



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesinas de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Licenciatura en Ciencias Químicas**

**Diseño de un Modelo de Interacción de
Benzodiazepinas y Flavonoides con acción
Ansiolítica derivado de su Análisis QSAR**

Nº 212

Nicolás Spegazzini

Tutor: Jorge L. Martiarena

Departamento de Investigación
Septiembre 2007

A mis Padres
A la memoria de Matilde y Juan Ramón Couchet

Agradecimientos

Al Dr. Jorge Luis Martiarena, por guiar mis pasos en la investigación, por su gran afecto y por ser un modelo de científico y maestro a quien respeto y admiro.

Al Dr. Marcelo Vernengo, a la Dra. Cecilia Di Risio, a la Lic. Vanina Di Silvestre y a mis profesores.

A la Lic. Liliana D´Huicque por abrirme las puertas, y seguir mis estudios en España.

A Valeria Urrutipi, por estar siempre ahí cuando la necesité.

A Silvio Rodríguez por siempre tenderme una mano.

A mis hermanos Laura y Eloy, mis tíos, por apoyarme en todo momento.

A todos los amigos, Ale, Sergio, Jorge, July, Sabri, Mariana, Eugenio, Fabián y Cristian.

Any alternative viewpoint with a different emphasis leads to an inequivalent description. There is only one reality but there are many viewpoints. It would be very narrowminded to use only one: we have to learn to be able to imagine several.

Hans Primas

In: Chemistry, Quantum Mechanics and Reductionism
(Springer- Verlag, 1981)

A molecular descriptor can be thought of as a mythological animal having several different meanings which depend on one's point of view.

Roberto Todeschini

Handbook of Molecular descriptors

August, 2000

Conoce a tu enemigo, concóctete a ti mismo, y tu victoria no estará nunca en peligro. Conoce el terreno, conoce las condiciones climáticas y tu victoria será completa.

Sun Tzu

El Arte de la Guerra. 500 a. C.

Resumen

Las benzodiazepinas son sustancias sintéticas ampliamente utilizadas en la práctica clínica para tratar la ansiedad, producir relajación muscular e inducción del sueño. Su mecanismo de acción más conocido es la unión de estas moléculas al sitio benzodiazepínico del receptor GABA_A – post – sináptico neuronal con apertura del canal de cloruro.

Los trabajos de Paladini y col. basados en publicaciones anteriores, demostraron que ciertos flavonoides naturales como la 5,7 – dihidroxiflavona y otros análogos se unían de manera selectiva y presentaban afinidad por el receptor GABA_A y en función de su sitio de unión exhibían interesantes propiedades ansiolíticas en común con las BZD, sin presentar relajación muscular ni hipnosis. Este hallazgo impulsó la síntesis de numerosos análogos a partir de compuestos naturales con el objeto de obtener drogas más potentes y seguras.

El presente estudio sugiere una estructura tridimensional del farmacóforo de flavonoides desde una óptica diferente. Los resultados de los cálculos de QSAR indican descripciones tridimensionales, dado por los parámetros ClogP, TPSA, RDF, Qzxp, que definen la distribución de los átomos en el espacio del entorno del receptor. Como lo describe el descriptor RDF y ClogP, mientras que los Qzxp o Qxxm indican la formación de más de un probable dipolo.

La zona lipofílica que engloban los halógenos en posición 6 de los flavonoides o en la posición 7 de las BZDs como así también los grupos metilos de ciertos derivados, adoptaría la forma de una semiesfera.

Ambos grupos carbonilos, en posición 2 y 4 de BZDs y flavonoides respectivamente, interactuarían con el sitio H1 del modelo refinado de Cook.

La forma molecular es la propiedad que mejor define la estructura tridimensional del receptor debido a que las BZDs presentan un plegamiento en su anillo 1,4-diazepínico adquiriendo forma angular, mientras que la forma de los flavonoides es extendida pudiendo sugerir subsitios distintos que a su vez indican la acción de agonista parcial de los flavonoides.

Esta diferencia explicaría la actividad ansiolítica de los flavonoides sin relajación muscular ni hipnosis, diferenciándose así de las BZDs, ya que el anillo B de los flavonoides interactuaría en el sitio LDI, en el cual no interactúa el anillo C de las BZDs.

En este estudio el análisis QSAR, también propondría una interacción hidrofóbica con aminoácidos hidrofóbicos, para explicar el incremento notable del $-\log K_i$ producido por el grupo NO₂ en posición 3'.

Índice

1. Introducción.....	10
2. Objetivo	34
3. Materiales y Métodos	34
4. Resultados y Discusión	37
5. Conclusiones.....	46
6. Anexo.....	47
7. Referencias Bibliográficas.....	52

1. Introducción

Diseño de Fármacos

Pasado y Presente

Desde el comienzo de los tiempos el hombre se ha empeñado en encontrar cura y tratamiento a sus males, de esta manera comenzó a volcarse a la exploración de vegetales, minerales y animales como fuente de soluciones, al principio mágicas y pseudo-empíricas (Papiro Hebers, Egipto), que gradualmente se transformaron más y más racionales y ligadas al pensamiento y experimentación científica. Sin embargo, también se utilizaron como modo de conectarse con lo divino o simplemente para el alivio de malestares anímicos. Con relación a esto en "Pursuit of Intoxication" (Malcom, 1971) dice: "En casi todas partes del mundo el hombre ha encontrado plantas que contienen principios narcóticos y alucinógenos" de esta manera queda claro que un estudio realizado sobre Flavonoides y Benzodiazepinas con actividad ansiolítica contempla la primera parte de la aseveración de Malcom.

Los primeros indicios serios de la búsqueda y modificación de un compuesto con actividad biológica asociada, con potencial de corregir, tratar o prevenir patologías; es decir, con actividad farmacológica, se observa en el aislamiento de la Salicina (siglo XIX). Esta luego fue modificada químicamente para su introducción al mercado como Ácido Acetil Salicílico (1899); por la Farbenfabrik en Bayer, de Alemania. En el mismo año Meyer y Overton encuentran una fuerte correlación entre una propiedad Físico Química, el coeficiente de Participación y la actividad Biológica, delineando la definición de Droga de Acción Inespecífica, concepto luego tomado y desarrollado por otros investigadores.

Allí en Alemania también se observa la síntesis de análogos activos de Morfina en respuesta al embargo producido por la Segunda Guerra Mundial, hecho por el cual comienza una carrera de síntesis y ensayos, generando una respuesta de puesta a punto y desarrollo de nuevas metodologías de síntesis, valoración y ensayo o screening de compuestos químicos. Desde 1950 hasta la actualidad se han acrecentado metodologías de investigación y desarrollo como las siguientes:

- ◆ Química Biológica Molecular.
- ◆ Cristalografía de Rayos-X de Receptores y Drogas.
- ◆ Resonancia Magnética Nuclear, Inmunocromatografía.
- ◆ Ensayos de Radioligandos.
- ◆ Síntesis de Peptidos.
- ◆ Aislamiento y Clonado de Receptores.
- ◆ Química Cuántica y Computacional: síntesis de Fármacos cada vez más racional y dirigida.

Actualmente todas estas disciplina y metodologías se potencian e interrelacionan para obtener fármacos diseñados de manera racional, es decir, una vez conocida la patología en profundidad y dilucidados algunos o todos sus pasos metabólicos, enzimas o puntos de posible influencia química; se procede a sintetizar, con metodologías que ahora explicaré, toda una amplia serie de posibles fármacos los cuales pueden ser optimizados a partir de una estructura química ya conocida o desarrollados desde "cero".^{1,2}

Conceptos fundamentales

Metodología para el diseño y/u optimización de un "Líder" Farmacológico

Las primeras drogas dirigidas específicamente a un determinado Receptor fueron los Antagonistas Beta Adrenérgicos, en la década del ochenta, pero antes de ese momento los fármacos eran sintetizados y probados y recién allí comenzaba toda una serie de especulaciones en función de su respuesta biológica, es así que muchas veces se tenía el conocimiento empírico pero se carecía de la explicación farmacológica molecular de su mecanismo de acción.

Actualmente la Farmacología se encuentra en otra era, que podría simplificarse a como era la Farmacología Inversa³⁻⁶, donde se identifican los posibles genes implicados en las patologías, se expresa el Receptor o enzima, muchas veces en especies híbridas (ratones knock-out, E.coli, etc.) y luego se estudia el receptor, farmacología y sus posibles puntos de influencia química. Luego de esto, con toda esa información, se procede a encontrar el tipo de molécula para ejercer dicha influencia o modificación.

Desde otro punto de vista puede decirse que el diseño de Fármacos comprende dos grandes cosas:

1. –Datos Experimentales (Cristalografía, Constantes de Afinidad, Coeficientes de Partición, etc.
2. –Modelado Molecular de Receptores y Ligandos; y todos los datos derivados del manejo estratégico de estos dos puntos.

Tal vez lo más relevante es una explicación breve de determinados pasos y objetivos, a saber:

Estudio de Receptores, Búsqueda de Ligandos, Predicción Farmacofórica, Diseño y Fuentes de los Fármacos.

Estudios de Receptores

A partir de los años ochenta se unificaron e interrelacionaron datos y conceptos cristalográficos de receptores y sus ligandos, obteniéndose una clara divisoria entre los datos que pueden obtenerse cuando se tiene el trabajo de cristalografía y cuando esta no este presente.

- Cuando se tiene el receptor cristalizado con o sin ligando

A partir de estos datos experimentales se procede a modelar molecularmente (por medio de poderosos software), el sitio de unión y a buscarse posibles ligandos que allí se unirían, realizando estudios de Unión o Binding. Estos estudios arrojan básicamente dos tipos de resultado, Cálculo de Energía (Libre especialmente) y datos estructurales con su amplia gama de derivaciones estéricas, electrónicas, de dipolo, geométricas, lipofílicas, etc.

Todo esto redundando en más datos y fuertes puntos de partida para el paso siguiente, la síntesis orgánica de nuevas moléculas.

- Cuando no se tienen los datos de Cristalografía

Aquí la situación es más compleja volviéndose más fascinante, así, se comienza unos pasos más atrás para culminar de la misma manera que con la Cristalografía. Para ello sin estos datos, es de vital importancia crear un modelo del receptor (especialmente de sitio activo).

La metodología comienza cuando se seleccionan sustancias que se unan de manera selectiva y afin al Receptor a estudiar y por medio de superposición sucesivas en tres dimensiones de las estructuras, luego a partir de su análisis computacional y estadístico aparecen Zonas de Superposición Repetida las cuales marcan indicios firmes de ser subestructuras complementarias al receptor, por medio de índices topológicos, potenciales electrostáticos, coeficientes de orbitales moleculares, cargas atómicas parciales por citar unos pocos de alta cantidad de datos estudiados, calculados y obtenidos, los cuales diferencian Zonas de Contacto con el ligando (dadoras o aceptoras de hidrógenos y lipofílicas), Zonas Olvidadas de poca implicancia en la unión y Zonas Neutrales, de este modo y repitiendo este ciclo alta cantidad de veces se delinea el sitio activo de unión a ligando.⁷⁻⁹

La importancia de esto surge englobando todo estos estudios, los cuales dan una idea del **RECEPTÓFORO** (requisitos moleculares, electrónicos y estéricos del receptor, indispensables para la unión de ligandos con posible actividad biológica asociada), así luego con todos estos datos se construye el **FARMACÓFORO** (mínimo requerimiento estructural, estérico y electrónico, necesario para obtener una respuesta asociada) el cual sirve a su vez de template o molde para el diseño de moléculas farmacológicas o biológicamente útiles.⁶

Estas metodologías sin importar su punto de partida, son basadas en supuestos, provenientes de hipótesis creadas para explicar determinados fenómenos o datos teóricos y prácticos.

Así la Hipótesis de que determinado receptor une determinada cantidad y tipo de ligandos y que tiene una respuesta biológica característica frente a estos, sería la primera y general; y la complementariedad entre Receptor-Ligando descrita por numerosas propiedades entre receptofo-ro-famacoforo sería la segunda y puntual.

Esto sería deseable, de cumplirse siempre, pero la realidad (datos prácticos, ensayos in-vitro, in-vivo, etc.) muestra que hay desviaciones a veces muy importantes donde no solo a confirmación de la hipótesis no se observa, sino que por ejemplo se ven limitaciones como los valores anormalmente altos o bajos en los cálculos teóricos, o determinadas propiedades no tenidas en cuenta, barreras energéticas o energías de activación altísimas que dejan a los ligandos prácticamente obsoletos por no poder alcanzar su conformación activa dentro del receptor.

No deja de resultar interesante que los Flavonoides no solo que **NO** han pasado por todos estos pasos para ser sintetizados (a diferencia de las Benzodiazepinas, que lo han hecho, pero con posterioridad), sino que simplemente fueron sometidos a un aislamiento y posterior modificación como líderes.

Siendo un Líder Farmacológico o Cabeza de Serie toda droga que potencialmente muestra una actividad biológica adecuada para tratar una patología determinada; a partir de la cual pueden sintetizarse toda una serie de análogos con el fin de obtener un perfil Farmacocinético y/o Farmacodinámico mejorado.

En función de esto los líderes (drogas) pueden obtenerse a partir de diversas fuentes no excluyente, que son:

- ◆ Productos Naturales (Síntesis, Semisíntesis)
- ◆ Antiguas Drogas utilizadas en terapéutica o conocidas

- ◆ Librerías Combinatorias Químicas.
- ◆ Química Medicinal.
- ◆ Screenings de Fuentes Naturales y de amplias Bases de Datos.

Química Medicinal

La definición clásica es la siguiente:

Rama de la Química que se encarga del diseño, optimización y valoración farmacológica de moléculas bioactivas. Es un concepto amplio, y engloba a los próximos dos; ya que determinados análisis de Química Cuántica, Química Computacional, Cristalografía de Rayos-X, Relación Estructura Actividad Cuantitativa, Mapeo de Receptores (los cuales ya forman un apartado en la Química Medicinal); delimitan posibles estructuras con la actividad biológica buscada. Por lo que pueden buscarse moléculas iguales o parecidas en las Bases de Datos y una vez realizado el acercamiento, por los métodos de Librerías Combinatorias se sintetizan rápidamente, para ser luego biológicamente testeadas.

Búsqueda en Base de Datos:

La Industria Farmacéutica dispone de Amplias Bases de Datos, propias y públicas, donde se encuentran almacenadas millones de drogas en un lenguaje de lectura computacional que permite su representación como estructuras en tres dimensiones. La exploración se puede realizar, buscando subestructuras o fragmentos moleculares o por propiedades físico-químicas (se busca determinado rango de valores de lipofilidad, calor de formación, refractividad molar, HOMO, LUMO, Dipolo, Potencial de Ionización, etc.)

Así por uno u otro método las moléculas que se obtuvieron son agrupadas y luego ensayadas o modificadas químicamente.¹⁰

Librerías Combinatorias Químicas

Este es un procedimiento de síntesis Orgánica en serie y a alta velocidad, a partir de una estructura básica a la cual se le van uniendo diferentes sustituyentes en sendos pellets o hendiduras dentro de una cubeta, así estas reacciones orgánicas ocurren en fase sólida o líquida dependiendo del compuesto de partida y del de llegada, obteniéndose una cantidad de sustancia del orden de los nanogramos con las cuales ya pueden realizarse Screenings o testeos biológicos, para develar su utilidad como posibles fármacos o cabeza de serie.

