

ESTUDOS DE QSAR BASEADOS EM DADOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA OBTIDOS POR MICROCALORIMETRIA. III INTERAÇÃO DE m-ALCOXIFENÓIS E p-HIDROXIBENZOATOS DE ALQUILA COM *ESCHERICHIA COLI*

P. L. O. Volpe

Instituto de Química - UNICAMP - 13081-970 - Campinas - SP

C. A. Montanari

Departamento de Química - ICEX - UFMG - 31270-901 - Belo Horizonte - MG

Recebido em 28/7/95; aceito em 30/11/96

QSAR BASED ON BIOLOGICAL MICROCALORIMETRY. III INTERACTION OF m-ALCOXY-PHENOLS AND p-HYDROXYBENZOATES WITH *ESCHERICHIA COLI*. QSAR studies based on flow microcalorimetric bioassay data for interaction of homologous series of m-alkoxyphenols and p-hydroxybenzoates with *E. coli* cells were carried out applying factorial design. Results for both series showed a linear relationship between $\log(\text{dose})_{\text{max}}$ and $\log P_{o/w}$. Analysis of these data allows the identification of contributions toward the derived bioactivity from the parent structures (the molecule minus n-CH₂ groups present in the side-chain) and the lipophilic groups, CH₂. These results are discussed with respect to drug quantitative structure-relationship.

Keywords: biological microcalorimetry; QSAR; biological response; homologous series.

INTRODUÇÃO

Microcalorimetria é uma técnica altamente sensível e não destrutiva, a qual é, em princípio, capaz de investigar qualquer processo ou reação¹. Esta generalidade, a qual em muitos casos pode ser compreendida como uma limitação (desde que todos os processos físicos e químicos ocasionam variações na entalpia) pode ser também vista como uma vantagem. Por este motivo, a microcalorimetria é uma técnica útil, apropriada para estudos de sistemas heterogêneos complexos. Além disso, como todo sistema biológico tem uma especificidade inerente, conferida através dos processos enzimáticos os quais coletivamente formam o metabolismo total, então a aplicação da microcalorimetria pode oferecer um discernimento do metabolismo através da observação das conseqüências térmicas deste. O sinal do microcalorímetro (dq/dt versus tempo, ou curva potência-tempo) proporciona um registro contínuo do progresso e processo do metabolismo, o qual, em contraste com muitos processos clássicos, responde somente à atividade metabólica de microrganismos ativos presentes e assim apresenta detalhes do processo dinâmico e complexo do metabolismo. Esta capacidade de acompanhar os detalhes do metabolismo tem, naturalmente, sido estendida para a identificação de organismos¹, interações drogas-células² e testes de atividade biológica^{1,3}. Qualquer substância que possa modificar o processo metabólico envolvido no crescimento ou respiração de microrganismos mudará a curva dq/dt versus tempo obtida do calorímetro o que torna possível estudar por um método direto a atividade biológica de modo qualitativo e quantitativo. A investigação quantitativa da atividade biológica de drogas numa cultura de microrganismos pode resultar na relação linear $\log(\text{dose})$ versus resposta do calorímetro ou resposta biológica (RB).

A microcalorimetria biológica (MB) tem sido utilizada como método moderno de ensaio microbiológico e determinação da RB como técnica substitutiva dos métodos clássicos como turbidimétrico, difusão em ágar, respirométrico e diluição em série^{4,5,6}. A elevada reprodutibilidade e alta precisão apresentadas pela MB tem possibilitado acurácia na diferenciação da interação de substâncias congêneras que dificilmente seria obtida pelos métodos clássicos.

Por outro lado, a proposta atual é que a MB também seja utilizada em estudos de QSAR (Relações Quantitativas de Ati-

vidade-Estrutura), como ferramenta capaz de distinguir, por exemplo, a interação sistema químico-sistema microbiológico em esquema grupo-aditivo de séries homólogas onde, para uma série pequena, as potências relativas são semelhantes⁷.

A base da QSAR é geralmente mantida quando fenômenos de transporte são importantes como sendo a conexão entre o coeficiente de partição (P) para os membros de uma série homóloga e a RB, mas muito trabalho tem sido feito para o estabelecimento da contribuição de grupos ou substituintes para o cálculo de valores de $P^{8,9,10}$.

Tais contribuições de grupos, em princípio, permitem a predição de valores de P para outros membros das séries e, por extensão, de compostos fora das séries. Desta maneira, a aditividade de grupos é vista como um importante aspecto na aplicação prática dos dados de QSAR.

