UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

KARINA SILVIA MATOS

Estudos computacionais e experimentais da permeabilidade celular de candidatos a fármacos

São Carlos 2016

KARINA SILVIA MATOS

Estudos computacionais e experimentais da permeabilidade celular de candidatos a fármacos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada Opção: Física Biomolecular Orientador: Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos 2016 AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Matos, Karina Silvia Estudos computacionais e experimentais da permeabilidade celular de candidatos a fármacos / Karina Silvia Matos; orientador Adriano Defini Andricopulo - versão corrigida -- São Carlos, 2016. 117 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

Absorção intestinal. 2. Holograma QSAR. 3.
 Permeabilidade celular Caco-2. 4. PAMPA . 5. ADME.
 I. Andricopulo, Adriano Defini , orient. II. Título.

Aos meus pais, Marlene Silva Matos e Antônio Claret de Matos. Gratidão pela presença constante, amizade e zelo, por todo suporte, e principalmente por apoiarem incondicionalmente os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos e Laboratório de Química Medicinal e Computacional, pela oportunidade de desenvolver esta etapa de minha formação profissional.

À FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Professor Adriano Defini Andricopulo, pela orientação, oportunidade, confiança no meu trabalho, pelos ensinamentos, apoio e dedicação para que esta etapa de minha formação acadêmica fosse concluída com êxito.

Ao Professor Tiago Luiz Moda, pela coorientação, pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados sobre modelagem molecular, pela dedicação e paciência, e pelas discussões essenciais ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À Wanessa Altei e à Luma Godoy Magalhães pelos conhecimentos compartilhados sobre o cultivo de células e ensaios celulares.

Ao Professor Fábio Cardoso Cruz, pelos ensinamentos, pela dedicação e apoio fundamentais na realização da etapa experimental deste trabalho.

À Professora Rosângela Gonçalves Peccinini e à sua competente equipe: Elias Carvalho Padilha, Marco Antonio Ferraz Nogueira Filho e Michel Leandro Campos pela colaboração, pelo desenvolvimento do método analítico e quantificação dos compostos, etapa essencial para a realização deste trabalho.

À Luma Godoy Magalhães por toda ajuda, pela solicitude e dedicação, pelo apoio e pelas incansáveis discussões, fundamentais para conclusão deste trabalho.

Às queridas Ivani Pauli, Luma Godoy Magalhães, Mariana Laureano de Souza e Wanessa Altei pela presença e evolução vivenciadas no dia a dia do laboratório tornando os dias mais leves. Pela amizade construída, pelo suporte nos momentos difíceis e por compartilharem os bons momentos.

Aos colegas do Laboratório de Química Medicinal e Computacional, às técnicas Simone Michelan Duarte e Renata Krogh pela convivência e aprendizados.

À Professora Nelma Regina Segnini Bossolan pela oportunidade de participar, durante o meu doutorado, do Programa de Formação de Professores da USP e pelos seus conhecimentos compartilhados, contribuindo significativamente para minha formação acadêmica.

Aos queridos amigos do grupo NEPE Paulo de Tarso pelas vivências compartilhadas, pelo acolhimento, pelos ensinamentos e sustento espiritual durante meu período em São Carlos. Aos queridos Artur Valadares e Flávia Contartesi pela condução dedicada dos nossos estudos, pela

amizade e por tantos conhecimentos compartilhados. À amiga Nayara Grande e todos os amigos da Sociedade Espírita Obreiros do Bem.

À querida Aline Alves Oliveira pela presença constante, pela amizade, por compartilhar momentos importantes da vida e por dividir durante muito tempo a nossa Casa das Flores.

Às colegas bailarinas que por muito tempo encheram meus dias em São Carlos de alegria, em especial à tribalista Milena Anselmo por compartilhar seus conhecimentos nessa arte.

À Renata Bueno pela amizade, apoio e por tantos aprendizados compartilhados no dia a dia em casa.

À Michelle Magalhães Maia, Melissa Soares Caetano, Rafaella Deslandes, Carina Romanielo e Angela Ramos, pela amizade e sustento, que mesmo à distância se fazem sempre presentes.

Às minhas sobrinhas Antonia Matos Paiva e Sophia Matos Paiva, que chegaram para inundar a alma de vida, amor e alegria.

Às minhas irmãs Lays Camila Matos e Fabiana Carolina de Matos pelo suporte incondicional, amizade, apoio, pelo carinho e confiança, e por acreditarem nos meus ideais.

Ao querido Rodrigo Antônio Cormanich pelo exemplo de disciplina, dedicação e amor ao conhecimento, por tantos anos compartilhando sonhos e experiências, por tantos aprendizados, lições e momentos vividos. Pelo apoio, incentivo e amor dedicados a mim.

Aos meus pais, Marlene Silva Matos e Antônio Claret de Matos, por todas as lições ao longo da vida, pela confiança nas minhas capacidades, pelo porto seguro que se fazem para mim. Pela amizade, zelo, suporte, carinho, amor e apoio incondicionais, sem os quais nada seria possível.

À Deus!

"Os dois dias mais importantes da sua vida são: o dia em que você nasceu, e o dia em que você descobre o porquê."

Mark Twain

RESUMO

MATOS, K. S. Estudos computacionais e experimentais da permeabilidade celular de candidatos a fármacos. 2016. 117 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Fisica de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

A absorção intestinal de fármacos (HIA, na sigla em inglês para human intestinal absorption) é um dos processos farmacocinéticos mais críticos para a ação de medicamentos administrados por via oral. Modelos in vitro baseados em células que mimetizam os enterócitos do intestino humano (células Caco-2), ou aqueles que utilizam membranas articifiais são muito utilizados no estudo da permeabilidade celular de moléculas bioativas. No processo de planejamento de fármacos, estas técnicas são frequentemente empregadas em paralelo com estratégias computacionais na avaliação de propriedades físico-químicas e farmacocinéticas. Nessa tese de doutorado foram desenvolvidos modelos computacionais para a predição da permeabilidade celular de compostos bioativos em células Caco-2 e em membrana artificial paralela (PAMPA, na sigla em inglês para Parallel Artificial Membrane Permeability Assay). Os modelos foram gerados através do método baseado em fragmentos moleculares holograma QSAR (HQSAR). Os indicadores estatísticos obtidos indicam a boa capacidade de correlação dos modelos Caco-2 e PAMPA para os dados utilizados na modelagem e o alto poder de predição destes modelos para a permeabilidade de um conjunto teste de compostos. Adicionalmente, os modelos foram avaliados quanto a sua capacidade preditiva frente a dois conjuntos de validação, constituídos por novas moléculas que foram planejadas e testadas experimentalmente durante o desenvolvimento deste trabalho. Para estes conjuntos, os modelos demonstraram alta capacidade de predição da permebildade tanto em células Caco-2 quanto em ensaios PAMPA. O processo de validação experimental foi essencial para a confirmação da robustez dos modelos desenvolvidos, que serão incorporados à base de dados de propriedades farmacocinéticas PK/DB (http://www.pkdb.ifsc.usp.br/), contribuindo desta forma para o seu aprimoramento. Os métodos computacionais e experimentais utilizados neste projeto permitiram o desenvolvimento de ferramentas úteis para a avaliação da absorção de fármacos administrados por via oral e para o planejamento de moléculas bioativas com propriedades farmacocinéticas otimizadas.

Palavras-chave: Absorção intestinal. Holograma QSAR. Permeabilidade celular Caco-2. PAMPA. ADME.

ABSTRACT

MATOS, K. S. Computational and experimental studies of the cellular permeability of drug candidates. 2016. 117 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Fisica de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Human intestinal absorption is a critical pharmacokinetics-related parameter for orally given drugs. In vitro models based on Caco-2 cells, which mimetize enterocytes, or those based on the parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) are broadly used in permeability studies of bioactive molecules. In drug discovery projects, these techniques are simultaneously used with computational methods to evaluate physico-chemical and pharmacokinetics properties. In this study, computational models to predict the cellular permeability of bioactive compounds in Caco-2 cells and in PAMPA assays were developed. The models were constructed by using the fragment-based method Hologram Quantitative Structure Activity Relationships (HQSAR). The obtained statistical indexes indicated the suitable correlation ability of the Caco-2 and PAMPA models for the employed data set, and the high predictive power for selected test set compounds. In addition, the HQSAR models were evaluated regarding their predictive ability against two validation sets, which are comprised by novel molecules that were designed and experimentally tested during this study. For these compounds, both the Caco-2 and PAMPA models demonstrated high predictive power. The process of experimental validation was an essential step for confirming the robustness of the developed models, which will be incorporated into the database of pharmacokinetic properties PK/DB (http://www.pkdb.ifsc.usp.br/), thus contributing to its improvement. The developed HQSAR models will be incorporated to the PK/DB pharmacokinetics database (http://www.pkdb.ifsc.usp.br/), thus contributing to its improvement. The molecular modeling and experimental methods employed in this study allowed for the development o robust tools for evaluating intestinal drug absorption and for the design of bioactive molecules with improved pharmacokinetics profiles.

Keywords: Human intestinal absorption. Hologram QSAR. Cell permeability Caco-2. PAMPA. ADME.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Panorama geral do processo de P&D até a aprovação de um fármaco22
Figura 2 -	Etapas do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos (ADME – absorção, distribuição, metabolismo e excreção; NDA – solicitação de novo fármaco, do inglês <i>New Drug Application</i>) ² 23
Figura 3 - 1	Principais etapas na geração de modelos de HQSAR27
Figura 4 - 1	Esquema de construção do holograma molecular28
Figura 5 - 1	Mecanismos de absorção de fármacos32
Figura 6 - '	Tendência de correlação geral entre permeabilidade em Caco-2 e HIA33
Figura 7-	Desenho esquemático do sanduíche de placas usado em PAMPA. A placa doadora preenchida com solução de fármacos e placa receptora com solução tampão, destaque para a direção do transporte do fármaco, da região apical (placa inferior) para basolateral (placa superior). O sanduíche é incubado em temperatura e umidade controladas, na presença ou ausência de agitação36
Figura 8 -	Conversão do composto MTS em formazan41
Figura 9-	Esquema do ensaio de permeabilidade em Caco-2. O fármaco é adicionado ao compartimento apical, e após um tempo determinado, é quantificada a concentração que atravessou a monocamada de células Caco-2 cultivadas e atingiu o compartimento basolateral
Figura 10	- Esquema do sistema poço e placa utilizado para o experimento de PAMPA
Figura 11	- Histograma da distribuição dos valores de permeabilidade em Caco-2 para o conjunto de dados
Figura 12 -	- Exemplos representativos do conjunto de dados
Figura 13	- Valores preditos contra experimentais de permeabilidade em células Caco-2 para ambos conjuntos, treinamento e teste
Figura 14	- Validação cruzada LMO para o conjunto treinamento de 470 compostos (LOO, $q^2 = 0,69$)60
Figura 15 -	- Estruturas dos compostos do conjunto de validação experimental61
Figura 16 -	- Viabilidade das células Caco-2 após 24 horas de incubação com os compostos em estudo, avaliada pelo método do reagente MTS65
Figura 17 -	- Viabilidade das células Caco-2 após 24 horas de incubação com os compostos em estudo, avaliada pelo método do reagente MTS

Figura 18 -	Formação de cristais dos compostos de validação durante a determinação da viabilidade celular
Figura 19 -	Exemplo de formação da monocamada de células Caco-2. Fotografia feita em microscópio invertido usando objetivas de 10x e 20x
Figura 20 -	Fluorescência intracelular da calceína na ausência e presença dos compostos verapamil e benzonidazol
Figura 21 -	Histograma da distribuição dos valores de permeabilidade em PAMPA para o conjunto de dados
Figura 22 -	Exemplos representativos do conjunto de dados da modelagem dos dados de PAMPA
Figura 23-	Valores preditos contra experimentais de permeabilidade em PAMPA para ambos conjuntos, treinamento e teste
Figura 24 -	Validação cruzada LMO para o conjunto treinamento de 65 compostos (LOO, $q2 = 0,69$)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de distinção de fragmentos no método HQSAR ⁴⁴
Tabela 2 - Resultados da análise de HQSAR para várias distinções de fragmentos, sobreos parâmetros estatísticos usando o tamanho de fragmento padrão (4-7)50
 Tabela 3 - Análise da influência da variação do tamanho de fragmentos (2-5, 3-6, 4-7, 5-8 e 6-9), sobre os parâmetros estatísticos chave, aplicando cinco distinções de fragmentos selecionadas: A/B/Ch/DA, A/B/DA, A/C/DA, A/B/C/DA, B/C/Ch/DA
 Tabela 4 - Resultados da validação externa para os modelos selecionados a partir da análise da influência da variação do tamanho de fragmentos (2-5, 3-6, 4-7, 5-8 e 6-9), sobre os parâmetros estatísticos chave, aplicando cinco distinções de fragmentos selecionadas: A/B/Ch/DA, A/B/DA, A/C/DA, A/B/C/DA, B/C/Ch/DA
Tabela 5 - Valores experimentais, preditos pelo modelo final (modelo 8) e residuais de permeabilidade em Caco-2 para os compostos do conjunto teste
Tabela 6 - Parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos preditos para os compostos de validação experimental do modelo HQSAR de permeabilidade em células Caco-2
Tabela 7 -Valores determinados de resistência elétrica transepitelial (RET) em Ω.cm², para os insertos distribuídos em duas placas de 12 poços
Tabela 8 - Permeabilidade em células Caco-2 determinada para os compostos em estudo
Tabela 9 - Valores de permeabilidade em células Caco-2 para os compostos em estudo
Tabela 10 - Classificação experimental e predita da permeabilidade em células Caco- 2 72
Tabela 11 - Moléculas dos conjuntos treinamento e teste e seus respectivos valores de logP _{app.PAMPA}
Tabela 12 - Resultados da análise de HQSAR para várias distinções de fragmentos sobreos parâmetros estatísticos usando o tamanho de fragmento padrão (4-7)79
 Tabela 13 - Análise da influência da variação do tamanho de fragmentos (1-3, 2-5, 3-6, 4-7 e 5-8), sobre os parâmetros estatísticos chave, aplicando oito distinções de fragmentos selecionadas: A/B/C/Ch, A/B/C, A/B/H, A/B/C/H, A/B/H/Ch, A/H/Ch/DA, B/H/Ch/DA e A/C/H
Tabela 14 - Resultados da validação externa para os modelos selecionados a partir da análise da influência da variação do tamanho de fragmentos (1-3, 2-5, 3-6,

4-7, e 5-8) sobre os parâmetros estatísticos chave, aplicando cinco distinções

	de fragmentos selecionadas: A/B/C/Ch, A/B/C, A/B/H, A/B/C/H, A/B/H/Ch, A/H/Ch/DA, B/H/Ch/DA, A/C/H
Tabela 15 - V	Valores experimentais, preditos pelo modelo final (modelo 26) e residuais de permeabilidade em PAMPA para os compostos do conjunto teste
Tabela 16 -	Valores experimentais, preditos e residuais para as moléculas do conjunto de validação e suas respectivas classificações baseadas no valor de Papp (Papp < $1.5 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ = baixa permeabilidade e Papp > $1.5 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ = alta permeabilidade)
Tabela 17 –	Valores de permeabilidade em células Caco-2 preditos e experimentais para o conjunto treinamento
Tabela 18 –	Valores experimentais e preditos de permeabilidade em PAMPA para o conjunto treinamento

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensionais
А	Átomo
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
В	Ligação
BBB	Permeação Em Barreira Hematoencefálica
BCS	Biopharmaceutics Classification System
BZ	Benznidazol
С	Conectividade
Caco-2	Células de Adenocarnima de Cólon
Calceína-AM	Calceína acetoximetil ester
Ch	Quiralidade
CRC	Cyclic Redundancy Check
DA	Doadores e Aceptores
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EMA	European Medicines Agency
F	Biodisponibilidade
FDA	Food and Drug Administration
GI	Gastrointestinal
Н	Hidrogênio
HL	Hologram Length
HQSAR	Hologram Quantitative Structure-Activity Relationships
HTS	High-Throughput Screening
IRB	Institutional review board
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LBDD	Ligand Based Drug Design
LMO	Leave-Many-Out
LOO	Leave-one-out
Μ	Mínimo
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MSS	Molecular Spreadsheet
	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-
MTS	carboximetoxifenil)-2-(4-sulfophenyl)-2H- tetrazolio]
Ν	Máximo
NCEs	New Chemical Entities
NDA	New Drug Application
OMS	Organização Mundial da Saúde
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento

Parallel Artificial Membrane Permeability Assay
Permeabilidade Aparente
Glicoproteína P
Principal Components Regression
Pharmaceutical Research and Manufacturers of America
Farmacocinéticos
Database for Pharmacokinetic Properties
Partial Least Squares
Peso Molecular
Ligação A Proteínas Do Plasma
Polar Surface Area
Quantitative Structure-Activity Relationships
Quantitative Structure-Properties Relationshisps
Resistência Elétrica Transepitelial
Solubilidade
Structure Activity Relationships
Structure Based Drug Design
Erro Padrão
Soro Fetal Bovino
World Precision Instruments

SUMÁRIO

1 1.1.	INTRODUÇÃO A Química Medicinal	. 21 . 21
1.2	Desenvolvimento de Fármacos	. 23
1.3	Planejamento Baseado na Estrutura do Receptor e do Ligante	. 24
1.4	Modelagem QSAR no Desenvolvimento de Fármacos	. 25
1.5	Holograma QSAR	. 27
1.6	Hologramas Moleculares	. 28
1.7	Outros Parâmetros no HQSAR	. 29
1.8	Farmacocinética	. 30
1.9	Permeabilidade	. 31
1.10	Células Caco-2	. 34
1.11	Ensaio de permeabilidade em mambrana artificial paralela – PAMPA	. 35
2 3 3.1	OBJETIVOS MATERIAIS E MÉTODOS Conjunto de Dados	. 37 . 39 . 39
3.2	Modelagem de HQSAR	. 39
3.3	Determinação da permeabilidade em células Caco-2	. 40
3.3.1	Cultivo de células Caco-2	. 40
3.3.2	Determinação da viabilidade celular na presença dos compostos em estudo - Citotoxicidade	. 41
3.3.3	Monitoramento da integridade da monocamada de células Caco-2: determinação da RET	. 42
3.3.4	Experimento de permeabilidade em células Caco-2	. 42
3.3.5	Ensaio de efluxo calceína-AM	. 44
3.4	Ensaio de permeabilidade em membrana paralela artificial – PAMPA	. 45
4 4.1	RESULTADOS E DISCUSSÃO Modelo de Permeabilidade em Caco-2	. 47 . 47
4.2	Validação experimental do modelo in silico de permeabilidade em Caco-2	. 60
4.2.1	Os compostos de validação	. 60
4.4.2	Determinação da viabilidade celular na presença dos compostos de validação – Teste de citotoxicidade	. 64
4.2.3	Formação das monocamadas de células Caco-2	. 67
4.2.4	Monitoramento da integridade das monocamadas de células Caco-2: determinação da RET.	. 68
4.2.5	Determinação da permeabilidade em células Caco-2	. 69
4.2.6	Permeabilidade em células Caco-2 predita e experimental	. 71

4.2.7	Ensaio de efluxo de Calceína-AM	73
4.3	Modelo de Permeabilidade PAMPA	76
4.4	Validação experimental do modelo in silico de permeabilidade PAMPA	86
5	CONCLUSÕES REFERÊNCIAS APÊNDICE	91 93 .03

1 INTRODUÇÃO

1.1. A Química Medicinal

A química medicinal possui caráter multidisciplinar e desempenha papel fundamental no processo de P&D de fármacos, abrangendo as áreas de química orgânica, bioquímica, farmacologia, informática, biologia molecular e estrutural, entre outras. De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, na sigla em inglês para International Union of Pure and Applied Chemistry), a química medicinal é uma disciplina com base em química, envolvendo a descoberta, planejamento e identificação de compostos biologicamente ativos, bem como o estudo do seu mecanismo de ação em nível molecular. Também envolve a investigação de fenômenos relacionados à suas propriedades farmacocinéticas (ADME, na sigla em inglês para absorption, distribution, metabolism and excretion) e às relações entre a estrutura química e atividade biológica.¹ Deste modo, a química medicinal busca por inovações terapêuticas com o objetivo de promover a saúde humana. Este processo é caracterizado por sua complexidade e envolve várias etapas, incluindo o estudo das vias bioquímicas, alvos moleculares e mecanismos que levam ao aparecimento e desenvolvimento de doenças.²⁻³ Desta forma, introduzir um fármaco no mercado é um processo longo, complexo, competitivo e requer a integração de elementos como inovação, conhecimento, tecnologia, e altos investimentos.⁴ Estima-se que desde a identificação de um composto até a sua aprovação pelo FDA (do inglês, Food and Drug Administration) são necessários em média de 12 a 15 anos de investimentos em PD&I (pesquisa, desenvolvimento e inovação).4-5 De acordo com relatórios recentes do PhRMA – sigla do inglês para Pharmaceutical Research and Manufacturers of America – o custo médio de desenvolvimento de um novo fármaco é de US\$ 2,6 bilhões. Além disso, menos de 12% dos candidatos a fármacos que alcançam a fase de desenvolvimento clínico (estágio no qual são realizados os testes em seres humanos) são aprovados pelo FDA (Figura 1).4,6



^{*}IND: Investigational New Drug Application; NDA: New Drug Appplication; BLA: Biologics License Application

Um estudo feito pela organização de pesquisa independente do Reino Unido, a Office of Health Economics, indicou que os custos de desenvolvimento de fármacos variam segundo a área terapêutica.⁷ As áreas de oncologia, neurologia e doenças respiratórias geralmente exigem maiores investimentos. Este estudo afirma ainda que os custos de desenvolvimento aumentaram quase 600% entre 1970 e 2000, o que pode estar associado ao maior interesse da indústria farmacêutica por doenças de alta complexidade, como doença de Alzheimer e câncer. O processo de desenvolvimento também ficou mais longo, passando de 6 anos em média, nos anos 1970, para 13,5 anos em 2000.7-8 Neste contexto, algumas companhias optaram por explorar outras oportunidades, como por exemplo a Novartis que anunciou como estratégia de longo prazo a intensificação das pesquisas em doenças que atingem um número menor de pacientes.⁷ Outra estratégia, adotada pela Pfizer, inclui a aquisição de companhias menores que possuem medicamentos da categoria blockbusters (termo da língua inglesa usado para definir medicamentos capazes de gerar receitas superiores a 1 bilhão de dólares por ano).^{7,9} Por outro lado, estas companhias farmacêuticas têm expressado a sua constante preocupação em relação ao número modesto de novas entidades químicas (NCEs, na sigla do inglês para new chemical *entities*) que têm chegado ao mercado farmacêutico a cada ano.¹⁰

Figura 1- Panorama geral do processo de P&D até a aprovação de um fármaco Fonte: Adaptada de PhRMA.⁴

1.2 Desenvolvimento de Fármacos

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é dividido em duas grandes fases (Figura 2): (i) pré-clínica ou pesquisa básica; e (ii) clínica.¹¹ Nos estágios iniciais da fase de descoberta (pré-clínica), geralmente o objetivo é a identificação e otimização de moléculas capazes de gerar NCEs com potencial de desenvolvimento clínico. Nesta etapa é importante a identificação e validação do alvo molecular ou receptor (macromolécula biológica que interage com o fármaco) e o estabelecimento da sua relevância no processo fisiopatológico em estudo. Nesta fase é necessário que se investigue o impacto da modulação seletiva do alvo molecular no tratamento ou na cura da doença de interesse. A compreensão dos mecanismos envolvidos na gênese e manutenção da doença permite que um alvo molecular específico seja explorado em todo o processo de descoberta e desenvolvimento, desde a identificação de um ligante até a otimização de um composto líder (*i.e.*, um composto que possui propriedades otimizadas e que é capaz de gerar uma NCE com potencial para desenvolvimento clínico).⁴



Figura 2 - Etapas do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos (ADME – absorção, distribuição, metabolismo e excreção; NDA – solicitação de novo fármaco, do inglês New Drug Application)²

Fonte: Adaptada de GUIDO et al.²

Após a identificação e validação do alvo molecular, inicia-se a busca por moléculas bioativas (ligantes) por meio de triagens biológicas, bioquímicas ou virtuais, ulitizando-se coleções de compostos que podem ser de origem natural ou moléculas obtidas por síntese orgânica. Dentre as abordagens utilizadas na indústria farmacêutica moderna destaca-se a triagem biológica automatizada em larga escala (HTS, na sigla do inglês para *high-throughput screening*), que emprega grandes coleções de compostos que podem ser testadas contra o alvo

molecular isolado, ou utilizando culturas de células (ensaios fenotípicos).^{10,12} Estas moléculas bioativas são submetidas a um processo de otimização de propriedades que visa a geração de compostos líderes; dentre estes os mais promissores são selecionados para a realização de testes pré-clínicos em modelos animais da doença, a fim de determinar parâmetros de eficácia e segurança. Estes testes determinam se o composto poderá adquirir o *status* de NCE e portanto ser conduzido à fase clínica de desenvolvimento.^{2,12} Neste processo, que dura vários anos, uma série muita extensa de estudos *in vitro* e *in vivo* são realizados para determinar propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e relacionadas à segurança e toxicidade do candidato à farmaco. Uma vez concluída a fase pré-clinica, a próxima etapa consiste na realização de um pedido de investigação de novo fármaco (IND, na sigla em inglês para *Investigational New Drug*), para a agencia que regula o setor, que no caso dos EUA é o FDA.

Na fase clínica, o candidato à fármaco é avaliado quanto a sua eficácia e segurança em seres humanos.^{4,13} Na fase clínica I, o candidato é avaliado em um pequeno grupo de indivíduos saudáveis para determinar principalmente a segurança do composto. Na fase clínica II os testes são realizados em grupos de pacientes que apresentam a doença investigada. Nesta fase também são determinados parâmetros relacionados a eficácia, segurança e posologia. A fase clínica III é conduzida com a utilização de milhares de pacientes para que dados estatisticamente relevantes sejam gerados. Se a NCE passar por estas três etapas, é submetido ao FDA um pedido de licença de novo fármaco (NDA, na sigla do inglês para *New Drug Application*). Este pedido deve conter todos os dados e resultados colhidos durante todo o processo de desenvolvimento, além da proposta de fabricação do novo medicamento.^{4,14}

1.3 Planejamento Baseado na Estrutura do Receptor e do Ligante

As estratégias atuais de planejamento de fármacos, adotadas tanto no contexto acadêmico quanto na indústria farmacêutica, podem ser divididas em duas categorias: (i) aquelas baseadas na estrutura do alvo molecular (SBDD, na sigla do inglês para *structure-based drug design*), e (ii) aquelas que se baseiam na estrutura do ligante (LBDD, na sigla do inglês para *ligand-based drug design*). As estratégias de SBDD dependem do conhecimento da estrutura tridimensional do alvo molecular. Neste tipo de abordagem, a determinação estrutural de complexos moleculares do tipo receptor-ligante permite a identificação de conformações bioativas e interações intermoleculares; conhecimento que é utilizado para modular propriedades do ligante como potência, afinidade e seletividade.^{3,10,15-16} Porém, quando não se conhece a estrutura tridimensional do alvo molecular, os métodos de planejamento de LBDD

podem ser utilizados. Nesta estratégia, coleções de compostos com estrutura e atividade conhecida são empregados para gerar relações que indiquem padrões moleculares que resultem em moléculas com propriedades superiores.^{3,10,15} O contexto atual de descoberta e planjemaneto de fármacos é caracterizado pelo emprego simultâneo de métodos de SBDD e LBDD.^{17–20}

Uma das estratégias mais importantes em SBDD e LBDD é a triagem virtual, uma alternativa com excelente relação custo-benefício que tem sido utilizada na descoberta de forma muito ampla nos centros de pequisa e desenvolvimento. Nesta abordagem, coleção virtuais de compostos são triadas utilizando filtros moleculares definidos a partir de compostos com atividade conhecida (LBVS, na sigla em inglês para *ligand-based virtual screening*), ou utilizando a estrutura 3D do alvo molecular (SBVS, na sigla em inglês para *structure-based virtual screening*). Através destas estratégias, grupos de moléculas podem ser selecionadas e testadas experimentalmente.^{21–24} A partir dos resultados experimentais, é possível estabelecer relações entre estrutura química e atividade biológica (SAR, na sigla do inglês par *structure-activity relationshisps*), que então são utilizadas na obtenção de series de compostos com as propriedades desejadas, que podem ser tanto parâmetros farmacodinâmicos como potência, quanto farmacocinéticos, como permeabidade.