A partir del alto número de compuestos sintetizados, al ser ensayados, surgen líderes los cuales otra vez son sometidos a diversas modificaciones estructurales siguiendo procesos iterativos que responden a metodologías racionales bien delineadas como los Árboles de Decisión de Topliss, Método Free-Wilson, etc. Estas metodologías en función de las señales positivas (por testeos biológicos paralelos) de los análogos sintetizados, van dirigiendo y ordenado de manera lógica las rutas sintéticas y el punto de detención. Esto puede aplicarse a nuevos compuestos a obtener (síntesis de Novo); a antiguas drogas, productos naturales y por supuesto a líderes farmacológicos.

Estas fuentes deben estar respaldadas por el conocimiento profundo de mecanismos patológicos bien conocidos, puntos de partida explícitos de síntesis química, posibles Targets o Blancos farmacológicos aislado en estructuras celulares, subcelulares o tisulares (Enzimas, Receptores, Canales Iónicos, ARN, ADN, etc.); y deben estar relacionados a bioensayos que puedan extrapolarse, por los menos parcialmente, a los humanos o a la especie que esté dirigido.¹¹

Esta introducción teórica de conceptos básicos en el diseño de Drogas muestra uno de los puntos importantes de los Flavonoides; saltan importantes pasos de diseño y son paradigmáticos en otros, mostrando aún así actividades farmacológicas posiblemente útiles.

Ampliando lo anterior, los Flavonoides:

- No fueron sometidos a Cristalografía de Rayos-X unidos al supuesto receptor farmacológico,
- No fueron encontrados por métodos de Búsqueda en Base de datos,
- Si fueron sintetizados por métodos de Librerías Combinatorias Químicas,
- Su fuente de obtención Si responde al apartado de productos naturales, funcionando estas moléculas como molde o temple para un posterior desarrollo de análogo más potentes.

Receptores

Se definen como Receptores a todo biopolímero (enzima, ácido nucleico, canal iónico, etc.) que fija un ligando o mensajero químico endógeno (hormonas, péptidos, aminos, autacoides, etc.) o exógenos (fármacos, tóxicos ambientales, aditivos alimentarios, etc.) de manera selectiva, afín, reversible y saturable para propagar un mensaje y al ser propagado producir una respuesta biológica de inhibición o estimulación.

De hecho esta afinidad y selectividad de fijación se debe a que las moléculas cumplen determinados requerimientos estructurales que permiten gran selectividad entre las múltiples poblaciones y subpoblaciones receptoriales. Esto nace con las experiencias Termodinámicas en la década del cuarenta de Ferguson, que realiza por primera vez la siguiente división entre fármacos:

- **Drogas de acción específica (Drogas Estructuralmente Específicas)**

Responden a la ley de acción de masa, dependiendo de determinados grupos funcionales y geometrías moleculares bien definidas para ejercer su acción. Esta acción es obtenida con dosis o cantidades de droga muy bajas ya que actúan sobre receptores.

- **Drogas de acción inespecífica (Drogas Estructuralmente inespecífica):**

Dependen de su saturación en la sangre o fluidos extracelulares, más que determinados grupos funcionales y geometrías moleculares. Las dosis para ejercer actividad biológica son muy superiores a las drogas de acción específica y en general son muy poco específicas en función de la selectividad y afinidad por receptores.¹²

De estas definiciones se desprende que al ser estructuras biológicas tan importantes e influenciadas tan importantes e influenciadas desde un punto de vista fisiológico y/o farmacológico, se han realizado y siguen realizando intensas investigaciones para develar sus mecanismos íntimos de acción y sus posibles sitios de modificación o modulación.

Entre esas metodologías y técnicas de estudio se encuentran:

- Cristalografía de Rayos-X con y sin ligando (exógeno o endógeno); la cual provee mucha información sobre el lugar exacto, forma y los tipos de unión del ligando a su receptor.
- Unión de Radioligandos.
- Modificación estructural del receptor; clivado de sus unidades estructurales y/o mutación de las mismas con posterior medición de su actividad biológica afinidad de unión de diferentes moléculas.
- Modelización del sitio activo del receptor por métodos computacionales, aquí cabe aclarar dos metodologías de estudio complementarias:
 - Estudios de binding o unión (donde se realizan complejos cálculos de energías de unión)
 - Estudios de superposición de Ligandos (con diferentes afinidades y respuestas biológicas); y posterior hipotetización del sitio activo.

Existen diferentes teorías para explicar el funcionamiento de los receptores, los cuales podrían clasificarse en Clásicas, Modernas y Supermodernas.

Teorías Clásicas

Teoría Ocupacional (Clark y Gaddum)

Estos dos investigadores basados en las experiencias previas de Ehrlich, Langley y Langmuir; en diferentes años; determinan que:

- Los receptores para una misma molécula son idénticos.
- A mayor número de receptores ocupados, mayor respuesta biológica o al fármaco.
- Es decir, responden a la ley de acción de masas.
- Define a moléculas que al unirse al receptor producen una respuesta como: AGONISTAS y a los que bloquean a la misma por unión y competición al mismo como: ANTAGONISTAS.

Teoría de Ariëns:

La teoría anterior fue modificada por Ariëns treinta años después, para poder explicar la existencia de AGONISTAS PARCIALES, a los que definió como entidades químicas que producen una acción agónica en el receptor. Pero sin que esta respuesta sea total (máxima), en comparación con otras moléculas con "normal" o mayor respuesta.

Así realiza una clara diferenciación entre afinidad (capacidad de unión) y actividad intrínseca o actividad biológica dada en simples números enteros.¹²

Teorías Modernas y Teorías Modernas Refinadas

Posteriormente Patton, engloba a las anteriores y conceptos reformulándolos de la siguiente manera:

- La respuesta biológica depende de la velocidad relativa de asociación-disociación de los ligandos al receptor.

En el año 1983 Black y Leff propusieron otra concepción muy importante en Farmacología; cuando se produce la unión ligando-receptor, puede traducirse en un mecanismo bioquímico de liberación de un segundo mensajero o **la apertura de un canal iónico**.

Actualmente otras definiciones fueron introducidas en los estudios de receptores y ligandos, las cuales pueden ser complementarias con las anteriores y sirven para explicar nuevos conceptos y mecanismos de acción desde otros modelos.¹³

Por lo tanto se ubica al receptor en dos estadíos diferentes, que fluctúan en un equilibrio metaestable:

- Conformación activa: corresponde al receptor ionofórico abierto o a una conformación productiva, la que generalmente produce las respuestas biológicas.
- Conformación inactiva: receptor ionofórico cerrado o conformación improductiva.

El receptor fluctúa entre un estado u otro de acuerdo al medio molecular en el cual esta inmerso y especialmente a la presencia de ligandos exógenos. Así en ausencia del fármaco predomina el estado improductivo, con un nivel basal muy bajo de actividad o conformación activa.

Por lo tanto una equidad química que desplace el equilibrio hacia la conformación activa será un Agonista y en función del grado de desplazamiento o inducción hacia ese estado será Parcial o Total. Así en esta misma línea de razonamiento otra entidad que no pueda diferenciar o desbalancear ese estado de equilibrio, será un Antagonista (sin tener en cuenta si es competitivo o no).

Por lo tanto, todo ligando que desplace ese equilibrio hacia las conformaciones cerradas o inactivas será aquel definido como AGONISTA INVERSO O ANTAGONISTA NEGATIVO, ya que inducirá una respuesta pero con una actividad intrínseca de valor negativo, ya que esta respuesta es contraria a la del AGONISTA.¹²

Así en la grafico 1, puede verse la acción de un agonista inverso como los derivados B-carbolínicos, surgidos de las investigaciones tempranas en torno al receptor benzodiazepínico. Dichos derivados lejos de inducir ansiólisis y sedación, producían ansiedad, miedo, temblores y convulsiones en animales de experimentación.^{13, 14}

Estos modelos son resueltos por poderosos programas de computación ya que dependen de estas herramientas por estar representados como complejos cúbicos ternarios, donde no solo están presentes los parámetros antes mencionados sino la capacidad de las drogas para inducir cambios conformacionales y la resistencia del receptor a estos cambios.¹⁵

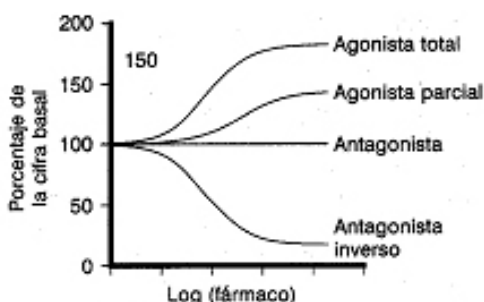


Gráfico 1

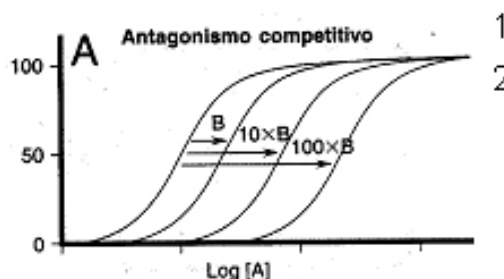
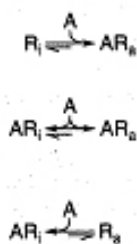


Gráfico 2

Esos modelos son de alta complejidad y por lo tanto una síntesis de todas estas Teorías se ve en los gráficos arriba representados, donde:

Grafico 1

Donde 1 es un agonista total y 2 es un agonista parcial. La curva 3 es un antagonista (no acción), y 4 son agonistas inversos parcial y total respectivamente.

Grafico 2

En el clásico gráfico de respuesta farmacológica en función del logaritmo de la concentración; se observa que la curva 1, es la que podría observarse cuando un ligando se une a su receptor, llegando a un máximo de respuesta. La curva 2 podría corresponderse a la unión de un ligando a su receptor cuando este previamente fue ocupado por un antagonista competitivo, el cual bloquea el sitio de unión y se necesita más concentración de ligando en el sitio para generar un desplazamiento químico del antagonista.

Receptor Farmacológico GABA_A

Estos son las estructuras modificadas por los ligandos, en el caso particular de los Receptores GABA_A, se los caracteriza como:

- Pertenecientes a la Superfamilia de Receptores asociados a canales iónicos¹⁶, SON RECEPTORES DE MEMBRANA Tipo 1, Ionofóricos (amplifican la señal. Unión de ligando por uniones no-covalentes, reversibles, presentando un flujo unidireccional de iones hacia el interior celular).*

- Forma de Receptor

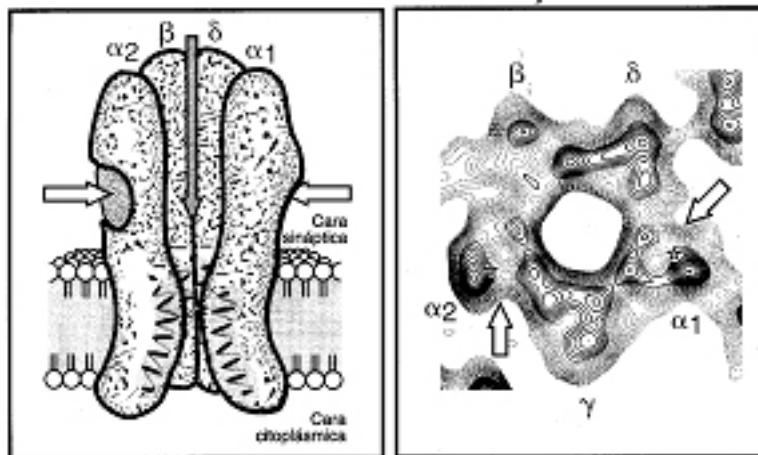


Figura - 1

Figura - 2

- Como muestra la figura 2, posee una morfología de cinco elementos estructurales llamadas subunidades, donde cada una posee cuatro segmentos de transmembrana¹⁶,
- Subunidades pertenecientes a cinco familias (α , β , γ , δ y ϵ); cada una con varias isoformas ($\alpha 1-6$; $\beta 1-4$; $\delta 1$; $\gamma 1-3$; $\epsilon 1$). Figura 1
- Divididos en Tipo I y Tipo II y BZD 1 y BZD2 de acuerdo a los ligandos que fijan y a su ubicación neuroanatómica.^{17, 18}
- Entre los dos puntos anteriores la posibilidad de combinación es altísima, sin embargo se observa una estequiometría repetida de 2 subunidades α , 1 β y 2 γ . En cuanto a las isoformas las más repetidas son $\alpha 1 \beta 2 \gamma 2$. (correspondiente al clásico Tipo I de receptores benzodiazepínicos) y las isoformas $\alpha 1 \beta 3 \gamma 2$ y 1β y $\alpha 5 \beta 3 \gamma 2$ (correspondientes a los receptores de benzodiazepina Tipo II).
- Absoluta heterogeneidad en la ubicación de estas isoformas en todo el SNC.
- Especificidad iónica al cloro, el cual al ingresar a la célula neuronal produce hiperpolarización por aumento de cargas negativas en el interior celular, lo cual induce una disminución de la irritabilidad e impulsos.
- Es un receptor Glicosilado de una masa molecular aproximada de 250 Kda.

Desde un enfoque macroscópico se encuentran en el SNC, en el Hígado, Plaquetas, Testículo, Útero.^{20, 21}

* Si bien es un receptor de membrana ionofórico habitualmente presentado como post-sináptico existe otro tipo de receptor denominado periférico, el cual se ubica en la membrana mitocondrial externa de las neuronas, y en las células de la glia (células de sostén y nutrición en íntimo contacto con las neuronas), por lo cual se lo denomina también mitocondrial, el cual viene siendo investigado intensamente desde su descubrimiento, a principios de los años ochenta; para tratar de entender su rol fisiológico, ya que se observa una fuerte correlación entre su ocupación y actividad antineoplásica o ansiolítica en animales de experimentación. Las células utilizadas como modelo farmacológico de acción gliales C6-2B.

Este receptor al ser ocupado por ligandos agonistas favorece la síntesis y/o ingreso de colesterol al interior mitocondrial, dicho colesterol es transformado enzimáticamente en neuroesteroides gabaérgicos (pregnenolona sulfato, dihidroxitestosterona sulfato, 3alfa hidroxí-5-alfa-pregnan-20-ona y 3-alfa-21-dihidroxi-5-alfa-pregnan-20-ona.); los cuales son transportados y almacenados en vesículas pre-sinápticas. Estas vesículas al ser liberadas a la hendidura sináptica, dejan libres a estos neuroesteroides los cuales se unen a la subunidad γ del receptor GABA_A favoreciendo el pasaje de iones cloro al interior neuronal, aumentando la hiperpolarización, amplificando la inhibición del neurotransmisor GABA sobre su blanco molecular.

Estos ligando agonistas deben cumplir con determinados requerimientos estructurales, los cuales son enumerados en la tabla 1:

Tabla 1:

Requerimientos estructurales mínimos de ligandos agonistas GABA mitocondriales
• Moléculas de tres anillos, dos de ellos fusionados
• Anillo aromático no fusionado y unido a estructura principal de dos anillos. Con posibilidad de adquirir diferentes grados de libertad y rotación
• Anillo aromático unido al anillo no aromático de siete átomos
• Grupo carbonílico atractor de protones
• Grupos hidrofobicos como: otros anillos aromáticos, cadenas amínicas cortas, halógenos y grupos nitro.