O modelo mais simples para a identificação da correlação atividade-estrutura envolvendo RB é o de Free-Wilson¹¹. Este modelo atribui uma constante para cada substituinte da série homóloga:

$$\text{Potência} = \sum (\text{constantes substituintes}) + X$$

onde X é uma constante designando a medida global da atividade biológica para a série toda. Este modelo formou a base de diversos outros modelos, mas a maior deficiência dos modelos mais recentes de aditividade quando utilizados sozinhos, é que as constantes substituintes obtidas não tem significado físico-químico direto e conseqüentemente torna-se extremamente difícil explicar racionalmente as exigências para substituintes melhores. Uma alternativa elegante envolve a utilização de um modelo combinado, Free-Wilson - Análise de Hansch:

$$\text{Potência} = \sum a_i + \sum k_j \phi_j + C$$

onde a_i representa a contribuição do grupo substituinte e ϕ_j os parâmetros físico-químicos¹².

EXPERIMENTAL

Os derivados do resorcinol, metoxi e etoxi foram comprados da Eastman Kodak Co. Ltd. e foram destilados sob vácuo antes de utilizados. Os outros monoalquil éteres do resorcinol foram preparados segundo o procedimento descrito por Beezer e

colaboradores¹³. A pureza de todos os monoésteres foi analisada por GLC num cromatógrafo a gás Perkin-Elmer F-33 equipado com uma coluna de 1 m contendo 3% SE30 sobre Chromosorb W, 80-100 mesh (Temperatura do forno 110°C; temperatura do injetor/detector 150°C; gás de arraste N₂ (30 mL min⁻¹), mistura de hidrogênio (30 mL min⁻¹) e ar (300 mL min⁻¹) usada para o detector de ionização de chama). Espectroscopia NMR foi usada para confirmar a estrutura dos compostos.

p-Hidroxibenzoatos foram generosamente cedidos pela NIPA Chemicals com certificado de pureza 99,9% e utilizados sem tratamento prévio.

Suspensão de *Escherichia coli* NCTC 10418 (1.10⁸ células mL⁻¹) foi preparada e estocada em ampolas de polipropileno em N₂ líquido segundo procedimento descrito em¹⁴.

A potência ou resposta biológica (RB) dos compostos das duas séries homólogas frente ao metabolismo de respiração de *E. coli* foi determinada utilizando um microcalorímetro isotérmico de condução LKB-10700, mantido a 36°C equipado com uma cela de fluxo contínuo e detectores termopilhas¹⁵. O meio de cultura foi bombeado para dentro da cela de fluxo (35 mLh⁻¹) com o auxílio de uma bomba peristáltica LKB-2132.

A composição do meio de cultura usada para a respiração da *E. coli* foi (gL⁻¹): glicose 0,5; K₂HPO₄, 8,75; K₂PO₄, 3,75; pH=7. Sem a adição dos compostos bioativos, este meio foi definido como preparação controle. A inoculação do microrganismo (500 µl da suspensão de células em 50 mL do meio de cultura) foi sempre feita imediatamente após o descongelamento da ampola por 3 minutos em um banho de água a 36°C, seguido por agitação durante 20 segundos.

Neste trabalho, estudos de QSAR foram feitos baseados nos dados microcalorimétricos da inibição das séries homólogas de m-alcoixifenóis e p-hidroxibenzoatos de alquila sobre a respiração da *Escherichia coli* pela aplicação do planejamento fatorial 2ⁿ, sendo a otimização do sistema sugerida através do planejamento D-ótimo^{17,18}.

Inicialmente, uma área de trabalho que contemple os descritores π , σ e MR foi definida¹⁸. A seguir, uma série de substituintes foi selecionada de tal forma a minimizar suas propriedades covariantes. Neste caso o método do "vizinho mais próximo" foi empregado¹⁷⁻¹⁸. Isso proporciona uma redução do número de substituintes. Esses são, então, testados no modelo QSAR descrito frente à potência das drogas, no nosso caso, representados pelas equações (1) e (2). Se a série planejada descrever o modelo apropriadamente os substituintes podem ser usados na otimização. Essa otimização é feita através da equação (3), a partir da qual novos substituintes são selecionados, também de forma a reduzir o seu número e propiciar a busca da melhor correlação quadrática (menor covariância) entre os descritores escolhidos. No nosso caso, os descritores escolhidos foram π e MR e são representados através das equações (3) e (4).

Os compostos m-alcoixifenóis e p-hidroxibenzoatos de alquila são reconhecidos bactericidas, sendo que os p-hidroxibenzoatos de alquila (parabenos), são largamente utilizados como preservativos em formulações cosméticas, farmacêuticas e alimentos¹⁹.

