporcional ao número de elétrons do sistema e, portanto, tende a cancelar o erro cometido em função da relaxação eletrônica no caso do potencial de ionização, mas é aditivo a esse erro no caso da afinidade eletrônica. Como resultado, o potencial de ionização produzido pelo teorema de Koopmans é uma razoável aproximação para o observado experimentalmente. As afinidades eletrônicas fornecidas pelo teorema de Koopmans são, infelizmente, freqüentemente ruins (Lowe, 1978).

A utilização dos métodos semiempíricos no cálculo das energias do HOMO e LUMO é pouco menos problemático do que no caso do método *ab initio*. Os primeiros, como o próprio nome sugere, utilizam em seu conteúdo parâmetros de natureza empírica que são incorporados para agilizar o processamento de diversas etapas do cálculo e para reproduzir os resultados experimentais. Ora, quando fazemos uso desses parâmetros, trazemos embutida, além de outras coisas, parte dos efeitos de correlação e relaxação eletrônicas. Juntando-se a isto o fato de estarmos trabalhando com uma série de compostos bastante similares, o que torna menos danosa a estimativa das energias do HOMO e LUMO, cremos que podemos ao menos esperar detectar a tendência correta destas duas propriedades ao longo da série.

Talvez o método mais confiável na previsão teórica das energias do HOMO e LUMO seja o método HAM/3 (Asbrink *et al.*, 1977; Bruijn, 1977 e Lindholm & Asbrink, 1985), que é especialmente parametrizado para reproduzir o potencial de ionização e a afinidade eletrônica. Estudos diversos têm comprovado essa grande superioridade em relação aos demais métodos semiempíricos e até mesmo *ab initio* (Lindholm & Asbrink, 1985). Infelizmente HAM/3 opera somente com os elementos H, C, N, O e F, não sendo possível, portanto, que o utilizemos em nosso trabalho. Porém, há uma maneira de verificarmos se os valores das energias do HOMO e

LUMO fornecidos pelo AM1 estão em bom acordo com os valores fornecidos pelo HAM/3, pelo menos para as moléculas da série que forem constituídas por H, C, N, O e F. Basta fazermos a regressão linear de $\epsilon_{HOMO_{AM1}} \times \epsilon_{HOMO_{HAM3}}$ e outra de $\epsilon_{LUMO_{AM1}} \times \epsilon_{LUMO_{HAM3}}$ e analisarmos a qualidade estatística de cada regressão. As Eqs. (4.3) e (4.4) mostram regressões lineares de $\epsilon_{HOMO_{AM1}} \times \epsilon_{HOMO_{HAM3}}$ e $\epsilon_{LUMO_{AM1}} \times \epsilon_{LUMO_{HAM3}}$, respectivamente. Estas equações confirmam o que dissemos há pouco. Realmente ϵ_{HOMO} é muito melhor estimado pelo AM1 do que ϵ_{LUMO} . Note que, na Eq. (4.3), a declividade vale aproximadamente um e o intercepto é igual a zero (seu intervalo de confiança de 95%, mostrado entre parênteses, é maior do que o próprio intercepto). Isto mostra que $\epsilon_{HOMO_{AM1}}$ e $\epsilon_{HOMO_{HAM3}}$ são aproximadamente iguais.

$$\epsilon_{HOMO_{AM1}} = 1,06 (\pm 0,12) \epsilon_{HOMO_{HAM3}} - 0,31 (\pm 0,96) \quad (4.3)$$

n = 30 R = 0,96 s = 0,08 F = 321,88 P < 0,0001

A Eq. (4.4) mostra que $\epsilon_{LUMO_{AM1}}$ e $\epsilon_{LUMO_{HAM3}}$ não estão na mesma escala (declividade igual a 0,75) e que o ajuste da curva não é bom (R = 0,77).

$$\epsilon_{LUMO_{AM1}} = 0,75 (\pm 0,24) \epsilon_{LUMO_{HAM3}} - 0,69 (\pm 0,39) \quad (4.4)$$

n = 30 R = 0,77 s = 0,12 F = 40,61 P < 0,0001

Nas Eqs. (4.3) e (4.4) n é o número de compostos analisados, R é o coeficiente de correlação, s é o desvio padrão, F corresponde ao teste de variância, P assinala o nível de significância da equação e os números entre parênteses correspondem ao intervalo de confiança de 95% de cada coeficiente. Os valores das energias de HOMO e LUMO podem ser vistas na Tab. 4.1.

Existem duas propriedades descritas na literatura que são definidas em função das energias do HOMO e LUMO: eletronegatividade de Mulliken e dureza. Raramente estes dois parâmetros são utilizados em estudos de relações estrutura-atividade (Shillmann, 1990 e Estiu *et al.*, 1990). Como consequência, não conhecemos o valor útil de cada uma dessas propriedades em tais estudos. Assim, vamos incorporá-las ao conjunto das propriedades físico-químicas que estamos utilizando para investigar suas potencialidades.

4.1.1 - Eletronegatividade de Mulliken

A escala de eletronegatividade de Mulliken (Mulliken, 1934) é um excelente guia na previsão da intensidade de interação entre dois átomos e é baseada nos seguintes argumentos. Sejam dois átomos A e B , monovalentes, capazes de formar o composto AB . A função de onda total da molécula AB , Ψ_{AB} , pode ser representada pela combinação linear entre a função de onda $\Psi_{(A-B)}$, que representa o caráter covalente da ligação, e duas outras funções de onda, $\Psi_{(A^+B^-)}$ e $\Psi_{(A^-B^+)}$, que representam os estados iônicos A^+B^- e A^-B^+ , respectivamente.

$$\Psi_{AB} = c \Psi_{(A-B)} + a \Psi_{(A^+B^-)} + b \Psi_{(A^-B^+)} , \quad (4.5)$$

onde c , a e b são coeficientes cujos valores relativos revelam o caráter final da ligação entre A e B . Se $a = b$, teremos uma ligação que, embora possuindo termos iônicos, será estritamente covalente não-polar.

Mulliken tentou estabelecer a condição, outra que não $A \equiv B$, em que a energia das formas A^+B^- e A^-B^+ fossem iguais, ou seja $a = b$. Seguindo argumentos próprios (Mulliken, 1934), ele chegou à conclusão de que $E_{A^+B^-}$ seria igual a $E_{A^-B^+}$ se

$$PI_A - AE_B = PI_B - AE_A , \quad (4.6a)$$

ou seja, se a energia requerida para transferir um elétron de A para B fosse igual à energia necessária para transferir um elétron de B para A . Se isto é verdade, então

$$PI_A + AE_A = PI_B + AE_B . \quad (4.6b)$$

Isto sugere que dois átomos terão eletronegatividades iguais se a soma, ou a média, do potencial de ionização mais a afinidade eletrônica for igual para cada um deles. Mulliken achou mais conveniente expressar a eletronegatividade na forma de média. Logo, a eletronegatividade da espécie química A é

$$\chi_A = 1/2 (PI_A + AE_A) , \quad (4.7)$$

onde χ_A é o símbolo usualmente adotado para a eletronegatividade de Mulliken da espécie A (Paar & Yang, 1989).

Como estamos trabalhando com moléculas, ao invés de átomos, achamos por bem estender a definição de eletronegatividade de Mulliken ao nível molecular. Neste sentido, se duas moléculas A e B forem tais que $\chi_A > \chi_B$, a interação intermolecular entre A e B resultará na polarização atrativa dos elétrons mais móveis de B em direção a A . A

denominação do tipo de interação depende, naturalmente, do valor absoluto da diferença de eletronegatividade entre *A* e *B*, podendo variar desde interações eletrostáticas fracas até transferência efetiva de carga. Interpretações diferenciadas do significado da eletronegatividade de Mulliken podem ser apreciadas em outros trabalhos (Iczkowski & Margrave, 1961 e Pritchard & Sumner, 1956).

Optamos por apresentar os valores da eletronegatividade de Mulliken em termos de eletronegatividade do substituinte χ_s , segundo a Eq. (4.8).

$$\chi_s = \chi_{R-X} - \chi_{R-H} \quad (4.8)$$

Nesta equação, χ_{R-X} é a eletronegatividade do composto substituído pelo grupo químico *X* e χ_{R-H} é a eletronegatividade do composto não substituído. Escolhemos esse tipo de apresentação dos valores da eletronegatividade pelo fato de χ_s ter características de constante de substituinte eletrônica (Gaudio *et al.*, 1992). Dessa forma, o sinal adquirido por χ_s para os diversos substituintes da série passam a ser significativos do ponto de vista da interpretação dos resultados. Sob a óptica estatística, é indiferente o uso de χ ou de χ_s pois eles estão perfeitamente correlacionados ($R = 1,00$, onde *R* é o coeficiente de correlação). Na Tab. 4.2 são mostrados os valores da eletronegatividade de Mulliken.

4.1.2 - Dureza Absoluta

O conceito de dureza química surgiu inicialmente nos trabalhos de Pearson (1963 e 1966), sobre as propriedades das interações entre um ácido e uma base de Lewis. Mais tarde, Paar & Pearson (1983) estabeleceram as relações entre dureza absoluta, eletronegatividade e potencial químico de elétrons. A definição e propriedades da dureza absoluta serão vistas a seguir.

Se construirmos um gráfico onde a energia eletrônica total E_{el} de um átomo ou molécula *A* é função do número total de elétrons *N*, obteremos resultado semelhante ao da Fig. 4.1. O primeiro potencial de ionização será muito maior do que a afinidade eletrônica e muito menor do que o segundo potencial de ionização. A primeira afinidade eletrônica da espécie neutra terá valor pequeno e positivo, ou será igual a zero. O valor zero para a primeira afinidade eletrônica significa que o elétron não será adicionado à espécie, porque a estabilidade do conjunto é máxima quando o elétron encontra-se no infinito. A segunda afinidade eletrônica será zero, exceto em raríssimos casos. Por conseguinte, a curva da Fig. 4.1 tende para um valor constante de energia, independentemente do acréscimo subsequente de elétrons. Para o

terceiro e quarto potenciais de ionização, a curva eleva-se rapidamente.

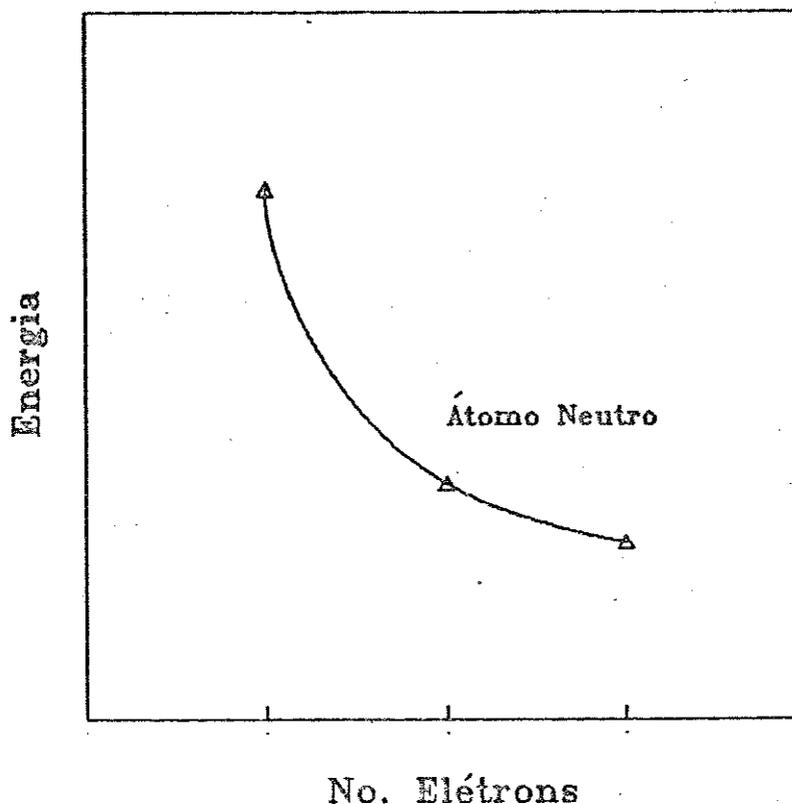


Figura 4.1 - Comportamento da energia eletrônica em função do número de elétrons.

Experimentalmente nós conhecemos apenas os pontos da Fig. 4.1 que possuem valores inteiros de N . Porém, é conveniente considerar que os pontos estejam conectados por curva suave. É coisa natural imaginar que, numa molécula, os átomos individuais tenham populações eletrônicas que não necessariamente sejam números inteiros (Mulliken, 1955). Assumindo, portanto, que a curva da Fig. 4.1 é diferenciável em todos os pontos, podemos definir *dureza absoluta* (Paar & Pearson, 1983) da espécie química A como

$$\eta_A = \frac{1}{2} \left[\frac{\partial^2 E_{el}}{\partial N^2} \right]_Z, \quad (4.9)$$

onde Z , a carga nuclear, é mantida constante. A correspondente definição operacional é obtida considerando a situação onde os pontos da Fig. 4.1 são finitos (ignorando o conceito de população eletrônica fracionária), cada qual correspondendo a um elétron.

$$\eta_A = 1/2 (PI_A - AE_A) \quad (4.10)$$

É importante notar que a primeira derivada de E_{el} em relação a N , mantendo Z constante,

corresponde ao potencial químico ξ dos elétrons.

$$\xi_A = \left[\frac{\partial E_{el}}{\partial N} \right]_Z \quad (4.11)$$

Outra relação importante é

$$\xi_A = -\chi_A \quad (4.12)$$

ou seja

$$\chi_A = - \left[\frac{\partial E_{el}}{\partial N} \right]_Z \quad (4.13)$$

A partir das Eqs. (4.9), (4.11) e (4.13), podemos notar que a dureza está relacionada com a eletronegatividade e também com o potencial químico através da identidade

$$2 \eta_A = \left[\frac{\partial \xi_A}{\partial N} \right]_Z = - \left[\frac{\partial \chi_A}{\partial N} \right]_Z \quad (4.14)$$

A Eq. (4.14) mostra que o significado da dureza química é a resistência à variação do potencial químico com o número de elétrons. Observando a Fig. 4.1 é fácil notar que o valor de ξ_A , a derivada primeira, é sempre negativo ou nulo e aumenta à medida que N aumenta. Já o valor de η_A , a derivada segunda, é alto para átomos muito ionizados e vai diminuindo com o aumento de N . O valor mínimo de η_A é zero, uma vez que sempre $PI_A \geq AE_A$. Os valores da dureza molecular para os compostos da série são mostrados na Tab. 4.2.

4.2 - Índices baseados na Teoria dos Orbitais de Fronteira

A teoria dos orbitais de fronteira surgiu há quarenta anos, nos artigos de Fukui *et al.* (1952, 1954 e 1957). Desde então, ele (Fukui, 1970 e 1971) e outros (Klopman, 1968; Salem, 1969; Pearson, 1971; Dewar, 1971; Woodward & Hoffmann, 1969 e 1970) têm desenvolvido este assunto em direções diversas. Basicamente, todas as espécies químicas (átomos, íons e moléculas) são consideradas como possuidoras de orbitais de fronteira, que são simplesmente o HOMO e o LUMO. As características cinéticas de reagentes e reações podem ser avaliadas considerando apenas as interações entre os orbitais de fronteira. Estas são provavelmente as maiores interações que ocorrem à medida em que os reagentes se aproximam, uma vez que, a distâncias pouco maiores do que as típicas distâncias

interatômicas, o maior recobrimento de orbitais ocorre entre os orbitais de fronteira.

Seguindo o raciocínio de Bradley & Guerrans (1973), as interações de fronteira entre os reagentes podem ser do tipo atrativas ou repulsivas: com diferentes sítios de contato e diferentes orientações relativas, diferentes interações resultantes irão ocorrer. O curso, mecanismo e estereoquímica de uma reação são então considerados como sob controle da tendência em maximizar as interações atrativas e minimizar as interações repulsivas. É importante reconhecer a diferença característica entre interações atrativas e repulsivas, com respeito à magnitude da correspondente variação na energia eletrônica. Para uma dada perturbação mútua (HOMO_A interagindo com LUMO_B e HOMO_A interagindo com HOMO_B , de dois reagentes A e B), a variação da energia eletrônica é maior nas interações atrativas do que nas repulsivas. Isto surge porque a interação repulsiva é resultante da estabilização de um par eletrônico e instabilização do outro (HOMO_A interagindo com HOMO_B poderia levar à formação de dois novos orbitais, um ligante e outro antiligante, com um par de elétrons em cada um deles). Ou seja, a interação repulsiva é o resultado de duas subinterações (talvez possamos chamá-las assim), uma atrativa (orbital ligante) e outra repulsiva (orbital antiligante). Por outro lado, a interação atrativa é consequência somente da estabilização de um par eletrônico (HOMO_A interagindo com LUMO_B levaria à formação de apenas um orbital ligante), ou seja apenas uma subinteração atrativa.

Continuando o raciocínio (Bradley & Guerrans, 1973), a natureza e magnitude das interações entre os orbitais de fronteira são postuladas como sendo indicação da energia de ativação da etapa de reação onde eles são relevantes. Se a interação repulsiva é dominante, a implicação é que qualquer alteração líquida que se esperaria advir da interação entre duas espécies não se concretiza, mesmo que termodinamicamente permitida, por causa da elevada energia de ativação. Da mesma forma, a interação atrativa entre orbitais de fronteira não é garantia de reação. Se as interações de fronteira levam, em princípio, à formação de produtos que são termodinamicamente desfavoráveis, esses produtos não serão formados, não importa quão favoráveis as interações de fronteira aparentam ser.

Fato digno de nota é que o uso de índices de fronteira, cargas e outros índices estáticos obtidos através de cálculos de sistemas moleculares não perturbados como guia para sua reatividade é muito perigoso. Reatividade é fenômeno dependente do estado de transição e não das moléculas iniciais isoladas. No caso da interação fármaco-receptor, a utilização desses índices é menos danosa. Se a ligação da droga ao receptor for baseada em forças eletrostáticas

e de dispersão, a energia livre de ligação pode ser pequena. Isto faz com que as características físico-químicas do fármaco e do receptor não sejam muito diferentes em relação aos estados ligado e não-ligado. Particularmente para fins de comparação os índices estáticos podem ser úteis, mas o perigo inerente à sua utilização deve sempre ser lembrado (Richards, 1983).

Talvez seja pertinente apresentar os postulados fundamentais da teoria dos orbitais de fronteira propostos por Fukui *et al.* (1954). São eles:

- I *No caso da reação com reagente eletrofílico, a posição mais susceptível ao ataque é aquela que apresenta maior densidade dos dois elétrons ocupando o orbital molecular de maior energia no estado fundamental.*
- II *No caso da reação com reagente nucleofílico, a posição mais susceptível ao ataque é aquela que apresentaria maior densidade dos dois elétrons que se supõe estejam ocupando o orbital molecular desocupado de menor energia no estado fundamental.*
- III *No caso da reação com reagente na forma de um radical, a posição mais susceptível ao ataque é aquela que apresentaria maior densidade dos dois elétrons, um ocupando o orbital de maior energia e o outro ocupando o orbital molecular desocupado de menor energia no estado fundamental.*

O fato é que a teoria dos orbitais de fronteira foi inicialmente formulada visando prever as possíveis posições onde ocorreriam os ataques eletrófilos, nucleófilos e radicalares, para reações ordinárias ($A + B \rightarrow C + D$). Porém, ela é facilmente aplicável a sistemas onde a transformação química não chega a se completar, como no caso da interação fármaco-receptor ($A + B \rightarrow A \cdots B$). Na esmagadora maioria dos casos, a interação fármaco-receptor ocorre sem que haja a formação de ligações covalentes. Quase sempre ocorrem interações intermoleculares de tipos variados (Martin, 1978) (interações hidrofóbicas, dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, etc.), isoladamente ou, mais comum, combinadas. Por diversas vezes a utilização de índices de fronteira já se mostrou útil na previsão das posições-chave, em moléculas de fármacos, onde se dão as principais interações com o receptor.

Os índices de fronteira que iremos determinar são os seguintes:

a) Densidade do elétron de fronteira [$F_k^{(e)}$]

$$F_k^{(e)} = 2 \sum_k (c_k^{HOMO})^2 \quad (4.18)$$

b) Densidade do orbital de fronteira [$F_k^{(o)}$]

$$F_k^{(o)} = 2 \sum_k (c_k^{LUMO})^2 \quad (4.19)$$

c) Densidade do radical de fronteira [$F_k^{(r)}$]

$$F_k^{(r)} = 2 \sum_k (c_k^{HOMO})^2 + 2 \sum_k (c_k^{LUMO})^2 \quad (4.20)$$

Nas equações acima, c_k^{HOMO} e c_k^{LUMO} são os coeficientes de expansão da combinação linear de orbitais atômicos, obtido no processo de autoconsistência do método Hartree-Fock, do HOMO e LUMO, respectivamente, do k-ésimo átomo. As Tab. 4.4-4.6 mostram os valores dos índices de fronteira para as DHPs.

4.3 - Cargas Atômicas Líquidas

No momento em que a molécula de um fármaco aproxima-se de seu receptor, este *percebe* a presença daquela através da interação entre as densidades eletrônicas de ambos. A distribuição das cargas eletrônicas pode ter grande influência na orientação espacial da interação fármaco-receptor. A presença de grupos químicos fortemente carregados ou ionizados como carbonila, hidroxila, amino, nitro, etc. na molécula do fármaco, pode determinar em grande parte a orientação de encaixe no receptor. Isto ocorre porque esses grupos naturalmente irão associar-se a outros grupos funcionais, com cargas complementares às suas, presentes na estrutura do receptor. Portanto, a distribuição de cargas é de fundamental importância em qualquer aplicação da mecânica quântica à farmacologia, especialmente porque os métodos teóricos disponíveis são capazes de fornecer detalhes da distribuição de cargas que não seriam possíveis de se obter experimentalmente.

O método mais difundido para o cálculo da distribuição de cargas é a análise populacional de Mulliken (Mulliken, 1955). Também é possível utilizar o potencial eletrostático molecular (Scrocco & Tomasi, 1973) na determinação das cargas atômicas. A utilização do potencial eletrostático molecular fornecido pelo MNDO (Dewar & Thiel, 1977) e AM1 no cálculo das cargas atômicas tem sido objeto de estudos interessantes e promissores (Ferenkzy *et al.*, 1990; Besler *et al.*, 1990 e Orozco & Luque, 1990). Em nosso caso, vamos usar as cargas atômicas líquidas fornecidas pela

análise populacional, já que são diretamente calculadas pelo AM1. Vamos fornecer a seguir os fundamentos da análise populacional de Mulliken (1955).

Seja o orbital molecular normalizado ψ , de uma molécula diatômica, representado pela combinação linear dos orbitais atômicos normalizados ϕ_r e ϕ_s de dois átomos k e l , respectivamente:

$$\psi = c_r \phi_r + c_s \phi_s , \quad (4.21)$$

onde ϕ_r e ϕ_s são orbitais atômicos e c_r e c_s são os coeficientes de expansão da função de onda ψ . Considerando que a probabilidade P de encontrarmos N elétrons (normalmente $N=2$) dentro da região do espaço de volume $d\tau$ é igual a

$$P = \psi^* \psi d\tau , \quad (4.22)$$

podemos dividir a população atômica de ψ em três subpopulações, representadas pelos três termos da Eq. (4.23).

$$N\psi^2 = Nc_r^2\phi_r^2 + 2Nc_r c_s \phi_r \phi_s + Nc_s^2\phi_s^2 . \quad (4.23)$$

Como ψ , ϕ_r e ϕ_s são normalizados, podemos integrar a Eq. (4.23) em todo o espaço $d\tau$ para fornecer

$$N = Nc_r^2 + 2Nc_r c_s S_{rs} + Nc_s^2 , \quad (4.25)$$

onde

$$S_{rs} = \int \phi_r \phi_s d\tau . \quad (4.24)$$

Cada uma das subpopulações Nc_r^2 e Nc_s^2 é denominada *população atômica líquida* dos átomos k e l , e $2Nc_r c_s S_{rs}$ é denominada *população de recobrimento*. No caso mais geral, ou seja, para moléculas poliatômicas, as Eqs. (4.21) e (4.23) são substituídas, respectivamente, por

$$\psi_i = \sum_{rk} c_{rk} \phi_{rk} \quad (4.26)$$

e

$$N_{(i)} = N_{(i)} \sum_{rk} c_{rk}^2 + 2N_{(i)} \sum_{l>k} c_{rk} c_{rl} S_{rk,rl} , \quad (4.27)$$

onde o índice i refere-se ao i -ésimo orbital molecular. Só para lembrar, c_{rk} corresponde ao coeficiente de expansão do r -ésimo orbital atômico do i -ésimo orbital molecular do k -ésimo

átomo. Obrigatoriamente $N_{(i)}$ deverá ser um número inteiro.

Portanto, podemos definir três tipos de cargas para o k-ésimo átomo:

a) Carga eletrônica líquida

$$q_k^l = \sum_i \sum_r N_{(i)} c_{ir}^k{}^2, \quad (4.28)$$

b) Carga eletrônica total

$$q_k^t = \sum_i \sum_r N_{(i)} c_{ir}^k{}^2 + \sum_{i>k} \sum_l N_{(i)} c_{ir}^k c_{il} S_{r_k'l}, \quad (4.29)$$

onde o segundo termo da Eq. (4.29) corresponde à metade da população de recobrimento dos átomos k e l , independentemente das eletronegatividades de cada um deles.

c) Carga atômica total ou carga líquida

$$Q_k = Z_k - q_k, \quad (4.30)$$

onde Z_k é a carga nuclear do k-ésimo átomo e q_k pode ser definido por uma das Eqs. (4.28) e (4.29), dependendo das finalidades do cálculo. As cargas líquidas dos átomos de carbono do anel benzênico das DHPs são mostradas na Tab. 4.3.

4.4 - Momentos Dipolares Total e Parciais

O momento dipolar total de uma molécula é consequência direta da distribuição geral de suas cargas elétricas internas. Esta distribuição pode ser alterada na medida em que a molécula (p.ex. fármaco) esteja interagindo com algum campo elétrico externo, como por exemplo o campo produzido por outra molécula (p.ex. receptor). A constante dielétrica do meio também é capaz de produzir alterações no momento dipolar da molécula nele dissolvida.

Embora tencionamos determinar o momento dipolar da molécula isolada no vácuo, certamente seremos capazes de identificar a tendência geral da polaridade do grupo. O momento dipolar, em combinação com a polarizabilidade molecular, poderá ser capaz de revelar interações de natureza elétrica tais como interações dipolo-dipolo e de transferência de carga, caso elas existam. O método de cálculo dos momentos dipolares total e parcial será descrito a seguir.