Importancia Terapéutica del manejo del Receptor GABA_A

Ansiedad

Es definida desde una visión Psiquiátrica, como una emoción normal o angustiante, diferenciándose una definición de otra solo por una cuestión de grado e intensidad de aparición y permanencia. Y cómo influencia la vida de un individuo. Es decir, la patología aparece cuando en vez de favorecer el comportamiento, lo interfiere y cuando la atención a dicha sensación de perturbación llega a niveles postrantes.

La ansiedad es la vivencia de un sentimiento de amenaza o de expectación tensa del futuro, muchas veces inmediato. Dicha amenaza puede ser real, irreal o simplemente desproporcionada y abarcar un amplio espectro de manifestaciones psicológicas como fisiológicas.

La base neuroanatómica y las principales estructuras implicadas en estos procesos son ubicados desde diversos modelos y teorías en el Cerebro; específicamente en el Sistema Límbico el cual es descrito como uno de los principales centro de placer y alarma que responde de tres maneras básicas: **aumento de atención**, o **aumento de impulsos de evitación** a estos estímulos amenazantes o evaluados como amenazantes; provenientes tanto desde el interior (vía visceral) o desde el exterior (vía Sensorial) y pueden ser patológicos o fisiológicos.

Dentro del Sistema Límbico existen estructuras anatómico-funcionales directamente implicadas en la ansiedad:

- El **complejo Septo-Hipocámpico** (el cual regula el sistema de inhibición de conducta por medio de vías reguladas por el neurotransmisor Acetil Colina).
- **Núcleo Central de la Amígdala** del cual parten numerosas proyecciones reguladoras hacia otros núcleos como el del **Rafe, Hipotálamo y Locus Coeruleus**, los cuales al ser estimuladas aportan gran parte de las manifestaciones de ansiedad y miedo.²²

Los principales sistemas de neurotransmisión son catalogados por:

- El neurotransmisor que sintetizan
- Elementos constitutivos (unidades neuroanatómicas funcionales) es decir las neuronas.

Neurotransmisores

La Farmacología define como neurotransmisor a las sustancias que son:

- Sintetizadas en la unidad anátomo-funciona del SNC (la neurona).
- Liberadas en el espacio intersináptico.
- Poseen unión a receptor post-sináptico iniciando una respuesta de estimulación o inhibición.
- Metabolizadas por enzimas en la biofase* intersináptica.
- Antagonizados por antagonistas del neurotransmisor.
- Si una molécula sintética con la misma identidad química es introducida en esta hendidura sináptica y/o unida al receptor post-sináptico; la respuesta biológica debe ser idéntica y gradual, dependiendo de la concentración del análogo químico.

*biofase: entorno molecular donde actúa una droga.

Neurotransmisor GABA

El neurotransmisor γ Amino Butírico (figura 3) es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC. Es sintetizado por medio de la enzima Glutamato descarboxilasa en las neuronas gabaérgicas a través de la descarboxilación del aminoácido Glutamato.

Este neurotransmisor, al ser liberado a la interfase sináptica, impacta sobre el receptor GABA_A, uniéndose a la subunidad β de dicho receptor, aumentando la conductancia del anión Cloro, produciendo hiperpolarización neuronal.

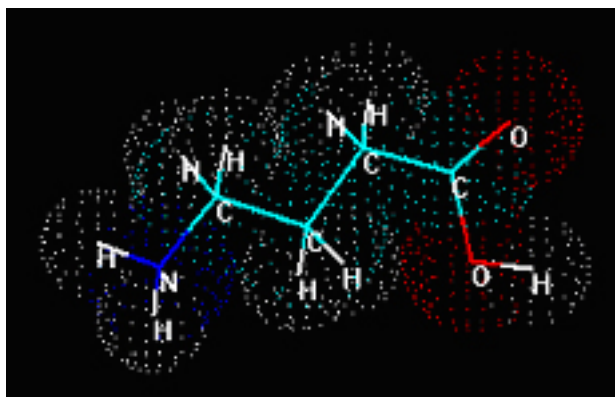


Figura 3 -Neurotransmisor GABA: estructura química en dos y tres dimensiones, minimización AM1 (se incluyen nubes electrónicas)

Así los sistemas de neurotransmisión con influencia moduladora directa a la génesis y expresión de los síntomas de ansiedad, son el sistema serotoninérgico, el noradrenérgico y el Complejo GABA_A Receptor-benzodiazepínico.²²

Este último **al ser estimulado inhibe** a los dos anteriores, lo cual trae aparejada la disminución de los estados de ansiedad y miedo. Esto es posible ya que ese tercio (30-50%) de los neurotransmisores del SNC son gabaérgicos y una pequeña influencia de este sistema produce una respuesta generalizada en numerosas vías, cuyo resultado final como antes se ha dicho, es la ansiólisis.

Definidas las ubicaciones y las respuestas biológicas de este receptor en particular; se explica el aprovechamiento de dichas respuestas en Farmacología Clínica.

Farmacología Molecular y Clínica

Gran variedad de agentes tienen la capacidad de deprimir las funciones del Sistema Nervioso Central, con la consecuente sedación o somnolencia.

Los fármacos sedantes e hipnóticos antiguos, deprimen el SNC de una manera dependiente de la dosis con producción progresiva de sedación, sueño, pérdida de conocimiento, anestesia, coma y depresión letal cardio-pulmonar.

Las propiedades estructurales y funcionales de las neuronas brindan un medio para especificar los posibles sitios en los que estos fármacos pueden interactuar de forma general o específica en el SNC.

Pero en general ejercen estas actividades al unirse al receptor GABA_A difiriendo en sus mecanismos y sitios de acción molecular.

Dentro de esta variedad de compuestos, pero con un extraordinario margen de seguridad, se encuentran las Benzodiazepinas, las cuales para ejercer sus efectos en el receptor GABA_A dependen de este neurotransmisor. De esta manera al tener una naturaleza de automodulación son ampliamente utilizadas en clínica para producir efectos sedantes, tranquilizantes y anticonvulsivos; pero sin deprimir el SNC como los compuestos químicos antes mencionados¹⁶.

Estos fármacos han sido ampliamente investigados y usados desde la introducción al mercado de la primera y segunda benzodiazepina de la Historia (Clordiazepoxido, bajo el nombre comercial de LIBRIUM; y el Diazepam, cuyo nombre comercial es Valium, entre otros).

Por lo tanto se conoce que el entorno molecular o biofase en el que actúan es el receptor GABA_A específicamente en la interfase de las subunidades α y γ ^{18, 19, 23} sin importar los subtipos de receptor, los cuales inicialmente fueron catalogados por métodos de radioligandos como BZD1 y BZD2 (cuando se usaban β -Carbolinas) y como Tipo I y Tipo II (al usarse Triazolopiridinas).

En estos últimos el Tipo I tiene asociados los efectos de ansiólisis y el Tipo II los efectos de sedación, sueño e hipnosis.^{17,22}

Como los Tipo I son los de mayor número en el SNC de mamíferos adultos, y tiene asociada la respuesta biológica generalmente en clínica, numerosos estudios se han llevado a cabo para encontrar y delinear el sitio activo o bolsillo receptorial en el cual este grupo de fármacos ingresa y actúa.¹⁹

De este modo y por estudios de mutagénesis y de delección selectiva de aminoácidos los fragmentos estructurales con mayor implicancia en el reconocimiento y unión de las Benzodiazepinas, en el receptor Tipo I, pueden verse en la siguiente Tabla 2:

Subunidad	Aminoácido	Posición o número
α 1	L-Histidina	101
	L-Tirosina	159
	L-Glutamina	200
	L-Treonina	206
γ 2	L-Fenilalanina	77
	L-Metionina	103

Tabla 2

Las BZDs al ingresar a su sitio activo en los receptores BZD₁nicos producen un aumento de la sensibilidad del receptor por su ligando natural (GABA), regulándolo de manera heterotrópica, amplificando la corriente de iones cloro al interior celular.

Los estudios electrofisiológicos in-Vitro realizados por Twyman y col. (1989) mostraron que la intensificación iónica inducida por BZDs en receptores GABA_A a dosis submáximas (no significativas para abrir los canales de cloruro), responde a un incremento de apertura de canales y no a una prolongación en la apertura de los mismos como las inducidas por los Barbitúricos. Asimismo los estudios cinéticos indican que el efecto en la apertura y cierre de canales, luego de fijarse el GABA son nulos o despreciables. Estas mediciones indican que las BZDs desplazan hacia la izquierda la curva de concentración y reacción del GABA, sin incrementar la corriente máxima de iones producida o evocada por este neurotransmisor. Todo lo anterior demuestra y explica a un nivel clínico el porque de la extraordinaria seguridad de las BZD, ya que la potencialidad de depresión neuronal que exhiben estas drogas, está autolimitada por su naturaleza dependiente de ligando endógeno GABA.

En consecuencia, para producir su efecto requieren la presencia de GABA, sugiriendo también que los efectos post-sinápticos directos de los fármacos que aquí actúen, requieren de una alta especificidad por los receptores y/o resistencia a la degradación metabólica.¹⁶

Estructura Química de las Benzodiazepinas

Benzodiazepina
(5-Aril-1,4-Benzodiazepina)

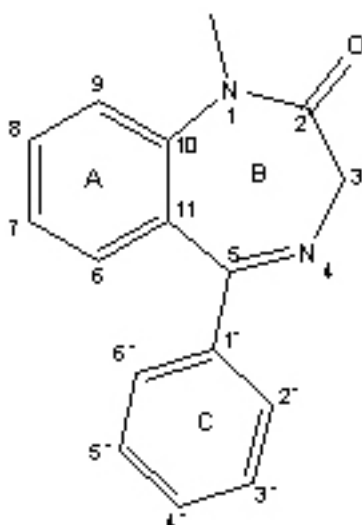


Figura 4

Como puede verse de una estructura central o básica con pequeñas variaciones estructurales pueden obtenerse toda una variedad de compuestos relacionados, pero con diferentes acciones farmacológicas.

Los usos clínicos de las benzodiazepinas se deben justamente a la ocupación de estos receptores del SNC; aunque como muchos autores indican, existe evidencia suficiente para afirmar que la mera ocupación de receptores GABA_A post-sinápticos no explica todas las respuestas farmacológicas observadas.^{17,21, 22}

Sin embargo investigaciones iniciales de Miller y Greenblat²⁴ demuestran que los modelos de respuesta farmacológica versus receptores ocupación de receptores son lo suficientemente acertados para explicar gran parte de dichas respuestas. Estos modelos correlacionan concentración plasmática de BZDs con las concentraciones en biofase; para luego determinar que a mayor ocupación receptorial se observan respuestas graduales y aditivas, por un agonista (verde), y respuestas graduales y aditivas pero de magnitud o efecto opuesto (Marron, Agonista Inverso).

Como se muestran en la siguiente figura 5:

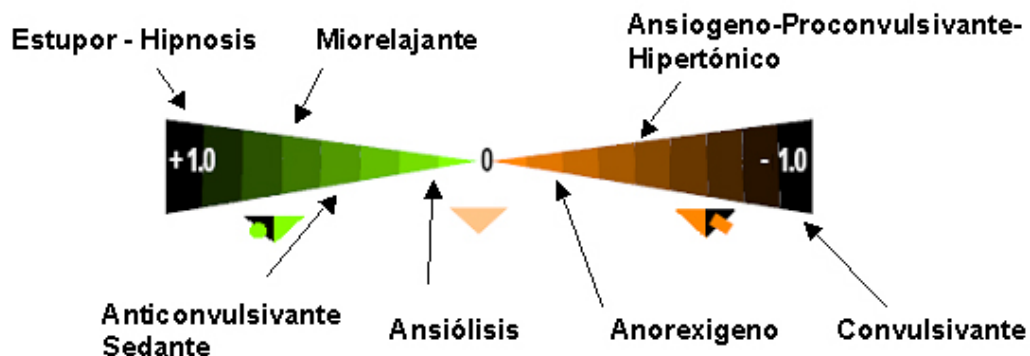


Figura - 5

La actividad biológica y/o farmacológica puede explicarse de acuerdo al siguiente esquema:

$$\Sigma \text{Rta. Biológica o Farmacológica Total} = \Sigma \text{Rtas Biológicas Parciales y locales}$$

Rtas. Parciales y locales = Σ Actividades de los Ligandos que allí actúan + Ocupación Receptorial + Receptores de reserva

Actividades de los Ligandos (endógenos y/o exógenos)= Función directa de la Estructura Química y Concentración en el sitio activo-

De los trabajos de diferentes autores^{18, 24, 25} y teniendo en cuenta el anterior esquema se desprende que el receptor BZDpínic ofrece tres niveles de complejidad, que permiten tres diferentes enfoques desde la siguiente óptica:

- Número de receptores de reserva (los que no están ocupados por ligandos o fármacos)
- Ubicación de Receptores por Agonistas Totales, Parciales, Antagonistas Inversos.
- ocupación de receptores por agonista totales, parciales, antagonistas y agonistas inversos.

Con respecto a estos puntos la clínica esta basada en la búsqueda de las respuestas totales o globales; pero la Farmacología Molecular y la Química Medicinal centran sus esfuerzos en dilucidar los mecanismos íntimos de acción y los requerimientos estructurales mínimos para la expresión de determinado tipo de acción.

En función de lo anterior se sabe que:

- Un Agonista Total exhibe una capacidad ansiolítica cuando entre el 20-30 % de la población total de receptores del SNC esta ocupada.
- A su vez un Agonista Parcial exhibe similar actividad al estar ocupado entre el 60-70% de los receptores totales.

Así, los agonistas totales permiten un margen pequeño en la manipulación de dosis, mostrando efectos secundarios con una pequeña variación de la dosis o del estado general del paciente.

Contrariamente los agonistas parciales, para llegar al porcentaje necesario de ocupación y actividad ansiolítica ofrecen mayor regulación de dosis. Así también, una difícil inducción de efectos secundarios como efectos sedantes, miorelajantes o de estupor e hipnosis.

Por lo tanto en función de lo anterior todo fármaco que sea agonista **total** o parcial del receptor de BZDs, puede en clínica o cuando menos en investigación, utilizarse para producir estos efectos:

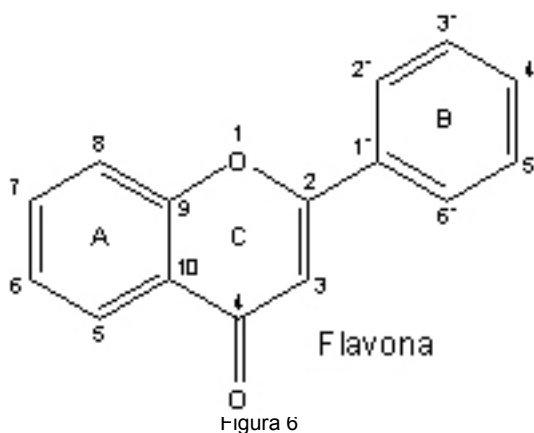
Efecto Farmacológico	Indicación terapéutica	Efectos secundarios
Ansiolítico	Trastornos de ansiedad	Indiferencia
Anticonvulsivo	Epilepsia-disritmias-intoxicaciones	Sueño-dificultad en el habla-Disturbios de la atención.
Músculo relajante	Tensión muscular-Espasticidad-Tétanos	Los anteriores + Debilidad muscular- Ataxia
Sedante e hipnótico	Disturbios del sueño-Medicación pre-anestésica	Depresión respiratoria + riesgo de muerte por incompatibilidad con alcohol

Tabla - 3

Las BZDs, como se ha visto antes **no** son las únicas entidades químicas que se unen al receptor GABAA- Benzodiazepínico. De hecho un amplio número de estructura de origen vegetal (Flavonoides), actualmente son investigadas intensamente por unirse a dicho receptor, y por mostrar un futuro promisorio como nuevos fitofármacos.²⁵

Flavonoides

Los Flavonoides que se encuentran tanto en estado libre como unido a una o varios azúcares (heterósido), constituyen el grupo más amplio de fenoles naturales, siendo este grupo uno de los más amplios metabolitos secundarios de plantas. Su estructura química está basada en la Benzo- γ -pirona (Cromona), que se encuentra sustituida en diferentes posiciones por un anillo fenilo, conformando una estructura Flavanica o Flavona, como se muestra en la siguiente figura 6:



Estructura Química de los Flavonoides estudiados

La ubicación en las plantas es ubicua, concentrándose en flores y tallos jóvenes²⁶, los Flavonoides corresponden al Grupo de las Flavonas.