Foi também nossa intenção verificar se a RB pode ser fatorada em contribuições das partes lipofílica (grupos CH₂) e hidrofílica (composto matriz) da molécula. A designação de subunidades hidrofílicas e lipofílicas é idêntica àquela usada na análise termodinâmica da partição destes compostos entre água e solventes não aquosos e numa análise termodinâmica da equação de Collander²⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 exemplifica o termograma da respiração da *Escherichia coli* (curva controle) e o efeito da concentração (dose) da droga m-propoxifenol adicionada neste processo. As respostas biológicas (RB) foram obtidas dos termogramas como a altura na curva potência versus tempo em cada concentração

da droga em comparação com a altura da preparação controle (100% RB) de composição e concentração conhecidas.

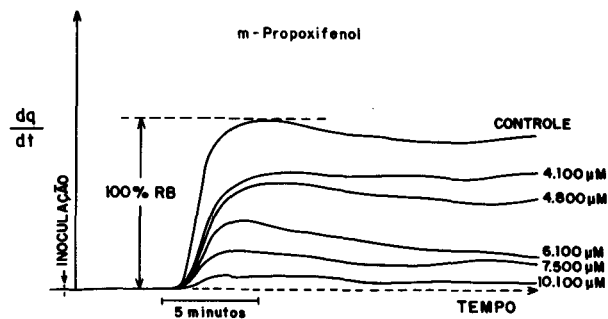


Figura 1. Termograma da respiração da *E. Coli* em glicose/ampão em diferentes concentrações de m-propoxifenol. Ref. (13).

A partir do estudo microcalorimétrico do efeito das séries homólogas dos compostos bioativos m-alcoixifenóis e p-hidroxibenzoatos de alquila com culturas de *E. coli*¹⁶ pode-se demonstrar a existência de um comportamento linear entre log(dose) e a resposta do calorímetro (ver gráficos das figuras 2 e 3). Estes gráficos, quando extrapolados para resposta zero (RB=0) permitem a definição de log(dose)_{max}, isto é, o logaritmo da concentração máxima da droga adicionada a uma cultura de células a qual não deve produzir resposta no calorímetro. As tabelas 1 e 2 e as Figuras 2 e 3 mostram os dados calorimétricos obtidos dos termogramas de interação das séries homólogas dos compostos m-alcoixifenóis e p-hidroxibenzoatos de alquila com as células de *E. coli* juntamente com os coeficientes de correlação obtidos dos gráficos de RB versus log(dose).

A interação de m-alcoixifenóis e p-hidroxibenzoatos de alquila homólogos (grupos CH₂)_nCH₃, N = n+1 com *Escherichia coli* foi estudada e resultou em um coeficiente de correlação $r > 0,982$, n = 5 para log dose versus RB, considerados separadamente para ambas as séries. Foi possível ilustrar a correlação entre log(dose)_{max} e o coeficiente de partição (Log P_{o/w}) para as drogas estudadas. Os valores de log P para as substâncias matrizes foram obtidos da literatura através da ref. 8. Os valores correspondentes aos demais derivados da série homóloga foram obtidos pela adição da constante lipofílica, π , devido ao grupo CH₂. A correlação obtida para os m-alcoixifenóis mostra que a resposta farmacológica experimental é sensível à transferência do soluto da água para o solvente lipóide:

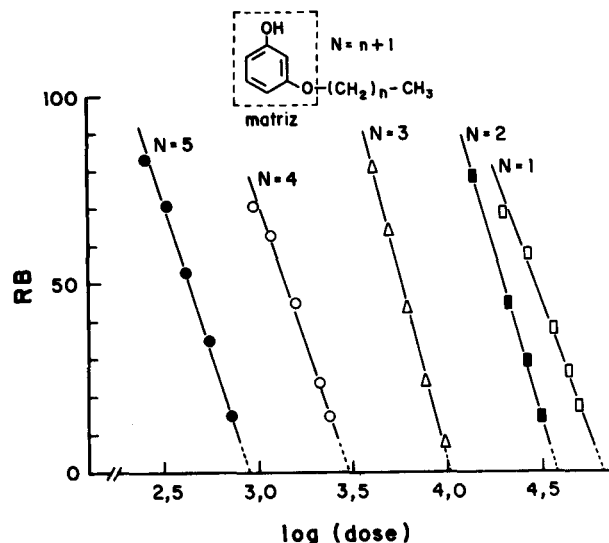


Figura 2. RB versus log(dose) para a série homóloga m-alcoixifenóis.

$$RB = -0,93(\pm 0,33)\log P + 2,86(\pm 0,91)$$

(n = 5; r = 0,982; s = 0,177; F = 80,36)

(1)

Para os p-hidroxibenzoatos de alquila a seguinte correlação foi encontrada:

$$RB = -0,61(\pm 0,15)\log P + 1,87(\pm 0,47)$$

(2)

(n = 5; r = 0,991; s = 0,081; F = 173,53)

