

**ESTUDOS DE RELAÇÕES ESTRUTURA-ATIVIDADE QUANTITATIVAS (QSAR) DE BIS-BENZAMIDINAS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA****Vera L. de Almeida, Júlio César Dias Lopes, Sheila Rodrigues Oliveira e Claudio L. Donnici\***

Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte – MG, Brasil

**Carlos A. Montanari**

Departamento de Química e Física Molecular, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense, 400, 13560-970 São Carlos - SP, Brasil

Recebido em 5/10/09; aceito em 26/3/10; publicado na web em 20/7/10

QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS (QSAR) STUDIES OF BISBENZAMIDINES WITH ANTIFUNGAL ACTIVITY. This paper describes 2D-QSAR and 3D-QSAR studies against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* for a set of 20 bisbenzamidines. In the studies of 2D-QSAR with *C. albicans* it was obtained a correlation between  $\log \text{MIC}^{-1}$  and lipolo component-Z ( $r^2 = 0.68$ ;  $Q^2 = 0.51$ ). In the case of *C. neoformans* a correlation between  $\log \text{MIC}^{-1}$  and lipolo component-Z and of Balaban index ( $r^2 = 0.85$ ;  $Q^2 = 0.6$ ) was obtained. 3D-QSAR studies using CoMFA showed that the steric fields contributed more to the predicted activities for *Candida albicans* (94.9%) and *Cryptococcus neoformans* (97.9%).

Keywords: QSAR; bis-benzamidines; antifungal activity.

**INTRODUÇÃO**

As infecções causadas por fungos são, geralmente, limitadas à superfície dos tecidos e são relativamente fáceis de serem curadas.<sup>1,2</sup> Com os avanços da medicina, o número de pacientes em internação hospitalar prolongada cresceu muito, assim como a população de pacientes imunologicamente vulneráveis a fungos e bactérias, levando a um aumento da frequência de infecções causadas por patógenos oportunistas. Tais internações propiciam uma maior exposição do paciente a patógenos multirresistentes, comumente presente nos centros hospitalares.<sup>3,4</sup> Adicionalmente, em pacientes imunossuprimidos as infecções causadas por fungos podem ser graves.<sup>5,6</sup> Ao longo dos últimos 10 anos, a incidência de infecções causadas por fungos tem aumentado muito em número e em gravidade. Para piorar este grave quadro epidemiológico, o uso incorreto de antibióticos de amplo espectro de ação tem levado ao surgimento de populações de microorganismos resistentes a estes agentes quimioterápicos,<sup>7</sup> apesar da maior parte dos fungos patogênicos serem muito bem conhecidos tanto quanto o seu tratamento clínico.<sup>3-9</sup> O tratamento destas infecções fúngicas invasivas (IFIs) e oportunistas permanece ainda insatisfatório com o uso da maior parte dos agentes antifúngicos usuais, tais como itraconazol e anfotericina B, e além disso os agentes patogênicos oportunistas têm aumentado cada vez mais a sua resistência mesmo com o uso de novos agentes antifúngicos como, por exemplo, o voriconazol. Um estudo relatou que em 47 a 68% dos pacientes não houve eficácia terapêutica.<sup>8,9</sup> Diante deste grave e crescente problema de saúde, o governo americano estabeleceu uma comissão nacional para o estudo e a prevenção das doenças microbianas resistentes - *Antimicrobial Resistance Prevention Initiative (ARPI)* - cuja principal meta é auxiliar no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos mais eficientes.<sup>10-13</sup>

O gênero *Candida* é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas em ambiente hospitalar e constitui causa relevante de infecções de corrente sanguínea.<sup>14</sup> Entre as espécies mais invasivas, que são responsáveis por quadros graves de candidíases, incluem-se *C.*

*glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*.<sup>15</sup> *Cryptococcus neoformans* é o segundo mais comum fungo oportunista em pacientes HIV positivos. A manifestação clínica desta infecção irá depender do sistema imunológico do hospedeiro.<sup>16</sup>

Entre os agentes antifúngicos descritos na literatura pode-se destacar a pentamidina, que é o fármaco de escolha no tratamento da PCP (pneumonia causada por *Pneumocystis carinii*) e que tem sido usada clinicamente no tratamento de tripanossomíases e leishmaniose.<sup>17-20</sup> A pentamidina e os seus análogos também se mostraram ativos contra *Plasmodium falciparum*, *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii*, *Giardia lamblia*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium soloni* e várias espécies de *Candida*.<sup>21-23</sup>

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar o mecanismo de ação farmacológica das amidinas aromáticas. Segundo estudos biofísicos, que incluem RMN e cristalografia de raios X, estes compostos se ligam na fenda menor do DNA em regiões ricas em adenina-timina (A-T) no código genético.<sup>24</sup> Eles possuem características estruturais em comum que incluem: podem assumir uma conformação isoélica ao DNA, possuem grupos amidínicos carregados positivamente em pH fisiológico.<sup>17</sup> A estrutura complementar à dupla hélice do DNA aumenta a superfície de contato e alinha grupos que favorecem a interação com o DNA.<sup>25</sup> Estudos prévios de modelagem molecular e relação estrutura-atividade utilizando compostos amidínicos têm mostrado a importância da estrutura isoélica e da carga positiva presente nestes compostos para a interação com a fenda menor do B-DNA.<sup>18,26-28</sup> Estudos de modelagem molecular sugerem ainda que o grupo amidínico desses compostos forme ligações de hidrogênio com os átomos receptores das bases A-T presentes na fenda menor.<sup>17,22,26</sup> Há fortes evidências de que eles levariam à subsequente inibição de enzimas DNA-dependentes.<sup>23,29,30</sup>

Assim, a pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos e/ou a modificação molecular de compostos químicos já existentes para descoberta de novos compostos-protótipo com atividade biológica potencial são importantes ferramentas para se garantir o combate ao crescente número de fungos patogênicos resistentes e levar ao uso clínico de compostos cada vez mais eficientes e menos

