Adriana Leandra Santoro

Relações Estrutura-Retenção de Flavonóides por
Cromatografia a Líquido em Membranas Imobilizadas
Artificialmente

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade
de São Paulo para a obtenção do título
de Mestre em Ciências (Físico-Química)
Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto
Montanari

2007

Agradecimentos

À DEUS;

À minha família, que está sempre comigo, nas vitórias, ajudando a festejar, e nos obstáculos, ajudando a me levantar.

Ao meu pai, pelo lindo exemplo de homem, de pai, e principalmente de ser humano que ele sempre passou pra todos com enorme espontaneidade;

A minha mãe, que "todos os dias" esta disposta a me ouvir, e sempre me ajudar;

A minha irmã Andréa, que sempre me carrega no colo, até para o mundo da química ela me carregou;

Ao amigo William Sanazar, pelo apoio e amizade;

Ao meu irmão Aislan e à minha cunhada Andréa, que me apóiam em todos os momentos;

A minha irmãzinha Andreza, que é o maior tesouro que Deus resolveu criar;

Ao meu namorado e amigo Formiga, pelo amor, incentivo, paciência durante todos os dias de desenvolvimento deste trabalho;

Aos amigos, Arnaldo, Beth, Vitor, Nauva, Sérgio, Marx, Fabiana, Joyce, Karina, Marcelo, Cristine, Tomate, Érika, Márcio, Camila, Dedé, Carol, Puf, Vinho, pelo apoio e pelos momentos de alegria;

Ao meu orientador, Prof. Carlos Alberto Montanari pela orientação;

À Malu, pela amizade;

Ao professor Emanuel Carrilho, pela ajuda e incentivo;

Ao grupo de Química Medicinal, pelas valiosas contribuições ao trabalho e pela amizade;

Aos colegas do Departamento de Cromatografia, que me receberam muito bem e me ajudaram muito;

Ao Instituto de Química de São Carlos, e todos seus funcionários;

À professora Maria de Fátima das G. F. da Silva, da Universidade Federal de São Carlos, por nos conceder os flavonóides deste estudo;

Ao professor Fernando Mauro Lanças, por nos receber de braços abertos em seu laboratório;

A CNPq pela bolsa de estudo.

Resumo

Para um composto químico exercer seu efeito bioativo é necessário que ele atravessasse várias barreiras biológicas até alcançar seu sítio de ação. Propriedades farmacocinéticas insatisfatórias (como absorção, distribuição, metabolismo e excreção) são reconhecidamente as principais causas na descontinuidade de pesquisas na busca por novos fármacos. Neste trabalho, modelos biofísicos foram utilizados para o estudo de absorção de uma série de flavonóides naturais com atividade tripanossomicida. O coeficiente cromatográfico de partição, k_w , foi determinado através da cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, RP-HPLC, utilizando-se de colunas cromatográficas empacotadas com constituintes básicos da membrana biológica (fosfatidilcolina e colesterol). Os resultados obtidos demonstraram que nas colunas compostas por fosfatidilcolina a retenção de flavonóides hidroxilados é determinada por interações secundárias, além da partição, e no caso da coluna de colesterol, a partição é o principal mecanismo que rege a retenção. Uma série de descritores físico-químicos foi gerada pelos campos moleculares de interações (MIFs) entre os flavonóides naturais e algumas sondas químicas virtuais, utilizando o programa GRID. Os descritores físico-químicos gerados foram correlacionados com os $\log k_w$ por análise dos mínimos múltiplos parciais (PLS), utilizando o programa VolSurf, com a finalidade de gerar um modelo quantitativo entre estrutura e propriedade (QSPR) para esta classe de compostos. O modelo produzido por este estudo, ao utilizar os dados de partição em colesterol, $\log k_{wCol}$, apresentou elevada consistência interna, com bom poder de correlação ($R^2 = 0,97$) e predição ($Q^2 = 0,86$) para a partição destas moléculas.

Palavras-chave: Doença de Chagas, Flavonóides, IAM, $\log P_{oct}$, PLS, QSPR, RP-HPLC.

Abstract

In order to a chemical compound exert its bioactive effect it is necessary that it crosses some biological barriers until reaching its site of action. Unfavorable pharmacokinetics properties (absorption, distribution, metabolism and excretion) are admittedly one of the main causes in the discontinuity of research in the search for new drugs. In this work, biophysics models were used for the study of absorption of a series of natural flavonoids with trypanocide activity. The chromatographic retention indices ($\log k_w$) were determined on immobilized artificial membranes columns (IAM.PC.DD, IAM.PC.DD2, Cholesteryl 10-Undecetonoato) obtained by the extrapolation method. The results demonstrated that in the composed columns for fosfatidilcolina the retention of hydroxyl flavonoids is determined by secondary interactions, beyond the partition. In the case of the retention for the cholesterol column, the partition is the main mechanism that drives the retention. A series of physico-chemical descriptors were generated by the molecular interaction fields (MIF) between the flavonoids and some virtual chemical probes, using the program GRID. The descriptors were correlated with $\log k_w$ by the partial least squares regression (PLS), using the VolSurf program, with the purpose to generate a quantitative model between the structure and the retention (QSRR) for this compounds class. The model produced for this study, when using the data of partition in cholesterol, $\log k_{wCol}$, presented high internal consistency, with good correlation power ($R^2 = 0,97$) and prediction ($Q^2 = 0,86$) for the partition of these molecules.

Keywords: Immobilized artificial membrane chromatography (IAM); Quantitative structure–retention relationship (QSRR); Partial least squares regression (PLS), Chagas' disease, flavonoids, $\log P_{oct}$.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Principais causas para o insucesso no desenvolvimento de fármacos ¹	2
Figura 2. Esquema representando o transporte de fármacos através da membrana pela forma paracelular e transcelular.	3
Figura 3. Modelo do mosaico fluído da membrana biológica.	4
Figura 4. Esquema do transporte do fármaco e interação com o receptor.	5
Figura 5. Esquema básico de um equipamento para CLAE ²⁴	11
Figura 6. Representação esquemática da medida do índice lipofílico por CLAE em fase reversa ²⁶	12
Figura 7. Representação das estruturas das três principais superfícies IAM.PC ¹²	16
Figura 8. Representação estrutural da superfície da coluna de colesterol	19
Figura 9. Ilustração das duas etapas envolvidas no cálculo dos descritores VolSurf: (a) obtenção do campo de interação molecular entre a sonda OH2 e a molécula alvo; (b) derivação dos descritores VolSurf através do mapa 3D gerado no item (a).	24
Figura 10. Representação das estruturas dos dois fármacos atuais contra a Doença de Chagas: (a) Nifurtimox, (b) Benzonidazol	34
Figura 11. Representação das estruturas das seis subclasses de flavonóides	36
Figura 12. Modelo de potência frente à enzima g(GAPDH)Tc para nucleosídeos, cumarinas e flavonóides ⁵² , e projeção de um conjunto de diversas moléculas no modelo.	38
Figura 13. Cromatogramas da amostra 10, obtidos na coluna IAM.PC.DD2, utilizando 80, 60, 40 e 20% de metanol.	45
Figura 14. Coeficiente cromatográfico de partição ($\log k$) dos flavonóides estudados determinado por RP-HPLC utilizando IAM.PC.DD (retas em vermelho: flavonóides hidroxilados, retas em preto: flavonóides não hidroxilados).....	51
Figura 15. Coeficiente cromatográfico de partição ($\log k$) dos flavonóides estudados determinado por RP-HPLC utilizando IAM.PC.DD2 (retas em vermelho: flavonóides hidroxilados, retas em preto: flavonóides não hidroxilados).....	51
Figura 16 Coeficiente cromatográfico de partição ($\log k$) dos flavonóides estudados determinado por RP-HPLC utilizando Colesterol (retas em vermelho: flavonóides hidroxilados, retas em preto: flavonóides não hidroxilados).....	53
Figura 17. (a) $\log k_{wIAM.PC.DD}$ versus $\log P_{oct}$ (b) $\log k_{wIAM.PC.DD2}$ versus $\log P_{oct}$	55
Figura 18. Dependência linear de $-S_{Col}$ versus $\log k_{wCol}$ para os flavonóides estudados	59
Figura 19. (a) Relação entre $-S_{IAM.PC.DD}$ versus $\log k_{wIAM.PC.DD}$. (b) Relação entre $-S_{IAM.PC.DD2}$ versus $\log k_{wIAM.PC.DD2}$	59
Figura 20. PCA escores da PC2 versus PC1	62
Figura 21. Gráfico de pesos da PC1 versus PC2 para o modelo da Figura 20.....	63
Figura 22. Comparação entre os valores de ajuste (R^2) e validação (Q^2) para o modelo de PLS.	65
Figura 23. Gráfico de PLS correlacionando os descritores do VolSurf (T) com $\log P_{oct}$ (U). 66	
Figura 24. Gráfico de pesos de PC1 versus PC2 para o modelo da Figura 23. Y1 representa a variável dependente de partição.	67
Figura 25. PLS escores para a PC2 versus PC1	68
Figura 26. Gráfico de coeficientes da PLS	69
Figura 27. Gráfico dos valores de $\log P_{oct}$ predito pelo modelo versus os $\log P_{oct}$ calculados pelo programa AB/LogP.....	70
Figura 28. Comparação entre os valores de ajuste (R^2) e validação (Q^2) para o modelo de PLS.	72

Figura 29. Gráfico de PLS correlacionando os descritores do VolSurf (T) com $\log k_{wCol}$ (U).	73
Figura 30. Gráfico de pesos de PC1 <i>versus</i> PC2 para o modelo da Figura 29. Y1 representa a partição cromatográfica na coluna de colesterol.	74
Figura 31. Gráfico de escore para as duas primeiras componentes principais	75
Figura 32. Gráfico de coeficientes da PLS para o modelo global da correlação dos descritores do VolSurf com $\log k_{wCol}$	77
Figura 33. Gráfico dos valores preditos <i>versus</i> os valores experimentais	78
Figura 34. Projeção das 22 moléculas estudadas no modelo de permeação da barreira hematoencefálica (azul: compostos impermeáveis; vermelho: compostos permeáveis; amarelo: moléculas estudadas)	79
Figura 35. Projeção das 22 moléculas estudadas no modelo de permeação de células Caco-2 (azul: compostos impermeáveis; vermelho: compostos permeáveis; amarelo: moléculas estudadas)	80
Figura 36. Gráfico de pesos da PC 1 <i>versus</i> a PC2	82
Figura 37. Gráfico de escores da PC 1 <i>versus</i> a PC2: grupo (a) moléculas não hidroxiladas, (b) moléculas glicosiladas e (c) moléculas hidroxiladas	83
Figura 38. Escores da PC 1 dos dados autoescalados para os cinco sistemas <i>versus</i> os valores de $\log P_{oct}$	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Representação estrutural das 65 moléculas projetadas no modelo de potência.....	40
Tabela 2. Valores de $\log k_{wIAM}$ obtidos em diferentes proporções de agente modificador (ϕ) nas colunas IAM.PC.DD.	46
Tabela 3. Valores de $\log k_{wIAM}$ obtidos em diferentes proporções de agente modificador (ϕ) na coluna IAM.PC.DD2.	47
Tabela 4. Valores de $\log k_{wCol}$ obtidos em diferentes proporções de agente modificador (ϕ) na coluna de Colesterol.	48
Tabela 5. Análise estatística dos dados cromatográficos obtidos utilizando as colunas de fosfatidilcolina (IAM.PC.DD).....	49
Tabela 6 Análise estatística dos dados cromatográficos obtidos utilizando as colunas de fosfatidilcolina (IAM.PC.DD2).....	50
Tabela 7. Análise estatística dos dados cromatográficos obtidos utilizando a coluna de colesterol.....	52
Tabela 8. Análise de PLS (22 objetos e 32X=descritores $Y=\log P_{oct}$)	64
Tabela 9. Análise de PLS (20 objetos e 32X=descritores $Y=\log k_{wCOL}$).....	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
DD	Planejamento de fármacos
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IAM.PC	Membranas de Fosfatidilcolina Imobilizadas Artificialmente
k_{IAM}	Coeficiente de partição cromatográfico em membranas imobilizadas artificialmente
MIF	Campos Moleculares de Interação
NEQUIMED-PN	Grupo de Estudos em Química Medicinal em Produtos Naturais
PC	Fosfatidilcolina
PCA	Análise de Componentes Principais
PLS	Regressões Multivariadas por Mínimos Quadrados Parciais
P_{oct}	Coeficiente de partição octanol/água
QSAR	Relações Quantitativas entre a Estrutura e a Atividade
QSPR	Relações Quantitativas entre a Estrutura e a Propriedade
QSRR	Relações Quantitativas entre a Estrutura e a Retenção
RB	Resposta Biológica
RP-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
VolSurf	Volume e Superfície

Sumário

Agradecimentos

Resumo

Abstract

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Sumário

1. Introdução	1
1.1. A Química Medicinal e o Planejamento de Fármacos	1
1.2. A Membrana Biológica e o Transporte do Ligante	3
1.3. Métodos in vitro para a Determinação da Absorção de Fármacos	7
1.3.1. Cromatografia a Líquido	10
1.3.1.1 Membranas Imobilizadas Artificialmente	15
1.4. Relações Quantitativas Estrutura Propriedade	19
1.5 VolSurf	22
1.5.1 Descritores VolSurf	24
1.5.1.1 Descritores de forma e tamanho	25
1.5.1.2 Descritores de regiões hidrofílicas	25
1.5.1.3 Descritores de regiões hidrofóbicas	26
1.5.1.4 Momentos de Energia de Interação (integy moments, do inglês <i>INTERaction energy</i> (integy) moments)	26
1.5.1.5 Descritores Mistos	27
1.5.2 Métodos Estatísticos	30
1.6. Doença de Chagas e Produtos Naturais	33
2. OBJETIVOS	37
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	38
3.1. Métodos Computacionais	38
3.2. Método Cromatográfico	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
4.1. Partição Cromatográfica	45
4.2. Regressão Linear de Collander	53
4.3. Análise do coeficiente angular S	58
4.4. Relação Quantitativa Estrutura Propriedade	61
4.4.1. Análise discriminante das moléculas	61
4.4.2. Descritores Físico-Químicos versus $\text{Log}P_{\text{oct}}$ (AB/LogP)	64
4.4.3. Descritores físico-químicos versus $\log k_{\text{wIAM.PC.DD}}$ e $\log k_{\text{wIAM.PC.DD2}}$	70
4.4.4. Descritores físico-químicos versus $\log k_{\text{wCol}}$	71
4.4.5. Projeção das moléculas estudadas em modelos de permeação BBB e Caco-2.	78
4.5 Mecanismos de Retenção	81

5. Conclusões	86
6. Referências Bibliográficas	89

1. Introdução

1.1. A Química Medicinal e o Planejamento de Fármacos

A química medicinal é uma ciência multidisciplinar e engloba desde a descoberta e desenvolvimento de novas substâncias químicas bioativas até a compreensão dos fenômenos biológicos celulares. Os estudos em química medicinal envolvem desde etapas que são desenvolvidas *in silico* (simulações computacionais que modelam um processo natural ou de laboratório) e *in vitro* (processos biológicos executados fora do sistema vivo, no ambiente controlado e fechado de um laboratório) até etapas que são desenvolvidas *in vivo* (processos acompanhados dentro de um sistema vivo).

A administração de fármacos por sua vez, envolve três etapas onde inicialmente acontece a dissolução da substância ativa (fase farmacêutica), posteriormente esta substância passará por processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (propriedades ADME, fase farmacocinética) e finalmente o processo de interação do fármaco com o receptor (fase farmacodinâmica). Os aspectos toxicológicos também são evidentes na fase farmacocinética dos fármacos.

Tradicionalmente, os fármacos eram descobertos por meio de testes com compostos sintetizados contra uma bateria de ensaios *in vivo*, consumindo tempo em um processo com várias etapas. Os compostos promissores eram estudados com relação às suas propriedades farmacocinéticas, e os resultados encontrados nesta etapa do estudo eram na maioria das vezes adversos, sendo assim o projeto deveria ser reiniciado ou descartado, o que era completamente indesejável para qualquer companhia farmacêutica¹. Atualmente, este problema vem sendo contornado, sendo que os compostos só alcançam os ensaios *in vivo*, após passar

por testes farmacocinéticos. Segundo estudos realizados recentemente, a falta de otimização das propriedades farmacocinéticas é reconhecidamente uma das principais causas na descontinuidade de pesquisas na busca por novos fármacos (Figura 1), então o estudo dessas propriedades torna-se necessário o mais rápido possível no processo de desenvolvimento de fármacos^{1,2,3,4,5}.

Figura 1. Principais causas para o insucesso no desenvolvimento de fármacos¹.

A obtenção de informações sobre as propriedades ADME deve ser feita logo na etapa inicial do planejamento de novos compostos, pois as predições geradas servirão de guia para decisões posteriores², e podem reduzir consideravelmente o custo no planejamento de fármacos⁶. Das propriedades farmacocinéticas (ADME) é importante considerar em particular a absorção e distribuição do fármaco no organismo, pois o fármaco exercerá seu efeito terapêutico e farmacológico se conseguir atravessar as barreiras celulares e alcançar seu sítio de ação em concentração suficiente^{3,7,8}. Portanto, a atividade biológica é função do transporte da substância química bioativa (ligante) até o receptor biológico (biorreceptor)^{6,9,10}.

1.2. A Membrana Biológica e o Transporte do Ligante

A distribuição dos fármacos no organismo é dependente de suas interações com as membranas biológicas e, portanto a avaliação destas interações é um parâmetro chave no planejamento de fármacos¹¹. A membrana biológica é uma barreira celular para a absorção de fármacos, a qual uma molécula bioativa deve ser capaz de permear para conseguir exercer sua atividade biológica. A permeação da membrana pode ocorrer de forma paracelular ou transcelular. A permeação paracelular envolve a difusão do fármaco ao redor ou entre as células que formam a barreira biológica. O transporte transcelular, por sua vez, envolve os mecanismos de permeação passiva, através da bicamada lipídica, transporte ativo, transporte facilitado (mediado por um carreador) e fagocitose. A Figura 2 mostra uma ilustração do transporte paracelular e transcelular.

Figura 2. Esquema representando o transporte de fármacos através da membrana pela forma paracelular e transcelular¹².

O transporte passivo é parcialmente responsável pelo transporte para dentro de muitas células e a maioria dos fármacos atravessam a membrana por meio deste transporte^{3,12}. Todos os compostos bioativos devem atravessar pelo menos uma barreira celular até encontrar seu sítio de ação, devido a isso, o estudo da absorção e distribuição de fármacos no organismo exige um conhecimento básico da

composição e função das membranas. As membranas biológicas são estruturas assimétricas complexas, compostas de lipídeos, proteínas e carboidratos. São constituídas por bicamadas de fosfolipídeos unidas de forma não covalente e termodinamicamente estáveis¹². A interação de todas as moléculas que compõe a membrana (lipídeos, proteínas, carboidratos, água, metais, etc) forma o modelo mais aceito hoje em dia, chamado modelo do mosaico fluído (Figura 3).