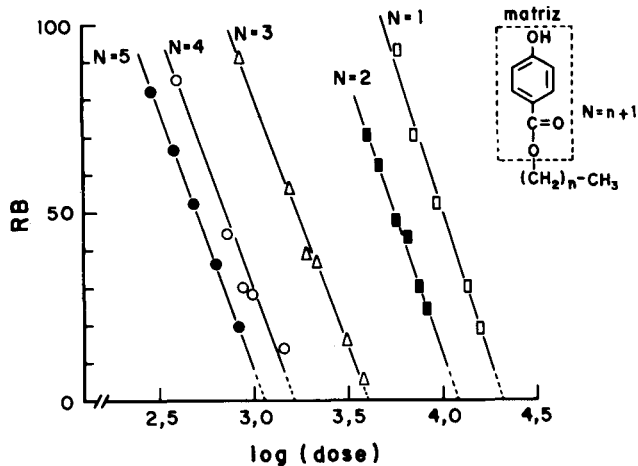


Figura 3. RB versus $\log(\text{dose})$ para a série homóloga p-hidroxibenzoatos de alquila.

O sinal negativo em ambas as equações implica em aumento da potência com o aumento da partição.

É bem conhecido que a lipofilia pode apresentar um caráter parabólico. Embora os dados ainda sejam insuficientes, a análise de regressão mostrou que a introdução do quinto grupo metila esboça um pequeno desvio da linearidade e os coeficientes de correlação são $r = 0,998$ e $0,992$, respectivamente.

A correlação observada entre $\log(\text{dose})_{\text{max}}$ e $\log P_{o/w}$ (onde $P_{o/w}$ é o coeficiente de partição para a distribuição da droga entre água e octanol) para as duas séries homólogas estudadas indica que a partição no octanol mimetiza a partição dentro da membrana lipóide da bactéria. Esta observação indica que para a interação destes compostos com as células de microrganismos é suficiente considerar o microrganismo simplesmente como um solvente lipóide para dentro do qual a droga particiona.

Uma análise retrospectiva, através da aplicação do planejamento fatorial- 2^n , para as séries estudadas, coloca todos os derivados com a mesma ordem de potência experimental e

Tabela 1. Valores de RB, $\log(\text{dose})$ e parâmetros de regressão para a interação *E. coli* versus m-alcóxifenóis.

Composto	Dose (μM)	Log(dose)	RB	Coefficiente correlação	RB=0 $\log(\text{dose})_{\text{max}}$
1	49.700	4,70	18	-0,9956	4,83
	43.600	4,64	27		
	36.400	4,56	38		
	26.100	4,42	58		
	19.500	4,29	69		
2	32.200	4,51	15	-0,9612	4,58
	26.600	4,43	30		
	21.100	4,32	45		
	13.700	4,14	79		
3	10.100	4,00	8	-0,9963	4,03
	7.500	3,88	24		
	6.100	3,79	43		
	4.800	3,68	64		
	4.100	3,61	71		
4	2.420	3,38	15	-0,9965	3,48
	2.150	3,33	24		
	1.570	3,20	45		
	1.180	3,07	63		
5	950	2,98	71	-0,9981	2,96
	740	2,87	15		
	550	2,74	35		
	420	2,62	53		
	330	2,52	71		
	260	2,41	83		

Compostos: 1 m-metoxifenol; 2 m-etoxifenol; 3 m-propoxifenol; 4 m-butoxifenol; 5 m-pentoxifenol.

Tabela 2. Valores de RB, log(dose) e parâmetros de regressão para a interação *E. coli* versus p-hidroxibenzoatos de alquila.

Composto	Dose (µM)	Log(dose)	RB	Coefficiente correlação	RB=0 Log(dose) _{max}
1	15.800	4,20	19	-0,9981	4,32
	13.700	4,14	30		
	9.300	3,97	52		
	7.000	3,85	70		
	4.700	3,67	93		
2	8.400	3,92	24	-0,9916	4,08
	7.500	3,88	30		
	6.600	3,82	43		
	5.700	3,76	47		
	4.700	3,67	62		
	4.000	3,60	70		
3	3.800	3,58	5,2	-0,9957	3,60
	3.100	3,49	15		
	2.200	3,34	36		
	1.900	3,28	38		
	1.600	3,20	56		
	870	2,94	91		
4	1.450	3,16	14	-0,9831	3,21
	970	2,99	28		
	870	2,94	30		
	720	2,86	44		
	380	2,60	85		
5	810	2,91	19	-0,9996	3,06
	630	2,80	36		
	480	2,68	52		
	380	2,58	66		
	290	2,46	82		

Compostos: 1p-hidroxibenzoato de metila; 2 p-hidroxibenzoato de etila; 3 p-hidroxibenzoato de propila; 4 p-hidroxibenzoato de butila; 5 p-hidroxibenzoato de pentila.

calculada. A otimização do sistema é sugerida através do planejamento D-ótimo¹⁷.