\*e-mail: [cdonnici@terra.com.br](mailto:cdonnici@terra.com.br)

tóxicos. O uso de quimioinformática e técnicas de QSAR-2D e 3D tem contribuído para o planejamento de novos potenciais agentes antifúngicos.<sup>31</sup>

As análises de QSAR têm como principal objetivo a construção de modelos matemáticos que relacionem a estrutura química à atividade biológica de uma série de compostos análogos. Em geral, esses compostos diferem entre si pela presença de um ou mais grupos substituintes em posições definidas na estrutura química comum à série.<sup>32,33</sup> Esses modelos devem ser capazes de explicar o fenômeno observado bem como de proporcionar previsões dentro e, se possível, fora dos limites observados,<sup>34</sup> sendo utilizadas técnicas estatísticas multivariadas que podem gerar modelos lineares ou não. Para os modelos lineares, as técnicas de Regressão Múltipla Linear (RML ou *Multiple Linear Regression - MLR*) e Mínimos Quadrados Parciais (MQP ou *PLS - Partial Least Squares*) são as funções matemáticas mais utilizadas.<sup>35</sup>

Neste trabalho foram utilizadas análises de QSAR-2D e 3D. Esta última foi realizada através da análise comparativa do campo molecular (*Comparative Molecular Field Analysis - CoMFA*) de um banco de compostos bisbenzamidínicos obtidos da literatura,<sup>36,37</sup> utilizando o software SYBYL 6.7.<sup>38</sup> No método CoMFA<sup>38-40</sup> as energias de interação eletrostática e estereoquímica entre uma sonda e a molécula<sup>18,40,41</sup> foram usadas como descritores. Para o cálculo de interação eletrostática foi utilizado o potencial coulômbico e para o cálculo dos campos estereoquímicos foi utilizado o potencial de Lennard-Jones. Foram gerados mapas de contorno que permitem uma análise visual das propriedades moleculares relevantes para a atividade biológica buscada.<sup>18</sup>

## PARTE EXPERIMENTAL

### Geração da estrutura 3D

Inicialmente foi construído um banco de dados com 19 compostos benzamidínicos substituídos (Figura 1) obtidos da literatura com valores quantitativos de atividade antifúngica (concentração inibitória mínima) frente à *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* relatados na literatura.<sup>36,37</sup> Todos esses compostos se ligam à fenda menor do B-DNA em regiões ricas em adenina-timina (A-T).<sup>21,23,41-45</sup>

As moléculas foram construídas na sua forma protonada utilizando o programa SYBYL 6.7. As cargas parciais dos átomos dos compostos foram calculadas utilizando o programa MOPAC 7.0 por métodos semiempíricos de cálculo Hamiltoniano MNDO-ESP.<sup>26,46,47</sup>

Utilizando o programa MacroModel versão 5.5<sup>48</sup> os complexos DNA-ligante foram construídos utilizando o octâmero do B-DNA o (CGAATTCG)<sub>2</sub> (arquivo PDB 227d). Esses complexos foram inicialmente minimizados, mantendo o DNA rígido e o ligante flexível. Foram feitos 2500 ciclos utilizando o campo de força Amber,<sup>49</sup> tratamento eletrostático dependente da distância e constante dielétrica molecular simulando a presença de água. A minimização foi feita utilizando gradiente conjugado. As distâncias de corte para o cálculo das interações foram padronizadas em 20 Å para interação coulômbica e 8 Å em van der Waals (critérios de convergência: 0,01 kcal/ -mol). Os complexos DNA-ligante obtidos foram então otimizados usando o procedimento MM-DM-MM (mecânica molecular-dinâmica molecular-mecânica molecular) no programa MacroModel 5.5, considerando o DNA e os ligantes flexíveis, utilizando o campo de força Amber.<sup>21,23,39-43</sup> As condições de minimização utilizando mecânica molecular descritas acima foram seguidas. O complexo de menor energia obtido foi submetido à dinâmica molecular com o DNA e o ligante flexíveis. A dinâmica foi feita em três etapas, com temperatura constante de 300 K. Na primeira etapa, o tempo total de dinâmica foi de 100 picossegundos com passos de 1,5 femtossegundos. Na segunda