1.4 Modelagem QSAR no Desenvolvimento de Fármacos

Dentre as estratégias de LBDD, destacam-se os métodos de relações quantitativas entre estrutura e atividade (QSAR, na sigla do inglês para *quantitative structure-activity relationshisps*) e entre estrutura e propriedade (QSPR, na sigla do inglês para *quantitative structure-property relationshisps*). Desde os trabalhos pioneiros do professor Corwin Hansch no início dos anos 1960, os métodos de QSAR evoluíram enormemente, e muitas técnicas utilizando os mais variados tipos de descritores moleculares surgiram recentemente, incluindo aqueles destinados à modelagem de propriedades farmacocinéticas.²⁵⁻²⁶ Hansch propôs inicialmente que a atividade biológica estava relacionada à estrutura molecular por meio da equação: log (1/C) = k_1 log P + $k_2\sigma$ + k_3 , onde, C é a concentração requerida de determinado composto para produzir uma respota, P é o coeficiente de partição octanol-água desse composto, σ é o parâmetro de substituição de Hammett e k_i é o coeficiente da equação.²⁶ A partir desta equação foram derivadas muitas outras, e hoje, diversos métodos matemáticos têm sido utilizados para gerar modelos de QSAR e QSPR. No entanto, a técnica mais utilizada é a regressão linear, que na sua forma mais simples é representada pela equação: y = mx + c, onde y e x são as variáveis dependente e independente, respectivamente. Nesta equação, y é a propriedade que se deseja modelar (variável dependente), e x é um descritor molecular (variável independente). O objetivo desta regressão é a identificação dos valores dos coeficientes m e cque minimizam a soma das diferenças entre os valores preditos e reais.²⁶ Entretanto, é comum a existência de mais de uma variável independente, e neste caso a regressão linear múltipla é utilizada, que pode ser simplificada na seguinte equação: $y = a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + \cdots$, onde x_i corresponde às diferentes variáveis independentes, e os coeficientes a_i indicam a contribuição da respectiva variável para a propriedade dependente y. Para resolver regressões multivariadas são utilizadas as técnicas de regressão das componentes principais (PCR, na sigla do inglês *principal components regression*) ou dos mínimos quadrados parciais (PLS, na sigla do inglês para *partial least squares*). As componentes principais derivadas da PCR, ou variáveis latentes derivadas da PLS, são combinações lineares das múltiplas variáveis independentes.^{26–30} Assim, as componentes principais ou variáveis latentes são utilizadas como novas variáveis na regressão linear múltipla. A PLS é a técnica mais utilizada para gerar modelos de QSPR utilizados na predição de propriedades ADME.^{17,26}

Modelos matemáticos desempenham um papel importante na química medicinal e quimio-informática. Uma uma vez validados, esses modelos constituem ferramentas úteis no planejamento e avaliação experimental de novas molélulas.^{26,31-32} Modelos de QSAR e QSPR com alto poder de predição podem apontar o espaço químico mais adequado a ser explorado na síntese de moléculas com propriedades físico-químicas, farmacodinâmicas e farmacocinéticas otimizadas.^{2,15,24,33–35} Dado que parâmetros farmacocinéticos inadequados são a principal causa de insucesso de candidatos a fármacos, a modelagem destas propriedades têm sido bastante empregada pela comunidade científica especializada, como uma ferramenta importante no processo de planejamento molecular.^{17,24,26,36–41} Além disso, estratégias computacionais quando integradas à métodos experimentais podem reduzir a utilização de animais em experimentos científicos, como sugere a diretiva da União Europeia relativa à proteção de animais.^{24,31,42-43}

Para o desenvolvimento de modelos robustos de QSAR, diversos requisitos devem ser observados. A propriedade biológica alvo deve ser obtida em condições experimentais padronizadas e apresentar um amplo espectro de valores.^{3,10,15} A modelagem de QSAR também exige que os conjuntos de dados a serem investigados apresentem boa diversidade química. O método estatístico utilizado deve ser selecionado considerando as características do conjunto de dados.³³⁻³⁴

1.5 Holograma QSAR

O método holograma QSAR (HQSAR) utiliza o método PLS para correlacionar a atividade biológica com determinados padrões de fragmentos moleculares. Na primeira etapa deste método, cada molécula é dividida em diferentes fragmentos que são organizados como uma sequência numérica denominada holograma molecular. O holograma é uma forma extendida de impressão digital que codifica todos os fragmentos possíveis (lineares, ramificados e cíclicos) de uma molécula, mantendo o número de vezes que cada fragmento ocorre.44 Para a conversão da representação química de uma molécula em seu holograma molecular correspondente, o método não requer informações 3D explícitas (estruturas tridimensionais), desta forma, o uso desta técnica de QSAR evita possíveis inconvenientes associados aos métodos de QSAR 3D como a sobreposição de estruturas tridimensionais, considerando que são empregadas apenas as estruturas 2D e os respectivos valores da propriedade biológica em questão.44-47 Diversos estudos indicam o alto poder preditivo dos modelos de HQSAR.^{15,25,38-46} O método de HQSAR emprega variações na composição do holograma, construindo diversas combinações de parâmetros tais como comprimento do holograma, tamanho e distinção de fragmentos, a fim de produzir modelos com parâmetros estatísticos consistentes (Figura 3).54



Figura 3 - Principais etapas na geração de modelos de HQSAR Fonte: Elaborada pela autora.

1.6 Hologramas Moleculares

Para todas as estruturas moleculares do conjunto de dados são gerados os seus hologramas moleculares correspondentes, incorporando todos os fragmentos possíveis. O holograma molecular se diferencia da impressão digital tradicional pelo tipo de notação, que nesta última é binária (contém apenas os caracteres 0 e 1).^{44,55} Na obtenção do holograma, para cada fragmento único gerado é atribuído um número inteiro positivo específico por meio de um algorítimo de checagem de redundância, que o codifica na forma de uma notação linear numérica. Cada fragmento é alocado em uma caixa dentro de um arranjo de comprimento fixo L (Figura 4).



Figura 4 - Esquema de construção do holograma molecular Fonte: Elaborada pela autora.

Esse arranjo de caixas é o holograma molecular, e a ocupação das caixas são os descritores, sendo que cada uma dessas posições no holograma contêm a identidade e o número de fragmentos alocados nesta posição. Desta forma, o holograma agrupa informações valiosas sobre as características moleculares, e a qualidade do modelo é diretamente influenciada pela forma como são distribuídos os fragmentos nas caixas dos hologramas. O cálculo do holograma molecular para um conjunto de estruturas produz uma matriz de dados com dimensões R x L, onde R é o número de compostos no conjunto e L é comprimento do holograma, o qual define o número de caixas de ocupação que irá compor o holograma. Este número geralmente varia de 50 a 500 posições.⁴⁴⁻⁴⁵ A maneira de alocar cada fragmentos. Este fenômeno acontece porque durante a fragmentação, fragmentos idênticos podem ser alocados na mesma caixa, e a

ocupância correspondente àquela caixa aumenta. Porém, como o comprimento do holograma geralmente é menor do que o número de fragmentos únicos, diferentes fragmentos podem ser alocados numa mesma caixa, produzindo portanto a colisão de fragmentos. Desta forma, alterações no comprimento do holograma, L, farão com que o padrão de ocupação das caixas mude, e consequentemente as colisões de fragmentos também serão alteradas. Alguns padrões de arranjo dos fragmentos no holograma molecular permitem que a análise PLS detecte facilmente a relação entre os fragmentos presentes no conjunto de dados e a variância na atividade biológica ou propriedade. Assim, são sugeridos 12 comprimentos de holograma padrão (53, 59, 61, 71, 83, 97, 151, 199, 257, 307, 353, 401 caixas) que para um certo número de conjuntos teste, produziram modelos preditivos.⁴⁵ Estes comprimentos de holograma padrão, os quais são números primos, minimizam a colisão de fragmentos, ou seja, a chance de fragmentos diferentes serem alocados na mesma posição do holograma.⁴⁵ Assim, a técnica PLS é usada para gerar um modelo estatístico que relaciona as variáveis independentes, ou seja, o número de ocupação das caixas no holograma, a uma variável dependente. O número de componentes ótimo que produz um modelo preditivo é determinado por validação cruzada do tipo deixe um fora (LOO, na sigla em inglês para leave-one-out).44

1.7 Outros Parâmetros no HQSAR

Além da influência do comprimento dos hologramas, já mencionada, o tamanho dos fragmentos também interfere na qualidade dos modelos. A escolha dos tamanhos mínimo (M) e máximo (N) de átomos dos fragmentos também é realizada, e a variação padrão é de M = 4 e $N = 7.^{44-45}$ Este intervalo foi definido através de testes realizados em vários conjuntos de dados diferentes.⁴⁵ Os fragmentos também podem ser distinguidos pelo tipo de átomo, ligação, conectividade, quiralidade e quanto à presença de átomos de hidrogênio.⁴⁴⁻⁴⁵ Os parâmetros de distinção de fragmentos são apresentados na Tabela 1.

Parâmetros de distinção de fragmentos	Definição
Atomos (A)	Permite que os fragmentos sejam distinguidos quanto aos tipos de átomos.
Ligação (B)	Permite que os fragmentos sejam distinguidos quanto aos tipos de ligações: simples, duplas, triplas e aromáticas.
Conectividade (C)	Permite que os fragmentos sejam diferenciados baseando-se no estado de hibridização dos átomos contidos no fragmento.
Hidrogênio (H)	Distingue os fragmentos quanto a presença e número de átomos de hidrogênio.
Quiralidade (Ch)	Permite que os fragmentos sejam distinguidos com base na presença de átomos com centros quirais.
Doadores e Aceptores (DA)	Distingue os fragmentos com base na presença de átomos receptores ou doadores de ligação de hidrogênio.

Tabela 1 - Parâmetros de distinção de fragmentos no método HQSAR⁴⁴

Fonte: Elaborada pela autora.

1.8 Farmacocinética

Um fármaco em processo de desenvolvimento deve interagir com o alvo biológico em ensaios *in vitro*. No entanto, o ligante também deve ser capaz de alcançar o seu sítio de ação no organismo humano. Para que isso ocorra é preciso que a molécula atravesse diversas barreiras biológicas, tais como membranas celulares e a barreira hematoencefálica. Para promover o efeito terapêutico desejado, o fármaco deve permanecer no corpo por um período de tempo apropriado, e finalmente deve ser metabolizado e eliminado. Todos estes estes aspectos são estudados pelo ramo da farmacologia denominado farmacocinética.^{26,56} Os estudos de farmacocinética são fundamentais em diversas etapas do planejamento de fármacos, desde a fase de descoberta e otimização de NCEs até a fase de desenvolvimento clínico.⁵⁶⁻⁵⁷ Há duas décadas atrás, 40% dos casos de insucesso no desenvolvimento clínico de NCEs era atribuído a propriedades farmacocinéticas inadequadas e a toxicidade.^{10,36,58-59} Nos últimos 10 anos, contudo, esta porcentagem foi reduzida significativamente, o que se deve aos avanços alcançados no estudo de propriedades farmacocinéticas.⁶⁰ O desenvolvimento de modelos cada vez mais preditivos para propriedades farmacocinéticas, continua sendo um dos principais desafios para os programas de desenvolvimento das companhias farmacêuticas.^{36,58,61-63}

A farmacocinética se refere à investigação das causas das alterações da concentração do fármaco ao longo do tempo.^{46,64} Para determinar as características de ação dos fármacos após a sua administração, como a velocidade em que se inicia a ação, a intensidade e a duração do seu efeito no organismo, são avalidas as propriedades ADME.⁵⁷ A absorção é a transferência de um fármaco do seu sítio de administração para a corrente sanguínea através de diferentes mecanismos. A distribuição é o processo pelo qual um fármaco reversivelmente deixa a corrente sanguínea e entra no interstício (fluido extracelular) e, em seguida, nas células dos tecidos para atingir o sítio de ação, podendo também, ser biotransformado e metabolizado pelo fígado e outros tecidos. Finalmente, o fármaco e seus metabólitos são eliminados do corpo junto à urina, bile e fezes.⁵⁷ A otimização dos parâmetros de ADME auxilia no ajuste da dosagem para que uma concentração plasmática ideal seja alcançada, levando ao efeito terapêutico desejado.^{46,64}

1.9 Permeabilidade

A via oral é o modo de administração mais desejável para um fármaco, o que eleva muito o interesse no desenvolvimento de princípios ativos que possam ser absorvidos eficazmente através do epitélio intestinal. Uma vez administrados por via oral, os fármacos devem ser dissolvidos e solubilizados no trato gastrointestinal (GI), e posteriormente absorvidos no estômago ou intestino para alcançar a circulação sanguínea.^{41,57,65} Dissolução, solubilidade aquosa e a habilidade de permear o trato gastrointestinal são parâmetros frequentemente considerados como barreiras para a biodisponibilidade do fármaco na circulação sistêmica, reduzindo os efeitos terapêuticos. Assim, é essencial encontrar candidatos a fármacos que possam ser efetivamente absorvidos através do epitélio intestinal. Por esta razão, a permeabilidade de uma molécula bioativa através de membrana celulares intestinal é um requisito essencial para um bom candidato a fármaco.^{26,66-67}

O principal mecanismo de absorção intestinal em humanos é a difusão passiva através do transporte paracelular, que ocorre entre as junções celulares ou pelo transporte transcelular, que ocorre através do citoplasma. Outro mecanismo importante é o transporte ativo, processo que requer energia. O processo de efluxo, no qual algumas substâncias que entram no citoplasma das células são transportadas de volta ao lúmen intestinal, ocorre por meio de transportadores, como a proteína transmembrana, glicoproteína P (P-gp) (Figura 5).^{57,62}



Figura 5 - Mecanismos de absorção de fármacos Fonte: Adaptada de CLARK et al.⁵⁷

A estimativa da absorção intestinal de fármacos com base unicamente em parâmetros físico-químicos (por exemplo, pK_a , lipofilia e solubilidade) não tem apresentado sucesso. Usualmente são utilizados modelos in vitro da mucosa intestinal.⁶² Estes modelos in vitro permitem acessar a absorção através da avaliação da permeabilidade em membranas, sendo um dos parâmetros fundamentais para a absorção de fármacos por via oral.^{26,68-70} A triagem de grandes bibliotecas de compostos para avaliar a absorção oral é um processo complexo e requer o uso de variados métodos in vitro, tais como o sistema de monocamada de células Caco-2 (derivadas de adenocarcinoma de cólon), e células MDCK (na sigla do inglês para Madin-Darby canine kidney), derivadas de rim canino.^{17,71-72} Modelos baseados em células humanas, como o sistema Caco-2, tem sido larga e eficientemente usado nos estudos de permeabilidade intestinal.^{38,58,62,73} O sistema de classificação biofarmacêutica (BCS, sigla do inglês para biopharmaceutics classification system), criado em 1995, é uma ferramenta para predizer a absorção de fármacos administrados por via oral. De acordo com a sua solubilidade aquosa e sua permabilidade intestinal, os compostos são classificados dentro de quatro grupos pelas normas do BCS: Classe I (alta solubilidade, alta permeabilidade), Classe II (baixa solubilidade, alta permeabilidade), Classe III (alta solubilidade, baixa permeabilidade) e Classe IV (baixa solubilidade, baixa permeabilidade). Com base nestes critérios, o FDA implementou o Guia BCS, que suporta isenções de estudos clínicos de bioequivalência de fármacos da classe BCS I, que são altamente soluveis e permeáveis. O Guia BCS FDA descreve muitas metodologias para determinar a classificação e demonstrar a bioequivalência.⁷⁴ A Classe BCS pode ser determinada pela medida das taxas de permeabilidade efetiva (Peff) através da membrana jejunal, ou alternativamente, pelas taxas de permeabilidade aparente (Papp) através de monocamadas de células epiteliais *in vitro*, tais como a linha de células Caco-2, em relação a um padrão de referência de alta permeabilidade.⁷⁴

O FDA recomenda o sistema de monocamada de células Caco-2 como o modelo mais adequado para estimar a permeabilidade intestinal, devido a sua habilidade de adquirir similaridade funcional e morfológica a enterócitos humanos (células do epitélio intestinal).^{65,75–77} Portanto, o modelo de células Caco-2 é tido como o melhor substituto para o potencial de absorção de fármacos *in vivo* comparado a outras culturas de células epiteliais. Este modelo é a ferramenta biológica mais utilizada para a triagem de permeabilidade intestinal de NCEs durante a descoberta e desenvolvimento de fármacos.^{65,71,78} Muitos estudos têm demonstrado que a absorção oral de compostos em humanos tem uma boa correlação com sua permeabilidade em células Caco-2, fornecendo uma medida importante para estimar a captação de fármacos administrados por via oral.^{79–81} Um exemplo desta correlação pode ser observado na Figura 6.

Dados de permeabilidade em Caco-2 gerados durante a descoberta de fármacos tem sido empregados para desenvolver modelos de QSPR, que através de descritores baseados na estrutura molecular e algoritmos computacionais, relacionam determinadas propriedades moleculares à parâmetros ADME relevante.^{35,41,54,82-83}



Figura 6 - Tendência de correlação geral entre permeabilidade em Caco-2 e HIA Fonte: Elaborada pela autora.

1.10 Células Caco-2

As células Caco-2 são derivadas de adenocarcinoma de cólon humano, e quando cultivadas como células confluentes adquirem muitas características funcionais e morfológicas de células normais, se diferenciando em enterócitos.^{38,58,73} Estas células são geralmente cultivadas em uma placa de cultura celular transpoço, desenvolvida especificamente para estudos de absorção de fármacos. O cultivo acontece por pelo menos três semanas (21 dias) para que adquiram as características das células da mucosa intestinal.⁶² Usualmente, são cultivadas sobre um suporte plástico semipermeável, montado dentro de um poco da placa de cultura multipoços, que fornece um sistema de transporte.⁶⁷ Este sistema pode ser usado para avaliar a absorção por tranporte passivo através do citoplasma das células (transcelular) ou entre as junções celulares (paracelular), e por tranporte ativo mediado por um transportador (por exemplo, P-gp). O emprego deste modelo resulta na quantificação da absorção de compostos a partir do lúmen para o sangue, representado pelo trasporte de uma solução de composto na direção do compartimento apical (doador) para o basolateral (receptor), em diferentes tempos de incubação.^{38,58,67,84} Uma das principais aplicações deste ensaio celular é a triagem de coleções de compostos para identificar aqueles que podem ser absorvidos pelo epitélio intestinal.^{17,62} Como já mencionado, muitos estudos demonstraram que há uma boa correlação entre os coeficientes de permeabilidade e a absorção de fármacos administrados por via oral, sugerindo que a absorção intestinal humana pode ser estudada por estes modelos in vitro.^{38,58,84} A literatura tem sugerido que compostos com coeficientes de permeabilidade menores do que $1 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$, entre 1 e 10 x $10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ e maiores do que 10 x $10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ podem ser classificados, respectivamente, como fármacos pouco absorvidos (0-20%), moderadamente absorvidos (20-70%) e bem absorvidos (70-100%).63,85-86

É importante mencionar que o ensaio de permeabilidade em Caco-2 possui algumas limitações que podem levar a resultados que não refletem a absorção intestinal humana.⁸⁷⁻⁸⁸ Larregieu e Benet⁶⁵ sugerem que o ensaio em células Caco-2 não é adequado para predizer a permeabilidade intestinal humana de compostos hidrofílicos absorvidos por difusão passiva paracelular ou para aqueles compostos que são substratos de transpostadores intestinais altamente expressados. Alguns compostos hidrofílicos têm baixa permeabilidade no ensaio Caco-2, entretanto mostram alta absorção intestinal, gerando correlações pobres *in vitro-in vivo*. Isso provavelmente se deve ao processo de difusão paracelular, uma vez que a linha de células Caco-2 tem um número significativamente menor de poros paracelulares do que o intestino
humano.⁸⁹ Além disso, este fenômeno pode ser o resultado de uma diferença na expressão de transportadores entre células Caco-2 e o intestino humano, tais como aminoácidos, nucleosídeos e peptídeos transportadores.⁹⁰ Larregieu and Benet,⁶⁵ afirmaram que para compostos que são particularmente substratos de transportadores, apresentando uma variabilidade na expressão maior ou igual a 10 vezes, entre Caco-2 e intestino delgado humano, podem ter suas predições de permeabilidade intestinal humana incorretas. Para os compostos cuja permeabilidade em Caco-2 reflete a permeabilidade *in vivo*, os autores mostram que estes compostos são prováveis substratos de transportadores que apresentam variabilidade de expressão em Caco-2 e intestino delgado humano menor do que 10 vezes. A glicoproteína P (P-gp) é um transportador dependente de ATP (adenosina trifosfato), responsável pelo efluxo de uma série de fármacos clinicamente importantes, afetando a absorção, distribuição e eliminação desses compostos.⁹¹⁻⁹² Portanto, a presença da P-gp na mebrana apical das células do trato gastrintestinal é identificada como uma das possíveis causas para a baixa absorção intestinal de algumas moléculas.⁹³

É importante reconhecer que, em especial, para compostos lipofílicos um método de permeabilidade em Caco-2 padronizado e validado pode predizer a permeabilidade intestinal humana com bastante êxito. Por outro lado, na predição de compostos hidrofílicos deve-se considerar os pontos supracitados. Para estes compostos, os valores de permeabilidade podem ser superestimados pelos modelos *in silico* desenvolvidos a partir de dados *in vitro* de células Caco-2. Entretanto, a exclusão completa de compostos hidrofílicos dos conjuntos treinamento e teste, produz modelos que são restritos a um confinado espaço químico. Assim, modelos *in silico* Caco-2 devem ser utilizados com cuidado para predição da absorção intestinal humana para compostos hidrofílicos, pois para estes compostos, quando é observada uma alta permeabilidade intestinal, a primeira hipótese considerada é a difusão paracelular.⁶⁵

1.11 Ensaio de permeabilidade em mambrana artificial paralela – PAMPA

O ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA, na sigla do inglês *parallel artificial membrane permeability assay*) é usado para medir a permeabilidade de pequenas moléculas por transporte passivo.⁹⁴⁻⁹⁵ Foi originalmente desenvolvido como um método simples para predizer a absorção transcelular de fármacos, através da quantificação da permeabilidade de uma molécula através da membrana, formada por uma mistura de lecitina e um solvente orgânico inerte sobre um filtro suporte hidrofóbico, mimetizando uma membrana celular.^{61–63} Este sistema apresenta como vantagem o alto rendimento e reprodutibilidade,

fornecendo uma rápida predição da absorção transcelular. As membranas artificiais têm sido comparadas às céluas Caco-2, mostrando se comportar de maneira similar nos estudos de difusão passiva.^{64,96-97} O trabalho que deu origem ao conceito PAMPA utilizou uma membrana de lecitina de ovo dissolvida em *n*-dodecano.⁹⁸⁻⁹⁹ Neste trabalho foram correlacionados o fluxo na membrana com a fração absorvida em humanos, e demonstrado que o fluxo através da lecitina de ovo/membrana dodecano se correlacionava melhor com a fração absorvida em humanos, quando comparado com valores de log*D* em um sistema octanol/água.⁹⁸ Foi reportado também que a capacidade preditiva é aumetada quando é usado um pH de 6,5 ou 5,5 no sítio doador.¹⁰⁰ Dependendo da natureza da membrana artificial, diferentes barreiras biológicas (intestinal ou hematoencefálica) podem ser alvo de estudos.^{95,97} Devido à sua versatilidade e consistência, o sistema PAMPA passou a ser empregado como padrão na indústria farmacêutica.⁹⁹ A Figura 7 mostra uma representação esquemática das principais etapas do ensaio PAMPA.



Figura 7- Desenho esquemático do sanduíche de placas usado em PAMPA. A placa doadora preenchida com solução de fármacos e placa receptora com solução tampão, destaque para a direção do transporte do fármaco, da região apical (placa inferior) para basolateral (placa superior). O sanduíche é incubado em temperatura e umidade controladas, na presença ou ausência de agitação

Fonte: Adaptada de AVDEEF.¹⁰¹

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desta tese de doutorado compreende o desenvolvimento de modelos de QSAR-ADME de permeabilidade em células Caco-2 e sistema PAMPA, empregando a técnica de HQSAR. O objetivo também inclui a realização de estudos para a avaliação experimental dos modelos gerados, os quais deverão ser integrados aos diferentes modelos *in silico* já presentes na base de dados de propriedades farmacocinéticas PK/DB (www.pkdb.ifsc.usp.br).

Os objetivos específicos incluem:

- ✓ Gerar modelos de QSPR Caco-2 e PAMPA;
- Avaliar a consistência interna e externa dos modelos através do seu poder de correlação nos conjuntos treinamento e predição nos conjuntos teste;
- Determinar a robustez dos modelos e a sua aplicação em química medicinal para a identificação e seleção de candidatos a fármacos;
- Realizar a validação experimental de um conjunto teste de novas moléculas com dados experimentais de permeabilidade PAMPA;
- Realizar a validação experimental de um conjunto teste de novas moléculas por meio do ensaio de permeabilidade em Caco-2;
- Disponibilizar à comunidade científica, de maneira livre a gratuita, o modelo preditivo validado experimentalmente, através da base de dados de propriedades farmacocinéticas PK/DB.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Conjunto de Dados

Para a construção de modelos *in silico* com alta capacidade preditiva é fundamental a seleção criteriosa do conjunto de dados.¹⁰²⁻¹⁰³ Também como parte do processo de preparação dos conjuntos de dados, é necessária a normalização das estruturas que foram consideradas na forma neutra.¹⁰³ O processo de otimização das estruturas químicas foi realizado através de várias operações padrão, incluindo a otimização da conformação 3D, correção e adição de hidrogênio, a remoção de solvente e sal, normalização do tipo de ligação, da quiralidade, representação de anéis aromáticos, entre outros.⁶⁹ Uma vez que é crítico demonstrar que os modelos de QSAR possuem elevado poder de predição externa, um subconjunto dos compostos foi excluído aleatoriamente do conjunto total e utilizado como conjunto teste para a validação dos modelos. O conjunto teste, contém 15-20% dos compostos do conjunto total,^{38,63,104} enquanto o restante (80-85%),¹⁰⁴ estão presentes no conjunto treinamento que foi usado para a geração dos modelos de HQSAR independentes. Como requerimento para obtenção de modelos *in silico* confiáveis, moléculas estruturalmente diversas possuindo uma ampla faixa de valores de permeabilidade foram incluídas em ambos conjuntos.^{30,103}

3.2 Modelagem de HQSAR

As diversas etapas de modelagem molecular, análise e visualizações foram realizadas utilizando o módulo de HQSAR da plataforma computacional SYBYL-X 2.0,¹⁰⁵ no sistema operacional Linux.¹⁰⁶⁻¹⁰⁷ O método de HQSAR baseado em fragmentação molecular tem sido aplicado para uma variedade de propósitos em modelagem molecular, e foi utilizado neste estudo considerando-se os parâmetros padrão.^{4,33,36,105} As estruturas das moléculas dos conjuntos de dados e os valores correspondentes à propriedade alvo (permeabilidade) foram dispostos em uma planilha molecular (MSS, sigla do inglês para *molecular spreadsheet*), onde toda a informação para o processo de modelagem foi armazenada. Para produzir modelos de HQSAR com elevada consistência interna, diversas análises de PLS foram conduzidas para diversas combinações de distinção de fragmentos e tamanho dos fragmentos. Outra etapa fundamental no processo de modelagem de HQSAR é a validação externa, que é utilizada a fim de comprovar a capacidade preditiva do modelo gerado para um conjunto teste de moléculas

que são excluídas do conjunto de dados inicial. Na validação externa, os modelos mais robustos foram aplicados ao conjunto teste.

3.3 Determinação da permeabilidade em células Caco-2

3.3.1 Cultivo de células Caco-2

As células Caco-2 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ; RJ, BR) e cultivadas em meio DMEM em alta concentração de glicose (4,5 g/L) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 1% de solução de Glutamina 200 mM e antimicrobianos (penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 μ g/mL, ou gentamicina 50 μ g/mL). As células Caco-2 utilizadas estavam entre o número de passagem 30 a 50. As células foram mantidas em garrafas de cultivo de 75 cm², sendo que o meio era substituído a cada dois dias, em estufa a 37 °C e 5% de CO₂.

Para realização dos ensaios, as células foram descongeladas e cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm² ou 75 cm² (TPPTM, Trasadingen, Suíça). Atingida a confluência da monocamada celular, as células eram sub-cultivadas ou plaqueadas para a realização dos ensaios celulares, como o de citotoxicidade. Para o descongelamento das células foi realizada a imersão das amostras retiradas do nitrogênio líquido em banho térmico a 37 °C. Após o completo descongelamento, a suspensão celular foi imediatamente transferida para uma garrafa de cultura contendo 10 mL de meio de cultura pré-aquecido a 37 °C e suplementado com 20% de SFB.

O subcultivo das células era realizado quando a cultura apresentava no mínimo 80% de cobertura da garrafa (3 a 4 dias de cultivo). Para o subcultivo, o meio de cultura foi removido completamente por aspiração e descartado. As células aderidas foram lavadas com tampão para retirada de resíduos de SFB. Em seguida foram adicionados 5 mL de solução de enzima tripsina com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (Cultilab, Campinas, Brasil), a fim de desaderir as células da superfície de cultivo. Após a completa desaderência (verificada em microscópio invertido), para a inativação da enzima tripsina, cerca de 8 mL de meio de cultura enriquecido com SFB foram adicionados à garrafa. Esta solução celular, transferida para um tubo falcon (BD FalconTM, Franklin Lakes, Estados Unidos) foi centrifugada a 150 rcf por 10 minutos, até a formação de *pellet* celular. Descartado o sobrenadante, o *pellet* foi ressuspendido em 1 mL de

meio de cultura suplementado com 20% de SFB. O material foi então transferido para uma nova garrafa ou plaqueado para a realização dos ensaios.

Para realizar o ensaio de permeabilidade as células foram transferidas para os insertos com membrana suporte PET, $0,4 \mu m$ de poro e área de $1,13 \text{ cm}^2$, adequados para placas de 12 poços. A cultura foi antida à 37 °C e atmosfera com 5% de CO₂ em meio DMEM suplementado com 20% de SFB por 21 dias, até a formação da monocamada de células adequada para realização do experimento, que é confirmada pela medida da resistência elétrica transepitelial. O meio de cultivo foi substituído a cada dois dias.

3.3.2 Determinação da viabilidade celular na presença dos compostos em estudo -Citotoxicidade

Para a realização do ensaio de citotoxicidade as células utilizadas foram cultivadas, como descrito anteriormente (seção 3.3.1). Este é um ensaio colorimétrico que se baseia na capacidade das desidrogenases mitocondriais das células viáveis reduzirem o composto tetrazólio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3- carboximetoxifenil)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolio] (MTS), alterando sua coloração de amarelo para roxo quando o composto formazan é formado (Figura 8). A conversão é monitorada e quantificada através da leitura da absorbância em 490 nm.



MTS

Formazan

Figura 8 - Conversão do composto MTS em formazan Fonte: Elaborada pela autora.

Em uma placa de 96 poços (TPPTM), foram adicionadas 4,0 x 10^3 células em cada poço com 100 µL de meio de cultura (20% SFB). A placa foi incubada por um período de 24 horas

em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ até ocorrer a adesão celular. Em seguida, foram adicionadas aos poços 4 concentrações (200, 100, 50 e 16,66 μ M) dos compostos em teste e os controles. A placa foi novamente incubada por 24 horas e posteriormente foram adicionados 20 μ L do reagente MTS em cada poço. A placa foi incubada por 4 horas, até a completa reação do MTS, quando a placa foi analisada no espectrofotômetro SpectraMaxPlus384 (Molecular Devices, Sunnyvale, Estados Unidos), em comprimento de onda de 490 nm.