Durante o processo de seleção e otimização de substituintes, cria-se um espaço de n-dimensões que é definido por todos os membros da série. Esse espaço de n-dimensões que é chamado de espaço de trabalho pode ser maximizado, ou seja o parâmetro, digamos lipofílico, pode ser otimizado de tal forma a descrever essa propriedade de uma forma mais adequada à potência farmacológica de interesse. Essa otimização é feita pela busca simples de valores paramétricos que potencializem o efeito desejado, por exemplo em um modelo linear $RB = a \log P + b$, e, então, novos membros podem ser trazidos ao espaço de trabalho. Essa maximização é feita, entretanto, com base no espaço de trabalho original que é, em síntese, sua base de dados. Dessa forma, evita-se extrapolações para fora do espaço de trabalho que, provavelmente, levariam a erros na predição da atividade biológica.

Para a predição da atividade de uma substância “desconhecida”, via QSAR, qualquer forma de parametrização (físico-

química ou estrutural) pode ser usada. A qualidade da predição não depende somente da qualidade da equação matemática mas também, ou muito mais, do grau de similaridade entre os membros da “série de treinamento” e do caso em teste.

A predição através de modelos lineares não permanece verdadeira “para sempre” para todos os valores do parâmetro lipofílico, por exemplo. Um composto muito lipofílico, sendo insolúvel, não seria descrito pelo modelo.

Hansch²¹ sugeriu duas formas de predição: (1) predição interpolativa dentro do espaço de trabalho do substituinte (SSS) e (2) predição extrapolativa fora do SSS. Por exemplo, se a “série de treinamento” usada para obter-se o modelo matemático contiver valores de log P variando de -2 até +2, então o espaço entre esses limites é SSS e fora desses limites é não-SSS. A predição interpolativa é, em geral, muito melhor sucedida do que a extrapolativa²².

Em nosso trabalho, o espaço de trabalho foi originalmente definido dentro da série homóloga já mencionada que serviu para a obtenção da equação 3,²³. A partir desse modelo, novos

membros foram trazidos e, alguns dados são listados na tabela 3¹⁸. Nessa tabela, π é a constante lipofílica determinada através de $\pi = \log PX - \log PH$, por analogia à constante do substituinte de Hammett,²⁴ onde PX representa a contribuição do substituinte para lipofilia da molécula e PH é determinado para a molécula não substituída. MR é a refatividade molar do substituinte e σ a constante eletrônica de Hammett. RB representa a potência calculada através do planejamento fatorial, de acordo com as variáveis independentes selecionadas.

A tabela 3 mostra que todos os membros da série original são descritos dentro do novo espaço de trabalho. Portanto, é razoável

assumir-se que todos os membros dessa nova série sejam otimizados, como mostrado na tabela 4 e abaixo explicitado.

Uma análise de regressão linear múltipla para a interação de *E. coli* com p-hidroxibenzoatos de alquila mostrou que para o parâmetro π a equação obtida é a seguinte: (compare estes coeficientes com aqueles da equação 2).

$$RB = -0,64(\pm 0,17)\pi + 0,99(\pm 0,29) \quad (3)$$

$$(n = 5; r = -0,990; s = 0,088; F = 150,31, r^2_{cv} = 0,943)$$

Através da utilização dos substituintes contidos na tabela 3,

Tabela 3. Valores de π , MR, σ e RB para alguns grupos substituintes¹⁸.