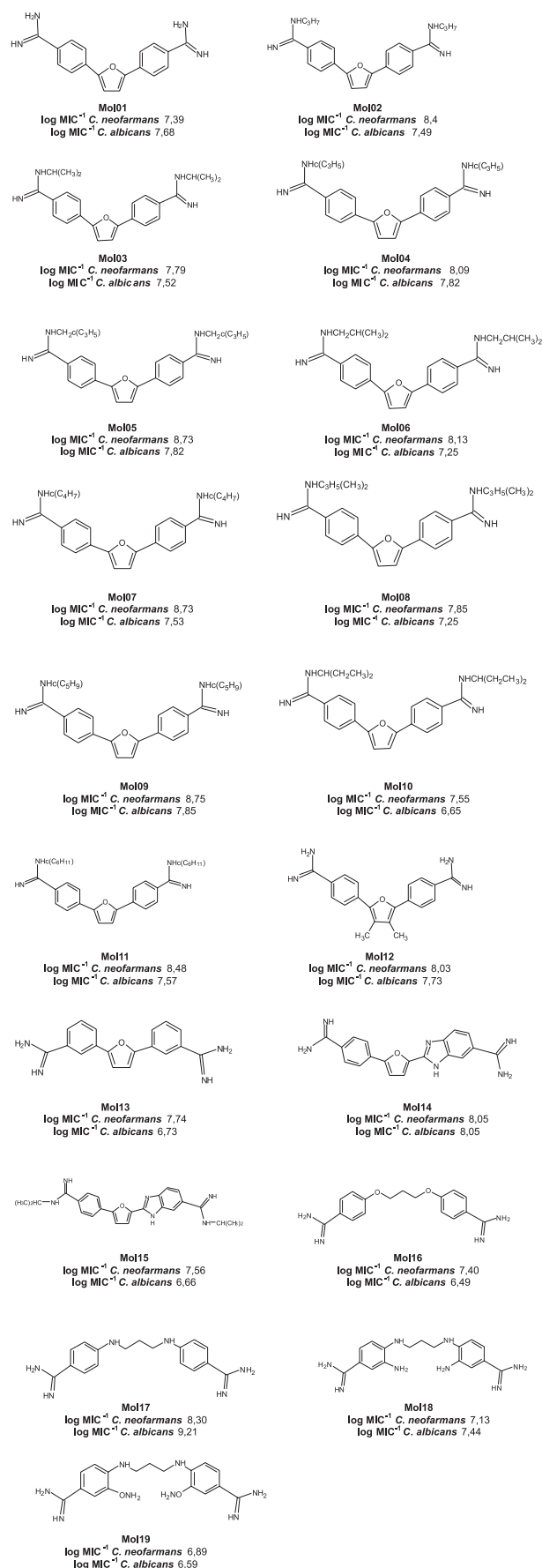


Figura 1. Estruturas das bisbenzamidinas do banco de dados e a atividade biológica de frente aos fungos, *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*<sup>42,43</sup>

etapa o tempo total de dinâmica foi de 300 picossegundos com passos de 1,5 femtossegundos. Na terceira etapa o tempo total de dinâmica foi de 500 picossegundos com passos de 1,5 femtossegundos. O complexo de menor energia foi submetido novamente à mecânica molecular utilizando as mesmas condições descritas anteriormente. Após a minimização, os complexos foram desfeitos.

As conformações de algumas bisbenzamidinas obtidas na docagem manual foram avaliadas por comparação com aquelas conformações obtidas por cristalografia de raios X depositadas no *Protein Data Bank*- PDB.<sup>50-52</sup> As moléculas **3** (arquivo PDB 298D), **4** (arquivo PDB 289D), **7** (arquivo PDB 1EEL) e **11** (arquivo PDB 1FMS) foram comparadas através do cálculo de desvio médio quadrático (RMS - *Root Mean Square*) utilizando o programa INSIGHT II versão 97.<sup>53</sup>

### Estudos de QSAR-2D frente ao fungo *Candida albicans*

Utilizando o programa Tsar versão 3.21,<sup>54</sup> as moléculas na conformação obtida do *docking* manual foram alinhadas utilizando alinhamento baseado na massa e na carga atômica (massa peso = 1, carga peso = 10). Cinquenta parâmetros físico-químicos (estereoquímicos, eletrônicos, topológicos, lipofílicos e de similaridade) foram calculados e normalizados segundo procedimento média/desvio. Foi realizada análise de RML usando o programa BILIN,<sup>55</sup> utilizando como grupo de treino os compostos **1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 12 e 13** (Figura 1) e como grupo de teste os compostos **6, 7, 8 e 9** (Figura 1) que foram escolhidos de forma aleatória. Como variável dependente foi utilizado log MIC<sup>-1</sup> frente ao fungo *Candida albicans* e como variáveis independentes aqueles calculados usando programa Tsar versão 3.2.<sup>53</sup> O método de validação cruzada escolhido foi *Leaving One Out* (LOO). A equação que correlaciona atividade biológica com parâmetros físico-químicos foi obtida e feita uma predição dos valores de log MIC<sup>-1</sup> dos compostos do grupo de treino. A atividade biológica dos compostos do grupo de teste e das moléculas da validação lateral, assim como as porcentagens de erro desta análise, foram calculadas para cada composto.

### Estudos de QSAR-2D frente ao fungo *Cryptococcus neoformans*

Utilizando-se a mesma metodologia descrita anteriormente, foi feita uma regressão múltipla linear, programa BILIN,<sup>54</sup> utilizando como grupo de treino os compostos **3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12 e 13** (Figura 1) e como grupo de teste os compostos **1, 2, 6, e 9** (Figura 1) escolhidos de forma aleatória.

### Estudos de QSAR-3D frente aos fungos *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*

Na análise de QSAR-3D foi utilizado o programa CoMFA, do pacote de programas SYBYL 6.7.<sup>36</sup> As moléculas do banco de dados (Figura 1) foram alinhadas pelo método ponto a ponto com estrutura da pentamidina obtida por cristalografia raios X (227d arquivo PDB). Os campos eletrostático e estereoquímico do CoMFA foram calculados em cada ponto de interseção da caixa usando as funções potencial de Leonard Jones e Coulômbica do campo de força Tripos utilizando diferentes sondas. Com base no conhecimento da interação destes compostos com a fenda menor do B-DNA, foram escolhidas sondas que fossem capazes de mimetizar a interação da droga com o alvo biológico: a sonda O2 (oxigênio sp<sup>2</sup>) acceptor de ligação de hidrogênio, sonda O3 (oxigênio sp<sup>3</sup>) acceptor de ligação de hidrogênio, N3 (nitrogênio sp<sup>2</sup> pertencente a anel aromático), CH<sub>3</sub><sup>+</sup> (sonda *default* do programa), N3 (nitrogênio sp<sup>3</sup>) acceptor de ligação de hidrogênio e sonda H<sup>+</sup> doadora de ligação de hidrogênio. O tamanho da caixa utilizado foi de 31,

15 e 13 Å em relação os eixos X, Y e Z, respectivamente, com diferentes espaçamentos dos pontos e raios de corte. Para reduzir o número de variáveis calculado para cada modelo foram utilizados raios de corte para os campos eletrostático e estereoquímico. Com o objetivo de melhorar a eficiência e diminuir o ruído, foi empregado um filtro para excluir variáveis com variância menor que 2 Kcal/mol. O modelo foi obtido através de análises de PLS utilizando como variáveis dependentes os valores de log MIC<sup>-1</sup> frente aos fungos *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. O método validação cruzada utilizado foi o LOO.