3.3.3 Monitoramento da integridade da monocamada de células Caco-2: determinação da RET

A monocamada de células em cultivo nas placas do experimento de permeabilidade tem seu valor de resistência elétrica transepitelial (RET) monitorado utilizando-se o minimultímetro epitelial EVOM² - Epithelial Voltohmmeter for TEER, WPI (*World Precision Instruments*). A medida do valor da RET (Ω .cm²) é realizada nos dias 17 e 21 de cultivo da monocamada a 37 °C. As monocamadas com valores de resistência elétrica transepitelial acima de 300 Ω .cm² são consideradas íntegras e aptas para a realização do experimento de permeabilidade.^{75,108-109} Este valor é obtido considerando-se a medida de resitência elétrica e a área da monocamada. A formação e a integridade da monocamada de células cultivadas em um poço translúcido da placa de 12 poços, foi monitorada visualmente em microscópio invertido, a cada dois dias durante os 21 dias de cultivo.

3.3.4 Experimento de permeabilidade em células Caco-2

Um esquema simplificado do ensaio de permeabilidade em Caco-2 é apresentado na Figura 9.



Figura 9- Esquema do ensaio de permeabilidade em Caco-2. O fármaco é adicionado ao compartimento apical, e após um tempo determinado, é quantificada a concentração que atravessou a monocamada de células Caco-2 cultivadas e atingiu o compartimento basolateral

Fonte:	Ada	ptada	de	LL	62
		percete	~~~		

O coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app} , expressado em cm.s⁻¹) de um composto no ensaio em células Caco-2, determinado em ambas direções, é calculado como:⁶⁷

$$\mathbf{P}_{app} = \frac{dA/dt}{SA.C_{0;doador}}$$

onde, dA/dt (ng.s⁻¹) é a taxa inicial de aumento da quantidade de composto acumulada (A) no compartimento receptor (volume do compartimento receptor x concentração do composto no compartimento receptor) ao longo do tempo (Δ t), C₀ é a concentração inicial (em t = 0) no compartimento doador (ng.mL⁻¹, o qual equivale a ng.cm⁻³), e *SA* é a área da superfície do filtro poroso (cm²).⁶⁷

Para o experimento de permeabilidade, realizado em triplicata, as células foram previamente lavadas com tampão Hank's (Solução Balanceada de Hank's - HBSS) em pH 7,4, e mantidas neste tampão por 20 minutos a 37 °C, e então, foi feita a medida da RET em cada membrana. As monocamadas que apresentaram RET acima de 300 Ω .cm² foram utilizadas para o experimento, sendo o tampão Hank's, o meio de transporte. As soluções dos compostos em tampão, na concentração de 10 µg/mL, mantidas a 37 °C, foram adicionadas nos compartimentos doadores das placas Transwell[®] e imediatamente (t = 0) 100 µL de amostra foram coletados do compartimento receptor. Após cada amostragem, realizou-se a reposição de 100 µL de tampão Hank's a 37 °C, para a manutenção do volume de meio no compartimento. As placas ficaram sob agitação orbital a 25 rpm a 37 °C durante todo o experimento. As coletas de 100 µL das amostras dos compartimentos receptores, foram realizadas aos 15, 30, 60, 120,

180 minutos. A quantificação dos compostos foi realizada por meio de uma colaboração com o Laboratório de Toxicologia, sob a coordenação da Prof^a. Dra. Rosangela Gonçalves Peccinini, no Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, na sigla do inglês para *High performance liquid chromatography*) com detecção espectrofotométrica UV-vis, segundo método desenvolvido pelos nossos colaboradores.¹¹⁰

3.3.5 Ensaio de efluxo calceína-AM

A calceína-AM (calceina acetoximetil ester) é um corante não fluorescente permeável nas células, substrato da P-gp que quando clivado, produz calceína fluorescente e não permeável na membrana celular. A calceína-AM é expulsa das células pela P-gp, assim quando as células são expostas a compostos substratos da P-gp que competem com a calceína-AM, ocorre um aumento da concentração de calceína-AM a serem clivadas dentro das células, e consequentemente há um aumeto da fluorescência intracelular. Assim, a calceina-AM funciona como um marcador de compostos que interagem com a P-gp.¹¹¹ As células Caco-2 foram cultivadas em DMEM HG com 20% de SFB em placa de 12 poços (8 x 10⁴ células por poço) (TPPTM, Trasadingen, Suíça) por 96 h em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Após esse período, soluções dos compostos a 100 µM foram adicionadas em duplicatas e incubadas por 3h em estufa a 37 °C com 5% de CO2. Em seguida os poços foram lavados com DMEM sem SFB e foram adicionados aos poços a seguinte solução: compostos (100 µM) e calceína-AM (50 nM) em DMEM sem SFB. A placa foi então incubada por 30 min em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Após a incubação, as células foram tripsinizadas e centrifugadas (10 min a 150 rcf). A suspensão celular foi lavada duas vezes em uma solução de PBS contendo 0,09% de SFB e 0,05% de azida de sódio. As células nessa solução foram analisadas em um citômetro de fluxo (BD Accuri C5 (BD BiosciencesTM) por meio de excitação por luz laser em comprimento de onda de 480 nm e emissão captada com o filtro de 533/30 nm. Foram coletados 10 mil eventos por amostra em dois experimentos independentes. Os dados foram tratados utilizando o programa BD CSampler (BD BiosciencesTM).

3.4 Ensaio de permeabilidade em membrana paralela artificial - PAMPA

O ensaio de permeabilidade em membrana paralela artificial (PAMPA), é utilizado para predição da absorção de fármacos por via oral. Consiste em um modelo *in vitro* de difusão passiva onde o composto teste é adicionado ao compartimento doador de uma placa de 96 poços (Figura 10). A permeabilidade dos compostos através de uma membrana artificial composta por hexadecanos é quantificada por LC-MS/MS após um período de incubação de 5 horas.



Figura 10 - Esquema do sistema poço e placa utilizado para o experimento de PAMPA Fonte: Elaborada pela autora.

Inicialmente, os compostos em teste foram dissolvidos em DMSO a uma concentração final de 5 mM. Em seguida, foram adicionados aos respectivos poços da placa estoque e diluídos em tampão de fosfato salino (PBS; pH 6,5; 1% DMSO v/v) para obter uma concentração final de composto igual a 1 μ M. Na câmara doadora (placa superior) foram adicionados 300 μ L da solução doadora correspondente aos respectivos poços. Na câmara aceptora (placa inferior) foram adicionados 200 μ L do tampão PBS, pH 7,4. Finalmente, a placa doadora foi sobreposta à placa aceptora. Na tentativa de mimetizar as condições fisiológicas do corpo humano, onde o pH no interior do intestino é ligeiramente mais ácido (em torno de 6,5) do que o pH do sangue (7,4), foi considerada uma diferença de pH (6,5 da câmara doadora e 7,4 da câmara aceptora). A placa montada foi embalada em um saco plástico contendo um papel umedecido a fim de manter a umidade. Em seguida a placa foi mantida numa estufa a 37 °C por 5 horas sob leve agitação.

Para quantificação dos compostos por espectrometria de massas, duas placas (uma para a porção doadora e outra para a aceptora) foram preparadas contendo 300 μ L do composto carbutamida (50 nM em 10% de H₂O e 90% de MEOH:ACN 50:50), utilizado como controle interno de qualidade das leituras. Além diso, à placa de análise do conteúdo do poço doador, foram adicionados 90 μ L de PBS pH 6,5 e 10 μ L do conteúdo da placa superior. Para a placa de análise do poço aceptor, foram adicionados 100 μ L do conteúdo da placa inferior de PAMPA. A fim de descartar ou identificar a decomposição/instabilidade intrínseca do composto em solução, amostras da placa estoque também foram submetidas a análise por LC/MS/MS. Como fármacos controle para o ensaio de PAMPA são utilizados o metoprolol e a quinidina. A permeabilidade aparente, em cm.s⁻¹, dos compostos é calculada a partir da

equação: $P_{app} = \frac{-\ln\left[1 - \frac{C_{A(t)}}{C_{equilíbrio}}\right]}{A\left(\frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_A}\right)t}, \text{ onde, } C_{equilíbrio} = \frac{\left[C_{D(t)} \cdot \left(V_D + C_{A(t)}\right)V_A\right]}{V_D + V_A}, C_{D(t)} \text{ é a}$

concentração do composto no poço doador no tempo t, $C_{A(t)}$ é a concentração do composto no poço aceptor no tempo t, V_D é o volume adicionado ao poço doador, V_A é o volume adicionado ao poço aceptor, A é a área do filtro (membrana de hexadecano) e *t* é o tempo de incubação em segundos.

Para classificação dos compostos quanto a permeabilidade, como critério geral, foram classificados como permeáveis compostos que apresentaram $P \ge 1.5 \times 10^{-6}$ cm/s, enquanto compostos que apresentaram valores inferiores a este foram considerados como pouco ou não permeáveis.

Além disso, em esforços anteriores realizados em nosso laboratório com o objetivo de identificar novos inibidores de cruzaína como candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Chagas, fomos capazes de identificar candidatos promissores entre três diferentes séries químicas estudadas (benzoimidazois, imidazois e imidas). Devido a uma colaboração entre nosso laboratório e Abbvie Inc., North Chicago, EUA, 78 destes compostos com dados experimentais de permeabilidade PAMPA disponíveis, foram utilizados como conjunto de validação experimental do nosso melhor modelo HQSAR. Esta estapa de validação em PAMPA pelo modelo. Após a predição os compostos foram agrupados em duas classes: alta ou baixa permeabilidade. Por meio dessa validação externa, fomos capazes de atestar a qualidade e a capacidade preditiva do modelo gerado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Modelo de Permeabilidade em Caco-2

Para a modelagem de HQSAR, um conjunto contendo 589 moléculas estruturalmente diversas e associadas aos seus valores experimentais de permeabilidade em células Caco-2 foi obtido do banco de dados de moléculas bioativas, ChEMBL,¹⁰⁴ e também, a partir de dados disponíveis na literatura.^{38,63} Estas 589 moléculas foram extraídas de um conjunto de dados inicial contendo cerca de 3 mil compostos através de um trabalho minucioso de seleção, onde priorizou-se as mesmas condições experimentais mais relevantes no experimento de permeabilidade em Caco-2, tais como: pH nos compartimentos apicais e basolaterais, direção de transporte avaliada (apical para basolateral), tempo de cultivo das células, presença de íons/sais etc. Além disso foram retiradas duplicatas e misturas de compostos. Assim, o conjunto total foi dividido em um conjunto treinamento contendo 470 compostos (80%) e um conjunto teste contendo 119 compostos (20%). A divisão foi realizada com o auxílio do Mapa de Similaridade das moléculas disponível na plataforma SYBYL-X 2.0,¹⁰⁵ a fim de manter a diversidade estrutural nos conjuntos treinamento e teste, e ainda manter representantes de todas as faixas de permeabilidade nos conjuntos. O conjunto de dados tem compostos de diferentes classes químicas. A alta diversidade química, associada a uma grande distribuição de valores de permeabilidade, garante uma boa cobertura do espaço químico-biológico da propriedade alvo. A distribuição dos valores é apresentada na Figura 11, e indica que há compostos representativos nas faixas de baixa, moderada e alta absorção. O conjunto abrange candidatos a fármacos de diversas classes terapêuticas, incluindo inibidores enzimáticos, agonistas e antagonistas de receptores biológicos. Podem ser citados os agentes antivirais, antibióticos, analgésicos, antiinflamatórios, antipiréticos, antibacterianos, anti-hipertensivos, antoarrítmicos, antifúngicos, anticâncer, entre outros (Figura 12).



Figura 11 - Histograma da distribuição dos valores de permeabilidade em Caco-2 para o conjunto de dados Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 12 - Exemplos representativos do conjunto de dados Fonte: Elaborada pela autora.

Os hologramas moleculares foram gerados a partir de 12 séries padrões de comprimentos de holograma (53, 59, 61, 71, 83, 97, 151, 199, 257, 307, 353, e 401 caixas). Os fragmentos moleculares foram gerados e determinados segundo as distinções de fragmentos que diferenciam características químicas estruturais como: (A) átomos, (B) ligação, (C) conectividade, (H) átomos de hidrogênio, (Ch) quiralidade e (DA) átomos doadores e aceptores. Os padrões de contagem de fragmentos das moléculas do conjunto treinamento foram relacionados aos dados experimentais de permeabilidade em células Caco-2 por meio da análise de PLS com validação cruzada, pelo método (LOO), o qual deixa uma molécula por vez de fora do processo de geração do modelo de QSAR, repetindo a análise para todas as moléculas do conjunto treinamento. Diversas combinações destes parâmetros foram avaliadas usando o tamanho de fragmento padrão (4-7), gerando modelos para o conjunto treinamento de 470 compostos. A análise de HQSAR foi realizada a fim de identificar os modelos mais preditivos. Em princípio foram selecionados cinco modelos que apresentaram boa qualidade estatística, considerando-se os valores de coeficiente de correlação da validação cruzada (LOO), q^2 , e o coeficiente de determinação múltipla, r^2 . Segundo a literatura, para o ajuste de um modelo ser aprovado, ele deve apresentar $r^2 > 0.6$, ou seja, o modelo deve ser capaz de explicar pelo menos 60% ($r^2 \ge 100$) da variabilidade da propriedade alvo (deve ajustar 60% da informação disponível no modelo). Quanto à quantidade de informação ou variabilidade predita, derivada dos resultados da validação cruzada (LOO), é de consenso geral que o mínimo aceitável é q^2 LOO > 0,5 (capacidade de prever pelo menos 50% da variabilidade). Quanto aos erros padrão associados aos coeficientes de determinação e corrrelação, quanto mais próximos de zero, mais variabilidade ou informação pode ser explicada pelo modelo.27-28,112-116 Neste estudo foi adotado $q^2 \ge 0.6$ como valor de corte para seleção inicial dos modelos.

Os resultados para os cinco melhores modelos (modelos 2, 7, 8, 9 e 12) selecionados desta série de combinações de parâmetros são apresentados na Tabela 2. Estes modelos possuem as seguintes informações de distinção de fragmentos: 2 - A/B/Ch/DA ($q^2 = 0.60$, $r^2 = 0.80$), 7 - A/B/DA ($q^2 = 0.60$, $r^2 = 0.79$), 8 - A/C/DA ($q^2 = 0.69$, $r^2 = 0.82$), 9 - A/B/C/DA ($q^2 = 0.60$, $r^2 = 0.60$, $r^2 = 0.60$, $r^2 = 0.62$, $r^2 = 0.82$). O modelo 8 é o melhor da série, apresentando maior consistência interna, indicada pelo parâmetro q^2 , e menor número ótimo de componentes (variáveis latentes igual a 7).

Modolo	Distinção de	Parâmetros estatísticos					
Modelo	fragmento	q^2	r^2	SEE	HL	N	
1	A/B/C/Ch	0,55	0,77	0,32	353	8	
2*	A/B/Ch/DA	0,60	0,80	0,30	353	8	
3	A/B/H/Ch/DA	0,55	0,75	0,34	401	8	
4	A/B/C/H/Ch/DA	0,53	0,77	0,32	401	8	
5	A/B	0,58	0,74	0,34	353	8	
6	A/B/C	0,55	0,73	0,34	307	7	
7*	A/B/DA	0,60	0,79	0,31	353	8	
8*	A/C/DA	0,69	0,82	0,28	307	7	
9*	A/B/C/DA	0,60	0,83	0,28	353	8	
10	A/B/H/DA	0,56	0,76	0,33	406	8	
11	A/H/Ch/DA	0,57	0,73	0,35	401	8	
12*	B/C/Ch/DA	0,62	0,82	0,28	353	8	
13	B/H/Ch/DA	0,59	0,77	0,32	353	8	

 Tabela 2 Resultados da análise de HQSAR para várias distinções de fragmentos, sobre os parâmetros estatísticos usando o tamanho de fragmento padrão (4-7)

*Cinco melhores modelos de HQSAR selecionados para avaliação de tamanho de fragmentos; q^2 , coeficiente de validação cruzada (LOO); r^2 , coeficiente de correlação sem validação cruzada; SEE, erro padrão sem validação cruzada; *N*, número ótimo de componentes; HL, comprimento do holograma. Distinção de Fragmentos: A, átomos; B, ligação; C, conecção; H, átomos hidrogênio; Ch, quiralidade; DA, átomos doadores e aceptores.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para os cinco modelos selecionados, a influência dos diferentes tamanhos de fragmentos sobre os parâmetros estatísticos foi investigada, considerando as seguintes variações: 2–5, 3–6, 4–7, 5–8 e 6–9. O tamanho de fragmento padrão (4–7) foi o primeiro escolhido para produzir os modelos de HQSAR. Entretanto, é fundamental considerar este parâmetro na construção estatística dos modelos de HQSAR, porque o mesmo define o tamanho máximo e mínimo dos fragmentos que serão incluídos no holograma.^{35,106}

Os resultados estatísticos para uma sequência de diferentes tamanhos de fragmentos avaliados (2-5, 3-6, 4-7, 5-8, 6-9) são mostrados na Tabela 3. A variação do tamanho dos fragmentos não resultou na melhoria dos valores estatísticos dos modelos de HQSAR, levandose em consideração o tamanho de fragmento padrão (4-7). Uma exceção foi o modelo 9, o qual

apresentou uma discreta diferença no valor do coeficiente de correlação com validação cruzada (valor de $q^2 = 0.60$ para $q^2 = 0.61$) para o tamanho de fragmento 2-5, enquanto o valor de r^2 diminuiu de 0,83 para 0,78. Portanto, o tamanho de fragmentos padrão (4-7) parece ainda ser o mais indicado para o modelo 9 (A/B/C/DA). Quanto ao modelo 8, os demais tamanhos de fragmentos não resultaram em melhores parâmetros estatísticos em relação a combinação usada originalmente. Ao final das análises, o modelo 8 (distinção de fragmentos A/C/DA, e tamanho de fragmentos 4-7) continuou sendo o que apresenta melhores parâmetros estatísticos, com valores de $q^2 = 0.69$ e $r^2 = 0.82$. A distinção de fragmento DA, que distingue a presença de doadores e aceptores de ligação de hidrogênio, esta relacionada à capacidade de ionização das moléculas, o que interfere diretamente na sua permeabilidade celular. Não há exigências quanto à presença das distinções de fragmento B e H entre os parâmetros para a modelagem, uma vez que a opção DA está acionada, pois alguns testes demostraram que a presença da distinção DA na ausência das opções H e B, gerou modelos ligeiramente melhores. Além disso, há evidências de que nenhuma melhoria ocorre quando DA e H são selecionadas simultaneamente. Uma possível razão é o drástico aumento no número de fragmentos gerados quando essas duas opções são consideradas.44

Parâmetros estatísticos - Influência do tamanho de fragmentos								
Modelo	q^2	r^2	SEE	HL	N			
Model 2								
2-5	0,57	0,72	0,36	257	8			
3-6	0,60	0,77	0,32	307	8			
4-7*	0,60	0,80	0,30	353	8			
5-8	0,56	0,80	0,30	353	8			
6-9	0,55	0,80	0,30	307	8			
Modelo 7								
2-5	0,56	0,70	0,36	257	8			
3-6	0,56	0,75	0,33	307	8			
4-7*	0,60	0,79	0,31	353	8			
5-8	0,55	0,80	0,30	353	8			
6-9	0,55	0,80	0,30	401	8			
Modelo 8								
2-5	0,60	0,76	0,33	353	8			
3-6	0,64	0,81	0,29	401	8			
4-7*	0,69	0,82	0,28	307	7			
5-8	0,57	0,82	0,29	307	8			
6-9	0,56	0,75	0,33	151	7			
Modelo 9								
2-5*	0,61	0,78	0,31	401	8			
3-6	0,60	0,81	0,29	401	8			
4-7	0,60	0,83	0,28	353	8			
5-8	0,60	0,83	0,28	353	7			
6-9	0,58	0,81	0,29	307	7			
Modelo 12								
2-5	0,62	0,79	0,31	401	8			
3-6	0,60	0,80	0,30	401	8			
4-7*	0,62	0,82	0,28	353	8			
5-8	0,58	0,82	0,29	353	7			
6-9	0,58	0,83	0,27	353	8			

Tabela 3 - Análise da influência da variação do tamanho de fragmentos (2-5, 3-6, 4-7, 5-8 e 6-9), sobre os parâmetros estatísticos chave, aplicando cinco distinções de fragmentos selecionadas: A/B/Ch/DA, A/B/DA, A/C/DA, A/B/C/DA, B/C/Ch/DA

* Os cinco modelos selecionados para predição consenso de HQSAR; q^2 , coeficiente de correlação com validação cruzada (LOO); r^2 , coeficiente de correlação sem validação; SEE, erro padrão sem validação cruzada; N, número ideal de componentes; HL, comprimento holograma. Distinção de Fragmento: A, átomos; B, ligação; C, conectividade; H, átomos de hidrogênio; Ch, quiralidade; DA, átomos doadores e receptores.

Fonte: Elaborada pela autora.

O valor de q^2 fornece uma medida da consistência interna de um modelo de QSAR. Por outro lado, torna-se de grande importância a avaliação da habilidade do modelo em predizer o valor da propriedade alvo para novos compostos. No método de HQSAR, a estrutura codificada em uma impressão digital 2D está diretamente relacionada com a permeabilidade em células Caco-2 das moléculas do conjunto treinamento. Desta maneira, os modelos de HQSAR podem ser capazes de predizer a permeabilidade de novos compostos a partir de suas impressões digitais. Para realizar a etapa considerada a mais importante da modelagem de QSAR^{29,32} (a validação externa), os compostos do conjunto teste foram completamente excluídos do conjunto de dados durante o processo de modelagem. Após a análise de uma sequência de diferentes tamanhos de fragmentos, os modelos obtidos a partir do conjunto treinamento contendo 470 moléculas que apresentaram $q^2 \ge 0,6$ (Tabela 3), foram avaliados quanto a sua capacidade preditiva para as 119 moléculas do conjunto teste. Os resultados do teste de validação externa são apresentados na Tabela 4.

A análise da validação externa é realizada com base no parâmetro estatístico r_{pred}^2 (r^2 predito) para o conjunto teste. Os limites mínimos para o r_{pred}^2 de um modelo não são bem definidos na literatura, mas alguns estudos sugerem que os valores de r_{pred}^2 devem ficar entre 0,5–0,6.^{28-29,32,112,114,117–119} Neste estudo foi adotado o valor de corte 0,5 para que os modelos fossem considerados preditivos.^{32,120}

Modelo	Tam. Frag.	q^2	SEE	r^2	SEE	HL	N	r ² _{pred}
Modelo 2	3-6	0,60	0,43	0,77	0,32	307	8	0,43
A/B/Ch/DA	4-7	0,60	0,42	0,80	0,30	353	8	0,30
Modelo 7 A/B/DA	4-7	0,60	0,42	0,79	0,31	353	8	0,22
Madala 8	2-5	0,60	0,42	0,76	0,33	353	8	0,42
	3-6	0,64	0,40	0,81	0,29	401	8	0,59
A/C/DA	4-7	0,69	0,37	0,82	0,28	307	7	0,70
	2-5	0,61	0,41	0,78	0,31	401	8	0,57
Modelo 9	3-6	0,60	0,42	0,81	0,29	401	8	0,39
A/B/C/DA	4-7	0,60	0,42	0,83	0,28	353	8	0,55
	5-8	0,60	0,42	0,83	0,28	353	7	0,49
Modelo 12	2-5	0,62	0,41	0,79	0,31	401	8	0,40
R/C/Ch/DA	3-6	0,60	0,42	0,80	0,30	401	8	0,52
D/C/CII/DA	4-7	0,62	0,41	0,82	0,28	353	8	0,53

Tabela 4 - Resultados da validação externa para os modelos selecionados a partir da análise da influência da variação do tamanho de fragmentos (2-5, 3-6, 4-7, 5-8 e 6-9), sobre os parâmetros estatísticos chave, aplicando cinco distinções de fragmentos selecionadas: A/B/Ch/DA, A/B/DA, A/C/DA, A/B/C/DA, B/C/Ch/DA

 q^2 , coeficiente de correlação com validação cruzada (LOO); r^2 , coeficiente de correlação sem validação; *SEE*, erro padrão; N, número ideal de componentes; *HL*, comprimento holograma. Distinção de Fragmento: A, átomos; B, ligação; C, conectividade; H, átomos de hidrogênio; Ch, quiralidade; DA, átomos doadores e receptores; r^2_{pred} , coeficiente de correlação para o conjunto teste.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar de apresentarem os parâmetros dentro dos limites mínimos esperados ($q^2 > 0,5$ e $r^2 > 0,6$),³² os modelos 2 (com tamanhos de fragmento variando entre 3-6 e 4-7 átomos), o modelo 7 (4-7), o modelo 8 (2-5), os modelos 9 (3-6 e 5-8) e o modelo 12 (2-5), não foram considerados preditivos, dados os valores de $r^2_{pred} < 0,5$.¹²⁰ Entretanto, os modelos 8 (3-6 e 4-7), 9 (2-5 e 4-7) e 12 (3-6 e 4-7) satisfazem os requisitos essenciais ($q^2 > 0,5, r^2 > 0,6$ e $r^2_{pred} > 0,5$),^{32,120} apresentando, respectivamente, valores de r^2_{pred} de 0,59; 0,70; 0,57; 0,55; 0,52 e 0,53. Para o modelo 8 (4-7), foi obtido um valor de r^2_{pred} superior aos dos demais modelos ($r^2_{pred} = 0,70$), indicando sua alta capacidade preditiva de permeabilidade em Caco-2. Os resultados da predição realizada pelo modelo 8 (4-7), escolhido por apresentar os melhores parâmetros estatísticos, são mostrados na Tabela 5. Os valores indicam uma boa predição da permeabilidade em células Caco-2 para os compostos do conjunto teste, que representam as

diferentes características estruturais incorporadas no conjunto treinamento. Assim, o modelo final pode ser utilizado para o estudo desta propriedade para novas moléculas.

No.	Moléculas	Exp ^[a]	Pred ^[b]	Res ^[c]
1	Composto 471	-4,39	-4,64	-0,25
2	Composto 472	-4,39	-4,94	-0,55
3	Composto 473	-4,39	-4,79	-0,4
4	Composto 474	-4,39	-4,83	-0,44
5	Composto 475	-4,38	-4,4	-0,02
6	Composto 476	-4,37	-4,89	-0,52
7	Composto 477	-4,37	-4,81	-0,44
8	Composto 478	-4,36	-4,88	-0,52
9	Composto 479	-4,34	-4,94	-0,6
10	Composto 480	-4,34	-4,96	-0,62
11	Composto 481	-4,32	-4,79	-0,47
12	Composto 482	-4,32	-4,94	-0,62
13	Composto 483	-4,28	-4,87	-0,59
14	Composto 484	-4,23	-4,94	-0,71
15	Composto 485	-4,22	-4,55	-0,33
16	Composto 486	-4,21	-4,69	-0,48
17	Composto 487	-4,17	-4,63	-0,46
18	Composto 488	-4,16	-4,68	-0,52
19	Composto 489	-4,11	-4,85	-0,74
20	Composto 490	-4,11	-4,71	-0,6
21	Composto 491	-4,11	-4,65	-0,54
22	Composto 492	-5,31	-4,78	0,53
23	Composto 493	-5,98	-5,75	0,23
24	Composto 494	-5,4	-5,2	0,2
25	Composto 495	-5,44	-5,17	0,27
26	Composto 496	-4,66	-5,21	-0,55
27	Composto 497	-4,78	-5,23	-0,45
28	Composto 498	-4,82	-5,22	-0,4
29	Composto 499	-4,86	-5,25	-0,39
30	Composto 500	-6,75	-5,79	0,96
31	Composto 501	-5,72	-5,16	0,56
32	Composto 502	-4,76	-5,19	-0,43
33	Composto 503	-5,22	-4,95	0,27
34	Composto 504	-4,1	-4,73	-0,63
35	Composto 505	-5,22	-5,42	-0,2
36	Composto 506	-4,64	-4,65	-0,01
37	Composto 507	-4,74	-4,8	-0,06
38	Composto 508	-6,57	-6,11	0,46

Tabela 5 - Valores experimentais, preditos pelo modelo final (modelo 8) e residuais de permeabilidade em Caco-2 para os compostos do conjunto teste

continua

39	Composto 509	-5.22	-5.7	-0.48
40	Composto 510	-5.47	-5.33	0.14
41	Composto 511	-4.7	-4.66	0.04
42	Composto 512	-5.71	-5.64	0.07
43	Composto 513	-6.39	-5.43	0.96
44	Composto 514	-7.3	-6.32	0.98
45	Composto 515	-5,41	-5,36	0,05
46	Composto 516	-5.06	-5,01	0,05
47	Composto 517	-4,16	-4,93	-0,7
48	Composto 518	-4.67	-5.21	-0.54
49	Composto 519	-5,71	-5,27	0,44
50	Composto 520	-5,52	-5,24	0,28
51	Composto 521	-4,32	-4,68	-0,36
52	Composto 522	-4,35	-4,75	-0,4
53	Composto 523	-4,61	-5,14	-0,53
54	Composto 524	-5.06	-4.76	0.3
55	Composto 525	-6.15	-4.92	1.23
56	Composto 526	-4.62	-4.79	-0.1
57	Composto 527	-4.47	-4.72	-0.2
58	Composto 528	-4,44	-5,51	-1.0
59	Composto 529	-4.81	-4,85	-0,04
60	Composto 530	-4,52	-4,86	-0,34
61	Composto 531	-5,1	-5,22	-0,12
62	Composto 532	-4,69	-5,18	-0,49
63	Composto 533	-4,47	-4,97	-0,5
64	Composto 534	-4,67	-5,21	-0,54
65	Composto 535	-6,54	-5,95	0,59
66	Composto 536	-6,12	-5,73	0,39
67	Composto 537	-5,03	-5,13	-0,1
68	Composto 538	-6,8	-6,08	0,72
69	Composto 539	-4,77	-5,21	-0,44
70	Composto 540	-4,64	-4,94	-0,3
71	Composto 541	-6,06	-5,68	0,38
72	Composto 542	-4,66	-5,1	-0,4
73	Composto 543	-4,28	-4,62	-0,34
74	Composto 544	-4,85	-5,25	-0,4
75	Composto 545	-4,69	-5,06	-0,3′
76	Composto 546	-5,03	-5,22	-0,19
77	Composto 547	-4,58	-4,72	-0,14
78	Composto 548	-5,92	-5,07	0,85
79	Composto 549	-4,59	-4,86	-0,2
80	Composto 550	-5,41	-5,01	0,4
81	Composto 551	-4,83	-4,62	0,21
82	Composto 552	-4.71	-4.62	0.09

conclusão				
83	Composto 553	-4,68	-4,92	-0,24
84	Composto 554	-4,52	-4,84	-0,32
85	Composto 555	-4,61	-4,54	0,07
86	Composto 556	-4,57	-4,98	-0,41
87	Composto 557	-4,78	-5	-0,22
88	Composto 558	-6,36	-5,87	0,49
89	Composto 559	-6,25	-4,98	1,27
90	Composto 560	-4,37	-4,7	-0,33
91	Composto 561	-4,48	-4,66	-0,18
92	Composto 562	-4,79	-4,88	-0,09
93	Composto 563	-4,93	-5,07	-0,14
94	Composto 564	-5,77	-5,96	-0,19
95	Composto 565	-4,82	-5,15	-0,33
96	Composto 566	-4,34	-4,71	-0,37
97	Composto 567	-4,85	-5,09	-0,24
98	Composto 568	-4,6	-5,08	-0,48
99	Composto 569	-5,37	-4,7	0,67
100	Composto 570	-5,34	-4,72	0,62
101	Composto 571	-5,16	-5,54	-0,38
102	Composto 572	-4,81	-5,25	-0,44
103	Composto 573	-4,87	-5,1	-0,23
104	Composto 574	-4,58	-4,89	-0,31
105	Composto 575	-4,71	-4,99	-0,28
106	Composto 576	-6,26	-5,92	0,34
107	Composto 577	-5,64	-5,22	0,42
108	Composto 578	-4,55	-5,17	-0,62
109	Composto 579	-6,2	-5,88	0,32
110	Composto 580	-4,11	-4,75	-0,64
111	Composto 581	-4,77	-4,74	0,03
112	Composto 582	-6,02	-5,18	0,84
113	Composto 583	-4,9	-4,68	0,22
114	Composto 584	-6,1	-6,03	0,07
115	Composto 585	-6,13	-5,36	0,77
116	Composto 586	-5,98	-5,79	0,19
117	Composto 587	-6,88	-6,45	0,43
118	Composto 588	-8	-7,96	0,04
119	Composto 589	-8	-8,02	-0,02
	$*r^{2}_{\text{pred}}$		0,70	

[a] log dos valores experimentais da permeabilidade em Caco (cm.s⁻¹). [b] Valores preditos pelo modelo 8. [c] Valores residuais, a diferença entre valores preditos e experimentais. * Coeficiente de correlação para o conjunto teste, r^2 pred = 0.70.