Figura 3. Modelo do mosaico fluído da membrana biológica¹³.

As proteínas, apesar de serem impermeáveis, podem agir como canais iônicos ou transportadores, facilitando a passagem de componentes polares de dentro da célula para fora e vice-versa. Os lipídeos presentes nas membranas contêm tanto regiões hidrofóbicas como hidrofílicas e, portanto são denominados anfipáticos, são semipermeáveis, e a partição lipídeo-água (determinada pela lipofilia da molécula) é o fator mais importante que governa a habilidade da substância para difundir através da membrana celular. Sendo a membrana composta por bicamadas lipídicas possui caráter anfipático e, portanto, para ocorrer o transporte passivo a substância deve ser suficientemente solúvel em lipídeos e em água para estabelecer

um gradiente de concentração adequado. A importância da lipofília das moléculas tem sido reconhecida na ação dos fármacos (absorção, interação fármaco-receptor, etc)¹⁴ e juntamente com os processos de dissociação/ionização, a lipofília é responsável pelo transporte e distribuição dos ligantes em sistemas biológicos. Em um trabalho desenvolvido recentemente, cerca de 10.000 modelos de relação quantitativa entre estrutura e atividade (QSAR, do inglês *Quantitative Structure Activity Relationship*) foram analisados. Por meio destas análises, observou-se claramente, que o parâmetro lipofílico, representado pelo coeficiente de partição octanol/água $\log P_{\text{oct}}$, é crucial para desenvolver o entendimento das propriedades farmacocinéticas, sendo que das 10.000 equações de QSAR analisadas, mais da metade (cerca de 5.500) possuía como um dos parâmetros mais importantes o $\log P_{\text{oct}}$ ⁶.

Os processos de transporte do ligante e sua interação com o biorreceptor ocorrem através de “caminhos” aleatórios hidrofílicos e hidrofóbicos. As barreiras lipofílicas e aquosa devem ser vencidas até que o ligante interaja com o biorreceptor. Esses processos podem ser descritos, como representado na Figura 4, através da equação: Resposta Biológica (RB) = $f(\text{transporte} + \text{interação ligante-receptor})$.

Figura 4. Esquema do transporte do fármaco e interação com o receptor.

As propriedades moleculares lipofílicas representam as interações hidrofóbicas das moléculas, as quais são de fundamental importância para interação fármaco-receptor e transporte de fármacos até seu o sitio de ação¹⁵. As interações soluto-membrana são caracterizadas pelo coeficiente de equilíbrio de partição da

membrana, K_m , o qual representa a distribuição do soluto entre a fase aquosa extracelular e a membrana (absorção). Portanto, K_m é de grande importância para muitos processos biológicos, como por exemplo, nos processos de atividade, toxidez e distribuição de fármacos no organismo¹⁶.

A principal barreira para a absorção de fármacos administrados oralmente são as membranas do aparelho gastrointestinal. A permeação destas membranas ocorre por difusão passiva, para a maioria dos fármacos. A permeabilidade, P_m , através da membrana é diretamente proporcional a K_m , como pode ser verificado pela Equação 1¹⁶:

$$P_m = (D_m K_m) / L \quad (1)$$

onde D_m é o coeficiente de difusão do soluto na membrana e L é a espessura da membrana. Devido à importância de K_m no processo de planejamento de fármacos, e em muitos outros processos biológicos, medidas de K_m tem sido o objeto de muitos estudos durante as últimas décadas, porém, a obtenção de K_m utilizando ensaios *in vivo* é muito difícil. A necessidade de determinar a absorção para um número cada vez maior de compostos, desencadeou vários estudos com o objetivo de propor métodos *in vitro* para descrever e prever a permeabilidade passiva de fármacos^{3,12}. Alguns ensaios que predizem propriedades de transporte relevantes biologicamente podem ser citados em ordem de conveniência experimental: (i) métodos físico-químicos: em geral partição em solvente orgânico/água, partição em lipossomos, medidas de lipofília utilizando a técnica de cromatografia em fase reversa, (ii) ensaios celulares utilizando células Caco-2, (iii) ensaios em tecidos, e (iv) ensaios em animais¹². Devido a maior facilidade em realizar os métodos físico-químicos,

estes são os mais utilizados para prever o transporte passivo de fármacos através das membranas.

1.3. Métodos *in vitro* para a Determinação da Absorção de Fármacos

O método físico-químico mais utilizado para a predição de absorção é o coeficiente de partição solvente orgânico/água, em especial octanol-água, medido pelo procedimento *shake-flask*¹⁷. Este sistema consiste em determinar o coeficiente de partição octanol/água (P_{oct}), o qual é definido pela Equação 2. O P_{oct} representa a razão da concentração do soluto na fase orgânica e na fase aquosa.

$$P_{oct} = \frac{[solute]_{oct}}{[solute]_{aquoso}} \quad (2)$$

Algumas limitações apresentadas por este procedimento (como o elevado consumo de tempo, necessidade de que os compostos a serem analisados apresentem elevado grau de pureza, baixa precisão das medidas para compostos com $\log P_{OCT} > 4$, além de a partição do soluto usando esse sistema só ser útil quando interações de grupos polares entre o soluto e as bicamadas fosfolipídicas são mínimas ou ausentes^{8,18}) têm desencadeado numerosas pesquisas visando novos métodos para a determinação do coeficiente de partição.

Recentemente, muitos trabalhos têm utilizado células Caco-2 como modelo para estudar o transporte intestinal de fármacos^{6,19}. A célula Caco-2 é uma célula do carcinoma colorretal (de origem humana) e geralmente é aceita como um ensaio primário de absorção de fármacos em várias indústrias farmacêuticas³. Estas células

apresentam propriedades úteis para correlações com dados *in vivo* e são usadas para estudar transporte ativo, difusão paracelular e transcelular, entre outros¹⁹. Entretanto, a falta de padronização nas culturas celulares e nos procedimentos experimentais tornam difícil a comparação inter-laboratorial. O cultivo das células Caco-2 requer mais de 20 dias para preparação e as células devem ser mantidas em ambientes protegidos; tudo isso torna o procedimento demorado, trabalhoso e dificulta a reprodutibilidade³.

A partição de solutos em lipossomos em suspensão também tem sido bastante utilizada para estudos de interações soluto-membrana. A suspensão de lipossomos preparada por fosfolipídeos também exibe similaridades estruturais com a bicamada lipídica das membranas celulares, fazendo dos lipossomos excelentes modelos do ambiente lipídico da célula. Porém, embora este sistema possa modelar ambas as interações polares e apolares entre soluto e membrana, é um método bastante minucioso. A preparação dos lipossomos, seguida pelo equilíbrio da suspensão e quantificação do soluto livre na suspensão de lipossomos e na água, torna o procedimento muito demorado. Estas características limitam a aplicação do sistema em ampla escala para modelos *in vitro* de predição de interações fármaco-membrana^{16,20}.

Outro modelo *in vitro* comumente utilizado é a cromatografia. A introdução da cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) para a determinação da lipofília no início dos anos 70, chamou a atenção pelas vantagens oferecidas por esta técnica sobre o procedimento convencional, *shake-flask*. Dentre as vantagens que a técnica cromatográfica apresenta, pode-se citar a alta velocidade de determinação do coeficiente cromatográfico de partição, pequenas quantidades de amostras são suficientes para

a análise, reprodutibilidade, fácil uso, e instrumentação fácil de ser automatizada¹⁸. Por estas razões, numerosos trabalhos vêm sendo desenvolvidos utilizando a HPLC para a determinação da lipofília.

O sistema estável de cromatografia líquida em fase reversa (RP-HPLC) vem sendo usado desde 1975 para acessar dados de lipofília, utilizando como fase estacionária grupos alquílicos (geralmente, octadecil, C18) ligados quimicamente na superfície da sílica. Este sistema modela a partição octanol/água, e a medida do coeficiente de partição é comparativamente simples, entretanto esse método apresenta a mesma limitação do sistema octanol/água, sendo útil apenas quando interações de grupos polares entre o soluto e as bicamadas fosfolipídicas são mínimas ou ausentes⁸.

Atualmente diferentes sistemas cromatográficos têm sido propostos para prever a absorção oral de fármacos, sendo que a inclusão de estruturas anfifílicas na fase móvel e/ou estacionária vem sendo um pré-requisito para simular interações de fármacos com as bicamadas fosfolipídicas das membranas³. A estrutura anfifílica pode estar presente na fase estacionária, como no caso das colunas compostas por membranas imobilizadas artificialmente (IAM, do inglês *immobilized artificial membrane*).

As colunas IAM possuem diferentes tipos de monocamadas fosfolipídicas que são covalentemente ligadas a partículas de sílica, e a retenção das moléculas é dependente da interação entre a fase móvel (aquosa) e a fase estacionária. A presença de constituintes da membrana biológica nestes sistemas cromatográficos confere aos resultados obtidos uma maior correlação com dados *in vivo* do que os resultados obtidos em colunas hidrocarbônicas, ou pelo método *shake-flask*^{3,21,22}.

Tem sido mostrado que o logaritmo do fator de retenção obtidos em colunas IAM ($\log k_{IAM}$) simulam o comportamento de partição dos analitos em sistemas de lipossomos e podem ser usados para estimar propriedades de biopartição, como a permeabilidade de fármacos em células Caco-2, a permeabilidade na pele, o transporte através da barreira cerebral e a absorção intestinal de fármacos^{8,11,23}.

1.3.1. Cromatografia a Líquido

A técnica RP-HPLC é apropriada para a determinação da partição de um soluto entre fases móveis aquosas (polares) e estacionárias (apolares) e, portanto, apropriada para a determinação da lipofilia. É um método físico-químico de separação e está fundamentado na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. Essa migração é determinada pela composição da fase móvel, da fase estacionária e pela temperatura da separação. A HPLC utiliza fases estacionárias com micropartículas, sendo necessária a utilização de bombas para que a fase móvel (que no caso da cromatografia a líquido, é um líquido) possa atingir o fluxo desejado.

A instrumentação necessária para aplicação da técnica está representada na Figura 5 e ilustra os componentes fundamentais do equipamento²⁴.

Figura 5. Esquema básico de um equipamento para CLAE²⁴.

A separação de uma mistura por HPLC se dá por interações do soluto com a fase móvel e estacionária, sendo que essas interações podem ser de diversos tipos como, por exemplo, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, entre outras. De acordo com a natureza dessas interações os modos de separação se classificam como cromatografia em fase reversa, em fase normal, por pareamento de íons e por exclusão²⁴.

Sendo a RP-HPLC apropriada para a determinação da partição de um soluto entre fases móveis aquosas (polares) e estacionárias (apolares), a medida do fator de retenção cromatográfico do soluto, k , é comumente usada como um descritor lipofílico²⁵. O k é dado pelo tempo de retenção normalizado, e correlaciona-se com a constante de equilíbrio termodinâmico, K_m , conforme representado pelas Equações 3(a) e 3(b), respectivamente¹⁶.

$$k = (t_r - t_o) / t_o \text{ (a)}; \quad k = \frac{V_s}{V_M} K_m \text{ (b)} \quad (3)$$

Nestas equações os termos t_r e t_0 são os tempos de retenção do analito e do solvente (ou de um soluto não retido), V_S é o volume da fase estacionária e V_M é o volume da fase móvel.

Em uma determinada fase estacionária o valor de k pode ser controlado pela mudança da polaridade da fase móvel, através da força de eluição. Entretanto, a força de eluição é dependente, dentre outros, da fase estacionária e do analito. As misturas binárias de solventes são, então, apropriadas para o controle fino da força de eluição, e o ajuste da polaridade é conseguido pela variação da fração do agente modificador (ϕ). O agente modificador é necessário para eluir analitos altamente lipofílicos²⁶. Dentro da faixa $0,2 \leq \phi \leq 0,8$, há um comportamento linear do modelo de Snyder. A medida de k em diferentes proporções de agente modificador possibilita a obtenção do coeficiente cromatográfico de partição, $\log k_w$, por extrapolação dos valores isocráticos de $\log k$ para 100% de água (Figura 6)²⁶. Os valores de $\log k_w$ são obtidos através do modelo linear de força do solvente (LSS) de Snyder^{27,28} (Equação 4).

Figura 6. Representação esquemática da medida do índice lipofílico por CLAE em fase reversa²⁶.

$$\log k = -S\varphi + \log k_w \quad (4)$$

A retenção cromatográfica em 100% de água (k_w) é considerada como o melhor fator de retenção quando usado para estimar a lipofília no modo reverso de eluição, pois ela não apresenta os efeitos do agente modificador. A utilização de $\log k_w$ apresenta a vantagem de refletir a partição polar-não-polar de uma maneira similar às medidas obtidas pelo método *shake-flask*, além de ser dependente da estrutura do soluto e das funcionalidades polares^{18,28}.

Embora a força de eluição seja muito fraca quando utiliza-se 100% de água como fase móvel para a maioria dos analitos, a concentração do agente modificador em composições extremas resulta na falta de linearidade da equação de Snyder. Portanto, a composição da fase móvel é limitada ao intervalo de 20-80% do agente modificador. Em intervalos superiores e inferiores, obtém-se uma relação quadrática de $\log k_w$ versus a fração de agente modificador (φ), a qual está representada pela Equação 5.

$$\log k = A\varphi^2 - S\varphi + \log k_w \quad (5)$$

Porém, deve ser notado que a extrapolação linear dos dados de retenção para 100% de água pode mimetizar mais adequadamente $\log P_{\text{oct}}$.

Embora os valores de $\log k_w$ sejam bons índices lipofílicos, uma transformação em valores de $\log P_{\text{oct}}$ pode ser realizada²⁹. Isso é feito pela regressão linear de Collander (Equação 6).

$$\log k_w = a \log P_{oct} + b \quad (6)$$

Uma boa correlação e valores dos coeficientes de regressão a e b tendendo a unidade e a zero, respectivamente, são garantias de que o coeficiente cromatográfico de retenção seja linear e homo-energeticamente (energias de interação em dois sistemas são similares) relacionado ao coeficiente de partição.

A principal razão para comparar, ou mesmo transformar, $\log k_w$ em $\log P_{oct}$ é devida ao sistema octanol-água ser considerado como padrão para medidas de lipofília. Porém, a correlação entre $\log P_{oct}$ e $\log k_w$ ocorre somente para conjuntos de compostos bastante similares. Muitas vezes, dentro de uma série de compostos que aparentemente possuem estruturas similares, efeitos discretos, como diferenças na capacidade de formar interações de hidrogênio, podem ser encontrados²⁹.

A equação de Collander pode ser utilizada para comparar dois métodos distintos de obtenção do coeficiente de partição, assumindo a forma da Equação 7,

$$\log P_2 = a \log P_1 + b \quad (7)$$

onde $\log P_1$ representa o coeficiente de partição do soluto no sistema 1 e $\log P_2$ o valor de partição do mesmo soluto no segundo sistema. A retenção cromatográfica é devida primariamente à partição hidrofóbica entre as fases estacionária e móvel, entretanto, diferenças na capacidade de formar ligações hidrogênio podem perturbar a equação de Collander e afetar a predição da lipofília¹⁷.

A cromatografia a líquido em fase reversa utilizando colunas hidrocarbônicas foi uma das alternativas para a obtenção do coeficiente cromatográfico de partição no estudo de absorção de fármacos. Porém, devido à ausência de grupos polares na

fase estacionária os resultados obtidos apresentaram uma baixa correlação quando comparados à permeabilidade de fármacos determinada experimentalmente^{12,16}.

Uma nova fase estacionária que vem sendo utilizada em RP-HPLC e que modela a membrana natural é constituída pelas membranas imobilizadas artificialmente (IAM, do inglês *Immobilized Artificial Membrane*)²³.

1.3.1.1 Membranas Imobilizadas Artificialmente

As membranas imobilizadas artificialmente têm mostrado ser uma forma eficiente de acessar o comportamento lipofílico das moléculas, e útil para estudos de absorção por biomembranas²³. As colunas IAM retêm solutos neutros por balanço de forças intermoleculares semelhantes àqueles encontrados na partição octanol/água, sendo assim, essas membranas podem ser utilizadas para a obtenção do coeficiente cromatográfico de partição de solutos neutros, e este pode ser usado como um descritor lipofílico⁷. Estas membranas são superfícies cromatográficas preparadas por imobilização covalente de análogos de fosfolipídios da membrana celular em superfícies sólidas^{12,20,30}. Embora existam mais de 20 tipos diferentes de superfícies IAM, apenas três dessas superfícies tem sido amplamente utilizadas para avaliar as interações fármaco membrana. As representações das estruturas das três principais superfícies IAM estão na Figura 7¹².

Figura 7. Representação das estruturas das três principais superfícies IAM.PC¹²

Cada uma das três superfícies mostradas na figura foi preparada com o ligante fosfatidilcolina (PC, do inglês *phosphatidylcholine*), por isso usa-se IAM.PC. O sobrescrito da esquerda descreve a diferença estrutural dos ligantes PC usados para preparar a coluna. Por exemplo, como mostra a Figura 7, o sobrescrito 'éster' (^{éster}IAM.PC^{C10/C3}) denota uma ligação éster entre as duas cadeias acilas. O sobrescrito δG (^{δG} IAM.PC^{C10/C3}) significa que foi excluído o grupo glicerol da fosfatidilcolina. Os sobrescritos da direita, 'C10' e 'C3', significa que os grupos amino residuais presentes na superfície da sílica após a ligação com a IAM.PC foram encapsados com grupos decanoil e acil propiônico, respectivamente. Das IAM representadas na Figura 7, a mais usada para prever a permeabilidade do fármaco na membrana é a ^{δG} IAM.PC^{C10/C3}, comercialmente conhecida por IAM.PC.DD (DD, do inglês *Drug Discovery*). Recentemente, esta fase estacionária foi modificada a fim

de oferecer uma maior lipofília; esta nova fase recebeu o nome de IAM.PC.DD2, sendo que sua estrutura também está representada na Figura 7 pela $\text{ester IAM.PC}^{C10/C3}$. As vantagens da IAM.PC.DD2 são a natureza hidrofóbica, que permite um tempo de retenção maior para compostos que não são bem retidos na IAM.PC.DD, maior estabilidade, e excelente correlação com os métodos tradicionais³¹. A fosfatidilcolina é o principal fosfolipídio encontrado nas membranas celulares e assim as IAM.PC simulam a superfície da membrana biológica¹².