Uma molécula possui momento dipolar igual a zero quando o baricentro da carga nuclear for coincidente com o baricentro da carga eletrônica (McGlynn *et al.*, 1972 e Pople & Beveridge, 1970). Quando os dois baricentros não forem coincidentes, a molécula possuirá momento de dipolo permanente. Em termos exatos, o baricentro da carga nuclear é

$$\vec{D}_{nucl} = \frac{\sum_k \vec{R}_k Z_k}{\sum_k Z_k} , \quad (4.31)$$

onde \vec{R}_k e Z_k são o vetor posição e a carga do núcleo k , respectivamente. O baricentro da carga da nuvem eletrônica da molécula, no seu estado eletrônico fundamental, é

$$\vec{D}_{eletr} = \frac{1}{eN} \int \Psi_F^* \sum_{i=1}^N e \vec{r}_i \Psi_F d\tau , \quad (4.32)$$

onde N é o número de elétrons e \vec{r}_i é o vetor posição do i -ésimo elétron. Se a molécula é neutra, então

$$\sum_k Z_k = -eN . \quad (4.33)$$

Considerando que o vetor momento dipolar, por convenção, aponta para o polo positivo, então teremos

$$\vec{\mu} = eN (\vec{D}_{nucl} - \vec{D}_{eletr}) . \quad (4.34)$$

A fase limitante do cálculo do momento dipolar é, sem dúvida, a avaliação da integral da Eq. (4.32). Mesmo para moléculas pequenas o cálculo é demorado. Portanto, é comum usarmos aproximações para acelerar o processo de cálculo.

Podemos dizer que existem três contribuições principais para o momento de dipolo molecular: momento de carga pontual, momento de assimetria e momento de hibridização (McGlynn *et al.*, 1972). O primeiro é devido à distribuição das cargas pontuais, ou seja, das cargas atômicas totais centradas nos respectivos núcleos. O momento de assimetria é originado a partir da distribuição assimétrica da nuvem eletrônica ao longo de cada ligação covalente, quando os átomos ligados possuírem eletronegatividades diferentes. O momento de hibridização é um fenômeno que ocorre ao nível atômico. Por exemplo, no átomo de oxigênio os orbitais s e p possuem o baricentro de carga eletrônica coincidente com o núcleo atômico, devido à simetria de ambos orbitais. Se ocorrer hibridização entre esses dois orbitais, originando orbitais híbridos sp^n , o baricentro da carga eletrônica de cada orbital híbrido não

mais estará sobre o núcleo. Dependendo da distribuição espacial dos orbitais híbridos e de quantos deles participem de ligações químicas, isso irá ocasionar um momento de dipolo no interior do átomo, que contribui, às vezes de forma significativa, para o momento dipolar total.

No MOPAC 6.0, o momento dipolar total é considerado como sendo a soma vetorial entre o momento de carga pontual e o momento de hibridização (Pople & Beveridge, 1970). O momento de assimetria é ignorado.

$$\vec{\mu} = \vec{\mu}_{carg} + \vec{\mu}_{hibr} \quad (4.35)$$

O momento de carga pontual é dado por

$$\vec{\mu}_{carg} = - \sum_k \vec{R}_k Q_k , \quad (4.36)$$

onde Q_k é a carga total do k-ésimo átomo, dada pela Eq. (4.30), sendo que nesta o termo q_k é a carga eletrônica total, definida pela Eq. (4.28).

Para efetuarmos o cálculo do momento de hibridização, devemos antes lembrar-nos de que o cálculo de qualquer contribuição ao momento dipolar total é sempre feito através do produto entre distância e carga. Desta forma, o momento de hibridização será o produto da distância entre o baricentro da carga negativa do orbital híbrido e o núcleo e a carga do orbital híbrido (normalmente $2e$). Por exemplo, considere o orbital híbrido sp , sobre o átomo A , que pode ser representado por

$$\psi = c_1(2s) + c_2(2p_z) , \quad (4.37)$$

sendo que

$$c_1^2 + c_2^2 = 1 , \quad (4.38)$$

onde o orbital ψ está disposto sobre o eixo z . A localização do baricentro da carga eletrônica de ψ localiza-se em $\int \psi^* z \psi d\tau$ e a carga nesse orbital é igual a $2e$. Logo, o momento de hibridização será

$$\mu_{hibr_A} = 2e (z_A - \int \psi^* z \psi d\tau) , \quad (4.39)$$

onde o termo entre parênteses é a distância entre o núcleo de A e o baricentro da carga eletrônica do orbital híbrido ψ .

No caso geral da molécula contendo k átomos, cada um deles possuindo h orbitais híbridos, que por sua vez possuem N_h elétrons cada um, o momento de hibridização será dado por

$$\vec{\mu}_{hibr} = \sum_k \sum_h eN_h (\vec{R}_k - \int \psi_{kh} \vec{r} \psi_{kh} d\tau) , \quad (4.40)$$

onde \vec{R}_k é o vetor posição de cada núcleo e ψ_{kh} é o h -ésimo orbital híbrido do k -ésimo átomo. Os momentos dipolares total e parciais dos compostos da série podem ser vistos na Tab. 4.1.

4.5 - Polarizabilidade Molecular

A polarizabilidade molecular mede a susceptibilidade à modificação da distribuição das cargas internas, quando a molécula está sujeita a um campo elétrico externo. Portanto, a polarizabilidade mede também a capacidade da molécula variar seu momento dipolar quando estiver sujeita ao campo elétrico de outra molécula, como no caso do fármaco que se aproxima do receptor. Embora esse parâmetro não seja utilizado com muita frequência, vamos usá-lo em nosso estudo.

O MOPAC 6.0 é capaz de fornecer tanto a polarizabilidade molecular quanto as hiperpolarizabilidades de primeira e segunda ordens. Dois métodos são utilizados para realizar o mesmo cálculo: expansão em série do momento dipolar e expansão em série da energia total do sistema molecular, ambos sujeitos a um campo elétrico externo (Kuntz *et al.*, 1990).

O momento dipolar μ da molécula que se encontra interagindo com o campo elétrico uniforme F pode ser representado por

$$\mu_i = \mu_i^o + \alpha_{ij}F_j + (1/2) \beta_{ijk}F_jF_k + (1/6) \gamma_{ijkl}F_jF_kF_l + \dots , \quad (4.41)$$

onde μ^o é o momento dipolar permanente e α_{ij} , β_{ijk} e γ_{ijkl} são elementos dos tensores da polarizabilidade linear e das hiperpolarizabilidades de primeira e segunda ordens da molécula, respectivamente. Por outro lado, a energia total desse sistema também pode ser expandido em série

$$E_{(F)} = E_{(0)} - \mu_i F_i - (1/2!) \alpha_{ij} F_i F_j - (1/3!) \beta_{ijk} F_i F_j F_k - (1/4!) \gamma_{ijkl} F_i F_j F_k F_l - \dots , \quad (4.42)$$

onde $E_{(0)}$ é a energia do sistema quando o campo elétrico está ausente e F_i são os componentes do campo aplicado.

Se a molécula está sujeita a um campo elétrico uniforme e encontra-se alinhada a um dos eixos do sistema, como por exemplo $(F_x, 0, 0)$, os valores das polarizabilidades ao longo deste eixo (μ_x , α_{xx} , β_{xxx} e γ_{xxxx}) podem ser obtidos. Nesse caso, as Eq. (4.41) e (4.42) tornam-se, respectivamente,

$$\mu_i = \mu_i^0 + \alpha_{ii}F_i + (1/2)\beta_{iii}F_i^2 + (1/6)\gamma_{iiii}F_i^3 + \dots \quad (4.43)$$

e

$$E_{(F)} = E_{(0)} - \mu_i F_i - (1/2!)\alpha_{ii}F_i^2 - (1/6)\beta_{iii}F_i^3 - (1/24)\gamma_{iiii}F_i^4 - \dots \quad (4.44)$$

Truncando a Eq. (4.43) após F_i^3 e estimando μ_i para quatro intensidades de campo elétrico diferentes ($\pm F_i$, $\pm 2F_i$), são produzidas quatro equações a quatro incógnitas. Resolvendo o sistema para α_{ii} , teremos

$$\alpha_{ii}F_i = (2/3) [\mu_{i(F_i)} - \mu_{i(-F_i)}] - (1/12) [\mu_{i(2F_i)} - \mu_{i(-2F_i)}] \quad (4.45)$$

Truncando a Eq. (4.44) após F_i^4 e procedendo de forma idêntica à Eq. (4.43), teremos

$$\alpha_{ii}F_i^2 = (5/2)E_{(0)} - (4/3)[E_{(F_i)} + E_{(-F_i)}] + (1/12)[E_{(2F_i)} + E_{(-2F_i)}] \quad (4.46)$$

MOPAC 6.0 produz dois conjuntos de α_{ii} : um deles utilizando a Eq. (4.45) e outro através da Eq. (4.46), para efeito de comparação. A polarizabilidade média é calculada através de

$$\alpha = 1/3 (\alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz}) \quad (4.47)$$

Os resultados obtidos através do uso das Eqs. (4.45) e (4.46) foram praticamente idênticos, de forma que não há problema algum em utilizar uma ou outra equação. Assim, optamos usar em nosso trabalho a polarizabilidade calculada pela expansão do momento de dipolo do sistema [Eq. (4.45)], mas não haveria prejuízo algum em optar pela Eq. (4.46).

A polarizabilidade molecular também pode ser estimada a partir da soma das contribuições das polarizabilidades atômicas. Temos conhecimento de dois trabalhos onde este princípio é aplicado (Abdul-Ahad *et al.*, 1980 e Dewar & Stewart, 1984). Os valores da polarizabilidade molecular das DHPs são mostradas na Tab. 4.1.

4.6 - Volume molecular de van der Waals

Muitos trabalhos têm sido feitos na tentativa de correlacionar a área superficial molecular com a solubilidade e o coeficiente de partição (Hermann, 1972; Amidon *et al.*, 1974; Yalkowsky & Valvani, 1976; Valvani *et al.*, 1976; Dunn *et al.*, 1987; Doucette & Andren, 1987 e Camilleri *et al.*, 1988). Porém, resultados significativos só foram obtidos para séries homólogas, ou pelo menos quimicamente bastante semelhantes, de compostos químicos. Nesses casos o volume molecular de van der Waals também pode ser utilizado, embora com menor sucesso, devido à elevada intercorrelação existente entre este e a área superficial. A justificativa teórica para o sucesso desse procedimento foi mostrada por Dunn *et al.* (1986). Nos casos em que a série de compostos apresenta grupos funcionais bastante diferentes, como a nossa série, a tentativa de utilizar o volume ou a área superficial molecular para modelar o comportamento da solubilidade ou do coeficiente de partição falha completamente. No entanto, podemos utilizar a medida do volume molecular como modelo aproximado para o efeito estérico do substituinte. Numa série de compostos que diferem entre si apenas por grupos substituintes, o volume molecular está perfeitamente correlacionado com o volume do próprio substituinte, descontadas as pequenas variações de volume devidas às mudanças conformacionais que ocorrem ao longo da série.

Fizemos o cálculo do volume molecular de van der Waals através do programa computacional SURF, construído por nós. SURF é capaz de estimar com grande exatidão as seguintes grandezas moleculares: volume de van der Waals, área superficial de van der Waals, volume acessível ao solvente e área superficial acessível ao solvente (Dunn *et al.*, 1986). O algoritmo utilizado para estimar o volume molecular é o mesmo proposto por Higo & Go (1989). Porém, a área superficial é determinada por modificação do algoritmo de Higo & Go, onde fizemos uma inovação para que ela pudesse ser calculada através de fatores numéricos. Outras técnicas têm sido utilizadas para a estimativa do volume e área superficial moleculares (Hermann, 1972; Pearlman, 1981; Richmond, 1984; Karfunkel & Eyraud, 1989 e Pascual-Ahuir & Silla, 1990). Descreveremos a seguir o modo como é computado o volume molecular.

Para efeito de cálculo, a molécula é considerada como sendo uma coleção de esferas de raio de van der Waals apropriado (Pauling, 1960 e Valvani *et al.*, 1976), cada qual centrada nas respectivas coordenadas nucleares. O primeiro passo do cálculo do volume de van der Waals é criar uma caixa retangular capaz de acomodar toda a molécula. O tamanho da caixa deve ser tal que o comprimento de cada aresta seja múltiplo de 2 Å. A seguir cada aresta é dividida em

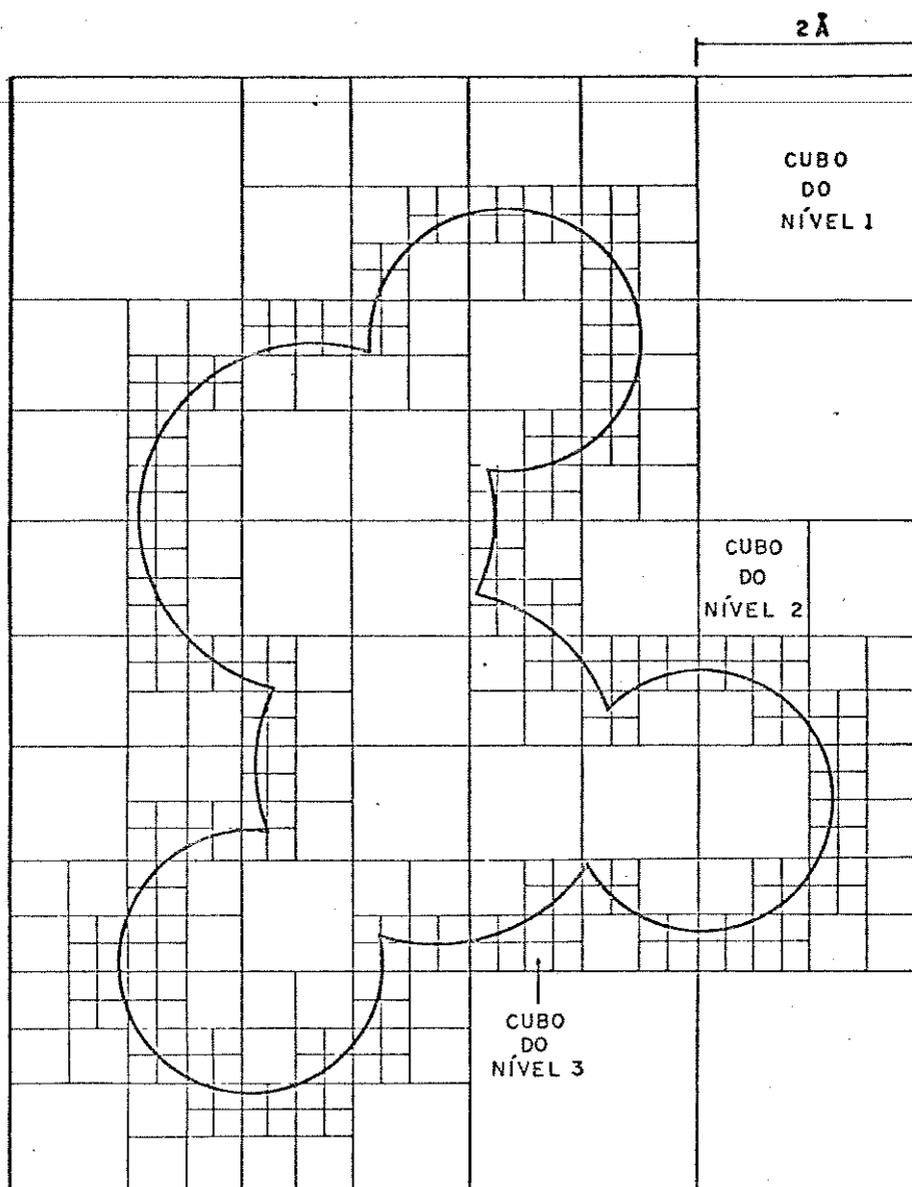


Figura 4.2 - Procedimento adotado para calcular o volume molecular. A molécula é acomodada numa caixa retangular, que é dividida em cubos de 2 Å de aresta no primeiro nível. Os cubos são sucessivamente divididos à medida que processo de cálculo avança.

unidades de 2 Å, de forma que toda a caixa transforme-se num conjunto de cubos de 2 Å de aresta cada. Estes são denominados *cubos do primeiro nível* (Fig. 4.2). Cada cubo é analisado e classificado em uma das três categorias: interno, externo e superficial à molécula. Se o cubo for externo, ele será desprezado. Se for interno, seu volume passará a fazer parte do volume molecular. Caso seja superficial, ele será subdividido em oito novos cubos, cada um com 1 Å de aresta, denominados *cubos do segundo nível*. Estes novos cubos serão analisados, classificados e processados de forma similar aos cubos do primeiro nível. Dessa forma, os

cubos superficiais serão continuamente subdivididos até o nível pré-estabelecido pelo operador. Nesse ponto o cubo superficial não mais será subdividido e determinada fração de seu volume (Higo & Go, 1989) será computada como pertencente à molécula. A partir do quinto nível já podem ser feitas boas aproximações do volume molecular. No entanto, SURF foi construído para operar também no sexto, sétimo e oitavo níveis. Níveis mais elevados do que o oitavo não são interessantes por causa do imenso tempo computacional requerido, sem que haja substancial melhora na qualidade dos resultados. A Tab. 4.2 mostra o volume molecular para os compostos da série.

Tabela 4.1 - Energias do HOMO (ϵ_{HOMO}) e LUMO (ϵ_{LUMO}), momentos dipolares total (μ) e parciais (μ_{carga} e μ_{hibr}) e polarizabilidade molecular (α) para os 45 compostos da série.

No.	$\epsilon_{HOMO}^{(a)}$	$\epsilon_{LUMO}^{(a)}$	$\mu^{(b)}$	$\mu_{carga}^{(b)}$	$\mu_{hibr}^{(b)}$	$\alpha^{(c)}$
1	-8,868	-0,523	3,768	2,779	1,013	26,53
2	-8,905	-0,508	4,482	4,064	0,458	26,43
3	-8,766	-0,409	2,865	2,390	0,476	25,75
4	-9,110	-0,809	7,591	7,218	0,401	27,45
5	-8,715	-0,382	2,446	2,004	0,498	28,00
6	-8,993	-0,699	5,935	5,538	0,525	27,09
7	-8,709	-0,389	2,280	1,853	0,522	26,24
8	-8,708	-0,386	2,305	1,879	0,533	27,49
9	-8,772	-0,404	2,992	2,186	0,949	26,10
10	-8,904	-0,549	4,537	3,489	1,053	26,80
11	-8,851	-0,514	3,625	3,178	0,459	26,06
12	-8,865	-0,524	3,876	3,555	0,353	25,27
13	-8,747	-0,419	2,302	1,810	0,508	24,98
14	-8,962	-0,616	5,717	4,630	1,097	27,23
15	-8,863	-0,525	3,756	1,915	1,907	26,99
16	-8,786	-0,444	2,954	2,572	0,436	25,16
17	-8,776	-0,380	3,167	2,155	1,801	26,51
18	-8,617	-0,263	0,975	0,899	0,315	27,12
19	-8,982	-0,629	5,630	5,283	0,360	26,62
20	-8,728	-0,405	2,039	1,520	0,539	26,34
21	-8,612	-0,259	0,920	0,880	0,366	28,47
22	-8,727	-0,401	2,290	1,679	0,652	27,34
23	-8,330	-0,387	2,426	1,609	1,019	29,25
24	-8,807	-0,486	3,275	2,653	0,763	25,72
25	-8,339	-0,381	1,512	1,244	0,651	26,39
26	-8,785	-0,453	2,557	2,295	0,482	29,06
27	-8,773	-0,438	2,035	1,894	0,452	36,18
28	-8,204	-0,398	2,636	1,914	0,929	26,24
29	-8,869	-0,529	3,627	3,376	0,451	25,36
30	-8,882	-0,549	3,619	2,749	0,871	26,70
31	-8,881	-0,549	3,564	1,986	1,699	27,16
32	-9,167	-0,925	7,529	7,325	0,436	27,68
33	-8,277	-0,376	2,665	1,544	1,127	29,50
34	-8,984	-0,657	5,430	4,497	0,942	27,45
35	-8,869	-0,529	3,397	3,010	0,478	26,19
36	-8,628	-0,360	1,803	1,398	0,499	26,65
37	-9,050	-0,896	4,278	4,253	0,502	26,71
38	-8,680	-0,418	1,953	1,532	0,422	26,04
39	-8,857	-0,498	3,987	3,549	0,440	26,87
40	-9,008	-1,049	6,919	6,567	0,404	28,39
41	-8,943	-0,601	3,458	3,102	0,471	27,13
42	-8,867	-0,814	7,731	7,262	1,041	28,26
43	-8,695	-0,376	2,288	1,839	0,500	27,63
44	-8,876	-0,522	3,630	3,219	0,451	27,04
45	-8,118	-0,287	1,593	1,348	0,257	31,98

(a) Dado em eV; (b) em Debye e (c) em \AA^3

Tabela 4.2 - Constante de hidrofobicidade de Hansch-Fujita (π), constante de Hammett dos substituintes na posição *meta* (σ_m), constantes de Verloop indicando a largura mínima (B_1) e o comprimento (L) do substituinte, eletronegatividade de Mulliken (χ_s), dureza (η) e volume molecular de van der Waals (V_{vdw}) para os 45 compostos da série.

Num.	π	σ_m	$B_1^{(a)}$	$L^{(a)}$	χ_s	η	$V_{vdw}^{(b)}$
1	0,86	0,39	1,95	3,83	0,113	4,173	289,5
2	0,88	0,43	1,98	3,30	0,127	4,199	292,3
3	0,71	0,37	1,80	3,52	0,005	4,179	283,8
4	-0,28	0,71	1,70	3,44	0,377	4,151	284,0
5	0,82	0,05	1,60	4,29	-0,032	4,167	292,5
6	-0,28	0,71	1,70	3,44	0,263	4,147	287,4
7	0,56	-0,07	1,52	3,00	-0,031	4,160	284,5
8	1,02	-0,07	1,52	4,11	-0,033	4,161	299,3
9	0,86	0,39	1,95	3,83	0,005	4,184	288,5
10	-0,57	0,56	1,60	4,23	0,144	4,178	283,6
11	0,71	0,37	1,80	3,52	0,100	4,169	283,2
12	0,14	0,34	1,35	2,65	0,112	4,171	271,9
13	0,00	0,00	1,00	2,06	0,000	4,164	268,9
14	-0,57	0,56	1,60	4,23	0,206	4,173	283,7
15	1,12	0,35	2,15	4,23	0,111	4,169	300,1
16	0,14	0,34	1,35	2,65	0,035	4,171	272,0
17	1,12	0,35	2,15	4,23	-0,005	4,198	298,0
18	-0,02	0,12	1,35	3,98	-0,140	4,177	290,5
19	0,88	0,43	1,98	3,30	0,223	4,177	293,4
20	0,56	-0,07	1,52	3,00	-0,017	4,162	283,9
21	0,38	0,10	1,35	4,92	-0,145	4,177	309,1
22	-0,02	0,12	1,35	3,98	-0,019	4,163	295,9
23	0,18	-0,15	1,50	3,53	-0,225	3,972	312,9
24	-0,67	0,12	1,35	2,74	0,064	4,161	275,6
25	-1,23	-0,16	1,50	2,93	-0,223	3,979	278,9
26	-0,64	0,39	1,35	4,87	0,036	4,166	309,5
27	1,46	0,21	1,70	8,15	0,023	4,168	364,9
28	-1,23	-0,16	1,50	2,93	-0,279	3,903	277,5
29	0,14	0,34	1,35	2,65	0,116	4,170	271,9
30	0,86	0,39	1,95	3,83	0,133	4,167	290,4
31	1,12	0,35	2,15	4,23	0,132	4,166	300,0
32	-0,28	0,71	1,70	3,44	0,463	4,121	287,4
33	0,18	-0,15	1,50	3,53	-0,257	3,951	314,6
34	-0,57	0,56	2,06	4,23	0,238	4,167	283,6
35	0,71	0,37	1,80	3,52	0,119	4,170	284,0
36	1,42	0,74			-0,086	4,134	301,0
37	0,70	1,70			0,393	4,077	284,3
38	0,85	0,71			-0,031	4,131	291,1
39	1,42	0,74			0,095	4,180	298,5
40	0,43	1,08			0,446	3,980	299,0
41	1,42	0,74			0,189	4,171	295,5
42	-0,95	0,83			0,258	4,027	290,8
43	1,12	-0,14			-0,044	4,160	300,4
44	1,42	0,74			0,116	4,177	298,8
45	-0,06	0,36			-0,377	3,916	337,4

(a) Dado \AA e (b) em \AA^3 .

Tabela 4.3 - Carga elétrica líquida sobre os átomos de carbono do anel benzênico dos 45 derivados da DHP, calculadas pelo método AM1.