Fonte: Elaborada pela autora.

A capacidade preditiva do modelo 8 (4-7) é sugerida também pela boa concordância entre os valores de permeabilidade preditos e experimentais, para o conjunto teste. A Figura 13 mostra uma representação gráfica dos valores de permeabilidade em Caco-2 experimentais *versus* valores preditos, para os conjuntos treinamento e teste. O coeficiente de determinação desta regressão linear, R² foi igual a 0,82, indicando que há um excelente nível de ajuste dos valores, portanto, neste modelo linear, 82% das variáveis dependentes podem ser explicadas pelos regressores. Além disso, este modelo é capaz de predizer 69% ($q^2 = 0,69 \times 100$) da variância total.



Figura 13 - Valores preditos contra experimentais de permeabilidade em células Caco-2 para ambos conjuntos, treinamento e teste



O teste F representa a razão entre a variabilidade explicada pelo modelo e a variabilidade que permanece sem explicação^{28,113}. Espera-se que o valor de F calculado seja maior que o valor de F crítico correspondente, utilizando-se o nível de confiança de 95% (α = 0,05). Assim, quanto mais acima de seu valor de referência for o resultado deste teste, mais robusto será o modelo.^{28,112–115,118} Para um intervalo de confiança de 95% (α = 0,05), o resultado para o teste-F (F = 2174,48) ficou muito acima do valor crítico (F_C = 3,84).

Ainda para confirmar a qualidade preditiva externa de um modelo, dois outros testes são sugeridos por Gobraikh e Tropha (2002),²⁹ Golbraikh e colaboradores (2003)¹¹⁴ e Tropsha

(2010):³² a avaliação do valor absoluto da diferença entre os coeficientes de determinação centrados na origem de uma regressão feita entre os valores preditos versus observados (r²₀) e outra entre os observados versus preditos (r²₀); e a avaliação das inclinações dessas retas (k e k'). Os coeficientes de determinação podem ser obtidos realizando uma regressão simples entre os valores experimentais e preditos na validação externa, mas com a reta centrada arbitrariamente na origem dos dados. Os limites para os valores dos testes com os coeficientes de determinações das retas para que um modelo seja considerado preditivo são bem definidos:^{29,32} o valor absoluto da diferença entre r²₀ e r²₀ deve ser menor que 0,3 (|r²₀ - r²₀| < 0,3); o resultado de pelo menos uma das inclinações deve estar dentro do intervalo 0,85 – 1,15 e (r²₀ - r²₀)/r² < 0,1 ou (r²₀ - r²₀)/r² < 0,1. Nesta avaliação o modelo 8 (4-7) também é considerado preditivo, pois satisfaz todos estes critérios apresentando os seguintes parâmetros: k = 1,00; k' = 0,98; r²₀ = 0,99 e r²₀ = 0,99. Considerando a importância da etapa de validação externa, a definição inequívoca destes critérios constitui um auxílio importante nos estudos de QSAR.

Outro parâmetro a ser avaliado é a robustez do modelo, realizada por meio da validação cruzada LMO (do inglês, *leave-many-out*), na qual mais de uma amostra é retirada por vez do processo de geração do modelo. No teste LMO o conjunto de dados é dividido aleatoriamente em grupos com determinado número de compostos e diversos modelos são construídos, exluindo um grupo da modelagem. O processo é repetido até que cada grupo fique fora por pelo menos uma vez. As moléculas deixadas de fora da modelagem têm suas propriedades preditas pelo modelo construído com as demais moléculas. Neste teste a capacidade de um modelo não ser afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros é estimada.^{29,32,121} Espera-se que o valor de q^2 LMO médio seja preferencialmente igual ou próximo ao de q^2 LOO, com mínimas oscilações para que o modelo seja considerado robusto.¹²² Neste caso, o conjunto treinamento composto por 470 moléculas, foi dividido em 130, 120,110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 e 2 grupos, considerando que o número de moléculas em cada grupo deve também representar uma fração significante das amostras (20 a 30%, no mínimo) para que o teste seja realmente efetivo.²⁷ O teste foi realizado em triplicata para cada número de moléculas retiradas, e considerado o valor médio de q^2 , mantendo-se o número de variáveis latentes (N = 7) e comprimento do holograma (HL = 307) considerados na LOO.¹²¹ O modelo apresenta um q^2 LMO médio estável em torno do q^2 LOO ($q^2 = 0,69$), com pequenas variações. A Figura 14 representa esta variação dos valores de q^2 com o número de grupos em que o conjunto treinamento foi dividido. O maior valor encontrado foi $q^2 = 0,70$, enquanto o



menor foi $q^2 = 0,64$. Este resultado indica que o modelo não é sensível a retiradas aleatórias de compostos.

Figura 14 - Validação cruzada LMO para o conjunto treinamento de 470 compostos (LOO, $q^2 = 0,69$)

31



Os modelos *in silico* de ADME são de extrema importância para a realização de triagens virtuais de coleções de compostos, que geralmente possuem grande diversidade química. Estes modelos devem possuir um domínio de aplicabilidade global para cobrir um amplo espaço químico. A habilidade preditiva do modelo 8 pode ser considerada adequada, dada a sua elevada diversidade química. Além disso, por ser baseado na fragmentação molecular, o método de HQSAR permite a predição de moléculas estruturalmente distintas, uma vez que a atividade biológica das moléculas é correlacionada com a informação contida nos fragmentos moleculares.

4.2 Validação experimental do modelo in silico de permeabilidade em Caco-2

4.2.1 Os compostos de validação

Para a realização da validação experimental do melhor modelo de HQSAR obtido para permeabilidade em células Caco-2, foi utilizado um conjunto de validação de 5 compostos (Compostos 590, 591, 592, 593, 594), derivados benzimidazólicos e imidazólicos, inibidores

de cruzaína, candidatos a fármacos para Doença de Chagas em estudo no LQMC. Os compostos, sintetizados por colaboradores, participaram de estudos prévios de otimização molecular e ensaios bioquímicos enzimáticos no LQMC.¹²³ Como controles positivos no experimento de permeabilidade foram utilizados os compostos benzonidazol (BZN) e verapamil, e como controle negativo, a fluoresceína. O verapamil e a fluoresceína estão entre os compostos listados pelo FDA como fármacos padrão para validação do método de determinação de permeabilidade por meio de células Caco-2.¹⁰⁸ Dentro do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, o verapamil pertence a classe 2 de compostos com baixa solubilidade e alta permeabilidade, enquanto a fluoresceína tem baixa permeabilidade quando em condições de mesmo pH, ou seja, quando não há gradiente de pH entre os compartimentos apical e basolateral.¹⁰⁸ As estruturas moleculares dos compostos de validação são apresentadas na Figura 15.



Figura 15 - Estruturas dos compostos do conjunto de validação experimental

Fonte: Elaborada pela autora.

As moléculas tiveram algumas propriedades físico-químicas como peso molecular (PM), área de superfície polar (PSA), de logP e parâmetros de Lipinski¹²⁴ preditos pelo *Molinspiration Property Calculation Service*¹²⁵ (www.molinspiration.com) e alguns parâmetros farmacocinéticos como absorção intestinal humana (HIA), biodisponibilidade (F), ligação a proteínas do plasma (PPB), permeação em barreira hematoencefálica (BBB), inibição de glicoproteína (inibição P-gp), solubilidade (S) e a permeabilidade em células Caco-2 (P-_{Caco-2}), preditos a partir da base de dados PK/DB.⁴⁹ Estes dados são apresentados na Tabela 6. A regra de Lipinski estabelece alguns parâmetros que permitem obter uma estimativa do perfil de biodisponibilidade oral para moléculas novas. De acordo com a regra de Lipinski (ou "regra dos cinco") os compostos administrados oralmente não podem violar mais que um dos quatro parâmetros múltiplos de 5 (máximo de 5 doadores e 10 aceptores de ligação de hidrogênio; massa molecular máxima de 500 Da e clogP máximo de 5).^{1,124}

Composto	IC ₅₀ (μM)	Parâmetros físico- químicos ^[a]	HIA ^[b] (%) (+/-13)	F^[b] (%) (+/-15)	PPB ^[b] (%) (+/- 10)	Log BBB ^[b] (+/- 0,30)	Inibição P-gp ^[b] (+/- 0,29)	Log (S) [b] (+/- 0,82)	Log P _{Caco} -2 (+/-0,28)
Composto 590	0,8 ± 0,1	LogP 3,26 TPSA 67,01 MM 374,24 nON 5 nOHNH 2 nviol. 0 nrotb 6 vol. 288,93	94,47	51,57	70,77	-1,24	-1,16	-4,29	-4,99
Composto 591	0,8 ± 0,5	LogP 3,286 TPSA 67,01 MM 374,24 nON 5 nOHNH 2 nviol. 0 nrotb 6 vol. 288,93	94,84	50,58	68,87	-1,26	-1,18	-4,32	-4,99
Composto 592	0,54 ± 0,1	LogP 4,455 TPSA 76,25 MM 454,32 nON 6 nOHNH 2 nviol. 0 nrotb 7 vol. 358,47	94,35	56,75	100	-1,27	-1,08	-6,56	-5,11
Composto 593	0,35 ± 0,2	LogP 4,251 TPSA 65,39 MM 415,49 nON 6 nOHNH 1 nviol. 0 nrotb 10 vol. 385,43	100	83,22	97,45	-0,86	-0,54	-5,97	-5,14
Composto 594	3,17 ± 0,96	LogP 2,13 TPSA 56,16 MM 310,15 nON 5 nOHNH 1 nviol. 0 nrotb 4 vol. 228,52	95,53		27,40	-0,756	-0,66	-1,891	-4,821

 Tabela 6 Parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos preditos para os compostos de validação experimental do modelo HQSAR de permeabilidade em células Caco-2

[a] Parâmetros físico-químicos preditos no *Molinspiration Property Calculation Service*. LogP, logarítmo do coeficiente de partição calculado. TPSA, área de superfície polar topológica (Å²). MM, massa molecular (Da). nON/nOHNH, número de aceptores/doadores de ligação de hidrogênio. nviol, número de violações à Lipinski. nrotb, número de ligações rotacionáveis. vol., volume molecular (Å³). [b] Parâmetros farmacocinéticos preditos na PK/DB. HIA, absorção intestinal humana. F, biodisponibilidade. PPB, ligação a proteínas do plasma, LogBBB, logarítmo do valor da permeação a barreira hematoencefálica. Inibição P-gp, inibição a glicoproteína P (-logEC₅₀, EC₅₀ (μmol.L⁻¹). Log (S), logarítimo da solubilidade aquosa, LogP_{Caco-2}, logaritmo da permeabilidade em células Caco-2. *Para obter a solubilidade em g/L, faça logS.MM_i.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na tabela 6 observa-se que os compostos atenderam às regras de Lipinski pois não violam nenhum dos parâmetros estabelecidos sugerindo que estas moléculas têm valores de permeabilidade apropriados, corroborando a predição dos valores de permeabilidade em células Caco-2, realizada pelo modelo de HQSAR. Além disso, estas moléculas apresentam a área de superfície polar (PSA) inferior a 140 Å,² valor considerado limite para uma adequada permeabilidade em membranas celulares.¹ Além disso, o número de ligações rotacionáveis não excede a 10, valor limite associado à diminuição da biodisponibilidade oral de fármacos.¹²⁵ Estes dados sugerem que as moléculas terão absorção intestinal humana e biodisponibilidade adequadas, não apresentando problemas em ser administradas oralmente, corroborando também os valores preditos pela PK/DB para estas propriedades, que variam entre 94,35 e 100% para HIA, e de 50,58 a 83,22% para biodisponibilidade.

4.4.2 Determinação da viabilidade celular na presença dos compostos de validação – Teste de citotoxicidade

Durante a realização dos experimentos de permeabilidade em células Caco-2 é indispensável manter-se a viabilidade das membranas celulares e da monocamada, garantindose a confiabilidade dos resultados obtidos. A maioria dos fármacos ionizáveis são permeados pela via paracelular, permeabilidade esta que pode ser afetada pela diminuição da integridade das membranas e consequentemente da monocamada. Outro fator que pode afetar a viabilidade das células e da monocamada é a concentração utilizada dos compostos, assim, é de extrema importância a avaliação das concentrações adequadas para realização do experimento de permeabilidade, através do ensaio de citotoxicidade.

Os sistemas celulares são bastante uteis nos estudos envolvendo planejamento de fármacos podendo ser utilizados também em triagens iniciais permitindo selecionar as moléculas capazes de ultrapassar as barreiras e membranas celulares. O ensaio de proliferação celular, ou citotoxicidade, é importante para o estudo de permeabilidade porque é preciso garantir a integridade morfológica e funcional da camada de células na presença dos compostos em análise durante o experimento de permeabilidade. Portanto, para a determinação da viabilidade celular as células Caco-2 foram submetidas à incubação por 24h com os compostos em análise, indicando assim a concentração máxima dos compostos que deve ser utilizada durante os experimentos de permeabilidade. Os resultados da citotoxicidade dos compostos incubados são apresentados em porcentagem de células vivas para cada uma das concentrações pela técnica do MTS (decrito anteriormente no item 3.4.2), conforme a Figura 16.

% Células viáveis



Figura 16 - Viabilidade das células Caco-2 após 24 horas de incubação com os compostos em estudo, avaliada pelo método do reagente MTS

Fonte: Elaborada pela autora.

A viabilidade celular foi superior a 70% para todos os compostos nas concentrações de 200 e 100 μ M, com exceção ao verapamil que apresentou citotoxicidade em Caco-2 a 200 μ M com apenas 33% de células vivas. Nas concentrações iguais a 50 e 16 μ M, para todos os compostos incubados por 24 horas, a viabilidade celular foi igual ou superior a 90%, indicando que 50 μ M é a concentração máxima segura para manutenção das monocamadas de células Caco-2 e realização dos experimentos de permeabilidade, pois nenhum efeito significativo em relação à atividade enzimática mitocondrial (teste MTS) foi observado nesta concentração e pelo período de exposição das células Caco-2 a estes compostos. A variação da viabilidade celular para cada composto nas diferentes concentrações pode ser melhor visualizada pelo gráfico na figura 17.



Figura 17 - Viabilidade das células Caco-2 após 24 horas de incubação com os compostos em estudo, avaliada pelo método do reagente MTS

Fonte: Elaborada pela autora.

Além disso, embora a porcentagem de células vivas dos compostos a 100 e 200 μ M tenha sido igual ou superior a 70%, alguns compostos nestas concentrações apresentaram problemas de solubilidade em meio de cultura ou houve formação de cristais, como pode ser observado na figura 18.



Figura 18 - Formação de cristais dos compostos de validação durante a determinação da viabilidade celular Fonte: Elaborada pela autora.

Para os compostos 591 e 592 hove formação de cristais no meio de cultura, nas concentrações mais elevadas. Estes cristais podem além de perturbar ou danificar as membranas celulares, alterar a concentração do compotos no meio de cultura. Portanto, para mater a viabilidade e integridade das células foi considerada a concentração máxima de 50 µM.

4.2.3 Formação das monocamadas de células Caco-2

O experimento de permeabilidade foi realizado na direção apical-basolateral em pH 7,4 em ambos os compartimentos. Nestas condições, foi determinada a permeabilidade para os compostos 590, 591, 592, 593 e 594, para os controles positivos Benzonidazol e Verapamil, e para o controle negativo Fluoresceína.⁷⁵ As células utilizadas estavam em número de passagem entre 35-40, e foram cultivadas segundo os procedimentos descritos no item 3.4. Foram preparados vinte e sete insertos para crescimento das monocamadas de células a fim de realizar o ensaio de permeabilidade para os cinco compostos e três controles, em triplicatas. Além destes, foram cultivados três insertos para controle da resistência das monocamadas durante o período de cultivo (21 dias). Também foram cultivadas células diretamente em um poço da placa de 12 poços, para acompanhamento visual da formação da monocamada no microscópio invertido, uma vez que os insertos não são translúcidos impossibilitando a inspeção visual. Um exemplo de formação da monocamada de células Caco-2 é mostrado na figura 19.



Figura 19 - Exemplo de formação da monocamada de células Caco-2. Fotografia feita em microscópio invertido usando objetivas de 10x e 20x

Fonte: Elaborada pela autora.

As células foram cultivadas a uma densidade celular de 3 x 10⁵ células/cm² seguindo o protocolo proposto Hubatsch, Ragnarsson e Artursson (2007).⁷⁵ A cada dois dias, no período de 21 dias de cultivo, o meio de cultura foi substituído aspirando-se primeiramente o meio

antigo do compartimento basolateral (poço), e em seguida do compartimento apical (inserto), tomando-se o cuidado de não encostar na monocamada. Em seguida eram adicionados 500 µL de meio novo no compartimento apical, e finalmente 1,5 mL no compratimento basolateral. Esta sequência de realização do procedimento é necessária para evitar o ressecamento das células, e além disso, evitar qualquer efeito de pressão hidrostática que possa perturbar a monocamada.

4.2.4 Monitoramento da integridade das monocamadas de células Caco-2: determinação da RET

No protocolo escolhido como referência⁷⁵ o valor padrão da RET a 37 °C é 260 ± 65 Ω .cm², e as monocamadas com valores inferiores a 165 Ω .cm² são descartadas. Os valores da RET das monocamadas Caco-2 podem variar de acordo com o clone de células Caco-2 utilizado, o número de dias de cultivo, o número de passagem e condições de cultura,⁷⁵ assim, considerando possíveis variações devido às características celulares, 300 Ω .cm² foi escolhido como valor mínimo da RET. No 17º dia de cultivo foi monitorada a RET em um dos insertos controles, e obtido o valor de 854,28 Ω .cm². Este valor indica que a monocamada estava adequadamente sendo formada, ou seja, estavam se desenvolvendo na membrana as estruturas que compõem as junções intercelulares, tornando mais restritos os espaços entre as células. Como consequência, há a restrição da passagem de eletrólitos, aumentando o valor da resistência e indicando, portanto, que a monocamada estava apta para a realização do experimento. Porém, como descrito no protocolo de referência,⁷⁵ o cultivo da monocamada foi mantido até o 21° dia, quando foram determinados os valores de RET para todas as monocamadas e o experimento foi realizado. Para as medidas de RET, foi convencionado manter-se os eletrodos imersos no sistema por cinco segundos, para então realizar a leitura da resistência elétrica transepitelial. Com este intervalo de tempo de apenas cinco segundos o valor da RET era estabilizado e a temperatura mantida a 37 °C até a leitura de todos os insertos em uma placa de 12 poços. A medida determinada a uma temperatura inferior, como 25 °C por exemplo, poderia fornecer erroneamente um valor elevado de RET alterando nossa interpretação quanto à integridade da monocamada, pois esta medida é altamente dependente da temperatura. Os valores de RET obtidos (tabela 7) variaram de 630,54 a 739,02 Ω .cm² nas membranas com tampão Hank's a pH 7,4.

Valores de RET (Ω .cm ²)									
	Pla	ca 1			Pla	ca 2			
692,69	716,42	706,25	641,84	638,45	663,31	681,39	664,44		
726,59	735,63	714,16	698,34	645,23	678	713,03	700,6		
727,72	731,11	739,02	692,69	662,18	689,3	678	717,55		

Tabela 7 - Valores determinados de resistência elétrica transepitelial (RET) em Ω.cm², para os insertos distribuídos em duas placas de 12 poços

* O valor de RET branco igual a 112 Ω (membrana suporte sem a monocamada de células) foi subtraído dos valores de resistência obtidos, e o valor resultante foi multiplicado pela área da membrana suporte (A = 1,13 cm²).

Fonte: Elaborada pela autora.

As medidas de RET para todas as monocamadas cultivadas foi superior a 300 Ω .cm², assim todas foram consideradas aptas para a determinação da permeabilidade dos compostos. Neste trabalho, mesmo considerando o acompanhamento e inspeção visual do crescimento das monocamadas, a medida da resistência elétrica transepitelial associada ao uso da fluoresceína foram as principais ferramentas para avaliação da integridade das membranas obtidas. Outra forma de caracterizar a integridade das monocamadas é a determinação da permeabilidade de compostos com dados conhecidos desta propriedade, como por exemplo o manitol, a digoxina, o metoprolol, a cimetidina e a fluoresceína.^{108,126} A fluoresceína, destaca-se pelo emprego simplificado em relação ao uso do manitol, um marcador radioativo, permitindo a obtenção das mesmas informações sobre integridade de monocamadas, além da sua fácil quantificação, estabilidade no meio de transporte e característica de permeabilidade bem estabelecida.^{75,108-} 109,126 Portanto, a fluoresceína além de ser usada como fármaco referência de baixa permeabilidade (controle negativo),¹⁰⁸ é também extensamente utilizada como marcador para acompanhamento da integridade da monocamada de células durante o tempo de realização do experimento, pois é um marcador de transporte passivo paracelular em pH igual 7,4.^{108,126} Resultados de Konishi et al. indicaram que a permeabilidade da fluoresceína em pH 7,4 foi inversamente proporcional aos valores de RET, o que reforça o perfil de absorção paracelular da fluoresceína em tais condições de pH.^{108,127}

4.2.5 Determinação da permeabilidade em células Caco-2

Os valores de permeabilidade aparente (P_{app}) dos compostos foram determinados a partir da fração permeada no sentido apical-basolateral de acordo com a equação apresentada no item 3.3.4, empregando-se HPLC com detector espectrofotométrico UV-vis.¹¹⁰ A concentração inicial para os compostos foi de 10 μ g/mL, o equivalente em concentração molar a uma faixa de 22 a 32 μ M, dependendo da massa molecular de cada composto. Ao início e ao fim do experimento foram coletadas amostras no compartimento receptor à fim de monitorar a estabilidade de todos os compostos no meio de transporte. Esta informação é importante para assegurar a confiabilidade acerca das quantidades transportadas de cada molécula. Os valores de permeabilidade determinados são apresentados na tabela 8. O período apresentado na tabela representa o intervalo de tempo entre a primeira quantificação possível de ser realizada e a última.

Composto	Período (min)	Co-Cf (µg.mL ⁻¹)	C_0 - $C_f(\mu M)$	Papp (cm.s ⁻¹)	Desvio padrão			
Composto 590	150	0,221–1,160	0,59 – 3,09	2,06 x 10 ⁻⁵	2,68 x 10 ⁻⁶			
Composto 592	145	0,166 - 0,809	0,36 – 1,78	1,45 x 10 ⁻⁵	5,54 x 10 ⁻⁶			
Composto 593	145	0,248 - 0,449	0,60 - 1,08	2,87 x 10 ⁻⁶	1,47 x 10 ⁻⁶			
Composto 591	130	0,540 - 1,047	1,44 – 2,79	2,43 x 10 ⁻⁵	3,32 x 10 ⁻⁶			
Composto 594		Composto instável						
BZN	120	0,106 - 1,644	2,27 - 6,32	1,34 x 10 ⁻⁵	3,04 x 10 ⁻⁶			
Verapamil	110	0,194 - 0,769	1,29 – 1,69	7,74 x 10 ⁻⁶	6,19 x 10 ⁻⁶			
Fluoresceína	Concentração permeada não detectada							

Tabela 8 - Permeabilidade em células Caco-2 determinada para os compostos em estudo

Fonte: Elaborada pela autora.

O composto 594 se mostrou instável durante o tempo de realização do experimento de transporte, por isso não foi possível a determinação da sua permeabilidade. Para a fluoresceína, usada como controle de baixa permeabilidade, a quantidade transportada para o compartimento receptor foi menor que o limite de detecção do método de quantificação empregado. Este resultado confirma a integridade das monocamadas de células Caco-2 durante todo o tempo de realização do experimento, e também a confiabilidade dos resultados. A permeabilidade determinada para os compostos pode ser observada em escala logarítmica na tabela 9.
Composto	P _{app} (cm.s ⁻¹)	LogPapp
Composto 590	2,06 x 10 ⁻⁵	-4,69
Composto 592	1,45 x 10 ⁻⁵	-4,84
Composto 593	2,87 x 10 ⁻⁶	-5,54
Composto 591	2,43 x 10 ⁻⁵	-4,61
BZN	1,34 x 10 ⁻⁵	-4,87
Verapamil	7,74 x 10 ⁻⁶	-5,11

Tabela 9 - Valores de permeabilidade em células Caco-2 para os compostos em estudo

Fonte: Elaborada pela autora.

Na próxima etapa do nosso estudo, os valores de permeabilidade determinados experimentalmente foram confrontados com os valores preditos pelo modelo de HQSAR.

4.2.6 Permeabilidade em células Caco-2 predita e experimental

A permeabilidade determinada experimentalmente foi comparada aos valores preditos pelo modelo de HQSAR, como mostra a tabela 10. Como já mencionado, um composto pode ser classificado quanto à sua permeabilidade podendo ser considerado de baixa absorção (0 – 20%), se o valor de P_{app} for menor que 1 x 10⁻⁶ cm.s⁻¹, de moderada absorção (20 – 70%) com valores de P_{app} entre 1 e 10 x 10⁻⁶ cm.s⁻¹, e de alta absorção (70 – 100%), quando P_{app} é superior a 10 x 10⁻⁶ cm.s^{-1.85} Assim, os compostos também foram classificados em baixa, moderada e alta absorção, segundo os valores preditos e determinados de permeabilidade (tabela 10).

Composto	LogP _{app} ^[a]	Classificação Experimental	LogP _{app-} predito ^[b]	Classificação Predita	Res ^[c]
Composto 590	-4,69	Alta	-4,99	Alta	-0,30
Composto 592	-4,84	Alta	-5,11	Moderada	-0,27
Composto 593	-5,54	Moderada	-5,14	Moderada	0,40
Composto 591	-4,61	Alta	-4,99	Alta	-0,38
BZN	-4,87	Alta	-4,90	Alta	-0,03
Verapamil	-5,11	Moderada	-4,85	Alta	0,26

Tabela 10 - Classificação experimental e predita da permeabilidade em células Caco-2

[a] Logaritmo do valor de permeabilidade obtido no experimente de em células Caco-2. [b] Logarítmo do valor de permeabilidade predito pelo modelo HQSAR. [c] Valores residuais, a diferença entre valores preditos e experimentais.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para os compostos do conjunto de validação, o modelo foi capaz de predizer valores de permeabilidade muito próximos aos valores determinados experimentalmente, sendo que o modelo classificou 75% destes compostos de acordo com o experimento. Observa-se na tabela 10 que os valores residuais entre valores preditos e experimentais são baixos, principalmente considerando o erro do modelo igual a +/- 0,28. Nenhum dos compostos apresentou baixa absorção de acordo com os resultados do experimento de permeabilidade, o que era esperado de acordo com a avaliação das propriedades físico-químicas destas moléculas, tais como o valor de PSA e adequação às regras de Lipinski. Os compostos 590, 591, 592 e BZN foram classificados como tendo alta absorção, enquanto os compostos 593 e verapamil, classificados como de moderada absorção. Para o verapamil esta classificação à princípio diverge do esperado, uma vez que este é um composto conhecido como referência de alta permeabilidade e indicado pelo FDA como fármaco padrão de alta permeabilidade.¹⁰⁸ A absorção em humanos do verapamil é praticamente 100%, 40,108,128 sugerindo a subestimação do seu potencial de absorção na classificação realizada pelo experimento. Esta divergência na classificação do verapamil como um composto de permeabilidade moderada, é também encontrada em outros trabalhos na literatura.¹⁰⁸ O verapamil é também um inibidor da bomba de efluxo glicoproteína-P,⁹²⁻⁹³ desta forma, esta aparente contradição pode indicar a sua interação com a P-gp^{93,108,129}. Portanto, é necessário considerar a variação dos níveis de expressão da P-gp sob diferentes condições e tempo de cultivo das células¹²⁹. Assim, devemos levar em conta também o número

de passagem das células utilizadas nos experimentos de permeabilidade, o qual em todos os experimentos realizados estavam entre 35 e 45. Este intervalo está dentro da janela de passagem celular em que a expressão e funcionalidade de bomba de efluxo P-gp tem sido observada, enquanto que em passagens mais elevadas essa atividade parece diminuir.^{108,130} O valor de permeabilidade em Caco-2 predito pelo modelo para o verapamil, igual a -4,85 (+/- 0,28), é bastante próximo ao valor experimental igual a -4,58, disponível nas bases de dados Drug Bank¹³¹ e PubChem¹³². Assim, podemos considerar que a permeabilidade predita pelo modelo HQSAR (Tabela 10) corresponde à real permeabilidade do composto verapamil, cujo valor absoluto foi ligeiramente subestimado pelo experimento devido as suas interações com a P-gp. Para investigar melhor e confirmar esta hipótese, uma vez que o efluxo promovido pela P-gp pode influenciar a absorção de compostos no intestino, o ensaio de efluxo de Calceína-AM, descrito anteriormente no item 3.3.5 foi realizado, a fim de estimar a interação do verapamil com a P-gp nas monocamadas de células Caco-2.