Desde quando foram introduzidas como modelo *in vitro* para ensaios de interações fármaco-membrana, no início da década de 90, vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos com estas membranas, com a finalidade de comprovar a sua capacidade em prever se um fármaco é capaz de atravessar a membrana biológica. Em meados da década de 90, vários tipos de IAM foram utilizadas para prever: (i) a partição de solutos para dentro de membranas lipossômicas, (ii) a permeabilidade de fármacos em células Caco-2, (iii) absorção intestinal de fármacos, (iv) transporte de solutos para dentro do cérebro e (v) permeabilidade na pele humana, sendo que todas as previsões apresentaram resultados satisfatórios, onde a correlação obtida entre os dados de partição cromatográfica, utilizando IAM, e os dados de permeação biológica foram sempre maiores do que 80%^{12,22,16}. Estes estudos permitem concluir que a retenção nestas membranas possui algumas similaridades com o processo de absorção em biomembranas, possibilitando o desenvolvimento de modelos de correlações para estimar propriedades de biopartição²³. Entretanto, até o presente, nenhum estudo mostrou qual descritor lipofílico (partição em IAM, em lipossomos ou em octanol/água, por exemplo) é o mais apropriado para prever a permeação na membrana para uma grande série de

compostos, já que tem sido verificado que a resposta difere de acordo com o conjunto de composto que está sob investigação⁸.

Alguns trabalhos desenvolvidos mais recentemente com IAM, demonstraram que a partição de solutos ionizáveis neste sistema apresenta diferente escala lipofílica, quando comparada com a partição em lipossomo/água e octanol/água, ou seja, para estes compostos existem interações secundárias que governam a partição nas IAM^{8,26}. Em 2006, um estudo utilizando colunas IAM e colunas convencionais de HPLC em fase reversa (como octadecilsilica, C18) foi desenvolvido para verificar o desempenho de cada um destes sistemas cromatográficos para prever a distribuição de fármacos no organismo. Os resultados demonstraram que, ao contrário do que normalmente se acredita, IAM não são sempre a melhor escolha para modelar um sistema biológico de distribuição de fármaco¹¹.

Além de fosfolipídeos, o colesterol também tem sido testado como um meio de simular, em sistemas cromatográficos, as interações que ocorrem nas membranas. O primeiro passo foi dado no final da década de 90 quando utilizou-se o *Cholesteryl 10-Undecetonoato* ligado na sílica^{32,33,34}. A estrutura da coluna empacotada com colesterol (*Cholesteryl 10-Undecetonoato*) está representada na Figura 8. Colunas cromatográficas cuja fase estacionária é constituída por colesterol têm sido utilizadas em aplicações farmacêuticas, pois estas reconhecem estruturas específicas em moléculas, exibindo alta seletividade. Seletividade esta que se dá pela presença de três estruturas específicas (i) a longa cadeia de hidrocarbonetos, que faz com que a cadeia tenha alta mobilidade; (ii) o grupo carbonila, que pode interagir com uma variedade de grupos substituintes; (iii) e o colesterol, que pode invocar interações $\pi - \pi$, assim como efeito estéreo³⁵. A fase estacionária com

colesterol apresenta propriedades de fase reversa, porém sua lipofilia é menor do que a C18.

Figura 8. Representação estrutural da superfície da coluna de colesterol.

Ao contrário das IAM compostas por fosfatidilcolina, apesar de terem sido desenvolvidas na mesma década, as colunas compostas por colesterol ainda não foram tão utilizadas em estudos de interação fármaco membrana para modelar partição.

1.4. Relações Quantitativas Estrutura Propriedade

A relação propriedade–estrutura química assumiu bases quantitativas em 1940 quando Hammett, com seu clássico trabalho: *“Physical Organic Chemistry: reactions, equilibria and mechanisms”*, estudou a ionização de ácidos benzóicos *meta* ou *para*-substituídos em água a 25°C, demonstrando, pela primeira vez, a ocorrência de relação linear entre os logaritmos da constante de ionização do ácido benzóico substituído e o logaritmo da constante de ionização do ácido benzóico⁹.

Em Química Medicinal, o conceito de relação estrutura-propriedade (SPR, do inglês *structure-property relationships*) e, por extensão, relação quantitativa estrutura-propriedade (QSPR, do inglês *Quantitative structure-property relationships*), objetiva estabelecer uma relação quantitativa (estatística) entre as propriedades físico-químicas e estruturais de uma série de compostos congêneres. É comum também a designação QSRR (do inglês *Quantitative structure-retention relationships*) quando a propriedade físico-química em questão é relacionada com partição.

Como as propriedades farmacocinéticas (ADME) estão intimamente relacionadas com propriedades físico-químicas, e necessitam ser estudadas logo na etapa inicial do desenvolvimento de fármacos, QSPR tornou-se uma tendência corrente em química medicinal⁴. Vários estudos têm mostrado a importância dessas relações para prever a permeabilidade de fármacos, e aprofundar o conhecimento sobre os tipos de interações moleculares que ocorrem no processo de partição em membranas biológicas.

Um trabalho desenvolvido em 2003, utilizou o coeficiente de retenção cromatográfico obtido em uma coluna IAM ($\log k_{IAM}$) para uma série de 32 moléculas estruturalmente diversas, e adicionalmente desenvolveu uma QSRR a fim de explicar a dependência da retenção com relação à estrutura química dos fármacos considerados. O modelo de QSRR obtido neste trabalho foi capaz de evidenciar os principais fatores que governaram o processo de partição deste conjunto de moléculas nas membranas biomiméticas³⁶.

Em 2005 um estudo de QSPR, para uma série de fármacos, demonstrou que os dados de retenção obtidos em IAM combinados com descritores físico-químicos foram capazes de elucidar o mecanismo de biopartição dos fármacos em células

Caco-2¹⁹. Outro estudo de QSPR que demonstrou a possibilidade de determinar os principais parâmetros físico-químicos responsáveis pela partição, utilizando descritores de propriedades físico-químicas e fatores de retenção em uma coluna cromatográfica IAM.PC.DD2, foi publicado em 2007³⁷.

Os dados de partição, também podem ser correlacionados com a atividade de moléculas bioativas para construção de modelos de relação quantitativa entre estrutura e atividade (QSAR, do inglês *Quantitative structure activity relationship*). Em 2003 um modelo de QSAR foi construído correlacionando o descritor lipofílico, $\log k_w$, com a atividade biológica de algumas moléculas da classe das pteridinas, que possuem atividade antielmíntica³⁸.

A construção de uma QSPR exige o conhecimento de algumas propriedades físico-químicas das moléculas. Geralmente medidas em larga escala destas propriedades consomem muito tempo ou muito material é necessário. Sendo assim, a utilização de ferramentas computacionais para a obtenção de propriedades físico-químicas a partir da estrutura molecular de um composto faz-se necessária, assim como a utilização de *softwares* especiais para a correlação da estrutura molecular 3D com propriedades farmacocinéticas⁴.

1.5 VolSurf

O método VolSurf (do inglês VOLUME and SURFace) é um procedimento computacional usado para produzir descritores moleculares 2D por meio de mapas 3D de energia de interação molecular. O cálculo de propriedades moleculares pela energia de interação do campo molecular 3D (MIF do inglês *molecular interaction field*) é uma nova ferramenta que correlaciona estrutura molecular 3D com propriedades físico-químicas e farmacocinéticas. Os MIF podem ser vistos como uma matriz 3D, na qual os elementos são as forças atrativas e repulsivas entre um padrão de interação (uma sonda química virtual) e um alvo (a molécula).

A maioria das propriedades relacionadas com interação molecular pode ser representadas em um campo molecular 3D, o qual geralmente possui uma grande quantidade de dados, alguns dos quais são redundantes ou não são relevantes para um dado problema, o que torna necessário a utilização de ferramentas para extrair os descritores úteis dos MIF 3D, e correlacionar observações experimentais com a estrutura molecular.

O VolSurf, desenvolvido em 2000, é capaz de comprimir o máximo de informação relevante presentes no mapa do campo molecular 3D, dentro de poucos descritores físico-químicos, os quais são fáceis de obter e interpretar e são especialmente planejados para otimização de propriedades farmacocinéticas (ADME)^{4,39,40}.

A interação do fármaco com a membrana biológica é um reconhecimento tridimensional mediado por propriedades de superfície como forma, forças de van-der-Waals, forças eletrostáticas, interações de hidrogênio e hidrofobia⁴. O campo de força GRID é uma das ferramentas computacionais mais amplamente utilizada para mapear superfícies moleculares de fármacos e macromoléculas. Ele utiliza um

potencial baseado na energia total de interação entre uma molécula alvo e uma sonda, a qual pode ser um átomo ou uma molécula, como a de água, por exemplo. Pelo movimento da sonda ao longo da superfície da molécula alvo, o GRID produz um campo de interação molecular tridimensional (MIF 3D) o qual mapeia as forças químicas existentes entre a sonda e a molécula^{41,42}.

As sondas GRIDs são seletivas e o uso inteligente delas permite coletar dados das propriedades do campo molecular que podem ter várias finalidades, como por exemplo a construção de modelos de QSAR-3D⁴³. As sondas mais comuns utilizadas para simular as interações entre as moléculas e a membrana biológica, são as sondas de água, hidrofóbicas e de oxigênio carbonílico (chamadas de OH2, DRY e O, respectivamente, no programa GRID). A sonda OH2 é usada para simular processos de solvatação e dessolvatação enquanto a sonda DRY e de O são usadas para simular interações entre os grupos apolares (“cauda”) e polares (“cabeça”), respectivamente, da membrana biológica⁴. Portanto as interações calculadas através da combinação das sondas virtuais representam as interações entre as moléculas e os vários compartimentos biológicos por onde ela pode circular⁴⁴. Os MIF 3D gerados pelas interações entre as sondas e as moléculas são então convertidos em descritores físico-químicos que serão utilizados para estudos relacionados com propriedades farmacocinéticas ou com atividade biológica.

A obtenção dos descritores físico-químicos pode ser resumida em duas etapas, onde na primeira etapa o campo molecular 3D é gerado pela interação das sondas com a molécula alvo (pelo procedimento GRID), e na segunda etapa é feito o cálculo dos descritores moleculares (pelo método VolSurf) a partir dos mapas 3D obtidos na primeira etapa, este procedimento esta ilustrado na Figura 9, sendo que cada vértice do cubo que secciona a caixa tridimensional (espaçamento da caixa)

representa um ponto a partir do qual as energias são exploradas pela sonda química virtual sobre a molécula em questão. Os descritores físico-químicos gerados podem ser utilizados para a construção de modelos multivariados que irão correlacionar a estrutura molecular 3D com o comportamento biológico.

Figura 9. Ilustração das duas etapas envolvidas no cálculo dos descritores VolSurf: (a) obtenção do campo de interação molecular entre a sonda OH2 e a molécula alvo; (b) derivação dos descritores VolSurf através do mapa 3D gerado no item (a)⁴⁵.

1.5.1 Descritores VolSurf

1.5.1.1 Descritores de forma e tamanho

O conceito de forma molecular é de fundamental importância para acessar similaridade, regularidades e correlações em planejamento e otimização de fármacos, em análises de toxicidade e em QSPR. Os descritores de forma e tamanho gerados pelo VolSurf são: volume molecular (V, representa o volume acessível pela sonda água, calculado a $0,20 \text{ kcal mol}^{-1}$) superfície molecular (S, superfície acessível a sonda OH₂, calculado a $0,20 \text{ kcal mol}^{-1}$), rugosidade (R, é a medida da superfície rugosa da molécula) e globularidade (G, classifica as moléculas em níveis de globularidade comparando-as com moléculas esféricas perfeitas), a globularidade é também relacionada com a flexibilidade molecular⁴⁶.

1.5.1.2 Descritores de regiões hidrofílicas

Regiões hidrofílicas são definidas como um envelope molecular que é acessível e atrai moléculas de água. O volume deste envelope varia com o nível de energia de interação entre a água e a molécula. Os descritores VolSurf de regiões hidrofílicas são representados por W1-W8, e são obtidos nos níveis de energia -0,2; -0,5; -1,0; -2,0; -3,0; -4,0; -5,0 e -6,0 kcal mol^{-1} . Geralmente W1-W4 considera forças de dispersão e polarizabilidade, enquanto que W5-W8 considera interações polares e regiões de doadores e receptores de hidrogênio. Outro descritor do VolSurf

referente à regiões hidrofílicas é o fator de capacidade, este parâmetro descreve a razão entre regiões hidrofílicas e a superfície molecular e é representado por CW1-CW8, já que também é obtido em oitos níveis de enrgia (-0,2; -0,5; -1,0; -2,0;-3,0; -4,0; -5,0 e -6,0 kcal mol⁻¹)⁴⁶.

1.5.1.3 Descritor de regiões hidrofóbicas

O descritor hidrofóbico gerado pelo VolSurf pode ser definido como o envelope molecular que gera interações hidrofóbicas. Também é obtido em oito níveis de energia, -0,2; -0,4; -0,6; -0,8;-1,0; -1,2; -1,4 e -1,6 kcal mol⁻¹, e é representado por D1-D8⁴⁶.

1.5.1.4 Momentos de Energia de Interação (integy moments, do inglês *INTERaction enerGY (integy) moments*)

Semelhantes à momentos dipolo, momento *integy* expressa o desequilíbrio entre o centro de massa e o baricentro de regiões hidrofílicas de uma molécula (Figura 10b).

Momento *integy*, quando se referem às regiões hidrofílicas, são vetores que apontam do centro de massa para o centro de regiões hidrofílicas, em diferentes níveis de energia (-0,2; -0,5; -1,0; -2,0;-3,0; -4,0; -5,0 e -6,0 kcal mol⁻¹), e é representado por IW1-IW8. Se o momento *integy* é elevado, existe uma clara

concentração de regiões hidratadas em somente uma parte da superfície molecular, se este momento é pequeno, as partes polares da molécula estão próximas ao centro de massa, ou em posições opostas da molécula.

Quando se referem a regiões hidrofóbicas (ID1-ID8), estes momentos medem o desequilíbrio entre o centro de massa e o baricentro de regiões hidrofóbicas de uma molécula em diferentes níveis de energia⁴⁶.

1.5.1.5 Descritores Mistos

Os descritores mistos consideram ambas as interações, hidrofílicas e lipofílicas. O descritor de Balanço hidrofílico-lipofílico (HL1-HL2), representa a razão entre as regiões hidrofílicas e lipofílicas, descrevendo qual efeito predomina na molécula, ou se ambos estão igualmente balanceados. Momento Anfifílico (A), definido como um vetor que aponta do centro do domínio hidrofóbico para o centro do domínio hidrofílico, o comprimento do vetor é proporcional à força do momento anfifílico, e este pode determinar a habilidade do composto em permear a membrana. Parâmetros de Empacotamento Crítico (CP) define a razão entre a parte hidrofílica e lipofílica da molécula, mas, em contraste com o balanço hidrofílico-lipofílico, refere-se somente à forma molecular. Interações de Hidrogênio (HB1-HB8) descreve a capacidade da molécula alvo em realizar interações de hidrogênio com uma sonda polar nos seguintes níveis de energia, -0,2; -0,5; -1,0; -2,0; -1,0; -2,0; -3,0; -4,0; -5,0 e -6,0 kcal/mol. A sonda OH2 apresenta uma ótima habilidade para interações de hidrogênios, tanto como doadora como receptora. Polarizabilidade (P), é uma estimativa da polarizabilidade média molecular baseada na estrutura dos

compostos, é independente do MIF 3D e, portanto, independente do número e tipos de sondas utilizadas⁴⁵.

Ao correlacionar os descritores 2D obtidos pelo programa VolSurf com propriedades farmacocinéticas, através de análises estatísticas, é possível identificar padrões físico-químicos relevantes que estão associados à estas propriedades e até mesmo gerar modelos quali e/ou quantitativos entre as estruturas e propriedades de um conjunto de compostos.

Existem alguns modelos qualitativos de permeação no banco de dados do programa VolSurf, os quais podem ser utilizados para prever propriedades farmacocinéticas de novas entidades químicas em humanos. O perfil farmacocinético de um composto, ou de uma série de compostos, é definido rapidamente com a utilização destes modelos. Um dos modelos presente no banco de dados do VolSurf, é um modelo de permeação da barreira hematoencefálica (BBB, do inglês *Blood-Brain Barrier*).

A penetração da barreira BBB é um fenômeno complexo que depende de diversos fatores, e o transporte através dela pode ocorrer de diversas formas. Para gerar o modelo BBB, apenas o transporte passivo foi considerado. Para a construção deste modelo, dados de permeação foram obtidos para 313 moléculas e correlacionados com os descritores VolSurf (gerados pelos campos de interações moleculares entre as moléculas e as sondas DRY, OH2 e O) através de uma análise de regressão dos mínimos múltiplos parciais (PLS, do inglês *Partial Least Square*). O modelo gerado é capaz de separar compostos que apresentam elevada permeação em BBB (BB+), de outros com permeação moderada (BB?) ou nenhuma habilidade para atravessar a barreira hematoencefálica (BB-). Sendo assim, o modelo BBB

obtido possui caráter qualitativo, onde as projeções de novas moléculas neste modelo rendem informações sobre a capacidade de permear esta barreira⁴⁷.

Outro modelo armazenado no banco de dados do VolSurf, é o modelo de permeação Caco-2. O uso de monocamadas de células Caco-2 tem ganhado destaque como o teste in vivo que simula a absorção intestinal humana. O modelo Caco-2 foi construído através da correlação dos dados de permeação de 751 compostos, em células Caco-2, com os descritores físico-químicos obtidos pelo método VolSurf ao utilizar as sondas DRY, OH2 e O. O modelo obtido, é capaz de discriminar compostos com elevada, baixa e moderada capacidade de permear estas células. Sendo assim a projeção de compostos externos no espaço químico representado por este modelo, rende informações sobre a capacidade das moléculas em permear estas células⁴⁷.

A partição é outra propriedade físico-química que também pode ser correlacionada com descritores VolSurf com a finalidade de obter modelos de correlação entre estrutura e propriedade. A partição pode ser obtida por diversas maneiras, sendo que medidas de partição cromatográfica são cada vez mais utilizadas com a finalidade de construir modelos de QSPR.

Recentemente foi reportado um modelo de QSPR para a partição de um conjunto de 20 oligopeptídeos utilizando métodos estatísticos. A habilidade dos peptídeos em particionar a membrana foi testada em dois sistemas cromatográficos com fosfolipídios, IAM e cromatografia com lipossomos imobilizados (ILC, do inglês *Immobilized Liposome Chromatography*), e as medidas resultantes foram correlacionadas com três conjuntos de descritores físico-químicos, incluindo os descritores gerados pelo programa VolSurf. Os três modelos de QSPR obtidos neste trabalho foram de boa qualidade estatística⁴⁸.

A necessidade de relacionar os descritores gerados com propriedades físico-químicas das moléculas (ou com propriedades biológicas) exige que algumas ferramentas estatísticas sejam utilizadas a fim de extrair o máximo de informação possível dos dados obtidos.

1.5.2 Métodos Estatísticos

A análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) é uma técnica estatística poderosa que pode ser utilizada para redução do número de variáveis, e para fornecer uma visão estatisticamente privilegiada do conjunto de dados. A análise de componentes principais consiste em reescrever as variáveis originais em novas variáveis denominadas componentes principais (PC, do inglês *Principal Components*) através de uma transformação de coordenadas. A transformação de coordenadas é um processo feito utilizando matrizes.