	Substituinte	π	MR	σ	RB
1.	(trans)-CHCHC ₆ H ₅	2,680	34,170	-0,070	-0,886
2.	C₅H₁₁	2,670	24,260	-0,160	-0,892
3.	CCC ₆ H ₅	2,650	33,210	0,160	0,904
4.	Cicloexila	2,510	26,690	-0,220	-0,992
5.	SC ₆ H ₅	2,320	34,290	0,020	-1,111
6.	C₄H₉	2,130	19,610	-0,160	-1,230
7.	CH ₂ C ₆ H ₅	2,010	30,010	-0,090	-1,306
8.	C(CH ₃) ₃ .	1,980	19,620	-0,200	-1,325
9.	C ₆ H ₅	1,960	25,360	-0,010	-1,337
10.	2,5-dimetil Pirrolila	1,950	31,150	0,380	-1,343
11.	3-Tienila	1,810	24,040	-0,020	-1,431
12.	CF ₂ CF ₃	1,680	9,230	0,520	-1,513
13.	CH ₂ OC ₆ H ₅	1,660	32,190	0,040	-1,525
14.	2-Tienila	1,610	24,040	0,050	-1,557
15.	SC ₃ H ₇	1,610	23,070	0,000	-1,557
16.	C₃H₇	1,550	14,960	-0,130	-1,594
17.	CH(CH ₃) ₂	1,530	14,960	-0,150	-1,607
18.	CH ₂ I	1,500	18,600	0,110	-1,625
19.	C=O(OC ₆ H ₅)	1,460	32,310	0,440	-1,651
20.	CHCHCOOC ₃ H ₇	1,400	31,860	0,030	-1,688
21.	C=O(C ₆ H ₅)	1,050	30,330	0,430	-1,908
22.	CHCHCOC ₃ H ₇	1,020	30,400	-0,010	-1,926
23.	C₂H₅	1,020	10,300	-0,150	-1,926
24.	1-pirrolila	0,950	21,850	0,370	-1,970
25.	CHCHCOC ₆ H ₅	0,950	40,250	0,050	-1,970
26.	OSO ₂ C ₆ H ₅	0,930	36,700	0,330	-1,983
27.	CF ₃	0,880	5,020	0,540	-2,014
28.	CHCHCOOC ₂ H ₅	0,860	27,210	0,030	-2,027
29.	CH ₂ OC ₄ H ₉	0,840	26,020	0,030	-2,039
30.	CHCH ₂	0,820	10,990	-0,020	-2,052
31.	CH ₂ Br	0,790	13,390	0,140	-2,071
32.	CH₃	0,560	5,650	-0,170	-2,215
33.	SO ₂ CF ₃	0,550	12,860	0,930	-2,221
34.	COC ₃ H ₇	0,530	20,480	0,500	-2,234

Tabela 4. Valores de π e MR obtidos pela otimização da eq. (3).

	Substituintes	π	MR
1.	CH ₃	0,56	5,65
2.	SOCH ₃	-1,58	13,70
3.	SO ₂ CH ₃	-1,63	13,49
4.	C ₂ H ₅	1,02	10,30
5.	SOC ₂ H ₅	-1,04	18,35
6.	C ₃ H ₇	1,55	14,96
7.	C ₄ H ₉	2,13	19,61
8.	C ₅ H ₁₁	2,67	24,26
9.	CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	2,66	34,65

foi derivada a tabela 4. Essa tabela contempla os descritores lipofílicos e de refratividade molar que podem ser usados como proposta para o estudo da separação de ambas as propriedades que os mesmos representam. π e MR foram definidos de acordo com a tabela 3.

A otimização da equação (3) levou aos dados de π e MR contidos na tabela 4.

A matriz de correlação quadrática mostra que essa série pode ser estudada:

	π	MR
π	1,00	
MR	0,534	1,00

O mesmo repete-se quando o descritor MR é considerado. Para a melhor equação, quando o parâmetro MR é utilizado, a equação obtida é:

$$RB = -0,73(\pm 0,23)MR + 1,07(\pm 0,37) \quad (4)$$

$$(n = 5; r = 0,986; s = 0,105; F = 104,06, r^2_{cv} = 0,913)$$

A otimização da equação (4) conduz aos dados de π e MR contidos na tabela 5.

A correlação quadrática da matriz é:

	π	MR
π	1,00	
MR	0,68	1,00

A otimização da equação usando o parâmetro MR parece apresentar maior número de componentes apesar dos coeficientes angulares serem semelhantes. Nesta série, entretanto, apenas um substituinte SOC₂H₅ não está identificado. É importante notar, portanto, que a série descrita pela equação (3) pode ser escolhida para validação do modelo.

A não identificação de SOC₂H₅ refere-se ao fato desse substituinte não estar descrito na tabela 5. Esta informação é valiosa do ponto de vista que a matriz de correlação quadrática decorrente do uso da equação (4) é pior do que aquela da equação (3). O fato corroborou com a escolha da série descrita na tabela 4.

Embora os estudos tenham sido iniciados usando uma série homóloga, a otimização dada pela equação (3) relaciona os novos substituintes dentro do espaço de trabalho $-1,63 \leq \pi \leq 2,67$ e elimina a intercorrelação $\pi \times MR$ (1,000) encontrada na série metila, etila, propila, butila, pentila²⁵.

Um gráfico de $\log(\text{dose})_{\max}$ versus número de carbono na cadeia lateral forneceu os coeficientes de correlação -0,9931 e -0,9877, os interceptos 5,428 e 4,671 e as inclinações -0,484 e

Tabela 5. Valores de π e MR obtidos pela otimização da eq. (4).