No.	δ_7	δ_8	δ_9	δ_{10}	δ_{11}	δ_{12}
1	-0,0656	-0,1075	-0,1338	-0,1057	-0,1683	-0,0905
2	-0,0119	-0,1275	-0,1034	-0,1351	-0,0955	-0,1064
3	-0,0596	-0,1111	-0,1328	-0,1215	-0,1323	-0,0435
4	-0,0716	-0,0799	-0,1433	-0,0717	-0,1338	-0,0551
5	-0,0583	-0,1192	-0,1321	-0,1295	-0,1270	-0,0278
6	+0,0019	-0,1296	-0,0991	-0,1348	-0,0869	-0,0958
7	-0,0716	-0,1150	-0,1401	-0,1253	-0,1393	-0,0426
8	-0,0750	-0,1154	-0,1405	-0,1258	-0,1394	-0,0373
9	-0,0393	-0,1185	-0,1207	-0,1298	-0,1132	-0,1467
10	-0,0230	-0,1258	-0,1108	-0,1358	-0,0986	+0,0025
11	-0,0589	-0,1182	-0,1261	-0,1254	-0,0647	-0,1059
12	-0,0412	-0,1352	-0,1094	-0,1674	+0,0841	-0,1524
13	-0,0677	-0,1195	-0,1337	-0,1312	-0,1343	-0,1163
14	-0,0710	-0,0961	-0,1394	-0,0921	-0,0228	-0,0717
15	-0,0708	-0,1012	-0,1380	-0,0978	-0,2659	-0,0782
16	-0,1021	-0,0952	-0,1497	-0,1047	-0,1743	+0,1110
17	-0,0331	-0,1207	-0,1151	-0,1327	-0,1079	-0,2436
18	-0,0964	-0,0879	-0,1677	-0,0938	-0,2109	+0,0956
19	-0,0691	-0,0902	-0,1387	-0,0840	-0,1658	-0,0631
20	-0,0657	-0,1223	-0,1315	-0,1294	-0,0756	-0,1125
21	-0,0977	-0,0877	-0,1691	-0,0933	-0,2132	+0,1009
22	-0,0309	-0,1517	-0,1009	-0,2030	+0,0719	-0,1365
23	-0,0475	-0,1457	-0,1112	-0,1787	+0,0442	-0,1444
24	-0,0289	-0,1551	-0,1013	-0,1574	+0,0735	-0,1991
25	-0,0330	-0,1597	-0,0988	-0,1883	+0,0460	-0,1746
26	-0,0562	-0,1273	-0,1194	-0,1355	+0,0544	-0,1158
27	-0,0578	-0,1252	-0,1206	-0,1317	+0,0554	-0,1105
28	-0,1321	-0,0825	-0,1802	-0,0899	-0,2026	+0,0850
29	-0,0804	-0,0962	-0,1689	+0,0859	-0,1689	-0,0926
30	-0,0522	-0,1213	-0,1066	-0,1679	-0,1073	-0,1173
31	-0,0484	-0,1237	-0,1002	-0,2635	-0,1013	-0,1159
32	-0,0176	-0,1339	-0,0696	-0,1358	-0,0706	-0,1294
33	-0,0938	-0,0970	-0,1808	+0,0460	-0,1553	-0,0970
34	-0,0412	-0,1258	-0,0938	-0,0203	-0,0949	-0,1179
35	-0,0655	-0,1112	-0,1283	-0,0617	-0,1290	-0,1046
36	-0,0485	-0,0358	-0,1322	-0,1139	-0,1346	-0,0354
37	-0,0976	+0,1041	+0,0215	+0,0708	+0,0205	+0,1201
38	-0,0897	-0,0214	-0,1493	-0,0972	-0,1767	+0,1237
39	-0,0528	-0,1110	-0,1254	-0,1176	-0,0674	-0,0417
40	-0,0631	-0,0343	-0,1396	-0,0633	-0,1450	-0,0087
41	-0,0484	-0,1148	-0,0567	-0,1222	-0,0578	-0,1059
42	-0,0996	-0,0127	-0,1767	-0,0278	-0,2353	+0,1358
43	-0,0689	-0,1136	-0,0809	-0,1259	-0,1357	-0,0468
44	-0,0584	-0,1036	-0,1279	-0,0539	-0,1293	-0,0357
45	-0,0992	-0,1327	+0,0186	+0,0930	-0,2580	+0,0988

Tabela 4.4 - Densidade eletrônica de fronteira dos átomos de carbono do anel benzênico dos 45 derivados da DHP, calculada a partir da função de onda fornecida pelo AM1.

Comp.	$F_7^{(\epsilon)}$	$F_8^{(\epsilon)}$	$F_9^{(\epsilon)}$	$F_{10}^{(\epsilon)}$	$F_{11}^{(\epsilon)}$	$F_{12}^{(\epsilon)}$
1	0,10293	0,00847	0,00358	0,00041	0,00531	0,00419
2	0,10040	0,00555	0,00302	0,00013	0,00404	0,00460
3	0,09115	0,00590	0,00443	0,00023	0,00414	0,00289
4	0,10204	0,00584	0,00361	0,00028	0,00573	0,00504
5	0,10107	0,00730	0,00296	0,00020	0,00382	0,00308
6	0,09572	0,00398	0,00344	0,00020	0,00336	0,00263
7	0,10425	0,00712	0,01012	0,00145	0,00960	0,01227
8	0,09702	0,00692	0,00246	0,00036	0,00400	0,00340
9	0,10314	0,00668	0,00402	0,00028	0,00597	0,00579
10	0,10265	0,00680	0,00397	0,00027	0,00617	0,00593
11	0,10125	0,00560	0,00342	0,00025	0,00549	0,00519
12	0,09356	0,00589	0,00452	0,00020	0,00406	0,00289
13	0,10095	0,00553	0,00343	0,00015	0,00438	0,00489
14	0,10298	0,00720	0,00384	0,00032	0,00467	0,00451
15	0,10067	0,00522	0,00332	0,00028	0,00500	0,00443
16	0,10370	0,00962	0,00394	0,00092	0,00584	0,00426
17	0,10477	0,00882	0,00397	0,00030	0,00568	0,00477
18	0,09253	0,00567	0,00418	0,00008	0,00235	0,00239
19	0,10185	0,00675	0,00351	0,00019	0,00414	0,00399
20	0,10306	0,00678	0,00373	0,00015	0,00485	0,00474
21	0,10223	0,00536	0,00370	0,00020	0,00529	0,00494
22	0,10145	0,00573	0,00334	0,00024	0,00533	0,00524
23	0,10251	0,00643	0,00407	0,00025	0,00513	0,00474
24	0,10123	0,00647	0,00339	0,00012	0,00388	0,00382
25	0,10231	0,00649	0,00317	0,00010	0,00418	0,00440
26	0,09615	0,00469	0,00383	0,00009	0,00276	0,00344
27	0,10338	0,00666	0,00397	0,00022	0,00598	0,00585
28	0,10458	0,00814	0,00438	0,00035	0,00599	0,00540
29	0,10293	0,00642	0,00398	0,00025	0,00513	0,00473
30	0,10357	0,00793	0,00314	0,00028	0,00488	0,00392
31	0,10149	0,03708	0,01157	0,01180	0,02820	0,01754
32	0,10060	0,00507	0,00320	0,00007	0,00512	0,00460
33	0,03558	0,35903	0,06087	0,20599	0,26321	0,20312
34	0,11139	0,08460	0,01152	0,04055	0,06443	0,02527
35	0,06665	0,48005	0,05841	0,27441	0,33037	0,22856
36	0,10184	0,00717	0,00298	0,00014	0,00419	0,00358
37	0,10227	0,00649	0,00344	0,00006	0,00436	0,00434
38	0,10363	0,00819	0,00345	0,00026	0,00521	0,00424
39	0,10363	0,00774	0,00392	0,00045	0,00463	0,00419
40	0,10342	0,00461	0,00410	0,00049	0,00399	0,00639
41	0,10312	0,00676	0,00368	0,00006	0,00464	0,00460
42	0,10336	0,00480	0,00488	0,00018	0,00386	0,00690
43	0,31897	0,03236	0,44287	0,06596	0,22970	0,30056
44	0,37759	0,07613	0,19085	0,27320	0,19807	0,04584
45	0,35728	0,03616	0,41746	0,26425	0,00315	0,30706

Tabela 4.5 - Densidade do orbital de fronteira dos átomos de carbono do anel benzênico dos 45 derivados da DHP, calculada a partir da função de onda fornecida pelo AM1.

Comp.	$F_1^{(o)}$	$F_2^{(o)}$	$F_3^{(o)}$	$F_{18}^{(o)}$	$F_{11}^{(o)}$	$F_{12}^{(o)}$
1	0,00708	0,00568	0,00347	0,01264	0,00062	0,00930
2	0,05110	0,00282	0,04050	0,04036	0,00173	0,06001
3	0,04013	0,01149	0,01681	0,04261	0,00126	0,03488
4	0,01605	0,00594	0,00897	0,02070	0,00014	0,02145
5	0,07893	0,41708	0,02520	0,27317	0,31677	0,16782
6	0,38436	0,08515	0,14475	0,45617	0,08873	0,14228
7	0,01156	0,00453	0,00772	0,01548	0,00004	0,01810
8	0,16546	0,00261	0,19349	0,07641	0,04678	0,21433
9	0,00604	0,00561	0,00315	0,01199	0,00030	0,01132
10	0,00573	0,00569	0,00308	0,01187	0,00029	0,01104
11	0,02141	0,00504	0,01375	0,02378	0,00000	0,02800
12	0,03081	0,01359	0,00987	0,03609	0,00233	0,02562
13	0,04369	0,00221	0,03618	0,03320	0,00263	0,05323
14	0,00932	0,00634	0,00443	0,01492	0,00060	0,01173
15	0,02470	0,00699	0,01418	0,02895	0,00023	0,02820
16	0,00796	0,00534	0,00411	0,01267	0,00058	0,01020
17	0,00445	0,00473	0,00233	0,00924	0,00030	0,00805
18	0,10047	0,49343	0,04871	0,24431	0,36305	0,20501
19	0,01222	0,00955	0,00446	0,02032	0,00158	0,01043
20	0,00908	0,00676	0,00411	0,01525	0,00066	0,01118
21	0,01360	0,00713	0,00657	0,01993	0,00044	0,01875
22	0,02385	0,00475	0,01593	0,02521	0,00003	0,03053
23	0,00914	0,00853	0,00357	0,01737	0,00116	0,01220
24	0,01392	0,00890	0,00566	0,02152	0,00136	0,01268
25	0,01549	0,00672	0,00789	0,02276	0,00120	0,01632
26	0,05904	0,49072	0,02339	0,26751	0,31832	0,21731
27	0,00589	0,00514	0,00345	0,01194	0,00024	0,01169
28	0,00550	0,00529	0,00269	0,01059	0,00030	0,00952
29	0,00869	0,00857	0,00328	0,01684	0,00120	0,01162
30	0,00749	0,00548	0,00372	0,01449	0,00067	0,01019
31	0,00796	0,00496	0,00417	0,01240	0,00057	0,01170
32	0,03317	0,00824	0,01824	0,03996	0,00127	0,03209
33	0,00292	0,00387	0,00156	0,00668	0,00049	0,00583
34	0,00580	0,00459	0,00326	0,00971	0,00018	0,00924
35	0,00459	0,00429	0,00268	0,00860	0,00028	0,00825
36	0,28058	0,03962	0,15594	0,23644	0,13936	0,04693
37	0,03827	0,01213	0,01948	0,04390	0,00998	0,01969
38	0,01097	0,00627	0,00567	0,01728	0,00164	0,01092
39	0,00677	0,00535	0,00337	0,01173	0,00034	0,01036
40	0,00922	0,01101	0,00070	0,01539	0,00367	0,00745
41	0,01050	0,00651	0,00509	0,01726	0,00107	0,01200
42	0,01440	0,01318	0,00207	0,02073	0,00715	0,00739
43	0,00292	0,00555	0,00150	0,00968	0,00054	0,00893
44	0,00375	0,00470	0,00194	0,00968	0,00019	0,00782
45	0,00850	0,00868	0,00217	0,01671	0,00101	0,01189

Tabela 4.6 - Densidade do radical de fronteira dos átomos de carbono do anel benzênico dos 45 derivados da DHP, calculada a partir dos coeficientes da função de onda fornecida pelo AM1.

Comp.	$F_1^{(r)}$	$F_2^{(r)}$	$F_3^{(r)}$	$F_{18}^{(r)}$	$F_{11}^{(r)}$	$F_{12}^{(r)}$
1	0,05500	0,00707	0,00352	0,00653	0,00296	0,00675
2	0,07575	0,00419	0,02176	0,02024	0,00288	0,03230
3	0,06564	0,00869	0,01062	0,02142	0,00270	0,01889
4	0,05904	0,00589	0,00629	0,01049	0,00293	0,01324
5	0,09000	0,21219	0,01408	0,13669	0,16029	0,08545
6	0,24004	0,04457	0,07410	0,22818	0,04605	0,07245
7	0,05791	0,00583	0,00892	0,00846	0,00482	0,01518
8	0,13124	0,00477	0,09797	0,03838	0,02539	0,10886
9	0,05459	0,00615	0,00358	0,00614	0,00313	0,00855
10	0,05419	0,00625	0,00352	0,00607	0,00323	0,00849
11	0,06133	0,00532	0,00859	0,01201	0,00274	0,01659
12	0,06218	0,00974	0,00720	0,01814	0,00320	0,01426
13	0,07232	0,00387	0,01981	0,01667	0,00351	0,02906
14	0,05615	0,00677	0,00413	0,00762	0,00263	0,00812
15	0,06269	0,00610	0,00875	0,01461	0,00262	0,01632
16	0,05583	0,00748	0,00402	0,00680	0,00321	0,00723
17	0,05461	0,00678	0,00315	0,00477	0,00299	0,00641
18	0,09650	0,24955	0,02645	0,12220	0,18270	0,10370
19	0,05704	0,00815	0,00399	0,01025	0,00286	0,00721
20	0,05607	0,00677	0,00392	0,00770	0,00276	0,00796
21	0,05792	0,00625	0,00514	0,01007	0,00286	0,01184
22	0,06265	0,00524	0,00964	0,01273	0,00268	0,01789
23	0,05582	0,00748	0,00382	0,00881	0,00314	0,00847
24	0,05758	0,00768	0,00452	0,01082	0,00262	0,00825
25	0,05890	0,00661	0,00553	0,01143	0,00269	0,01036
26	0,07760	0,24770	0,01361	0,13380	0,16054	0,11037
27	0,05464	0,00590	0,00371	0,00608	0,00311	0,00877
28	0,05504	0,00671	0,00353	0,00547	0,00315	0,00746
29	0,05581	0,00750	0,00363	0,00855	0,00317	0,00818
30	0,05553	0,00670	0,00343	0,00738	0,00277	0,00705
31	0,05472	0,02102	0,00787	0,01210	0,01439	0,01462
32	0,06688	0,00666	0,01072	0,02002	0,00319	0,01834
33	0,01925	0,18145	0,03122	0,10633	0,13185	0,10448
34	0,05859	0,04460	0,00739	0,02513	0,03230	0,01725
35	0,03562	0,24217	0,03054	0,14151	0,16532	0,11841
36	0,19121	0,02339	0,07946	0,11829	0,07177	0,02525
37	0,07027	0,00931	0,01146	0,02198	0,00717	0,01202
38	0,05730	0,00723	0,00456	0,00877	0,00343	0,00758
39	0,05520	0,00655	0,00365	0,00609	0,00248	0,00727
40	0,05632	0,00781	0,00240	0,00794	0,00383	0,00692
41	0,05681	0,00663	0,00439	0,00866	0,00286	0,00830
42	0,05888	0,00899	0,00347	0,01046	0,00550	0,00714
43	0,16095	0,01895	0,22218	0,03782	0,11512	0,15474
44	0,19067	0,04042	0,09640	0,14144	0,09913	0,02683
45	0,18289	0,02242	0,20981	0,14048	0,00208	0,15947

Capítulo 5 - Relações Estrutura-Atividade

Este capítulo tem como objetivo obter relações quantitativas entre os parâmetros físico-químicos calculados no capítulo anterior e a atividade biológica das DHPs. A obtenção e análise dessas relações é um passo importante na compreensão do mecanismo de ação das DHPs. Alguns aspectos interessantes das interações DHP-receptor podem ser esclarecidos através do estudo das relações estrutura-atividade. Os resultados aqui obtidos também serão utilizados no mapeamento do receptor das DHPs. A ferramenta que utilizaremos para estabelecer relações estrutura-atividade será a regressão linear múltipla, baseada no método dos mínimos quadrados (Martin, 1978; Box *et al.*, 1978 e Draper & Smith, 1981). A técnica de regressão múltipla tem-se mostrado extremamente útil na investigação científica em química médica (Martin, 1978). Embora o estudo das relações estrutura-atividade não muito frequentemente tenha conduzido ao desenvolvimento de fármacos mais ativos, lançados comercialmente, duas vantagens em sua utilização mais que compensam essa deficiência: esse tipo de estudo reduz drasticamente o número de compostos a serem sintetizados e testados em laboratório durante o desenvolvimento de novos fármacos (o que proporciona substancial economia de recursos); e esclarece aspectos importantes sobre a absorção, transporte e, principalmente, a natureza das interações fármaco-receptor (Martin, 1978).

A organização deste capítulo será feita da seguinte forma. Primeiramente faremos um histórico do desenvolvimento do estudo das relações estrutura-atividade, tanto qualitativa quanto quantitativamente. Achamos importante destacar o aspecto histórico porque o assunto QSAR ainda é pouco conhecido no meio científico nacional. Além do que, também estamos interessados em divulgar este assunto e atrair a atenção de outros pesquisadores para esta área do conhecimento humano. Em seguida vamos analisar o que já conhecemos a respeito das relações estrutura-atividade das DHPs. Finalmente vamos proceder à análise dos parâmetros físico-químicos calculados ao longo do presente trabalho.

5.1 - Histórico

A primeira tentativa de correlacionar alguma propriedade físico-química com a atividade biológica foi feita por Overton (1897, 1899 e 1901) e Meyer (1899). Estes pesquisadores estudaram a significância da solubilidade de algumas substâncias químicas como fator determinante para a

atividade biológica. O efeito narcótico de variada gama de compostos não ionizados pôde ser correlacionado aos seus coeficientes de partição entre lipídio (clorofórmio) e água. Dentro de certos limites, foi descoberto que quanto maior o coeficiente de partição lipídio/água, maior o efeito narcótico medido. Esta regra funcionava bem até o momento em que o coeficiente de partição fosse tão grande que a droga seria praticamente insolúvel em água. Nesse momento, as moléculas do fármaco não mais seriam capazes de caminhar pelos tecidos biológicos, pois ficariam presas à primeira barreira lipídica do caminho, e a atividade biológica passaria a decrescer.

A seguir, Ferguson (1939) estudou cuidadosamente o comportamento de diversas propriedades (solubilidade em água, partição, capilaridade e pressão de vapor) ao longo de séries homólogas de compostos, em relação à sua atividade tóxica. Segundo ele, a atividade tóxica é, em grande parte, determinada por processo de equilíbrio de fases: a exobiofase, na qual são realizadas as medidas da concentração da droga; e a biofase, local da ação primária da droga, onde se encontra o receptor farmacológico e que não é acessível às medidas experimentais. Quando essas duas fases encontram-se em estado de equilíbrio, princípios termodinâmicos simples podem ser aplicados à atividade dos fármacos. Além disso, concluiu que o parâmetro importante a ser considerado para a atividade farmacológica era o grau de saturação relativa da droga na biofase. Este conhecimento passou a ser chamado de *princípio de Ferguson* (Korolkovas, 1974 e 1988). Princípios termodinâmicos têm sido aplicados para descrever a atividade de fármacos diversos quando se acredita que existe estado de equilíbrio durante a ação dos mesmos. As relações obtidas, entretanto, têm sido de uso muito limitado, sendo restritas não somente a certos tipos de atividade biológica como narcótica, anestésica e efeitos depressivos, mas também a certos sistemas-teste simplificados, como peças anatômicas isoladas. Quando usamos todo o corpo da cobaia, correlações simples em geral não são obtidas.

O próximo avanço significativo foi o uso de constantes de substituintes ao invés das medidas de propriedades da molécula inteira. Hammett (1937 e 1940) mostrou que a reatividade química de derivados do benzeno *meta* e *para* substituídos podiam ser correlacionados por

$$\log (K_X/K_H) = \rho\sigma , \quad (5.1)$$

onde K_H é a constante cinética ou a constante de equilíbrio do derivado não substituído ($R-H$) e K_X é a mesma constante para o derivado substituído ($R-X$). A constante σ refere-se ao efeito eletrônico do substituinte e é parâmetro aplicável a diferentes reações

(caracterizada por diferentes valores de ρ) cuja posição de equilíbrio depende da capacidade doadora ou aceptora de elétrons ao centro de reação pelo substituinte. A constante ρ mede a susceptibilidade da reação química aos efeitos eletrônicos exercidos pelo substituinte X . Para a determinação dos valores de σ , a ionização de derivados do ácido benzóico foi definida como reação padrão para a qual ρ foi arbitrariamente feito igual a 1.

Podemos reescrever a equação de Hammett da seguinte forma

$$\log K_X = \rho\sigma + \log K_H , \quad (5.2)$$

ou ainda de maneira mais geral

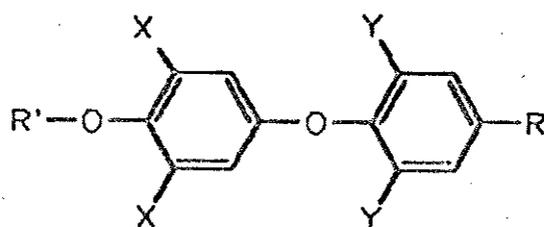
$$\log K = k_1\sigma + k . \quad (5.3)$$

A Eq. (5.3) mostra que o gráfico do logaritmo da constante de equilíbrio, ou constante cinética, contra os valores de σ deverá fornecer uma reta de declividade k_1 ($\equiv \rho$) e intercepto k ($\equiv \log K_H$). A declividade caracteriza a sensibilidade da reação às variações em σ e o intercepto fornece a atividade da molécula não substituída.

A equação de Hammett é exemplo de relação linear de energia livre (Ritchie & Sager, 1964). Ela é preditiva no sentido de que o conhecimento da constante σ possibilitará que se faça a estimativa da reatividade de um composto desconhecido. A equação de Hammett também pode funcionar como ferramenta de classificação de certo tipo de reação: se a equação é satisfeita podemos dizer que o efeito eletrônico do substituinte é importante para o mecanismo da reação (Hammett, 1970). Embora estejamos falando de reações químicas no sentido mais geral da expressão, a constante de Hammett foi e continua sendo amplamente utilizada em estudos estrutura-atividade. Sua utilização só não é maior do que o coeficiente de partição octanol/água, P , e a constante de hidrofobicidade π de Hansch e Fujita (Fujita *et al.*, 1964). Nesse aspecto, a interação fármaco-receptor também é considerada como reação química, embora com aspectos bem particulares (Martin, 1978).

Em 1956, Bruice *et al.* investigaram a atividade tireomimética de uma série de 47 análogos da tireoxina (5.I). Num esforço para racionalizar as relações estrutura-atividade, eles formularam a Eq. (5.4), onde AB é a atividade biológica medida em porcentagem de atividade tireomimética, f são constantes de substituintes dos grupos X , Y e OR' e k e c são constantes de ajustamento.

$$\log AB = k \sum f + c \quad (5.4)$$



(5.1)

sendo que

$$\sum f = f_X + f_Y + f_{OR'} \quad (5.5)$$

Os autores não forneceram os detalhes matemáticos da determinação de f . Disseram apenas que os valores de f são totalmente empíricos e foram derivados de forma similar à constante σ de Hammett. Elevada correlação foi encontrada entre os valores da atividade biológica e o somatório dos valores de f . Além disso, Bruice e colaboradores foram capazes de interpretar as contribuições f em termos físico-químicos: grupos elétron-aceptores X , Y ou OR' diminuem a atividade biológica enquanto que a habilidade de formar pontes de hidrogênio de X e Y intensifica a atividade biológica. É notável o fato de ter sido utilizada a escala logarítmica de atividade biológica nesse estágio de desenvolvimento da química médica. Os autores salientaram a natureza empírica da correlação obtida mas enfatizaram que se tratava de útil sumário dos resultados experimentais e também de um caminho para futuras pesquisas neste campo.

Entre 1960 e 1962, Zahradnik e colaboradores (Zahradnik & Chvapil, 1960; Zahradnik, 1962a e 1962b; Chvapil *et al.*, 1962) postularam que a intensidade da atividade biológica de séries homólogas de compostos $R-X$ poderia ser correlacionada pela Eq. (5.6), construída de forma análoga à Eq. (5.1).

$$\log (C_i/C_{Et}) = \omega v \quad (5.6)$$

Nesta equação, a constante ω caracteriza a sensibilidade do sistema biológico (similar a ρ) e v é uma constante característica do substituinte R (note que sendo a série homóloga, X permanece constante e quem varia é o comprimento da cadeia R) e considerada como independente do grupo funcional X (análoga a σ). O lado esquerdo da Eq. (5.6) é atividade

biológica relativa, na qual C_i revela a concentração molar do i -ésimo membro da série homóloga, capaz de produzir resposta biológica definida e C_{Et} é a correspondente concentração do homólogo etil. Fazendo $R = Et$ como padrão, v será zero para o grupo etil, assim como σ é zero para o hidrogênio na equação de Hammett. Da mesma forma como Hammett definiu $\rho = 1$ para a ionização de ácidos benzóicos, Zahradnik escolheu definir $\omega = 1$ para a toxicidade de álcoois ($X = OH$) em ratos, medindo os valores de LD_{50}^\dagger para cada homólogo sob condições cuidadosamente controladas. Desta forma, valores de v foram gerados para 25 grupos alquila e ω foi avaliado para 39 sistemas biológicos diferentes. O ajuste foi razoavelmente bom, especialmente onde efeitos eletrônicos altamente específicos e efeitos estéricos não eram críticos (Hansch, 1966). Mais tarde, estudos revelaram que os valores de v são medidas da variação relativa da energia livre associadas à transferência de moléculas da fase aquosa para a fase lipídica e que ω caracteriza a importância relativa deste efeito sobre o sistema biológico em estudo.

Em 1962, Hansen propôs a *equação biológica de Hammett*. O motivo que o levou a esta proposição foi que seria altamente desejável que se pudesse dispor de equação semelhante à Eq. (5.3) para prever e explicar a atividade biológica. Hansen baseou-se em algumas suposições simplificadoras para explicar a inibição do crescimento de bactérias em cultura. Ele postulou que a inibição do crescimento das bactérias dependia de reação bimolecular, entre um composto e uma enzima, que, diretamente ou por mecanismo de retroalimentação (*feedback*), controlaria o mecanismo de crescimento. Hansen representou a razão de destruição da enzima através da Eq. (5.7), onde $[I]$ é a concentração do agente inibidor ao redor da enzima E , e K é a constante cinética.

$$dE/dt = K E [I] \quad (5.7)$$

Medindo as concentrações de tal forma que o crescimento bacteriano é inibido por uma quantidade padrão, o que equivale a fazer dE/dt constante, podemos esperar uma linha reta do gráfico de $\log [I]$ contra σ . Da Eq. (5.7) temos

$$\log K + \log [I] = \log (dE/dt) - \log E = \text{Constante} \quad (5.8)$$

Substituindo na Eq. (5.8) o valor de $\log K$ da Eq. (5.3), obtemos

[†] LD_{50} (*letal dose*) corresponde à concentração molar do fármaco capaz de matar 50% da população animal em estudo.

$$-\log [I] = k_1\sigma + k' , \quad (5.9)$$

onde

$$k' = k + \log E - \log (dE/dt) . \quad (5.10)$$

A Eq. (5.9) ficou conhecida como equação biológica de Hammett, devido à semelhança guardada com a Eq. (5.3). Esta abordagem conduziu a resultados desapontadores pelo fato de ter sido assumido que a mesma enzima estava envolvida no mecanismo de inibição exercido por todos os compostos da série. Além disso, foi também assumido que os substituintes do anel benzênico exerciam sua ação somente por efeito eletrônico. Questões como habilidades variadas para penetrar a membrana celular e variações na entropia devido a diferentes orientações sobre a superfície da enzima tiveram de ser ignoradas (Tute, 1971). Essas questões são atualmente reconhecidas como de particular importância em reações biológicas. Desse ponto de vista, não é surpreendente que o ajustamento dos dados experimentais à Eq. (5.9) fosse pobre. No entanto, a abordagem de Hansen marcou importante estágio no desenvolvimento da teoria e serviu de base para trabalhos posteriores (Tute, 1971).