Más de 5000 flavonoides han sido descritos y las propiedades biológicas y farmacológicas de ellos se agrupan en las siguientes categorías:

- Antiinflamatorios.
- Antioxidantes.
- Antihistamínicos.
- Diuréticos.
- Antitóxico Hepático.
- Inhibidores enzimáticos.
- Anticarcinogénico, Antiviral.

Durante varios años se desconocían las propiedades de unión de estos al receptor GABA_A hasta que los estudios de Paladín y col. (1986); guiados por los trabajos de diferentes autores sobre moléculas no benzodiazepínicas con afinidad de unión por receptores GABA; mostraron por estudios de desplazamiento de Flunitrazepam tritiado (radioligando), que los Flavonoides obtenidos de extractos de diferentes plantas se unían con alta afinidad a dichos receptores.

En la misma línea de trabajo fueron ensayados in Vitro, otra serie de ligandos naturales y sintéticos, obtenidos por métodos de **librerías combinatoriales químicas**. Se encontró que los Flavonoides naturales (5,7-dihydroxiflavona y 5, 7, 4`trihydroxiflavona) y los Flavonoides sintéticos (6-Bromoflavona y 6, 3`Dinitroflavona), exhibían interesantes propiedades ansiolíticas en varios modelos de ansiólisis. Con perfiles farmacológicos correspondientes a los de los **agonistas parciales**. Esto generó una intensa búsqueda de flavonoides activos por este y otros investigadores^{18, 23, 25, 28, 29, 30}.

Modelado del sitio activo del receptor GABA_A

Regiones

Para modelar e hipotetizar la región agonista del sitio activo del receptor GABA_A - Benzodiazepínico, post-sináptico, se discuten los siguientes conceptos descritos por los siguientes autores:

- No todos los ligandos para determinada región deben ser estructuralmente idénticos.
- Hay una similitud atómica y molecular.
- Las razones para la actividad biológica responden a más razones que las anteriores.
- Puede hipotetizarse el sitio activo del receptor en células humanas, a partir de ligandos estudiados en receptores de animales, ya que pese a ser especies diferentes dicho sitio no presenta grandes variaciones entre una especie y otra.
- Todas las BZDs presentan estructuras altamente similares.
- Las estructuras obtenidas por cristalografía de Rayos-X de los ligandos son casi idénticas a las conformaciones bioactivas (conformeros con máxima actividad biológica); por lo tanto las minimizaciones energéticas por métodos Semi- Empíricos son acertadas y extensamente utilizadas para obtener las estructuras en tres dimensiones unidas al receptor.³¹
- Los Flavonoides comparten una alta similitud estructural, de afinidad y de respuesta farmacológica con las BZDs. También poseen potenciales electrostáticos muy parecidos.^{25, 32}
- Los potenciales electrostáticos, los cuales miden los campos de fuerza electrostáticos de las moléculas, pueden utilizarse con alto valor predictivo en cuanto a equivalencia de unión receptoral, por lo tanto una comparación entre Flavonoides y BZDs no solo es factible sino altamente orientativa en como se ubican dentro del receptor^{32,33}.

Superposiciones moleculares de alto número de ligandos con la misma actividad farmacológica delinea el posible sitio activo, orientación y requerimientos estructurales regionales^{13, 14, 20, 21}

En función de esto último Cook y colaboradores, han construido un modelo de zonas y requerimientos estructurales mínimos, los cuales al ser ocupados permiten predecir de que manera un ligando posiblemente actúe y lo que es más importante, que actividad farmacológica poseerá. Este modelo es general y puede usarse para los receptores Tipo I y/o II.¹⁸ Posteriormente a estos trabajos Kahnberg y colaboradores refinaron el modelo de Cook, agregándole nuevos sitios.^{18*}

En este modelo refinado se observa qué moléculas estructuralmente muy similares actuando en el receptor GABA_A-Benzodiazepínico, pueden tener una alta variabilidad de respuestas biológicas. Esto se debe en parte a la modulación alostérica que ejercen estos ligandos dentro del receptor, estabilizando o favoreciendo determinada conformación por sobre otra, en el caso de los agonistas (BZDs y Flavonoides) (figura 7) y un *no* favorecimiento de conformación en el caso del antagonista.

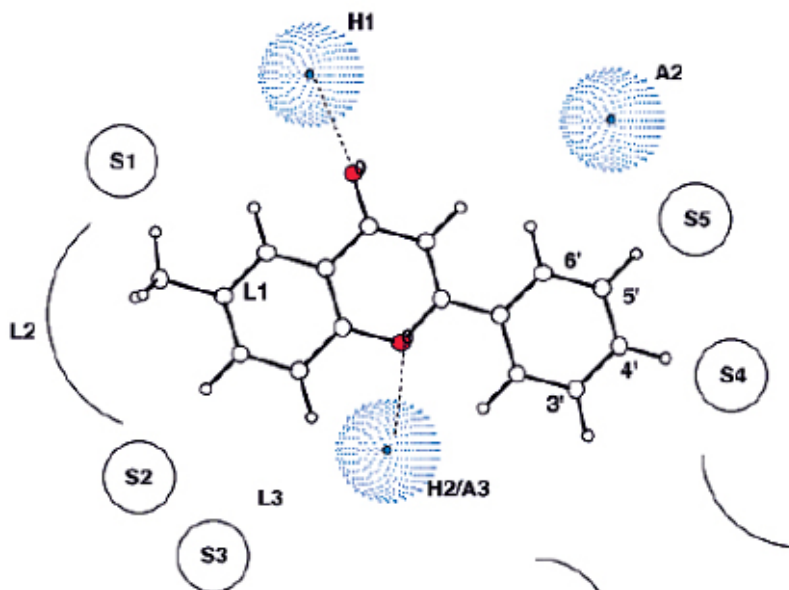


Figura 7 - Modelo refinado de Cook, donde se ajusta un flavonoide

El modelo refinado de Cook ha sido dividido en zonas las cuales poseen una respuesta biológica asociada al ser ocupadas, estas son:

- L1, L2, L3, LDi: Zonas Lipofílicas, las cuales unirán con alta afinidad fragmentos moleculares lipofílicos.
- A2: Zona aceptora de protones (producida por aminoácidos básicos).
- H1, H2/A3: Zonas dadoras de protones.
- S1, S2, S3, **S4**, **S5** (son sitios agregados por el refinamiento del modelo de Cook): Zonas prohibidas o de impedimento estérico.

De acuerdo entonces a este modelo un fármaco que ingrese al receptor y ocupe en mayor o menor medida determinadas regiones producirá lo siguiente:^{18,18*, 23, 32}

Zonas de ocupación	Actividad Farmacológica	Selectividad por receptor Tipo
L1, L2, L3, Ldi, H1, H2	Agonista	No selectivo
L1, L2, L3, Ldi ++ H1, H2	Agonista	Tipo I
L1, L2 ++ L3, Ldi, H1, H2	Agonista	Tipo II
A2, H1, L1	Agonista inverso	No selectivo
L1, H1, H2, A2	Antagonista	No selectivo

(El indicador ++, corresponde a más afinidad y/u ocupación zonal)

Tabla 4

Como las regiones **S** son las que delimitan al receptor, no forman parte del cuadro porque cualquier molécula que intente ingresar al receptor y entre en conflicto con estas zonas, estar especialmente impedida a establecer cualquier tipo de unión y no podrá ejercer ningún tipo de acción.

Las superposiciones de ligandos en el mismo sitio del receptor pero con diferentes arreglos espaciales fue hipotetizado y mencionado por diferentes autores, esto supone que cuanto más alta sea la homología regional y espacial entre moléculas superpuestas, más parecido será su mecanismo de acción y por lo tanto su respuesta biológica.^{18, 19}

Entonces, de esta manera, no queda más que sentar las bases para un estudio extratermodinámico, correlacionando la estructura química con la actividad farmacológica a través del análisis QSAR.

Qsar y 3DQsar en el diseño de drogas

La relación de estructura actividad cuantitativa correlaciona, dentro de una serie congénica de compuestos con afinidades de ligandos a su sitio de unión, constante de inhibición, tipos de constantes, y otras actividades biológicas, con cualquiera de los dos rasgos estructurales (análisis Free Wilson) o con propiedades moleculares, grupales, o atómicas tales como lipofilicidad, polarizabilidad, electrónicas y estéricas (análisis de Hansch)^{37,38,39}.

Si bien las relaciones entre la lipofilicidad y la actividad biológica inespecífica tales como narcóticas, bactericidas, hemolíticas, y tóxicas han tenido un giro en estos últimos cien años, a través de las publicaciones independientes del análisis de Hansch y el método de Free Wilson, nacidos en 1964, han marcado un hito en el desarrollo del QSAR (relación estructura actividad cuantitativa).

Desde entonces las ecuaciones de QSAR han tenido uso en la descripción de miles de compuestos con actividades biológicas dentro de diferentes series de drogas y drogas candidatas. Especialmente los datos de inhibición de enzimas han tenido una correlación exitosa con propiedades físico-químicas del ligando. En ciertos casos donde la estructura de rayos x de las proteínas están disponibles, los resultados de los modelos de regresión de QSAR podría ser interpretado con la información adicional dada por la estructura tridimensional (3D) del ligando³⁷⁻³⁹.

Después de un lento desarrollo del método de aproximación basado en grillas 3D QSAR, en 1988 el método de análisis molecular comparativo de campos de fuerza (CoMFA) fue publicado por Cramer et al.⁴⁰. Este método molecular basado en campos constituye el primer método real de 3D-QSAR. En los pasados últimos diez años, la aplicación de CoMFA ha tenido éxito en la investigación por estos métodos especialmente en el caso donde el método de QSAR clásico falla. En contraste con el análisis de Hansch o el de Free Wilson, CoMFA es mejor en el proceso de descripción de la interacción ligando-receptor, porque considera las propiedades de los ligandos en su supuesta conformación bioactiva. Como los resultados de análisis de CoMFA identifica regiones en el espacio que son favorables o desfavorables para la interacción entre el ligando y el receptor.

Relación estructura-actividad cuantitativa

Teoría QSAR

Todos los análisis por QSAR están basados sobre la aceptación de una contribución lineal aditiva de diferentes propiedades estructurales, físico-químicas o teóricas de un compuesto a una actividad biológica, lo que nos proporciona una dependencia lineal del transporte o una unión al receptor, de una propiedad fisicoquímica en particular. Esta simple aceptación esta probada por una función lineal que se utiliza como un concepto soporte para los análisis de Hansch y de Free Wilson⁴¹:

(1)

$\Delta G_0 = +5,4 \text{ KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	Perdida total de entropía por traslacional y rotacional
$\Delta G_{hb} = -4,7 \text{ KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	Unión hidrógeno neutral ideal
$\Delta G_{ionic} = -8,3 \text{ KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	Interacción iónica ideal
$\Delta G_{lipo} = -0,17 \text{ KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	Contacto lipofílico
$\Delta G_{rot} = +1,4 \text{ KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	Perdida de entropía por rotación de la unión del ligando

La ecuación (1) correlaciona energía libre de unión $\Delta G_{binding}$, con un termino constante, ΔG_0 , que describe la pérdida total en grados de libertad rotacionales y traslacionales ΔG_{hb} , ΔG_{ionic} y ΔG_{lipo} , que son términos de energía derivados de la estructura por interacciones de unión-hidrógeno cargada y neutrales e interacciones hidrofóbicas entre el ligando y la proteína; ΔG_{rot} describe la pérdida interna de los grados de libertad rotacionales del ligando. La ecuación uno contiene un amplio rango de valores de energía: el $\Delta G_{binding}$ de 45 diferentes uniones ligando-proteínas esta tiene un complejo rango desde -9 hasta -76 KJ mol⁻¹ correspondientes a un error promedio de alrededor de 1,4 unidades de logaritmo en la predicción de constantes de unión del ligando del modelo matemático⁸. Como la relación extratermodinámica es entre la energía libre ΔG y la constante de equilibrio K (ecuación 2).

$$\Delta G = -2,303 \cdot RT \log K = -2,303 \cdot RT \log \frac{k_{on}}{k_{off}} \quad (2)$$

o la constante k (k_{on} = constante de asociación, k_{off} = constante de disociación de la formación del complejo ligando-receptor), se pueden utilizar los logaritmos de estos valores y pueden ser correlacionados con la afinidad de la unión.

El logaritmo de la concentración molar C que produce un efecto biológico puede ser correlacionado con una característica de la molécula o por una propiedad físico-química que están relacionadas con la constante de equilibrio de la energía libre; normalmente se utiliza el logaritmo de la inversa de la concentración, $\log 1/C$, para obtener amplios valores de análogos más activos.

Vale entonces representar una destallada de descripción de los métodos análisis de QSAR:

Análisis de Hansch

Este método derivado de la fisicoquímica orgánica y de las ecuaciones de Hammett, puede ser considerado como la primera aproximación al estudio moderno de QSAR. propuesto por Hansch y colaboradores a mediados de 1960⁴¹⁻⁴⁸, en la investigación de la relación cuantitativa entre actividad biológica y una serie de compuestos y sus parámetros fisicoquímicos representados por efectos hidrofóbicos, electrónicos, estéricos y otros, usando métodos de regresión lineal multivariante.⁴⁹

El análisis de Hansch asume que la variación en la magnitud de cierta actividad biológica exhibida por una serie de compuestos bioactivos puede ser correlacionada con variaciones en diferentes factores fisicoquímicos asociados con su estructura. Por lo tanto, la ecuación básica del QSAR en el análisis de Hansch es definida por:

$$\text{Actividad biológica} = f(\Phi_1, \Phi_2, \dots, \Phi_j) \quad (3)$$

Donde Φ son propiedades fisicoquímicas de **compuestos congenéricos** que tienen un esqueleto en común pero varían sus sustituyentes. Junto con la mayoría de los parámetros importantes, factores como la unión hidrógeno, van der Waals y fuerzas de transferencias de cargas, etc. que pueden ser usados dependiendo de la situación.

La actividad biológica es usualmente definida como el $\log (1/C)$ donde C es la concentración molar de un compuesto medido a respuesta fija a dosis variable.