As PC são as novas variáveis geradas através de uma transformação matemática especial realizada sobre as variáveis originais. Geralmente é necessário aplicar algum tipo de transformação nos dados originais antes de iniciar a análise de PCA, de forma que as variáveis apresentadas passem a ter a mesma importância, ou seja, o mesmo peso. Um dos tipos de pré-processamento utilizado é o auto-escalamento, onde todos os dados são centrados na média e divide-se cada um pelo desvio-padrão.

Cada componente principal é uma combinação linear de todas as variáveis originais. Cada uma destas componentes principais, por sua vez, será escrita como uma combinação linear das variáveis originais. Nestas combinações, cada variável

terá uma importância ou peso diferente. Na PCA os gráficos de pesos (do inglês *loadings*) e escores (do inglês *scores*) trazem informações sobre as variáveis e as amostras, respectivamente, em função da magnitude de seus valores. Entretanto, a técnica PCA é uma análise multivariada que trata somente de variáveis independentes (X). Sendo assim, para a construção de modelos de QSPR e QSAR, é necessária uma ferramenta estatística que seja capaz de exercer a mesma função da PCA (reduzir o número de variáveis e fornecer uma ampla visão estatística do conjunto de dados) e, além disso, consiga correlacionar as variáveis independentes (X) com uma ou mais variáveis dependentes (Y). Com esta finalidade a técnica de regressão por análise dos mínimos múltiplos parciais (PLS, do inglês *Partial Least Square*) vem sendo cada vez mais utilizada.

A técnica de regressão por PLS tem por objetivo explicar uma ou mais variáveis dependentes (Y) em termos de um número de variáveis preditivas (X), como representado de maneira simplificada pela Equação 8.

$$Y = f(X) + E \quad (8)$$

A análise dos mínimos múltiplos parciais (PLS) é uma das ferramentas quimiométricas mais utilizadas para extrair e racionalizar a informação de qualquer descrição multivariada de um sistema biológico. A redução de complexidade e simplificação dos dados são duas das características mais importantes desta ferramenta.

PLS, assim como a PCA, condensa toda a informação em duas matrizes menores, chamadas de escore (que mostra o padrão dos compostos) e pesos (que mostra o padrão dos descritores). A matriz dos pesos contém poucos vetores,

chamados de variáveis latentes (LV, do inglês *Latent Variables*), os quais são obtidos como combinação linear das variáveis originais X. O conceito de LV é bem equivalente ao de PC em PCA. Os pesos e escores são interconectados de modo que mudanças nos pesos são refletidas por mudanças na posição dos compostos no gráfico de escores.

A principal diferença entre PCA e PLS, é que por PCA obtêm-se as PC as quais representam a melhor estrutura da matriz X, enquanto que por PLS obtêm-se as LV as quais são responsáveis por representar as estruturas das matrizes X e Y, e por maximizar o ajuste entre X e Y. Sendo assim, PCA é muito útil para uma visão geral dos dados, enquanto que PLS é útil para construção de modelos quantitativos. Os modelos gerados por PLS são preditivos e podem ser usados para prever valores de Y para novas moléculas, antes de elas serem avaliadas experimentalmente. A habilidade preditiva de um modelo PLS é atribuída à existência de uma relação verdadeira entre as propriedades medidas X (geralmente energias do campo de interação) e a propriedade medida Y (geralmente atividade de um fármaco para QSAR, ou alguma propriedade físico-química, como por exemplo, a partição, para QSPR).

1.6. Doença de Chagas e Produtos Naturais

A doença de Chagas é uma infecção causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, o qual é transmitido para o hospedeiro humano pelas fezes do inseto vetor hematófago, sendo o principal triatomíneo, o *Triatoma infestans*, conhecido popularmente como “barbeiro”. É uma das enfermidades humana mais relacionada com o subdesenvolvimento, o que torna ainda mais crítica a situação de milhões de paciente chagásicos. Embora a incidência da infestação no continente americano tenha decaído cerca de 70% por volta do ano de 2000⁴⁹ estima-se que há entre 16 a 18 milhões de infectados e cerca de 100 milhões, 25% da população, sob o risco de contrair a infecção na América Latina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO, 2006)⁵⁰.

A transmissão da doença ocorre principalmente por três mecanismos: através das picadas do barbeiro, por transfusão de sangue contaminado e por transmissão congênita⁵⁰. O controle do inseto vetor nas áreas endêmicas tem levado a uma eliminação da transmissão por picadas de inseto. Atualmente, a transmissão congênita e a transfusão sanguínea são as principais causas de transmissão da doença.

Apesar de ter sido descrita sua etiologia em 1909 pelo médico sanitarista Carlos Chagas, e desde então inúmeras tentativas de tratamento terem sido realizadas, até o momento não existe nem um fármaco totalmente eficaz para o tratamento da doença de Chagas. No final da década de 1960 e início de 1970 dois novos fármacos surgiram com melhores perspectivas para o tratamento da doença de Chagas tanto pelo potencial curativo, como pela tolerância: o nifurtimox

comercializado com o nome de *Lampit* e o benzonidazol comercializado com o nome de Rochagan® no Brasil e Radanil® na Argentina (Figura 10).

A produção do nifurtimox a partir da década de 1980 vem sendo descontinuada, inicialmente no Brasil e depois na Argentina, Chile e Uruguai, devido aos efeitos colaterais. O benzonidazol no Brasil está sendo passado pela Roche para o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Lafepe), o que demonstra o desinteresse da indústria farmacêutica na produção de medicamentos para a doença de Chagas. Considerados como “medicamentos sociais”, estão ligados à baixa demanda, restritos somente a alguns países na América Latina, para população de baixa renda e, portanto com pequena margem de lucro⁵¹.

Figura 10. Representação das estruturas dos dois fármacos atuais contra a Doença de Chagas: (a) Nifurtimox, (b) Benzonidazol

Os efeitos colaterais mais freqüentes apresentados pelo uso de nifurtimox são anorexia, perda de peso, excitabilidade psíquica ou sonolência e manifestações digestivas como náuseas, vômitos e ocasionalmente cólicas intestinais. Os efeitos colaterais apresentados devido ao uso de benzonidazol também são vários, porém um pouco menos severos⁵¹. Existem, entretanto, tentativas de se empregar outras substâncias, mas nenhuma delas apresenta resultados promissores até o presente. Por isso, a busca de novas substâncias químicas com atividade tripanossomicida é fundamental para a farmacoterapia da doença de Chagas⁵².

Produtos naturais tem sido uma rica fonte de fármacos em diversas áreas terapêuticas por décadas⁵³. Algumas moléculas da classe dos flavonóides vêm sendo utilizadas em estudos de atividade tripanossomicida^{54,55,56}, sendo que alguns flavonóides apresentam atividade frente à enzima glicossomal gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase g(GAPDH)Tc que é um alvo macromolecular importante para a descoberta de novos inibidores candidatos a agentes tripanossomicidas. Em estudos anteriores constatou-se que entre as classes de cumarinas, nucleosídeos e flavonóides, os flavonóides apresentam potência intermediária frente à enzima g(GAPDH)Tc, sendo que um dos descritores moleculares identificados como responsável por essa classificação é o coeficiente de partição e sua otimização provavelmente resultará no aumento da potência frente a enzima alvo⁵².

As propriedades dos flavonóides estão relacionadas com sua estrutura química, com as variações que ocorrem com a estrutura base (como hidroxilação e metoxilação) e com o grau de polimerização e conjugação. Estas moléculas são amplamente utilizadas como fármacos devido à ampla variedade de atividades biológicas que possuem, como por exemplo, propriedade antialérgica, antidiurética, antioxidante entre outras⁵⁷.

A classe dos flavonóides é uma grande família e possui seis subclasses: antocianidinas, flavonóis, flavonas, catequinas, flavononas e diidroflavonóis²⁶ (Figura 11).

Figura 11. Representação das estruturas das seis subclasses de flavonóides

A literatura atual apresenta pouco conhecimento sobre o metabolismo dos flavonóides e o modo como eles entram na circulação sistêmica após a absorção oral⁵⁸. Por outro lado, surgem inúmeros trabalhos relatando propriedades terapêuticas dos flavonóides. Sendo assim, o conhecimento sobre propriedades farmacocinéticas para esta classe de composto é de suma importância. Neste trabalho, o aspecto da interação de flavonóides com a membrana biológica foi estudado, através do mecanismo de partição apresentado por esta classe de compostos em componentes da membrana biológica (fosfatidilcolina e colesterol imobilizados artificialmente), visando um maior conhecimento sobre a absorção desta classe de compostos pelo organismo.

2. OBJETIVOS

O trabalho aqui apresentado tem a finalidade de descrever de forma apropriada a partição de alguns flavonóides naturais em constituintes da membrana biológica. Desta forma, tem-se como principal objetivo determinar a partição cromatográfica em constituintes da membrana biológica para uma série de flavonóides e elucidar as relações existentes entre a partição da membrana biológica e a estruturas químicas em estudo, utilizando para isto descritores físico-químicos e análise multivariada a fim de obter um modelo de QSPR.

Os flavonóides são moléculas que comprovadamente possuem inúmeras atividades biológicas. É de especial interesse para o grupo de Química Medicinal, do Instituto de Química de São Carlos (NEQUIMED-PN, grupo de estudos em química medicinal em produtos naturais), a potência de alguns flavonóides frente à enzima g(GAPDH)Tc, a qual já foi comprovada em estudos anteriores⁵². Dos flavonóides estudados, alguns apresentaram elevada potência contra a g(GAPDH)Tc, com propriedades farmacocinéticas indefinidas. Isto justifica o objetivo deste trabalho em estudar as propriedades ADME, em especial absorção, para esta classe de compostos.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Métodos Computacionais

Em estudos prévios⁵², foi construído um modelo classificatório relacionado à potência de algumas classes de moléculas (nucleosídeos, flavonóides e cumarinas) frente à enzima g(GAPDH)Tc, o qual é representado pela Figura 12. Neste modelo, a PC1 relaciona-se diretamente com a potência destas moléculas, sendo assim, as moléculas localizadas na região de maiores valores da PC1 (no caso, os nucleosídeos) apresentam elevada potência, já as moléculas localizadas na região onde a PC1 possui os menores valores (neste caso as cumarinas e os flavonóides), apresentam baixa potência.

Figura 12. Modelo de potência frente à enzima g(GAPDH)Tc para nucleosídeos, cumarinas e flavonóides⁵², e projeção de um conjunto de diversas moléculas no modelo.

Como um dos descritores moleculares identificados como responsável por essa classificação foi o coeficiente de partição, um estudo mais aprofundado para esta propriedade e sua otimização provavelmente resultará no aumento da potência frente à enzima alvo⁵². Baseando-se nestas informações, um conjunto de 65 moléculas de diversas classes (Tabela 1) foi projetado neste modelo a fim de se obter uma classificação sobre a potência destas moléculas frente à enzima g(GAPDH)Tc. A Figura 12 representa esta projeção, onde os pontos classificados por números referem-se às moléculas projetadas.

A escolha da série de moléculas a ser estudada, foi feita com base nesta projeção, e algumas moléculas localizadas nas regiões de elevada, moderada e baixa potência foram escolhidas para serem estudadas com relação ao caráter lipofílico. Esta série está representada na Figura 12 pelos números grifados, sendo que a maioria das moléculas escolhidas pertence à classe de flavonóides.

Desta forma, uma série de moléculas da classe de flavonóides foi escolhida para estudo de absorção, o qual foi feito por análises cromatográficas e por métodos computacionais. Inicialmente obteve-se a estrutura molecular 3D para as moléculas utilizando o programa *Sybyl* 7.3, posteriormente foi feito o cálculo do coeficiente de partição de cada molécula pelo programa *AB/LogP*^{59,60,61}.

A estrutura molecular 3D foi utilizada para gerar os MIF entre essas moléculas e as sondas de H₂O, DRY e O no programa VolSurf, e a partir desses campos de interações, foram gerados uma série de descritores os quais foram relacionados com os coeficientes de partição de cada composto, pela aplicação de PLS. As moléculas também foram projetadas nos modelos BBB e Caco-2, presentes no banco de dados do programa VolSurf. O conjunto de 21 moléculas de flavonóides naturais escolhido para estudos de absorção está representado na Tabela 1 (molécula de [1](#) a [22](#)).

Tabela 1. Representação estrutural das 65 moléculas projetadas no modelo de potência.

(51)

(52)

(53)

(54)

(55)

(56)

(57)

(58)

(59)

(60)

(61)

(62)

(63)

(64)

(65)

3.2. Método Cromatográfico

Para cada molécula da série escolhida, os coeficientes cromatográficos de partição foram determinados utilizando como fases estacionárias constituintes da membrana biológica; colesterol e fosfatidilcolina com diferentes graus de lipofilia. Para as análises cromatográficas, não foi possível considerar o conjunto completo

das moléculas selecionadas, pois não havia material suficiente disponível, já que todos estes compostos são produtos naturais e são de difícil obtenção. Nas colunas de fosfatidilcolina, das 22 moléculas selecionadas foi possível analisar 19 (onde as moléculas 01, 07 e 13 não participaram destas análises) e na coluna de colesterol analisaram-se 20 compostos (as moléculas 08 e 13 não foram analisadas nesta coluna). Vale a pena ressaltar que dos 19 compostos analisados nas colunas de fosfatidilcolina, 10 são moléculas hidroxiladas e 9 não hidroxiladas, e na coluna de colesterol dos 20 flavonóides analisados, 11 são hidroxilados e 9 não hidroxilados.

As análises foram feitas em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (HPLC-Shimadzu, série LC10AVP) usando como fase estacionária membranas imobilizadas artificialmente constituídas por fosfatidilcolina (IAM.PC.DD, 10cm x 4,6mm 300ANG; 5micron, IAM.PC.DD2, 10cm x 4,6mm 300ANG 12micron, da marca registech) e colesterol (Cholesteryl 10-Undecetonoato).

As medidas isocráticas de $\log k$ foram feitas variando a composição da fase móvel entre 80 e 20%v/v de metanol em tampão. O tampão utilizado era composto de trietanolamina, em pH = 7,4 ajustado com ácido clorídrico, EDTA e 2-mercaptoetanol. Utilizaram-se estas condições para o tampão com a finalidade de reproduzir da maneira mais aproximada possível, o meio onde foi desenvolvido o ensaio da atividade destes compostos frente a enzima g(GAPDH)Tc.

A fase móvel foi preparada com concentrações diferentes de tampão, a fim de considerar o efeito de diluição provocado pelo modificador orgânico (metanol), em cada proporção utilizada, e manter a força iônica constante em 100 mM, idêntica àquela para 100% de tampão. A fase móvel foi filtrada passando por uma membrana de nylon (0,20 μ m de poro e 47 mm de diâmetro) e desgaseificada antes de ser utilizada. As amostras foram filtradas passando por uma membrana hidrofóbica

(0,50 μm de poro e 13 mm de diâmetro) antes de iniciar as análises cromatográficas. As análises foram conduzidas com um fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, para as proporções de 0,2; 0,4; 0,6 de agente modificador, e $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ para a proporção de 0,8 de agente modificador. Os tempos de retenção de cada composto foram obtidos, utilizando um detector ultravioleta (*SPD-10AV vp Shimadzu UV-Vis Detector*) em 330 nm, e a concentração dos flavonóides estudados era de 0,2 mM.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e o valor do fator de retenção k foi calculado pela Equação 3(a), sendo que o tempo morto (t_0) nas colunas de fosfatidilcolina foi determinado utilizando ácido cítrico, e na coluna de colesterol foi determinado com a uracila. A temperatura de eluição foi mantida constante a 25°C , e o pH da fase móvel mantido em 7,4. Todas as equações de regressão (Equação 4) foram obtidas a partir do programa BILIN (KUBINYI, 1994)¹, e os valores dos coeficientes de partição cromatográficos foram obtidos pela extrapolação das retas, como demonstrado nas Figuras 14, 15 e 16.

¹ KUBINYI, H. Programa BILIN de regressão linear múltipla passo a passo. Comunicação pessoal, 1994.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Partição Cromatográfica

As medidas isocráticas de $\log k$ foram feitas para todas as amostras nas três colunas variando a quantidade de modificador orgânico dentro da faixa $0,2 \leq \phi \leq 0,8$, onde o comportamento é linear (segundo o modelo de Snyder). A Figura 13 apresenta os cromatogramas obtidos para a amostra 10, a título de exemplo representativo ao utilizar diferentes proporções de metanol (80, 60, 40 e 20%).

Figura 13. Cromatogramas da amostra 10, obtidos na coluna IAM.PC.DD2, utilizando 80, 60, 40 e 20% de metanol.

Os tempos de retenção foram determinados para cada amostra, nas diferentes composições de fase móvel utilizadas. Aplicando a Equação 3(a) ($k = (t_r - t_0)/t_0$) calcularam-se os valores de k de cada amostra, em cada proporção de agente modificador utilizado (ϕ), nas três colunas (Tabelas 2, 3 e 4).

Tabela 2. Valores de $\log k_{\text{wIAM}}$ obtidos em diferentes proporções de agente modificador (ϕ) nas colunas IAM.PC.DD.

Log k obtidos na coluna IAM.PC.DD						
Moléculas	$\phi = 0,2$	$\phi = 0,4$	$\phi = 0,5$	$\phi = 0,6$	$\phi = 0,7$	$\phi = 0,8$
2	1,66 ($\pm 0,03$)	0,43 ($\pm 0,08$)	-	-0,48 ($\pm 0,01$)	-	-1,32 ($\pm 0,01$)
3	1,29 ($\pm 0,30$)	0,22 ($\pm 0,01$)	-	-0,64 (0,01)	-	-1,81 ($\pm 0,01$)
4	1,30 ($\pm 0,12$)	0,06 (0,01)	-	-0,88 ($\pm 0,01$)	-	-1,30 ($\pm 0,01$)
5	1,06 ($\pm 0,04$)	0,04 ($\pm 0,01$)	-	-0,80 ($\pm 0,01$)	-	-1,22 ($\pm 0,01$)
6	2,41 ($\pm 0,11$)	1,11 ($\pm 0,11$)	-	-0,03 ($\pm 0,01$)	-	-0,91 ($\pm 0,01$)
8	0,96 ($\pm 0,01$)	-0,09 ($\pm 0,01$)	-	-0,97 ($\pm 0,01$)	-	-1,63 ($\pm 0,01$)
9	1,79 ($\pm 0,12$)	0,57 ($\pm 0,01$)	-	-0,47 ($\pm 0,01$)	-	-1,22 ($\pm 0,01$)
10	1,67 ($\pm 0,30$)	0,71 ($\pm 0,01$)	-	-0,21 ($\pm 0,01$)	-	-0,95 ($\pm 0,01$)
11	1,92 ($\pm 0,01$)	0,99 ($\pm 0,01$)	-	0,29 ($\pm 0,01$)	-	-0,09 ($\pm 0,01$)
12	2,47 ($\pm 0,32$)	1,52 ($\pm 0,12$)	-	0,67 ($\pm 0,02$)	-	0,09 ($\pm 0,01$)
14	2,22 ($\pm 0,21$)	1,29 ($\pm 0,10$)	-	0,39 ($\pm 0,01$)	-	-0,23 ($\pm 0,01$)
15	1,41 ($\pm 0,01$)	0,42 ($\pm 0,01$)	-	-0,44 ($\pm 0,01$)	-	-1,08 ($\pm 0,01$)
16	1,36 ($\pm 0,17$)	0,52 ($\pm 0,14$)	-	-0,07 ($\pm 0,01$)	-	-0,36 ($\pm 0,03$)
17	0,51 ($\pm 0,16$)	-0,28 ($\pm 0,03$)	-	-0,87 ($\pm 0,01$)	-	-1,47 ($\pm 0,02$)
18	2,07 ($\pm 0,31$)	1,58 ($\pm 0,18$)	-	0,76 ($\pm 0,10$)	-	0,15 ($\pm 0,01$)
19	-	0,98 ($\pm 0,15$)	0,62 ($\pm 0,08$)	0,28 ($\pm 0,01$)	0,07 ($\pm 0,01$)	-
20	1,70 ($\pm 0,22$)	0,95 ($\pm 0,13$)	-	0,24 ($\pm 0,01$)	-	-0,17 ($\pm 0,01$)
21	1,53 ($\pm 0,12$)	0,86 ($\pm 0,11$)	-	0,27 ($\pm 0,06$)	-	-0,06 ($\pm 0,02$)
22	-	1,86 ($\pm 0,03$)	1,18 ($\pm 0,02$)	0,67 ($\pm 0,02$)	0,30 ($\pm 0,01$)	-

(-) Valores não determinados experimentalmente

Tabela 3. Valores de $\log k_{wIAM}$ obtidos em diferentes proporções de agente modificador (ϕ) na coluna IAM.PC.DD2.