O ano de 1964 marcou definitivamente o desenvolvimento do estudo das relações estrutura-atividade. Nesse ano surgiram dois métodos diferentes para abordar o tratamento da atividade biológica em termos de propriedades físico-químicas: o método de Free-Wilson e o método de Hansch. Mais tarde esses métodos viriam a completar-se mutuamente, gerando a melhor ferramenta disponível na atualidade para o estudo das relações estrutura-atividade.

O modelo aditivo de Free e Wilson (1964) foi formulado com base na observação de que em séries congêneres de compostos a contribuição para os valores da atividade biológica, de substituintes idênticos em posições idênticas da molécula, são mais ou menos constantes. Esse modelo pode ser expresso pela Eq. (5.11), onde AB corresponde aos valores da atividade biológica (em escala linear), a_i é a contribuição para a atividade biológica do substituinte X_i e ζ é a média global da atividade biológica do grupo de compostos da série.

$$AB = \sum_i a_i + \zeta \quad (5.11)$$

O conceito de aditividade da atividade biológica ocasiona algumas limitações, que por sua vez provocam falhas no método de Free-Wilson. Em primeiro lugar, os compostos da série devem possuir a mesma estrutura fundamental, caso contrário as diferenças devem ser consideradas através de um parâmetro extra. Em segundo, no mínimo duas posições da

molécula devem sofrer substituição ao longo da série para que seja possível incluir mais compostos do que variáveis. Em terceiro, os substituintes presentes em diferentes posições não devem influenciar as demais posições, sob pena de tornar falso o conceito de aditividade. Talvez a maior limitação do método de Free-Wilson seja sua incapacidade de gerar previsões acerca da atividade biológica de derivados que não estejam incluídos na série inicial (Martín, 1978). Por outro lado, a análise de Free-Wilson é uma ferramenta simples e eficaz, principalmente quando utilizada no estágio inicial do processo de otimização estrutural. O método lida com o conceito intuitivo de que cada substituinte acrescentado à estrutura-base contribui para a atividade biológica global com uma fração que é característica do próprio substituinte.

Nas primeiras aplicações do método de Free-Wilson surgiram controvérsias a respeito da escala em que deveriam ser apresentados os valores da atividade biológica. Não havia certeza se a melhor escala era a linear ou a escala logarítmica. Hoje sabemos que o conceito de aditividade só é verdadeiro quando utilizamos a escala logarítmica de atividade biológica. Além disso, como o método utiliza a regressão linear múltipla para determinar a contribuição de cada substituinte, é necessário que os erros presentes nos dados biológicos estejam normalmente distribuídos. Somente a escala logarítmica apresenta distribuição normal desses erros, o que não ocorre na escala linear. Por último, pode ser demonstrado que somente a escala logarítmica é parâmetro linearmente relacionado com a energia livre (Kubinyi, 1988).

Podemos rerepresentar a Eq. (5.11) de forma mais rigorosa através da Eq. (5.12)

$$\log AB_{(i)} = \sum_j a_{jk} X_{jk} + \zeta \quad (5.12)$$

onde a atividade biológica do i -ésimo composto está adequadamente expressa em escala logarítmica, a_{jk} é a contribuição para a atividade biológica do substituinte X_k , em cada posição j , e X_{jk} possui valor igual a 1 se o substituinte X_k está presente na posição j , caso contrário terá valor igual a zero.

A versão original do método de Free & Wilson (1964), também conhecida como *modelo clássico de Free-Wilson*, traz em seu bojo sérios problemas matemáticos que muito limitaram sua aplicação. Vamos supor que o conjunto-teste possua n compostos, que diferem entre si pela presença, em certas posições, de m grupos substituintes. Isso provocará o aparecimento de n equações a m incógnitas, mais o termo constante ζ (a média global das atividades biológicas). No entanto este sistema de equações não pode ser resolvido devido à dependência

linear presente. Uma vez que ζ é a média de todos os valores das atividades biológicas [Eq. (5.13)], a soma de todas as contribuições grupais a_{jk} precisa ser zero (Kubinyi, 1988).

$$\zeta = 1/n \sum_i \log AB_{(i)} \quad (5.13)$$

Assim, Free e Wilson definiram *equações de simetria*, para cada posição de substituição, baseados na suposição arbitrária de que a soma das contribuições em cada posição de substituição é zero.

$$\sum_i a_{jk} X_{jk} = 0 \text{ (para cada valor de } j) \quad (5.14)$$

Isto torna possível a resolução do sistema de equações, às custas de duro trabalho manual.

A modificação de Fujita e Ban (1971) simplificou bastante a utilização do método de Free-Wilson. Eles interpretaram ζ como sendo o valor teórico da atividade biológica do composto não substituído, que chamaremos ζ_H . Além disso, relacionaram todas as contribuições grupais ao hidrogênio, na mesma posição de substituição. Isso eliminou a necessidade das equações de simetria e simplificou sobremaneira o processo de cálculo. A equação modificada passou a ser

$$\log AB_{(i)} = \sum_i b_{jk} X_{jk} + \zeta_H \quad (5.15)$$

onde ζ_H é o valor calculado da atividade biológica para o composto não substituído (R-H) e b_{jk} é a contribuição para a atividade biológica do substituinte X_k tomada em relação ao hidrogênio. Como foi salientado por Kubinyi (1988), "as relações entre a modificação de Fujita-Ban e a análise clássica de Free-Wilson são tão simples como a relação entre as escalas de temperatura Celsius e Kelvin. Somente a escolha do ponto de referência determina a magnitude dos valores". Outras propriedades e limitações podem ser vistos em excelentes artigos de revisão (Kubinyi, 1988 e 1990).

Antes de abordar o método de Hansch, talvez seja interessante relatar o modelo proposto por Bocek e Kopecky (Bocek *et al.*, 1964 e Kopecky *et al.*, 1965). Este é um modelo que pode ser considerado semelhante ao de Free-Wilson (Kubinyi & Kehrhan, 1976), diferindo apenas pela inclusão de termos cruzados do tipo $e_X e_Y$. O termo $e_X e_Y$ é utilizado para detectar possíveis interações entre os substituintes X e Y localizados em posições de substituição próximas. Embora o modelo Bocek-Kopecky seja bastante citado em artigos de revisão, não há muita utilidade prática para ele, uma vez que seu uso implica na manipulação de um grande número de

variáveis (Kubinyi & Kehrhahn, 1976).

O método de Hansch (Hansch & Fujita, 1964) para o estudo das relações quantitativas entre estrutura química e atividade biológica é o mais utilizado e o mais difundido. Este método é utilizado no estudo de séries de compostos que possuem estruturas químicas semelhantes, porém diferindo entre si por um ou mais grupos substituintes, em posições definidas. Segundo Hansch, a atividade biológica observada é o resultado da contribuição de diversos fatores, que se comportam de maneira independente. Desde o instante da introdução do fármaco no corpo de um indivíduo até o aparecimento do efeito farmacológico, vários fenômenos têm lugar. As moléculas do fármaco devem ser absorvidas, transportadas através de inúmeras barreiras constituídas por membranas orgânicas, muitas vezes são conjugadas a proteínas, desconjugadas, solvatadas e dessolvatadas, até que finalmente possam interagir com o receptor. A partir daí, certas propriedades moleculares intrínsecas do fármaco e do receptor irão determinar a natureza das interações que irão ocorrer entre os dois. O método de Hansch tenta caracterizar e isolar as contribuições de cada um dos fatores físico-químicos responsáveis pela atuação farmacológica da droga. Os fatores físico-químicos que governam o transporte e as interações da droga com o sítio receptor são normalmente classificados em componentes hidrofóbicos, eletrônicos e estéricos. Cada contribuição é representada por uma constante de substituinte e a atividade biológica do conjunto de compostos é ajustada ao modelo linear multidimensional do tipo

$$\log (1/C) = a \log P + b \sigma + c E_s + d , \quad (5.16)$$

onde a dependência da atividade biológica com a lipofilicidade é linear (Hansch & Dunn, 1972), ou do tipo

$$\log (1/C) = -a (\log P)^2 + b \log P + c \sigma + d E_s + e , \quad (5.17)$$

onde a dependência da atividade biológica em relação à lipofilicidade obedece ao modelo quadrático (Hansch & Clayton, 1973). Nas Eqs. (5.16) e (5.17) P é o coeficiente de partição 1-octanol/água, σ é a constante eletrônica de Hammett, E_s é a constante estérica de Taft (1952 e 1956) do substituinte e C é a concentração molar do composto que produz resposta biológica padrão (IC_{50} , LD_{50} , etc.). As constantes a , b , c , d e e são os coeficientes obtidos pela análise de regressão linear múltipla. Além dos parâmetros citados acima, muitos outros já foram descritos e utilizados. Entre estes incluem-se o parâmetro hidrofóbico π (Fujita *et al.*, 1964), refratividade molar (RM) (Martin, 1978), constantes derivadas de σ (σ^+ , σ^- , σ^* , etc.) (Hammett, 1970 e

Bowden, 1990), parâmetros estéricos de Verloop (L, B_0, \dots, B_4) (Sillipo & Vittoria, 1990), etc. A Eq. (5.16) aparece mais frequentemente quando a atividade biológica é medida em peças anatômicas simples e isoladas (pequenas extensões de parede intestinal, fibras musculares, artérias, etc.). Já a dependência não linear da atividade biológica em relação à hidrofobicidade, que é medida por $\log P$, é observada quando trabalhamos com a cobaia inteira ou com peças anatômicas mais complexas.

Relações lineares entre lipofilicidade e atividade biológica somente são aplicáveis quando o conjunto de moléculas testadas possui extensão limitada de lipofilicidade. Se a lipofilicidade excede determinado limite, será observado decréscimo da atividade biológica para cada série de compostos e cada conjunto de atividade biológica (Taylor, 1990). As numerosas equações lineares obtidas para as relações atividade-lipofilicidade não são argumentos contra essa afirmação: elas apenas indicam que aquele valor limite encontra-se além da extensão de lipofilicidade incluídas nessas análises. Se não houver a lipofilicidade ótima em cada uma das séries, pode resultar em compostos com atividade biológica infinita, caso sua lipofilicidade seja grande o bastante (Kubinyi, 1979).

Existem diversas hipóteses que tentam explicar a dependência não linear entre a atividade biológica e a lipofilicidade (Kubinyi, 1979). É possível que todas elas contribuam em maior ou menor extensão para esse tipo de comportamento. Porém, a hipótese mais óbvia, e que mais deve contribuir, está relacionada com a dependência da solubilidade aquosa na lipofilicidade: se para congêneres lipofílicos a solubilidade em água diminui mais rápido do que a atividade aumenta, repentina quebra na relação linear entre a atividade biológica e a lipofilicidade irá ocorrer (Kubinyi, 1979). Isto acontece no instante em que a solubilidade do fármaco na fase aquosa for tão pequena que ele não mais será capaz de caminhar através das sucessivas barreiras do organismo, constituídas alternadamente por meios aquosos e lipofílicos. Nesse ponto, a droga ficará completamente retida nas primeiras barreiras lipofílicas e não poderá chegar ao local primário de sua ação (Taylor, 1990).

O método de Hansch faz parte do que se convencionou chamar de *abordagem extratermodinâmica*. O termo *relações extratermodinâmicas* refere-se às relações entre quantidades ligadas a parâmetros termodinâmicos como energias livres, entalpias e entropias de reações diversas. Entre tais quantidades relações simples têm sido frequentemente encontradas. Elas correlacionam termodinâmica e parâmetros relacionados, mas as relações entre essas quantidades não requerem a estrutura formal da termodinâmica, por isso elas são

extratermodinâmicas (Fujita, 1990).

Existem três hipóteses que regem a análise correlacional de Hansch (Jurs *et al.*, 1985 e Martin, 1978). A primeira é que as propriedades moleculares relacionadas com a atividade biológica podem ser separadas e quantificadas. Essas propriedades moleculares, por hipótese, são representáveis por parâmetros físico-químicos experimentais ou calculados. A segunda importante hipótese é que a atividade biológica de interesse pode ser medida quantitativamente. Está implícito que todos os compostos estudados possuem o mesmo mecanismo de ação. A terceira hipótese é que a relação entre as estruturas, representadas pelos parâmetros físico-químicos, e a atividade biológica pode ser descrita por equação matemática simples. O modelo linear tem sido utilizado frequentemente.

Essas hipóteses são mais realísticas quando o conjunto de compostos possuir as seguintes características (Jurs *et al.*, 1985 e Martin, 1978). Os compostos devem ser análogos estruturais que agem pelo mesmo mecanismo de ação. Parâmetros físico-químicos confiáveis para os substituintes devem estar disponíveis para todos os compostos. O conjunto de dados deve ser grande o bastante para que os métodos estatísticos sejam aplicáveis. A variação na atividade biológica deve ser apreciável dentro da série (usualmente maior do que duas unidades de $\log 1/C$). Os parâmetros físico-químicos devem possuir apreciável variação ao longo do conjunto de compostos, mas a colinearidade entre os parâmetros físico-químicos precisa ser evitada.

O método de Hansch apresenta diversos pontos fortes e também alguns pontos fracos (Martin, 1978). Os principais pontos fortes serão citados a seguir. A característica mais importante desse método é que ele é baseado na suposição de que as interações que ocorrem entre duas moléculas pequenas são semelhantes às que ocorrem entre uma molécula pequena (fármaco) e uma molécula grande (receptor). Como exemplo, podemos citar o uso do coeficiente de partição octanol/água como forma de modelar o comportamento da molécula do fármaco frente às estruturas lipofílicas encontradas no organismo e o meio aquoso circundante. Uma consequência direta da suposição acima é que podemos utilizar dados extraídos a partir de modelos simples para prever o comportamento de sistemas biológicos complexos. Além disso, o método proporciona alguma compreensão e a formação de figura mental sobre o comportamento químico do fármaco no sistema biológico. Em segundo lugar, o método permite a elaboração de previsões quantitativas cujos intervalos de confiança são estatisticamente definidos. O terceiro ponto forte do método é que ele é relativamente simples de usar e barato. Diversos programas computacionais que fazem regressão linear múltipla

encontram-se disponíveis e quase sempre existe um computador por perto com um desses programas instalados. Da mesma forma, os parâmetros físico-químicos utilizados podem ser facilmente obtidos na literatura. A vantagem final é que, ao contrário do método de Free-Wilson, o método de Hansch permite fazer previsões da atividade biológica de compostos não incluídos na série inicial.

As principais limitações do método de Hansch são as seguintes (Martin, 1978). A primeira é que deve haver parâmetros físico-químicos disponíveis para todos os substituintes da série. Muitas vezes um composto precisa ser eliminado da série porque um de seus parâmetros não foi localizado ou não pôde ser adequadamente avaliado. A segunda limitação é que é necessário incluir número relativamente elevado de compostos a fim de que se possam obter equações confiáveis e que todos os possíveis preditores sejam testados. É regra internacionalmente aceita de que deve haver cerca de cinco compostos para cada variável incluída no modelo (Topliss & Costello, 1972). A terceira limitação é que a aplicação da abordagem extratermodinâmica requer conhecimentos em áreas onde os químicos sintéticos e farmacólogos não se sentem muito à vontade: estatística e operação de computadores. A mais séria limitação da abordagem extratermodinâmica é que os modelos construídos a partir das interações entre moléculas pequenas, com os quais a atividade biológica é correlacionada, são modelos imperfeitos para o sistema biológico.

Alguns bons artigos introdutórios à abordagem extratermodinâmica (Hansch, 1969; Neely, 1973 e Redl *et al.*, 1974) e de revisão (Tate, 1971 e Fujita, 1990) estão disponíveis.

Hoje sabemos que o método de Free-Wilson e o modelo linear de Hansch [Eq. (5.16)] são teoricamente interrelacionados e numericamente equivalentes (Singer & Purcell, 1967 e Kubinyi & Kehrhahn, 1976). Também sabemos que o modelo de Bocek-Kopecky é matematicamente equivalente ao modelo parabólico de Hansch [Eq. (5.17)] (Singer & Purcell, 1967 e Kubinyi & Kehrhahn, 1976). De posse do conhecimento dessas interrelações, Kubinyi (1976) desenvolveu o que chamou de *abordagem mista*, baseada nos modelos de Free-Wilson e Hansch. A abordagem mista é a combinação destes dois modelos e que faz uso das vantagens de cada um deles e amplia a aplicabilidade das análises de Hansch e Free-Wilson. Segundo Kubinyi (1976), existem duas situações especiais onde o emprego da abordagem mista pode ser especialmente favorável.

A primeira situação é quando existe pequeno número de substituintes diferentes numa posição definida da molécula, o que frequentemente torna impossível obter correlações significativas pela análise de Hansch. Ou no caso de equações de Hansch, obtidas a partir de

contribuições de grupo oriundas da análise de Free-Wilson (Cammarata & Yau, 1970 e Fujita & Ban, 1971), que incluem grande número de determinações de ponto único (*single points determination*). Essas equações não são muito confiáveis porque as contribuições de grupo derivadas de grande número de compostos e contribuições de grupo incluindo o erro experimental de um único composto possuem o mesmo peso.

A segunda aplicação da abordagem mista é o uso de variáveis indicadoras[†] (*indicator variables* ou *dummy variables*) na análise de Hansch (Hansch & Yoshimoto, 1974). Hansch e Yoshimoto (1974) interpretaram a utilização de variáveis indicadoras na análise de Hansch como sendo a "abordagem extratermodinâmica auxiliada pelo que é, às vezes, chamado de método de Free-Wilson". Eles definiram a abordagem de Free-Wilson como "relacionamento quantitativo entre estrutura e atividade formulado em termos de variáveis indicadoras. Segundo Kubinyi (1976), o uso de certos tipos de variáveis indicadoras na análise de Hansch é o resultado da aplicação da abordagem mista.

5.2 - Revisão dos Estudos Estrutura-Atividade das DHPs

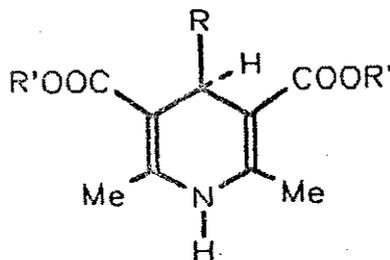
Convencionou-se dividir o ramo de estudo das relações estrutura-atividade em duas partes: SAR (*Structure-Activity Relationships*) e QSAR (*Quantitative SAR*)[‡]. Ambas as partes referem-se ao estabelecimento de relações entre a estrutura química, que tem sido analisada de diversas formas, e a atividade biológica, que pode ser medida semi-quantitativa ou quantitativamente. A diferença fundamental entre os estudos SAR e QSAR está no fato de que neste as relações são expressas na forma de equações matemáticas, normalmente oriundas de análise estatística. Nos estudos SAR, as relações são apenas de nível qualitativo ou, quando muito, semi-quantitativo. Em primeiro lugar vamos relatar o que de mais importante já foi publicado em termos de estudos SAR e a seguir vamos analisar os principais estudos QSAR

[†] Variáveis indicadoras são variáveis especiais capazes de assumir apenas dois valores diferentes: zero e um. O valor um indica a presença de certo evento, enquanto que o valor zero indica sua ausência. Os indicadores de variáveis são normalmente utilizados para detectar propriedades estruturais específicas (impedimento estérico ou mudanças conformacionais), interações específicas entre substituintes (pontes de hidrogênio) e para detectar todas as mudanças nas contribuições polares, eletrônicas e estéricas no caso de um grupo X que é substituído por um grupo químico Y (Martin, 1978).

[‡] Vamos conservar a sigla original da expressão inglesa. Mesmo em congressos realizados no Brasil são usadas as siglas para as expressões não traduzidas.

envolvendo as DHPs.

O primeiro estudo SAR relevante sobre as 1,4-diidropiridinas foi publicado em 1974. Loev *et al.* (1974) sintetizaram e promoveram testes biológicos em 64 derivados diversos da estrutura (5-II), além de outros 10 compostos parecidos.



(5-II)

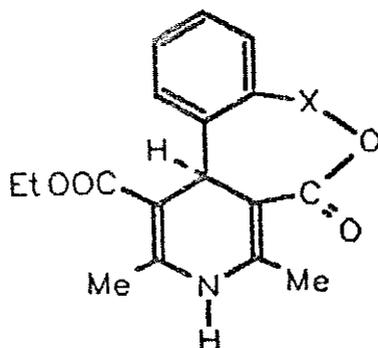
Eles relataram que os compostos mais ativos foram os que possuíam grupos heteroaril e fenil-substituído na posição 4 do anel piridínico. Notaram também que a atividade biológica era elevada quando o grupo 4-fenil era substituído na posição *orto*, mas que a atividade diminuía quando o substituinte era transferido para a posição *meta* e diminuía ainda mais quando ele estava presente em *para*. Segundo Loev, a atividade biológica é independente da eletronegatividade do substituinte presente na posição *orto*, o que sugere que a presença de grupos volumosos em *orto* intensifica a atividade biológica. Isto determina a preferência do grupo fenil pela orientação perpendicular ao plano do anel piridínico. Loev relatou também que a substituição do nitrogênio costuma diminuir a atividade biológica. A presença de grupos metil nas posições 2 e 6 mostraram-se mais favoráveis. Nas posições 3 e 5, a substituição dos grupos carboxílicos por outros substituintes aceptores de elétrons diminuiu marcadamente a atividade.

Após esse primeiro estudo SAR[†] sobre as 1,4-diidropiridinas, vários outros trabalhos foram publicados. Eles ampliaram bastante nosso conhecimento sobre o perfil geométrico apropriado e também sobre a natureza dos substituintes que favorecem a atividade anti-hipertensiva das 1,4-diidropiridinas. Os resultados desses estudos serão mostrados a seguir.

[†] Na verdade houve um trabalho SAR anterior sobre as 1,4-diidropiridinas, mas a atividade biológica considerada não foi anti-hipertensiva mas sim analgésica e curaremimética (Phillips, 1949).

Alguns resultados interessantes foram obtidos a partir do estudo correlacional entre a estrutura cristalográfica de algumas DHPs e a atividade biológica (Triggle *et al.*, 1980; Fosshem *et al.*, 1982 e 1988). O grau de planaridade do anel piridínico foi indicado como sendo um fator capaz de influenciar o desempenho farmacológico do composto. Foi relatado que a atividade biológica das DHPs seria favorecida na medida em que o anel piridínico tendesse à planaridade (Triggle *et al.*, 1980; Fosshem *et al.*, 1982 e 1988). No entanto, quando o grupo fenil encontra-se substituído na posição *para* esta regra não é obedecida (Fosshem *et al.*, 1982). Além disso, os compostos substituídos na posição *orto* apresentaram distorção mínima da planaridade do anel piridínico. Nos derivados *orto*, que em média são mais ativos, a presença do substituinte obriga o anel benzênico a bissectar o plano do anel piridínico (Fosshem *et al.*, 1982).

Esta última informação conduziu Seidel *et al.* (1985) a fazer um dos mais criativos trabalhos SAR sobre as 1,4-diidropiridinas. Eles sintetizaram uma série desses compostos onde o grupo fenil ligado à posição 4 do anel piridínico é mantido rígido, em relação à rotação, através de ponte de lactona entre os dois anéis. Isto é mostrado na Estrutura (5.III).



(5.III)

A orientação com a qual o anel fenil bissecta o anel piridínico é controlada através do comprimento da cadeia lactônica, ou seja, pela extensão do grupo X. Assim, vários análogos rígidos foram obtidos, sendo que foram construídas lactonas cujos anéis possuíam entre 6 e 12 átomos. As estruturas dos compostos obtidos através de cristalografia de raios-x foram superpostas para mostrar as diferentes orientações conseguidas para o anel fenílico, como mostra a Fig. 5.1.

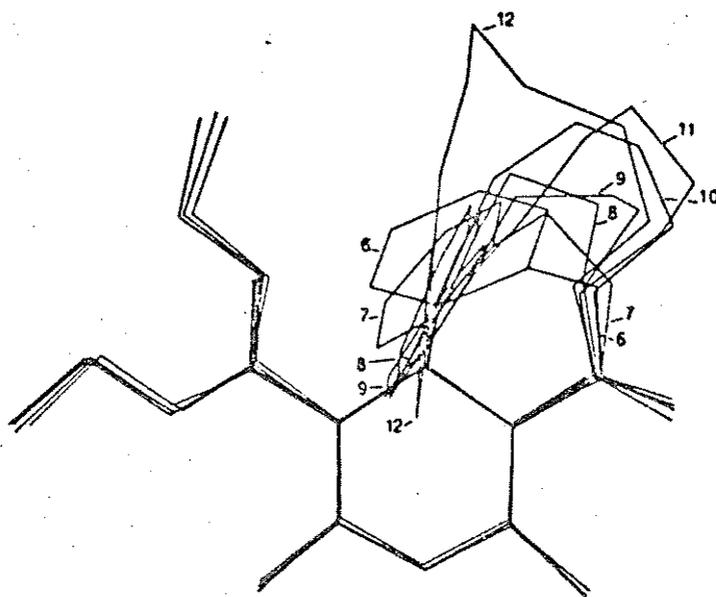


Figura 5.1 - Superposição das estruturas cristalográficas das 1,4-diidropiridina-lactonas mostrando as diversas orientações do anel fenílico conseguidas (Seidel *et al.*, 1985).

Após realizar os testes biológicos, Seidel confirmou que a 1,4-diidropiridina cujo anel de lactona possui 6 átomos é totalmente inativa. Concluiu também que a atividade aumenta regularmente à medida que o plano do anel fenil vai-se alinhando com a direção N1-C4 do anel piridínico.

Num artigo de revisão, Janis e Triggle (1983) enumeraram as principais características das 1,4-diidropiridinas capazes de favorecer a atividade biológica. São elas:

- a) O anel 1,4-diidropiridina é essencial para a atividade biológica. A oxidação à piridina elimina a atividade biológica.
- b) N1 não pode ser substituído afim de que a atividade seja ótima.
- c) Os substituintes nas posições 2 e 6 devem ser grupos alquilas pequenos, embora um grupo NH_2 seja tolerado.
- d) A atividade também é ótima quando substituintes éster encontram-se ligados às posições 3 e 5 do anel piridínico. Se removermos os grupos éster ou se os substituirmos por COMe ou CN, a atividade será substancialmente reduzida.
- e) Substituintes éster maiores do que COOMe, nas posições 3 e 5, geralmente mantêm ou até mesmo intensificam a atividade. Isto sugere que o receptor é capaz de acomodar

grupos volumosos na região de interação com aqueles grupos.