Nos estudos de QSAR-3D frente à *Candida albicans*, foram utilizados como grupo de treino os compostos **1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 12 e 13** (Figura 1) e como grupo de teste os compostos **6, 7 e 8** (Figura 1), os quais foram escolhidos de forma aleatória. As melhores condições de análises obtidas encontram-se resumidas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Condições utilizadas na análise CoMFA frente a *Candida albicans*

Análise	Peso	Sonda	Carga	Intervalo dos pontos (Å)	Raios de corte (Kcal/mol <sup>-1</sup> )	
					estereoquímico	eletrostático
<b>1</b>	-	O2	0	1,5:1,5:1,5	8	16
<b>2</b>	0,6	O2	0	1,5:1,5:1,5	8	16
<b>3</b>	-	O3	0	1,0:1,0:1,0	8	16
<b>4</b>	0,3	O3	0	1,0:1,0:1,0	8	16
<b>6</b>		CH3	+1	1,5:1,5:1,5	8	16
<b>7</b>	0,3	CH3	+1	1,5:1,5:1,5	8	16
<b>8</b>		N3	0	1,0:1,0:1,0	8	16
<b>9</b>	0,3	N3	0	1,0:1,0:1,0	8	16

Nos estudos de QSAR-3D frente ao *Cryptococcus neoformans* fizeram parte do grupo de treino os compostos **2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11 e 12** (Figura 1) e como grupo de teste os compostos **1, 6, e 9** (Figura 1), que foram escolhidos aleatoriamente. As melhores condições de análises obtidas estão resumidamente mostradas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Condições utilizados na análise CoMFA frente a *Cryptococcus neoformans*

Análise	Peso	Sonda	Carga	Intervalos dos pontos (Å)	Raios de corte (Kcal/mol <sup>-1</sup> )	
					estereoquímico	eletrostático
<b>1</b>		CH3	+1	1:1:1	8	16
<b>2</b>	0,3	CH3	+1	1:1:1	8	16
<b>3</b>		CH3	+1	1:1:1	0	16
<b>4</b>	0,3	CH3	+1	1:1:1	0	16
<b>5</b>		O2	0	1:1:1	30	30
<b>6</b>	0,3	O2	0	1:1:1	30	30
<b>7</b>	0,6	O2	0	1:1:1	30	30
<b>8</b>	0,6	O2	0	1:1:1	8	16
<b>10</b>	0,3	O2	0	1:1:1	8	16
<b>11</b>	0,3	N2	0	2:2:2	8	16
<b>13</b>		H	+1	1:1:1	0	16
<b>14</b>	0,3	H	+1	1:1:1	0	16
<b>15</b>	0,6	H	+1	1:1:1	0	16

Os valores de log MIC<sup>-1</sup> frente à *Candida albicans* foram calculados para os compostos dos grupos de treino, de teste e de validação externa utilizando a análise com maior significância estatística. As atividades biológicas calculadas foram comparadas com os valores descritos na literatura e os mapas de contorno das análises foram construídos.<sup>21,41,42,45</sup> O mesmo procedimento foi feito para a análise frente a *Cryptococcus neoformans*.

### Validação externa das análises de QSAR-2D e QSAR-3D

As análises foram validadas utilizando moléculas obtidas da literatura para os modelos de QSAR-2D e QSAR-3D frente a *C. albicans* e *C. neoformans*.<sup>41,42</sup>

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Geração da estrutura 3D

As estruturas geradas no *docking* foram comparadas com aquelas obtidas por cristalografia de raios X. O cálculo de RMS para as moléculas **3** (bis-isopropilfuramidina), **4** (bis-ciclopropilfuramidina), **7** (bis-ciclobutilfuramidina) e **11** (bis-ciclo-hexilfuramidina) são, respectivamente, 0,287; 0,320; 0,447 e 0,460. Observando os valores de RMS pode-se concluir que as estruturas dos ligantes obtidas no *docking* manual estão muito próximas da conformação dos ligantes na estrutura obtida por cristalografia de raios X.

### Estudos QSAR-2D frente ao fungo *Candida albicans*

A análise de correlação linear expressa numericamente o grau de associação entre as variáveis X e Y. Na análise de RML foi utilizado como variável dependente  $\log \text{MIC}^{-1}$  frente a *C. albicans* e como variável independente lipolo Componente Z. Obteve-se a seguinte equação:

$$\log \text{MIC}^{-1} = -0,414 (\pm 0,25) \text{ lipolo Componente Z} + 7,26 (\pm 0,021) \quad (1)$$

$$R^2=0,69 \quad Q^2=0,51 \quad n=9 \quad F=15,29 \quad s=0,257$$

O parâmetro lipolo é a medida da distribuição lipofílica na molécula e está relacionado com os grupos presentes na molécula em relação aos eixos X, Y e Z.<sup>56</sup> A Equação 1 indica que a atividade frente a *C. albicans* está correlacionada à distribuição lipofílica da molécula. Quanto menor é o valor desta distribuição maior será a atividade. Os valores de  $R^2$  e  $Q^2$  foram razoáveis, indicando que o parâmetro lipolo-componente Z descreve apenas parcialmente a

atividade biológica, apesar de ser o parâmetro isolado que descreve melhor a atividade biológica observada. A atividade biológica frente à *Candida albicans* dos compostos do grupo de treino e do grupo de teste foi calculada utilizando a Equação 1. Os resultados encontram-se na Tabela 3.

O comportamento do composto **8** do grupo de teste não foi explicado adequadamente pelo modelo obtido (% de erro > que 5%). As moléculas do grupo de validação externa não tiveram sua atividade explicada de forma adequada (erro  $\geq 5\%$ ). Isto pode ser explicado pelo fato de que essas moléculas são muito diferentes das moléculas do grupo de treino e, assim, seria necessário aumentar o número de moléculas com estruturas diferentes, de modo a ampliar o alcance do modelo obtido.