Log k obtidos na coluna IAM.PC.DD2						
Moléculas	$\phi = 0,2$	$\phi = 0,3$	$\phi = 0,4$	$\phi = 0,5$	$\phi = 0,6$	$\phi = 0,8$
2	1,91(±0,33)	-	0,77 (±0,01)	-	-0,18 (±0,01)	-0,83 (±0,01)
3	1,77 (±0,47)	-	0,60 (±0,14)	-	-0,34 (±0,01)	-0,96 (±0,01)
4	1,58 (±0,16)	-	0,41 (±0,02)	-	0,52 (±0,01)	-1,31 (±0,01)
5	1,59 (±0,82)	-	0,45 (±0,50)	-	-0,47 (±0,01)	-1,06 (±0,02)
6	2,61 (±0,78)	-	1,75 (±0,48))	-	0,61 (±0,02)	-0,34 (±0,01)
8	1,67 (±0,70)	-	0,60 (±0,56)	-	-0,38 (±0,01)	-1,14 (±0,01)
9	2,04 (±0,10)	-	1,32 (±0,03)	-	0,24 (±0,01)	-0,66 (±0,01)
10	2,35 (±0,45)	-	1,49 (±0,10)	-	0,39 (±0,01)	-0,42 (±0,01)
11	1,83 (±0,12)	-	1,04 (±0,04)	-	0,25 (±0,05)	-0,24 (±0,01)
12	2,22 (±0,62)	-	1,62 (±0,37)	-	0,77 (±0,07)	0,09 (±0,01)
14	2,04 (±0,58)	-	1,53 (±0,45)	-	0,66 (±0,01)	-0,05 (±0,01)
15	1,86 (±0,10)	-	0,97 (±0,17)	-	0,03 (±0,01)	-0,69 (±0,01)
16	1,46 (±0,27)	1,03 (±0,01)	0,56 (±0,04)	-	-0,15 (±0,01)	-0,47 (±0,01)
17	0,99 (±0,10)	0,56 (±0,01)	0,07 (±0,03)	-	-0,64 (±0,01)	-0,87 (±0,01)
18	-	2,27 (±0,38)	1,71 (±0,12)	-	0,77 (±0,35)	0,14 (±0,01)
19	1,83 (±0,01)	-	0,95 (±0,15)	-	0,20 (±0,01)	-0,21 (±0,01)
20	1,85 (±0,13)	-	0,97 (±0,13)	-	0,19 (±0,01)	-0,24 (±0,01)
21	1,61 (±0,08)	-	0,78 (±0,11)	-	0,11 (±0,01)	-0,22 (±0,01)
22	-	-	1,93 (±0,15)	1,26 (±0,16)	0,72 (±0,06)	0,022 (±0,01)

(-) Valores não determinados experimentalmente

Tabela 4. Valores de $\log k_{wCol}$ obtidos em diferentes proporções de agente modificador (ϕ) na coluna de Colesterol.

log k obtidos na coluna de Colesterol					
Moléculas	$\phi = 0,4$	$\phi = 0,5$	$\phi = 0,6$	$\phi = 0,7$	$\phi = 0,8$
1	-	1,31 ($\pm 0,10$)	0,78 ($\pm 0,16$)	0,64 ($\pm 0,18$)	0,05 ($\pm 0,15$)
2	-	1,32 ($\pm 0,06$)	0,78 ($\pm 0,05$)	0,39 ($\pm 0,06$)	0,05 ($\pm 0,01$)
3	-	1,24 ($\pm 0,01$)	0,94 ($\pm 0,02$)	0,34 ($\pm 0,01$)	0,03 ($\pm 0,05$)
4	-	1,09 ($\pm 0,02$)	0,56 ($\pm 0,18$)	0,15 ($\pm 0,03$)	-0,20 ($\pm 0,15$)
5	-	1,09 ($\pm 0,15$)	0,57 ($\pm 0,02$)	0,17 ($\pm 0,02$)	-0,17 ($\pm 0,01$)
6	-	2,02 ($\pm 0,82$)	1,35 ($\pm 0,08$)	0,83 ($\pm 0,15$)	0,39 ($\pm 0,15$)
7	-	2,19 ($\pm 0,23$)	1,74 ($\pm 0,07$)	1,00 ($\pm 0,24$)	0,45 ($\pm 0,01$)
9	-	1,75 ($\pm 0,03$)	1,04 ($\pm 0,02$)	0,50 ($\pm 0,05$)	0,06 ($\pm 0,01$)
10	2,31($\pm 0,08$)	-	1,16 ($\pm 0,07$)	0,68 ($\pm 0,05$)	0,33 ($\pm 0,01$)
11	-	0,67 ($\pm 0,08$)	0,23 ($\pm 0,05$)	-0,13 ($\pm 0,02$)	-0,45 ($\pm 0,01$)
12	-	1,17($\pm 0,06$)	0,71 ($\pm 0,05$)	0,33 ($\pm 0,05$)	0,02 ($\pm 0,15$)
14	-	1,34 ($\pm 0,15$)	0,87 ($\pm 0,07$)	0,48 ($\pm 0,08$)	0,15 ($\pm 0,15$)
15	1,83 ($\pm 0,39$)	1,28 ($\pm 0,02$)	0,81 ($\pm 0,06$)	0,38 ($\pm 0,01$)	0,08 ($\pm 0,01$)
16	0,95 ($\pm 0,25$)	0,47 ($\pm 0,03$)	0,07 ($\pm 0,01$)	-0,31 ($\pm 0,01$)	-0,85 ($\pm 0,01$)
17	0,52 ($\pm 0,02$)	0,04 ($\pm 0,01$)	-0,37 ($\pm 0,01$)	-0,77 ($\pm 0,01$)	-
18	-	1,23 ($\pm 0,06$)	0,81 ($\pm 0,05$)	0,37 ($\pm 0,01$)	0 ($\pm 0,01$)
19	1,05 ($\pm 0,31$)	0,62 ($\pm 0,06$)	0,21 ($\pm 0,01$)	-0,13 ($\pm 0,01$)	-0,20 ($\pm 0,01$)
20	1,11 ($\pm 0,13$)	0,67 ($\pm 0,03$)	0,26 ($\pm 0,01$)	-0,11 ($\pm 0,01$)	-0,42 ($\pm 0,01$)
21	0,85 ($\pm 0,06$)	0,43 ($\pm 0,03$)	0,06 ($\pm 0,03$)	-0,28 ($\pm 0,01$)	-0,56 ($\pm 0,01$)
22	-	1,33($\pm 0,02$)	0,79 ($\pm 0,01$)	0,26 ($\pm 0,07$)	-0,03 ($\pm 0,21$)

(-) Valores não determinados experimentalmente

Após a obtenção dos valores de $\log k$ em diferentes proporções de metanol, foi possível obter o coeficiente cromatográfico de partição $\log k_w$, por extrapolação da curva de $\log k$ *versus* ϕ , para todas as amostras. Os dados obtidos pelas análises estatísticas dos dados cromatográficos, obtidos para o conjunto completo de flavonóides analisados nas três colunas, estão representados nas Tabelas 5, 6 e 7.

Tabela 5. Análise estatística dos dados cromatográficos obtidos utilizando as colunas de fosfatidilcolina (IAM.PC.DD)

Moléculas	$\log k_{IAM.PC.DD} = -S\phi + \log k_{IAM.PC.DD}$	n	R ²	s	F	Q ²
2	$\log k_{IAM.PC.DD} = -4,93 (\pm 1,36)\phi + 2,53 (\pm 0,74)$	4	0,99	0,14	243,52	0,95
3	$\log k_{IAM.PC.DD} = -5,09 (\pm 0,73)\phi + 2,30 (\pm 0,40)$	4	0,99	0,08	906,49	0,99
4	$\log k_{IAM.PC.DD} = -4,37 (\pm 2,81)\phi + 1,98 (\pm 1,54)$	4	0,96	0,29	44,85	0,72
5	$\log k_{IAM.PC.DD} = -3,83 (\pm 2,09)\phi + 1,69 (\pm 1,15)$	4	0,97	0,22	62,17	0,80
6	$\log k_{IAM.PC.DD} = -5,55 (\pm 1,46)\phi + 3,42 (\pm 0,80)$	4	0,99	0,15	268,81	0,95
8	$\log k_{IAM.PC.DD} = -4,32 (\pm 1,30)\phi + 1,73 (\pm 0,71)$	4	0,99	0,13	203,62	0,94
9	$\log k_{IAM.PC.DD} = -5,03 (\pm 1,63)\phi + 2,69 (\pm 0,89)$	4	0,99	0,17	176,28	0,93
10	$\log k_{IAM.PC.DD} = -4,39 (\pm 0,78)\phi + 2,50 (\pm 0,43)$	4	0,99	0,08	581,70	0,98
11	$\log k_{IAM.PC.DD} = -3,37 (\pm 1,88)\phi + 2,46 (\pm 1,03)$	4	0,97	0,19	59,86	0,79
12	$\log k_{IAM.PC.DD} = -4,01 (\pm 1,26)\phi + 3,19 (\pm 0,69)$	4	0,99	0,13	188,48	0,93
14	$\log k_{IAM.PC.DD} = -4,13 (\pm 1,10)\phi + 2,98 (\pm 0,60)$	4	0,99	0,11	260,60	0,95
15	$\log k_{IAM.PC.DD} = -4,16 (\pm 1,19)\phi + 2,16 (\pm 0,65)$	4	0,99	0,12	225,32	0,94
16	$\log k_{IAM.PC.DD} = -2,87 (\pm 1,90)\phi + 1,80 (\pm 1,04)$	4	0,95	0,20	42,29	0,70
17	$\log k_{IAM.PC.DD} = -3,27 (\pm 0,74)\phi + 1,11 (\pm 0,40)$	4	0,99	0,08	364,62	0,97
18	$\log k_{IAM.PC.DD} = -3,26 (\pm 0,95)\phi + 2,77 (\pm 0,52)$	4	0,99	0,10	216,89	0,97
19	$\log k_{IAM.PC.DD} = -3,06 (\pm 1,10)\phi + 2,17 (\pm 0,62)$	4	0,99	0,06	141,93	0,91
20	$\log k_{IAM.PC.DD} = -3,16 (\pm 1,22)\phi + 2,26 (\pm 0,67)$	4	0,98	0,13	124,34	0,90
21	$\log k_{IAM.PC.DD} = -2,68 (\pm 1,19)\phi + 1,99 (\pm 0,65)$	4	0,98	0,12	94,34	0,87
22	$\log k_{IAM.PC.DD} = -5,20 (\pm 2,08)\phi + 3,86 (\pm 1,17)$	4	0,98	0,11	115,21	0,89

Tabela 6 Análise estatística dos dados cromatográficos obtidos utilizando as colunas de fosfatidilcolina (IAM.PC.DD2)

Moléculas	$\log k_{IAM.PC.DD2} = -S\phi + \log k_{IAM.PC.DD2}$	n	R ²	s	F	Q ²
2	$\log k_{IAM.PC.DD2} = -4,59 (\pm 1,67) \phi + 2,71 (\pm 0,91)$	4	0,99	0,17	140,82	0,91
3	$\log k_{IAM.PC.DD2} = -4,57 (\pm 1,88) \phi + 2,55 (\pm 1,03)$	4	0,98	0,19	109,78	0,88
4	$\log k_{IAM.PC.DD2} = -4,79 (\pm 1,31) \phi + 2,44 (\pm 0,72)$	4	0,99	0,14	247,48	0,95
5	$\log k_{IAM.PC.DD2} = -4,43 (\pm 1,87) \phi + 2,34 (\pm 1,02)$	4	0,98	0,19	103,92	0,88
6	$\log k_{IAM.PC.DD2} = -4,98 (\pm 0,79) \phi + 3,65 (\pm 0,43)$	4	0,99	0,08	738,10	0,99
8	$\log k_{IAM.PC.DD2} = -4,71 (\pm 1,05) \phi + 2,54 (\pm 0,58)$	4	0,99	0,11	370,57	0,97
9	$\log k_{IAM.PC.DD2} = -4,58 (\pm 1,03) \phi + 3,03 (\pm 0,56)$	4	0,99	0,11	366,30	0,98
10	$\log k_{IAM.PC.DD2} = -4,71 (\pm 0,83) \phi + 3,30 (\pm 0,46)$	4	0,99	0,09	594,46	0,99
11	$\log k_{IAM.PC.DD2} = -3,51 (\pm 1,07) \phi + 2,47 (\pm 0,59)$	4	0,99	0,11	198,02	0,94
12	$\log k_{IAM.PC.DD2} = -3,60 (\pm 0,68) \phi + 2,98 (\pm 0,37)$	4	0,99	0,07	519,05	0,99
14	$\log k_{IAM.PC.DD2} = -3,58 (\pm 1,06) \phi + 2,83 (\pm 0,58)$	4	0,99	0,11	212,05	0,96
15	$\log k_{IAM.PC.DD2} = -4,30 (\pm 0,70) \phi + 2,69 (\pm 0,38)$	4	0,99	0,07	699,49	0,99
16	$\log k_{IAM.PC.DD2} = -3,26 (\pm 1,11) \phi + 1,99 (\pm 0,57)$	5	0,97	0,17	86,78	0,84
17	$\log k_{IAM.PC.DD2} = -3,18 (\pm 1,32) \phi + 1,48 (\pm 0,67)$	5	0,95	0,20	58,35	0,77
18	$\log k_{IAM.PC.DD2} = -4,25 (\pm 1,45) \phi + 3,45 (\pm 0,81)$	4	0,99	0,13	159,16	0,92
19	$\log k_{IAM.PC.DD2} = -3,43 (\pm 1,66) \phi + 2,41 (\pm 0,91)$	4	0,97	0,17	79,44	0,84
20	$\log k_{IAM.PC.DD2} = -3,52 (\pm 1,59) \phi + 2,45 (\pm 0,87)$	4	0,98	0,17	90,52	0,86
21	$\log k_{IAM.PC.DD2} = -3,07 (\pm 1,72) \phi + 2,10 (\pm 0,94)$	4	0,97	0,18	58,55	0,79
22	$\log k_{IAM.PC.DD2} = -4,72 (\pm 1,34) \phi + 3,69 (\pm 0,83)$	4	0,98	0,13	125,06	0,90

As curvas representadas pelos parâmetros apresentados nas Tabelas 5 e 6 (Figuras 14 e 15) seguem o modelo linear de força do solvente (LSS) de Snyder ($k = -S\phi + \log k_w$). Para cada regressão, os seguintes requerimentos de significância foram observados: n = número de observações, R² = coeficiente de regressão, s = desvio padrão, F = Estatística de Fisher e Q² = Coeficiente de Validação Cruzada. Pelos valores de R² e Q² obtidos para cada reta, é possível observar que todas as retas apresentaram um bom ajuste linear ($0,96 < R^2 < 0,99$) e uma boa capacidade preditiva ($0,70 < Q^2 < 0,99$).