- f) A presença do grupo fenil na posição 4 do anel piridínico parece ser ótima. A posição de substituição no grupo fenil, no entanto, é crítica. A substituição na posição *para* diminui invariavelmente a atividade biológica, enquanto que a substituição nas posições *orto* e *meta* geralmente intensificam a atividade biológica, dependendo dos efeitos estéricos e eletrônicos apresentados pelos substituintes.
- g) Quando os substituintes éster nas posições 3 e 5 do anel piridínico são diferentes, a posição 4 torna-se quiral e passamos a observar a estereosseletividade onde os enantiômeros *R* e *S* costumam apresentar atividades antagônicas (Hof *et al.*, 1985 e Wei *et al.*, 1986).

Duas excelentes revisões sobre os aspectos gerais das 1,4-diidropiridinas foram recentemente apresentadas (Triggle, 1990 e Janis *et al.*, 1987), sendo que uma delas (Janis *et al.*, 1987) cita cerca de 2 mil referências. Esses trabalhos reúnem praticamente tudo o que de relevante foi publicado não somente sobre as 1,4-diidropiridinas mas também, de forma mais geral, sobre os antagonistas do cálcio e drogas que agem sobre os canais iônicos de membranas. Além do que já mencionamos anteriormente, são ressaltados os seguintes aspectos sobre as relações estrutura-atividade das 1,4-diidropiridinas:

- a) Numa série de 2,6-dimetil-3,5-dicarboxil-1,4-diidropiridinas, a atividade aumenta com a substituição na posição 4 do anel piridínico na seguinte sequência: H < Metil < Cicloalquil < Fenil e Fenil-substituído.
- b) Ocorre atividade ótima quando o anel fenílico é substituído nas posições *orto* e *meta* e os substituintes são grupos aceptores de elétrons.
- c) Qualquer substituinte presente na posição *para* reduz a atividade biológica. Isto sugere a ocorrência de impedimento estérico na interação com o receptor.
- d) Tanto a oxidação do anel piridínico (piridina) quanto a sua redução (piperidina) abole a atividade biológica.

No aspecto das relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade biológica das DHPs, apenas três trabalhos parecem ter sido relevantes.

O primeiro estudo QSAR relevante envolvendo as DHPs foi realizado por Rodenkirchen *et al.* (1979). Eles estudaram o efeito da substituição do anel fenílico nas posições *orto*, *meta* e *para* (num total de 14 compostos) sobre a atividade biológica. A atividade medida foi a

capacidade das DHPs em reduzir o ritmo das contrações de músculos de coração de gato (efeito inotrópico negativo), expressa na forma de $\log(1/EC_{50})$. EC_{50} é a concentração molar da droga capaz de causar um efeito inotrópico negativo de 50%.

A única correlação importante foi obtida para os derivados *orto*, em relação ao parâmetro estérico. A Eq. (5.18) mostra como o parâmetro estérico E_s de Taft é capaz de modelar a atividade dos 8 derivados *orto*.

$$\log(1/C) = 6,42 - 0,33 E_s \quad (5.18)$$

$$n = 8 \quad R = 0,87 \quad s = 0,14 \quad F = 18,21 \quad P < 0,01$$

E_s , à imagem de σ , é um parâmetro de natureza genérica, ou seja, E_s é capaz de mostrar apenas que o efeito estérico é importante, mas não fornece maiores detalhes sobre esse efeito. Sabendo disso, Rodenkirchen tentou correlacionar a atividade dos derivados *orto* com os diversos parâmetros de Verloop. A melhor equação obtida foi a Eq. (5.19), onde B_1 é a largura mínima do substituinte.

$$\log(1/C) = 5,06 + 0,80 B_1 \quad (5.19)$$

$$n = 8 \quad R = 0,91 \quad s = 0,12 \quad F = 27,88 \quad P < 0,001$$

A Eq. (5.19) mostra que quanto maior for a largura mínima do substituinte ligado na posição *orto* do anel fenílico, maior será atividade inotrópica negativa da DHP. Tentando interpretar a Eq. (5.19), Rodenkirchen comenta que "a significativa correlação obtida com B_1 indica que a rotação do raio mínimo do substituinte *orto* em direção à (hipotética) cavidade do receptor é de fundamental importância para a potência das drogas e esta condição estérica parece determinar o conjunto de interações entre as moléculas da droga e o receptor". E ele complementa dizendo que "parece que a função predominante dos substituintes arilas é sua fixação estérica".

Não foram observadas correlações importantes envolvendo os derivados *meta* e *para*.

O segundo trabalho é devido a Mahmoudian e Richards (1986). Eles analisaram o efeito de 18 derivados da DHP sobre preparações de íleo de cobaias (*guinea pig*). Os valores quantitativos da atividade biológica foram tomados emprestados do trabalho de Bolger *et al.* (1983). Os derivados *orto*, *meta* e *para* foram inicialmente analisados em separado e a seguir o

grupo foi analisado como um todo.

Segundo os autores, existe correlação significativa entre a atividade biológica dos derivados *orto* e o parâmetro estérico B_1 de Verloop. A correlação pode ser vista na Eq. (5.20), onde $B_{1,o}$ significa que os valores de B_1 são computados apenas na posição *orto*.

$$\log (1/C) = 5,152 + 2,407 B_{1,o} \quad (5.20)$$

$n = 7 \quad R = 0,91 \quad s = 0,32 \quad F = 23,81 \quad P < 0,05$

Segundo a Eq. (5.20), a atividade biológica dos derivados *orto* é favorecida por substituintes largos. Não foram observadas correlações com os parâmetros σ , π ou L (comprimento do substituinte).

Os derivados *meta* correlacionaram-se melhor com a constante eletrônica de Hammett σ_m , segundo a Eq. (5.21).

$$\log (1/C) = 7,543 + 3,116 \sigma_m \quad (5.21)$$

$n = 8 \quad R = 0,882 \quad s = 0,48 \quad F = 21,01 \quad P < 0,005$

Segundo esta equação, grupos aceptores de elétrons ligados em *meta* intensificam a atividade biológica. Mahmoudian e Richards combinaram, em outras três equações, a constante σ_m com B_1 , L e π . Embora não sendo reconhecido pelos autores, somente σ_m e π , quando combinadas, melhoraram significativamente a correlação existente na Eq. (5.21), como mostra a Eq. (5.22).

$$\log (1/C) = 7,230 + 3,444 \sigma_m + 0,927 \pi_m \quad (5.22)$$

$n = 8 \quad R = 0,938 \quad s = 0,39 \quad F = 18,18 \quad P < 0,001$

A atividade biológica dos cinco derivados substituídos na posição *para* apresentou boa correlação com o parâmetro B_1 , de acordo com a Eq. (5.23) e também com o parâmetro L , como mostra a Eq. (5.24). As Eqs. (5.23) e (5.24) indicam que quanto mais largo e mais longo for o substituinte na posição *para*, menor será a atividade biológica das DHPs (observe

$$\log (1/C) = 10,051 - 2,039 B_{1,p} \quad (5.23)$$

$$n = 5 \quad R = 0,96 \quad s = 0,21 \quad F = 37,02 \quad P < 0,01$$

$$\log (1/C) = 9,512 - 0,876 L_p \quad (5.24)$$

$$n = 5 \quad R = 0,94 \quad s = 0,27 \quad F = 22,27 \quad P < 0,025$$

que os coeficientes de L e B_1 apresentam sinais negativos nessas equações).

A análise do conjunto global das 18 DHPs gerou, entre outras, as Eqs. (5.25) e (5.26) como sendo as mais significativas.

$$\log (1/C) = 7,566 + 2,238 B_{1,o m} - 0,479 L_m - 1,288 B_{1,p} + 1,948 \sigma_m \quad (5.25)$$

$$n = 18 \quad R = 0,93 \quad s = 0,45 \quad F = 21,27 \quad P < 0,001$$

$$\log (1/C) = 7,430 + 2,376 B_{1,o m} - 0,472 L_m - 0,674 L_p + 1,928 \sigma_m \quad (5.26)$$

$$n = 18 \quad R = 0,93 \quad s = 0,43 \quad F = 23,10 \quad P < 0,001$$

As principais conclusões de Mahmoudian e Richards foram as seguintes:

- Na posição *orto* a atividade biológica é intensificada à medida em que cresce a largura mínima do substituinte;
- Os substituintes na posição *meta* devem ser largos, porém não longos. Além disso devem ser bons aceptores de elétrons;
- Um substituinte pequeno (preferencialmente H) deve estar presente na posição *para*;
- O sítio receptor das DHPs possui características hidrofóbicas na região de interação com a posição *orto* e hidrofílicas na região de interação com a a posição *para*. Mahmoudian e Richards representaram estas conclusões através da Fig. 5.2.

O terceiro e último estudo QSAR relevante foi realizado por Coburn *et al.* (1988). Esse trabalho parecia ser a análise de Hansch definitiva para os derivados da DHP. Os autores

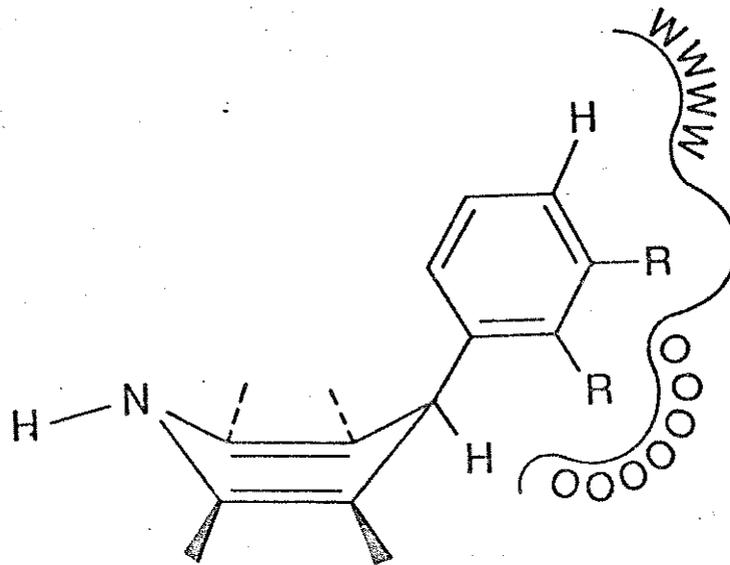


Figura 5.2 - Característica do ambiente do receptor do músculo do íleo de cobaias, na região de interação com o grupo fenil das DHPs, segundo Mahmoudian e Richards (1986). O anel fenil liga-se ao receptor por meio de interações hidrofílicas (W) e lipofílicas (O).

tomaram todos os cuidados para que os resultados não pudessem ser contestados. Cuidados que vão desde a opção pelo tipo de atividade biológica medida, passando pela escolha criteriosa dos substituintes do anel fenílico e também pelo número de compostos a serem analisados, até a prudência ao interpretar os resultados. Bem, o que estamos dizendo parece ser redundância, pois ao menos aparentemente todo trabalho científico deveria ter essas qualidades. Infelizmente isto nem sempre é verdade. O exemplo mais imediato que podemos citar é o próprio trabalho de Mahmoudian e Richards (1986). Segundo Coburn, o trabalho de Mahmoudian contém uma "série de inconsistências". Talvez a principal motivação de Coburn, ao elaborar seu trabalho, tenha sido a de apresentar a versão correta, ampliada e definitiva do trabalho de Mahmoudian e encerrar o assunto.

Dentre as inúmeras "inconsistências" presentes no trabalho de Mahmoudian e Richards relatadas por Coburn, podemos citar as seguintes:

- a) Os valores de σ utilizados para os substituintes na posição *orto* foram obtidos a partir de fenóis e, portanto, sujeitos a efeitos de ressonância de relevância incerta para o caso em discussão;
- b) Foram notadas algumas discrepâncias entre dois dos valores de π tabelados por Mahmoudian e sua fonte original (Norrington *et al.*, 1975);

- c) Foram usados valores não atualizados para π ;
- d) Um dos substituintes utilizados por Bolger *et al.* (1983) foi excluído da análise sem explicação;
- e) A maioria dos compostos utilizados por Mahmoudian são *meta*-derivados e, apesar disso, numa das equações que representam o conjunto global da série [Eq. (11) do trabalho de Mahmoudian] nenhuma constante de substituinte medida em relação à posição *meta* foi incluída;
- f) As Eqs. (5.25) e (5.26) são inconsistentes do modo como foram escritas. O motivo é que nos três últimos termos dessas equações o hidrogênio é substituído, quando apropriado. Porém, ele não é substituído no segundo termo, para os compostos substituídos em *orto* ou *meta*.

Além de tudo isso, Coburn observou que os trabalhos realizados anteriormente apresentaram reduzido número de compostos nas séries analisadas e diversidade do tipo de resposta biológica medida, o que dificulta a comparação entre os trabalhos.

Assim, Coburn selecionou número razoável de compostos derivados da DHP (46), substituídos nas posições *orto*, *meta*, *para* e em múltiplas posições. A atividade biológica medida foi a capacidade dessas drogas em inibir a contração de peças anatómicas de íleo de cobaias (*guinea pig*), provocada pela preparação-padrão do agonista muscarínico metilfurmetida. A atividade foi expressa em termos de $\log(1/IC_{50})$, onde IC_{50} é a concentração molar da droga capaz de reduzir em 50% a contração muscular induzida pelo agente muscarínico.

Ao contrário do que foi reportado em trabalhos anteriores, Coburn não conseguiu estabelecer correlações significativas entre a atividade de cada subgrupo de compostos monossustituídos e os parâmetros testados. Nenhuma das correlações testadas apresentou coeficiente de correlação melhor do que 0,85. Muito menos comprovou estar B_1 correlacionado à atividade dos derivados *orto*, cujo coeficiente de correlação foi de apenas 0,44.

A análise dos derivados *orto* e *meta*, mais o composto não substituído, resultou na Eq. (5.27).

Para obter esta equação, foram testadas combinações de até quatro parâmetros, sendo um termo estérico para a posição *orto* e outro para a posição *meta*, um termo eletrônico para a

$$\log (1/C) = 0,69 (\pm 0,10) \pi + 2,32 (\pm 0,49) \sigma_m - 0,49 (\pm 0,10) L_m + \quad (5.27)$$
$$8,01 (\pm 0,32)$$

$$n = 29 \quad R = 0,87 \quad s = 0,67 \quad F = 25,35$$

posição meta e o termo hidrofóbico π .

A adição dos sete compostos substituídos na posição *para* resultou na Eq. (5.28).

$$\log (1/C) = 0,68 (\pm 0,10) \pi + 2,50 (\pm 0,45) \sigma_m - 0,47 (\pm 0,10) L_m - \quad (5.28)$$
$$3,40 (\pm 0,37) B_{1,p} + 11,31 (\pm 0,55)$$

$$n = 36 \quad R = 0,89 \quad s = 0,68 \quad F = 30,46$$

A análise do conjunto global dos derivados da DHP apresentou como melhor resultado a Eq. (5.29).

$$\log (1/C) = 0,62 (\pm 0,09) \pi + 1,96 (\pm 0,29) \sigma_m - 0,44 (\pm 0,09) L_m - \quad (5.29)$$
$$3,26 (\pm 0,33) B_{1,p} - 1,51 (\pm 0,26) L_{m'} + 14,23 (\pm 0,78)$$

$$n = 46 \quad R = 0,90 \quad s = 0,67 \quad F = 33,93$$

Onde $L_{m'}$ corresponde à constante L de Verloop para o substituinte ligado na posição meta ao anel aromático espacialmente mais próxima do anel piridínico.

As conclusões a que Coburn chegou foram bastante modestas. Segundo ele "estas correlações indicam consistentemente que os dados farmacológicos para os análogos da nifedipina são dependentes da lipofilicidade, de um termo eletrônico e de termos estéricos separados para cada posição do anel aromático".

Muito recentemente tomamos conhecimento de um estudo QSAR envolvendo as DHPs, cuja abordagem é semelhante à nossa. Este estudo é devido a Mahmoudian & Richards (1990) e que, para nossa felicidade, inclui apenas 10 derivados da DHP. Não tivemos acesso ao artigo original mas somente ao seu resumo, que foi publicado no jornal *Quant. Struct.-Act. Relat.*

10, 173 (1991), sob o No. 159/1991. Somente duas equações foram publicadas neste resumo [Eqs. (5.30) e (5.31)].

$$\log (1/IC_{50}) = -20,98 \delta_{12} - 1,60 I_p + 5,81 \quad (5.30)$$

$$n = 8 \quad R = 0,99 \quad s = 0,146 \quad F = 127$$

$$\log (1/IC_{50}) = -0,030 \Theta + 7,413 \quad (5.31)$$

$$n = 6 \quad R = 0,81 \quad s = 0,201 \quad F = 7,64$$

Nestas equações, δ_6 é a carga atômica líquida sobre o átomo de carbono 12 do anel fenílico, I_p é uma variável indicadora que assinala a presença ou ausência de substituinte na posição *para* e Θ é o grau de rotação livre do grupo fenil.

Os compostos utilizados nessa análise foram H, 2-OMe, 2-CN, 2-Me, 2-NO₂ (nifedipina), 2-CF₃, 3-OMe, 3-NO₂, 4-OMe e 4-Me. A atividade biológica medida foi a mesma utilizada no trabalho anterior de Mahmoudian & Richards (1986).

5.3 - Estudo QSAR Envolvendo Parâmetros Teóricos das DHPs

Agora que já tomamos conhecimento dos principais estudos estrutura-atividade envolvendo as DHPs, passaremos a desenvolver novas equações para estudar novos aspectos dessas relações. Nossa idéia inicial era construir equações onde utilizaríamos apenas parâmetros calculados, tais como energias do HOMO e LUMO, momento dipolar, polarizabilidade, cargas atômicas líquidas, etc.. Porém, a análise de alguns resultados obtidos e a experiência adquirida através da análise de diversos outros trabalhos alteraram nossos planos. Achemos por bem tomar os trabalhos de Mahmoudian & Richards (1986 e 1990) e, principalmente, o de Coburn *et al.* (1988) como base para nossa análise. Tentaremos melhorar as equações propostas nesses dois trabalhos através da inclusão dos parâmetros que dispomos e que não foram testados anteriormente em trabalhos envolvendo as DHPs. Aliás, o procedimento de combinar as constantes clássicas de substituintes com parâmetros calculados é uma prática bem estabelecida. Não raras vezes informações valiosas têm sido obtidas através dessa combinação. Chamamos apenas a atenção para alguns cuidados ao manipular equações

de regressão.

Todo pesquisador que trabalha com equações, oriundas da análise de regressão, que relacionam propriedades físico-químicas à atividade biológica deve tomar sérios cuidados ao publicá-las. Normalmente dispomos de numerosos parâmetros ou variáveis e número bastante limitado de compostos ou objetos. Como vimos anteriormente, existe proporção mínima entre o número de variáveis e o número de objetos que a equação de regressão é capaz de suportar, a fim de evitar a correlação por coincidência (*chance correlation*) (Topliss & Costello, 1972). Sabemos também que a disponibilidade de compostos para serem incluídos na análise de regressão depende das facilidades encontradas no processo de síntese orgânica. Normalmente dispomos de número bastante limitado de compostos na série estudada. Assim, o pesquisador vê-se freqüentemente na situação de ter de selecionar número pequeno de variáveis significativas, dentre número relativamente grande de variáveis disponíveis. É justamente neste momento que a maioria dos erros encontrados em estudos QSAR são cometidos.

Os pacotes computacionais estatísticos disponíveis no mercado apresentam diversos métodos de seleção de variáveis. Como exemplo podemos citar o SAS - *Statistical Analysis System*, pacote estatístico que estamos utilizando, que possui nada menos do que oito métodos diferentes para selecionar variáveis. Cada método procura selecionar as variáveis que, quando combinadas, são capazes de maximizar ou minimizar determinada propriedade estatística, como por exemplo teste F, coeficiente de correlação, desvio-padrão, Cp de Mallow, etc.. O problema é que não podemos aceitar todos os modelos selecionados por esses métodos. Temos de obedecer algumas regras que são parcial ou completamente ignoradas pelos programas.

A primeira delas diz respeito à intercorrelação entre as variáveis combinadas na equação. Cada uma das variáveis utilizadas na mesma equação deve ser independente em relação às demais. Além dos problemas de natureza matemática que a intercorrelação de variáveis acarreta (Draper & Smith, 1981), devemos notar que se as variáveis presentes em determinado modelo não forem independentes, não poderemos atribuir a ocorrência de determinado evento a esta ou àquela variável. Isto torna inútil a presença de tais variáveis. Podemos avaliar o grau de interdependência das variáveis observando a matriz de intercorrelações dos parâmetros da regressão. Certos limites de intercorrelação são aceitáveis, porém não existe formalmente o valor exato desse limite. Em conversa pessoal com o Dr. Hugo Kubinyi, pesquisador da BASF alemã, fomos informados de que intercorrelações de até 0,70 são aceitáveis em estudos

QSAR. Podemos dizer ainda que os programas estatísticos detectam a intercorrelação apenas quando ela ocorre em níveis elevados (acima de 0,9), quando passa a prejudicar o processo de inversão de certas matrizes (Draper & Smith, 1981).

A segunda regra é ainda mais séria. Mesmo que sejamos especialistas em estatística, construindo equações estatisticamente válidas, executando testes de validade, verificando limites de confiabilidade, distribuição de resíduos e verificando a capacidade preditiva do modelo, mesmo assim ainda nos arriscamos a construir equações inúteis, do ponto de vista biológico. Quando obtemos determinada equação, estatisticamente confiável, devemos-nos perguntar se ela também o é do ponto de vista biológico. Todas as equações que relacionam propriedades estruturais com a atividade biológica devem ser coerentes com o processo de interação fármaco-receptor. Cada variável acrescentada ao modelo deve expressar uma parcela dessa interação. Variáveis que não sejam capazes de fornecer esta informação devem ser excluídas do modelo, pois são inúteis. A permanência dessas variáveis em modelos matemáticos é considerada erro, pois além de não proporcionar informações específicas sobre o sistema, podem levar a interpretações falsas sobre a natureza do mesmo. Fato ainda mais grave é o de utilizar certas variáveis que se chocam frontalmente com observações experimentais conhecidas. Exemplo famoso é fornecido por Hansch e Cammarata.

Em 1968, Hansch & Lien estudaram a atividade bloqueadora adrenérgica de β -halo- β -arilalquilaminas. Nesse estudo foi proposta a Eq. (5.32)

$$\log (1/ED_{50}) = 1,22 \pi - 1,59 \sigma + 7,89 , \quad (5.32)$$
$$n = 22 \quad R = 0,918 \quad s = 0,238$$

onde ED_{50} é a concentração molar correspondente a 50% da dose efetiva do fármaco. Logo a seguir, esse trabalho foi reexaminado por Cammarata (1972) que apresentou a Eq. (5.33) como possuindo melhor ajuste entre os parâmetros e a atividade biológica.

$$\log (1/ED_{50}) = 0,75 \pi_m - 0,91 \sigma_m + 1,67 r_{v,p} + 5,77 \quad (5.33)$$
$$n = 22 \quad R = 0,961 \quad s = 0,168$$

Na Eq. (5.33) $r_{v,p}$ é o raio de van der Waals do substituinte, considerado esférico, localizado

na posição *para*. Ao tomar conhecimento do trabalho de Cammarata, Hansch não ficou nada satisfeito e publicou artigo (Unger & Hansch, 1973) onde dirigiu severas críticas ao critério utilizado por Cammarata para selecionar variáveis. Segundo Hansch, Cammarata não prestou a mínima atenção ao real significado das variáveis utilizadas. Entre outros aspectos negativos, Hansch salientou o uso da constante eletrônica somente para os substituintes localizados em *meta*. Ele comentou que "para nosso conhecimento, isto é sem precedentes na literatura de físico-química orgânica." Segundo Hansch, "enquanto é concebível que um balanceamento incomum de forças poderia resultar no cancelamento do efeito eletrônico dos substituintes *para*, isto parece ser improvável do ponto de vista do mecanismo proposto; ou seja, o íon carbônio (cuja estrutura é mostrada no artigo original sob o número III) deveria exibir, como esperado, efeito eletrônico do substituinte muito forte, e deveríamos esperar que σ^+ apresentasse melhor performance do que σ nesse processo." Assim, Hansch propôs a Eq. (5.34).

$$\log (1/ED_{50}) = 1,15 \pi - 1,47 \sigma^+ + 7,82 \quad (5.34)$$

$$n = 22 \quad R = 0,944 \quad s = 0,197$$

Embora a Eq. (5.33) apresente melhor ajuste do que a Eq. (5.34), devemos optar pela última pois, segundo Hansch, "ela está em acordo com a físico-química orgânica". Na parte inicial de seu artigo (Unger & Hansch, 1973), Hansch faz alguns comentários sobre os problemas envolvidos na seleção de variáveis que se tornaram clássicos. Recomendamos sua leitura a todos aqueles que trabalham direta ou indiretamente em estudos QSAR.

Erros dessa natureza são mais difíceis de evitar pois exigem do pesquisador conhecimento razoável acerca dos possíveis mecanismos de ação dos fármacos, bem como de sua físico-química orgânica. Porém, erra menos quem ao menos mantém um dos olhos voltado nessa direção.

Adotaremos a seguinte estratégia ao estudarmos as relações quantitativas estrutural-atividade. Em primeiro lugar vamos analisar os derivados *orto*, *meta* e *para* separadamente. O derivado não substituído (H) será incluído em cada um desses grupos, segundo o procedimento usual adotado em estudos QSAR. Em seguida analisaremos esses derivados em grupos de dois, como *orto-meta*, *orto-para* e *meta-para*. A seguir vamos analisar conjuntamente todos os derivados monossustituídos e finalmente vamos estudar todo o grupo

de 45 derivados da DHP. Sempre que possível tentaremos iniciar a análise a partir das equações já conhecidas, porém, não faremos disso obrigação.