	Substituintes	π	MR
1.	SO ₂ F	0,05	8,65
2.	H	0,00	1,03
3.	CF ₃	0,88	5,02
4.	CH ₂ Br	0,79	13,39
5.	CH ₂ Cl	0,17	10,49
6.	CH ₃	0,56	5,65
7.	CH ₂ OH	-1,03	7,19
8.	SOCH ₃	-1,58	13,70
9.	SO ₂ CH ₃	-1,63	13,49
10.	COCF ₃	0,02	11,17
11.	CF ₂ CF ₃	1,68	9,23
12.	CHCH ₂	0,82	10,99
13.	COCH ₃	-0,55	11,18
14.	CONHCH ₃	-1,27	14,57
15.	C ₂ H ₅	1,02	10,30
16.	CH ₂ CH ₂ OH	-0,77	11,84
17.	Ciclopropila	1,14	13,53
18.	CH ₂ CHCH ₂	1,10	14,49
19.	CH ₂ COCH ₃	-0,69	15,06
20.	CH(CH ₃) ₂	1,53	14,96
21.	C ₃ H ₇	1,55	14,96
22.	2-Tienila	1,61	24,04
23.	3-Tienila	1,81	24,04
24.	C ₄ H ₉	2,13	19,61
25.	C ₅ H ₁₁	2,67	24,26
26.	C ₆ H ₅	1,96	25,36
27.	2,5-dimetil Pirrolila	1,95	31,15
28.	Cicloexila	2,51	26,69
29.	C=O(C ₆ H ₅)	1,05	30,33
30.	CH ₂ C ₆ H ₅	2,01	30,01
31.	CH ₂ OC ₆ H ₅	1,66	32,19
32.	2-Fenantrila	2,33	34,51
33.	2-Antrila	2,32	34,51
34.	C≡CC ₆ H ₅	2,65	33,21
35.	CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	2,66	34,65
36.	Ferrocenila	2,46	48,24

-0,339 para as séries homólogas m-alcoxifenóis e p-hidroxibenzoatos de alquila respectivamente, figura 4. O valor do intercepto em termos de concentração é a atividade biológica (hipotética) do composto-matriz, a qual é 268.000 μM e 47.000 μM para as séries m-alcoxifenol e p-hidroxibenzoato respectivamente. Observamos na figura 4 que o composto-matriz dos m-alcoxifenóis é menos bioativo que o composto-matriz dos p-hidroxibenzoatos de alquila. Além disso, a contribuição de

grupos CH₂ na variação da bioatividade é diferente para as duas séries homólogas, mas, à medida que a lipofilia destes compostos aumenta a bioatividade se aproxima, sendo praticamente a mesma para o derivado pentila.

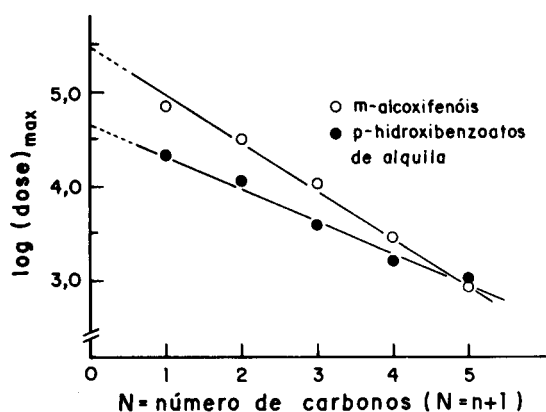


Figura 4. Efeito do número de carbonos da cadeia alquílica no valor de $\log(\text{dose})_{\text{max}}$ para as séries homólogas m-alcoixifenóis e p-hidroxibenzoatos de alquila.

As duas séries de compostos ensaiados frente ao mesmo microrganismo distribuem-se através do mesmo ambiente biológico de maneira parecida, mas não idêntica. Os coeficientes angulares das equações (1) e (2) são distintos. Na equação (1), a resposta biológica apresentada pelos m-alcoixifenóis demonstra uma dependência direta (ou praticamente direta) para $\log P$, o que representa, efetivamente, uma contribuição significativa da partição das drogas no sistema biológico. Embora, haja uma dependência da lipofilia para os p-hidroxibenzoatos, parece evidente que o fenômeno não é governado apenas por essa propriedade. A sua derivação em constante lipofilia mostra uma tendência similar (equação (3)). Esse comportamento está evidente no gráfico da figura 4.

A descrição dos comportamentos das duas séries homólogas estabelece que a contribuição aditiva dos grupos metileno para a resposta biológica, tem, provavelmente, diferentes interações energéticas, apesar da colinearidade da série homóloga. Para uma descrição realista do mesmo modo de ação das duas séries, dever-se-ia obter a figura 4 com retas paralelas e, obviamente, mesmo coeficiente angular, mas com diferentes interceptos no caso de ambas as séries apresentarem diferentes potências, como observado em nossos experimentos.