Figura 14. Coeficiente cromatográfico de partição ($\log k$) dos flavonóides estudados determinado por RP-HPLC utilizando IAM.PC.DD (retas em vermelho: flavonóides hidroxilados, retas em preto: flavonóides não hidroxilados)

Figura 15. Coeficiente cromatográfico de partição ($\log k$) dos flavonóides estudados determinado por RP-HPLC utilizando IAM.PC.DD2 (retas em vermelho: flavonóides hidroxilados, retas em preto: flavonóides não hidroxilados)

Tabela 7. Análise estatística dos dados cromatográficos obtidos utilizando a coluna de colesterol

Moléculas	$\log k_{\text{COL}} = -S\phi + \log k_{w\text{COL}}$	n	R^2	s	F	Q^2
1	$\log k_{\text{COL}} = -3,92 (\pm 2,63) \phi + \mathbf{3,24 (\pm 1,73)}$	4	0,95	0,14	41,14	0,86
2	$\log k_{\text{COL}} = -4,18 (\pm 1,37) \phi + \mathbf{3,35 (\pm 0,90)}$	4	0,99	0,07	172,86	0,93
3	$\log k_{\text{COL}} = -4,23 (\pm 1,79) \phi + \mathbf{3,38 (\pm 1,18)}$	4	0,98	0,09	103,02	0,94
4	$\log k_{\text{COL}} = -4,29 (\pm 1,22) \phi + \mathbf{3,19 (\pm 0,81)}$	4	0,99	0,06	228,54	0,94
5	$\log k_{\text{COL}} = -4,17 (\pm 1,30) \phi + \mathbf{3,13 (\pm 0,86)}$	4	0,99	0,07	190,04	0,93
6	$\log k_{\text{COL}} = -5,42 (\pm 1,52) \phi + \mathbf{4,67 (\pm 1,00)}$	4	0,99	0,08	235,87	0,95
7	$\log k_{\text{COL}} = -5,98 (\pm 1,56) \phi + \mathbf{5,23 (\pm 1,03)}$	4	0,99	0,08	271,88	0,97
9	$\log k_{\text{COL}} = -5,61 (\pm 1,80) \phi + \mathbf{4,48 (\pm 1,18)}$	4	0,99	0,09	180,84	0,93
10	$\log k_{\text{COL}} = -5,02 (\pm 1,57) \phi + \mathbf{4,26 (\pm 1,01)}$	4	0,99	0,11	189,33	0,91
11	$\log k_{\text{COL}} = -3,72 (\pm 0,83) \phi + \mathbf{2,51 (\pm 0,55)}$	4	0,99	0,04	373,77	0,97
12	$\log k_{\text{COL}} = -3,84 (\pm 1,03) \phi + \mathbf{3,05 (\pm 0,68)}$	4	0,99	0,05	258,53	0,95
14	$\log k_{\text{COL}} = -3,95 (\pm 0,97) \phi + \mathbf{3,28 (\pm 0,64)}$	4	0,99	0,05	310,13	0,96
15	$\log k_{\text{COL}} = -4,20 (\pm 0,84) \phi + \mathbf{3,51 (\pm 0,52)}$	5	0,99	0,08	275,02	0,95
16	$\log k_{\text{COL}} = -4,38 (\pm 0,49) \phi + \mathbf{2,69 (\pm 0,30)}$	5	0,99	0,05	807,66	0,99
17	$\log k_{\text{COL}} = -4,29 (\pm 0,58) \phi + \mathbf{2,21 (\pm 0,32)}$	4	0,99	0,03	1021,39	0,99
18	$\log k_{\text{COL}} = -4,12 (\pm 0,47) \phi + \mathbf{3,28 (\pm 0,31)}$	4	0,99	0,02	1427,62	0,99
19	$\log k_{\text{COL}} = -3,64 (\pm 0,61) \phi + \mathbf{2,46 (\pm 0,38)}$	5	0,99	0,06	356,90	0,96
20	$\log k_{\text{COL}} = -3,84 (\pm 0,51) \phi + \mathbf{2,61 (\pm 0,31)}$	5	0,99	0,05	585,00	0,98
21	$\log k_{\text{COL}} = -3,53 (\pm 0,49) \phi + \mathbf{2,22 (\pm 0,30)}$	5	0,99	0,05	524,01	0,97
22	$\log k_{\text{COL}} = -4,60 (\pm 1,79) \phi + \mathbf{3,58 (\pm 1,18)}$	4	0,98	0,09	121,88	0,90

Para as análises de partição cromatográfica na coluna de colesterol (Figura 16) os mesmos requerimentos de significância foram observados, sendo que as retas obtidas também seguem o modelo linear de força do solvente (LSS) de Snyder ($k = -S\phi + \log k_w$) e apresentam um bom ajuste ($0,95 < R^2 < 0,99$) e uma boa capacidade preditiva ($0,86 < Q^2 < 0,99$).

Figura 16 Coeficiente cromatográfico de partição ($\log k$) dos flavonóides estudados determinado por RP-HPLC utilizando Colesterol (retas em vermelho: flavonóides hidroxilados, retas em preto: flavonóides não hidroxilados)

4.2. Regressão Linear de Collander

Os valores de partição cromatográfica obtidos nas colunas *Cholesteryl 10-Undecetonoato*, IAM.PC.DD2, IAM.PC.DD (representados por $\log k_{wCol}$, $\log k_{wIAM.PC.DD2}$, $\log k_{wIAM.PC.DD}$, respectivamente) foram correlacionados com valores calculados de partição octanol/água ($\log P_{oct}$), sendo que as Equações (9) e (10) mostram as relações lineares obtidas entre os $\log k_w$ e $\log P_{oct}$ utilizando o conjunto completo das moléculas estudadas.

$$\log k_{wCol} = 0,41(\pm 0,06)\log P_{oct} + 2,35(\pm 0,17) \quad (9)$$

$$(n = 20; R^2 = 0,93; s = 0,23; F = 230,57; Q^2 = 0,90)$$

$$\log k_{wIAM.PC.DD2} = 0,25(\pm 0,11)\log P_{oct} + 2,14(\pm 0,31) \quad (10)$$

$$(n = 19; R^2 = 0,56; s = 0,39; F = 22,06; Q^2 = 0,47)$$

Pelas equações apresentadas acima é possível observar que a coluna de colesterol apresentou boa correlação linear com os valores de $\log P_{oct}$ ($R^2 = 0,927$) e boa capacidade preditiva, ($Q^2=0,904$). Portanto $\log k_{wCol}$ é considerado como um bom descritor para o coeficiente de partição octanol/água, mas determinado na coluna de colesterol.

A Equação (10) mostra que os dados obtidos em uma das colunas de fosfatidilcolina (IAM.PC.DD2) apresentou uma correlação linear pouco ajustada com o coeficiente de partição calculado. Já a correlação obtida entre os $\log k_{wIAM.PC.DD}$ e $\log P_{oct}$ não apresentou ajuste linear.

Os gráficos de $\log k_{wIAM.PC.DD}$ e $\log k_{wIAM.PC.DD2}$ *versus* $\log P_{oct}$ (Figura 17a e 17b) mostram que o conjunto de dados divide-se claramente em duas retas, uma que é composta pelos flavonóides hidroxilados e outra composta pelos flavonóides não hidroxilados. Este comportamento pode evidenciar diferenças na capacidade das moléculas em formar interações por ligação de hidrogênio.

Figura 17. (a) $\log k_{wIAM.PC.DD}$ versus $\log P_{oct}$ (b) $\log k_{wIAM.PC.DD2}$ versus $\log P_{oct}$

Considerando que o comportamento das moléculas hidroxiladas é bastante diferente das moléculas que não possuem grupos hidroxilas na sua estrutura, analisou-se novamente a correlação entre $\log k_{wIAM.PC.DD}$ vs. $\log P_{oct}$ e $\log k_{wIAM.PC.DD2}$ versus $\log P_{oct}$ considerando estes dois grupos de compostos separadamente (Equações de 11-14).

$$\log k_{wIAM.PC.DD(hidroxilados)} = 0,60(\pm 0,19)\log P_{oct} + 1,85(\pm 0,30) \quad (11)$$

$$(n = 10; R^2 = 0,86; s = 0,31; F = 50,04; Q^2 = 0,74)$$

$$\log k_{wIAM.PC.DD(não-hidroxilados)} = 0,42(\pm 0,22)\log P_{oct} + 0,86(\pm 0,80) \quad (12)$$

$$(n = 9; R^2 = 0,75; s = 0,29; F = 20,60; Q^2 = 0,53)$$

$$\log k_{wIAM.PC.DD2(hidroxilados)} = 0,52(\pm 0,15)\log P_{oct} + 2,05(\pm 0,22) \quad (13)$$

$$(n = 10; R^2 = 0,89; s = 0,23; F = 68,65; Q^2 = 0,81)$$

$$\log k_{wIAM.PC.DD2(n\tilde{a}o-hidroxilados)} = 0,36(\pm 0,14)\log P_{oct} + 1,55(\pm 0,51) \quad (14)$$

$$(n = 9; R^2 = 0,84; s = 0,19; F = 36,66; Q^2 = 0,67)$$

Quando consideramos os flavonóides hidroxilados e não hidroxilados separadamente, é possível observar que para estes dois conjuntos de moléculas existe uma correlação linear entre $\log P_{oct}$ e os coeficientes de retenção obtidos nas colunas de fosfatidilcolina. Isto sugere que os flavonóides que possuem hidroxilas em suas estruturas além da partição estão efetuando outros tipos de interações com a fosfatidilcolina. Este comportamento é possível, pois no pH em questão os flavonóides hidroxilados estão parcialmente ionizados, e podem estar efetuando interações eletrostáticas com as partes polares da coluna, e até mesmo com alguns grupos silanóis livres.

Utilizando todas as moléculas que foram eluídas em comum nas três colunas, foi possível fazer um estudo das relações entre os coeficientes cromatográficos de partição obtidos, Equações (15), (16) e (17).

$$\log k_{wIAM.PC.DD} = 0,880(\pm 0,26)\log k_{wIAM.PC.DD2} - 0,013(\pm 0,72) \quad (15)$$

$$(n = 19; R^2 = 0,745; s = 0,301; F = 49,59; Q^2 = 0,689)$$

$$\log k_{wIAM.PC.DD} = 0,53(\pm 0,40)\log k_{wCol} + 0,74(\pm 1,30) \quad (16)$$

$$(n = 18; R^2 = 0,33; s = 0,55; F = 8,00; Q^2 = 0,18)$$

$$\log k_{wIAM.PC.DD2} = 0,63(\pm 0,27)\log k_{wCol} + 0,68(\pm 0,89) \quad (17)$$

$$(n = 18; R^2 = 0,57; s = 0,38; F = 24,10; Q^2 = 0,50)$$

Pode-se observar que existe uma boa correlação entre os valores de $\log k_w$ obtidos nas colunas de fosfatidilcolina (Equação 15). Nesta relação linear a inclinação está próxima de 1 e o intercepto próximo de zero, o que representa a evidência de que as duas colunas apresentam mecanismos de retenção similares.

Os $\log k_w$ obtidos pelas colunas de fosfatidilcolina (IAM.PC.DD e IAM.PC.DD2) não apresentam boa correlação com os valores de $\log k_{wCol}$ (Equações 16 e 17) evidenciando que o mecanismo de retenção predominante nas colunas de fosfatidilcolina não é o mesmo que predomina na coluna de colesterol. Separando estes compostos em dois grupos (hidroxilados e não hidroxilados) e refazendo os mesmos cálculos obtêm-se as Equações (18) e (19), para os compostos hidroxilados.

$$\log k_{wIAM.PC.DD2(hidroxiladas)} = 1,27(\pm 0,49)\log k_{wCol(hidroxiladas)} - 0,95(\pm 1,39) \quad (18)$$

$$(n = 10; R^2 = 0,81; s = 0,31; F = 35,06; Q^2 = 0,71)$$

$$\log k_{wIAM.PC.DD(hidroxiladas)} = 1,43(\pm 0,63)\log k_{wCol(hidroxiladas)} - 1,53(\pm 1,79) \quad (19)$$

$$(n = 10; R^2 = 0,77; s = 0,39; F = 27,22; Q^2 = 0,63)$$

Os valores apresentados pelas Equações 18 e 19 mostram que ao comparar a retenção dos compostos hidroxilados nas colunas de fosfatidilcolina com a retenção na coluna de colesterol pode-se observar que existe uma boa correlação linear ($R^2 \cong 0,7$). Os coeficientes angulares próximos de 1 indicam que os mecanismos que regem a retenção destes compostos na fosfatidilcolina e no colesterol são similares. É possível sugerir que os flavonóides hidroxilados, parcialmente ionizados, estão interagindo com o grupo carbonila presente em ambas as colunas (Colesterol e IAM.PC).

Os dados obtidos nas colunas de fosfatidilcolina e colesterol para os compostos não-hidroxilados, apresentaram uma correlação linear pouco ajustada, o que sugere que para compostos neutros, o padrão de interação nas diferentes colunas não é o mesmo. Talvez o maior grau de lipofília apresentado pela coluna de colesterol seja o principal responsável pelas diferenças nas interações entre estas moléculas e as colunas.

4.3. Análise do coeficiente angular S

Na tentativa de evidenciar diferenças na capacidade de formação de interações de hidrogênio para o conjunto completo de compostos, ao serem analisados na coluna de colesterol, obteve-se o gráfico mostrado na Figura 18. Este gráfico representa a correlação entre o coeficiente angular, S , e os coeficientes de partição cromatográficos obtidos na coluna de colesterol, $\log k_{wCol}$.

Pode-se observar pela Figura 18 que, com 95% de confiança, existe uma boa correlação linear entre esses dados, e que o coeficiente angular da reta está bem próximo de 1. Isto indica que o mecanismo de interação, para todas essas moléculas, com a coluna de colesterol é muito semelhante. Nesta análise, as moléculas 16 e 17, apresentaram uma inclinação mais acentuada do que o esperado, o que significa que estas moléculas apresentam diferentes capacidades em realizar interações de hidrogênio. Devido a este comportamento, as moléculas 16 e 17 foram consideradas como *outliers* e, portanto, foram excluídas do cálculo da equação da reta (Equação 20).

Figura 18. Dependência linear de $-S_{COL}$ versus $\log k_{wCOL}$ para os flavonóides estudados

$$-S_{COL} = 0,83(\pm 0,13)\log k_{wCOL} + 1,50(\pm 0,45) \quad (20)$$

$(n = 18; R^2 = 0,92; s = 0,19; F = 186,40; Q^2 = 0,89)$

A Figura 19 representa a correlação entre $-S$ versus $\log k_{wIAM.PC.DD}$, $-S$ versus $\log k_{wIAM.PC.DD2}$.

Figura 19. (a) Relação entre $-S_{IAM.PC.DD}$ versus $\log k_{wIAM.PC.DD}$. (b) Relação entre $-S_{IAM.PC.DD2}$ versus $\log k_{wIAM.PC.DD2}$

É possível observar por esta figura que não existe uma correlação linear entre $-S$ versus $\log k_{wIAM.PC.DD}$, $-S$ versus $\log k_{wIAM.PC.DD2}$, ao analisar todos os compostos conjuntamente. Porém, analisando os compostos hidroxilados e não hidroxilados separadamente obtém-se uma relação linear para $-S$ versus $\log k_w$ em ambas as colunas. Este fato confirma que os compostos que possuem o grupamento hidroxila em sua estrutura apresentam diferentes capacidades em formar interações por ligação de hidrogênio com essas colunas, o que já era esperado, pois como já foi mencionado anteriormente, os flavonóides hidroxilados em pH 7,4, estão parcialmente ionizados.

Adicionalmente, na coluna IAM.PC.DD2, os compostos não hidroxilados apresentam valores de $-S$ iguais do ponto de vista estatístico, o que indica que estes compostos não estão fazendo interações de hidrogênio, e que o mecanismo predominante na sua retenção é a partição. O mesmo não pode ser dito para a retenção destes compostos na coluna IAM.PC.DD, pois neste caso os valores de $-S$ correlacionam-se linearmente com os valores de $\log k_w$ o que indica que estes compostos também estão fazendo interações de hidrogênio. Provavelmente isto ocorra, devido ao menor grau de lipofília apresentado pela coluna IAM.PC.DD.

Abaixo, as Equações de 21 a 23 representam as correlações entre $-S$ e os fatores de retenção obtidos nas colunas de fosfatidilcolina (sendo que as Equações consideram os compostos hidroxilados e não hidroxilados separadamente). Apesar de todas as moléculas hidroxiladas apresentarem uma relação linear para estes parâmetros em um nível de 95% de confiança, é possível observar que a molécula 17 apresenta um comportamento ligeiramente distinto em ambas as colunas, e, portanto o cálculo para as equações referentes a estas retas foi feito desconsiderando esta molécula.

$$-S_{IAM.PC.DD(não-hidroxilados)} = 0,87(\pm 0,46)\log k_{IAM.PC.DD(não-hidroxilados)} + 2,59(\pm 1,10) \quad (21)$$

$$(n = 9; R^2 = 0,74; s = 0,29; F = 20,04; Q^2 = 0,64)$$

$$-S_{IAM.PC.DD(hidroxilados)} = 1,17(\pm 0,21)\log k_{IAM.PC.DD(hidroxilados)} + 0,52(\pm 0,57) \quad (22)$$

$$(n = 9; R^2 = 0,96; s = 0,17; F = 172,61; Q^2 = 0,92)$$

$$-S_{IAM.PC.DD2(hidroxiladas)} = 0,83(\pm 0,26)\log k_{IAM.PC.DD2(hidroxiladas)} + 1,41(\pm 0,72) \quad (23)$$

$$(n = 9; R^2 = 0,89; s = 0,18; F = 56,71; Q^2 = 0,77)$$

4.4. Relação Quantitativa Estrutura Propriedade

4.4.1. Análise discriminante das moléculas

A energia de interação entre sondas químicas e os analitos rende informações valiosas sobre a natureza dos mecanismos de retenção. O campo de força GRID foi aplicado para calcular os campos de interações moleculares 3D, para todos os flavonóides analisados, os quais foram convertidos automaticamente em descritores moleculares mais simples através do procedimento VolSurf. Neste método, campos de interações moleculares com sondas de água, sondas hidrofóbicas e sondas de oxigênio carbonílico foram calculados ao redor das moléculas. Os descritores gerados foram quantitativamente correlacionados com dados de partição cromatográfica obtidos experimentalmente ($\log k_{IAM.PC.DD}$, $\log$

$k_{WIAM.PC.DD2}$ e $\log k_{wCol}$) e com valores de partição octanol/água (calculados pelo programa AB/LogP^{59,60,61}) através da análise de PLS.

Inicialmente foi feita apenas uma análise pré-classificatória das moléculas, segundo as diferentes interações entre suas estruturas 3D e as sondas de OH2, DRY e O, utilizando para isso PCA. A Figura 20 representa o gráfico de escore da PCA (PC2 *versus* PC1), sendo que a PC1 considera 53% da variância total.

Figura 20. PCA escores da PC2 *versus* PC1.

Pela análise deste gráfico podemos verificar o agrupamento dos compostos glicosilados em regiões negativas da PC1 (grupo (c) e (d)), e também há uma separação dos flavonóides hidroxilados, os quais encontram-se em regiões intermediárias (grupo (b)). Já as moléculas que não possuem hidroxilas em sua estrutura, localizam-se em regiões positivas da PC1 (grupo (a)). As moléculas 01 e 08, apesar de não possuírem o grupo hidroxila em sua estrutura, encontram-se na

região intermediária entre flavonóides glicosilados e hidroxilados, a molécula 07 apesar de ser hidroxilada está mais próxima do grupo (a) (grupo dos não hidroxilados), já no caso dos flavonóides glicosilados, a molécula 22 encontra-se desagrupada, e as moléculas 16 e 17 também não estão no grupo (c) como a maioria dos compostos glicosilados. Pelo gráfico de pesos da PCA (Figura 21) é possível compreender um pouco mais sobre quais parâmetros são responsáveis por estas separações.

Figura 21. Gráfico de pesos da PC1 *versus* PC2 para o modelo da Figura 20.

Os descritores de forma e tamanho (como volume e massa molecular) e de regiões hidrofílicas da molécula (como fator de capacidade, Cw, regiões hidrofílicas, W, interações de hidrogênio, HBO, entre outros) são responsáveis pelo agrupamento dos compostos glicosilados, o que permite concluir que estes compostos exibem

uma forte interação com as sondas de OH2 e O; já os flavonóides metoxilados, são descritos pelas sondas hidrofóbicas (DDRY). A molécula 22 provavelmente encontra-se separada dos demais flavonóides glicosilados devido a fatores relacionados à forma e tamanho (descritos por V e MW, por exemplo), para as moléculas 16 e 17, os fatores de regiões hidrofílicas determinam seu agrupamento (como interações por ligação de hidrogênio, HBO, e regiões hidrofílicas, WO).