Cada uma das equações que apresentaremos a partir de agora serão acompanhadas dos seguintes itens indicadores de sua qualidade (Draper & Smith, 1981):

- a) Intervalo de 95% de confiabilidade para os coeficientes das variáveis independentes e para o intercepto (este valor será apresentado entre parênteses);
- b) Número de objetos (compostos) analisados pela equação (n);
- c) Coeficiente de correlação (R);
- d) Desvio-padrão (s);
- e) Teste F de variância (F);
- f) Nível de significância estatística do modelo;
- g) Nível de significância das variáveis independentes, caso haja mais de uma presente na equação;

Procederemos a outros testes de qualidade e verificação que, apesar de não serem mostrados neste trabalho, serão mencionados sempre que sua qualidade tornar o modelo inaceitável. São eles (Draper & Smith, 1981):

- a) Análise dos resíduos;
- b) Gráfico mostrando a atividade biológica em função do parâmetro físico-químico, no caso de regressão simples;
- c) Gráfico mostrando o valor da atividade biológica previsto pelo modelo em função do valor observado da mesma, no caso de regressão múltipla.
- d) Parâmetro C_p de Mallow;
- e) Parâmetro D de Cook;
- f) Verificação do intervalo de 95% de confiabilidade dos valores previstos pelo modelo;
- g) Análise da matriz de correlação;
- h) Análise da matriz de covariância.

Para proceder à seleção das variáveis mais significativas para cada grupo de derivados, utilizaremos basicamente dois métodos disponíveis no pacote estatístico SAS: MAXR e RSQUARE. O procedimento MAXR é capaz de, dentre grande número de parâmetros

disponíveis, selecionar a melhor equação de um parâmetro, a melhor equação de dois parâmetros, etc., utilizando o critério de maximizar o coeficiente de correlação (R). No caso de RSQUARE, o programa apresenta todas as regressões simples em ordem decrescente de R^2 , em seguida apresenta todas as combinações de parâmetros dois a dois, três a três, etc., também em ordem decrescente de R^2 .

Após separarmos as melhores equações, faremos o estudo pormenorizado de cada uma delas. Não apresentaremos apenas o resultado final das análises, porém, mostraremos também as principais etapas de cada análise, inclusive alguns resultados que a princípio pareciam bons mas que se mostraram errados após minuciosa investigação. Aliás, temos pensado bastante sobre este aspecto. O que geralmente observamos em outros trabalhos é que apenas são mostrados os resultados finais, muitas vezes sem que se relatem os insucessos. Em nossa opinião, este tipo de procedimento é inadequado pois pode permitir que outros pesquisadores tenham de trilhar os mesmos caminhos que o pesquisador anterior deveria ter mostrado estarem errados. Ao deixarmos de relatar o que resultou em fracasso, automaticamente deixamos abertura para que outras pessoas cometam o mesmo erro. Pensando nisto, decidimos apresentar todos os resultados que podem ter algum significado real em termos de relações estrutura-atividade. Após apresentá-los, tentaremos selecionar os melhores seguindo nosso conhecimento e sensibilidade. Ao procedermos desta forma, permitiremos que o leitor, além de acompanhar confortavelmente cada passo de nosso raciocínio, possa fazer sua própria análise e chegar, ou não, à mesma conclusão. O fato é que dessa forma nosso trabalho ficará mais transparente, pois não pretendemos ocultar qualquer resultado. Por outro lado, temos consciência de nossa limitação nesse tipo de abordagem científica porque o assunto QSAR é ainda incipiente em nosso meio.

Em resumo, as variáveis que foram testadas e que resultaram nas equações que serão apresentadas foram as seguintes:

$\log (1/IC_{50}) \rightarrow$ Medida da atividade biológica das DHPs;

$\pi \rightarrow$ Parâmetro hidrofóbico de Hansch-Fujita;

$\sigma_m \rightarrow$ Parâmetro eletrônico de Hammett para os substituintes na posição meta;

$B_1 \rightarrow$ Parâmetro de Verloop correspondente à largura mínima do substituinte;

$L \rightarrow$ Parâmetro de Verloop correspondente ao comprimento do substituinte;

ϵ_{HOMO} → Energia do HOMO (eV);

ϵ_{LUMO} → Energia do LUMO (eV);

μ → Momento dipolar total (Debye);

μ_{carga} → Momento de carga pontual (Debye);

μ_{hibr} → Momento de hibridização (Debye);

χ_s → Eletronegatividade de Mulliken do substituinte;

η → Dureza absoluta;

α → Polarizabilidade molecular (\AA^3);

E_{rot} → Energia da barreira rotacional do anel fenílico (kcal/mol);

V_{vdw} → Volume de van der Waals (\AA^3);

$\delta_7 \dots \delta_{12}$ → Cargas líquidas nos átomos de carbono do anel benzênico;

$F_7^{(e)} \dots F_{12}^{(e)}$ → Densidade eletrônica de fronteira;

$F_7^{(o)} \dots F_{12}^{(o)}$ → Densidade do orbital de fronteira;

$F_7^{(r)} \dots F_{12}^{(r)}$ → Densidade do radical de fronteira;

I_o → Variável indicadora da presença de substituinte em *orto*.

5.3.1 - Análise dos derivados *orto*-substituídos

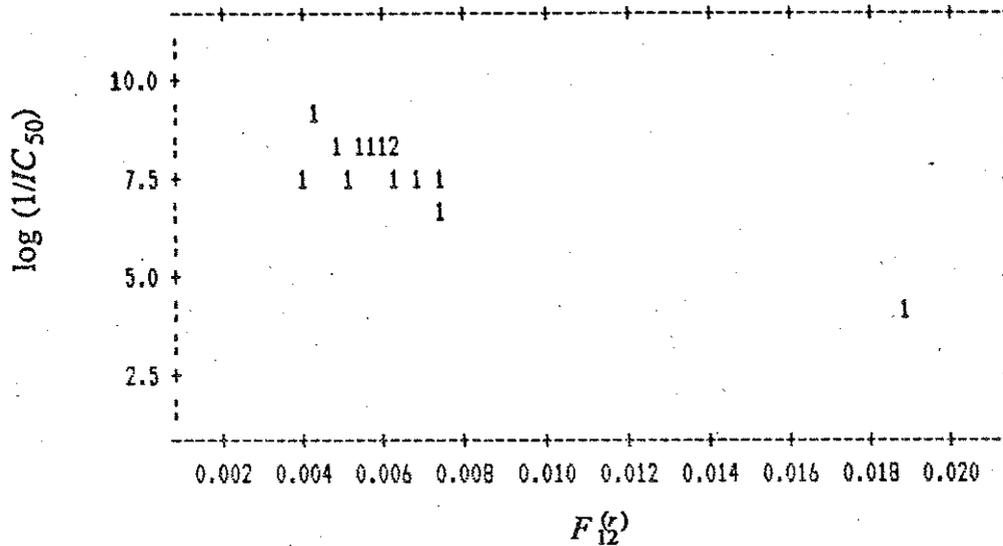
Três equações significativas surgiram da análise dos derivados *orto* [Eqs. (5.35)-(5.37)], que apresentaram ótimos parâmetros numéricos. Apresentaremos cada uma destas equações acompanhadas dos respectivos gráficos, pois a distribuição dos pontos não é adequada.

Embora as Eqs. (5.35)-(5.37) tenham parâmetros numéricos bastante bons, é visível o fato de que, nos gráficos correspondentes, o ponto isolado (composto 2-NH₂) deve apresentar influência bem maior do que os demais pontos sobre o resultado final das três equações. A análise do parâmetro D de Cook confirmou este fato. Portanto, é conveniente que refaçamos as regressões acima eliminando o composto 2-NH₂ e que verifiquemos se a estrutura das Eqs. (5.35)-(5.37) permanece ao menos parecida.

As Eqs. (5.38)-(5.40) correspondem às Eqs. (5.35)-(5.37) sem a presença do derivado 2-NH₂.

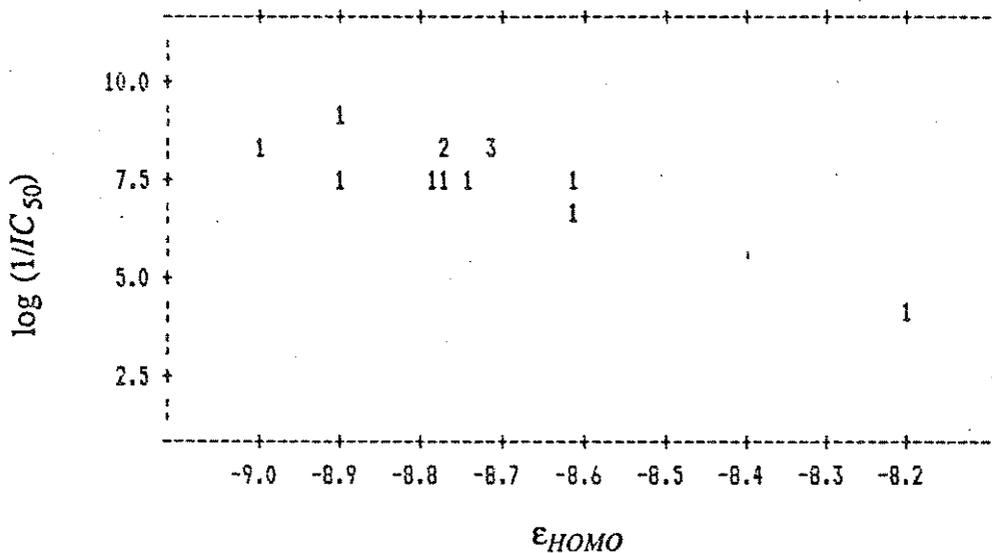
$$\log (1/IC_{50}) = -269, (\pm 79,) F_{12}^{(r)} + 9,48 (\pm 0,60) \quad (5.35)$$

$$n = 14 \quad R = 0,91 \quad s = 0,48 \quad F = 55,26 \quad P < 0,0001$$



$$\log (1/IC_{50}) = -5,0 (\pm 2,0) \epsilon_{HOMO} - 36, (\pm 17,) \quad (5.36)$$

$$n = 14 \quad R = 0,85 \quad s = 0,60 \quad F = 30,77 \quad P < 0,0001$$

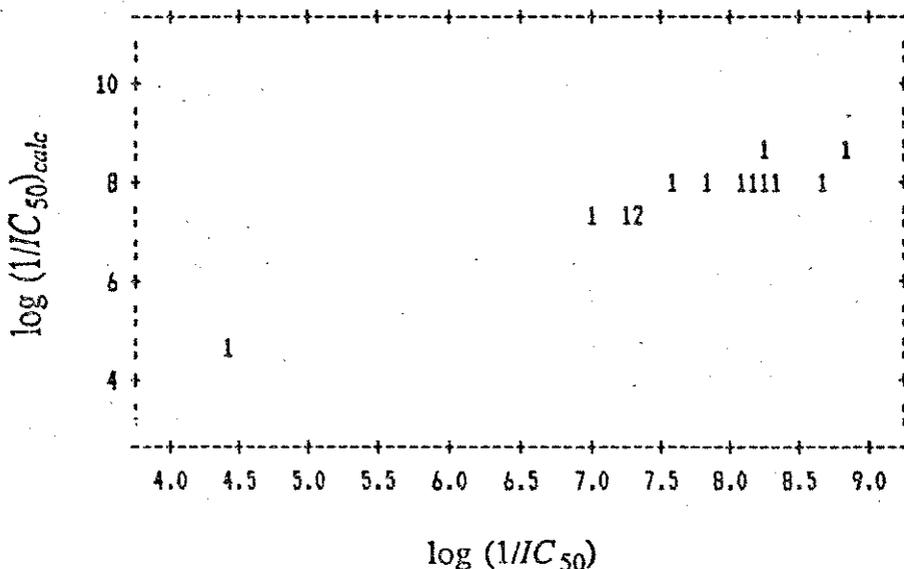


As Eqs. (5.38) e (5.39) são claramente não significativas, o que invalida completamente as Eqs. (5.35) e (5.36). A Eq. (5.40), por outro lado, mantém grande parte de sua estrutura intacta. A única modificação significativa foi a variável $F_9^{(r)}$ que se tornou não significativa (observe que o intervalo de 95% de confiança anula seu coeficiente). Isto sugere que

$$\log (1/C_{50}) = 15,2 (\pm 4,9) P < 0,0001 \delta_9 - 1,00 (\pm 0,51) P < 0,0013 \mu_{hibr} - \quad (5.37)$$

$$20,3 (\pm 6,7) P < 0,0001 F_9^{(r)} + 10,75 (\pm 0,87)$$

$$n = 14 \quad R = 0,97 \quad s = 0,29 \quad F = 58,85 \quad P < 0,0001$$



$$\log (1/C_{50}) = -293, (\pm 284,) F_{12}^{(r)} + 9,6 (\pm 1,7) \quad (5.38)$$

$$n = 13 \quad R = 0,57 \quad s = 0,50 \quad F = 5,19 \quad P < 0,044$$

$$\log (1/C_{50}) = -2,6 (\pm 3,1) \varepsilon_{HOMO} - 14, (\pm 27,) \quad (5.39)$$

$$n = 13 \quad R = 0,49 \quad s = 0,53 \quad F = 3,51 \quad P < 0,088$$

$$\log (1/C_{50}) = 15,8 (\pm 6,3) P < 0,0003 \delta_9 - 1,04 (\pm 0,59) P < 0,0031 \mu_{hibr} - \quad (5.40)$$

$$26, (\pm 37,) P < 0,14 F_9^{(r)} + 10,9 (\pm 1,2)$$

$$n = 13 \quad R = 0,89 \quad s = 0,30 \quad F = 11,86 \quad P < 0,0018$$

refaçamos a regressão de $\log (1/IC_{50})$ contra μ_{hibr} e δ_9 apenas, o que, aliás, alivia um pouco a relação número de variáveis/número de compostos.

A Eq. (5.41) mostra a atividade biológica dos derivados *orto*, sem o composto 2-NH₂, em função das variáveis μ_{hibr} e δ_9 .

$$\log (1/IC_{50}) = 13,7 (\pm 5,8) P < 0,0004 \delta_9 - 0,90 (\pm 0,59) P < 0,0067 \mu_{hibr} + 10,4 (\pm 1,1) \quad (5.41)$$

$$n = 13 \quad R = 0,86 \quad s = 0,33 \quad F = 14,20 \quad P < 0,0012$$

As variáveis δ_7 , δ_8 , δ_{10} , δ_{11} , δ_{12} quando substituídas na Eq. (5.41), no lugar de δ_9 , geraram equações não significantes.

A Eq. (5.41) não é equação de *encher os olhos* mas pode fornecer alguma informação útil. Ela nos diz que a atividade biológica dos derivados *orto* é favorecida pela presença de carga líquida positiva no átomo C9 do anel benzênico, ou seja, no átomo de carbono da posição *meta*. O que poderia significar isto? Ora, C9 é *orto* em relação a C8 (que é onde os substituintes estão ligados) e a Eq. (5.41) diz-nos que quanto mais positiva for a carga na posição *orto*, em relação à posição de ligação do substituinte, maior será a atividade biológica desses derivados. Isto sugere que grupos *orto*-diretores com capacidade de extrair elétrons do anel benzênico intensificam a atividade biológica desses derivados. Mas se os grupos *orto*-diretores também são *para*-diretores, porque δ_{11} também não é significativo quando substituído na Eq. (5.41)? E quanto a C7, a outra posição *orto* em relação a C8? Todo nosso conhecimento atual indica que, no que tange ao anel benzênico, apenas as posições C8, C9 e C10, incluindo os substituintes que a elas se ligam, são importantes durante a interação com o receptor. O que acontece é que C7 encontra-se estericamente bastante protegido para ser importante em termos de interação fármaco-receptor e C11 está localizado do outro lado do anel, o que aparentemente o coloca numa posição espacialmente distante daquela que entra em contato com o receptor.

A presença de μ_{hibr} na Eq. (5.41) deve ser tratada com cuidado. Seu nível de significância estatística pode não ser suficiente ($P < 0,0067$) a ponto de podermos afirmar conclusivamente se μ_{hibr} é realmente relevante para a atividade biológica. O que é fato, entretanto, é que a maioria dos compostos *orto*-substituídos mais ativos não possuem pares

eletrônicos que não participam de ligação química, como CF_3 , NO_2 , Me e Et. Infelizmente a qualidade da Eq. (5.41) não é suficientemente alta para que possamos concluir algo nesse sentido.

5.3.2 - Análise dos derivados *meta*

Não conseguimos obter equação significativa alguma para os derivados *meta* com quaisquer combinações de até três variáveis.

5.3.3 - Análise dos derivados *para*

Encontramos apenas uma relação importante para os derivados substituídos em *para*. A Eq. (5.42) mostra que a atividade biológica dos derivados *para* está inversamente correlacionada ao volume molecular de van der Waals e, conseqüentemente, ao volume do substituinte, uma vez que ambos são 100% correlacionados (descontadas as pequenas variações no volume molecular devidas às variações conformacionais que ocorrem ao longo da série de compostos).

$$\log (1/IC_{50}) = -0,073 (\pm 0,029) V_{vdw} + 26,4 (\pm 8,4) \quad (5.42)$$

$$n = 8 \quad R = 0,93 \quad s = 0,46 \quad F = 37,08 \quad P < 0,0009$$

As correlações entre a atividade biológica e L ou B_1 foram não significativas (Coburn *et al.*, 1988). Como V_{vdw} e α , a polarizabilidade molecular, são intercorrelacionados, é natural que exista alguma correlação entre $\log (1/IC_{50})$ e α . As principais características dessa correlação são $R = 0,86$; $s = 0,64$; $F = 16,85$ e $P < 0,0063$, ou seja, de qualidade estatística inferior à Eq. (5.42). Logo, podemos concluir que V_{vdw} é mais significativo do que α para explicar a atividade biológica dos derivados *para*.

Embora no trabalho de Mahmoudian & Richards (1986) exista uma equação que correlaciona a atividade dos derivados *para* com B_1 [Eq. (5.25)], esta equação inclui apenas cinco compostos e não consegue incorporar os derivados 4-Br, 4-I, 4-CN e 4-NMe₂. Mahmoudian incluiu em sua análise o derivado 4-Me, composto não utilizado por Coburn e,

portanto, também não incluído em nossa análise. Na verdade, o conjunto-teste de Mahmoudian é bastante diferente do utilizado por Coburn. Este também não conseguiu obter nenhuma correlação importante com os parâmetros de Verloop para os derivados *para*.

A Eq. (5.42) joga um pouco mais de luz sobre o problema do impedimento estérico dos derivados substituídos em *para*. Parece ser o volume do substituinte, e não a largura mínima ou o comprimento do substituinte, que é importante para explicar a atividade biológica dos derivados *para*. Com base nisto, podemos imaginar como poderia ser o aspecto da região do receptor que interage com o substituinte ligado a C10. Tomemos por hipótese que essa região seja constituída por uma cavidade, que poderia ser aproximadamente esférica, de raio pequeno e cujo interior seja desprovido de grupos funcionais importantes. A suposição de a cavidade ser aproximadamente esférica baseia-se no fato de que os grupos de maior simetria esférica obedecem melhor ao modelo. A ausência de grupos funcionais na cavidade pode ser proposta com base na inexistência de equações que detectem interações outras que não estérica. Portanto, é bastante razoável supor que um substituinte pequeno como 4-H, ao encaixar-se bem na cavidade, permita que todo o restante da molécula também interaja com os respectivos grupos funcionais complementares presentes no receptor (Fig. 5.3a). Quando um grupo mais volumoso está ligado em C10, sua impossibilidade de encaixe na cavidade obriga o restante da molécula a deslocar-se da posição ótima de interação com o receptor (Fig. 5.3b). Isto certamente ocasiona redução na intensidade da resposta biológica pelo fato de a interação fármaco-receptor também ter diminuído de intensidade.

5.3.4 - Análise dos derivados *orto* e *meta*

A análise isolada dos derivados *meta* não foi capaz de produzir qualquer equação significativa, enquanto que a análise isolada dos derivados *orto* originou apenas uma equação, e ainda assim, não muito significativa [Eq. (5.40)]. Fato que prejudicou a análise dos derivados *orto* foi a existência de um composto muito pouco ativo (2-NH₂), enquanto que os demais, comparativamente, eram bastante ativos. Esperávamos que a combinação *orto-meta*, preenchendo o espaço vazio existente nos gráficos das Eqs. (5.35)-(5.37), produzisse equações pouco melhores. Bem, conseguimos selecionar apenas uma equação cujo coeficiente de correlação é igual a 0,86 [Eq. (5.43)]. Embora como um todo a equação seja válida, o baixo coeficiente de correlação indica que o modelo carece de alguma variável não testada. O que acontece é que as variáveis que aparecem na Eq. (5.43) são importantes para o modelo, mas

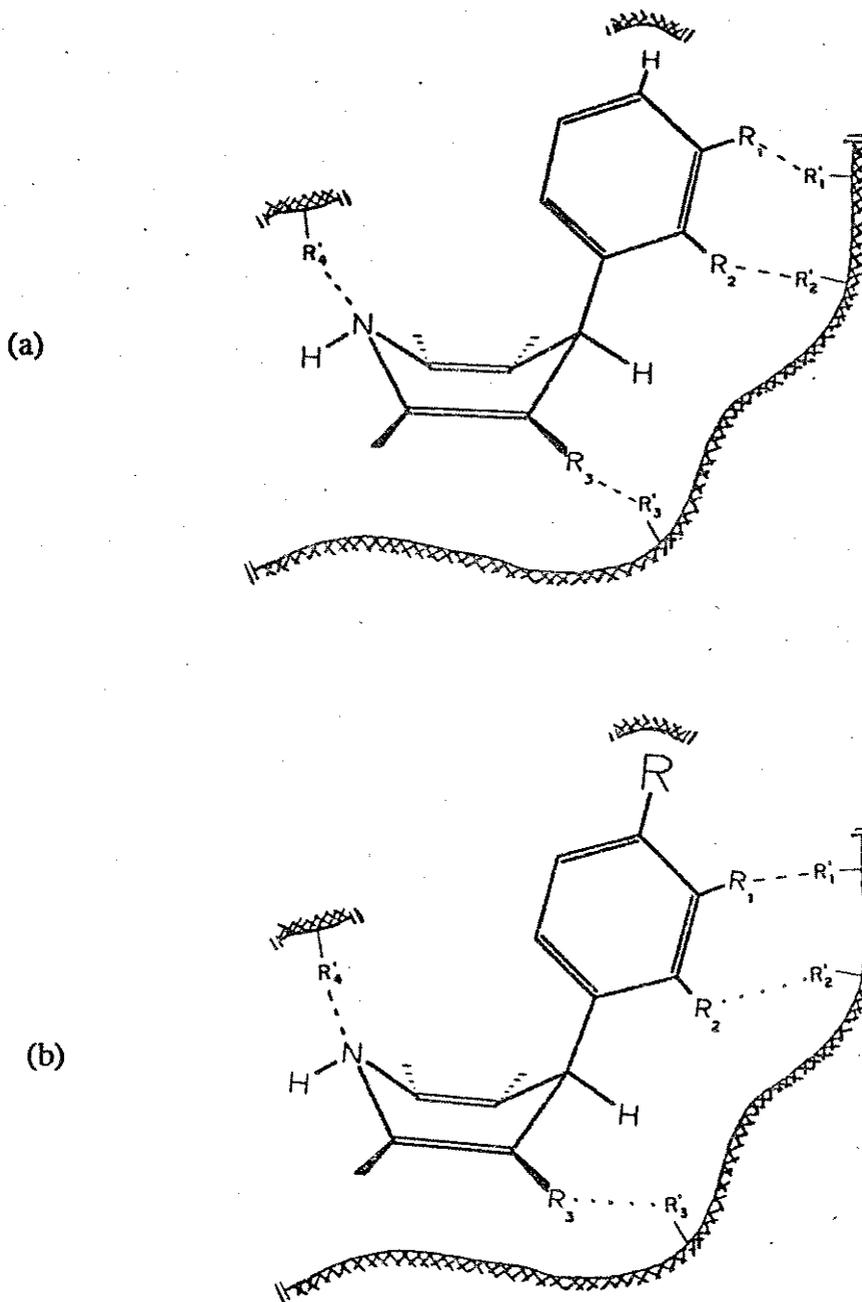


Figura 5.3 - Representação esquemática da região do receptor das DHPs que interage com o substituinte presente na posição *para*. Quando o substituinte é pouco volumoso, seu encaixe na cavidade proporciona interação ótima do restante da molécula com os respectivos grupos complementares do receptor (a). No caso de grupo substituinte volumoso o restante da molécula desloca-se da posição ideal de interação e a resposta biológica é reduzida (b).

o fato é que alguma variável misteriosa ainda deve ser encontrada para que o coeficiente de correlação torne-se satisfatório.

$$\log (1/IC_{50}) = 1,32 (\pm 0,39) P < 0,0001 \pi + 10,1 (\pm 5,3) P < 0,0006 F_8^{(o)} - \quad (5.43)$$

$$0,042 (\pm 0,015) P < 0,0001 V_{vdw} + 19,0 (\pm 4,4)$$

$$n = 28 \quad R = 0,86 \quad s = 0,63 \quad F = 23,00 \quad P < 0,0001$$

A Eq. (5.43) analisa um composto a menos do que a Eq. (5.29), que corresponde ao derivado 3-N⁺Me₃, que achamos por bem não incluir em nossa análise (ver seção 1.4).

Podemos dizer que a Eq. (5.43) possui a mesma estrutura fundamental da Eq. (5.29) proposta por Coburn, ou seja, um parâmetro lipofílico (π), um eletrônico [σ_m ou $F_8^{(o)}$] e um estérico (V_{vdw}). Fato interessante é que $F_8^{(o)}$ e σ_m possuem baixa intercorrelação ($R = 0,61$), o que torna a Eq. (5.43) digna de ser interpretada.

Como vimos na seção 4.2, $F_8^{(o)}$ é medida da reatividade de C8 em relação ao ataque nucleofílico. Isto não necessariamente significa que durante a interação com o receptor C8 irá interagir com grupo de natureza nucleófila. Na verdade é muito difícil afirmar o que realmente é relevante na interação do anel benzênico com o receptor. Não sabemos ao certo se os substituintes presentes no anel aromático são importantes pelo fato de eles próprios interagirem com grupos funcionais complementares do receptor ou se a presença dos substituintes só interessa na medida em que são capazes de modificar o perfil elétrico do anel benzênico. Fato importante é que a presença do substituinte *per se* não é essencial para que haja atividade biológica, pois o composto não substituído possui atividade elevada [$\log (1/IC_{50}) = 7,55$]. Talvez seja conveniente verificar o resultado das análises dos demais subgrupos de compostos antes de emitirmos opinião definitiva a respeito desse problema. Outra observação é que existe interferência do fator estérico em *meta*, como mostra a Eq. (5.29). É muito provável que a região do receptor que ocasiona problemas estéricos aos derivados *para*, cuja existência sugerimos na seção 5.3.3, estenda-se até parte da região que interage com os substituintes localizados em *meta*, daí a presença de L_m em (5.29) e V_{vdw} em (5.43) (Fig. 5.4). A ausência de equações específicas para os derivados *meta*-substituídos apóia esta hipótese.