En análisis de Hansch trata de correlacionar la actividad biológica con propiedades fisicoquímicas por análisis de regresión lineal o no-lineal, a fin de encontrar modelos que relacionen actividades con propiedades. Para entender por ejemplo el mecanismo de interacción de una droga con el sitio de unión específico al receptor. (Figura 8)

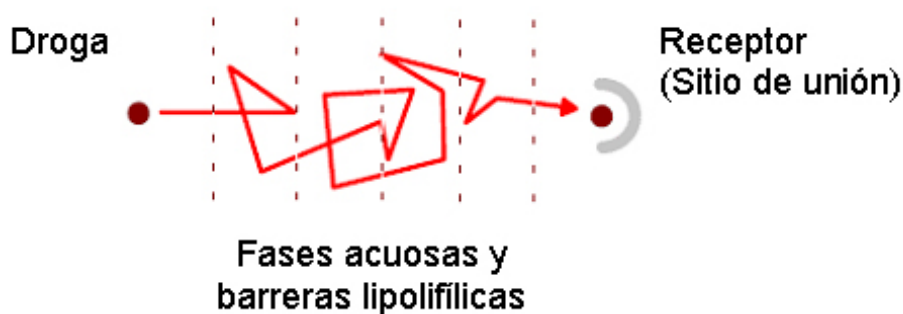


Figura -8

El análisis de Hansch sencillo está basado en el **modelo lineal de Hansch**⁵⁰. La ecuación esta definida por

$$\hat{y}_i = b_0 + \sum_{j=1}^J b_j \cdot \Phi_{ij} \quad (4)$$

Donde Φ_j representa la propiedades fisicoquímicas j del compuesto i , b_j son los coeficientes de regresión, y J es el número total de propiedades consideradas. La ordenada al origen b_0 corresponde a la actividad biológica teórica de un compuesto, cuyos valores de las propiedades son cero.

Esta condición es una aproximación total para un compuesto de referencia cuyos hidrógenos se hallan sustituidos y los valores de propiedades normalizadas a 0 dependiendo del coeficiente de regresión, algunos factores que no son relevantes si pueden serlo.

Las propiedades o parámetros fisicoquímicos utilizados en los modelos de QSAR clásico se pueden clasificar de forma general en tres grupos. En la actualidad se adosaron parámetros teóricos obtenidos por mecánica cuántica o aproximaciones matemáticas (Tabla 5):

- Electrónico
- Estérico
- Hidrofóbico

Idealmente los parámetros fisicoquímicos seleccionados para el o los modelos deben ser ortogonales entre sí, quiere decir que cuando una propiedad se modifica, esa variación no se transfiera al resto de los parámetros, por eso debe haber la menor correlación o mínima covarianza posible entre ellos (Figura 9).

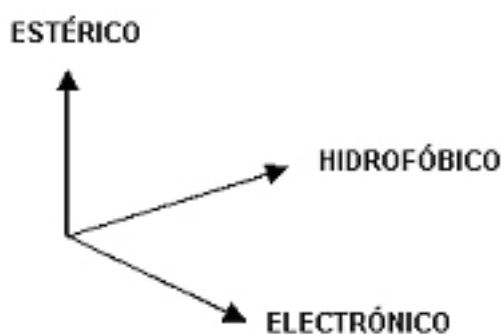


Figura 9

Parámetros	Símbolos
Parámetros Hidrofóbicos	
Coefficiente de partición	$\log P$
Constante de Hansch-Fujita	σ
Constantes de fragmentos hidrofobicos	f, f'
Coefficiente de distribución	$\log D$
Coefficiente de partición aparente	$\log P', \log P_{app}$
Factor de capacidad en HPLC	$\log k, \log k_w$
Parámetro de solubilidad	$\log S$
Descriptores Electrónicos	
Constante de Hammett	$\sigma, \sigma^-, \sigma^+$
Constante inductiva de Taft's (polar)	σ^*, σ_I
Parámetros de campo de Swain y Lupton	F
Parámetros de resonancia de Swain y Lupton	R
Constante de ionización	$pK_a, \Delta pK_a$
Corrimiento químico (^{13}C and 1H)	δ
Parámetros Teóricos	
Cargas netas atómicas	q, q
Superdeslocalización	S^N, S^E, S^R
Energía del ultimo orbital ocupado	E_{HOMO}
Energía del primer orbital desocupado	E_{LUMO}
Potencial electroestático	$V(r)$
Descriptores estéricos	
Parámetro estérico de Taft's	E_s
Volumen molar	MV
Masa molecular	MW
Radio de Van der Waals	r
Volumen de Van der Waals	V_w
Refractividad molar	MR
Parachor	P_r
STERMOL de Verloop	L, B_i

Tabla 5

Por ejemplo la clásica ecuación lineal de Hansch (3) es:

$$\log(1/C) = b_0 + b_1 \cdot \pi + b_2 \cdot \sigma + b_3 \cdot E_s \quad (5)$$

donde π es la constante hidrofóbica Hansch-Fujita de sustituyentes, σ es la constante electrónica de sustituyentes de Hammett, y E_s es el factor estérico de Taft. A continuación se da una breve descripción de parámetros:

La constante hidrofóbica Hansch-Fujita π de sustituyentes es una propiedad que describe la contribución del sustituyente a la lipofilidad o hidrofiliidad de un compuesto. Se basa en que los procesos de absorción y distribución en sistemas biológicos es determinado por las propiedades lipofílicas de un compuesto, por el cual se utiliza para esta determinación, el coeficiente de partición octanol/agua de la molécula usada, ya que simula el pasaje de esta a través de una membrana. El descriptor termodinámico π se calcula a partir de la diferencia entre LogP de un compuesto con sustituyente y el LogP sin sustituyente:

Ecuación de Hansch-Fujita

$$P = \frac{[\text{compuesto}]_{\text{octanol}}}{[\text{compuesto}]_{\text{agua}}}$$

$$\pi_x = \log P_{\text{compuestos sustituidos}} - \log P_{\text{compuestos insustituidos}} \quad (6)$$

Se utiliza octanol por su similitud con fosfolípidos de membrana, por tener una cabeza polar dada por el hidroxilo y una cola hidrocarbonada dada por su esqueleto de carbonos.

La constante electrónica de Hammett σ es una propiedad que describe la tendencia a tomar o ceder electrones, depende solamente de la naturaleza y posición de los sustituyentes (grupos atractores o dadores de electrones), caracterizando el efecto de estos sobre compuestos aromáticos. Los valores de sigma + indican sustituyentes atractores de electrones y valores de sigma - indican sustituyentes dadores de electrones.

Ecuación de Hammett.

$$\sigma = \log K_a(\text{mol sustituido}) - \log K_a(\text{mol insustituido}) \quad (7)$$

El factor estérico de Taft E_s da una descripción del impedimento estérico de los sustituyentes que caracterizan a la molécula. El principio de este parámetro se basa en los estudios cinéticos de hidrólisis ácida de compuestos aromáticos, en que la hidrólisis de estos compuestos depende del volumen del sustituyente, posteriormente se lo utilizó como parámetro de medida del efecto estérico, en modelos de QSAR.

Ecuación de Taft

$$E_s = \log \frac{K_{RCO_2CH_3}}{K_{CH_3CO_2CH_3}} \quad (8)$$

Los descriptores termodinámicos π , σ y E_s son aditivos y constitutivos.

La j propiedades moleculares de i compuestos Φ_j puede ser definida como la suma total de j constante de cada sustituyente ϕ que pertenecen a un compuesto.

$$\Phi_j = \sum_{s=1}^S \sum_{A=1}^{N_s} \phi_{A,s,j} \cdot I_{i,A,s} \quad (9)$$

Donde $I_{i,k}$ estos son variables indicadores (utilizadas en el análisis Free-Wilson) indicando la presencia. Cuando $I_{i,k} = 1$, de cada sustituyente en los s sitios para i compuesto; todo lo contrario la ausencia

$I_{i,k} = 0$; $\phi_{j,k}$ es la j propiedades de cada sustituyente en el s sitio; S es el número de sitios sustitucionales y N_s es el número de grupos de sustituyentes en el s sitios. En cada sitio solo hay un sustituyente presente para un compuesto dado, S es el número total de contribuciones considerando propiedades

moleculares. Alternativamente las j propiedades moleculares Φ_j de i compuestos es definido por un j propiedad global molecular tal como los descriptores estéricos.

Las propiedades fisicoquímicas moleculares Φ obtenidas bajo esta relación y las constantes de los sustituyentes ϕ son usualmente llamados descriptores de Hansch.⁵¹

Alternativamente se desarrollaron otros modelos de Hansch más complejos donde la relación entre la actividad biológica y los parámetros fisicoquímicos es no lineal. Se los utilizan a estos modelos para describir y predecir el transporte de droga, a través del pasaje de membranas ya sea pared gastrointestinal o barrera hematoencefálica.^{52, 49, 53, 55}

En el desarrollo de un modelo de QSAR, la selección de variables y la validación son condición necesaria para la viabilidad del modelo. Tratando de esta manera de eliminar la propagación de errores sistemáticos y la utilización de datos biológicos inapropiados.

Selección de variables

La selección se realiza a través de una serie de variables con el fin de desarrollar un modelo óptimo que pueda predecir, en este caso una respuesta biológica. Hay que tener en cuenta estos requerimientos antes de la validación del modelo⁵⁶:

- Una cuidadosa selección de variables que sean independientes entre si (ortogonalidad).
- Significación estadística de las variables (Justificación de variables a través de parámetros estadísticos).
- Principio de parsimonia, elegir el modelo más simple manteniendo la calidad del mismo.
- Mínimo número de compuestos por variable, debe poseer entre 5 a 6 datos de actividad biológica por cada variable que se encuentre en el modelo.
- Exigencia en la concordancia, entre el modelo de regresión propuesto y el modelo biológico, debe ser lógico desde el punto de este último.

Para cumplir con estos requerimientos se utilizan métodos para la selección de variables, por ejemplo:

Búsqueda secuencial

Este método realiza la selección de variables por chequeo de los parámetros estadísticos de los modelos. Estos parámetros son el coeficiente de correlación (r) y coeficiente de validación cruzada (Q^2), mostrando los modelos de mejor de calidad predictiva y excluyendo los peores, por corte, esto se realiza generando combinaciones de todas la variables, con sus respectivos parámetros estadísticos, a fin de encontrar el modelo más óptimo.⁴⁷

Requerimientos

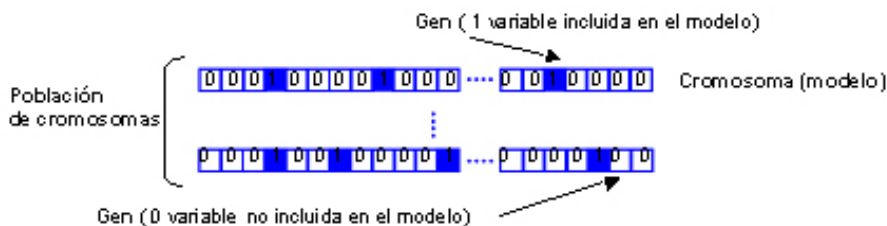
- 1) Se debe especificar la cantidad de variables que debe llevar para la búsqueda del modelo más óptimo.
- 2) Búsqueda de alta correlación de los parámetros estadísticos r y Q^2 en los modelos.

Selección de una serie de variables, por algoritmos genéticos (GA-VSS)

La selección de variables se lleva a cabo usando algoritmos genéticos, basándose en la evolución de una población de modelos, a fin de encontrar el más óptimo de ellos. El término algoritmo genético significa, un vector binario llamado cromosoma (un modelo), en el cual tiene en cada posición un gen que corresponde a una variable (1 si esta incluido en el modelo y 0 no esta incluido en el mismo). Cada cromosoma corresponde a un modelo con una serie de variables.^{57, 58}

Una vez que se define el parámetro a optimizar por ejemplo el Q^2 , comienza la evolución del algoritmo genético, basado en tres pasos y una condición de finalización:

- 1) Creación de una población: Se comienza con la construcción aleatoria de los modelos de una población y se ordenan en función del parámetro a optimizar, en primer lugar los mejores modelos (alta correlación) ver figura 10.



- 2) Entrecruzamiento: se genera el entrecruzamiento aleatorio de los genes (variables) entre los mejores modelos generados (cromosomas) en el primer paso, a fin de encontrar un mejor modelo. Si esto es así este se incluye en la población, este procedimiento se genera por iteración (Figura 11).

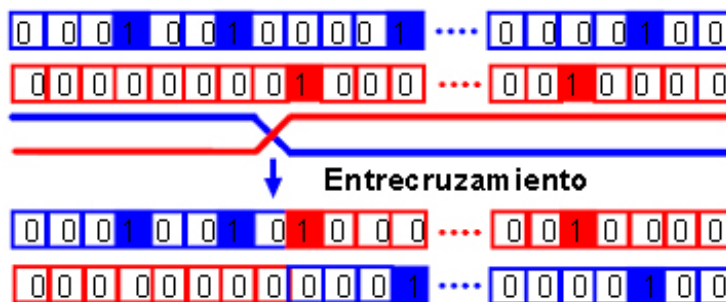


Figura 11

- 3) Mutación: por cada modelo (cromosoma) presente en la población, se genera un cambio de algunos de los genes (variables) del modelo, de esta manera aumenta el tamaño de la población, a fin de generar nuevas aproximaciones, que si son altos sus valores del parámetro a optimizar se incluyen en la población. También este procedimiento es generado por iteración (Figura 12).



- 4) Condición de finalización: el segundo y el tercer paso son repetidos hasta que se encuentra la condición de finalización, eso esta definido por el número máximo de iteraciones o algún proceso arbitrario.

Validación del modelo de QSAR

La técnica de validación constituye una herramienta fundamental para la evaluación de la validez de los modelos obtenidos de una serie de datos por regresión multivariante y métodos de clasificación. La técnica de validación es usada para analizar el poder predictivo de los modelos, dando una medida de su capacidad de realizar predicciones fiables a respuestas modeladas para nuevos casos donde no se conoce las mismas.⁵⁶

Se utilizan estos parámetros estadísticos para establecer la condición necesaria de la validez de un modelo de regresión (figura 13):

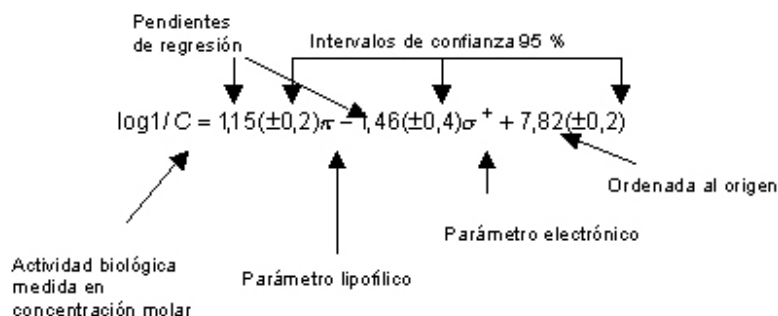


Figura 13, hipotético caso de una modelo de QSAR mostrando los parámetros estadísticos pertinentes

r es el coeficiente de correlación, es una medida relativa de la calidad de ajuste entre la variable dependiente (actividad biológica) y las variables independientes (parámetros fisicoquímicos) del modelo. Sus valores van desde 0 hasta 1, cuanto más cercano a 1 mayor será la calidad del modelo.

s es la desviación estándar, es una medida de la calidad absoluta del modelo, cuanto más chico este valor menor será la dispersión de la respuesta dada por el modelo.