4.4.2. Descritores Físico-Químicos versus $\log P_{\text{oct}}$ (AB/LogP)

Após a análise pré-classificatória, um modelo de PLS correlacionando $\log P_{\text{oct}}$ versus os descritores foi gerado, e apresentou um bom ajuste ($R^2 = 0,91$) e boa capacidade preditiva ($Q^2 = 0,78$) considerando três variáveis latentes. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Análise de PLS (22 objetos e 32X=descritores Y= $\log P_{\text{oct}}$)

PC	X VarExp	X Accum	SDEC	R^2	Q^2 (LOO)	SDEP
0	0	0	1,79	0	-0,10	1,83
1	56,20	56,20	1,07	0,65	0,54	1,2
2	10,80	66,99	0,64	0,87	0,75	0,90
3	8,611	75,61	0,53	0,91	0,78	0,85
4	4,85	80,45	0,46	0,93	0,76	0,88
5	4,93	85,38	0,41	0,95	0,72	1,00

A Figura 22 mostra o gráfico de R^2 e Q^2 versus o número de componentes necessárias para descrever o modelo.

Figura 22. Comparação entre os valores de ajuste (R^2) e validação (Q^2) para o modelo de PLS.

Como pode-se observar pela Figura 22 ambos os parâmetros estão em concordância com o aumento do número de componentes. Isto é muito importante devido ao fato da predição não diminuir com o aumento de componentes no modelo. A consistência de tal resultado é uma garantia de que as interações descritas pelas sondas utilizadas estão sendo capazes de descrever o fenômeno de partição. A correlação entre os $\log P_{\text{oct}}$ e os descritores calculados pelo VolSurf, está representada na Figura 23.

Figura 23. Gráfico de PLS correlacionando os descritores do VolSurf (T) com $\log P_{\text{oct}}$ (U).

A Figura 24 apresenta o gráfico de pesos para as duas primeiras componentes. A análise deste gráfico mostra que o coeficiente de partição octanol/água (representado no gráfico por Y1) correlaciona-se positivamente com descritores de regiões hidrofóbicas (quanto mais hidrofóbica a molécula, maior seu coeficiente de partição, isto está representado no gráfico pelos descritores DDRY, CP, EEFR, entre outros, os quais estão localizados na região positiva da PC1). Já, com relação aos descritores referentes a regiões hidrofílicas, como fator de capacidade, Cw, e interações de hidrogênio, HBO, a correlação com o $\log P_{\text{oct}}$ é negativa. O mesmo pode ser dito para os descritores referentes ao tamanho da molécula (como por exemplo os descritores de volume, V, e de superfície, S) o que pode ser compreendido pelo fato de que quanto maior a molécula, menor sua difusão no meio, e portanto menor a partição. Isso é confirmado, ao observar que o descritor de difusividade das moléculas correlaciona-se positivamente com a partição.

Figura 24. Gráfico de pesos de PC1 *versus* PC2 para o modelo da Figura 23. Y1 representa a variável dependente de partição.

Por meio desta análise, podemos concluir então que a PC1 representa o grau de hidrofobia das moléculas, e, portanto as moléculas mais hidrofóbicas estarão na região mais positiva da PC1 e as mais hidrofílicas na região mais negativa desta componente. Esta conclusão é confirmada pelo gráfico de escores, representado na Figura 25, sendo que as retas em azul, vermelho e amarelo, representam o limite de confiança do modelo. As moléculas localizadas à direita da reta em azul possuem caráter hidrofóbico, e à esquerda da reta em vermelho possuem caráter hidrofílico, já as moléculas localizadas entre estas duas retas, possuem caráter intermediário. Novamente, os agrupamentos apresentados pelo gráfico de escore da PCA da Figura 20 são confirmados pelo escore gerado por este modelo de PLS, e os

descritores responsáveis por estes agrupamentos são confirmados pelo gráfico de pesos da Figura 24.

Figura 25. PLS escores para a PC2 *versus* PC1.

A importância dos descritores está representada pelo gráfico de coeficientes, Figura 26, onde as barras representam a contribuição de cada descritor para o modelo. Os valores positivos das barras descritoras dos parâmetros implicam em uma correlação positiva de um determinado descritor com a variável Y (no caso $\log P_{\text{oct}}$). Quanto mais alta a barra maior a importância do descritor. As barras posicionadas verticalmente para baixo representam uma correlação negativa com $\log P_{\text{oct}}$, mas são tão importantes quanto os descritores que se correlacionam positivamente com a partição, dependendo também do tamanho da barra.

Figura 26. Gráfico de coeficientes da PLS

Pode-se concluir que a partição octanol/água está positivamente correlacionada com descritores da hidrofobia da molécula, em especial o que descreve a região hidrofóbica da molécula (DDRY) e o empacotamento crítico (CP). Por outro lado, os descritores de tamanho e forma, e de regiões hidrofílicas, correlacionam-se negativamente com $\log P_{\text{oct}}$. Os principais descritores das interações hidrofílicas são os que descrevem as regiões hidrofílicas, WO, interações de hidrogênio, HBO, fator de capacidade, Cw, e momento “integry”, lw, e os principais parâmetros referentes à tamanho são MW, V e S.

O gráfico dos valores preditos *versus* os experimentais, gerado por este modelo, está representado na Figura 27.

Figura 27. Gráfico dos valores de $\log P_{\text{oct}}$ predito pelo modelo *versus* os $\log P_{\text{oct}}$ calculados pelo programa AB/LogP

4.4.3. Descritores físico-químicos *versus* $\log k_{\text{WIAM.PC.DD}}$ e $\log k_{\text{WIAM.PC.DD2}}$

Com a finalidade de compreender melhor a natureza dos mecanismos de retenção das moléculas de flavonóides nas colunas de fosfatidilcolina, as sondas DRY, OH2 e O (as quais teoricamente descrevem as interações que ocorrem entre solutos e membranas biológicas) foram utilizadas para gerar descritores físico-químicos. A correlação destes descritores com o valor experimental do coeficiente de partição cromatográfica foi feita através da técnica de PLS. Os modelos obtidos por estas regressões apresentaram um bom ajuste ($R^2 = 0,70$, utilizando 5 variáveis latentes) porém a capacidade preditiva destes modelos foi muito baixa. Isto pode ter acontecido pelo fato de as sondas disponíveis para serem utilizadas nesta análise

não conseguirem representar de maneira completa os fatores que influenciam no mecanismo de retenção nestas fases estacionárias.

4.4.4. Descritores físico-químicos versus $\log k_{wCol}$

A mesma análise quimiométrica realizada para os valores obtidos nas colunas de fosfatidilcolina foi feita com os dados de retenção obtidos na coluna de colesterol. As sondas DRY, OH2 e O também foram utilizadas para a geração dos descritores físico-químicos, os quais foram correlacionados com os valores experimentais de partição cromatográfica por meio da análise de PLS. A validação do modelo foi feita pelo método de *Leave One Out* (LOO), *Leave Two Out* (LTO) e exclusão de grupos randômicos. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Análise de PLS (20 objetos e 32X=descritores Y= $\log k_{wCOL}$)

PC	X	X	SDEC	R ²	Q ²	SDEP	Q ²	SDEP	Q ²	SDEP	SDEV
	VarExp	Accum			(LOO)		(LTO)		(5grupos)		
0	0	0	0,74	0	-0,11	0,77	-0,11	0,78	-0,15	0,79	0,03
1	59,83	59,83	0,55	0,45	0,27	0,63	0,26	0,63	0,23	0,65	0,04
2	10,30	70,14	0,33	0,80	0,63	0,45	0,62	0,45	0,56	0,49	0,06
3	8,45	78,59	0,22	0,91	0,75	0,37	0,74	0,37	0,68	0,42	0,06
4	3,22	81,81	0,14	0,96	0,85	0,28	0,84	0,29	0,77	0,35	0,06
5	1,06	82,87	0,12	0,97	0,86	0,27	0,86	0,28	0,81	0,32	0,06

Como pode ser verificado pelos resultados, o modelo com dimensionalidade 4 apresenta um bom ajuste ($R^2 = 0,97$) e uma boa capacidade preditiva, tanto quando a validação cruzada é feita pelo método *Leave One Out* (LOO) ($Q^2 = 0,85$) como quando utilizamos o método de exclusão randômica, de grupos de 5 ($Q^2 = 0,77$).

A Figura 28 mostra o gráfico de R^2 e Q^2 versus o número de componentes necessárias para descrever o modelo. No caso deste modelo, o numero ideal de componentes é 4.

Figura 28. Comparação entre os valores de ajuste (R^2) e validação (Q^2) para o modelo de PLS.

Como pode-se observar pela Figura 28, como no caso da análise de PLS feita com os dados de $\log P_{\text{oct}}$, ambos os parâmetros estão em concordância com o aumento do número de componentes, o que é muito importante já que a predição não diminui com o aumento de componentes no modelo. A consistência de tal resultado é uma garantia de que as interações descritas pelas sondas utilizadas estão sendo capazes de descrever o fenômeno de partição na coluna de colesterol.

A correlação entre os $\log k_{wCol}$ e os descritores calculados pelo VolSurf, analisados pela PLS, está representada na Figura 29.

Figura 29. Gráfico de PLS correlacionando os descritores do VolSurf (T) com $\log k_{wCol}$ (U).

As Figuras 30 e 31 apresentam os gráficos de pesos e escores para as duas primeiras PCs. Y1 representa a partição cromatográfica obtida utilizando a coluna de colesterol como fase estacionária. A análise da Figura 30 mostra que a partição cromatográfica nesta coluna correlaciona-se positivamente com descritores de regiões hidrofóbicas (quanto mais hidrofóbica a molécula, maior seu coeficiente de partição, isto está representado no gráfico pelos descritores DDRY e CP, os quais estão localizados na região positiva da PC1). Já com relação aos descritores referentes a regiões hidrofílicas, como fator de capacidade, C_w , e interações de hidrogênio, HBO, a correlação com o $\log k_{wCol}$ é negativa. O mesmo pode ser dito para os descritores referentes a polarizabilidade (POL) e ao tamanho da molécula,

como V, S e MW, o que pode ser compreendido pelo fato de que quanto maior a molécula, menor sua difusão no meio, e portanto menor a partição.

Figura 30. Gráfico de pesos de PC1 *versus* PC2 para o modelo da Figura 29. Y1 representa a partição cromatográfica na coluna de colesterol.

Figura 31. Gráfico de escore para as duas primeiras componentes principais

O gráfico de escores reflete bem os itens descritos acima, sendo que os flavonóides glicosilados localizam-se na região negativa da PC1 (flavonóides com os menores $\log k_{wCol}$), e os flavonóides não hidroxilados (os que possuem maior hidrofobicidade, e os maiores valores de $\log k_{wCol}$) localizam-se na região positiva da PC1. Pode-se concluir então, que a PC1 reflete a hidrofobia das moléculas, sendo que as retas em azul, vermelho e amarelo, representam o limite de confiança do modelo. A molécula 07 e 22 apresentam-se desagrupadas dos seus prováveis grupos (a 07 deveria estar contida no grupo (b), pois é hidroxilada, e a 22 no grupo (c), pois é glicosilada), segundo o gráfico de pesos isto acontece devido à características de forma e tamanho destas moléculas. Já as moléculas 16 e 17, também deveriam estar contidas no grupo (c), já que são glicosiladas. Entretanto, estas moléculas agrupam-se em uma região mais negativa da PC1 e mais positiva

da PC2, pelo gráfico de pesos é possível verificar que isto indica que fatores de forma e de regiões hidrofílicas são determinantes para a separação destas moléculas. Este fato é bastante coerente com os dados obtidos experimentalmente, onde as moléculas 16 e principalmente a 17 apresentam um comportamento bastante diferenciado do conjunto analisado. A fim de verificar a importância dos descritores representados na Figura 30, um gráfico de coeficientes foi gerado (Figura 32). Pode-se concluir então, que os descritores de regiões hidrofóbicas gerados pela sonda DRY (DDRY) são os descritores mais importantes para descrever a partição cromatográfica e correlacionam-se positivamente com $\log k_{wCol}$. Já os descritores de regiões hidrofílicas gerados pela sonda de OH2 (como fator de capacidade, C_w , e interações de hidrogênio, HBO) correlacionam-se negativamente com a partição, sendo que o fator de capacidade e o descritor de regiões hidrofílicas são os descritores de correlação negativa que apresentam maior importância. Isso significa que o aumento de regiões hidrofóbicas favorece a partição.

Figura 32. Gráfico de coeficientes da PLS para o modelo global da correlação dos descritores do VolSurf com $\log k_{wCol}$

A Equação 24 representa a equação de predição do modelo. Utilizando 4 variáveis latentes, o modelo apresenta um ajuste de 86%, e 83% de capacidade preditiva.

$$\log k_{wColPREDITO} = 0,89(\pm 0,18)\log k_{wColExperimental} + 0,46(\pm 0,60) \quad (24)$$

$$(n = 20; R^2 = 0,86; s = 0,28; F = 106,73; Q^2 = 0,83)$$

A Figura 33 representa o gráfico de valores preditos *versus* experimentais.

Figura 33. Gráfico dos valores preditos *versus* os valores experimentais

4.4.5. *Projeção das moléculas estudadas em modelos de permeação BBB e Caco-2.*

A projeção do conjunto de compostos estudados no modelo de permeação da barreira hematoencefálica, (BBB, do inglês *Blood-Brain Barrier*) presente no banco de dados do VolSurf, está representada na Figura 34. Neste modelo, apenas 5 das 22 moléculas estudadas foram projetadas na região que contém compostos que apresentam elevada permeação em BBB (pontos em vermelho), as demais moléculas estão em regiões de compostos de permeação baixa ou intermediária (pontos em azul). Este resultado é conveniente, pois não existe o interesse de uma

molécula, que pode vir a ser candidata a fármaco para a doença de Chagas, atravessasse a barreira hematoencefálica.

Figura 34. Projeção das 22 moléculas estudadas no modelo de permeação da barreira hematoencefálica (azul: compostos impermeáveis; vermelho: compostos permeáveis; amarelo: moléculas estudadas)

A Figura 35 apresenta o resultado da projeção da série de flavonóides no modelo de permeação Caco-2 (CACO2). Neste modelo, apenas os flavonóides glicosilados encontram-se na região de baixa absorção, os flavonóides hidroxilados encontram-se na região intermediária e os metoxilados encontram-se na região de elevada absorção. A capacidade de permear células Caco-2 é importante, pois estas células são utilizadas para simular a absorção intestinal de fármacos, e todos os fármacos administrados oralmente necessitam atravessar a membrana intestinal. Além disso, a presença dos flavonóides hidroxilados entre a região de absorção intermediária e elevada absorção é um resultado interessante, pois estas moléculas

não são completamente hidrofóbicas, possuem valores consideráveis de coeficiente de partição cromatográfica em colesterol (em torno de 3,0) e são mais solúveis do que os flavonóides metoxilados, o que facilita a realização de testes biológicos.

Figura 35. Projeção das 22 moléculas estudadas no modelo de permeação de células Caco-2 (azul: compostos impermeáveis; vermelho: compostos permeáveis; amarelo: moléculas estudadas)

O modelo CACO2 classifica as moléculas estudadas em ordem crescente de absorção intestinal. A PC 1 representa o quanto uma molécula é capaz de permear as células Caco-2. Sendo assim, em regiões onde a PC 1 assume os menores valores, encontram-se as moléculas com menor permeabilidade nestas células. No caso, a molécula 16 (juntamente com o grupo de compostos glicosilados) é a menos absorvida enquanto que a molécula 15 (a qual pertence ao grupo dos flavonóides não hidroxilados) é a mais absorvida.

4.5 Mecanismos de Retenção

Para finalizar o trabalho, desenvolveu-se uma análise de PCA, a qual objetivou comparar os mecanismos de retenção apresentados para cada sistema utilizado (IAM.PC.DD2, IAM.PC.DD, Colesterol, $\log P_{\text{oct}}$ calculado) e também verificar quais destes sistemas, melhor representam a permeabilidade em células Caco-2. Para este estudo utilizou-se uma matriz $n \times m$, onde n representa os objetos (os flavonóides) e m as variáveis ($\log k_w$ obtidos nas três colunas, valores de permeabilidade em células Caco-2, preditos pelo modelo CACO2). Para esta análise de PCA utilizou-se como pré-processamento das variáveis originais o auto-escalamento. Após o pré-processamento, foi feito o cálculo dos *escores* dos dados e dos *loadings*.

Inicialmente na PCA deve-se analisar quantas componentes principais são necessárias para explicar uma porcentagem de variância suficiente para os objetivos em questão. Nesta análise o objetivo é verificar pelos gráficos de escores e pesos como as variáveis se correlacionam. Utilizando-se apenas duas componentes principais tem-se 94,3% de variância do modelo.

Analisando o gráfico de pesos (Figura 36) entre os fatores 1 e 2, observa-se que todas as variáveis possuem valores de PC 1 muito similares e negativos. Isto indica que a principal característica de retenção destes sistemas deve ser a mesma. Já na PC2 as variáveis $\log k_{\text{wIAM.PC.DD}}$ e $\log k_{\text{wIAM.PC.DD2}}$ tem um valor negativo, enquanto as variáveis $\log k_{\text{wCol}}$, $\log P_{\text{oct}}$ e permeabilidade em Caco-2 possuem valores positivos, sendo que $\log k_{\text{wCol}}$ e permeabilidade em células Caco-2 possuem praticamente o mesmo valor de PC 2.

Pelo gráfico de escores (Figura 37) é possível observar que os flavonóides que possuem uma maior lipofilia estão na região positiva da PC 2 e negativa da PC 1 (flavonóides não hidroxilados, representado na figura pelo grupo a), enquanto que os flavonóides que possuem uma maior hidrofília (flavonóides glicosilados, grupo b) estão na região mais positiva da PC 1. Para as moléculas com grau intermediário de lipofilia, flavonóides hidroxilados, grupo c, os valores de PC 1 e PC 2 são negativos.

Figura 36. Gráfico de pesos da PC 1 *versus* a PC2

Figura 37. Gráfico de escores da PC 1 *versus* a PC2: grupo (a) moléculas não hidroxiladas, (b) moléculas glicosiladas e (c) moléculas hidroxiladas

Pode-se concluir a partir destes resultados, que a partição das moléculas é baseada principalmente na lipofilia, por outro lado a PC 1 baseia-se na hidrofília, portanto as moléculas que estão na região mais negativa da PC 1 são as menos hidrofílicas. Isto é confirmado pela alta correlação inversa existente entre os valores de escores da PC 1 e os valores de $\log P_{\text{oct}}$ ($R^2 = 0,92$), Figura 38. Como consequência, a hidrofobia é a principal característica de retenção dos métodos.

Figura 38. Escores da PC 1 dos dados autoescalados para os cinco sistemas *versus* os valores de $\log P_{oct}$.

A PC 2 é capaz de discriminar dois grupos de variáveis, um composto pelos métodos que utiliza fosfatidilcolina e o outro composto pelos demais métodos. Observando o gráfico de escores cuidadosamente, é possível verificar que na região positiva da PC 2 encontram-se todas as moléculas que não possuem hidroxila na sua estrutura, já na região negativa da PC 2 encontram-se todas as moléculas que são hidroxiladas.