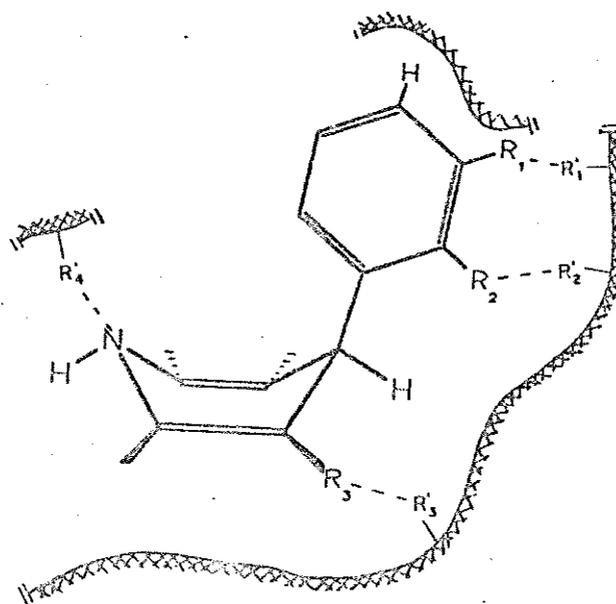


Figura 5.4 - Representação esquemática da região do receptor que interage com o substituinte em *meta*. A região que ocasiona impedimento estérico aos derivados *para* deve estender-se até parte da região que interage com o substituinte ligado em *meta*. A ausência de equações específicas para os derivados *meta*-substituídos apóia esta hipótese.

5.3.5 - Análise dos derivados *orto* e *para*

Conseguimos seleccionar quatro equações estatisticamente significativas para os derivados *orto* e *para* [Eqs. (5.44)-(5.47)].

$$\log (1/IC_{50}) = 0,38 (\pm 0,14) P < 0,0001 E_{rot} + 10,8 (\pm 4,9) P < 0,0002 \eta - \quad (5.44)$$

$$39, (\pm 20,)$$

$$n = 21 \quad R = 0,88 \quad s = 0,77 \quad F = 30,49 \quad P < 0,0001$$

Notadamente temos dois grupos de equações caracterizados pela sua qualidade estatística: (5.44)-(5.45) e (5.46)-(5.47). As Eqs. (5.44) e (5.45) sem dúvida são equivalentes, pois $r_{\eta}^{(e)}$ e η guardam entre si intercorrelação de -0,93. Por enquanto não é possível dizer qual destas, se alguma, é importante para explicar a atividade biológica dos derivados *orto* e *para*. Neste grupo aparece a variável E_{rot} . Sua presença não parece ser de fácil interpretação pelo simples fato de que E_{rot} não mede evento isolado. A energia da barreira rotacional pode estar

$$\log (1/IC_{50}) = 0,43 (\pm 0,14) P < 0,0001 E_{rot} - 8,0 (\pm 3,4) P < 0,0001 F_{II}^{(e)} + \quad (5.45)$$

$$5,28 (\pm 0,69)$$

$$n = 21 \quad R = 0,89 \quad s = 0,75 \quad F = 32,77 \quad P < 0,0001$$

$$\log (1/IC_{50}) = 12,0 (\pm 3,4) P < 0,0001 \eta - 2,63 (\pm 0,62) P < 0,0001 B_{1,p} - \quad (5.46)$$

$$40, (\pm 14,)$$

$$n = 21 \quad R = 0,94 \quad s = 0,54 \quad F = 70,00 \quad P < 0,0001$$

$$\log (1/IC_{50}) = 0,49 (\pm 0,11) P < 0,0001 E_{rot} - 13,3 (\pm 4,3) P < 0,0001 F_{II}^{(e)} - \quad (5.47)$$

$$0,050 (\pm 0,024) P < 0,0004 V_{vdw} + 19,4 (\pm 6,9)$$

$$n = 21 \quad R = 0,94 \quad s = 0,57 \quad F = 41,98 \quad P < 0,0001$$

relacionada tanto a fatores eletrônicos quanto estéricos. Se consultarmos a Tab. 3.1, no entanto, veremos que as barreiras rotacionais elevadas estão invariavelmente ligadas à presença de substituinte em *orto*. A barreira rotacional média de todos os compostos que possuem algum substituinte em *orto* é de 6,2 ($\pm 1,7$) kcal/mol, enquanto que para os compostos substituídos em *meta* e *para* esse valor é de 1,66 ($\pm 0,17$) e 1,45 ($\pm 0,06$), respectivamente (o número entre parênteses corresponde ao desvio padrão da média). Desta forma, pode ser interessante olhar para E_{rot} como uma espécie de variável indicadora da presença, ou ausência, de substituintes em *orto*. Porém, talvez haja uma vantagem a mais em olhar para E_{rot} dessa forma. Se E_{rot} fosse realmente variável indicadora, naturalmente só haveria dois valores diferentes para E_{rot} : zero e um (Martin, 1978). Da forma como está, além da característica de variável indicadora, praticamente separado em dois níveis de valores (em torno de 6,2 e 1,5), E_{rot} possui escalonamento dentro desses níveis. Este escalonamento promove o diferenciamento entre os diversos substituintes ligados em *orto*. Ou seja, E_{rot} não só revela que existe substituinte em *orto* como também, de acordo com seu valor, diz-nos algo a seu respeito. Na Tab. 3.1 está claro que os compostos *orto* com maior E_{rot} são aqueles

substituídos por grupos muito eletronegativos (2-CF₃, 2-NO₂, 2,6-Cl₂, etc.) ou que possuem grupos volumosos e pouco flexíveis (2-Me, 2-Et, 2-I, etc.). A impressão que temos é que a capacidade de E_{rot} em separar os derivados *orto* dos demais é mais relevante do que a capacidade de distinção entre as características elétrica e estérica do substituinte *orto*. Dessa forma, cremos ser mais seguro encarar E_{rot} apenas como variável indicadora da presença de grupos substituintes em *orto*.

Podemos averiguar a real função de E_{rot} nas Eqs. (5.44), (5.45) e (5.47) se efetuarmos a substituição de E_{rot} por I_o , variável indicadora que de fato assinala a presença ou ausência de substituição em *orto*. As Eqs. (5.48) e (5.49) correspondem às Eqs. (5.44) e (5.45), respectivamente, onde E_{rot} foi substituído por I_o .

$$\log (1/IC_{50}) = 2,13 (\pm 0,67) P < 0,0001 I_o + 10,4 (\pm 4,3) P < 0,0001 \eta - \quad (5.48)$$

$$38, (\pm 18,)$$

$$n = 21 \quad R = 0,91 \quad s = 0,68 \quad F = 41,65 \quad P < 0,0001$$

$$\log (1/IC_{50}) = 2,42 (\pm 0,60) P < 0,0001 I_o - 8,0 (\pm 2,9) P < 0,0001 F_{II}^{(e)} + \quad (5.49)$$

$$5,52 (\pm 0,50)$$

$$n = 21 \quad R = 0,92 \quad s = 0,62 \quad F = 51,75 \quad P < 0,0001$$

As Eqs. (5.48) e (5.49) mostram que E_{rot} realmente exerce a função de variável indicadora. Podemos observar sensível melhora na qualidade do ajuste do modelo pela substituição de E_{rot} por I_o . Porém, a Eq. (5.47) sofreu significativa deterioração de sua qualidade ao substituirmos E_{rot} por I_o , como mostra a Eq. (5.50).

$$\log (1/IC_{50}) = 2,53 (\pm 0,60) P < 0,0001 I_o - 12,9 (\pm 4,5) P < 0,0001 F_8^{(e)} - \quad (5.50)$$

$$0,024(\pm 0,025) P < 0,059 V_{vdw} + 12,5 (\pm 7,4)$$

$$n = 21 \quad R = 0,93 \quad s = 0,61 \quad F = 36,42 \quad P < 0,0001$$

Ao efetuarmos a mudança de E_{rot} por I_o , a variável V_{vdw} tornou-se não significativa para o

modelo.

As Eqs. (5.46) e (5.47) possuem praticamente a mesma qualidade estatística, embora estruturalmente sejam bem distintas. A Eq. (5.46), sendo composta por apenas dois parâmetros, é ligeiramente mais significativa do que (5.47) (observe o teste F e o desvio padrão), que é composta por três parâmetros. A Eq. (5.46) pode ser considerada como sendo derivada de (5.44) por substituição de E_{rot} por $B_{1,p}$. Elas são praticamente equivalentes na medida em que a intercorrelação entre E_{rot} e $B_{1,p}$ é igual a -0,75. Parece que as Eqs. (5.44)-(5.46) formam escala evolutiva, cuja componente mais desenvolvida é a Eq. (5.46). Esta é composta por um termo eletrônico e outro estérico. Se a Eq. (5.46) estiver dizendo-nos a verdade, a atividade biológica dos derivados *orto* e *para* é dependente da intensidade com que os elétrons de fronteira encontram-se atraídos pelo sistema nuclear das DHPs, ou seja, a atividade biológica aumenta na proporção em que esses elétrons estão menos disponíveis para grupos eletrófilos do receptor. Por outro lado, a Eq. (5.47) é muito parecida com (5.45), só que é bem mais significativa. Em comparação com (5.46), a Eq. (5.47) é mais explicativa. O termo $F_8^{(e)}$ mostra que quanto menor a densidade de elétrons de fronteira em C8 (*orto*) maior a atividade biológica e, em princípio, confirma a importância de η . Devemos apenas ter um pouco de cuidado porque $F_8^{(e)}$ e η mantêm intercorrelação de -0,82.

Creemos que a título de hipótese podemos propor que a atividade biológica dos derivados *orto* e *para* é caracterizada pela dependência de um fator estérico na posição *para* e um fator eletrônico na posição *orto*. Se substituirmos V_{vdw} por $V_{vdw,p}$ na Eq. (5.47), suas novas características serão $R = 0,95$; $s = 0,50$ e $F = 56,34$, o que confirma aquela afirmação. A presença de E_{rot} como variável indicadora apenas confirma que a substituição em *orto* é muito importante.

5.3.6 - Análise dos derivados *meta* e *para*

Não conseguimos obter equação significativa alguma para os derivados *meta* e *para* com quaisquer combinações de até quatro variáveis.

5.3.7 - Análise de todos os derivados monossustituídos

Obtivemos duas equações significativas para os derivados monossustituídos, mais o derivado não substituído [Eqs. (5.51) e (5.52)].

$$\log (1/IC_{50}) = 0,20 (\pm 0,12) P < 0,0022 E_{rot} - 3,4 (\pm 1,3) P < 0,0001 \epsilon_{HOMO} - \quad (5.51)$$

$$2,33 (\pm 0,87) P < 0,0001 B_{1,p} - 21, (\pm 11,)$$

$$n = 35 \quad R = 0,84 \quad s = 0,77 \quad F = 25,42 \quad P < 0,0001$$

$$\log (1/IC_{50}) = 0,22 (\pm 0,10) P < 0,0002 E_{rot} - 1,37 (\pm 0,71) P < 0,0001 B_{1,p} - \quad (5.52)$$

$$0,024 (\pm 0,013) P < 0,0008 V_{vdw} - 8,9 (\pm 2,9) P < 0,0001 F_{11}^{(e)} +$$

$$15,6 (\pm 4,0)$$

$$n = 35 \quad R = 0,90 \quad s = 0,65 \quad F = 30,27 \quad P < 0,0001$$

Na Eq. (5.51) aparece a variável ϵ_{HOMO} . Na Tab. 4.1 vemos que os valores de ϵ_{HOMO} são todos negativos, portanto o sinal negativo do coeficiente de ϵ_{HOMO} na Eq. (5.51) indica que quanto menor for ϵ_{HOMO} mais intensa será a atividade biológica dos derivados monossustituídos. Isto está em acordo com a Eq. (5.36), relativa aos derivados *orto*. Infelizmente o coeficiente de correlação da Eq. (5.51) é de apenas 0,84 o que a torna pouco representativa e, por isto, vamos apenas deixar registrada a existência de (5.51) mas não vamos atribuir-lhe nenhum significado. A substituição de E_{rot} por I_o praticamente não altera sua qualidade.

A Eq. (5.52) é muito parecida com (5.47), diferindo desta apenas pela inclusão de $B_{1,p}$. Ela não nos traz qualquer novidade, apenas confirma fatos revelados por outras equações anteriores. A mudança de E_{rot} por I_o piora a qualidade de (5.52).

Fato que devemos ressaltar é a presença de $F_{11}^{(e)}$. Não é muito conveniente manter esta variável na Eq. (5.52). $F_{11}^{(e)}$ está relacionado com uma propriedade de C11, que fica do lado (do anel aromático) oposto àquele que realmente interage com o receptor. Seria mais conveniente substituir $F_{11}^{(e)}$ por $F_8^{(e)}$ e verificar sua significância. $F_8^{(e)}$ é a melhor escolha

para o lugar de $F_{II}^{(e)}$ porque já apareceu anteriormente na Eq. (5.47) e está relacionado a C8, que é *para em* relação a C11. A Eq. (5.53) mostra $F_8^{(e)}$ no lugar de $F_{II}^{(e)}$ e suas consequências para a qualidade do modelo.

$$\log (1/IC_{50}) = 0,17 (\pm 0,11) P < 0,0051 E_{rot} - 2,19 (\pm 0,79) P < 0,0001 B_{1,p} - \quad (5.53)$$
$$0,025 (\pm 0,014) P < 0,0013 V_{vdw} - 9,7 (\pm 3,7) P < 0,0001 F_8^{(e)} +$$
$$16,5 (\pm 4,4)$$

$$n = 35 \quad R = 0,87 \quad s = 0,71 \quad F = 24,00 \quad P < 0,0001$$

Houve pequena perda de qualidade devido à substituição de $F_{II}^{(e)}$ por $F_8^{(e)}$, mas ainda assim podemos dizer que $F_8^{(e)}$ é importante para representar a atividade dos derivados monossubstituídos.

5.3.8 - Análise dos 45 derivados da DHP

Apenas uma equação envolvendo os 45 derivados da DHP mostrou-se significativa [Eq. (5.54)].

$$\log (1/IC_{50}) = 0,211 (\pm 0,074) P < 0,0001 E_{rot} - 0,022 (\pm 0,011) P < 0,0003 V_{vdw} - \quad (5.54)$$
$$1,73 (\pm 0,60) P < 0,0001 B_{1,p} - 8,0 (\pm 2,1) P < 0,0001 F_{II}^{(e)} +$$
$$14,8 (\pm 3,4)$$

$$n = 45 \quad R = 0,91 \quad s = 0,61 \quad F = 48,43 \quad P < 0,0001$$

Pela mesma razão anterior é interessante verificar a influência da substituição de $F_{II}^{(e)}$ por $F_8^{(e)}$. A Eq. (5.55) mostra esta substituição e mostra também que sua qualidade praticamente não muda. A substituição de E_{rot} por I_o nas Eqs. (5.54) e (5.55) provocou significativa deterioração na qualidade de ambas.

Neste ponto cabe comentário importante. Quando analisávamos os derivados *orto* e *para*, a substituição de E_{rot} por I_o em duas das três equações, provocou substancial melhoria da qualidade de ambas. Ao analisarmos os derivados monossubstituídos, a substituição de E_{rot}

$$\log (1/IC_{50}) = 0,181 (\pm 0,080) P < 0,0001 E_{rot} - 0,024 (\pm 0,012) P < 0,0002 V_{vdw} - (5.55)$$

$$1,99 (\pm 0,64) P < 0,0001 B_{1,p} - 9,3 (\pm 2,7) P < 0,0001 F_8^{(e)} +$$

$$16,0 (\pm 3,6)$$

$$n = 45 \quad R = 0,90 \quad s = 0,66 \quad F = 40,47 \quad P < 0,0001$$

por I_o não alterou a qualidade da Eq. (5.51) e piorou a qualidade de (5.52). No caso do conjunto global de compostos, a presença de I_o causou profunda piora na qualidade da Eq. (5.54). Isto parece mostrar que nas primeiras equações E_{rot} operava realmente como indicador de variável. Porém, à medida que mais derivados eram incluídos nas equações subsequentes, E_{rot} passou a operar de forma diferente. Como ressaltamos anteriormente, além da característica de indicador de variável, separando em dois níveis o conjunto de compostos, E_{rot} é capaz de diferenciar os compostos dentro de cada nível, o que se deve às características específicas de cada substituição. Acreditamos também que a presença de dupla substituição em *orto* em alguns compostos contribua também para esse comportamento.

Considerações Finais

A primeira conclusão importante deste trabalho refere-se à análise conformacional. Em todo estudo teórico de relações estrutura-atividade, a análise conformacional é a primeira, e muito provavelmente, a mais importante etapa. Todo o trabalho subsequente estará inexoravelmente fundamentado nela. Quando não dispomos de dados experimentais confiáveis para checar os cálculos efetuados, a importância da análise conformacional ganha ainda mais peso. Portanto, não devemos economizar esforços ao planejar essa fase crítica do trabalho. É dever do pesquisador transformar a análise conformacional numa simulação que envolva o maior número possível de variáveis e tentar reproduzir o ambiente em que as moléculas irão atuar utilizando todos os meios de que dispôr. Ficou claro em nosso trabalho que restringir a análise conformacional à otimização da geometria pela minimização da energia interna, sem impor certas restrições, é completa perda de tempo. Isto só tem sentido quando trabalhamos com moléculas rígidas, como anéis condensados.

No momento em que nos propusemos a fazer a análise conformacional de grupo bastante extenso de moléculas que possuem em comum a função de atuar sobre o mesmo receptor farmacológico, assumimos automaticamente o compromisso de sermos coerentes com este fato. Não poderíamos levar adiante a análise conformacional olhando só para as moléculas. Isto seria atitude bastante irresponsável. Assim, dentre os poucos recursos de que dispúnhamos, optamos por combinar três fatores. Como não poderíamos fugir à otimização da geometria pela minimização da energia conformacional, decidimos impor duas condições de contorno que serviriam de elo entre o cálculo puramente teórico e o processo biológico real. Procedemos à análise de grupos de moléculas separadas de acordo com a atividade biológica, e restringimos o número de conformações possíveis através de considerações termodinâmico-estatísticas. Os resultados, em termos de perfil conformacional, foram os melhores possíveis. É claro que, em se dispendo de recursos, muito mais poderia ser feito. Atualmente, em grandes centros, a análise conformacional é sempre acompanhada pela simulação dinâmica, por estudos de mecânica molecular e também de métodos experimentais como análise cristalográfica e ressonância magnética nuclear bidimensional. Recentemente adquirimos o programa AMBER, capaz de realizar cálculos de dinâmica molecular. Infelizmente não foi a tempo de podermos utilizá-lo, mas vamos deixar aqui o registro de sua importância.

Em relação à escolha das propriedades físico-químicas a serem utilizadas em estudos estrutura-atividade, também aprendemos muitas lições. Para nós ficou clara a necessidade da

utilização de propriedades capazes de detectar interações específicas ao nível molecular. Esta é uma necessidade fisiológica do processo de estudo das relações estrutura-atividade. Aliás, chegamos a sofrer na carne alguns dos efeitos da transgressão dessa regra fundamental. Logo nos primórdios deste trabalho, a primeira idéia que nos veio à cabeça foi a de incluir o maior número possível de variáveis, independentemente da possibilidade de ser possível atribuir-lhes a responsabilidade pela ocorrência de fenômenos específicos ao nível molecular. Podemos definir essa fase como *intuitiva* e acreditamos que ela seja obrigatória a todos os que se iniciam nessa área de conhecimento. Aparentemente, o que interessa é obter o maior coeficiente de correlação, não importando os meios utilizados para tal. Esse tipo de pensamento deve ser abandonado mais cedo possível. A escolha das variáveis, principalmente quando não forem constantes de substituintes classicamente consagradas, deve ser bastante criteriosa. Em nosso caso, a escolha que nos pareceu mais sensata, dada nossa inexperiência, foi de utilizar as propriedades físico-químicas que estão sendo mais utilizadas pelo mundo afora. Assim, optamos pela pesquisa bibliográfica como recurso para a escolha das propriedades que utilizamos. Mesmo assim, cometemos alguns erros nessa escolha. A utilização da polarizabilidade molecular juntamente com o volume molecular é uma delas. Como estas propriedades são bastante correlacionadas, é quase impossível decidir qual das duas é realmente importante. Talvez este seja o motivo de termos registrado tão pouca utilização da polarizabilidade molecular em trabalhos semelhantes (só encontramos dois trabalhos desde 1988). Nos momentos em que tivemos o problema de decidir-nos em qual dos dois poderíamos acreditar, optamos pelo volume molecular devido às condições especiais do problema. Outra coisa que ainda não estamos certos de sua utilidade refere-se aos momentos de dipolo parciais. Em todas as referências que citamos no início capítulo 4, sem exceção, apenas o momento dipolar total foi utilizado. A idéia da utilização dos momentos parciais foi extraída de Korolkovas & Burekhalter (1983). Porém, no momento de atribuir algum significado a essas variáveis, em termos de interações fármaco-receptor, surgiram muitas dúvidas em nossas cabeças.

Achamos que, em termos de metodologia, a grande lição que aprendemos foi a da real utilidade dos métodos de química quântica aplicados aos estudos estrutura-atividade. A maior contribuição que estes métodos têm a dar refere-se ao estudo das propriedades e interações eletrônicas que ocorrem entre fármaco e receptor. Isto decorre do fato de somente os métodos de química quântica serem capazes de gerar facilmente diversos índices estáticos relativamente confiáveis que não são facilmente obtidos de outra forma. Se por ventura não conseguimos

utilizar plenamente os recursos da química quântica neste trabalho, devemos basicamente associar duas causas: a primeira delas é a nossa inexperiência em associar as propriedades eletrônicas às interações fármaco-receptor e a segunda é devido à grande quantidade de moléculas que manipulamos. Se prestarmos atenção, veremos que manipulamos 38 propriedades ou índices diversos para cada uma das 45 moléculas. Na verdade, foi uma tarefa enorme a que acabamos de executar.

Quanto às relações estrutura-atividade propriamente ditas, temos algumas considerações a fazer. A primeira delas é quanto ao sentimento de insegurança que surgiu em determinado momento. A sensação que tivemos durante a elaboração das equações que correlacionam as propriedades físico-químicas à atividade biológica foi a mesma de um topógrafo cego tentando elaborar o mapa de uma cidade desconhecida. Estávamos tentando explorar uma região à qual não temos acesso direto e cuja única ligação com nossa dimensão são os números relativos à intensidade da resposta farmacológica exercida por algumas moléculas, além, é claro, de conhecermos o perfil médio destas moléculas que se ligam àquela região. É natural que numa situação como esta, assim como no caso do topógrafo, urge a necessidade de um bom e confiável guia. A escolha do guia é fundamental para o sucesso da empreitada. Utilizamos como guia equações construídas a partir de método estatístico confiável. No entanto, para que pudéssemos acreditar nos resultados obtidos, foi preciso que fôssemos rigorosos em relação à aplicação do método. Não temos dúvidas quanto à existência de outros guias. O único problema é que nós particularmente ainda não os conhecemos direito. Antes de utilizá-los é preciso travar conhecimento com eles. Estes correspondem aos métodos multivariados como análise de componentes principais, análise de agrupamentos (*cluster analysis*), mínimos quadrados parciais (*partial least squares*), análise comparativa do campo molecular (CoMFA) e outros mais. Dessa forma, optamos pela escolha de um velho mas confiável guia.

Conclusões

Em relação à análise conformacional, podemos concluir que:

- a) A análise conformacional baseada no estudo termodinâmico-estatístico das regiões permitidas de estabilidade conformacional apresentou resultados bem mais realísticos do que o estudo baseado no mínimo absoluto de estabilidade conformacional;
- b) O anel piridínico apresenta conformação *bote*. O átomo de H ligado a N1 está ligado à posição equatorial do anel piridínico, enquanto que o anel fenílico está ligado à posição axial;
- c) O plano determinado pelo anel fenílico bissecta o anel piridínico próximo à linha N1-C4;
- d) Os substituintes ligados às posições *orto* e *meta* do anel fenílico encontram-se espacialmente em oposição ao anel piridínico;
- e) As principais dimensões do receptor das DHPs são: aproximadamente 6,1 Å em relação à região que interage com o anel fenílico e aproximadamente 4,8 Å em relação à região que interage com o eixo N1-C4;

Com respeito às relações estrutura-atividade, as principais conclusões foram:

- f) Os derivados *orto*-substituídos devem ser grupos *orto*-diretores capazes de atrair elétrons do anel aromático;
- g) A atividade biológica dos derivados *para* é determinada pelo volume do grupo substituinte. Quanto maior o volume do grupo ligado a C10 menor a atividade biológica;
- h) Não foi possível obter qualquer relação simples entre os derivados *meta* e a atividade biológica;
- i) C8 e C9 são o centro das interações eletrônicas entre o anel fenil e o receptor das DHPs;
- j) É importantíssimo que não haja substituição em *para*. A presença de qualquer grupo diferente de H em *para* reduz acentuadamente a resposta biológica;
- k) Dois parâmetros estéricos são necessários para modelar a atividade biológica das DHPs: um para a posição *para* (V_{vdw}) e outro para *meta* (L_m);
- l) A densidade de elétrons de fronteira deve ser mínima sobre C8 para que a atividade seja elevada. Isto requer a presença de grupos capazes de atrair elétrons do anel aromático

tanto em *orto* quanto em *meta*;

- m) A presença de dupla substituição em *orto* intensifica a atividade biológica;
- n) A região do receptor que interage com os derivados *para* é constituída por pequena cavidade aproximadamente esférica e desprovida de grupos funcionais importantes;
- o) A região mencionada no item anterior prolonga-se até parte da região que interage com os substituintes em *meta*;
- p) A região do receptor que interage com *orto* dispõe de um grupo carregado positivamente e capaz de interagir com o grupo aceptor de elétrons ligado a *orto*.