4.2.7 Ensaio de efluxo de Calceína-AM

Diversas metodologias experimentais são utilizadas no estudo da atividade da P-gp *in vitro*, dentre as quais está o ensaio de efluxo do substrato de P-gp, calceína-AM.^{111,133-134} A calceína-AM é permeável nas membranas celulares e rapidamente é expulsa das células pela P-gp. Neste ensaio, o grupo acetometóxi da calceína-AM, é hidrolisado por esterases intracelulares liberando a calceína fluorescente, que pode ser detectada por citometria de fluxo. A calceína não é um substrato da P-gp e não é permeável nas membranas celulares, portanto, o seu acúmulo dentro das células e consequente aumento da fluorescência intracelular, indica que houve diminuição do efluxo do seu precursor, a calceína-AM. Assim, a calceína fluorescente funciona como um marcador de compostos que são substratos ou inibidores da P-gp.^{111,133-134} Foi realizado o ensaio de efluxo da calceína-AM para os compostos verapamil e benzonidazol, usados como controles positivos no ensaio de permeabilidade. Os resultados, ilustrados na figura 20, são apresentados em porcentagem de fluorescência na ausência dos compostos.



Figura 20 - Fluorescência intracelular da calceína na ausência e presença dos compostos verapamil e benzonidazol

Fonte: Elaborada pela autora.

A fluorescência da calceína é a referência (ou branco), dada como 100 %. Observou-se que na presença do verapamil a fluorescência da calceína aumentou em 31%, indicando que houve diminuição do efluxo de calceína-AM, provocado pela inibição da P-gp pelo verapamil. Este resultado corrobora o fato de que o verapamil é um inibidor da P-gp,^{93,135–137} reforçando nossa hipótese de que sua interação com a bomba de efluxo levou a uma menor permeabilidade na monocamada de células caco-2. Na presença do bezonidazol, a fluorescência da calceína foi de 87,19%, o que também está de acordo com a sua alta permeabilidade em caco-2 determinada no experimento. O benzonidazol embora possa interagir com a P-gp, não é um inibidor, e em alguns casos, dependendo da concentração pode até modular a sua atividade provocando aumento de efluxo de substratos.¹³⁷ Isso explica porque, de acordo com os resultados obtidos, o acúmulo de calceína (ou fluorescência) intracelular foi reduzido. Estes resultados estão de acordo com outro estudo encontrado na literatura,¹³⁷ onde a fluorescência do marcador aumenta na presença de verapamil, e diminui na presença de benzonidazol. Desta forma, sua interação com a P-gp não provocou a subestimação da sua permeabilidade em células Caco-2, sendo que resíduo entre a permeabilidade predita e experimental é igual a 0,03. Portanto, o modelo é altamente capaz de estimar o perfil de permeabilidade de uma nova molécula, candidata a fármaco, ainda nas fases iniciais de descoberta. Deve-se, porém, levar em consideração as características estruturais da molécula e avaliar a possibilidade de ser um possível substrato da P-gp, e então, ponderar o erro de subestimação da sua permeabilidade.

Alguns estudos sugerem, por exemplo, que o aumento do número de possibilidades de formação de ligações de hidrogênio em uma molécula pode aumentar a chance de ligação com a P-gp.¹³⁸ Também a "Regra dos 4", que sugere que compostos com: peso molecular < 400, número total de O e N < 4 e pKa básico < 8, provavelmente não serão substratos de P-gp.¹³⁹ Além disso, a importância do uso associado de outros modelos *in silico* preditivos importantes, como o modelo de inibição da P-gp e de absorção intestinal humana, disponíveis na base de dados PK/DB.⁴⁹

Avaliando essas propriedades para os compostos estudados (tabela 6), verica-se que os compostos 592 e 593, classificados pelo modelo com moderada permeabilidade (tabela 10), apresentam número de aceptores de ligação de hidrogênio igual a 6 (>4) e massas moleculares maiores que 400, sugerindo que podem sofrer efluxo. O composto 593 que foi classificado como de moderada permeabilidade tanto pelo modelo, quanto pelo experimento de permeabilidade, teve também o seu valor de inibição da P-gp predito (pEC₅₀ = -0.54, EC₅₀ = 3,47 µmol/L) indicando que esta molécula é um inibidor de P-gp. Portanto, a moderada permeabilidade predita para este composto, está de acordo com as suas propriedades avaliadas, sendo confirmada pelo experimento. Já para o composto 592 que foi classificado como de alta permeabilidade pelo experimento, porém com moderada P_{app} pelo modelo, teve seu valor de inibição da P-gp predito (pEC₅₀ = - 1,08, EC₅₀ = 12,02 μ mol/L), relativamente maior do que a do composto 593, sugerindo que ele pode interagir com a P-gp (não necessáriamente como um inibidor). Assim, embora o modelo HQSAR, que considera características estruturais de acordo com as distinções de fragmentos A e DA (tipo de átomos e doadores/aceptores de ligação de hidrogênio), indique uma moderada permeabilidade para o composto 592, deve-se considerar sua predição de inibição de P-gp, e ponderar que o modelo pode subestimar ligeiramente sua real permeabilidade. O que foi confirmado pelo experimento. Para os demais compostos (composto 590 e 591), a alta permeabilidade predita, era esperada dadas as suas propriedades e inibição de P-gp preditas. Para estes compostos a alta permeabilidade predita foi confirmada pelo experimento.

Estes resultados corroboram a adequação e confiabilidade do experimento de permeabilidade realizado, além do alto poder preditivo do modelo *in silico* desenvolvido. Após a validação experimental, este modelo poderá ser integrado a outros modelos, como os de solubilidade, HIA e biodisponibilidade oral, que é diretamente afetada pela combinação de propriedades como solubilidade, absorção e permeabilidade. Estes modelos foram

desenvolvidos previamente em nosso laboratório e estão disponíveis livremente na base de dados PK/DB^{49,140,141}. A origem da PK/DB está na dissertação de mestrado de Tiago L. Moda, desenvolvida entre 2005 e 2007 sob a orientação do Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo, com o objetivo de criar modelos preditivos *in silico* para duas propriedades farmacocinéticas (biodisponibilidade oral e ligação às proteínas plasmáticas) aplicáveis na descoberta de fármacos. Devido à quantidade de dados coletados durante o processo de modelagem e aos problemas com ADME terem sido identificados como uma das principais causas de insucesso de candidatos, surgiu a idéia de compartilhar os dados farmacocinéticos de elevada qualidade utilizados e os modelos desenvolvidos com a comunidade científica mundial. Portanto, este estudo possui grande utilidade, considerando que a determinação experimental das propriedades de ADME em humanos de candidatos a fármacos é bastante complexa e os custos envolvidos são elevados.

4.3 Modelo de Permeabilidade PAMPA

Um conjunto de 77 moléculas estruturalmente diversas e associadas aos seus valores experimentais de permeabilidade em PAMPA foi obtido da literatura.¹⁴² Este conjunto total foi dividido em um conjunto treinamento contendo 65 moléculas (85%) e um conjunto teste contendo 12 moléculas (15%) (Tabela 11). Os critérios para obtenção de um conjunto de dados que abrange uma ampla cobertura do espaço químico-biológico da propriedade alvo também foram seguidos para a construção do modelo *in silico* preditivo de permeabilidade em PAMPA. Portanto, o conjunto apresenta uma grande diversidade química associada a uma ampla distribuição de valores de permeabilidade. A Figura 21, mostra a presença de compostos representativos nas faixas de baixa, moderada e alta absorção. Entre os compostos encontramse fármacos de diversas classes terapêuticas, como ilustra a Figura 22.



Figura 21 - Histograma da distribuição dos valores de permeabilidade em PAMPA para o conjunto de dados Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 22 - Exemplos representativos do conjunto de dados da modelagem dos dados de PAMPA Fonte: Elaborada pela autora.

	Conjunto treinamento	LogPapp		Conjunto treinamento	LogPapp
1	Composto 595	-4,78	41	Composto 635	-6,05
2	Composto 596	-4,72	42	Composto 636	-5,37
3	Composto 597	-4,72	43	Composto 637	-4,77
4	Composto 598	-4,77	44	Composto 638	-5,45
5	Composto 599	-6,17	45	Composto 639	-5,47
6	Composto 600	-4,76	46	Composto 640	-4,76
7	Composto 601	-4,97	47	Composto 641	-4,95
8	Composto 602	-6,54	48	Composto 642	-4,82
9	Composto 603	-5,3	49	Composto 643	-4,54
10	Composto 604	-4,91	50	Composto 644	-6,02
11	Composto 605	-5,03	51	Composto 645	-5,22
12	Composto 606	-6,04	52	Composto 646	-4,48
13	Composto 607	-4,94	53	Composto 647	-4,67
14	Composto 608	-5,31	54	Composto 648	-4,68
15	Composto 609	-5,21	55	Composto 649	-5,55
16	Composto 610	-4,53	56	Composto 650	-4,61
17	Composto 611	-5,41	57	Composto 651	-5,14
18	Composto 612	-4,64	58	Composto 652	-4,44
19	Composto 613	-4,98	59	Composto 653	-4,93
20	Composto 614	-4,77	60	Composto 654	-4,36
21	Composto 615	-6,38	61	Composto 655	-4,78
22	Composto 616	-4,28	62	Composto 656	-5,34
23	Composto 617	-6,47	63	Composto 657	-4,8
24	Composto 618	-6,69	64	Composto 658	-5,72
25	Composto 619	-4,67	65	Composto 659	-5,28
26	Composto 620	-4,71			
27	Composto 621	-5,68		Conjunto teste	LogPapp
28	Composto 622	-5,55	1	Composto 660	-4,77
29	Composto 623	-5,18	2	Composto 661	-5,65
30	Composto 624	-5,1	3	Composto 662	-4,55
31	Composto 625	-4,86	4	Composto 663	-4,93
32	Composto 626	-5,56	5	Composto 664	-6,15
33	Composto 627	-5,55	6	Composto 665	-6,71
34	Composto 628	-6,62	7	Composto 666	-4,24
35	Composto 629	-6,18	8	Composto 667	-5,11
36	Composto 630	-6,14	9	Composto 668	-4,5
37	Composto 631	-4,83	10	Composto 669	-6,44
38	Composto 632	-5,31	11	Composto 670	-5,77
39	Composto 633	-6,05	12	Composto 671	-5,27
40	Composto 634	-5,98			

 $Tabela \ 11 \ \text{-} \ Mol{\acute{e}}culas \ dos \ conjuntos \ treinamento \ e \ teste \ e \ seus \ respectivos \ valores \ de \ log P_{app}. PAMPA$

Fonte: Elaborada pela autora.

O conjunto de dados foi dividido em um conjunto treinamento de 65 compostos e um conjunto teste contendo 12 moléculas. As etapas e avaliação da combinação dos diferentes parâmetros para a geração do modelo de HQSAR a partir de dados de permeabilidade em PAMPA foram as mesmas abordadas durante a modelagem para os dados de Caco-2. Assim, os hologramas moleculares foram gerados a partir de 12 séries padrões de comprimentos de holograma (53, 59, 61, 71, 83, 97, 151, 199, 257, 307, 353, e 401 caixas) e os fragmentos moleculares foram gerados e determinados segundo as distinções de fragmentos que diferenciam características químicas estruturais como (A, B, C, H, Ch e DA). Os hologramas moleculares foram relacionados aos dados experimentais de permeabilidade em PAMPA via análise de PLS com validação cruzada (LOO). Inicialmente foram avaliadas diversas combinações de distinções de fragmentos e comprimentos de holograma, usando o tamanho de fragmento padrão (4-7). Foram selecionados oito modelos que apresentaram os valores de coeficiente de correlação da validação cruzada (q^2) e coeficiente de determinação múltipla (r^2), acima de 0,6. Os modelos selecionados (modelos 1, 10, 11, 13, 22, 23, 25 e 26) são apresentados na Tabela 12.

		Parâmetros estatísticos						
	Distinção de fragmentos	q^2	SEE	r^2	SEE	HL	N	
Modelo 1	A/B/C/Ch	0,61	0,40	0,80	0,29	83	5	
Modelo 10	A/B/C	0,62	0,40	0,80	0,29	83	5	
Modelo 11	A/B/H	0,62	0,41	0,91	0,20	257	8	
Modelo 13	A/B/C/H	0,63	0,40	0,94	0,17	257	8	
Modelo 22	A/B/H/Ch	0,62	0,40	0,93	0,17	199	8	
Modelo 23	A/H/Ch/DA	0,60	0,42	0,91	0,20	353	8	
Modelo 25	B/H/Ch/DA	0,60	0,41	0,84	0,26	83	6	
Modelo 26	A/C/H	0,60	0,42	0,91	0,19	353	8	

Tabela 12 - Resultados da análise de HQSAR para várias distinções de fragmentos sobre os parâmetros estatísticos usando o tamanho de fragmento padrão (4-7)

*Cinco melhores modelos de HQSAR selecionados para avaliação de tamanho de fragmentos; q^2 , coeficiente de validação cruzada (LOO); r^2 , coeficiente de correlação sem validação cruzada; SEE, erro padrão sem validação cruzada; N, número ótimo de componentes; HL, comprimento do holograma. Distinção de Fragmentos: A, átomos; B, ligação; C, conecção; H, átomos hidrogênio; Ch, quiralidade; DA, átomos doadores e aceptores.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os modelos não apresentaram variações significativas quanto aos seus valores de q^2 , sendo o menor valor igual a 0,60 e o maior 0,63. Quanto ao parâmetro r^2 , o modelo que apresentou o melhor resultado foi o 13 ($r^2 = 0,94$). Considerando o menor número de variáveis latentes, o modelo 10 seria o mais adequado com o número ótimo de componentes igual a 5. Para a próxima etapa, os oito modelos selecionados, foram testados quanto a influência dos diferentes tamanhos de fragmentos sobre os parâmetros estatísticos, considerando as seguintes variações: 1–3, 2–5, 3–6, 4–7, 5–8 e 6–9. Os resultados estatísticos considerando a variação de fragmentos 6-9, foram muito inferiores aos obtidos com o tamanho de fragmento padrão (4–7), por isso não foram considerados nas etapas de avaliação seguintes. Os resultados para os demais tamanhos de fragmentos considerados (1–3, 2–5, 3–6, 4–7 e 5–8) são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13 - Análise da influência da variação do tamanho de fragmentos (1-3, 2-5, 3-6, 4-7 e 5-8), sobre os parâmetros estatísticos chave, aplicando oito distinções de fragmentos selecionadas: A/B/C/Ch, A/B/C, A/B/H, A/B/C/H, A/B/H/Ch, A/H/Ch/DA, B/H/Ch/DA e A/C/H

Parâmetros estatísticos - Influência do tamanho de fragmentos							
Modelo	Tamanho fragmentos	q^2	r ²	SEE	HL	N	
	1-3	0,65	0,85	0,25	151	7	
	2-5	0,63	0,85	0,25	97	6	
Model I A/B/C/Ch	3-6	0,61	0,91	0,20	401	7	
	4-7	0,61	0,80	0,29	83	5	
	5-8	0,57	0,90	0,21	83	8	
	1-3	0,65	0,85	0,25	151	7	
Modelo 10	2-5	0,60	0,87	0,24	61	7	
	3-6	0,60	0,91	0,20	401	7	
A/D/C	4-7	0,62	0,80	0,29	83	5	
	5-8	0,55	0,75	0,32	97	5	
	1-3	0,67	0,83	0,28	61	8	
	2-5	0,67	0,90	0,21	401	8	
Modelo 11 A/B/H	3-6	0,66	0,92	0,19	401	8	
<i>T</i> (D /11	4-7	0,62	0,91	0,20	257	8	
	5-8	0,50	0,91	0,20	257	8	
	1-3	0,64	0,85	0,26	151	7	
Madal- 12	2-5	0,66	0,89	0,22	307	7	
A/B/C/H	3-6	0,65	0,92	0,19	257	8	
	4-7	0,63	0,94	0,17	257	8	
	5-8	0,59	0,92	0,18	199	8	

continuação						
	1-3	0,66	0,83	0,27	353	8
Modelo 22	2-5	0,66	0,90	0,21	401	8
A/B/H/Ch	3-6	0,60	0,82	0,28	61	6
	4-7	0,62	0,93	0,17	199	8
	5-8	0,62	0,91	0,19	199	8
	1-3	0,67	0,82	0,28	59	8
Modelo 23 A/H/Ch/DA	2-5	0,69	0,87	0,23	53	7
	3-6	0,59	0,88	0,23	307	8
	4-7	0,60	0,91	0,20	353	8
	5-8	0,48	0,90	0,21	353	8
	1-3	0,64	0,81	0,29	59	8
	2-5	0,62	0,85	0,25	97	6
Modelo 25 B/H/Ch/DA	3-6	0,60	0,89	0,22	353	8
D/II/CII/D/X	4-7	0,60	0,84	0,26	83	6
	5-8	0,43	0,72	0,34	257	4
	1-3	0,67	0,85	0,26	307	8
	2-5	0,69	0,91	0,20	151	8
Modelo 26	3-6	0,69	0,90	0,21	307	7
11/0/11	4-7	0,60	0,91	0,19	353	8
	5-8	0,53	0,89	0,22	307	7

 q^2 , coeficiente de correlação com validação cruzada (LOO); r^2 , coeficiente de correlação sem validação; SEE, erro padrão sem validação cruzada; N, número ideal de componentes; HL, comprimento holograma. Distinção de Fragmento: A, átomos; B, ligação; C, conectividade; H, átomos de hidrogênio; Ch, quiralidade; DA, átomos doadores e receptores.

Fonte: Elaborada pela autora.

A variação do tamanho dos fragmentos, resultou no aumento do valor do coeficiente de correlação com validação cruzada, q^2 , para todos os modelos de HQSAR, levando-se em consideração o tamanho de fragmento padrão (4-7). O tamanho de fragmento 5-8 resultou em valores menores de q^2 para todos os modelos avaliados em relação a combinação usada originalmente. Para o modelo 10 (A/B/C), o tamanho de fragmento 1-3 resultou no aumento discreto de q^2 de 0,62 para 0,65; enquanto que o valor de r^2 aumentou de 0,80 para 0,85. Os modelos 1 (A/B/C/Ch), 11 (A/B/H), 13 (A/B/C/H), 22 (A/B/H/Ch), 23 (A/H/Ch/DA), 25 (B/H/Ch/DA) e 26 (A/C/H), também apresentaram valores de q^2 ligeiramente melhores para os tamanhos de fragmento 1-3 e 2-5. Os modelos 11, 13 e 26 também apresentaram um aumento do valor de q^2 considerando o tamanho de fragmento 3-6. As variações mais significativas nos valores de q^2 foram observadas para os modelos 23 (de $q^2_{4-7} = 0,60$ para $q^2_{1-3} = 0,67$ e $q^2_{2-5} = 0,69$) e para o modelo 26 (de $q^2_{4-7} = 0,60$ para $q^2_{1-3} = 0,67$, $q^2_{2-5} = 0,69$ e $q^2_{3-6} = 0,69$). Após a análise de uma sequência de diferentes tamanhos de fragmentos, nesta etapa de avaliação dos

modelos de HQSAR considerando a sua consistência interna (q^2) , foi feita a análise da sua habilidade em predizer o valor de permeabilidade para os compostos do conjunto teste. Esta etapa de validação externa, considerada a mais importante da modelagem de QSAR, foi útil neste caso também como critério de seleção do modelo mais adequado dentre os 32 modelos que correspondem aos requisitos numéricos adotados neste estudo (q^2 e $r^2 > 0,6$), apresentados na Tabela 13. Assim, os modelos com $q^2 < 0,6$ não foram considerados nesta etapa, sendo todos eles com tamanho de fragmentos de 5-8. Os resultados do teste de validação externa para o conjunto teste composto por 12 moléculas são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados da validação externa para os modelos selecionados a partir da análise da influência da variação do tamanho de fragmentos (1-3, 2-5, 3-6, 4-7, e 5-8) sobre os parâmetros estatísticos chave, aplicando cinco distinções de fragmentos selecionadas: A/B/C/Ch, A/B/C, A/B/H, A/B/C/H, A/B/H/Ch, A/H/Ch/DA, B/H/Ch/DA, A/C/H

Parâmetros estatísticos							
	Tamanho fragmentos	q^2	r^2	SEE	HL	N	r ² pred
	1-3	0,65	0,85	0,25	151	7	0,44
N.C. 1.1.4	2-5	0,63	0,85	0,25	97	6	0,63
Model I	3-6	0,61	0,91	0,20	401	7	0,37
A/B/C/CII	4-7	0,61	0,80	0,29	83	5	0,44
	5-8	0,57	0,90	0,21	83	8	-
	1-3	0,65	0,85	0,25	151	7	0,44
	2-5	0,60	0,87	0,24	61	7	0,58
Modelo 10	3-6	0,60	0,91	0,20	401	7	0,41
A/D/C	4-7	0,62	0,80	0,29	83	5	0,36
	5-8	0,55	0,75	0,32	97	5	-
	1-3	0,67	0,83	0,28	61	8	0,44
M.J.I. 11	2-5	0,67	0,90	0,21	401	8	0,69
	3-6	0,66	0,92	0,19	401	8	0,69
A/D/11	4-7	0,62	0,91	0,20	257	8	0,78
	5-8	0,50	0,91	0,20	257	8	-
	1-3	0,64	0,85	0,26	151	7	0,70
	2-5	0,66	0,89	0,22	307	7	0,55
Modelo 13	3-6	0,65	0,92	0,19	257	8	0,57
A/B/C/H	4-7	0,63	0,94	0,17	257	8	0,63
	5-8	0,59	0,92	0,18	199	8	-
-	1-3	0,66	0,83	0,27	353	8	0,62
	2-5	0,66	0,90	0,21	401	8	0,67
Modelo 22	3-6	0,60	0,82	0,28	61	6	0,54
A/D/II/UI	4-7	0,62	0,93	0,17	199	8	0,51
	5-8	0,62	0,91	0,19	199	8	0,55
							continua

continuação							
	1-3	0,67	0,82	0,28	59	8	0,39
Madala 22	2-5	0,69	0,87	0,23	53	7	0,55
A/H/Ch/DA	3-6	0,59	0,88	0,23	307	8	0,42
	4-7	0,60	0,91	0,20	353	8	0,87
	5-8	0,48	0,90	0,21	353	8	-
	1-3	0,64	0,81	0,29	59	8	0,42
	2-5	0,62	0,85	0,25	97	6	0,51
Niodelo 25 B/H/Ch/DA	3-6	0,60	0,89	0,22	353	8	0,66
D/II/CII/DA	4-7	0,60	0,84	0,26	83	6	0,54
	5-8	0,43	0,72	0,34	257	4	-
	1-3	0,67	0,85	0,26	307	8	0,62
Madala 26	2-5	0,69	0,91	0,20	151	8	0,74
Modelo 26	3-6	0,69	0,90	0,21	307	7	0,87
$\Lambda/C/\Pi$	4-7	0,60	0,91	0,19	353	8	0,55
	5-8	0,53	0,89	0,22	307	7	-

 q^2 , coeficiente de correlação com validação cruzada (LOO); r^2 , coeficiente de correlação sem validação; SEE, erro padrão; N, número ideal de componentes; HL, comprimento holograma. Distinção de Fragmento: A, átomos; B, ligação; C, conectividade; H, átomos de hidrogênio; Ch, quiralidade; DA, átomos doadores e receptores; r^2_{pred} , coeficiente de correlação para o conjunto teste.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar de apresentarem os parâmetros dentro dos limites mínimos esperados $(q^2 > 0.5)$ e $r^2 > 0.6$,³² muitos modelos não foram considerados preditivos, dados os valores de $r_{pred}^2 < 0.5$,¹²⁰ como os modelos 1 e 10 (1-3, 3-6, 4-7, e 5-8), o modelo 11 (1-3), o modelo 23 (1-3 e 3-6) e o modelo 25 (1-3). Entretanto, os demais modelos satisfazem os requisitos essenciais $(q^2 > 0.5, r^2 > 0.6)$ e $r_{pred}^2 > 0.5$,^{32,120} podendo ser considerados preditivos. Alguns modelos apresentaram valores considerados altos de r_{pred}^2 , como os modelos 11 (com tamanho de fragmento **2-5**: $q^2 = 0.67$, $r^2 = 0.90$ e $r_{pred}^2 = 0.69$; tamanho de fragmento **3-6**: $q^2 = 0.66$, $r^2 = 0.92$ e $r_{pred}^2 = 0.64$, $r^2 = 0.85$ e $r_{pred}^2 = 0.70$), o modelo 22 (2-5: $q^2 = 0.66$, $r^2 = 0.90$ e $r_{pred}^2 = 0.60$, $r^2 = 0.90$ e $r_{pred}^2 = 0.87$), o modelo 25 (**3-6**: $q^2 = 0.60$, $r^2 = 0.89$ e $r_{pred}^2 = 0.66$) e os modelos 26 (**2-5**: $q^2 = 0.69$, $r^2 = 0.91$ e $r_{pred}^2 = 0.74$ e também **3-6**: $q^2 = 0.69$, $r^2 = 0.69$, $r^2 = 0.90$ e $r_{pred}^2 = 0.69$, $r^2 = 0.91$ e $r_{pred}^2 = 0.74$ e também **3-6**: $q^2 = 0.69$, $r^2 = 0.90$ e $r_{pred}^2 = 0.69$, $r^2 = 0.91$ e $r_{pred}^2 = 0.74$ e também **3-6**: $q^2 = 0.69$, $r^2 = 0.90$ e $r_{pred}^2 = 0.60$, $r^2 = 0.91$ e $r_{pred}^2 = 0.74$ e também **3-6**: $q^2 = 0.69$, $r^2 = 0.91$ e $r_{pred}^2 = 0.74$ e também **3-6**: $q^2 = 0.69$, $r^2 = 0.90$ e $r_{pred}^2 = 0.69$, $r^2 = 0.91$ e $r_{pred}^2 = 0.74$ e também **3-6**: $q^2 = 0.69$, $r^2 = 0.90$ e $r_{pred}^2 = 0.69$, $r^2 = 0.91$ e $r_{pred}^2 = 0.74$ e também **3-6**: $q^2 = 0.69$, $r^2 = 0.90$ e $r_{pred}^2 = 0.69$, $r^2 = 0.91$ e $r_{pred}^2 = 0.74$ e também **3-6**: $q^2 = 0.69$, $r^2 = 0.90$ e $r_{pred}^2 = 0.87$).

Os modelos 23 (4-7) e 26 (3-6), apresentaram valores de r^2_{pred} significativamente superiores aos dos demais modelos, com $r^2_{\text{pred}} = 0,87$, indicando a alta capacidade preditiva de ambos modelos. Porém, o modelo 26 ($q^2 = 0,69$) apresenta consistência interna superior ao modelo 23 ($q^2 = 0,60$), indicada pelo teste de validação cruzada LOO. Além disso, o modelo 26 apresenta um número de variáveis latentes menor que o 23, portanto, ao final da modelagem o modelo 26 foi selecionado como o melhor modelo preditivo da permeabilidade em PAMPA. Este modelo é capaz de predizer 69% da variabilidade dos dados. Os resultados da predição realizada pelo modelo 26 (3-6), são mostrados na Tabela 15. Os valores indicam a boa predição da permeabilidade em PAMPA para os 12 compostos do conjunto teste, que representam as diferentes características estruturais incorporadas no conjunto treinamento.

No.	Moléculas	Exp ^[a]	Pred ^[b]	Res ^[c]
1	Composto 660	-4,77	-4,91	-0,14
2	Composto 661	-5,65	-5,29	0,36
3	Composto 662	-4,55	-4,82	-0,27
4	Composto 663	-4,93	-4,59	0,34
5	Composto 664	-6,15	-5,39	0,76
6	Composto 665	-6,71	-5,80	0,91
7	Composto 666	-4,24	-4,72	-0,48
8	Composto 667	-5,11	-4,82	0,29
9	Composto 668	-4,5	-4,81	-0,31
10	Composto 669	-6,44	-5,81	0,63
11	Composto 670	-5,74	-5,37	0,40
12	Composto 671	-5,27	-4,93	0,34
	$*r^{2}_{\text{pred}}$		0,87	

Tabela 15 - Valores experimentais, preditos pelo modelo final (modelo 26) e residuais de permeabilidade em PAMPA para os compostos do conjunto teste

Fonte: Elaborada pela autora.

A capacidade preditiva do modelo 26 (3-6) pode ser observada pela boa concordância entre os valores de permeabilidade preditos e experimentais, para o conjunto teste. A Figura 23 mostra uma representação gráfica dos valores de permeabilidade em PAMPA experimentais *versus* valores preditos, para os conjuntos treinamento e teste. O coeficiente de determinação, R^2 , foi igual a 0,91, indicando que há um excelente nível de ajuste dos valores, portanto, neste modelo linear, 91% das variáveis dependentes podem ser explicadas pelos regressores. A excelência do ajuste é confirmada pelo baixo valor do desvio padrão (s^2 = 0,03).