F son los valores de Fisher, es una medida de la significación estadística, con respecto a la variabilidad del modelo.

Q^2 es el coeficiente de validación cruzada, es una medida de la predicción interna. Dicho en otras palabras mide el poder predictivo del modelo. Sus valores van desde 0 hasta 1, cuanto más cercano a 1 mayor será la calidad predictiva del modelo.

SPRESS es la desviación estándar de predicción, es una medida de la calidad absoluta predictiva del modelo, cuanto más chico este valor menor será la variación de la respuesta predicha por el modelo.

Análisis de QSAR de Flavonoides y derivados

Los flavonoides demostraron como se ha descrito anteriormente unirse de manera selectiva y afin al mismo receptor que las BZD y en función de su sitio de unión y propiedades farmacológicas en común (ansiolíticas). Marder y colaboradores desarrollaron un análisis de QSAR por regresión, de parámetros que describen la interacción de los flavonoides con el receptor $GABA_A$, demostrando que la relevancia del efecto electrónico sobre la unión al receptor, mostrando que está asociado con las carga negativa del oxígeno del grupo carbonilo de los flavonoides y con la naturaleza de los sustituyentes en posición 3'.⁵⁹

El resultado de su modelo fue el siguiente

$$Ln(1/K_i) = -2,068(\pm 147)[H - L] + 1,408(\pm 112)\pi_6 + 2,657(\pm 0,97)\pi_3 + 12,174(\pm 64,7)\sigma + 53,669(\pm 18,7) \quad (10)$$

$n = 37; r = 0,834; s = 122; F = 18,28$

Obtuvieron una ecuación de QSAR que cuantifica

- 1) El efecto electrónico que es derivado de cálculos cuánticos a través de la diferencia de energía entre el HOMO-LUMO (H-L). Donde el HOMO es la energía del último orbital ocupado y LUMO la energía del primer orbital no ocupado. La diferencia entre ellos se utiliza como un importante índice de estabilidad, cuanto más baja es esta diferencia mayor interacción tendrá la molécula con el receptor, producido por el solapamiento de los orbitales moleculares entre el ligando y el receptor.
- 2) Carga negativa del oxígeno del grupo carbonilo, es un centro para la formación de unión de tipo puente hidrogeno, ya que su carga negativa le confiere propiedad atractora que va interaccionar con un grupo dador de hidrogeno que se encuentra en el receptor.
- 3) Y el efecto lipofílico es notorio para el incremento de la actividad biológica, mostrando el requerimiento de sustituyentes lipofílicos en posición 6 y 3'.
- 4) Buenos valores de significación por parte de los parámetros estadísticos para la validación del modelo.

3D-QSAR

Es uno de los métodos más usados de QSAR entre las técnicas basadas en cajas y grillas, comparando campos de energía potencial de una molécula o de una serie de moléculas y se analizan diferencias y similitudes que pueden ser correlacionadas con propiedades similares y diferentes (bibliografía). Mientras que CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) y otros métodos relacionados se pueden usar para comparar una variedad de propiedades biológicas y fisicoquímicas de un número determinado de moléculas, su aplicación más importante está focalizado sobre la propiedades de unión entre el ligando-receptor.^{60, 61, 62}

El primer paso en la aproximación de CoMFA consiste en la selección de un grupo de compuestos que tienen un farmacóforo en común para la generación de una estructura tridimensional y su alineamiento. Una vez que las moléculas son alineadas en una caja regular, representando una aproximación del espacio de la cavidad del sitio de unión, se establece alrededor de cada compuesto la grilla de puntos que tiene una distancia arbitraria que se establece con un mínimo de 2 Å.

El receptor se considera como un bolsillo no flexible derivado de la grilla rígida como aproximación básica en el método de CoMFA.

Por cada molécula embebida en la grilla son calculados los campos de interacción de la molécula en todos los puntos de la grilla entre la energía de interacción de un átomo trazador y los átomos del ligando.

En el método original de CoMFA sólo se calculan dos campos de interacción no covalentes: campos estéricos, es una función potencial de Lennard-Jones y un campo electrostático dado por una función de la energía del potencial Coulombiano. Usualmente los dos campos son siempre separados para facilitar las interpretaciones de los resultados finales.

Los campos estéricos y electrostáticos dan cuenta solamente de la contribución entálpica que contribuye a la energía libre de la unión, se pueden adicionar otros campos para estudiar la solvatación y propiedades entrópicas.

Los campos entálpicos son todos los campos de interacción molecular que dan cuenta de la contribución entálpica a la energía libre de unión ligando-receptor a través de los campos estéricos y electrostáticos.

La interacción de campos estéricos es calculado a partir de la fuerza de interacción de van der Waals. Una de las maneras más comunes de calcularlo es a través del potencial de Lennard-Jones, que es caracterizado por un elevado incremento en la energía a cortas distancias de la superficie molecular.

Campos de interacción estérica (Campos de interacción de van der Waals)

Función potencial 6-12 de Lennard-Jones

$$E_{vdw} = \sum_s \sum_t \left(\frac{A}{r_{st}^{12}} - \frac{C}{r_{st}^6} \right) \quad (11)$$

$$A = \sqrt{\epsilon_s \cdot \epsilon_t} \cdot (R_s + R_t)^{12}$$

$$C = 2 \cdot \sqrt{\epsilon_s \cdot \epsilon_t} \cdot (R_s + R_t)^6$$

Otro de los campos entálpicos es la interacción de campo electrostático que calcula la energía de interacción electrostática, da una idea de la distribución del potencial electrostático de la superficie molecular.

Campos interacción electrostática

Función de energía del potencial Coulombiano

$$E_{el} = \sum_s \sum_t \frac{q_s \cdot q_t}{4\pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_m \cdot r_{st}} \quad (12)$$

Los valores de energía que interacción de cada punto de la grilla se los denomina descriptores CoMFA y son recolectados en una matriz QSAR, donde las filas representan las moléculas y las columnas representan los puntos de la grilla por cada campo considerado.

Una vez conformada la matriz QSAR se realiza usualmente análisis por regresión de mínimos cuadra-

dos parciales con la finalidad de correlacionar los descriptores CoMFA con la actividad biológica.

Finalmente lo que se obtiene es un mapa tridimensional de zonas de interacción favorables o desfavorables para la actividad biológica de una serie de compuestos a través de los campos calculados (Lennard-Jones y electrostáticos).

Modelo de CoMFA

$$\hat{y}_i = b_0 + \sum_{j=1}^F \sum_{x=1}^{N_x} \sum_{y=1}^{N_y} \sum_{z=1}^{N_z} b_{j,xyz} \cdot E_{ij,xyz} = \sum_{j=1}^F \sum_{k=1}^{N_g} b_{jk} \cdot E_{ijk} \quad (13)$$

Donde F es el número de campos usados en el análisis, N_x , N_y y N_z números de los puntos de la grilla a lo largo de los ejes X, Y y Z. N_g es el número total de los puntos de la grilla, $E_{ij,XYZ}$ es la energía potencial de interacción de i compuestos para j campo en las coordenada X,Y y Z. k es una representación vectorial de los puntos de la grilla.

Análisis por CoMFA de flavonoides y derivados

Posteriormente al análisis de QSAR desarrollado por Marder y colaboradores, Huang y colaboradores llevaron a cabo el primer análisis de 3D-QSAR sobre una serie de flavonoides con la finalidad de plasmar un modelo de farmacóforo, utilizando análisis por CoMFA.³²

El análisis de QSAR por CoMFA, el cual es representado por un coeficiente de contorno en tres dimensiones mostrado en la (Figura 14).

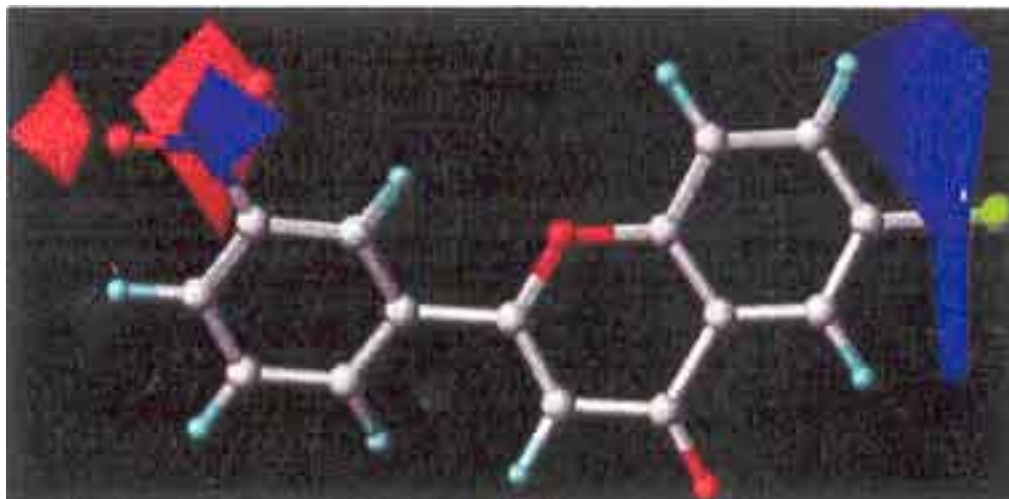
El beneficio y el detrimento de las interacciones estéricas son visualizadas en contornos verdes y amarillos, respectivamente, mientras que las interacciones electrostáticas favorables se visualizan en contornos rojos y azules ilustrando regiones negativas y positivas.

Junto con la estructura característica de los flavonoides, se muestran varias regiones importantes del sitio de unión.

Figura 14-



a)



b)

Análisis de la contribución estérica (Figura 14a):

- La gran región de contorno verde cerca de la posición 6 sugiere que un sustituyente voluminoso en esa posición mejora significativamente la afinidad.
- El poliedro amarillo cerca de las posiciones 5 y 7 del anillo aromático B, indica que el incremento en el volumen es desfavorable para la afinidad.

Análisis de la contribución electroestática (Figura 14b):

- El contorno azul cerca de la posición 6 y 7 sugieren que un sustituyente de carga de negativa incrementa la actividad.
- Los poliedros rojos cerca de la posición 3' indica que hay una baja densidad electrónica o la capacidad de un sustituyente como atractor de electrones en posición 3', jugando un rol favorable en la afinidad de la unión.

La validación mostró altos valores en los parámetros estadísticos r y Q^2 , a fin de encontrar el mejor modelo estadístico, cuyo resultado en este caso fueron los contornos tridimensionales.

Paralelamente al desarrollo de nuevos métodos de análisis de QSAR y 3D-QSAR, como CoMFA y otros, también los descriptores moleculares evolucionaron llegando a un alto grado de sofisticación a fin de poder comprender lo que sucede a nivel tridimensional en una molécula y el ambiente que la rodea. De esta manera la utilización de estos en el análisis de QSAR ha potenciado su poder predictivo en sus modelos, compitiendo directamente con el 3D-QSAR. Entonces queda de manifiesto de esta manera que los descriptores moleculares son de fundamental importancia junto con todos los métodos de análisis de QSAR en el desarrollo de modelos predictivos.

Descriptores moleculares

Los descriptores moleculares juegan un papel fundamental en química, industria farmacéutica, leyes de protección ambiental, y control de calidad.

Su forma estructural y una idea de organización real se transforman en números, permitiendo el tratamiento matemático de la información química contenida en la molécula. Por lo tanto los descriptores moleculares nos permiten encontrar, correlación entre la estructura-actividad y realizar búsquedas de similitud estructural o subestructural, etc.

Formalmente los descriptores moleculares son representaciones matemáticas de una molécula obtenida por un algoritmo específico, aplicado a definir una representación molecular o bien a un procedimiento experimental específico. En consecuencia los descriptores moleculares son el resultado final de una representación lógica y matemática de procedimientos que transforman la información química codificando la representación simbólica de una molécula que puede ser usado como un número o un resultado de algún experimento estandarizado.

El uso de estos nos permiten interpretar las propiedades de las moléculas tomando parte importante en el desarrollo de modelos predictivos.

Aunque si bien varios parámetros de cuantificación molecular tienen su origen en la química cuántica y la teoría de grafos, el término "descriptor molecular" fué acuñado popularmente con el desarrollo de modelos donde se correlacionaban estructura-propiedad. Los iniciadores en diseñar los primeros de descriptores moleculares fueron Platt y Wiener.^{63, 64}

Por definición los descriptores moleculares se dividen en dos grupos:

- **Medidas experimentales:**
Son parámetros basados en medidas experimentales que representan a la molécula
Ejemplo; log P; Dipolo, Polarización, etc.
- **Descriptores moleculares teóricos**
Son derivados de representaciones simbólicas de una molécula que se pueden clasificar acorde a los diferentes tipos de estructuras moleculares.
La representación molecular es el fenómeno real estructural, que se representa simbólicamente por un procedimiento formal-específico y con reglas convencionales. La cuantificación de la información química se transfiere a la representación simbólica de una molécula que siempre depende de cuan factible sea su representación.
Los descriptores moleculares teóricos se van a dividir según su representación dimensional (en los ejes X,Y,Z):

0D-descriptores:

Es la representación molecular más simple, donde se lista los diferentes tipos de átomos de la molécula, siendo independiente a todo lo concerniente a su configuración molecular, un ejemplo es la formula molecular.^{65, 66}

1D-descriptores:

Se consideran aquellos que constituyan un listado de subestructuras dentro de la molécula y consiste en listar los fragmentos de la molécula como, grupo funcionales o sustituyentes de interés presentes en la molécula. Comúnmente son usados en análisis y búsqueda subestructural. Ello indica la falta de un reconocimiento completo de la estructura de la molécula

2D-descriptores:

La representación en dos dimensiones de una molécula esta basado en la conexión de los átomos entre sí. Definiendo la conectividad de átomos en la molécula en términos de la presencia y naturaleza de las uniones químicas. Esta aproximación basada en la teoría de grafos que permitió la representación bidimensional de una molécula, usualmente se lo llama representación topológica.^{67, 68, 69}

3D-descriptores

La representación tridimensional de una molécula se realiza a través del diseño de una entidad geométrica rígida, y permite no solo una representación de la naturaleza y conectividad de los átomos, sino también la configuración o arreglo espacial total de la molécula. Esta representación es conocida como representación geométrica. Ejemplos de descriptores tridimensionales tenemos, descriptores geométricos, descriptores estéricos, descriptores de tamaño y forma.^{70, 71, 72}

Objetivo

En función de los antecedentes anteriormente descritos, el **objetivo** de este trabajo es desarrollar un modelo de interacción diseñado en base al análisis QSAR, orbitales moleculares, potencial electroestático molecular (MEP) y superposición molecular, de flavonoides en el receptor BZDpínico del complejo GABA_A.

Materiales y Métodos

Alineación de una serie de compuestos

La serie de 41 flavonoides, elegidos de la literatura³², se usaron para seleccionar posteriormente el conjunto molecular a estudiar. Las estructuras químicas de los flavonoides y sus afinidades al sitio BZD, representados por $-\log K_i$, se muestran en la Tabla 6. K_i es la constante de afinidad ligando-receptor.