### Estudos QSAR-2D frente ao fungo *Cryptococcus neoformans*

Na análise de RML utilizando como variável dependente o  $\log \text{MIC}^{-1}$  frente ao fungo *Cryptococcus neoformans* e como variáveis independentes aquelas calculadas previamente com o programa Tsar versão 3.21, obteve-se a Equação 2:

$$\log \text{MIC}^{-1} = -0,366 (\pm 0,19) \text{ lipolo componente Z} - 1,332 (\pm 0,81) \text{ índice topológico Balaban} + 9,46 (\pm 0,90) \quad (2)$$

$$R^2=0,85 \quad Q^2=0,60 \quad n=9 \quad s=0,195 \quad F=17,197$$

Os coeficientes e/ou parâmetros da Equação 2 sugerem que quanto menor o parâmetro lipolo-componente Z e o parâmetro topológico de Balaban maior será a potência do composto frente ao fungo *C. neoformans*. O índice topológico de Balaban (J) reflete fortemente a ramificação molecular e muito pouco o tamanho molecular, sendo baseado na soma das distâncias de um átomo a outro na conformação da molécula e seu valor é dependente da conformação tridimensional.<sup>57,58</sup> Assim, segundo a Equação 2, será mais potente a molécula menos ramificada e menor ramificação (menor lipolo –componente Z).

Os valores de  $\log \text{MIC}^{-1}$  dos compostos dos grupos de treino, de teste e o de validação lateral foram calculados utilizando a Equação 2. Os resultados encontram-se na Tabela 4.

**Tabela 3.** Valores reais e calculados de  $\log \text{MIC}^{-1}$  frente a *Candida albicans* dos compostos bisbenzamidínicos dos grupos de treino, de teste e do grupo de validação externa utilizando análise de QSAR-2D

Grupo	Molécula	Lipolo-componente Z	$\log \text{MIC}^{-1}_{\text{real}}$	$\log \text{MIC}^{-1}_{\text{predito}}$	Resíduo	% erro
Treino	01	-0,13	7,68	7,31	0,37	4,82
Treino	02	0,02	7,49	7,25	0,24	3,20
Treino	03	-0,01	7,19	7,26	-0,07	0,97
Treino	04	0,22	7,19	7,17	0,02	0,28
Treino	05	-1,72	7,82	7,97	-0,15	1,92
Treino	10	0,47	6,65	7,06	-0,42	6,32
Treino	11	-0,22	7,57	7,35	0,22	2,91
Treino	12	-1,36	7,73	7,82	-0,09	1,16
Treino	13	1,02	6,73	6,84	-0,11	1,63
Teste	06	0,36	7,22	7,11	0,11	1,51
Teste	07	-0,49	7,82	7,46	0,36	4,57
Teste	08	0,36	7,5	7,11	0,39	5,19
Teste	09	1,02	6,6	6,84	-0,24	3,60
validação externa	14	0,37	8,05	7,11	0,94	11,72
validação externa	15	-1,57	6,66	7,91	-1,25	18,77
validação externa	16	-1,18	6,5	7,75	-1,25	19,21
validação externa	17	-0,07	9,22	7,29	1,93	20,94
validação externa	18	0,53	7,47	7,04	0,43	5,75
validação externa	19	-0,48	7,12	7,46	-0,34	4,76

**Tabela 4.** Valores reais e calculados de log MIC<sup>-1</sup> frente a *Cryptococcus neoformans* dos compostos bisbenzamidínicos dos grupos de treino, de teste e do grupo de validação externa utilizando análise de QSAR-2D

Grupo	Molécula	log MIC <sup>-1</sup> <sub>real</sub>	Lipolo-Z	Balaban	log MIC <sup>-1</sup> <sub>predito</sub>	Resíduo	%erro
Treino	03	7,79	-0,02	1,28	7,79	0	0
Treino	04	8,09	0,23	0,95	8,14	-0,04	0,49
Treino	05	8,73	-1,72	0,92	8,89	-0,16	1,83
Treino	07	8,73	-0,49	0,94	8,41	0,32	3,67
Treino	08	7,85	0,36	1,24	7,70	0,15	1,91
Treino	10	7,55	0,47	1,28	7,61	-0,06	0,79
Treino	11	8,48	-0,23	0,91	8,34	0,12	1,42
Treino	12	8,03	-1,36	1,40	8,12	0,09	1,12
Treino	13	7,74	1,02	0,86	7,97	-0,23	2,97
Teste	01	-0,130	1,289	7,39	7,72	-0,33	4,49
Teste	02	0,025	1,258	8,4	7,82	0,58	6,91
Teste	06	0,234	0,946	8,75	8,31	0,44	5,01
Teste	09	0,725	0,968	8,13	8,46	-0,33	4,08
validação externa	14	0,375	1,124	8,05	8,13	-0,08	0,95
validação externa	15	-1,567	1,113	7,56	7,43	0,13	1,72
validação externa	16	-1,181	1,389	7,40	7,20	0,20	2,65
validação externa	17	-0,065	1,289	8,30	7,75	0,55	6,68
validação externa	18	0,527	1,492	7,13	7,69	-0,56	7,88
validação externa	19	-0,480	1,363	8,02	7,49	0,53	6,55

**Tabela 5.** Resultados estatísticos da análise CoMFA frente ao fungo *Candida albicans*

Análise	Número ótimo de componentes	R <sup>2</sup>	Q <sup>2</sup>	s	F	Contribuição	
						Estéreoquímico	eletrostático
1	1	0,790	0,280	0,210	26,40	0,941	0,059
2	1	0,836	0,704	0,185	35,69	0,948	0,052
3	1	0,802	0,225	0,203	28,43	0,936	0,064
4	1	0,820	0,600	0,194	31,80	0,955	0,045
5	1	0,824	0,281	0,190	32,82	0,966	0,034
6	1	0,824	0,603	0,192	32,82	0,966	0,034
7	1	0,801	0,540	0,204	28,09	0,955	0,045
8	1	0,800	0,240	0,205	27,91	0,942	0,058
9	1	0,827	0,608	0,190	33,55	0,95	0,045

### Estudos de QSAR-3D frente ao fungo *Candida albicans*

Os resultados da análise por metodologia CoMFA encontram-se na Tabela 5.

As condições utilizadas na análise 2 (Tabela 2) foram as que levaram aos melhores resultados estatísticos. Assim, foram calculados os valores de log MIC<sup>-1</sup> para os compostos dos grupos de treino, de teste e do grupo de moléculas utilizadas na validação externa. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 6.