CONCLUSÕES

O valor de $\log(\text{dose})_{\text{max}}$ permitiu a interpretação da bioatividade relativa dos compostos substituídos, desde que as bioatividades estão todas relacionadas ao mesmo padrão reprodutível, isto é, completa inibição da produção de calor no microcalorímetro ou RB zero. Mais interessante entretanto, é a possibilidade que isto oferece para estabelecer um sistema para a avaliação da RB. É evidente que este potencial existe, desde que, $\log(\text{dose})_{\text{max}}$ versus o número de carbonos N, seja linear, então também deverá ser linear $\log(\text{dose})_{\text{max}}$ versus a Energia livre de Gibbs de transferência ($\Delta_{\text{trs}}G$) e conseqüentemente $\log(\text{dose})_{\text{max}}$ versus o coeficiente de partição $P_{\text{t/w}}$ para o mesmo processo de transferência.

Estes dados são de fundamental importância para os estudos de QSAR e para a pesquisa farmacêutica, onde a estrutura da

droga pode estar relacionada com a RB e com níveis conhecidos de solubilidade na biofase. Concluímos que o princípio de aditividade pode ser observado nos dados de QSAR e que a (RB) pode ser separada numa contribuição de bioatividade do composto-matriz e da adição sucessiva de grupos metileno na molécula da droga, avaliados por microcalorimetria biológica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos professores Anthony E. Beezer e Celso U. Davanzo pelas valiosas discussões e sugestões.

REFERÊNCIAS

- Beezer, A. E.; (ed), In *Biological Microcalorimetry*. Academic Press, London, 1980.
- Beezer, A. E.; Volpe, P. L. O.; Miles, R. J.; e Hunter, W. H.; *J. Chem. Soc., Faraday Trans I* **1986**, *82*, 2929.
- Beezer, A. E.; Volpe, P. L. O.; Gooch, C. A. e Hunter, W. H.; *Analytical Proceedings* **1986**, *23*, 399.
- Volpe, P. L. O.; *Quím. Nova* **1987**, *10*, 122.
- Volpe, P. L. O.; *Quím. Nova* **1988**, *11*, 435.
- Montanari, C. A.; Montanari, M. L. C.; Beezer, A. E. e Giesbrecht, A. M.; *Quím. Nova* **1993**, *16*, 133.
- Montanari, M. L. C.; Sandall, J. P. B.; Beezer, A. E. e Montanari, C. A.; *Int. J. Pharm.* **1992**, *85*, 199.
- Leo, A.; Hansch, C. e Elkins, D.; *Chem. Rev.* **1971**, *71*, 525.
- Dearden, J. C.; (ed)., In *Quantitative Approaches to Drug Design*, Elsevier, Amsterdam, 1983.
- Rogers, J. A. e Davis, S. S.; *Biochim. Biophys. Acta.* **1980**, *598*, 392.
- Free, S. M. e Wilson, J. W.; *J. Med. Chem.* **1964**, *7*, 395.
- Kubinyi, H.; In *Comprehensive Medicinal Chemistry, Quantitative Drug Design*, V.4, Ed. Ramsden, C. A. Pergamon Press, Oxford, 1990, p 589.
- Beezer, A. E.; Hunter, W. H. e Storey, D. E.; *J. Pharm. Pharmacol.* **1980**, *32*, 815.
- Kirsop, B. E. e Snell, J. J.; In *Maintenance of Microorganisms* Academic Press, New York, 1984.
- Volpe, P. L. O.; *Quím. Nova.* **1993**, *16*, 49.
- Beezer, A. E.; Volpe, P. L. O.; Gooch, C. A.; Hunter, W. H. e Miles, R. J.; *International Journal of Pharmaceutics*, **1986**, *29*, 237.
- Pleiss, M. A. e Unger, S. H.; In *Comprehensive Medicinal Chemistry Quantitative Drug Design*, V.4, Ed. Ramsden, C. A., Pergamon Press, Oxford, 1990, p 56.
- Pastor, M. e Alvarez-Builla; *J. Quant. Struct.-Act. Rel.* **1991**, *10*, 350.
- Dimicky, M. e Huhtanen, C. N.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *15*, 798.
- Beezer, A. E.; Gooch, C. A.; Hunter, W. H. e Volpe, P. L. O.; *J. Pharm. Pharmacol* **1987**, *39*, 774.
- Hansch, C.; In *Biological Activity and Chemical Structure* ed. J. A. Kevering Buisman, Elsevier, 1977, p.47.
- Franke, R.; In *Theoretical Drug Design Methods*, Elsevier, 1984, p. 282
- Hansch, C.; Hoekman, D. e Gao, H.; *Chem. Rev.* **1966**, *96*, 1045.
- (a) Hammett, L. P.; *Chem. Rev.* **1935**, *17*, 125 (b) *Physical Organic Chemistry*, 2nd, Ed.; McGraw Hill, New York, 1970.
- Tute, M. S.; In *Comprehensive Medicinal Chemistry, Quantitative Drug Design*, V.4, Ed. Ramsden, C. A., Pergamon Press, Oxford, 1990.