Isto indica que nas colunas de fosfatidilcolina as moléculas que possuem grupamentos hidroxilas apresentam uma maior retenção, enquanto que nos demais sistemas, esta característica é apresentada pelas moléculas não hidroxiladas. Este fato evidencia a existência de interações secundárias, além da partição, entre as moléculas hidroxiladas e as colunas de fosfatidilcolina. Isto confirma os resultados das análises cromatográficas onde todas as moléculas hidroxiladas na coluna de fosfatidilcolina apresentam um maior fator de retenção.

Nos métodos CACO2, $\log P_{\text{oct}}$ e partição em colesterol, as moléculas não hidroxiladas são as que possuem uma maior partição, o que novamente confirma que nestes sistemas a partição tem como fator determinante a lipofilia das moléculas.

Pode-se concluir então que a PC 2 representa os tipos de interações secundárias existentes entre as moléculas e os sistemas em questão. Por esta análise, fica evidente que os sistemas compostos por fosfatidilcolina apresentam interações secundárias bastante semelhantes, assim como os sistemas CACO2 e colesterol.

Tem-se então que o colesterol foi o sistema que melhor representou as interações que ocorrem no modelo de permeação CACO2.

5. Conclusões

Os coeficientes de partição de flavonóides naturais em fosfatidilcolina e colesterol foram obtidos utilizando-se a cromatografia a líquido avaliada em fase reversa. Pelas análises cromatográficas foi possível observar que quando correlaciona-se a fração de modificador orgânico (dentro da faixa de $0,2 < \phi < 0,8$) com os valores de $\log k_w$, as curvas obtidas seguem o modelo linear de força do solvente de Snyder ($k = -S\phi + \log k_w$), o que possibilitou a determinação de $\log k_w$ por extrapolação.

Obteve-se uma boa correlação entre $\log P_{\text{oct}}$ (calculado pelo programa AB/LogP) e $\log k_{w\text{Col}}$, demonstrando que $\log k_{w\text{Col}}$ é um bom descritor lipofílico, e pode ser usado para prever valores de $\log P_{\text{oct}}$ ($Q^2 = 0,904$). Já no caso da correlação entre $\log P_{\text{oct}}$ e os $\log k_w$ obtidos nas colunas de fosfatidilcolina não houve um bom ajuste linear para o conjunto completo de moléculas, mas uma nítida separação entre flavonóides hidroxilados e não hidroxilados foi obtida. Isto sugere que os flavonóides hidroxilados (os quais encontram-se parcialmente ionizados nas condições de análises) apresentam diferentes capacidades de formar interações por ligações de hidrogênio.

Correlações entre os $\log k_w$, obtidos nas diferentes colunas foram feitas, e pode-se observar que apenas as colunas de fosfatidilcolina (IAM.PC.DD e IAM.PC.DD2) apresentam mecanismos de retenção similares. No caso dos compostos hidroxilados, houve uma boa correlação entre os valores de $\log k$ obtidos nas colunas de fosfatidilcolina e $\log k_{w\text{Col}}$, o que sugere que para estes compostos os mecanismos de retenção na fosfatidilcolina e no colesterol são similares. Talvez este fato possa ser explicado por interações por ligações de hidrogênio que ocorrem

entre os flavonóides parcialmente ionizados e os grupos carbonilas presentes em ambas as fases estacionárias. Outra hipótese, é que as moléculas hidroxiladas estejam interagindo com os silanóis livres.

A correlação entre o coeficiente angular das curvas de Snyder, $-S$, e o coeficiente cromatográfico de partição, $\log k_w$ (obtidos para cada molécula nos três sistemas cromatográficos) foi feita e constatou-se que os flavonóides hidroxilados realmente apresentam diferentes capacidades em formar interações por ligações de hidrogênio nas colunas de fosfatidilcolina. Já no caso da retenção na coluna de colesterol obteve-se uma relação linear para o conjunto completo de moléculas, o que indica que todas as moléculas são retidas por mecanismos de interações similares.

Os descritores moleculares 3D, gerados por campos de interações moleculares entre os flavonóides e sondas químicas virtuais, não foram capazes de descrever o mecanismo de partição em fosfatidilcolina. Provavelmente isto tenha ocorrido porque as sondas DRY, OH2 e O não foram capazes de representar todos os parâmetros que influenciam a partição nestas colunas.

Os resultados obtidos pelo modelo de PLS, ao correlacionar os descritores moleculares 3D com o $\log k_{wCol}$, demonstram que é possível descrever e prever a partição em RP-HPLC para a coluna de colesterol, pela estrutura molecular 3D dos flavonóides. O coeficiente de partição cromatográfica em colesterol foi descrito utilizando-se os descritores moleculares calculados pelos campos de interações moleculares 3D. Os campos de interações moleculares gerados pelo programa GRID e codificados pelos descritores do programa VolSurf revelaram quais parâmetros físico-químicos influenciam sinergisticamente ou antagonicamente a partição da série de flavonóides em questão. Parâmetros relacionados à forma e tamanho,

lipofilia, interações de hidrogênio e balanço hidrofílico e lipofílico mostraram-se de fundamental importância para descrever a partição destas moléculas em colesterol.

A projeção do conjunto de flavonóides no modelo de permeação BBB e CACO2 possibilitou prever a capacidade dos solutos estudados em permear estas barreiras. Foi possível observar, que a ordem de classificação de permeabilidade obtida por estes modelos foi a mesma apresentada para a partição na coluna de colesterol.

Os resultados obtidos demonstraram que a partição obtida em colesterol é capaz de modelar a partição octanol-água, a permeabilidade da barreira hematoencefálica e a permeabilidade em células Caco-2. Além disso, o modelo de QSPR para a partição dos flavonóides em colesterol, apresentou uma explicação de 97% da variância total e uma predição de 86%.

6. Referências Bibliográficas

- ¹ KENNEDY, T. Managing the drug discovery/development interface. **Drug Discovery Today**, v. 2, p. 436-444, 1997.
- ² WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E. ADMET *in silico* modelling: towards prediction paradise? **Pfizer Global Research and Development**, v. 2, p. 192-204, 2003.
- ³ GILABERT, L. E.; MARTINEZ, J. J.; SAGRADO, S.; CAMAÑAS, R. M. V.; HERNÁNDEZ, M. J. M. Biopartitioning micellar separation methods: modelling drug absorption. **Journal of Chromatography B**, v. 797, p. 21-35, 2003.
- ⁴ CRUCIANI, G.; PASTOR, M.; GUBA, W. VolSurf: a new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.11, p. S29-S39, 2000.
- ⁵ YEN, T.E.; KUSTRIN, S. A.; EVANS, A. M.; NATION, R. L.; RYAND, J. Prediction of drug absorption on immobilized artificial membrane (IAM) chromatography separation and calculated molecular descriptors. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 472-478, 2005.
- ⁶ HANSCH, C.; LEO, A.; MEKAPATI, S. B.; KURUP, A. QSAR and ADME. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 3391-3400, 2004.
- ⁷ BERTSCHINGER, A; BARBATO, F.; QUERCIA, M. T.; CARRUPT, P.; REIST, M.; ROTONDA, M. I.; TESTA, B. Structural properties governing retention mechanisms on immobilized artificial membrane (IAM) HPLC columns. **Helvetica Chimica Acta**, v. 85, p. 519-532, 2002.
- ⁸ BERTSCHINGER, A. T.; CARRUPT, P. A.; BARBATO, F.; TESTA, B. Immobilized artificial membrane HPLC in drug research. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 655-665, 2003.
- ⁹ TAVARES, L. C. QSAR: a abordagem de Hansch. **Química Nova**, v. 27, p. 27-48, 2004.
- ¹⁰ OPREA, T. I. Current trends in lead discovery: Are we looking for the appropriate properties? **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v.16, p. 325-334, 2002.
- ¹¹ LÁZARO, E.; RÀFOLS, C.; ABRAHAM, M. H.; ROSÉS, M. Chromatographic estimation of drug disposition properties by means of immobilized artificial membranes (IAM) and C18 columns. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 4861-4870, 2006.
- ¹² YANG, C. Y.; CAI, S. J.; LIU, H.; PIDGEON, C. Immobilized Artificial Membranes-screens for drug membrane interactions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p. 229-256, 1996.

-
- ¹³ LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.
- ¹⁴ VALKÓ, K.; PLASS, M.; BEVAN, C.; REYNOLDS, D. ABRAHAM, M. H. Relationships between the chromatographic indices and solute descriptors obtained by using several reversed-phase, diol, nitrile, cyclodextrin and immobilised artificial membrane-bonded high-performance liquid chromatography columns. **Journal of Chromatography A**, v. 797, p. 41-55, 1998.
- ¹⁵ TOROPOV, A. A.; ROY, K. QSPR modeling of lipid -water partition coefficient by optimization of correlation weights of local graph invariants. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 44, p. 179-186, 2004.
- ¹⁶ ONG, S.; LIU, H.; PIDGEON, C. Immobilized-artificial-membrane chromatography: measurements of membrane partition coefficient and predicting drug membrane permeability. **Journal of Chromatography A**, v. 728, p. 113-128, 1996.
- ¹⁷ VALKÓ, K. Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution. **Journal of Chromatography A**, v. 1037, p. 299-310, 2004.
- ¹⁸ HSIEH, M.; DORSEY, J. G. Bioavailability estimation by reverse-phase liquid chromatography: high bonding density C18 phases for modeling biopartitioning processes. **Analytical Chemistry**, v. 67, p. 48-57, 1995.
- ¹⁹ CHAN, E. C. Y.; TAN, W. L.; HO, P. C.; FANG, L. J. Modeling Caco-2 permeability of drugs using immobilized artificial membrane chromatography and physicochemical descriptors. **Journal of Chromatography A**, v. 1072, p. 159-168, 2005.
- ²⁰ ONG, S.; LIU, H.; QIU, X.; BHAT, G.; PIDGEON, C. Membrane partition coefficient chromatographically measured using immobilized artificial membrane surfaces. **Analytical Chemistry**, v. 67, p. 755-762, 1995.
- ²¹ NASAL, A.; SZNITOWSKA, M.; BUCINSKI, A.; KALISZAN, R. Hydrophobicity parameter from high-performance liquid chromatography on an immobilized artificial membrane column and its relationships to bioactivity. **Journal of Chromatography A**, v. 692, p. 83-89, 1995.
- ²² PIDGEON, C.; ONG, S.; LUI, H.; QIU, X.; PIDGEON, M.; DANTZIG, A. H.; MUNROE, J.; HORNBAK, W. J.; KASHER, J. S.; GLUNZ, L.; SZCZERBA, T. IAM chromatography: An in vitro screen for predicting drug membrane permeability. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, p. 590-594, 1995.
- ²³ LEPONT, C.; POOLE, C. F.; Retention characteristics of an immobilized artificial membrane column in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 946, p. 107-124, 2002.

-
- ²⁴ CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EdUFSCAR, 2001. 27p.
- ²⁵ LAMBERT, W. J. Modeling oil-water partitioning and membrane permeation using reversed-phase chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 656, p. 469-481, 1993.
- ²⁶ TAILLARDAT-BERTSCHINGER, A.; GALLAND, A.; CARRUPT, P.; TESTA, B. Immobilized artificial membrane liquid chromatography: proposed guidelines for technical optimization of retention measurements. **Journal of Chromatography A**, v. 953, p. 39-53, 2002.
- ²⁷ SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W.; GANT, J. R. Gradient elution in high-performance liquid chromatography. I. Theoretical basis for reversed-phase systems. **Journal of Chromatography A**, v. 165, p. 3-30, 1979.
- ²⁸ VALKÓ, K.; SNYDER, L. R.; GLAJCH, J. L. Retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of mobile-phase composition. **Journal of Chromatography A**, v. 656, p. 501-520, 1993.
- ²⁹ PLISKA, V.; TESTA, B.; WATERBEEMD, H. **Lipophilicity in Drug Action and Toxicology**. Weinheim: VCH, 1996. v. 4, p. 72-87.
- ³⁰ RHEE, D.; MARKOVICH, R.; CHAE, W. G.; QIU, X.; PIDGEON, C. Chromatographic surfaces prepared from lyso phosphatidylcholine ligands. **Analytica Chimica Acta**, v. 297, p. 377-386, 1994.
- ³¹ REGIS TECHNOLOGIES. Disponível em: <www.registech.com/iam/>. Acesso em: 30 abr. 2007.
- ³² CATABAY, A.; OKUMURA, C.; JINO, K.; PESEK, J. J.; WILLIAMSEN, E.; FETZER, J. C.; BIGGS, W. R.. Retention behavior of large polycyclic aromatic hydrocarbons on cholesteryl 10-undecenoate bonded phase in microcolumn liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 47, p. 13-20, 1998.
- ³³ PESEK, J. J.; MATYSKA, M. T; WILLIAMSEN, E. J; TAM, R. Variable-temperature, solid-state NMR studies of bonded liquid crystal stationary phases for HPLC. **Chromatographia**, v. 41, p. 301-310, 1995.
- ³⁴ PESEK, J. J; MATYSKA, M. T; WILLIAMSEN, E. J.; TAM, R.; WANG, Z. Synthesis and characterization of liquid crystal type stationary phases on a silica hydride surface. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**. v. 21, p. 2747-2762, 1998.
- ³⁵ BUSZEWSKI, B.; JEZIERSKA, M.; KALISZAN, R.; WOJTCZAK, A.; ABERT, K.; BACHRNANN, S.; MATYSKA, M. T.; PESEK, J. J. Selectivity Tuning and Molecular Modeling of New Generation Packings for RP HPLC. **Chromatographia**, v. 53, p. S-204 S-212, 2001.

-
- ³⁶ LUCO, J. M.; SALINAS, A. P.; TORRIERO, A. A.; VAZQUEZ, R.; RABA, J.; MARCHEVSKY, E. Immobilized artificial membrane chromatog. and the quantitative structure-retention relationships of structurally diverse drugs. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 43, p. 2129-2136, 2003.
- ³⁷ LI, J.; SUN, J.; HE, Z. Quantitative structure-retention relationship studies with immobilized artificial membrane chromatography II: Partial least squares regression. **Journal of Chromatography A**, v. 1140, p. 174-179, 2007.
- ³⁸ RETA, M.; GIACOMELLI, L.; SANTO, M.; CATTANA, R.; SILBER, J. J.; OCHOA, C.; RODRIGUEZ, M.; CHANA, A. Determination of lipophilic descriptors of antihelminthic 6,7-diaryl-pteridine derivatives useful for bioactivity predictions. **Biomedical Chromatography**, v. 17, p. 365-372, 2003.
- ³⁹ CRUCIANI, G.; CRIVORI, P.; CARRUPT, P. A.; TESTA, B. Molecular fields in quantitative structure-permeation relationships: the VolSurf approach. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 503, p. 17-30, 2000.
- ⁴⁰ CRIVORI, P.; CRUCIANI, G.; CARRUPT, P. A.; TESTA, B. Predicting Blood-Brain Barrier Permeation from Three-Dimensional Molecular Structure. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 2204-2216, 2000.
- ⁴¹ GOODFORD, P. J. A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 28, p. 849-857, 1985.
- ⁴² BOOBBYER, D. N. A.; GOODFORD, P. J.; MCWHINNIE, P. M.; WADE, R. C. New Hydrogen-Bond Potentials for Use in Determining Energetically Favorable Binding Sites on Molecules of Known Structure. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 32, p. 1083-1094, 1989.
- ⁴³ CRUCIANI, G.; WATSON, K. A. Comparative molecular field analysis using GRID force-field and GOLPE variable selection methods in a study of inhibitors of glycogen phosphorylase *b*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 2589-2601, 1994.
- ⁴⁴ ZAMORA, I.; OPREA, T.; CRUCIANI, G.; PASTOR, M.; UNGELL, A. L. Surface Descriptors for Protein-Ligand Affinity Prediction. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 25-33, 2003.
- ⁴⁵ OPREA, T.; ZAMORA, I.; UNGELL, A. L. Pharmacokinetically based mapping device for chemical space navigation. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 4, p. 258-266, 2002.
- ⁴⁶ CRUCIANI, G.; CRIVORI, P.; CARRUPT, P. A.; TESTA, B. Molecular fields in quantitative structure-permeation relationships: the VolSurf approach. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 503, p. 17-30, 2000.

⁴⁷ MOLECULAR Discovery Today. Disponível em: <www.moldiscovery.com/>. Acesso em: 17 maio 2007.

⁴⁸ ALIFRANGIS, L. H.; CHRISTENSEN, I. T.; BERGLUND, A.; SANDBERG, M.; HOVGAAARD, L.; FROKJAER, S. Structure-Property for model membrane partitioning of oligopeptides. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 103-113, 2000.

⁴⁹ MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 577-591, 2003.

⁵⁰ UNICEF-UNDP World Health Organization Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Disponível em: <<http://www.who.int/ctd/chagas/burdens.htm>>. Acesso em: 11 set. 2006.

⁵¹ FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Disponível em: <www.fiocruz.br/chagas_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=62>. Acesso em: 16 jun. 2007.

⁵² LEITÃO, A.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G.; PUPO, M. T.; MARCHI, A. A.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V.; SÁ, M. M.; MORAES, V. R. S.; MONTANARI, C. A. Structure-Activity relationships of novel inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 2199-2204, 2004.

⁵³ NEWMAN, D. J. ; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

⁵⁴ PRYTZYK, E.; DANTAS, A. P.; SALOMÃO, K.; PEREIRA, A. S.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; NETO, F. R. A. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 189-193, 2003.

⁵⁵ TAKEARA, R.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C. Trypanocidal activity of *Lychnophora staavioides* Mart.(Vernonieae, Asteraceae). **Phytomedicine**, v. 10, p. 490-493, 2003.

⁵⁶ GRAEL, C.F.F.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, J. L. C. Chemical constituents of *Lychnophora pohlilii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. **Fitoterapia**, v. 76, p. 73- 82, 2005.

⁵⁷ WANG, S.; HUANG, K. Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p. 273-279, 2004.

⁵⁸ YODIM, K. A.; DOBBIE, M. S.; KUHNLE, G.; PROTEGGENTE, A. R.; ABBOTT, N. J. EVANS, C.R. Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: *in vitro* studies. **Journal of Neurochemistry**, v. 85, p. 180-192, 2003.

⁵⁹ TETKO, I. V.; GASTEIGER, J.; TODESCHINI, R.; MAURI, A.; LIVINGSTONE, D.; ERTL, P.; PALYULIN, V. A.; RADCHENKO, E. V.; ZEFIROV, N. S.; MAKARENKO, A. S.; TANCHUK, V. Y.; PROKOPENKO, V. V. Virtual computational chemistry laboratory - design and description. **Journal of. Computer. Aided Molecular Design.**, v. 19, p. 453-63, 2005.

⁶⁰ VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory, Disponível em: < <http://www.vcclab.org>>. Acesso em: 10 jun. 2007.

⁶¹ TETKO, I. V. Computing chemistry on the web. **Drug Discovery Today**, v. 10, p. 1497-500, 2005.