[[]a] log dos valores experimentais da permeabilidade em PAMPA (cm.s⁻¹). [b] Valores preditos pelo modelo 26 (3-6). [c] Valores residuais, a diferença entre valores preditos e experimentais. *Coeficiente de correlação para o conjunto teste, $r_{pred}^2 = 0.86$.



Figura 23- Valores preditos contra experimentais de permeabilidade em PAMPA para ambos conjuntos, treinamento e teste

Fonte: Elaborada pela autora.

O modelo apresenta ainda um alto nível de significância (> 95%), indicado pelo teste F, que apresentou um valor de F = 671,44, bem maior que o correspondente valor de referência, $F_{(1;63)} = 4$, para um nível de confiança de 95% (α = 0,05). A excelencia do nível de significância é confirmada pelo valor de probabilidade de F praticamente igual a 0 (p-valor = 2,63x10⁻³⁵). Com a mesma abordagem utilizada para o modelo de permeabilidade em células Caco-2, também para este modelo, avaliamos a qualidade preditiva externa através do teste com os coeficientes de determinação e inclinações das retas.^{29,32,115} O modelo 26 (3-6) satisfaz todos os critérios exigidos para ser considerado preditivo nesta análise ($|r^2_0 - r'^2_0| < 0,3$); 0,85 \leq k e/ou k' \leq 1,15; e ($r^2_0 - r'^2_0$)/ r^2 ou ($r^2_0 - r'^2_0$)/ $r^2 < 0,1$), apresentando os seguintes parâmetros: k = 0,95; k' = 1,05; $r^2_0 = 0,99$ e $r'^2_0 = 0,99$.

A robustez do modelo foi indicada pela validação cruzada LMO. O conjunto treinamento composto por 65 moléculas foi dividido em 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 e 2 grupos, afim de obter-se uma representatividade significativa das amostras (20 a 30%) para que o teste fosse efetivo. Foram mantidos o número de variáveis latentes, N = 7 e comprimento do holograma, HL = 307, adotados na validação cruzada LOO,¹²¹ e foi considerado o valor médio de q^2 , uma vez que o teste foi realizado em triplicata. O modelo apresenta um q^2 LMO médio estável em torno do q^2 LOO ($q^2 = 0,69$), com pequenas variações. A Figura 24 representa a



variação dos valores de q^2 com o número de grupos em que o conjunto treinamento foi dividido. O maior valor encontrado foi $q^2 = 0,69$, enquanto o menor foi $q^2 = 0,63$, indicando que o modelo

Figura 24 - Validação cruzada LMO para o conjunto treinamento de 65 compostos (LOO, q2 = 0.69)

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Validação experimental do modelo in silico de permeabilidade PAMPA

Nesta etapa foram exploradas a capacidade da modelagem de QSPR em identificar e priorizar cadidatos a fármacos com um adequado perfil de permeabilidade. Desta forma, 78 moléculas (compostos em desenvolvimento no LQMC) com dados de permeabilidade determinados experimentalmente por PAMPA, foram submetidos à predição pelo melhor modelo HQSAR representado pelo modelo 26 (3-6) (Tabela 14). Este é um extenso conjunto de validação, fornecendo uma prova consistente da capacidade preditiva deste modelo para novas moléculas. Os valores experimentais, preditos e residuais para cada molécula do conjunto de validação são apresentados na Tabela 16. Para realizar a avaliação as moléculas foram classificadas em duas categorias, de acordo com o valor limite de referência usado pela AbbVie $(P_{app} = 1.5 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1} \text{ ou } \log P_{app} = -5.82)$, a fim de agrupar os compostos com alta e baixa permeabilidade (Tabela 16).

Numero	Molécula	Papp-PAMPA 10 ⁻⁶ cm.s ⁻¹	Log Papp- PAMPA	Classificação Experimental	LogP _{app} predita	Classificação Predita	Resíduo
1	BZN	3,175	-5,50	Alta	-5,14	Alta	0,36
2	Composto 635	6,55	-5,18	Alta	-5,44	Alta	0,25
3	Composto 636	8,72	-5,06	Alta	-6,42	Baixa	1,36
4	Composto 637	9,06	-5,04	Alta	-5,65	Alta	0,61
5	Composto 638	0,709	-6,15	Baixa	-5,59	Alta	0,56
6	Composto 639	17,8	-4,75	Alta	-5,33	Alta	0,58
7	Composto 640	9,35	-5,03	Alta	-5,49	Alta	0,46
8	Composto 641	13,4	-4,87	Alta	-5,17	Alta	0,30
9	Composto 642	10,3	-4,99	Alta	-4,71	Alta	0,28
10	Composto 643	16,85	-4,77	Alta	-5,14	Alta	0,36
11	Composto 644	1,46	-5,84	Baixa	-5,69	Alta	0,15
12	Composto 590	12,7	-4,90	Alta	-4,97	Alta	0,08
13	Composto 645	14,6	-4,84	Alta	-5,26	Alta	0,42
14	Composto 646	1,8	-5,74	Alta	-5,66	Alta	0,08
15	Composto 647	12,5	-4,90	Alta	-5,11	Alta	0,21
16	Composto 648	10,5	-4,98	Alta	-5,14	Alta	0,16
17	Composto 649	1,94	-5,71	Alta	-5,56	Alta	0,15
18	Composto 650	8,44	-5,07	Alta	-5,39	Alta	0,31
19	Composto 651	2,9	-5,54	Alta	-5,45	Alta	0,09
20	Composto 652	3,74	-5,43	Alta	-5,38	Alta	0,05
21	Composto 653	1,61	-5,79	Alta	-5,55	Alta	0,25
22	Composto 654	6,83	-5,17	Alta	-5,54	Alta	0,37
23	Composto 655	24,2	-4,62	Alta	-5,27	Alta	0,65
24	Composto 656	2,075	-5,68	Alta	-5,60	Alta	0,08
25	Composto 657	3,965	-5,40	Alta	-5,71	Alta	0,31
26	Composto 658	2	-5,70	Alta	-5,70	Alta	0,00
27	Composto 659	2,35	-5,63	Alta	-5,59	Alta	0,04
28	Composto 660	5,87	-5,23	Alta	-5,73	Alta	0,50
29	Composto 661	16	-4,80	Alta	-5,62	Alta	0,82
30	Composto 662	11	-4,96	Alta	-5,37	Alta	0,41
31	Composto 663	2,175	-5,66	Alta	-5,77	Alta	0,11
32	Composto 664	0,582	-6,24	Baixa	-5,58	Alta	0,66
33	Composto 665	0,692	-6,16	Baixa	-6,05	Baixa	0,11
34	Composto 666	4,21	-5,38	Alta	-5,49	Alta	0,11
35	Composto 667	0,0424	-7,37	Baixa	-6,34	Baixa	1,03
36	Composto 668	0,609	-6,22	Baixa	-5,39	Alta	0,83
37	Composto 669	0,327	-6,49	Baixa	-5,66	Alta	0,82
38	Composto 670	0,62	-6,21	Baixa	-5,89	Baixa	0,32
39	Composto 671	0,12	-6,92	Baixa	-5,66	Alta	1,26

Tabela 16 - Valores experimentais, preditos e residuais para as moléculas do conjunto de validação e suas
respectivas classificações baseadas no valor de Papp (Papp < 1.5 x 10⁻⁶ cm.s⁻¹ = baixa
permeabilidade e Papp > 1.5 x 10⁻⁶ cm.s⁻¹ = alta permeabilidade)

continuação)						
40	Composto 591	0,294	-6,53	Baixa	-5,89	Baixa	0,65
41	Composto 672	0,0918	-7,04	Baixa	-5,67	Alta	1,36
42	Composto 673	0,298	-6,53	Baixa	-5,76	Alta	0,76
43	Composto 674	0,2	-6,70	Baixa	-5,80	Alta	0,90
44	Composto 675	0,214	-6,67	Baixa	-6,23	Baixa	0,44
45	Composto 676	0,165	-6,78	Baixa	-6,83	Baixa	0,05
46	Composto 677	0,204	-6,69	Baixa	-6,74	Baixa	0,05
47	Composto 678	0,0296	-7,53	Baixa	-6,21	Baixa	1,32
48	Composto 679	5,46	-5,26	Alta	-5,48	Alta	0,22
49	Composto 680	3,6	-5,44	Alta	-5,55	Alta	0,11
50	Composto 593	4,3	-5,37	Alta	-5,14	Alta	0,23
51	Composto 681	6,65	-5,18	Alta	-5,35	Alta	0,17
52	Composto 682	4,21	-5,38	Alta	-5,34	Alta	0,04
53	Composto 683	13,9	-4,86	Alta	-6,26	Baixa	1,40
54	Composto 684	11	-4,96	Alta	-6,27	Baixa	1,31
55	Composto 685	16,8	-4,77	Alta	-6,03	Baixa	1,25
56	Composto 686	0,613	-6,21	Baixa	-6,26	Baixa	0,05
57	Composto 687	2,65	-5,58	Alta	-6,12	Baixa	0,55
58	Composto 688	4,9	-5,31	Alta	-5,45	Alta	0,14
59	Composto 689	2,23	-5,65	Alta	-5,96	Baixa	0,31
60	Composto 690	2,69	-5,57	Alta	-6,31	Baixa	0,74
61	Composto 691	1,2	-5,92	Baixa	-5,39	Alta	0,53
62	Composto 692	0,164	-6,79	Baixa	-5,79	Alta	1,00
63	Composto 693	13,5	-4,87	Alta	-6,31	Baixa	1,44
64	Composto 694	5,94	-5,23	Alta	-5,21	Alta	0,01
65	Composto 695	0,207	-6,68	Baixa	-6,10	Baixa	0,59
66	Composto 696	0,166	-6,78	Baixa	-6,14	Baixa	0,64
67	Composto 697	0,126	-6,90	Baixa	-6,10	Baixa	0,80
68	Composto 698	0,337	-6,47	Baixa	-5,69	Alta	0,78
69	Composto 699	3,02	-5,52	Alta	-5,08	Alta	0,44
70	Composto 700	14,7	-4,83	Alta	-5,00	Alta	0,16
71	Composto 701	17,3	-4,76	Alta	-5,49	Alta	0,73
72	Composto 702	18,4	-4,74	Alta	-5,48	Alta	0,74
73	Composto 703	22,2	-4,65	Alta	-5,24	Alta	0,58
74	Composto 704	1,44	-5,84	Baixa	-5,43	Alta	0,41
75	Composto 705	3,98	-5,40	Alta	-5,19	Alta	0,21
76	Composto 706	2,17	-5,66	Alta	-5,60	Alta	0,06
77	Composto 707	0,381	-6,42	Baixa	-5,65	Alta	0,77
78	Composto 708	0,993	-6,00	Baixa	-5,36	Alta	0,64

* $P_{app-PAMPA}$, permeabilidade aparente no ensaio experimental PAMPA; Log P_{app} predita, permeabilidade aparente predita pelo modelo 26 (3-6).

Fonte: Elaborada pela autora.

A validação experimental realizada revelou que a maioria dos compostos foi corretamente classificada pelo modelo, indicando o seu alto poder preditivo. O modelo 26 (3-6) classificou corretamente 55 das 78 moléculas do conjunto de validação, representando uma taxa de sucesso 71,43%. Somente 22 compostos não foram classificados de acordo com o valor de referência (28.57%). Nosso modelo foi capaz de predizer com êxito 84,31% das moléculas classificadas como altamente permeáveis pelo ensaio PAMPA (51 moléculas), e 46,15% daquelas classificadas com baixa permeabilidade. Este resultado indica que o modelo é capaz de identificar candidatos a fármacos com perfil de alta permeabilidade. Para desenvolver esta avaliação um domínio de aplicabilidade de 60% foi considerado. Devido a grande diversidade estrutural do conjunto treinamento usado neste trabalho, nosso modelo correlacionou eficazmente muitas características de fragmentos moleculares diversos aos valores de permeabilidade para novas moléculas. Portanto, resultados satisfatórios podem ser esperados também para outras classes químicas, além de benzimidazois, uma vez que o modelo foi construído pelo método de HQSAR, o qual é baseado em fragmentos moleculares. Este modelo validado estatisticamente e experimentalmente pode também predizer aquelas moléculas que não são candidatos promissores devido a problemas de baixa permeabilidade, além de indicar aquelas com perfis desejados de permeabilidade. Estes resultados destacam o poder da modelagem QSPR usando o método de HQSAR em identificar perfis farmacocinéticos. É uma ferramenta in silico capaz de reduzir o tempo e os custos efetivos envolvidos na priorização de moléculas em estágios iniciais do processo de desenvolvimento de fármacos. Além disso, modelos in silico robustos e confiáveis para predizer ADME são necessários na triagem de bibliotecas de compostos, as quais geralmente possuem grande diversidade química, portanto, o modelo deve inevitavelmente ter um domínio de aplicabilidade global para garantir uma ampla cobertura do espaço químico. Para atender a este requisito, o conjunto treinamento usado aqui é composto por moléculas de diferentes classes químicas. Além disso, quando comparado com outros métodos, a técnica de HQSAR é capaz de predizer propriedades alvo para um amplo espaço químico, considerando que a fragmentação molecular oferece uma gama muito maior de arranjos distintos para as características moleculares.

5 CONCLUSÕES

Com a utilização de dados experimentais disponíveis, foram desenvolvidos modelos computacionais robustos e capazes de predizer a permeabilidade em células Caco-2 e no sistema PAMPA, além de estimar a absorção intestinal de candidatos a fármacos. A técnica de HQSAR é capaz de gerar modelos de QSPR com elevada consistência interna e externa, além de alta capacidade preditiva. Os compostos utilizados na construção dos modelos de permeabilidade celular são caracterizados por uma ampla diversidade química, o que torna os modelos gerados ferramentas úteis na triagem de coleções de compostos, bem como na predição da permeabilidade de novas moléculas bioativas. Com os dados experimentais de permeabilidade em Caco-2 obtidos no LQMC foi possível avaliar e validar a alta capacidade preditiva do modelo construído para novas moléculas. A validação experimental realizada através de um conjunto contendo 78 novas moléculas com dados in vitro de permeabilidade em PAMPA demonstrou a capacidade do modelo gerado em predizer o perfil de permeabilidade para novos candidatos a fármacos. Estes resultados demonstram que os modelos construídos apresentam grande potencial para utilização em programas de descoberta de fármacos não apenas para a predição de permeabilidade, mas também para estimar a absorção intestinal de novas entidades químicas. Os modelos desenvolvidos neste trabalho farão parte da base de dados para propriedades farmacocinéticas e modelos in silico PK/DB (www.pkdb.ifsc.usp.br), que consiste em um banco de dados que possui modelos de predição de propriedades farmacocinéticas disponíveis para utilização pela comunidade científica mundial.

REFERÊNCIAS*

1 WERMUTH, C. G. The practice of medicinal chemistry. London: Academic Press, 2003.

2 GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estudos Avançados*, v. 24, n. 70, p. 81–98,2010.

3 GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. *Current Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 1,p. 37–46, 2008.

4 PROFILE BIOPHARMACEUTICAL RESEARCH INDUSTRY. PhRMA .*Pharmaceutical research and manufacturers of America* 2015. Disponivel em:<http://phrmacdn.connectionsmedia.com/sites/default/files/pdf/2015_phrma_profile.pdf >. Acesso em: 07 dez. 2016.

5 PAUL, S. M. et al. How to improve r&d productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Reviews Drug Discovery* v.9, p. 203–214,2010. doi:10.1038/nrd3078.

6 PROFILE BIOPHARMACEUTICAL RESEARCH INDUSTRY. PhRMA .*Pharmaceutical research and manufacturers of America* 2016. Disponivel em: http://phrmacdn.connectionsmedia.com/sites/default/files/pdf/biopharmaceutical-industry-profile.pdf> Acesso em: 07 dez. 2016.

7 DREYFUS, N. *Keeping the lid on R & D costs*. Disponivel em: http://www.dddmag.com/article/2014/06/keeping-lid-rd-costs. Acesso em: 08 dez. 2016.

9 NOVARTIS CEO : we need to re-think the blockbuster. Disponivel em: http://fortune.com/2013/03/04/novartis-ceo-we-need-to-re-think-the-blockbuster/. Acesso em: 08 dez. 2016.

11 LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discoverythen and now. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.3, n.10, p.853-862,2004.

12 GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D. Modelagem molecular de fármacos. *Revista de Processos Quimicos*, v. 2, n. 4, p. 24-26, 2009.

13 BENTO, S. F.et al. The brazilian ethics research review system: an evaluation from the perspectives of institutional review boards. *AJOB Primary Research*, v. 2, n. 3, p. 28-37, 2011.

14 FOOD DRUG ADMINISTRATION. FDA. *Drug approval process*. Disponivel em: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/resourcesforyou/consumers/ucm284393.pdf>. Acesso em: 08 dez. 2016.

15 ANDRICOPULO, A. D.; SALUM, L. B.; ABRAHAM, D. J. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 9, n. 9, p. 771–790, 2009.

16 TEOTICO, D. G.et al. Docking for fragment inhibitors of AmpC Beta-Lactamase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.106, p.7455–7460, 2009.

^{*} De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6023.

17 HONÓRIO, K. M.; MODA, T. L.; ANDRICOPULO, A. D. Pharmacokinetic properties and in silico adme modeling in drug discovery. *Medicinal Chemistry*, v. 9, n. 2, 163–176, 2013.

18 BLEICHER, K. H. et al. A guide to drug discovery: hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 2, p. 369–378, 2003. doi: 10.1038/nrd1086

19 RIPPHAUSEN, P. et al. Quo Vadis, virtual screening? a comprehensive survey of prospective applications. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, n. 24,p. 8461–8467, 2010.

20 RIPPHAUSEN, P.; NISIUS, B.; BAJORATH, J. State-of-the-art in ligand-based virtual screening. *Drug Discovery Today*, v. 16, n. 9-10, p. 372–376,2011.

21 KAR, S.; ROY, K. How far can virtual screening take us in drug discovery? *Expert Opinion Drug Discovery*, v. 8, n. 3, p. 245–261, 2013.

22 CHENG, T.et al. Structure-based virtual screening for drug discovery: a problem-centric review. *AAPS journal*, v. 14, n. 1, p. 133–141, 2012.

23 KINCAID, V. A. et al. Virtual screening for UDP-Galactopyranose mutase ligands identifies a new class of antimycobacterial agents. *ACS Chemical Biology*, v. 10, n. 10, p. 2209–2218, 2015.

24 DA CUNHA, M. G. et al. Prediction of pharmacokinetic and toxicological parameters of a 4-phenylcoumarin isolated from geopropolis: in silico and in vitro approaches. *Toxicology Letters*, v. 263, p. 6-10, 2016. doi:10.1016/j.toxlet.2016.10.010.

25 HANSCH, C.; FUJITA, T. ρ -σ- π analysis. a method for the correlation of biological activity and chemical structure. *Journal of the American Chemical Society*, v. 86, n. 8, p. 1616–1626, 1964.

26 LEACH, A. R.; GILLET, Y. J. An introduction to chemoinformatics. Dordrecht: Springer, 2007.

27 KIRALJ, R.; FERREIRA, M. M. C. Basic validation procedures for regression models in qsar and qspr studies: theory and application. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 4, p. 770–787, 2009.

28 FERREIRA, M. M. C.; MONTANARI, C. A.; GAUDIO, A. C. Seleção de variáveis em QSAR. *Quimica Nova*, v. 25, n. 3, p. 439–448,2002.

29 GOLBRAIKH, A.; TROPSHA, A. Beware of q2! *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, v. 20, n. 4, p. 269–276, 2002.

30 GOLBRAIKH, A.; TROPSHA, A. Predictive QSAR modeling based on diversity sampling of experimental datasets for the training and test set selection. *Molecular Diversity*, v.5, n.4, 231–243,2002.

31 PUZYN, T.; LESZCZYNSKI, J.; CRONIN, M.T.D. (Ed.) *Recent advances in QSAR studies:* methods and applications. London: Springer Verlag, 2010. 423p. (Challenges and advances in computational chemistry and physics, v. 8).

32 TROPSHA, A. Best practices for qsar model development, validation, and exploitation. *Molecular Informatics*, v. 29, n. 6-7, p. 476–488, 2010.

33 SALUM, L. B.; ANDRICOPULO, A. D. Fragment-based QSAR: perspectives in drug. *Molecular Diversity*, v.13, n. 3, p. 277–285, 2009.

34 SALUM, L. B. Fragment-based QSAR strategies in drug design. *Expert Opinion on Drug Discovery* v. 5, n. 5, p. 405–412,2010.

35 MODA, T. L.; MONTANARI, C. A; ANDRICOPULO, A. D. Hologram QSAR model for the prediction of human oral bioavailability. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 24, p.7738–7745, 2007.

36 CAO, D. et al. ADMET evaluation in drug discovery. 11. pharmacokinetics knowledge base (pkkb): a comprehensive database of pharmacokinetic and toxic properties for drugs. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 52, p. 1132–1137, 2012.

37 HOU, T. et al. ADME evaluation in drug discovery. 6. can oral bioavailability in humans be effectively predicted by simple molecular property-based rules? *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 47, n. 2, p. 460–463, 2007.

38 HOU, T. J. et al. ADME evaluation in drug discovery. 5. correlation of caco-2 permeation with simple molecular properties. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* v. 44, n. 5, p. 1585–1600, 2004.

39 HOU, T. et al. ADME evaluation in drug discovery. 7. prediction of oral absorption by correlation and classification. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 47, n. 1, p. 208–218, 2007.

40 ZHU, C. et al. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 37, n. 5, p. 399–407, 2002.

41 WATERBEEMD, H. van de; GIFFORD, E. ADMET in silico modelling : towards prediction paradise ? *Drug discovery*, v.2, n.3, p.192–204, 2003.

42 DIRECTIVA 2010/63/UE do parlamento europeu e do conselho de 22 de setembro de 2010 relativa à protecção dos animais utilizados para fins científicos. Disponivel em: http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32010L0063. Acesso em: 12 dez. 2016.

43 ZURLO, J.; RODACILLE, D.; GOLDBERG, A. M. The three Rs: the way forward. *Environmental Health Perspectives*, v. 104, n. 8, p. 878–880, 1996.

44 HQSAR TM : manual. South Hanley: 2012.p. 1–80. Software.

45 LOWIS, D. R. *HQSAR* : a new , highly predictive t QSAR technique. *Tripos Technical Notes*, v. 1, n. 5, p. 1-17, 1997.

46 HONORIO, K. M.; GARRATT, R. C.; ANDRICOPULO, A. D. Hologram quantitative structure-activity relationships for a series of farnesoid x receptor activators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* v. 15, n. 12,p. 3119–3125,2005.

47 AVERY, M. A.et al. Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 6. the development of predictive in vitro potency models using CoMFA and HQSAR methodologies. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 2, p. 292–303, 2002.

48 CASTILHO, M. S. et al. Two- and three-dimensional quantitative structure-activity relationships for a series of purine nucleoside phosphorylase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 2, p. 516–527,2006.

49 MODA, T. L.; TORRES, L. G.; CARRARA, A. E.; ANDRICOPULO, A. D. PK/DB: database for pharmacokinetic properties and predictive in silico ADME models. *Bioinformatics*, v. 24, n. 19,p. 2270–2271, 2008.

50 LIU, C.-J. et al. Synthesis, cytotoxic activity evaluation and HQSAR Study of novel isosteviol derivatives as potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 10, n. 115, p. 26–40,2016.

51 LEAL, F. D.et al. Hologram QSAR models of a series of 6-Arylquinazolin-4-Amine Inhibitors of a New Alzheimers disease target: dual specificity Tyrosine-Phosphorylation-Regulated Kinase-1A enzyme. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 3, p. 5235–5253, 2015.

52 ASWATHY, L. et al. Computational strategies to explore antimalarial thiazine alkaloid lead compounds based on an Australian Marine Sponge Plakortis Lita. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, v. 1102, p. 1–53, 2016. doi:10.1080/07391102.2016.1220870.

53 NAIR, P. C.; MCKINNON, R. A.; MINERS, J. O. A fragment based approach for the computational prediction of the nonspecific binding of drugs to hepatic microsomes. *Drug and Metabolism and Disposition:* the biological fate of chemicals, v. 44, n. 11,p. 1794–1798, 2016.

54 MODA, T. L.; CARRARA, A. E.; ANDRICOPULO, A. D. A fragment-based approach for the *in silico* prediction of blood-brain barrier permeation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 23, n. 12, p. 2191–2196, 2012.

55 FREITAS,H. et al. Descriptor- and fragment-based QSAR models for a series of *Schistosoma mansoni* purine nucleoside inhibitors. *Journal Brazilian Chemical Society*, v. 22, n. 9, p. 1718-26, 2011.

56 WATERBEEMD, H.van de et al. Property--based design: optimisation of drug absorption and pharmacokinetics. *Journal Medicinal Chemistry*. v. 44, n. 9,p. 1313–1333, 2001.

57 CLARK, M. A. et al.(Ed.). *Pharmacology*. 5th ed. Baltimore: Walters Kluwer, 2012. (Lippincott's illustrated reviews).

58 LAU, Y. Y. et al. Evaluation of a novel in vitro caco-2 hepatocyte hybrid system for predicting in vivo oral bioavailability. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 32, n. 9, p. 937–942, 2004.

59 KOLA, I.; LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, p. 711–715, 2004. doi:10.1038/nrd1470.

60 MEANWELL, N. A. Improving drug candidates by design: a focus on physicochemical properties as a means of improving compound disposition and safety. *Chemical Research in Toxicology*, v. 24, n. 9, p. 1420–1456, 2011.

61 KLOPMAN, G.; STEFAN, L. R.; SAIAKHOV, R. D. ADME evaluation. 2. a computer model for the prediction of intestinal absorption in humans. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 17, n. 4-5, p. 253–263, 2002.

62 LI, A. P. Screening for hman ADME/Tox drug properties in drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 6, n. 7, p. 357–366, 2001.

63 CASTILLO-GARIT, J. A. et al. Estimation of ADME Properties in drug discovery : predicting caco-2 cell permeability using atom-based stochastic and non-stochastic linear

indices. Journal of Pharmaceutical Sciences v. 97, n. 5, p. 1946–1976, 2008.

64 RANG, H. P. et al. *Pharmacoloy*. 7th ed. New York: Elsevier Inc., 2012.

65 LARREGIEU, C. A; BENET, L. Z. Drug discovery and regulatory considerations for improving in silico and in vitro predictions that use Caco-2 as a surrogate for human intestinal permeability measurements. *AAPS Journal*, v. 15, n. 2, p. 483–497, 2013.

66 EGAN, W. J.; LAURI, G. Prediction of intestinal permeability. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, n. 3, p. 273–289, 2002.

67 FAN, J.; DE LANNOY, I. A. M. Pharmacokinetics. *Biochemical Pharmacology*, v. 87, n. 1, p. 93–120, 2014.

68 MASUNGI, C.et al. Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) combined with a 10-day multiscreen Caco-2 cell culture as a tool for assessing new drug candidates. *Pharmazie*, v. 63, n. 3, p. 194-99, 2008.

69 LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 50, n. 1, p. 47–60, 2000.

70 FUJIKAWA, M. et al. Relationships between structure and high-throughput screening permeability of diverse drugs with artificial membranes: application to prediction of Caco-2 cell permeability. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 13, n. 15, p. 4721–4732, 2005.

71 SASAKI, M. et al. Prediction of in vivo biliary clearance from the in vitro transcellular transport of organic anions across a double-transfected madin-darby canine kidney II monolayer expressing both rat organic anion transporting polypeptide 4 and multidrug resistance associate protein 2. *Molecular Pharmacology*, v. 66, n. 3, p. 450–459, 2004.

72 IRVINE, J. D. et al. MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cells: a tool for membrane permeability screening. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 88, n. 1, p. 28–33, 1999.

73 BORCHARDT, R. T. et al. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability, *Gastroenterology*, v. 96, n. 3, p. 736-749, 1989.

74 LARREGIEU, C. A; BENET, L. Z. Distinguishing between the permeability relationships with absorption and metabolism to improve BCS and BDDCS predictions in early drug discovery. *Molecular Pharmaceutics*, v. 11, n. 4, p. 1335–1344, 2014.

75 HUBATSCH, I.; RAGNARSSON, E. G. E.; ARTURSSON, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols*, v. 2, n. 9,p. 2111–2119, 2007.

76 VÁZQUEZ, M.; DEVESA, V.; VÉLEZ, D. Characterization of the intestinal absorption of inorganic mercury in Caco-2 cells. *Toxicology in Vitro*, v. 29, n. 1,p. 93–102, 2015.

77 CAI, Y. et al. Development, validation, and application of a novel 7-Day Caco-2 cell culture system. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 70, n. 2, p.175–18, 2014.

78 UNGELL, A. L.; ARTURSSON, P. An overview of Caco-2 and anternatives for predction of intestinal drugs transport and absorption. In: WATERBEEMED, H. van de. *Drug bioavailability. estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability.* 2nd ed.

Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2008. p. 133–159.

79 BALIMANE, P. V; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 44, n. 1,p. 301–312, 2001.

80 GONÇALVES, J. E.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Avaliação da permeabilidade de fármacos empregando culturas celulares. In: STORPIRTIS, S.et al.(Ed.). *Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 204–211. (Ciências Farmacêuticas).

81 FERNANDES, M. B. et al. Caco-2 Cells cytotoxicity of nifuroxazide derivatives with potential activity against methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA). *Toxicology in Vitro*, v.26, n.3, p.535–540,2012.

82 HANSCH, C.et al. Chem-bioinformatics and QSAR: a review of QSAR lacking positive hydrophobic terms. *Chemical Reviews*, v. 101, n. 3, p. 619–672, 2001.

83 GLEESON, M. P.; HERSEY, A.; HANNONGBUA, S. In-Silico ADME models: a general assessment of their utility in drug discovery applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 4, p.358–381, 2011.

84 ARTURSSON, J.; KARLSSON, P. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 175, n. 3,p. 880–885, 1991.

85 YEE, S. In vitro permeability across Caco-2 cells (Colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth. *Pharmaceutical Research*, v. 14, n. 6, p. 763–766, 1997.