Modelado molecular

El estudio de modelado molecular (cálculos de **mecánica molecular** y **semi-empíricos**) se llevó a cabo utilizando los programas Hyperchem 7.01® y ChemOffice 2005®^{73,74}, corridos en una PC Pentium IV 2,66 GHz, con un 1Gb de memoria RAM, y Sistema operativo Windows XP Profesional.

Se seleccionó el método MM+ como campos de fuerza aplicados a cálculos de mecánica molecular, algoritmo que se aplica preliminarmente para optimizar geoméricamente estructuras orgánicas de bajo peso molecular. La minimización por MM+ proporciona buenos valores de geometrías de equilibrio y energías estéricas relativas.

El método MM+ es una modificación del MM de Burkert y Allinger de la década del 70, donde se han parametrizado nuevamente las constantes para distancias interatómicas, ángulos de unión, ángulos de torsión, etc., evidenciando resultados más exactos.

El próximo paso fue el refinamiento de las estructuras minimizadas por MM+, (o las obtenidas por análisis conformacional) aplicando el método semi-empírico AM1. Es un método mecanocuántico que ofrece un cálculo energético más exacto y ofrece una serie de propiedades como la distribución de carga, dipolo y otras propiedades que pueden considerarse como descriptores moleculares de cada compuesto estudiado que pueden incorporarse a estudios de QSAR. Los métodos semiempíricos calculan buenas aproximaciones a la función de onda de la molécula descrita por la ecuación de Schrödinger.⁷⁵ ajustando mejor la distribución de los electrones en el espacio. A diferencia del método MM+ que ajusta los núcleos atómicos en el espacio.

El estudio conformacional se hizo por **dinámica molecular**, este método de búsqueda comienza con una conformación que es un mínimo, y entonces se asigna a cada átomo una serie de componentes de velocidad v_x , v_y , v_z que son elegidos al alcanzar a partir de una distribución de Maxwell a una temperatura elevada (normalmente 200 K o 1000 K)⁷⁵. La posición y velocidad iniciales de cada átomo son, por tanto, conocidas. Entonces se aplica la segunda ley del movimiento de Newton a cada átomo, donde cada

componente de la fuerza sobre el átomo i se calcula como $F_{x_i} = \partial U / \partial x_i$ donde U se obtiene a partir del campo de fuerzas de la mecánica molecular. Se integra numéricamente la segunda ley de Newton para obtener la posición de cada átomo en los tiempos Δt , $2\Delta t$, $3\Delta t$, ..., donde el intervalo de tiempo Δt es, habitualmente, 10^{-15} s, y se pueden seguir los movimientos atómicos, habitualmente de 10^{-9} s. a intervalos de tiempos iguales se muestrea las configuraciones generadas por los movimientos atómicos (normalmente se toman 10^3 a 10^4 configuraciones), y cada configuración muestreada se somete a minimización de la energía. La elevada temperatura usada permite a la molécula ascender por la barrera energía potencial para alcanzar nuevas regiones de la SEP (Superficie de energía Potencial) que pueden contener mínimos de energía más bajos que la región actual.

Descriptores moleculares

Los descriptores moleculares son calculados para las moléculas después de obtener un confórmero de baja energía y minimizado usando alguna de las técnicas estándar de optimización, como mecánica molecular y métodos semi-empíricos. Los descriptores moleculares usados en este estudio fueron calculados aplicando el programa DRAGON, la versión E-DRAGON gentilmente recomendado por el Dr. Roberto Todeschini de la Universidad de Milano, Italia.⁷⁶

El programa contiene un editor para la generación de 1497 descriptores de diferentes tipos: 1D-descriptores (constitucionales), 2D-descriptores (topológicos), 3D-descriptores (espaciales).⁷⁶ A esta serie de

descriptores se le suman los descriptores teóricos (mecano-cuánticos), como momento dipolar, HOMO, LUMO, diferencia de energía HOMO-LUMO, tensor de polarizabilidad, etc, que son obtenidos para cada compuesto después del proceder a la optimización geométrica.

Descriptores usados

A continuación se muestran las ecuaciones de los descriptores utilizados en este estudio.

- TPSA (total polar surface area): es la suma de las áreas de accesibilidad al solvente de átomos en barras de valor absoluto, para valores mayores o iguales que 0,2. Este descriptor fue propuesto para describir zonas polares de las moléculas que interactúan con sitios dadores de hidrogeno.

$$TPSA = \sum_a SA_a \quad \forall: |q_a| \geq 0,2 \quad (14)$$

SA= áreas de accesibilidad al solvente

a= atomo

- Dip X = es la componente x del vector momento dipolar, se lo utiliza para observar el comportamiento del dipolo en un solo eje, para obtener una descripción más simple del momento dipolar.⁷⁷

$$\mu_x = \sum_i q_i \cdot x_i \quad (15)$$

μ_x = componente x del momento dipolar; $q_i \cdot x_i$ = carga descripta en el eje x

- Cuadрупolos (Qxxm, Qzzp) = es similar al momento dipolar, pero representa la molécula con nueve componentes, formando un tensor de segundo grado (matriz tensorial). Se lo utiliza para estudiar la distribución de cargas en el espacio, y su geometría.

$$Q = \frac{1}{2!} \sum_{i=1}^A q_i \cdot r_i \cdot r_i \quad (16)$$

Q = momento cuadрупolar

- ClogP: es el logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua, calculado por computadora; es un parámetro físico-químico que cuantifica la lipofilidad de un conformero.⁵¹

$$\log P(\text{molécula}) = \log P_H + \sum_{x=1}^5 \pi_x \quad (17)$$

$\log P_H$ = lipofilidad de la molécula sin sustituir, $\sum_{x=1}^5 \pi_x$ = es la suma de lipofilidad del sustituyente, que se encuentran en la molécula.

- Pzz: es un componente (gradiente) del tensor de polarizabilidad, para describir la distorsión de las nubes electrónicas cuando se aplica un campo eléctrico. Se lo utiliza para observar cambios sobre la molécula, cuando interacciona de manera electroestática.⁷³

$$P = \begin{pmatrix} P_{xx} & P_{xy} & P_{xz} \\ P_{yx} & P_{yy} & P_{yz} \\ P_{zx} & P_{zy} & P_{zz} \end{pmatrix} \quad (18)$$

- El código RDF, es un descriptor molecular basado en la función distribución radial de un ensamble de átomos que puede ser interpretado como una distribución de probabilidad de encontrar un átomo en un volumen esférico de radio R variable, cuyo centro coincide con el centro de masa de la molécula y su radio máximo se adapta de acuerdo a la molécula en cuestión.⁷⁸

$$g(R) = f \cdot \sum_{i=1}^{A-1} \sum_{j=i+1}^A w_i \cdot w_j \cdot e^{-\beta \cdot (R-r_{ij})^2} \quad (19)$$

$g(R)$ = es el código RDF de radio variable; f = factor de escalamiento; w = propiedades de los átomos de i y j ; r_{ij} = a la distancia interatómica entre i y j átomos; β = distribución de probabilidad de encontrar un átomo.

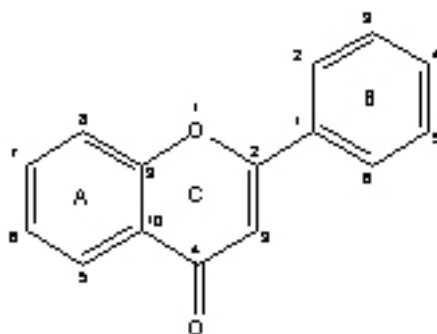
Métodos estadísticos

La elección preliminar de modelos, fue realizada 1) por la selección de descriptores moleculares por el método de algoritmos genéticos (GA) explicado en la Introducción 2) para el posterior análisis por regresión lineal multivariante (MLR) implementando el programa BuildQSAR, programa no interactivo, que consta de una planilla de cálculo donde se vuelcan encolumnados moléculas y propiedades para la aproximación de la relación estructura – actividad cuantitativa.⁷⁹

Como se mencionó anteriormente en la introducción, los parámetros de validación que permiten seleccionar los modelos con las siguientes características: altos valores en el coeficiente de correlación r y baja desviación estándar S .

Ambos estadísticos predicen la correlación del efecto biológico con las propiedades medidas con los programas descriptos previamente, pero el poder de predicción del modelo lo indica el estadístico Q^2 que valida internamente la predictibilidad del modelo usado.

Tabla 6 - Estructura química de los flavonoides usados en este estudio y sus constantes de afinidad al sitio BZDpínico (-log K_i , K_i en nM)



Compuestos	R_5	R_6	R_7	R_8	$R_{2'}$	$R_{3'}$	$R_{4'}$	-log K_i
1	-H	-H	-H	-H	-H	-H	-H	6.00
2	-H	-F	-H	-H	-H	-OH	-H	5.60
3	-H	-Cl	-H	-H	-H	-OH	-H	6.07
4	-H	-Br	-H	-H	-H	-OH	-H	6.22
5	-H	-F	-H	-H	-H	-NO ₂	-H	6.74
6	-H	-Cl	-H	-H	-H	-NO ₂	-H	8.10
7	-H	-Cl	-H	-H	-H	-H	-OCH ₃	5.90
8	-H	-Br	-H	-H	-H	-H	-OCH ₃	5.68
9	-H	-Br	-H	-H	-NO ₂	-H	-H	6.68
10	-H	-NO ₂	-H	-H	-H	-H	-Br	7.60
11	-H	-Cl	-H	-H	-F	-H	-H	6.38
12	-H	-Br	-H	-H	-F	-H	-H	6.42
13	-H	-H	-H	-H	-H	-F	-H	5.45
14	-H	-F	-H	-H	-H	-F	-H	6.04
15	-H	-Cl	-H	-H	-H	-F	-H	6.93
16	-H	-Br	-H	-H	-H	-F	-H	7.38
17	-H	-H	-H	-H	-H	-H	-F	5.44
18	-H	-F	-H	-H	-H	-H	-F	5.60
19	-H	-Cl	-H	-H	-H	-H	-F	6.74
20	-H	-Br	-H	-H	-H	-H	-F	6.94
21	-H	-H	-H	-H	-H	-Cl	-H	6.21
22	-H	-F	-H	-H	-H	-Cl	-H	6.70
23	-H	-Cl	-H	-H	-H	-Cl	-H	7.64

24	-H	-Br	-H	-H	-H	-Cl	-H	7.77
25	-H	-H	-H	-H	-H	-Br	-H	6.38
26	-H	-F	-H	-H	-H	-Br	-H	6.63
27	-H	-Cl	-H	-H	-H	-Br	-H	7.64
28	-H	-Br	-H	-H	-H	-Br	-H	7.72
29	-H	-Br	-H	-H	-H	-H	-H	7.15
30	-H	-Br	-H	-H	-H	-H	-NO ₂	6.70
31	-H	-NO ₂	-H	-H	-H	-NO ₂	-H	7.92
32	-H	-Br	-H	-H	-H	-NO ₂	-H	9.00
33	-OH	-Br	-OH	-Br	-H	-H	-H	6.15
34	-OH	-H	-OH	-H	-H	-H	-H	5.52
35	-OH	-H	-OH	-H	-H	-H	-OH	5.52
36	-OH	-H	-OH	-H	-Cl	-H	-H	5.10
37	-OH	-H	-OH	-H	-F	-H	-H	5.10
38	-OH	-OCH ₃	-OH	-H	-H	-H	-OH	6.00
baicaleina	-OH	-OH	-OH	-H	-H	-H	-H	5.25
Scutellareina	-OH	-OH	-OH	-H	-H	-H	-OH	4.92
Wogonina	-OH	-H	-OH	-OCH ₃	-H	-H	-H	5.69

Resultados y Discusión

Como se descrito en la introducción, los trabajos de Paladini y col. basados en publicaciones anteriores, demostraron que ciertos flavonoides naturales como la 5,7 – dihidroxiflavona y otros análogos se unían de manera selectiva y presentaban afinidad por el receptor GABA_A y en función de su sitio de unión exhibían interesantes propiedades ansiolíticas en común con las BZD, sin presentar relajación muscular ni hipnosis. Este hallazgo impulsó la síntesis de numerosos análogos a partir de compuestos naturales con el objeto de obtener drogas mas potentes y seguras.²⁸⁻³⁰

Se Desarrollo un estudio QSAR a flavonoides con acción ansiolítica, de esta manera se aplicó a una serie de 41 flavonoides (ver materiales y métodos TABLA 6), con sus respectivos K_i, realizando cálculos de descriptores moleculares, evaluación del volumen y forma molecular, carácter electrónico-electrostático y la posición específica de los sustituyentes en el flavonoides para predecir un incremento en el valor de la actividad farmacológica (-logK_i).

Estas propiedades nos permitirían proponer un farmacóforo 3D de flavonoides en el sitio benzodiazepínico del receptor GABA_A, basándonos conforme a las propiedades seleccionadas por el programa BuildQSAR (modelos) que se muestran y los resultados estadísticos con el objeto de obtener un probable modelo de interacción sobre el cual interactúen ambos grupos de drogas.

Para llevar a cabo este estudio se contó con los programas mencionados en Materiales y Métodos, planificando los pasos sucesivos que se describen a continuación:

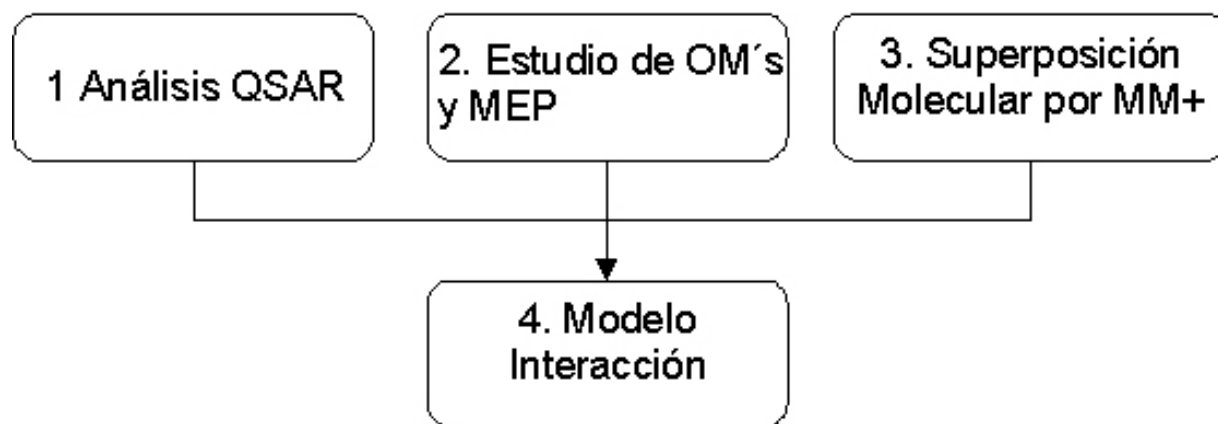


Figura 15- Esquema de trabajo

- 1) Análisis de QSAR basado en descriptores de moleculares.
- 2) Estudio de las características de los orbitales moleculares y MEP (potencial electrostático molecular) de los flavonoides y BZD.
- 3) Superposición molecular de flavonoides y BZD por mecánica molecular.
- 4) Modelos de interacción.

1) Análisis QSAR

Las estructuras de flavonoides se construyeron con el hyperchem V. 7.0 y el ChemOffice V. 9.0 eligiendo los conformeros de menor energía. Se refinaron por métodos semiempíricos como el AM1 (Austin Model 1) y posteriormente por dinámica molecular.