Referências Bibliográficas

- Abbott F.S. & Acheampong A.A. (1988) *Neuropharmacology* 27, 287.
- Abdul-Ahad P.G., Blair T. & Webb G.A. (1980) *Int. J. Quantum Chem.* 17, 821.
- Aggarwal D., Saha R.N., Gupta J.K. & Gupta S.P. (1988) *J. Pharmacobio-Dyn.* 11, 591.
- Amidon G.L., Yalkowsky S.H. & Leung S (1974) *J. Pharm. Sci.* 63, 1858.
- Armstrong C.M. (1981) *Physiol. Rev.* 61, 644.
- Asbrink L., Fridh C. & Lindholm E. (1977) *Chem. Phys. Lett.* 52, 63, 69, 72.
- Besler B.H., Merz K.M. & Kollman P.A. (1990) *J. Comp. Chem.* 11, 431.
- Bocek K., Kopecký J., Krivucová M. & Vlachová D. (1964) *Experientia* 20, 667.
- Bolger G.T., Gengo P., Klockowski K., Luchowski E., Siegel H., Janis R.A., Triggler A.M. & Triggler D.J. (1983) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 225, 291.
- Bolton T.B. (1979) *Physiol. Rev.* 59, 606.
- Bowden K. (1990) *Comprehensive Medicinal Chemistry. The Rational Design, Mechanistic Study and Therapeutic Application of Chemical Compounds*, Cap. 18.5, Ed. C. Hansch, P.G. Sammes & J.B. Taylor, Pergamon Press, New York.
- Box G.E.P., Hunter W.G. & Hunter J.S. (1978) *Statistics for Experimenters*, Wiley, New York.
- Bradley J.D. & Gerrans G.C. (1973) *J. Chem. Educ.* 50, 463.
- Brown H.D. (1985) *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 25, 218.
- Bruice T.C., Kharasch N. & Winzler R.J. (1956) *Arch. Biochem. Biophys.* 62, 305.
- Bruijn S. (1977) *Chem. Phys. Lett.* 52, 76.
- Bühler F.R., Distler A. & Gross F. (1984) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6, 5929.
- Burke B.J. & Hopfinger A.J. (1990) *J. Med. Chem.* 33, 274.
- Bushelev S.N. & Stepanov N.F. (1989) *Z. Naturforsch.* 44c, 212.
- Camilleri P., Watts S.A. & Boraston J.A. (1988) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1699.
- Cammarata A. (1972) *J. Med. Chem.* 15, 573.
- Cammarata A. & Yau S.J. (1970) *J. Med. Chem.* 13, 93.
- Campbell K.P., Leung A.T. & Sharp A.H. (1988) *Trend. Neurosci.* 11, 425.

- Carotti A., Raguseo C., Campagna F., Langridge R. & Klein T.E. (1989) *Quant. Struct.-Act. Relat.* **8**, 1.
- Catterall W.A. (1986) *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 953.
- Catterall W.A. (1988) *Science* **242**, 50.
- Catterall W.A., Seagar M.J. & Takahashi M.J. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 3535.
- Cauvin C., Loutzenhiser R. & van Breemen C. (1983) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23**, 373.
- Cauvin C., Lukerman S., Cameron J., Hwang O. & van Breemen C. (1985) *Circ. Res.* **56**, 822.
- Chang K.J. & Triggle D.J. (1973) *J. Theoret. Biol.* **40**, 125.
- Christoffersen R.E. (1976) *Quantum Mechanics of Molecular Conformation*, John Wiley, London.
- Chvapil M., Zahradnik R. & Cmuchalova B. (1962) *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **135**, 330.
- Clare B.W. (1990) *J. Med. Chem.* **33**, 687.
- Coburn R.A., Wierzba M., Suto M.J., Solo A.J., Triggle A.M. & Triggle, D.J. (1988) *J. Med. Chem.* **31**, 2103.
- Cocchi M., Menziani M.C., Rastelli G. & de Benedetti P.G. (1990) *Quant. Struct.-Act. Relat.* **9**, 340.
- de Benedetti P.G., Iarossi D., Frassinetti C., Menziani M.C., Cocchi M. & Cennamo C. (1989) *Prog. Clin. Biol. Res.* **291**, 345.
- de Compadre R.L.L., Debnath A.K., Shusterman A.J. & Hansch C. (1990) *Environ. Mol. Mutagen.* **15**, 44.
- de Compadre R.L.L., Shusterman A.J. & Hansch C. (1988) *Int. J. Quant. Chem.* **34**, 91.
- Dearden J.C., Gregg C.N. & Nicholson R.M. (1989) *Prog. Clin. Biol. Res.* **291**, 353.
- Debnath A.K., de Compadre R.L.L., Debnath G., Shusterman A.J. & Hansch C. (1991) *J. Med. Chem.* **34**, 786.
- den Kelder G.M.D.-O., Haaksma E.E.J., van der Schaar M.W.G., Veenstra D.M.J., Timmerman H., Cereda E. & Dubini E. (1988) *Quant. Struct.-Act. Relat.* **7**, 60.
- Dewar M.J.S. (1971) *Angew. Chem. Internat. Edit.* **10**, 761.

- Dewar M.J.S. & Holder A.J. (1990) *Organometallics* **9**, 508.
- Dewar M.J.S. & Jie C. (1987) *Organometallics* **6**, 1486.
- Dewar M.J.S. & Jie C. (1989a) *J. Mol. Struct. (Theochem)* **137**, 1.
- Dewar M.J.S. & Jie C. (1989b) *Organometallics* **8**, 1544.
- Dewar M.J.S. & Stewart J.J.P. (1984) *Chem. Phys. Lett.* **111**, 416.
- Dewar M.J.S. & Thiel W. (1977) *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 4899.
- Dewar M.J.S. & Yuan Y-C. (1990) *Inorg. Chem.* **29**, 3881.
- Dewar M.J.S. & Zoebisch E.G. (1988) *J. Mol. Struct. (Theochem)* **180**, 1.
- Dewar M.J.S., Zoebisch E.G., Healy E.F. & Stewart J.J.P. (1985) *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 3902.
- Dewar M.J.S., Jie C. & Zoebisch E.G. (1988) *Organometallics* **7**, 513.
- Dewar M.J.S., Healy E.F., Kuhn D.R. & Holder A.J. (1991) *Organometallics* **10**, 431.
- Doucette W.J. & Andren A.W. (1987) *Environ. Sci. Technol.* **21**, 821.
- Draper N.R. & Smith H. (1981) *Applied Regression Analysis*, 2 Ed., Wiley, New York.
- Dunn III W.J., Block J.H. & Pearlman R.S. (1986) *Partition Coefficient: Determination and Estimation*, Pergamon Press, New York.
- Dunn III W.J., Koehler M.G. & Grigoras S. (1987) *J. Med. Chem.* **30**, 1121.
- Estiu G.L., Cachau R.E., Castro E.A. & Blanch L.E.B. (1990) *Farmaco* **45**, 889.
- Farnell L., Richards W.G. & Ganellin C.R. (1975) *J. Med. Chem.* **18**, 662.
- Ferenczy G.G., Reynolds C.A. & Richards W.G. (1990) *J. Comp. Chem.* **11**, 159.
- Ferguson J. (1939) *Proc. Royal Soc. London, Ser. B*, **127**, 387.
- Fleckenstein A. (1977) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **17**, 149.
- Fleckenstein A. (1983) *Circ. Res.* **52** (suppl. I), 3.
- Ford M.G. & Livingstone D.J. (1990) *Quant. Struct.-Act. Relat.* **9**, 107.
- Fosset M.E., Jaimovich E., Delpont E. & Lazdunski M. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 6086.
- Fossheim R., Svarteng K., Mostad A., Romming C., Shefter E. & Triggle, D.J. (1982) *J. Med. Chem.* **25**, 126.
- Fossheim R., Joslyn A., Solo A.J., Luchowski E., Rutledge A. & Triggle D.J. (1988) *J. Med. Chem.* **31**, 300.

- Frecher V. & Miertus S. (1988) *Neoplasma* 35, 525.
- Free S.M.Jr & Wilson J.M. (1964) *J. Med. Chem.* 7, 395.
- Fujita T. (1990) *Comprehensive Medicinal Chemistry. The Rational Design, Mechanistic Study and Therapeutic Application of Chemical Compounds*, Cap. 21.1, Ed. C. Hansch, P.G. Sammes & J.B. Taylor, Pergamon Press, New York.
- Fujita T. & Ban T. (1971) *J. Med. Chem.* 14, 148.
- Fujita T., Iwasa J. & Hansch C. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* 86, 5175.
- Fukui K. (1970) *Theory of Orientation and Selection*, Springer Verlag, Heidelberg.
- Fukui K. (1971) *Acc. Chem. Res.* 4, 57.
- Fukui K., Yonezawa T. & Shingu H. (1952) *J. Chem. Phys.* 20, 722.
- Fukui K., Yonezawa T., Nagata C. & Shingu H. (1954) *J. Chem. Phys.* 22, 1433.
- Fukui K., Yonezawa T. & Nagata C. (1957) *J. Chem. Phys.* 27, 1247.
- Gaudio A.C., Takahata Y. & Korolkovas A. (1992) *Resumos da 15^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Caxambu, QB-06.*
- Gill E.W. (1965) *Progr. Med. Chem.* 4, 39.
- Glossmann H. & Striessnig J. (1990) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 114, 1.
- Glossmann H. & Ferry D.R. (1933) *Naunyn Schimiedebergs Arch. Pharmacol.* 323, 279.
- Golas C.L., Prokipeak R.D., Okey A.B., Manchester D.K., Safe S. & Fujita T. (1990) *Biochem. Pharmacol.* 40, 737.
- Gombar V.K. & Eslein K. (1990) *Quant. Struct.-Act. Relat.* 9, 321.
- Guy H.R. & Conti F. (1990) *Trend. Neurosci.* 13, 201.
- Guyton A.C. (1989) *Tratado de Fisiologia Médica*, Guanabara, Rio de Janeiro.
- Hagiwara S. & Byerly L. (1981) *Ann. Rev. Neurosci.* 4, 69.
- Hammett L.P. (1937) *J. Am. Chem. Soc.* 59, 96.
- Hammett L.P. (1940) *Physical Organic Chemistry*, McGraw-Hill, New York.
- Hammett L.P. (1970) *Physical Organic Chemistry: Reaction Rates, Equilibria, and Mechanisms*, 2nd Ed., McGraw-Hill, New York.
- Hansch C. (1966) *Ann. Rep. Med. Chem.* 34, 347.

- Hansch C. (1969) *Accts. Chem. Res.* 2, 232.
- Hansch C. & Clayton J.M. (1973) *J. Pharm. Sci.* 62, 1.
- Hansch C. & Dunn, III W.J. (1972) *J. Pharm. Sci.* 61, 1.
- Hansch C. & Fujita T. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1616.
- Hansch C. & Lien E.J. (1968) *Biochem. Pharmacol.* 17, 709.
- Hansch C. & Yoshimoto M. (1974) *J. Med. Chem.* 17, 1160.
- Hansen O.R. (1962) *Acta Chem. Scand.* 16, 1593.
- Hermann R.B. (1972) *J. Phys. Chem.* 76, 2754.
- Higo J. & Go N. (1989) *J. Comp. Chem.* 10, 376.
- Hof P.R., Ruegg U.T., Hof A. & Vogel A. (1985) *J. Cardivasc. Pharmacol.* 7, 689.
- Hosey M.M. & Lazdunski M.J. (1988) *Membrane Biol.* 104, 81.
- Iczkowski R.P. & Margrave J.L. (1961) *J. Am. Chem. Soc.* 83, 3547.
- Ishida T., In Y., Ohishi H., Yamamoto D., Inoue M., Tanaka C., Ueno Y., Ohmomo Y., Kanda N., Tanaka A. & Tanimoto T. (1988) *Mol. Pharm.* 34, 377.
- Itokawa H., Totsuka N., Nakahara K., Maezuru M., Takeya K., Kondo M., Inamatsu M. & Morita H. (1989) *Chem. Pharm. Bull.* 37, 1619.
- Janis R.A. & Triggle D.J. (1983) *J. Med. Chem.* 26, 775.
- Janis R.A., Silver P.J. & Triggle D.J. (1987) *Adv. Drug Res.* 16, 309.
- Jurs P.C., Stouch T.R., Czerwinski M. & Narvaez J.N. (1985) *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 25, 296.
- Karfunkel H.R. & Eyraud V. (1989) *J. Comp. Chem.* 10, 628.
- Kataoka T., Hatta T. & Kai H. (1988) *J. Pesticide Sci.* 13, 7.
- Katritzky A.R. & Topsom R.D. (1971) *J. Chem. Educ.* 48, 427.
- Kier L.B. (1971) *Molecular Orbital Theory in Drug Research*, Academic Press, New York.
- Klopman G. (1968) *J. Am. Chem. Soc.* 90, 223.
- Kobayashi T., Masutani H., Nishimura K. & Fujita T. (1989) *Pest. Biochem. Physiol.* 35, 58.
- Koehler M.G., Hopfinger A.J. & Seidel J.K. (1988) *Theochem* 179, 319.
- Kopecký J., Bocek K. & Vlachová D. (1965) *Nature* 207, 981.

- Korolkovas A. (1974) *Fundamentos de Farmacologia Molecular*, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Korolkovas A. (1991) *Rev. Bras. Med.* 48, 607.
- Korolkovas A. & Burckhalter J.H. (1988) *Química Farmacêutica*, Guanabara, Rio de Janeiro.
- Korolkovas A., Araújo M.B. & Lima F. (1991) *Rev. Bras. Med.* 48, 597 e referências contidas neste artigo.
- Koopmans T. (1933) *Physica* 1, 104.
- Kubinyi H. (1976) *J. Med. Chem.* 19, 587.
- Kubinyi H. (1979) *Progr. Drug Res.* 23, 97.
- Kubinyi H. (1988) *Quant. Struct.-Act. Relat.* 7, 121.
- Kubinyi H. (1990) *Comprehensive Medicinal Chemistry. The Rational Design, Mechanistic Study and Therapeutic Application of Chemical Compounds*, Cap. 21.3, Editado por C. Hansch, P.G. Sammes & J.B. Taylor, Pergamon Press, New York.
- Kubinyi H. & Kehrhahn O.-H. (1976) *J. Med. Chem.* 19, 578.
- Kubinyi H. & Klebe G. (1987) *1^{er} Congreso Hispano-Portugués de Química Terapéutica*, Santiago de Compostela.
- Kurtz H.A., Stewart J.J.P. & Dieter K.M. (1990) *J. Comp. Chem.* 11, 82.
- Langer G.A. (1984) *J. Mol. Cell. Cardiol.* 16, 147.
- Langs D.A., Strong P.D. & Triggle D.J. (1987) *Acta Cryst.* 43, 707.
- Leeson P.D., Emmett J.C., Shah V.P., Showell G.A., Novelli R., Prain H.D., Benson M.G., Ellis D., Pearce N.J. & Underwood A.H. (1989) *J. Med. Chem.* 32, 320.
- Leo A., Hansch C. & Elkins D. (1971) *Chem. Rev.* 71, 525.
- Lewis D.F.V. (1989) *J. Comp. Chem.* 10, 145.
- Lewis D.F.V., Arendt J. & English J. (1990) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252, 370.
- Lindholm E. & Asbrink L. (1985) *Molecular Orbital and their Energies, Studied by the Semiempirical HAM Method*, Springer Verlag, Berlin.
- Loev B., Goodman M.M., Snader K.M., Tedeschi R. & Macko E. (1974) *J. Med. Chem.* 17, 956.

- Lowe J.P. (1978) *Quantum Chemistry*, Academic Press, New York.
- Maelicke A. (1988) *Trend. Biochem. Sci.* **13**, 199.
- Mahmoudian M. & Richards W.G. (1986) *J. Pharm. Pharmacol.* **38**, 272.
- Mahmoudian M. & Richards W.G. (1990) *J. Sci. I. R. Iran* **1**, 261.
- Martin Y.C. (1978) *Quantitative Drug Design: A Critical Introduction*, Marcel Dekker, New York.
- McGlynn S.P., Vanquickenborne L.G., Kinoshita M. & Carrol D.G. (1972) *Introduction to Applied Quantum Chemistry*, Holt, Rinehart & Winston, New York.
- Mekenyay O., Bonchev D., Rouvray D.H., Peitchev D. & Bangov I. (1991) *Eur. J. Med. Chem.* **26**, 305.
- Menziani M.C., de Benedetti P.G., Gago F. & Richards W.G. (1989) *J. Med. Chem.* **32**, 951.
- Meyer H. (1899) *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **42**, 109.
- Miller R.J. (1987) *Science* **235**, 46.
- Mitchell T.J. & Webb G.A. (1991) *J. Mol. Struct. (Theochem)* **227**, 327.
- Moyer S.R. & Jurs P.C. (1990) *Quant. Struct.-Act. Relat.* **9**, 333.
- Mulliken R.S. (1934) *J. Chem. Phys.* **2**, 782.
- Mulliken R.S. (1955) *J. Chem. Phys.* **23**, 1833, 1841, 2338, 2343.
- Neely W.B. (1973) *Chemtech* **3**, 573.
- Nishimura K. & Fujita T. (1989) *Pestic. Biochem. Physiol.* **33**, 158.
- Nishimura K., Kitahaba T., Ikemoto Y. & Fujita T. (1988) *Pestic. Biochem. Physiol.* **31**, 155.
- Nordlander J.E., Bond IV A.F. & Bader M. (1985) *Comput. & Chem.* **9**, 209.
- Norrington F.E., Hyde R.M., Williams S.G. & Wootton R (1975) *J. Med. Chem.* **18**, 604.
- Nowycky M.C., Fox A.P. & Tsien R.W. (1985) *Nature* **316**, 440.
- Ohtaka H., Yoshida K. & Suzuki K. (1988a) *Chem. Pharmacol. Bull.* **36**, 3955.
- Ohtaka H., Yoshida K., Suzuki K., Shimohara K., Tajima S. & Ito K. (1988b) *Chem. Pharmacol. Bull.* **36**, 4825.
- Opie L.H., Thandroyen F.T., Muller C.A. & Hamm C.W. (1984) *Calcium Antagonists and Cardiovascular Disease*, Raven Press, New York.

- Orozco M. & Luque F.J. (1990) *J. Comp. Chem.* **11**, 909.
- Orozco M., Canela E.I., Lluís C., Mallol J. & Franco R. (1989) *Prog. Clin. Biol. Res.* **291**, 365.
- Overton E. (1897) *Z. Phys. Chem., Stoechiom. Verwandtschaftsl.* **22**, 189.
- Overton E. (1899) *Vierteljahrsschr. Naturforsch. Ges. Zuerich.* **44**, 88.
- Overton E. (1901) *Studien über die Narcose*, G. Fischer, Jena.
- Paar R.G. & Pearson R.G. (1983) *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 7512.
- Parr R.G. & Yang W. (1989) *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, Oxford.
- Pascual-Ahuir J.L. & Silla E. (1990) *J. Comp. Chem.* **11**, 1047.
- Pauling L. (1960) *The Nature of Chemical Bond*, p. 260, Cornell University Press, New York.
- Pearlman R.S. (1931) *Quantum Chem. Progr. Exch. Bull.* **1**, 15.
- Pearson R.G. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3533.
- Pearson R.G. (1966) *Science* **151**, 172.
- Pearson R.G. (1971) *Acc. Chem. Res.* **4**, 152.
- Phillips A.P. (1949) *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 4003.
- Phillipson K.D., Bers D.M., Nishimoto A.Y. & Langer G.A. (1980) *Am. J. Physiol.* **238**, H373.
- Pople J.A. & Beveridge D.L. (1970) *Approximate Molecular Orbital Theory*, McGraw-Hill, New York.
- Pritchard H.O. & Sumner F.H. (1956) *Proc. Roy. Soc. London, Ser. A*, **235**, 136.
- Purcell W.P. & Testa B. (1977) *Biological Activity and Chemical Structure* p.269, Elsevier Sci. Publ. Co., Amsterdam.
- Ramos M.N. & Neto B.B. (1990) *J. Comp. Chem.* **11**, 569.
- Redl G., Cramer R.D. & Berkoff C.E. (1974) *Chem. Soc. Rev.* **3**, 273.
- Rekker R.F. (1977) *Biological Activity and Chemical Structure*, Elsevier Publishing Co., Amsterdam.
- Reuter H. (1983) *Nature* **301**, 569.

- Richards W.G. (1983) *Quantum Pharmacology*, 2nd Ed., Butterworths, London.
- Richmond T. (1984) *J. Mol. Biol.* 178, 63.
- Ritchie C.D. & Sager W.F. (1964) *Progr. Phys. Org. Chem.* 2, 323.
- Rodenkirchen R., Bayer R., Steiner R., Bossert F., Meyer H. & Möller E. (1979) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 310, 69.
- Saccomano N.A. & Ganong A.H. (1991) *Rep. Med. Chem.* 26, 33.
- Salem L. (1969) *Chem. Brit.*, 449.
- Santos L., Cornago M.P., Izquierdo M.C., Lopez-Zumel M.C. & Smeyers Y.G. (1989) *Quant. Struct.-Act. Relat.* 8, 214.
- Schlöbmann G. (1990) *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 417.
- Schwartz A., McKenna E. & Vaghy P.L. (1988) *Am. J. Cardiol.* 62, 3G.
- Scrocco E. & Tomasi J. (1973) *Topics in Curr. Chem.* 42, 381.
- Seidel W., Meyer H., Bora L., Kazda S. & Dompert W. (1985) *QSAR Strategies Des. Bioact. Comp., Proc. Eur. Symp. Quant. Struct.-Act. Relat.*, 5th, Ed. J.K. Seidel, VCH Weinheim, p. 366.
- Selwood D.L., Livingstone D.J., Comley J.C.W., O'Dowd A.B., Hudson A.T., Jackson P., Jandu K.S., Rose V.S. & Stables J.N. (1990) *J. Med. Chem.* 33, 136.
- Shusterman A.J., Debnath A.K., Hansch C., Horn G.W., Fronkzek F.R., Greene A.C. & Watkins S.F. (1989) *Mol. Pharmacol.* 36, 939.
- Singer J.A. & Purcell W.P. (1967) *J. Med. Chem.* 10, 1000.
- Silipo C. & Vittoria A. (1990) *Comprehensive Medicinal Chemistry. The Rational Design, Mechanistic Study and Therapeutic Application of Chemical Compounds*, Cap. 13.4, Ed. por C. Hansch, P.G. Sammes & J.B. Taylor, Pergamon Press, New York.
- Spanggord R.J., Myers C.J., LeValley S.E., Green C.E. & Tyson C.A. (1990) *Chem. Res. Toxicol.* 3, 551.
- Stewart J.J.P. (1989) *J. Comp. Chem.* 10, 221.
- Stewart J.J.P. (1990) *J. Comp.-Aid. Mol. Des.* 4, 1.
- Stewart J.J.P. (1991) *J. Comp. Chem.* 12, 320.

- Szabo A. & Ostlund N.S. (1982) *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*, MacMillan Publishing Co., New York.
- Taft, Jr R.W. (1952) *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 3120.
- Taft, Jr R.W. (1956) *Steric Effects in Organic Chemistry*, Wiley, New York.
- Takahashi J., Kirino O., Takayama C., Nakamura S., Noguchi H., Kato T. & Kamoshita K. (1988) *J. Pesticide Sci.* **13**, 587.
- Tamazawa K., Arima H., Kojima T., Isomura Y., Okada M., Fujita S., Furuya T., Takenaka T., Inagaki O. & Terai M. (1986) *J. Med. Chem.* **29**, 2504.
- Tanabe T., Takeshima H., Mikami A., Flockerzi V., Takahashi H., Kangawa K., Kojima M., Matsuo H., Hirose T. & Numa S. (1987) *Nature* **328**, 313.
- Tanford C. (1973) *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, Wiley-Interscience, New York.
- Taskinen J., Vidgren J., Ovaska M., Blöckström R., Pippuri A. & Nissinen E. (1989) *Quant. Struct.-Act. Relat.* **8**, 210.
- Taylor E.W., Nikam S.S., Lambert G., Martin A.R. & Nelson D.L. (1988) *Mol. Pharmacol.* **34**, 42.
- Taylor P.J. (1990) *Comprehensive Medicinal Chemistry. The Rational Design, Mechanistic Study and Therapeutic Application of Chemical Compounds*, Cap. 18.6, Ed. por C. Hansch, P.G. Sammes & J.B. Taylor, Pergamon Press, New York.
- Tempel B.L., Papazian D.M., Schwartz T.L., Jan Y.N. & Jan L.Y. (1987) *Science* **237**, 770.
- Topliss J.G. & Costello R.J. (1972) *J. Med. Chem.* **15**, 1066.
- Triggle D.J. (1990) *Comprehensive Medicinal Chemistry. The Rational Design, Mechanistic Study and Therapeutic Application of Chemical Compounds*, Cap. 14.1, Ed. por C. Hansch, P.G. Sammes & J.B. Taylor, Pergamon Press, New York.
- Triggle D.J. & Langs D.A. (1989) *Ann. Rep. Med. Chem.* **25**, 225.
- Triggle A.M., Shefter E. & Triggle D.J. (1980) *J. Med. Chem.* **23**, 1442.
- Tute M.S. (1971) *Adv. Drug Res.* **6**, 1.
- Unger S.H. & Hansch C. (1973) *J. Med. Chem.* **16**, 745.
- Valvani S.C., Yalkowsky S.H. & Amidon G.L. (1976) *J. Phys. Chem.* **80**, 829. van Amsterdam F.T. & Zaagsma J. (1988) *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **337**, 213.

- Vanhoutte P.M. (1987) *Am. J. Cardiol.* 59, 3A.
- Wang P.-H., Keck J.G., Lien E.J. & Lai M.M.C. (1990) *J. Med. Chem.* 33, 608.
- Warne M.St.J., Connell D.W., Hawker D.W. & Schlürmann G. (1989) *Ecotoxicol. Environ. Safety* 17, 133.
- Wei X.Y., Luchowski E.M., Rutledge A., Su C.M. & Triggle D.J. (1986) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239, 144.
- Wilson L.Y. & Famini G.R. (1991) *J. Med. Chem.* 34, 1668.
- Woodward R.B. & Hoffmann R. (1970) *The Conservation of Orbital Symmetry*, Verlag Chemie, Weinheim.
- Woodward R.B. & Hoffmann R. (1969) *Angew. Chem. Internat. Edit.* 8, 781.
- Wu J.-A., Gu K.J., Qian L.-G. & Ji R.-Y. (1990) *West-China Pharmacol. Sci.* 5, 125.
- Yalkowsky S.H. & Valvani S.C. (1976) *J. Med. Chem.* 19, 727.
- Yuan C.J., Hopfinger A.J. & Johnson M.E. (1989) *J. Theor. Biol.* 141, 41.
- Zahradnik R. & Chvapil M. (1960) *Experientia* 16, 511.
- Zahradnik R. (1962a) *Experientia* 18, 534.
- Zahradnik R. (1962b) *Arch. int. Pharmacodyn. Ther.* 125, 311.