86 CHATURVEDI, P. R.; DECKER, C. J.; ODINECS, A. Prediction of pharmacokinetic properties using experimental approaches during early drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 5, n. 4, p. 452–463, 2001.

87 BENET, L. Z.; LARREGIEU, C. A. The FDA should eliminate the ambiguities in the current BCS biowaiver guidance and make public the drugs for which BCS biowaivers have been granted. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 88, n. 3, p. 405–407, 2010.

88 YANG, Y.et al. Biopharmaceutics classification of selected beta-blockers: solubility and permeability class membership. *Molecular Pharmaceutics*, v.4, n. 4,p. 608–614, 2007.

89 TAYLOR, M. J.; TANNA, S.; SAHOTA, T. Paracellular porosity and pore size of the human intestinal epithelium in tissue and cell culture models. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, n. 4, p. 4215–4227, 2010.

90 SUN, D. et al. Comparison of human duodenum and Caco-2 gene expression profiles for 12,000 gene sequences tags and correlation with permeability of 26 drugs. *Pharmaceutical Research*, v. 19, n. 10, p. 1400–1416, 2002.

91 SCHINKEL, A. H. P-glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.36, p.179–194,1999.

92 POLLI, J. W. et al. Rational use of in vitro P-Glycoprotein assays in drug discovery. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.299,n.2, p.620–628,2001.

93 DOPPENSCHMITT, S.et al. Role of P-Glycoprotein-mediated secretion in absorptive drug permeability: an approach using passive membrane permeability and affinity to p-glycoprotein. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 88, n. 10, p. 1067–1072, 1999.

94 CAMPBELL, S. D.; REGINA, K. J.; KHARASCH, E. D. Significance of lipid composition in a blood-brain barrier-mimetic PAMPA assay. *Journal of Biomolecular Screening*, v. 19, n. 3, p. 437–444, 2014.

95 MARKOVIC, B. D.et al. A PAMPA assay as fast predictive model of passive human skin permeability of new synthesized corticosteroid C-21 esters. *Molecules*, v. 17, n. 1, p. 480–491, 2012.

96 SUN, H. et al. Pharmacokinetic characterization of anhuienoside C and Its deglycosylated metabolites in rats. *Xenobiotica*, 2016. doi:10.1080/00498254.2016.1241452.Disponivel em:< http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00498254.2016.1241452?scroll=top&needAcce ss=true#aHR0cDovL3d3dy50YW5kZm9ubGluZS5jb20vZG9pL3BkZi8xMC4xMDgwLzAw NDk4MjU0LjIwMTYuMTI0MTQ1Mj9uZWVkQWNjZXNzPXRydWVAQEAw>. Acesso em: 13 dez. 2016.

97 MÜLLER, J. et al. BBB penetration-targeting physicochemical lead selection: ecdysteroids as chemo-sensitizers against CNS tumors. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 96, p. 571–577, 2016. doi: 10.1016/j.ejps.2016.10.034

98 KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. Physicochemical high throughput screening : parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 41, n. 7, p. 1007-1010, 1998.

99 FALLER, B. Artificial membrane assays to assess permeability. *Current Drug Metabolism*, v. 9, n. 9, p. 886–892, 2008.

100 AVDEEF, A. High-throughput measurement of membrane permeability. In: WATERBEEMD, H. van de; TESTA, B. (Ed.) *Drug bioavailability/estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability*; Weinheim: Wiley-VCH, 2003; p. 46-71.

101 AVDEEF, A. *Absorption and drug development*: solubility, permeability and charge state. Englewood Cliffs: Wiley-Interscience, 2012. 698 p.

102 GOLBRAIKH, A. Molecular dataset diversity indices and their applications to comparison of chemical databases and QSAR analysis. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, v. 40, n. 2, p. 414-425, 2000.

103 FOURCHES, D.; MURATOV, E.; TROPSHA, A. Trust, but verify: on the importance of chemical structure curation in cheminformatics and QSAR modeling research. *J ournal of Chemical Inf ormation and Modeling*, v. 50, n. 7, p. 1189–1204, 2011.

104 BENTO, A. P. et al. The ChEMBL bioactivity database: an update. *Nucleic Acids Research*, v. 42, p. 1083–1090, 2014.

105 TRIPOS A CERTARA COMPANY. *SYBYL-X 1.2.0:* basic manual. South Hanley:2012. p.1699.

106 MODA, T. L.; ANDRICOPULO, A. D. Consensus hologram QSAR modeling for the prediction of human intestinal absorption. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 22, n. 8, p. 2889-2893, 20112. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.02.061.

107 TRIPOS A CERTARA COMPANY. *SYBY1-x 2.0*: HQSARtm manual. South Hanley: 2012. p. 1–29.

108 KOLJONEN, M.et al. Evaluation of cocktail approach to standardise Caco-2 permeability experiments. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 64, n. 3, p. 379-

387, 2006.

109 BERGINC, K.et al. Fluorescein transport properties across artificial lipid membranes, Caco-2 cell monolayers and rat jejunum. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 66, n. 2, p. 281-285, 2007.

110 CAMPOS, M. L. et al. UHPLC quantitation method and in vitro studies of two new phthalimide derivatives planned to treat sickle cell disease. *Current Pharmaceutical Analysis*, v. 12, 2016. doi: 10.2174/1573412912666160608093542.

111 LEGRAND, O. et al. Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients. *Blood*, v. 91, n. 12, p. 4480-4488, 1998.

112 ZHANG, S.et al. Antitumor agents 252. application of validated QSAR models to database mining: discovery of novel tylophorine derivatives as potential anticancer agents. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 21,n. 1-3, p. 97-112, 2007.

113 GAUDIO, A. C.; ZANDONADE, E. Proposição, validação e análise dos modelos que correlacionam estrutura química e atividade biológica. *Quimica Nova*, v. 24, n. 5, p. 658-671, 2001.

114 GOLBRAIKH, A. et al. Rational selection of training and test sets for the development of validated QSAR models. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 17, n. 2-4, p. 241-253, 2003.

115 MELO, E. B. *Estudos teóricos (modelagem molecular e QSAR) de inibidores de HIV-1 integrase.* 2009. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

116 ALEXANDER, D. L. J.; TROPSHA, A.; WINKLER, D. A. Beware of R^2 : simple, unambiguous assessment of the prediction accuracy of QSAR and QSPR models. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 55, n. 7, p. 1316–1322, 2015.

117 ROY, P. P.; ROY, K. On some aspects of variable selection for partial least squares regression models. *QSAR & Combinatorial Science*, v. 27, n. 3, p. 302–313, 2008.

118 ERIKSSON, L. et al. Methods for reliability and uncertainty assessment and for applicability evaluations of classification- and regression-based QSARs. *Environmental Health Perspectives*, v. 111, n. 10, p. 1361-1375, 2003.

119 ROY, P. P.; LEONARD, J. T.; ROY, K. Exploring the impact of size of training sets for the development of predictive QSAR models. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 90, n. 1, p. 31-42, 2008.

120 ROY, P. P. et al. On two novel parameters for validation of predictive QSAR models. *Molecules*, v. 14, p. 1660–1701, 2009. doi:10.3390/molecules14051660

121 FERREIRA, M. M. C.; KIRALJ, R. Métodos quimiométricos em relações quantitatias estrutura-atividade (QSAR). In: MONTANARI, C. A. (Ed.) *Química medicinal, métodos e fundamentos em planejamento de fármacos*.São Paulo: EDUSP, 2011.

122 MELAGRAKI, G. et al. Optimization of biaryl piperidine and 4-amino-2-biarylurea MCH1 receptor antagonists using QSAR modeling, classification techniques and virtual screening. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 21, n. 5, p. 251–267, 2007.

123 PAULI, I. *Planejamento de inibidores da enzima cruzaína candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Chagas*. 2016. 131 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

124 LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today:* technologies, v. 1, n. 4, p. 337-341, 2004.

125 MOLINSPIRATION property explorer. Disponível em: http://www.molinspiration.com/. Acesso em: 01 nov. 2016

126 AUGUSTIJNS, P.; MOLS, R. HPLC with programmed wavelength fluorescence detection for the simultaneous determination of marker compounds of integrity and P-Gp functionality in the Caco-2 intestinal absorption model. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 34, n. 5, p. 971–978, 2004. doi:10.1016/j.jpba.2003.11.016.

127 KONISHI, Y.; HAGIWARA, K.; SHIMIZU, M. Transepithelial transport of fluorescein in caco-2 cell monolayers and use of such transport in *in vitro* evaluation of phenolic acid availability. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 66, n. 11, p. 2449–2457, 2002. doi: 10.1271/bbb.66.2449.

128 SUGANO, K. .et al. Prediction of passive intestinal absorption using bio-mimetic artificial membrane permeation assay and the paracellular pathway model. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 241, n. 2, p. 241–251, 2002.

129 ANDERLE, P. et al. P-Glycoprotein (P-Gp) mediated efflux in caco-2 cell monolayers: the influence of culturing conditions and drug exposure on P-Gp expression levels. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 87, n. 6, p. 757–762, 1998. doi: 10.1021/js970372e.

130 PALM, K. et al. Effect of molecular charge on intestinal epithelial drug transport: pHdependent transport of cationic drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 291, n. 2, p. 435–443, 1999.

131 DRUG BANK. Disponivel em:<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00661>. Acesso em: 30 nov. 2016.

132 PUBCHEM Disponivel em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/. Acesso em: 30 nov. 2016.

133 BD PHARMNGEN. Technical data sheet: calcein AM. Disponivel em: http://www.bdbiosciences.com/ds/pm/tds/564061.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2016.

134 CAYMAN CHEMICAL . *Multi-drug resistance assay kit (Calcein AM)*. Disponivel em: https://www.caymanchem.com/pdfs/600370.pdf>. Acesso em: 09 dez. 2016.

135 HIDALGO, I. J.; LI, J. Carrier-mediated transport and efflux mechanisms of Caco-2 cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 22, n. 1-2, p. 53-66, 1996.

136 AZEREDO, F. J.; COSTA, T. D.; UCHOA, F. D. T. Papel da glicoproteína-P Na farmacocinética P-Glycoprotein role on drug pharmacokinetics and interactions. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 90, p. 321–326, 2009.

137 RIGALLI, J. P. et al. Regulation of biotransformation systems and ABC transporters by benznidazole in HepG2 cells: involvement of pregnane X-receptor. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 12, p. e1951, 2012. doi: 10.1371/journal.pntd.0001951..

138 RANKOVIC, Z. CNS drug design: balancing physicochemical properties for optimal brain exposure. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 58, n. 6, p. 2584–2608, 2015.

139 DIDZIAPETRIS, R. et al. Classification analysis of P-glycoprotein substrate specificity. *Journal of Drug Targeting*, v. 11, n. 7, p. 391–406, 2003.

140 MODA, T. L. Desenvolvimento de modelos in silico de propriedades de ADME para a

triagem de novos candidatos a fármacos. 2007. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

141 MODA, T. L. *Modelagem in silico de propriedades farmacocinéticas para a avaliação de candidatos a novos fármacos*. 2011. 216 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

142 FUJIKAWA, M. et al. QSAR Study on permeability of hydrophobic compounds with artificial membranes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 11, p. 3756–3767, 2007.

APÊNDICE

N°	Moléculas	P _{appCaco-2} exp ^[a]	P _{appCaco-2} pred ^[b]	Res ^[c]
1	Composto 1	-8,00	-8,11	0,11
2	Composto 2	-8,00	-7,99	0,01
3	Composto 3	-8,00	-7,84	0,16
4	Composto 4	-8,00	-8,18	0,18
5	Composto 5	-8,00	-7,98	0,02
6	Composto 6	-7,70	-7,61	0,09
7	Composto 7	-7,70	-8,04	0,34
8	Composto 8	-7,00	-6,47	0,53
9	Composto 9	-7,00	-6,46	0,54
10	Composto 10	-7,00	-6,57	0,44
11	Composto 11	-6,80	-6,33	0,47
12	Composto 12	-6,70	-6,59	0,11
13	Composto 13	-6,70	-6,54	0,16
14	Composto 14	-6,60	-6,73	0,13
15	Composto 15	-6,57	-6,25	0,32
16	Composto 16	-6,55	-6,30	0,25
17	Composto 17	-6,54	-6,09	0,45
18	Composto 18	-6,54	-5,98	0,56
19	Composto 19	-6,54	-6,26	0,28
20	Composto 20	-6,52	-6,50	0,02
21	Composto 21	-6,52	-6,31	0,21
22	Composto 22	-6,52	-6,02	0,50
23	Composto 23	-6,49	-6,17	0,32
24	Composto 24	-6,48	-6,03	0,45
25	Composto 25	-6,40	-6,23	0,17
26	Composto 26	-6,40	-5,99	0,41
27	Composto 27	-6,35	-6,45	0,10

Tabela 17 - Valores de permeabilidade em células Caco-2 preditos e experimentais para o conjunto treinamento

continuação				
28	Composto 28	-6,40	-6,48	0,08
29	Composto 29	-6,40	-5,96	0,44
30	Composto 30	-6,40	-5,67	0,73
31	Composto 31	-6,40	-6,28	0,12
32	Composto 32	-6,38	-6,25	0,13
33	Composto 33	-6,36	-5,95	0,41
34	Composto 34	-6,36	-5,84	0,52
35	Composto 35	-6,35	-5,90	0,45
36	Composto 36	-6,30	-6,34	0,04
37	Composto 37	-6,30	-5,79	0,51
38	Composto 38	-6,30	-5,68	0,62
39	Composto 39	-6,30	-5,70	0,60
40	Composto 40	-6,30	-5,72	0,58
41	Composto 41	-6,30	-6,14	0,16
42	Composto 42	-6,30	-6,28	0,02
43	Composto 43	-6,30	-6,34	0,04
44	Composto 44	-6,30	-6,23	0,07
45	Composto 45	-6,30	-6,05	0,25
46	Composto 46	-6,28	-5,91	0,37
47	Composto 47	-6,26	-6,17	0,09
48	Composto 48	-6,26	-6,30	0,04
49	Composto 49	-6,26	-6,14	0,12
50	Composto 50	-6,22	-5,93	0,29
51	Composto 51	-6,22	-5,70	0,52
52	Composto 52	-6,22	-6,37	0,15
53	Composto 53	-6,22	-5,59	0,64
54	Composto 54	-6,22	-6,14	0,08
55	Composto 55	-6,22	-5,91	0,31
56	Composto 56	-6,22	-5,64	0,59
57	Composto 57	-6,22	-5,62	0,60
58	Composto 58	-6,19	-6,01	0,18

continuação					
59	Composto 59	-6,17	-6,25	0,08	
60	Composto 60	-6,15	-6,38	0,23	
61	Composto 61	-6,15	-5,53	0,62	
62	Composto 62	-6,15	-5,84	0,31	
63	Composto 63	-6,13	-6,13	0,00	
64	Composto 64	-6,13	-5,80	0,33	
65	Composto 65	-6,12	-6,11	0,01	
66	Composto 66	-6,12	-5,81	0,31	
67	Composto 67	-6,10	-6,05	0,05	
68	Composto 68	-6,10	-6,50	0,40	
69	Composto 69	-6,10	-6,06	0,04	
70	Composto 70	-6,10	-6,58	0,48	
71	Composto 71	-6,10	-6,50	0,40	
72	Composto 72	-6,10	-5,97	0,13	
73	Composto 73	-6,10	-6,23	0,13	
74	Composto 74	-6,08	-6,25	0,17	
75	Composto 75	-6,07	-6,28	0,21	
76	Composto 76	-6,06	-6,21	0,15	
77	Composto 77	-6,05	-5,77	0,28	
78	Composto 78	-6,05	-5,90	0,15	
79	Composto 79	-6,05	-6,29	0,24	
80	Composto 80	-6,04	-6,12	0,08	
81	Composto 81	-6,04	-6,14	0,10	
82	Composto 82	-6,03	-6,14	0,11	
83	Composto 83	-6,02	-6,02	0,00	
84	Composto 84	-6,00	-5,61	0,39	
85	Composto 85	-6,00	-6,39	0,39	
86	Composto 86	-6,00	-6,31	0,31	
87	Composto 87	-6,00	-6,14	0,14	
88	Composto 88	-6,00	-5,67	0,33	
89	Composto 89	-6,00	-6,45	0,45	

continuação						
90	Composto 90	-6,00	-5,61	0,39		
91	Composto 91	-6,00	-5,77	0,23		
92	Composto 92	-6,00	-5,42	0,58		
93	Composto 93	-6,00	-5,81	0,19		
94	Composto 94	-6,00	-5,75	0,25		
95	Composto 95	-6,00	-5,74	0,26		
96	Composto 96	-6,00	-5,99	0,01		
97	Composto 97	-5,98	-5,46	0,52		
98	Composto 98	-5,96	-5,46	0,50		
99	Composto 99	-5,96	-5,68	0,28		
100	Composto 100	-5,96	-5,88	0,08		
101	Composto 101	-5,94	-6,45	0,51		
102	Composto 102	-5,94	-5,31	0,63		
103	Composto 103	-5,92	-5,75	0,17		
104	Composto 104	-5,92	-5,88	0,04		
105	Composto 105	-5,92	-5,90	0,02		
106	Composto 106	-5,91	-5,82	0,09		
107	Composto 107	-5,89	-5,70	0,19		
108	Composto 108	-5,86	-6,20	0,34		
109	Composto 109	-5,85	-6,38	0,53		
110	Composto 110	-5,85	-5,34	0,51		
111	Composto 111	-5,82	-5,84	0,02		
112	Composto 112	-5,82	-5,17	0,65		
113	Composto 113	-5,82	-5,73	0,09		
114	Composto 114	-5,82	-5,59	0,23		
115	Composto 115	-5,82	-5,95	0,13		
116	Composto 116	-5,80	-5,82	0,02		
117	Composto 117	-5,80	-5,67	0,13		
118	Composto 118	-5,79	-6,07	0,28		
119	Composto 119	-5,79	-6,36	0,57		
120	Composto 120	-5,78	-5,65	0,13		
121 Composto 121 -5,77 -5,32 0,45 122 Composto 122 -5,77 -5,62 0,15 123 Composto 123 -5,76 -5,89 0,13 124 Composto 125 -5,74 -5,81 0,07 125 Composto 126 -5,73 -5,18 0,55 127 Composto 128 -5,72 -5,10 0,62 128 Composto 129 -5,72 -5,51 0,21 129 Composto 130 -5,70 -5,84 0,14 130 Composto 131 -5,70 -5,84 0,14 132 Composto 132 -5,70 -5,50 0,20 134 Composto 133 -5,70 -5,50 0,20 134 Composto 134 -5,70 -5,55 0,15 136 Composto 137 -5,68 -5,24 0,44 139 Composto 138 -5,66 -5,44 0,22 140 Composto 140 -5,62 -5,24 0,38 142 Composto 143 -5,62 -5,24 0,38 </th <th>continuação</th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th>	continuação					
---	-------------	--------------	-------	-------	------	--
122 Composto 122 -5,77 -5,62 0,15 123 Composto 123 -5,76 -5,89 0,13 124 Composto 125 -5,74 -5,81 0,07 125 Composto 126 -5,73 -5,18 0,55 127 Composto 127 -5,72 -5,10 0,62 128 Composto 128 -5,72 -5,51 0,21 129 Composto 130 -5,70 -5,34 0,36 131 Composto 131 -5,70 -5,84 0,14 132 Composto 132 -5,70 -6,01 0,31 133 Composto 133 -5,70 -5,50 0,20 134 Composto 135 -5,70 -5,55 0,15 135 Composto 136 -5,70 -5,65 0,05 137 Composto 138 -5,68 -5,24 0,44 139 Composto 138 -5,66 -5,44 0,22 140 Composto 140 -5,62 -5,23 0,39 143 Composto 141 -5,62 -5,24 0,44 </th <th>121</th> <th>Composto 121</th> <th>-5,77</th> <th>-5,32</th> <th>0,45</th> <th></th>	121	Composto 121	-5,77	-5,32	0,45	
123 Composto 123 -5,76 -5,89 0,13 124 Composto 124 -5,74 -5,81 0,07 125 Composto 126 -5,73 -5,18 0,55 127 Composto 127 -5,72 -5,10 0,62 128 Composto 128 -5,72 -5,51 0,21 129 Composto 130 -5,70 -5,34 0,36 131 Composto 131 -5,70 -5,84 0,14 132 Composto 132 -5,70 -6,01 0,31 133 Composto 133 -5,70 -5,50 0,20 134 Composto 135 -5,70 -5,57 0,13 135 Composto 136 -5,70 -5,55 0,15 137 Composto 137 -5,70 -5,55 0,15 138 Composto 138 -5,66 -5,44 0,22 140 Composto 140 -5,62 -5,23 0,39 143 Composto 141 -5,62 -5,24 0,44 139 Composto 142 -5,62 -5,23 0,39 </th <th>122</th> <th>Composto 122</th> <th>-5,77</th> <th>-5,62</th> <th>0,15</th> <th></th>	122	Composto 122	-5,77	-5,62	0,15	
124 Composto 124 -5,74 -5,81 0,07 125 Composto 125 -5,74 -5,47 0,27 126 Composto 126 -5,73 -5,18 0,55 127 Composto 128 -5,72 -5,51 0,21 129 Composto 129 -5,72 -5,25 0,47 130 Composto 130 -5,70 -5,84 0,14 132 Composto 132 -5,70 -6,01 0,31 133 Composto 133 -5,70 -5,50 0,20 134 Composto 134 -5,70 -5,57 0,13 135 Composto 136 -5,70 -5,55 0,15 137 Composto 138 -5,68 -5,24 0,44 139 Composto 138 -5,68 -5,24 0,44 139 Composto 138 -5,66 -5,44 0,22 140 Composto 140 -5,62 -5,23 0,39 143 Composto 141 -5,62 -5,24 0,44 139 Composto 141 -5,62 -5,23 0,39 </th <th>123</th> <th>Composto 123</th> <th>-5,76</th> <th>-5,89</th> <th>0,13</th> <th></th>	123	Composto 123	-5,76	-5,89	0,13	
125 Composto 125 -5,74 -5,47 0,27 126 Composto 126 -5,73 -5,18 0,55 127 Composto 127 -5,72 -5,10 0,62 128 Composto 129 -5,72 -5,51 0,21 129 Composto 129 -5,70 -5,34 0,36 131 Composto 131 -5,70 -5,84 0,14 132 Composto 132 -5,70 -6,01 0,31 133 Composto 133 -5,70 -5,50 0,20 134 Composto 135 -5,70 -5,57 0,13 135 Composto 136 -5,70 -5,55 0,15 137 Composto 138 -5,68 -5,24 0,44 139 Composto 139 -5,66 -5,44 0,22 140 Composto 140 -5,62 -5,23 0,39 141 Composto 141 -5,62 -5,24 0,44 139 Composto 141 -5,62 -5,23 0,39 143 Composto 141 -5,62 -5,23 0,39 </th <th>124</th> <th>Composto 124</th> <th>-5,74</th> <th>-5,81</th> <th>0,07</th> <th></th>	124	Composto 124	-5,74	-5,81	0,07	
126 Composto 126 -5,73 -5,18 0,55 127 Composto 127 -5,72 -5,10 0,62 128 Composto 129 -5,72 -5,51 0,21 129 Composto 130 -5,70 -5,34 0,36 131 Composto 131 -5,70 -5,84 0,14 132 Composto 132 -5,70 -6,01 0,31 133 Composto 134 -5,70 -5,50 0,20 134 Composto 135 -5,70 -5,57 0,13 135 Composto 136 -5,70 -5,55 0,15 136 Composto 137 -5,70 -5,55 0,15 137 Composto 138 -5,66 -5,44 0,22 140 Composto 140 -5,62 -5,23 0,39 143 Composto 141 -5,62 -5,23 0,39 144 Composto 143 -5,62 -5,23 0,39 143 Composto 143 -5,62 -5,23 0,39 144 Composto 145 -5,60 -5,00 0,60 </th <th>125</th> <th>Composto 125</th> <th>-5,74</th> <th>-5,47</th> <th>0,27</th> <th></th>	125	Composto 125	-5,74	-5,47	0,27	
127 Composto 127 -5,72 -5,10 0,62 128 Composto 128 -5,72 -5,51 0,21 129 Composto 129 -5,72 -5,25 0,47 130 Composto 130 -5,70 -5,34 0,36 131 Composto 131 -5,70 -5,84 0,14 132 Composto 132 -5,70 -6,01 0,31 133 Composto 134 -5,70 -5,50 0,20 134 Composto 135 -5,70 -5,57 0,13 135 Composto 136 -5,70 -5,55 0,15 136 Composto 137 -5,70 -5,55 0,15 138 Composto 138 -5,64 -5,44 0,22 140 Composto 140 -5,64 -5,40 0,24 141 Composto 141 -5,62 -5,23 0,39 143 Composto 143 -5,62 -5,01 0,61 144 Composto 143 -5,62 -5,01 0,61 144 Composto 145 -5,60 -5,00 0,00 </th <th>126</th> <th>Composto 126</th> <th>-5,73</th> <th>-5,18</th> <th>0,55</th> <th></th>	126	Composto 126	-5,73	-5,18	0,55	
128 Composto 128 -5,72 -5,51 0,21 129 Composto 130 -5,72 -5,25 0,47 130 Composto 130 -5,70 -5,34 0,36 131 Composto 131 -5,70 -5,84 0,14 132 Composto 132 -5,70 -6,01 0,31 133 Composto 133 -5,70 -5,50 0,20 134 Composto 134 -5,70 -5,57 0,13 135 Composto 135 -5,70 -5,55 0,05 137 Composto 136 -5,70 -5,55 0,15 138 Composto 137 -5,70 -5,55 0,15 139 Composto 138 -5,68 -5,24 0,44 139 Composto 140 -5,64 -5,40 0,24 141 Composto 140 -5,62 -5,23 0,39 142 Composto 143 -5,62 -5,01 0,61 144 Composto 143 -5,62 -5,00 0,60 145 Composto 146 -5,59 -5,75 0,16 </th <th>127</th> <th>Composto 127</th> <th>-5,72</th> <th>-5,10</th> <th>0,62</th> <th></th>	127	Composto 127	-5,72	-5,10	0,62	
129 Composto 129 -5,72 -5,25 0,47 130 Composto 130 -5,70 -5,34 0,36 131 Composto 131 -5,70 -5,84 0,14 132 Composto 132 -5,70 -6,01 0,31 133 Composto 133 -5,70 -5,50 0,20 134 Composto 134 -5,70 -5,57 0,13 135 Composto 135 -5,70 -5,57 0,13 136 Composto 136 -5,70 -5,55 0,05 137 Composto 138 -5,68 -5,24 0,44 139 Composto 139 -5,66 -5,44 0,22 140 Composto 140 -5,62 -5,23 0,39 141 Composto 141 -5,62 -5,24 0,38 142 Composto 143 -5,62 -5,23 0,39 143 Composto 143 -5,62 -5,23 0,39 144 Composto 145 -5,60 -5,01 0,61 144 Composto 145 -5,60 -5,02 0,02 </th <th>128</th> <th>Composto 128</th> <th>-5,72</th> <th>-5,51</th> <th>0,21</th> <th></th>	128	Composto 128	-5,72	-5,51	0,21	
130Composto 130-5,70-5,340,36131Composto 131-5,70-5,840,14132Composto 132-5,70-6,010,31133Composto 133-5,70-5,500,20134Composto 134-5,70-5,210,49135Composto 135-5,70-5,570,13136Composto 136-5,70-5,550,05137Composto 137-5,70-5,550,15138Composto 138-5,68-5,240,44139Composto 139-5,66-5,440,22140Composto 140-5,64-5,400,24141Composto 141-5,62-5,230,39143Composto 143-5,62-5,010,61144Composto 143-5,60-5,620,02145Composto 146-5,59-5,750,16147Composto 147-5,59-5,620,03148Composto 148-5,59-5,290,30149Composto 149-5,59-5,470,13150Composto 150-5,58-5,300,28151Composto 151-5,56-5,640,08	129	Composto 129	-5,72	-5,25	0,47	
131 Composto 131 -5,70 -5,84 0,14 132 Composto 132 -5,70 -6,01 0,31 133 Composto 133 -5,70 -5,50 0,20 134 Composto 134 -5,70 -5,21 0,49 135 Composto 135 -5,70 -5,57 0,13 136 Composto 136 -5,70 -5,55 0,05 137 Composto 137 -5,70 -5,55 0,15 138 Composto 138 -5,68 -5,24 0,44 139 Composto 139 -5,66 -5,44 0,22 140 Composto 140 -5,64 -5,40 0,24 141 Composto 141 -5,62 -5,23 0,39 142 Composto 143 -5,62 -5,01 0,61 144 Composto 143 -5,62 -5,01 0,61 144 Composto 145 -5,60 -5,00 0,60 145 Composto 145 -5,60 -5,00 0,60 146 Composto 146 -5,59 -5,75 0,16 </th <th>130</th> <th>Composto 130</th> <th>-5,70</th> <th>-5,34</th> <th>0,36</th> <th></th>	130	Composto 130	-5,70	-5,34	0,36	
132 Composto 132 -5,70 -6,01 0,31 133 Composto 133 -5,70 -5,50 0,20 134 Composto 134 -5,70 -5,21 0,49 135 Composto 135 -5,70 -5,57 0,13 136 Composto 136 -5,70 -5,55 0,05 137 Composto 137 -5,70 -5,55 0,15 138 Composto 138 -5,68 -5,24 0,44 139 Composto 139 -5,66 -5,44 0,22 140 Composto 140 -5,62 -5,23 0,38 142 Composto 141 -5,62 -5,23 0,39 143 Composto 143 -5,62 -5,01 0,61 144 Composto 143 -5,60 -5,62 0,02 145 Composto 146 -5,59 -5,75 0,16 144 Composto 146 -5,59 -5,62 0,03 145 Composto 146 -5,59 -5,62 0,03 146 Composto 148 -5,59 -5,62 0,03 </th <th>131</th> <th>Composto 131</th> <th>-5,70</th> <th>-5,84</th> <th>0,14</th> <th></th>	131	Composto 131	-5,70	-5,84	0,14	
133 Composto 133 -5,70 -5,50 0,20 134 Composto 134 -5,70 -5,21 0,49 135 Composto 135 -5,70 -5,57 0,13 136 Composto 136 -5,70 -5,65 0,05 137 Composto 137 -5,70 -5,55 0,15 138 Composto 138 -5,68 -5,24 0,44 139 Composto 139 -5,66 -5,44 0,22 140 Composto 140 -5,62 -5,24 0,38 141 Composto 141 -5,62 -5,23 0,39 143 Composto 143 -5,62 -5,23 0,39 143 Composto 143 -5,62 -5,01 0,61 144 Composto 143 -5,60 -5,62 0,02 145 Composto 144 -5,60 -5,62 0,02 145 Composto 146 -5,59 -5,75 0,16 147 Composto 146 -5,59 -5,62 0,03 148 Composto 148 -5,59 -5,62 0,03 </th <th>132</th> <th>Composto 132</th> <th>-5,70</th> <th>-6,01</th> <th>0,31</th> <th></th>	132	Composto 132	-5,70	-6,01	0,31	
134 Composto 134 -5,70 -5,21 0,49 135 Composto 135 -5,70 -5,57 0,13 136 Composto 136 -5,70 -5,65 0,05 137 Composto 137 -5,70 -5,55 0,15 138 Composto 138 -5,68 -5,24 0,44 139 Composto 139 -5,66 -5,44 0,22 140 Composto 140 -5,62 -5,23 0,38 142 Composto 142 -5,62 -5,23 0,39 143 Composto 143 -5,62 -5,01 0,61 144 Composto 143 -5,62 -5,00 0,02 145 Composto 144 -5,60 -5,62 0,02 145 Composto 144 -5,60 -5,62 0,02 146 Composto 145 -5,59 -5,75 0,16 147 Composto 146 -5,59 -5,29 0,30 148 Composto 148 -5,59 -5,29 0,30 149 Composto 149 -5,59 -5,47 0,13 </th <th>133</th> <th>Composto 133</th> <th>-5,70</th> <th>-5,50</th> <th>0,20</th> <th></th>	133	Composto 133	-5,70	-5,50	0,20	
135Composto 135-5,70-5,570,13136Composto 136-5,70-5,650,05137Composto 137-5,70-5,550,15138Composto 138-5,68-5,240,44139Composto 139-5,66-5,440,22140Composto 140-5,64-5,400,24141Composto 141-5,62-5,240,38142Composto 142-5,62-5,230,39143Composto 143-5,62-5,010,61144Composto 144-5,60-5,620,02145Composto 145-5,60-5,000,60146Composto 146-5,59-5,750,16147Composto 148-5,59-5,290,30148Composto 148-5,59-5,290,30149Composto 149-5,58-5,300,28151Composto 150-5,58-5,640,08	134	Composto 134	-5,70	-5,21	0,49	
136Composto 136-5,70-5,650,05137Composto 137-5,70-5,550,15138Composto 138-5,68-5,240,44139Composto 139-5,66-5,440,22140Composto 140-5,64-5,400,24141Composto 141-5,62-5,240,38142Composto 142-5,62-5,230,39143Composto 143-5,62-5,010,61144Composto 144-5,60-5,620,02145Composto 145-5,60-5,750,16146Composto 146-5,59-5,750,16147Composto 148-5,59-5,620,03148Composto 148-5,59-5,290,30149Composto 149-5,58-5,300,28151Composto 150-5,58-5,640,08	135	Composto 135	-5,70	-5,57	0,13	
137Composto 137-5,70-5,550,15138Composto 138-5,68-5,240,44139Composto 139-5,66-5,440,22140Composto 140-5,64-5,400,24141Composto 141-5,62-5,240,38142Composto 142-5,62-5,230,39143Composto 143-5,62-5,010,61144Composto 144-5,60-5,620,02145Composto 145-5,60-5,000,60146Composto 146-5,59-5,750,16147Composto 148-5,59-5,620,03148Composto 148-5,59-5,290,30149Composto 149-5,59-5,470,13150Composto 150-5,58-5,300,28151Composto 151-5,56-5,640,08	136	Composto 136	-5,70	-5,65	0,05	
138Composto 138-5,68-5,240,44139Composto 139-5,66-5,440,22140Composto 140-5,64-5,400,24141Composto 141-5,62-5,240,38142Composto 142-5,62-5,230,39143Composto 143-5,62-5,010,61144Composto 144-5,60-5,620,02145Composto 145-5,60-5,000,60146Composto 146-5,59-5,750,16147Composto 148-5,59-5,620,03148Composto 148-5,59-5,290,30149Composto 149-5,59-5,470,13150Composto 150-5,58-5,300,28151Composto 151-5,56-5,640,08	137	Composto 137	-5,70	-5,55	0,15	
139Composto 139-5,66-5,440,22140Composto 140-5,64-5,400,24141Composto 141-5,62-5,240,38142Composto 142-5,62-5,230,39143Composto 143-5,62-5,010,61144Composto 144-5,60-5,620,02145Composto 145-5,60-5,000,60146Composto 146-5,59-5,750,16147Composto 147-5,59-5,620,03148Composto 148-5,59-5,290,30149Composto 149-5,59-5,470,13150Composto 150-5,58-5,300,28151Composto 151-5,56-5,640,08	138	Composto 138	-5,68	-5,24	0,44	
140Composto 140-5,64-5,400,24141Composto 141-5,62-5,240,38142Composto 142-5,62-5,230,39143Composto 143-5,62-5,010,61144Composto 144-5,60-5,620,02145Composto 145-5,60-5,000,60146Composto 146-5,59-5,750,16147Composto 147-5,59-5,620,03148Composto 148-5,59-5,290,30149Composto 149-5,59-5,470,13150Composto 150-5,58-5,300,28151Composto 151-5,56-5,640,08	139	Composto 139	-5,66	-5,44	0,22	
141Composto 141-5,62-5,240,38142Composto 142-5,62-5,230,39143Composto 143-5,62-5,010,61144Composto 144-5,60-5,620,02145Composto 145-5,60-5,000,60146Composto 146-5,59-5,750,16147Composto 147-5,59-5,620,03148Composto 148-5,59-5,290,30149Composto 149-5,59-5,470,13150Composto 150-5,58-5,300,28151Composto 151-5,56-5,640,08	140	Composto 140	-5,64	-5,40	0,24	
142Composto 142-5,62-5,230,39143Composto 143-5,62-5,010,61144Composto 144-5,60-5,620,02145Composto 145-5,60-5,000,60146Composto 146-5,59-5,750,16147Composto 147-5,59-5,620,03148Composto 148-5,59-5,290,30149Composto 149-5,59-5,470,13150Composto 150-5,58-5,300,28151Composto 151-5,56-5,640,08	141	Composto 141	-5,62	-5,24	0,38	
143Composto 143-5,62-5,010,61144Composto 144-5,60-5,620,02145Composto 145-5,60-5,000,60146Composto 146-5,59-5,750,16147Composto 147-5,59-5,620,03148Composto 148-5,59-5,290,30149Composto 149-5,59-5,470,13150Composto 150-5,58-5,300,28151Composto 151-5,56-5,640,08	142	Composto 142	-5,62	-5,23	0,39	
144Composto 144-5,60-5,620,02145Composto 145-5,60-5,000,60146Composto 146-5,59-5,750,16147Composto 147-5,59-5,620,03148Composto 148-5,59-5,290,30149Composto 149-5,59-5,470,13150Composto 150-5,58-5,300,28151Composto 151-5,56-5,640,08	143	Composto 143	-5,62	-5,01	0,61	
145Composto 145-5,60-5,000,60146Composto 146-5,59-5,750,16147Composto 147-5,59-5,620,03148Composto 148-5,59-5,290,30149Composto 149-5,59-5,470,13150Composto 150-5,58-5,300,28151Composto 151-5,56-5,640,08	144	Composto 144	-5,60	-5,62	0,02	
146Composto 146-5,59-5,750,16147Composto 147-5,59-5,620,03148Composto 148-5,59-5,290,30149Composto 149-5,59-5,470,13150Composto 150-5,58-5,300,28151Composto 151-5,56-5,640,08	145	Composto 145	-5,60	-5,00	0,60	
147Composto 147-5,59-5,620,03148Composto 148-5,59-5,290,30149Composto 149-5,59-5,470,13150Composto 150-5,58-5,300,28151Composto 151-5,56-5,640,08	146	Composto 146	-5,59	-5,75	0,16	
148Composto 148-5,59-5,290,30149Composto 149-5,59-5,470,13150Composto 150-5,58-5,300,28151Composto 151-5,56-5,640,08	147	Composto 147	-5,59	-5,62	0,03	
149Composto 149-5,59-5,470,13150Composto 150-5,58-5,300,28151Composto 151-5,56-5,640,08	148	Composto 148	-5,59	-5,29	0,30	
150 Composto 150 -5,58 -5,30 0,28 151 Composto 151 -5,56 -5,64 0,08	149	Composto 149	-5,59	-5,47	0,13	
151 Composto 151 -5,56 -5,64 0,08	150	Composto 150	-5,58	-5,30	0,28	
	151	Composto 151	-5,56	-5,64	0,08	