Adicionalmente, os mapas de contorno utilizando-se as condições da citada análise 2 (Tabela 2) foram construídos (Figura 2). As áreas vermelhas são regiões onde grupos com um potencial eletrostático negativo levam ao aumento da potência e as áreas azuis são regiões onde grupos com potencial eletrostático positivo levam a um aumento da potência. As áreas verdes são regiões onde grupos volumosos são favoráveis (maior potência) e as áreas amarelas onde grupos volumosos são indesejáveis, pois diminuem a potência.

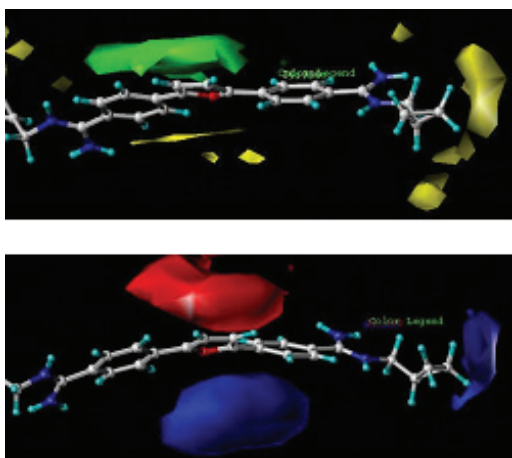
A análise de QSAR-3D indica que o fator estereoquímico é um fator importante para a atividade biológica frente ao fungo *Candida albicans*. A presença de grupos muito volumosos no grupo amidínico diminui a potência. O grupo carregado positivamente também é importante para a atividade biológica, o que está de acordo com as

**Tabela 6.** Valores calculados de log MIC<sup>-1</sup> para os compostos do grupo de treino frente a *Candida albicans* utilizando as condições da análise 2- CoMFA

Grupo	Molécula	log MIC <sup>-1</sup> <sub>real</sub>	log MIC <sup>-1</sup> <sub>predito</sub>	Resíduo	%erro
treino	01	7,68	7,64	-0,04	0,52
treino	02	7,49	7,29	-0,2	2,67
treino	03	7,19	7,23	0,04	0,56
treino	04	7,19	7,46	0,27	3,76
treino	05	7,82	7,65	-0,17	2,17
treino	10	6,65	6,72	0,07	1,05
treino	11	7,57	7,31	-0,26	3,43
treino	12	7,73	7,92	0,19	2,46
treino	13	6,73	6,83	0,1	1,49
teste	06	7,22	7,17	-0,35	4,65
teste	07	7,82	7,41	-0,41	5,24
teste	08	7,5	7,36	-0,14	1,87
validação externa	14	8,05	7,42	-0,63	7,83
validação externa	15	6,66	7,41	0,75	11,26
validação externa	16	6,5	7,87	1,38	21,26
validação externa	17	9,22	7,55	-1,66	18,02
validação externa	18	7,47	7,66	0,22	2,96
validação externa	19	7,12	7,49	0,37	5,20

**Tabela 7.** Resultados da análise CoMFA frente a *Cryptococcus neoformans*

Análise	R <sup>2</sup>	Q <sup>2</sup>	Nº ótimo de componentes	N	F	s	contribuição	
							Estéreoquímico	Eletrostático
Análise 3	0,987	0,582	2	10	264,9	0,058	0,950	0,050
Análise 7	0,990	0,710	2	10	336,7	0,052	0,950	0,050
Análise 8	0,998	0,808	2	10	278,3	0,057	0,979	0,021
Análise 4	0,958	0,623	1	10	79,09	0,105	0,948	0,052
Análise 14	0,794	0,474	1	10	30,899	0,216	0	1
Análise 15	0,934	0,523	2	10	49,560	0,131	0	1

**Figura 2.** Mapas de contorno frente ao fungo *Candida albicans*. Sonda O2 carga 0

informações da literatura.<sup>25,26</sup> Como observado na análise de QSAR-2D, as moléculas do grupo de validação externa não foram bem explicadas pelo modelo (erro > 5%). Isto pode ser explicado pela pequena variação estrutural do grupo de treino.

### Estudos QSAR-3D frente ao fungo *Cryptococcus neoformans*

Os resultados da análise do CoMFA frente a *Cryptococcus neoformans* encontram-se na Tabela 7.

Utilizando as condições da análise 8 (Tabela 3), obtiveram-se os melhores resultados estatísticos e foram calculados os valores de log MIC<sup>-1</sup> para os compostos do grupo de treino, para o grupo de teste e para o grupo de moléculas utilizadas na validação externa. Os resultados encontram-se na Tabela 8.

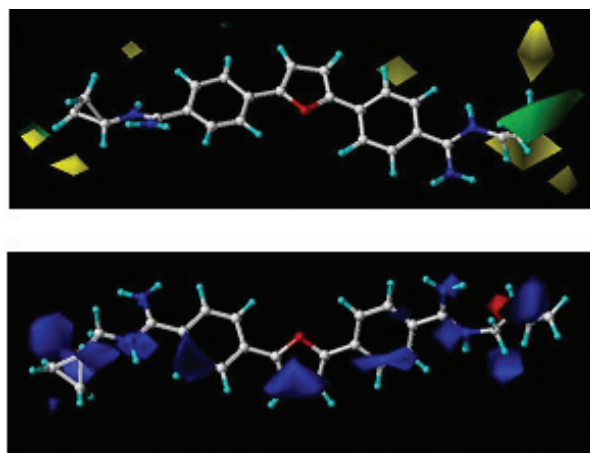
Os mapas de contorno foram construídos (Figura 3) também se utilizando as condições descritas na análise 8 (Tabela 3). Nas áreas vermelhas mostram-se regiões onde um potencial eletrostático negativo é favorável para a atividade e nas áreas azuis são desfavoráveis para a atividade (ou seja, menor potência). As áreas verdes são regiões onde grupos volumosos são favoráveis (maior potência) e as áreas amarelas onde grupos volumosos são indesejáveis, pois diminuem a potência.