continuação				
152	Composto 152	-5,55	-5,57	0,02
153	Composto 153	-5,54	-5,18	0,36
154	Composto 154	-5,53	-5,72	0,19
155	Composto 155	-5,52	-5,62	0,10
156	Composto 156	-5,52	-5,72	0,20
157	Composto 157	-5,52	-4,98	0,54
158	Composto 158	-5,52	-5,32	0,20
159	Composto 159	-5,52	-5,28	0,24
160	Composto 160	-5,51	-5,40	0,11
161	Composto 161	-5,51	-4,92	0,59
162	Composto 162	-5,49	-4,99	0,50
163	Composto 163	-5,49	-5,14	0,35
164	Composto 164	-5,49	-5,36	0,13
165	Composto 165	-5,48	-5,76	0,28
166	Composto 166	-5,48	-5,43	0,05
167	Composto 167	-5,48	-5,22	0,26
168	Composto 168	-5,47	-5,28	0,19
169	Composto 169	-5,47	-5,14	0,33
170	Composto 170	-5,46	-5,32	0,14
171	Composto 171	-5,45	-5,80	0,35
172	Composto 172	-5,45	-5,39	0,06
173	Composto 173	-5,45	-5,82	0,37
174	Composto 174	-5,41	-5,68	0,27
175	Composto 175	-5,40	-5,73	0,33
176	Composto 176	-5,40	-5,75	0,35
177	Composto 177	-5,40	-5,24	0,16
178	Composto 178	-5,40	-5,59	0,19
179	Composto 179	-5,40	-5,23	0,17
180	Composto 180	-5,40	-5,42	0,02
181	Composto 181	-5,40	-5,97	0,57
182	Composto 182	-5,39	-5,46	0,07

continua	ção			
183	Composto 183	-5,39	-5,45	0,06
184	Composto 184	-5,39	-5,34	0,05
185	Composto 185	-5,38	-5,44	0,06
186	Composto 186	-5,38	-5,24	0,14
187	Composto 187	-5,38	-5,49	0,11
188	Composto 188	-5,37	-5,32	0,05
189	Composto 189	-5,36	-5,14	0,22
190	Composto 190	-5,35	-5,46	0,11
191	Composto 191	-5,34	-4,94	0,40
192	Composto 192	-5,34	-5,36	0,02
193	Composto 193	-5,34	-5,45	0,11
194	Composto 194	-5,34	-5,78	0,44
195	Composto 195	-5,33	-5,35	0,02
196	Composto 196	-5,33	-5,73	0,40
197	Composto 197	-5,33	-5,34	0,01
198	Composto 198	-5,33	-5,29	0,04
199	Composto 199	-5,33	-5,10	0,23
200	Composto 200	-5,33	-5,70	0,37
201	Composto 201	-5,31	-5,24	0,07
202	Composto 202	-5,31	-4,82	0,49
203	Composto 203	-5,31	-4,88	0,43
204	Composto 204	-5,30	-5,81	0,51
205	Composto 205	-5,30	-5,28	0,02
206	Composto 206	-5,30	-5,22	0,08
207	Composto 207	-5,17	-4,76	0,41
208	Composto 208	-5,29	-5,08	0,21
209	Composto 209	-5,29	-5,29	0,00
210	Composto 210	-5,28	-4,74	0,54
211	Composto 211	-5,28	-5,12	0,16
212	Composto 212	-5,27	-5,05	0,22
213	Composto 213	-5,26	-5,48	0,22

continuação				
214	Composto 214	-5,26	-5,16	0,10
215	Composto 215	-5,26	-5,19	0,07
216	Composto 216	-5,25	-5,38	0,13
217	Composto 217	-5,25	-5,30	0,05
218	Composto 218	-5,25	-4,96	0,29
219	Composto 219	-5,24	-5,20	0,04
220	Composto 220	-5,24	-5,39	0,15
221	Composto 221	-5,24	-5,15	0,09
222	Composto 222	-5,24	-5,50	0,26
223	Composto 223	-5,23	-5,46	0,23
224	Composto 224	-5,23	-5,26	0,03
225	Composto 225	-5,22	-5,25	0,03
226	Composto 226	-5,22	-5,16	0,06
227	Composto 227	-5,22	-5,40	0,18
228	Composto 228	-5,22	-5,26	0,04
229	Composto 229	-5,21	-5,54	0,33
230	Composto 230	-5,20	-4,66	0,54
231	Composto 231	-5,20	-4,74	0,46
232	Composto 232	-5,19	-5,07	0,12
233	Composto 233	-5,19	-4,84	0,35
234	Composto 234	-5,19	-5,12	0,07
235	Composto 235	-5,19	-5,07	0,12
236	Composto 236	-5,19	-5,04	0,15
237	Composto 237	-5,17	-5,19	0,02
238	Composto 238	-5,17	-4,57	0,60
239	Composto 239	-5,17	-5,24	0,07
240	Composto 240	-5,16	-5,21	0,05
241	Composto 241	-5,16	-5,51	0,35
242	Composto 242	-5,15	-5,02	0,13
243	Composto 243	-5,15	-5,34	0,19
244	Composto 244	-5,15	-5,31	0,16
245	Composto 245	-5,15	-5,03	0,12
246	Composto 246	-5,15	-5,34	0,19
247	Composto 247	-5,15	-5,21	0,06
248	Composto 248	-5,15	-4,69	0,46
				continua

continuação				
249	Composto 249	-5,14	-5,40	0,26
250	Composto 250	-5,14	-4,95	0,19
251	Composto 251	-5,13	-4,97	0,16
252	Composto 252	-5,12	-5,23	0,11
253	Composto 253	-5,11	-4,97	0,14
254	Composto 254	-5,11	-5,25	0,14
255	Composto 255	-5,10	-5,36	0,26
256	Composto 256	-5,10	-5,26	0,16
257	Composto 257	-5,10	-4,84	0,26
258	Composto 258	-5,10	-5,21	0,11
259	Composto 259	-5,08	-5,16	0,08
260	Composto 260	-5,08	-5,50	0,42
261	Composto 261	-5,08	-5,14	0,06
262	Composto 262	-5,07	-4,97	0,10
263	Composto 263	-5,07	-5,39	0,32
264	Composto 264	-5,07	-4,70	0,37
265	Composto 265	-5,06	-5,05	0,01
266	Composto 266	-5,06	-5,03	0,03
267	Composto 267	-5,06	-5,25	0,19
268	Composto 268	-5,05	-5,15	0,10
269	Composto 269	-5,05	-5,61	0,56
270	Composto 270	-5,05	-4,68	0,37
271	Composto 271	-5,05	-4,91	0,14
272	Composto 272	-5,05	-5,18	0,13
273	Composto 273	-5,04	-5,21	0,17
274	Composto 274	-5,04	-4,96	0,08
275	Composto 275	-5,03	-4,88	0,15
276	Composto 276	-5,03	-5,02	0,01
277	Composto 277	-5,03	-4,87	0,16
278	Composto 278	-5,03	-5,27	0,24
279	Composto 279	-5,03	-5,16	0,13
280	Composto 280	-5,02	-4,84	0,18
281	Composto 281	-5,02	-5,40	0,38
282	Composto 282	-5,02	-5,31	0,29
283	Composto 283	-5,01	-5,18	0,17
284	Composto 284	-5,01	-4,98	0,03
285	Composto 285	-5,00	-4,66	0,34
286	Composto 286	-5,00	-5,12	0,12
287	Composto 287	-5,00	-5,12	0,12
288	Composto 288	-5,00	-4,83	0,17
289	Composto 289	-5,00	-5,06	0,06
290	Composto 290	-5,00	-5,03	0,03
				continua

continuação				
291	Composto 291	-5,00	-5,29	0,29
292	Composto 292	-5,00	-5,56	0,56
293	Composto 293	-5,00	-5,07	0,07
294	Composto 294	-5,00	-4,96	0,04
295	Composto 295	-5,00	-5,08	0,08
296	Composto 296	-5,00	-5,12	0,12
297	Composto 297	-5,00	-5,05	0,05
298	Composto 298	-5,00	-5,04	0,04
299	Composto 299	-5,00	-5,04	0,04
300	Composto 300	-5,00	-5,04	0,04
301	Composto 301	-5,00	-5,03	0,03
302	Composto 302	-5,00	-5,14	0,14
303	Composto 303	-5,00	-4,98	0,02
304	Composto 304	-5,00	-5,01	0,01
305	Composto 305	-5,00	-4,84	0,16
306	Composto 306	-5,00	-5,03	0,03
307	Composto 307	-5,00	-5,01	0,01
308	Composto 308	-5,00	-5,01	0,01
309	Composto 309	-5,00	-4,86	0,14
310	Composto 310	-5,00	-5,00	0,00
311	Composto 311	-5,00	-5,04	0,04
312	Composto 312	-5,00	-5,08	0,08
313	Composto 313	-5,00	-5,17	0,17
314	Composto 314	-5,00	-5,00	0,00
315	Composto 315	-5,00	-4,78	0,22
316	Composto 316	-5,00	-5,23	0,23
317	Composto 317	-5,00	-5,10	0,10
318	Composto 318	-5,00	-4,96	0,04
319	Composto 319	-5,00	-4,91	0,09
320	Composto 320	-5,00	-4,95	0,05
321	Composto 321	-4,99	-4,94	0,05
322	Composto 322	-4,99	-4,87	0,12
323	Composto 323	-4,98	-4,98	0,00
324	Composto 324	-4,98	-5,05	0,07
325	Composto 325	-4,97	-5,30	0,33
326	Composto 326	-4,97	-5,22	0,25
327	Composto 327	-4,96	-5,22	0,26
328	Composto 328	-4,96	-5,41	0,45
329	Composto 329	-4,96	-5,31	0,35
330	Composto 330	-4,96	-5,22	0,26
331	Composto 331	-4,96	-4,83	0,13
				continua

continuação				
332	Composto 332	-4,95	-5,01	0,06
333	Composto 333	-4,95	-5,38	0,43
334	Composto 334	-4,95	-4,89	0,06
335	Composto 335	-4,94	-5,24	0,30
336	Composto 336	-4,94	-5,09	0,15
337	Composto 337	-4,94	-4,70	0,24
338	Composto 338	-4,93	-4,85	0,08
339	Composto 339	-4,92	-5,05	0,13
340	Composto 340	-4,92	-4,65	0,27
341	Composto 341	-4,92	-4,67	0,25
342	Composto 342	-4,92	-4,77	0,15
343	Composto 343	-4,92	-4,65	0,27
344	Composto 344	-4,91	-4,99	0,08
345	Composto 345	-4,91	-4,99	0,08
346	Composto 346	-4,90	-5,29	0,39
347	Composto 347	-4,90	-5,27	0,37
348	Composto 348	-4,89	-5,21	0,32
349	Composto 349	-4,89	-4,99	0,10
350	Composto 350	-4,89	-5,17	0,28
351	Composto 351	-4,89	-4,99	0,10
352	Composto 352	-4,88	-4,94	0,05
353	Composto 353	-4,88	-4,66	0,22
354	Composto 354	-4,88	-4,94	0,06
355	Composto 355	-4,87	-4,55	0,32
356	Composto 356	-4,87	-4,78	0,09
357	Composto 357	-4,87	-4,61	0,26
358	Composto 358	-4,87	-4,97	0,10
359	Composto 359	-4,86	-4,88	0,02
360	Composto 360	-4,86	-5,34	0,48
361	Composto 361	-4,86	-5,02	0,16
362	Composto 362	-4,86	-4,93	0,07
363	Composto 363	-4,86	-4,80	0,06
364	Composto 364	-4,86	-5,38	0,52
365	Composto 365	-4,85	-5,16	0,31
366	Composto 366	-4,85	-4,55	0,30
367	Composto 367	-4,85	-4,82	0,03
368	Composto 368	-4,84	-5,20	0,36
369	Composto 369	-4,84	-4,75	0,09
370	Composto 370	-4,84	-5,09	0,25
371	Composto 371	-4,84	-5,20	0,36

continuação				
372	Composto 372	-4,84	-5,44	0,60
373	Composto 373	-4,84	-4,66	0,18
374	Composto 374	-4,82	-5,11	0,29
375	Composto 375	-4,82	-5,26	0,44
376	Composto 376	-4,80	-4,92	0,12
377	Composto 377	-4,80	-4,90	0,10
378	Composto 378	-4,80	-5,15	0,35
379	Composto 379	-4,80	-4,74	0,06
380	Composto 380	-4,79	-5,22	0,43
381	Composto 381	-4,78	-5,16	0,38
382	Composto 382	-4,78	-5,22	0,44
383	Composto 383	-4,78	-4,80	0,02
384	Composto 384	-4,78	-5,05	0,27
385	Composto 385	-4,78	-4,97	0,19
386	Composto 386	-4,77	-4,82	0,05
387	Composto 387	-4,77	-4,91	0,14
388	Composto 388	-4,77	-5,31	0,54
389	Composto 389	-4,77	-4,73	0,04
390	Composto 390	-4,77	-4,58	0,19
391	Composto 391	-4,72	-4,89	0,17
392	Composto 392	-4,77	-5,02	0,25
393	Composto 393	-4,77	-5,03	0,26
394	Composto 394	-4,77	-4,92	0,15
395	Composto 395	-4,75	-5,03	0,28
396	Composto 396	-4,75	-4,86	0,11
397	Composto 397	-4,75	-4,97	0,22
398	Composto 398	-4,74	-4,99	0,25
399	Composto 399	-4,74	-5,09	0,35
400	Composto 400	-4,73	-4,82	0,09
401	Composto 401	-4,72	-4,66	0,06
402	Composto 402	-4,72	-4,84	0,12
403	Composto 403	-4,72	-4,78	0,06
404	Composto 404	-4,71	-4,58	0,13
405	Composto 405	-4,71	-4,99	0,28
406	Composto 406	-4,70	-4,89	0,19
407	Composto 407	-4,70	-4,76	0,06
408	Composto 408	-4,70	-4,72	0,02
409	Composto 409	-4,70	-4,74	0,04
410	Composto 410	-4,70	-4,99	0,29
411	Composto 411	-4,69	-4,68	0,01
412	Composto 412	-4,69	-5,13	0,44
413	Composto 413	-4,69	-5,00	0,31
	-			continua

continuação				
414	Composto 414	-4,69	-5,05	0,36
415	Composto 415	-4,68	-4,77	0,09
416	Composto 416	-4,67	-4,65	0,02
417	Composto 417	-4,67	-4,60	0,07
418	Composto 418	-4,66	-4,84	0,18
419	Composto 419	-4,66	-4,93	0,27
420	Composto 420	-4,65	-4,85	0,20
421	Composto 421	-4,64	-5,22	0,58
422	Composto 422	-4,64	-5,06	0,42
423	Composto 423	-4,63	-4,95	0,32
424	Composto 424	-4,63	-4,67	0,04
425	Composto 425	-4,62	-4,70	0,08
426	Composto 426	-4,62	-5,06	0,44
427	Composto 427	-4,62	-5,09	0,47
428	Composto 428	-4,62	-5,02	0,40
429	Composto 429	-4,61	-5,30	0,69
430	Composto 430	-4,60	-4,90	0,30
431	Composto 431	-4,60	-5,01	0,41
432	Composto 432	-4,60	-4,86	0,26
433	Composto 433	-4,60	-4,75	0,15
434	Composto 434	-4,60	-4,96	0,36
435	Composto 435	-4,59	-4,72	0,13
436	Composto 436	-4,59	-5,04	0,45
437	Composto 437	-4,59	-4,94	0,35
438	Composto 438	-4,58	-4,80	0,22
439	Composto 439	-4,57	-4,78	0,21
440	Composto 440	-4,55	-4,69	0,14
441	Composto 441	-4,54	-5,03	0,49
442	Composto 442	-4,54	-4,77	0,23
443	Composto 443	-4,54	-4,56	0,02
444	Composto 444	-4,53	-4,62	0,09
445	Composto 445	-4,52	-4,70	0,18
446	Composto 446	-4,52	-4,61	0,09
447	Composto 447	-4,52	-4,61	0,09
448	Composto 448	-4,52	-4,80	0,28
449	Composto 449	-4,52	-4,58	0,06
450	Composto 450	-4,49	-4,76	0,27
451	Composto 451	-4,49	-4,58	0,09
452	Composto 452	-4,49	-4,60	0,11
453	Composto 453	-4,48	-4,62	0,14
454	Composto 454	-4,48	-4,55	0,07
455	Composto 455	-4,48	-4,56	0,08

continuação				
456	Composto 456	-4,47	-4,81	0,34
457	Composto 457	-4,47	-4,32	0,15
458	Composto 458	-4,46	-4,80	0,34
459	Composto 459	-4,46	-4,19	0,27
460	Composto 460	-4,45	-4,80	0,35
461	Composto 461	-4,45	-4,67	0,22
462	Composto 462	-4,44	-4,44	0,00
463	Composto 463	-4,44	-4,87	0,43
464	Composto 464	-4,43	-4,75	0,32
465	Composto 465	-4,43	-4,51	0,08
466	Composto 466	-4,42	-4,89	0,47
467	Composto 467	-4,42	-4,40	0,02
468	Composto 468	-4,41	-4,75	0,34
469	Composto 469	-4,41	-4,60	0,19
470	Composto 470	-4,40	-4,53	0,13

[a] log dos valores experimentais da permeabilidade em células Caco-2 (cm.s⁻¹). [b] Valores preditos pelo modelo 8 (4-7). [c] Valores residuais, a diferença entre valores preditos e experimentais.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 18 – Valores experin	mentais e preditos de	permeabilidade em PAMPA	para o conjunto treinamento
-----------------------------	-----------------------	-------------------------	-----------------------------

\mathbf{N}°	Composto	Papp-PAMPA exp ^[a]	P _{app} -PAMPA pred ^[b]	Res ^[c]
1	Composto 595	-4,78	-4,86	0,08
2	Composto 596	-4,72	-4,49	0,23
3	Composto 597	-4,72	-4,96	0,24
4	Composto 598	-4,77	-4,81	0,04
5	Composto 599	-6,17	-6,17	0,00
6	Composto 600	-4,76	-4,85	0,09
7	Composto 601	-4,97	-5,18	0,21
8	Composto 602	-6,54	-6,42	0,12
9	Composto 603	-5,3	-5,52	0,22
10	Composto 604	-4,91	-5,14	0,23
11	Composto 605	-5,03	-4,83	0,20
12	Composto 606	-6,04	-5,43	0,61
13	Composto 607	-4,94	-4,99	0,05
14	Composto 608	-5,31	-5,46	0,15
15	Composto 609	-5,21	-5,05	0,16
16	Composto 610	-4,53	-4,62	0,09
17	Composto 611	-5,41	-5,47	0,06
18	Composto 612	-4,64	-4,61	0,03
19	Composto 613	-4,98	-4,91	0,07
20	Composto 614	-4,77	-4,75	0,02
21	Composto 615	-6,38	-5,97	0,41
22	Composto 616	-4,28	-4,56	0,28

continuação)			
23	Composto 617	-6,47	-6,41	0,06
24	Composto 618	-6,69	-6,92	0,23
25	Composto 619	-4,67	-4,90	0,23
26	Composto 620	-4,71	-4,72	0,01
27	Composto 621	-5,68	-5,31	0,37
28	Composto 622	-5,55	-5,29	0,26
29	Composto 623	-5,18	-5,13	0,05
30	Composto 624	-5,1	-5,31	0,21
31	Composto 625	-4,86	-4,51	0,35
32	Composto 626	-5,56	-5,35	0,21
33	Composto 627	-5,55	-5,34	0,21
34	Composto 628	-6,62	-6,43	0,19
35	Composto 629	-6,18	-6,32	0,14
36	Composto 630	-6,14	-6,32	0,18
37	Composto 631	-4,83	-5,09	0,26
38	Composto 632	-5,31	-5,30	0,01
39	Composto 633	-6,05	-6,10	0,05
40	Composto 634	-5,98	-5,66	0,32
41	Composto 635	-6,05	-6,24	0,19
42	Composto 636	-5,37	-5,26	0,11
43	Composto 637	-4,77	-4,91	0,14
44	Composto 638	-5,45	-5,34	0,11
45	Composto 639	-5,47	-5,38	0,09
46	Composto 640	-4,76	-4,78	0,02
47	Composto 641	-4,95	-5,03	0,08
48	Composto 642	-4,82	-4,79	0,03
49	Composto 643	-4,54	-4,60	0,06
50	Composto 644	-6,02	-6,06	0,04
51	Composto 645	-5,22	-5,59	0,37
52	Composto 646	-4,48	-4,64	0,16
53	Composto 647	-4,67	-4,68	0,00
54	Composto 648	-4,68	-4,67	0,01
55	Composto 649	-5,55	-5,20	0,35
56	Composto 650	-4,61	-4,53	0,08
57	Composto 651	-5,14	-5,12	0,02
58	Composto 652	-4,44	-4,72	0,28
59	Composto 653	-4,93	-4,98	0,05
60	Composto 654	-4,36	-4,53	0,17
61	Composto 655	-4,78	-4,61	0,17
62	Composto 656	-5,34	-5,22	0,12
63	Composto 657	-4,8	-4,86	0,06
64	Composto 658	-5,72	-5,85	0,13
65	Composto 659	-5,28	-5,46	0.18

 [a] log dos valores experimentais da permeabilidade em PAMPA (cm.s⁻¹).
[b] Valores preditos pelo modelo 8 (4-7).
[c] Valores residuais, a diferença entre valores preditos e experimentais.

Fonte: Elaborada pela autora.