A análise do CoMFA está de acordo com a análise de QSAR-2D, uma vez que nas duas análises o parâmetro estereoquímico foi importante para a descrição da atividade biológica. Na análise do CoMFA a presença de grupos volumosos no grupo amidínico é desfavorável para a atividade biológica.

Como todas as moléculas do banco de dados são carregadas positivamente, o mapa eletrostático gerado não foi muito útil para a predição da atividade biológica. No entanto, o potencial positivo no anel furânico pode indicar a possibilidade de ligação de hidrogênio com os grupos fosfatos, carregados negativamente, presentes na parte externa da fenda do B-DNA.<sup>59</sup>

**Tabela 8.** Valores calculados de log MIC<sup>-1</sup> para os compostos do grupo de treino, do grupo de teste e validação externa frente a *Cryptococcus neoformans* utilizando as condições da análise 8- CoMFA

Grupo	Molécula	log MIC <sup>-1</sup> <sub>real</sub>	log MIC <sup>-1</sup> <sub>predito</sub>	Resíduo	%erro
treino	02	8,4	8,37	0,03	0,30
treino	03	7,79	7,87	0,08	1,01
treino	04	8,81	8,88	0,07	0,83
treino	05	8,73	8,62	0,11	1,23
treino	07	8,73	8,72	0,01	0,10
treino	08	7,85	7,84	0,01	0,17
treino	10	7,55	7,60	0,05	0,61
treino	11	8,48	8,46	0,02	0,25
treino	12	8,03	8,18	0,15	1,85
Teste	01	7,39	7,92	0,53	6,67
Teste	06	8,13	7,56	0,57	7,61
Teste	09	7,74	8,24	0,50	6,04
validação externa	14	8,05	7,61	0,44	5,75
validação externa	15	7,56	8,18	0,62	7,62
validação externa	16	7,4	8,18	0,78	9,56
validação externa	17	8,3	7,77	0,53	6,79
validação externa	18	7,13	8,07	0,94	11,64
validação externa	19	8,02	8,07	0,05	0,60

**Figura 3.** Mapas de contorno frente ao fungo *Cryptococcus neoformans* Sonda CH<sub>3</sub><sup>+1</sup>

### CONCLUSÕES

Um dos problemas da análise de QSAR é a escolha da conformação a ser utilizada. Normalmente, a conformação do ligante escolhida é aquela observada na estrutura de raios X no complexo ligante-alvo biológico, no entanto, muitas vezes não temos esta estrutura de todos os ligantes no complexo. O *docking* manual mostrou ser uma técnica

adequada para se obter a conformação semelhante àquela observada pela cristalografia de raios X, uma vez que as estruturas dos ligantes testados obtidas no *docking* manual estão muito próximas da conformação dos ligantes na estrutura de raios X.

As análises de QSAR-2D e QSAR-3D permitiram inferir que os parâmetros estereoquímicos e lipofílicos são importantes para a atividade biológica frente à *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*.

As análises de QSAR-2D indicaram que a atividade frente à *Candida albicans* está correlacionada à distribuição lipofílica da molécula. No entanto, este parâmetro isolado não explica de forma adequada a atividade biológica observada. O parâmetro lipofílico está relacionado com as características farmacodinâmicas necessárias à absorção. A equação obtida da análise de QSAR-2D frente ao fungo *Cryptococcus neoformans* indica que a distribuição lipofílica na molécula e a ramificação presente são importantes para a atividade biológica. Quanto menor o valor do lipolo-componente Z e quanto menos ramificada for a molécula e menor for esta ramificação, mais potente será a molécula.

As análises de QSAR-3D mostraram que o fator estereoquímico também é um fator importante para a atividade frente aos dois fungos. A presença de grupos muito volumosos no grupo amidínico diminui a potência dos compostos bis-benzamidínicos. Isto já era esperado, uma vez que estudos prévios de modelagem molecular e relação estrutura-atividade utilizando compostos amidínicos indicam a importância da estrutura isoélica à fenda menor do B-DNA destes compostos para a interação.

## AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG (CEX PPM III 0207/09, PRONEX EDT 479/07), CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L.; *Microbiologia*, 6ª ed., ArtMed: Porto Alegre, 2000.
- Lacaz, C. S.; Porto, E.; Martins, J. E. C.; Heins-Vaccari, E. M.; Melo, N. T.; *Tratado de Micologia Médica Lacaz*, 9ª ed., Sarvier: São Paulo, 2001.
- Harbarth, S.; Samore, M. H.; *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 794.
- McGowan, J. E.; Tenover, F. C.; *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 251.
- Anaissie, E.; *Clin. Infect. Dis.* **1992**, *14*, S43.
- Hadley, S.; Karchmer, A. W.; *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **1995**, *9*, 1045.
- Sundriyal, S.; Sharma, R. K.; Jain, R.; *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 1321.
- Perfect, J. R.; Marr, K. A.; Walsh, T. J.; Greenberg, R. N.; DuPont, B.; De la Torre-Cisneros, J.; Just-Nubling, G.; Schlamm, H. T.; Lutsar, I.; Espinel-Ingroff, A.; Johnson, E.; *Clin. Infect. Dis.* **2003**, *36*, 1122.
- Espinel-Ingroff, A.; *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 954.
- Pfaller, M. A.; Diekema, D. J.; *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 4419.
- Walsh, T. J.; Petraitis, V.; Petraitiene, R.; Field-Ridley, A.; Sutton, D.; Mahmoud, G.; Tin, S.; Schaufele, R.; Peter, J.; Bacher, J.; Casler, H.; Armstrong, D.; Espinel-Ingroff, A.; Rinaldi, M. G.; Lyman, C. A.; *J. Infec. Dis.* **2003**, *188*, 305.
- Gurgui, M.; Munoz, P.; *Enf. Infect. Microbiol. Clin.* **2007**, *25*, 587.
- Del Palacio, A.; Alhambra, A.; Cuetara, M. S.; Ponton J.; *Rev. Iberoam. Micol.* **2007**, *24*, 187.
- Marques, M. B.; *Cadernos de Saúde Pública* **1995**, *11*, 361.
- Colombo, A. L.; Guimarães, T.; *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2003**, *36*, 599.
- Scorzoni, L.; Benaducci, T.; Almeida, A. M. F.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Gianinni, M. J. S.; *Braz. J. Microbiol.* **2007**, *38*, 391.
- Gonzalez, C. E.; Venzon, D.; Lee, S.; Mueller, B. U.; Pizzo, P. A.; Walsh, T.; *J. Clin. Infect. Dis.* **1996**, *23*, 515.
- Wilson, W. D.; Tanious, F. A.; Mathis, A.; Tevis, D.; Hall, J. E.; Boykin, D. W.; *Biochimie* **2008**, *90*, 999.
- Athri, P.; Wenzler, T.; Ruiz, P.; Brun, R.; Boykin, D. W.; Tidwell, R.; Wilson, W. D.; *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3144.
- Kuryshv, Y. A.; Ficker, E.; Wang, L.; Hawryluk, P.; Dennis, A. T.; Wible, B. A.; Brown, A. M.; Kang, J.; Chen, X. L.; Sawamura, K.; Reynolds W.; Rampe, D.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *312*, 316.
- Tidwell, R. R.; Jones, S. K.; Naiman, N. A.; Berger, L. C.; Brake, W. B.; Dystra, C. C.; Hall, J. E.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 1713.
- Lombardy, R. L.; Tanious, F. A.; Ramachandran, R.; Tidwell, R. R.; Wilson, W. W.; *J. Med. Chem.* **1996**, *34*, 1452.
- Edwards, K. J.; Jenkins, T. C.; Neidle, S.; *Biochemistry* **1992**, *31*, 7104.
- Hall, J. E.; Kerrigan, J. E.; Ramachandran, K.; Bender, B. C.; Stanko, J. P.; Jones, S. K.; Patrick, D. A.; Tidwell, R. R.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 666.
- Boykin, D. W.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *13*, 763.
- Nguyen, B.; Hamelberg, D.; Bailly, C.; Colson, P.; Stanek, J.; Brun, R.; *Biophys. J.* **2004**, *88*, 1028.
- Neidle, S.; *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 291.
- Montanari, C. A.; Trent, J. O.; Jenkins, T. C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1998**, *9*, 175.
- Oliveira, A. M.; Custódio, F. B.; Donnici, C. L.; Montanari, C. A.; *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 141.
- Campbell, N. H.; Evans, D.; Lee, M. P. H.; Parkinson, G. N.; Neidle, S.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5.
- Montanari, C. A.; Tute, M. S.; Beezer, A. E.; Mitchell, J. C.; *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1996**, *10*, 67.
- Keseru, G.; Makaro, G. M.; *Drug Discovery Today* **2006**, *11*, 741.
- Ferreira, M. M. C.; Montanari, C. A.; Gáudio, A. C.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 439.
- Correia, P. R. M.; Ferreira, M. M. C.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 481.
- Gáudio, A.; Zandonade, E.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 658.
- Del Poeta, M.; Schell, W. A.; Dykstra, C. C.; Jones, S. K.; Tidwell, R. R.; Kumar, A.; Boykin, D. W.; Perfect, J. R.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 2503.
- Del Poeta, M.; Schell, W. A.; Dykstra, C. C.; Jones, S. K.; Tidwell, R. R.; Czamy, A.; Bajic, M.; Kumar, A.; Boykin, D. W.; Perfect, J. R.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 2495.
- SYBYL 6.7 ed, SYBYL molecular modeling software*; Tripos Associates Ltd., St Louis, 2000.
- Muegge, I.; Oloff, S.; *Drug discovery today: technologies* **2006**, *3*, 405.
- Cramer, R. D.; Patterson, D. E.; Bunce, J. D.; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5959.
- Golbraikh, A.; Bernard, P.; Chretien, J. R.; *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 123.
- Jayatilleke, P. P. N.; Nair, A. C.; Zauhar, R.; Welsh, W. J.; *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4446.
- Boykin, D. W.; Kumar, A.; Xiao, G. E.; Wilson, W. D.; Bender, B. C.; McCurdy, D. R.; Hall, J. E.; Tidwell, R. R.; *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 124.
- Dykstra, C. C.; McClernon, D. R.; Elwell, L. P.; Tidwell, R. R.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 1890.
- Hopkins, K. T.; Wilson, W. D.; Bender, B. C.; McMudy, D. R.; Hall, J. E.; Tidwell, R. R.; Kumar, A.; Bajic, M.; Boykin, D. W.; *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3872.
- MOPAC v. 7.0*; University of Indiana, Bloomington, USA, IN 47405.
- Rocha, R. K.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 1998.
- MacroModel v. 5.5*; Department of Chemistry, Columbia University, New York, USA, 10027.
- Weiner, S. J.; Kolman, P. A.; Care, D. A.; Singh, V. C.; Ghio, C.; Alagon, G.; Profeta, S.; Weiner, P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 765.

50. Dewar, M. J. S.; Thiel, W.; *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 4899.
51. Evans, D.; Neidle, S.; *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4232.
52. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, acessada em Maio 2005 e Junho 2010.
53. *Biosym Technologies. Insight II Version 2.3.0 User Guide, Part 1*; Biosym, San Diego, USA, 1995.
54. *Tsar 3.21, Reference Guide*, Oxford Molecular Limited, Accelrys, 2000.
55. Kubinyi, H.; *The Regression Analysis: Program BILIN*, disponível em <http://www.kubinyi.de/bilin-program.html>, acessada em Junho 2009.
56. Pedretti, A.; Villa L.; Vistoli, G.; *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1460.
57. Montanari, C. A.; Cass, Q. B.; Tiritan, M. E.; Souza, A. L. S. S.; *Anal. Chim. Acta* **2000**, *419*, 93.
58. Balaban, A. T.; *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *89*, 399.
59. Wang, H.; Laughton, C. A.; *Methods* **2007**, *42*, 196.