Este estudio se llevó a cabo con grupo de flavonoides (ver materiales y métodos TABLA 6), a su vez el programa seleccionó analítica y estadísticamente qué descriptores moleculares ajustaban mejor las ecuaciones de relación estructura – actividad cuantitativa, para mayor simplicidad se dividieron los modelos en 2 grupos, acorde a la naturaleza de los descriptores involucrados:

- Grupo A: contiene descriptores físico-químicos y descriptores geométricos (3D) de carga, generados por los programas DRAGON y Hyperchem.
- Grupo B: contiene descriptores 3D conformacionales, generados por el programa DRAGON.

• Grupo A

Analizando una tabla de 41 flavonoides y obteniendo resultados análogos con 21 de ellos, se optó en principio por la tabla de 21 flavonoides como una muestra representativa, así se seleccionaron por GA 39 descriptores moleculares físico-químicos, geométricos 3D (ver Anexo Tabla 7) de los 1497 descriptores moleculares, para realizar el posterior análisis por MLR. También se muestran las Tablas 9a de modelos en el anexo, donde se seleccionaron los modelos α y β .

Los flavonoides demostraron, como se ha descrito en la Introducción, unirse de manera selectiva y afin al mismo receptor de las BZD's.

En el análisis QSAR de propiedades físico-químicas y descriptores de carga 3D, que describen la interacción de los flavonoides con el receptor GABA_A, mostró que la mayor contribución es de tipo electrostática sobre la unión al receptor (modelos α y β), que esta asociada directamente a la formación de puente hidrogeno (modelo α , ecuación (20)) entre sitios dadores del receptor y las cargas parciales negativas de los oxígeno pertenecientes al heterociclo en posición 1 y al del grupo carbonilo en posición 4. Indicado por el descriptor molecular TPSA (área total polar).

La contribución electrostática no esta dada solamente por los enlaces hidrogeno, si no que también hay otros centros de cargas en los flavonoides que aumentan la interacción con el sitio benzodiazepínico, que se encuentran en las posiciones 6 y 3' además de los oxígenos en posición 1 y 4, expresados por los descriptores de carga 3D, Dip X (componente en el eje X del momento dipolar), Q_{xx_m} y Q_{zz_p} son gradientes del tensor del momento cuadrupolar (ver materiales y métodos).

Estos descriptores seleccionados por el programa BuildQSAR (ver materiales y métodos), calculó el siguiente modelo:

Modelo α

$$y = -\log Ki = -0,03216(\pm 0,00631)TPSA + 0,66707(\pm 0,13678)DipX - 0,01138(\pm 0,00754)Q_{xx_m} + 0,01835(\pm 0,00549)Q_{zz_p} + 4,99192(\pm 1601752)$$

$$n = 21; r = 0,962; s = 0,344; F = 49874; Q^2 = 0,874; SPRESS = 0,448 \quad (20)$$

	TPSA	Dip X	QXXm	QZZp
TPSA	1	0,126	0,087	0,105
Dip X		1	0,009	0,054
QXXm			1	0,01
QZZp				1

TABLA 10 – matriz de correlación modelo α

Por otra parte la matriz de correlación de la tabla 10 muestra la ortogonalidad de las variables seleccionadas indicando independencia de influencia entre ellas, y alto poder predictivo dado por los parámetros estadísticos, más específicamente por el coeficiente de validación cruzada Q^2 .

La gráfica del modelo α muestra (Grafico 3) actividad teórica versus la actividad medida experimentalmente (-log Ki). La actividad biológica se incrementa sumado a las uniones de hidrógeno, cuando se introducen sustituyentes halogenados en posición 6, y un grupo atractor de electrones como el nitro en posición 3', como se observa el compuesto 32, que es el de mayor actividad. Esto es lo predicho por los descriptores de carga 3D.

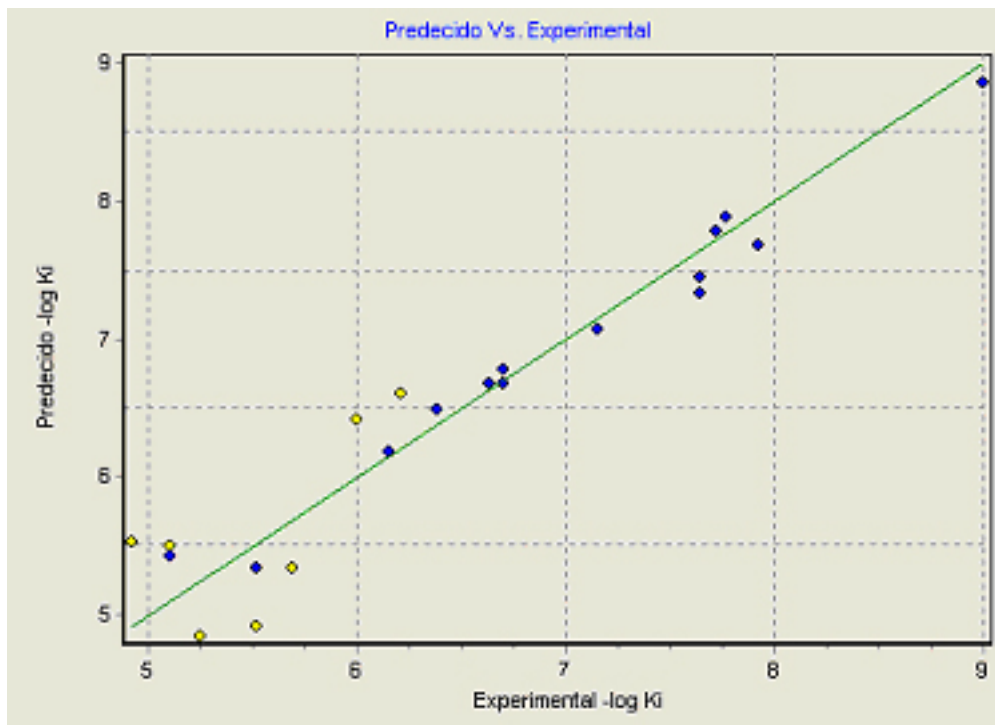


Grafico - 3 - modelo α Actividad predecida vs. Actividad experimental

Como se ve en la curva de regresión alrededor de la cual se representan, con baja dispersión, la predicción de los valores de las propiedades medidas o calculadas por la ecuación del modelo α .

Por otra parte en el modelo β (ecuación (21)), el descriptor molecular TPSA, se reemplaza por el ClogP (logP computacional) y el descriptor Q_{xx_m} por el Pzz (gradiente polarizabilidad).

Modelo β

$$y = -\log Ki = +0,19342(\pm 0,35782)C\log P - 0,10230(\pm 0,04755)P_{zz} + 0,51012(\pm 0,14707)Dip X + 0,01864(\pm 0,00742)Q_{zz_p} + 6,84130(\pm 2,583038)$$

$$n = 21; r = 0,958; s = 0,363; F = 44361; Q^2 = 0,839; SPRESS = 0,507 \tag{21}$$

	CLogP	Pzz	Dip X	QZZp
CLogP	1	0,474	0,008	0,009
Pzz		1	0,064	0,186
Dip X			1	0,054
QZZp				1

Tabla 11 – matriz de correlación modelo β

Por otra parte la matriz de correlación (Tabla 11) muestra también la ortogonalidad de las variables y su alto poder predictivo dado por el coeficiente de validación cruzada Q^2 .

El logP no es una determinación estática, si no que es una sumatoria algebraica del logP de cada isómero conformacional formado por la vibración intrínseca de la molécula. Cada isómero conformacional, posee un logP que depende de la exposición de sus grupos hidrofílicos o hidrofóbicos en la biofase, mostrando el incremento de la afinidad, con sustituyentes halogenados en posición 6 y menor grado en posición 3'.

El Pzz o el componente de polarizabilidad del tensor es un descriptor electrónico al igual que el Q_{xx}_m , indicando como se distorsiona la distribución de carga sobre los flavonoides.

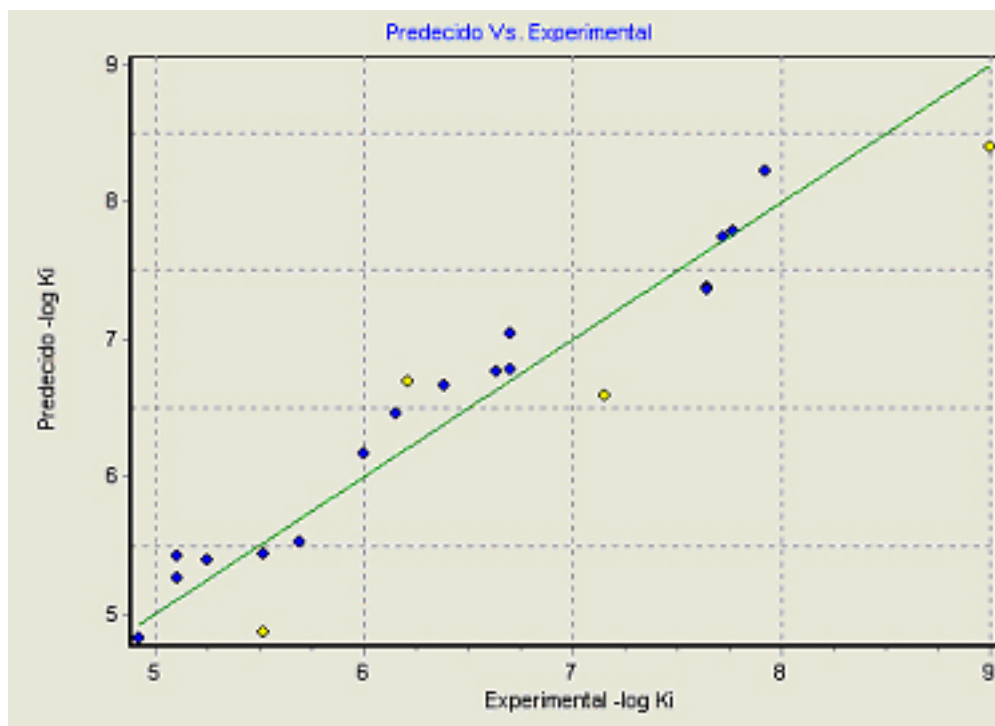


Grafico - 4 - modelo β Actividad predicida vs. Actividad experimental

La gráfica del modelo β (Grafico 4) tiene poder predictivo menor, pero además de la contribución electrostática en la interacción con el receptor, también muestra que hay contribución de tipo hidrofóbica, que comprueba el aumento de la afinidad, como se menciona anteriormente.

En consecuencia ambos modelos α y β ajustan con un alto poder predictivo expresado por el valor de Q^2 (coeficiente de validación cruzada) y una alta correlación de las variables con la actividad biológica, indicado por r (coeficiente de correlación).

• Grupo B

Se planteó un análisis estructural tomando 40 flavonoides (ver Anexo, TABLA 8). Se utilizó como descriptor 3D conformacional el código RDF. Así se seleccionaron, 26 descriptores conformacionales (los códigos RDFe), de los 1497 descriptores moleculares, para realizar el posterior análisis por MLR. También se muestra la Tablas 9b de modelos (en anexo), donde se seleccionó el modelo γ .

El código RDF, es un descriptor molecular basado en la función distribución radial de un ensamble de átomos que puede ser interpretado como una distribución de probabilidad de encontrar un átomo en un volumen esférico de radio R variable, cuyo centro coincide con el centro de masa de la molécula y su radio máximo se adapta de acuerdo a la molécula en cuestión.⁷⁸

RDF de electronegatividad (RDFe), es la función de distribución radial en función de la electronegatividad de Sanderson, indica el requerimiento mínimo estructural (ver introducción, figura 7) para que se exprese actividad biológica, conforme a la unión química correspondiente a lo contrastado con el fármaco refinado de Cook.^{18,18*}

El modelo γ (ecuación (22)) cuantifica el requerimiento mínimo estructural para que halla actividad farmacológica. La ecuación tiene buen poder predictivo dado por el Q^2 y una buena correlación de ajuste r entre las variables y la constante de afinidad (K_i).

Modelo γ

$$y = -\log K_i = -0,57293(\pm 0,16385)RDF\ 1e - 0,15721(\pm 0,09105)RDF\ 4,5e + 0,13266(\pm 0,05462)RDF\ 6,0e + 0,35740(\pm 0,14705)RDF\ 11e + 0,28296(\pm 0,18911)RDF\ 12e - 9,80989(\pm 1114783)$$

$$n = 41; r = 0,902; s = 0,438; F = 30653; Q^2 = 0,728; SPRESS = 0,529 \quad (22)$$

	RDF1e	RDF4,5e	RDF6e	RDF11e	RDF12e
RDF1e	1	0.378	0.018	0.086	0.078
RDF4,5e		1	0.021	0.057	0.092
RDF6e			1	0.001	0.017
RDF11e				1	0.116
RDF12e					1

Tabla 12 - matriz de correlación modelo y

Por otra parte la matriz de correlación (Tabla 12) muestra también la ortogonalidad de las variables y su alto poder predictivo dado por el coeficiente de validación cruzada Q^2 .

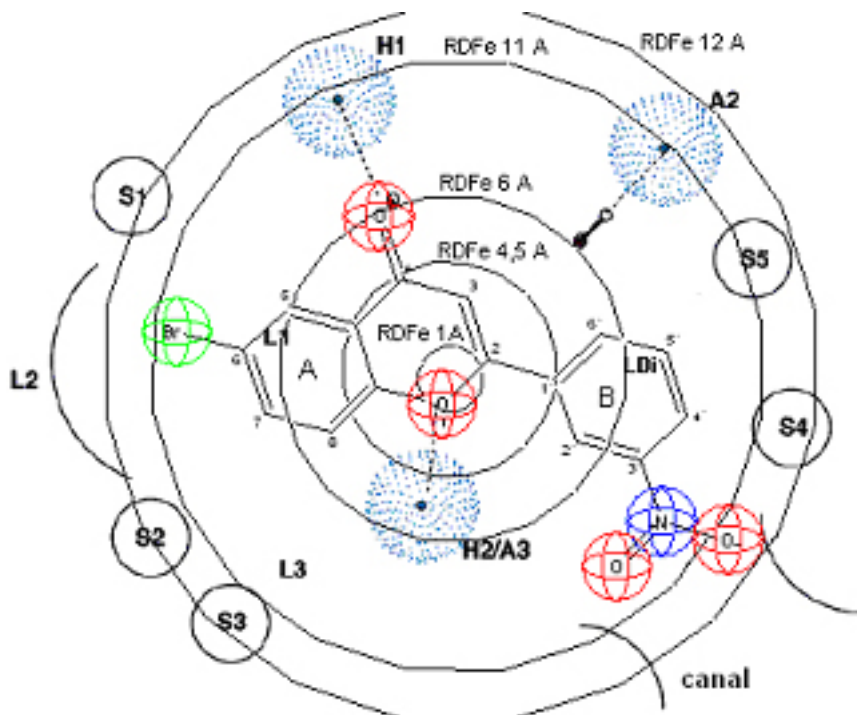


Figura 16 - Farmacóforo 3D; las esferas se ven como círculos para mayor entendimiento

La ecuación describe una esfera de un radio que oscila desde 1 Å a 12 Å (ver figura 16), cuyo círculo de 1 Å de radio, descrito por el parámetro RDF1e, abarca el oxígeno en posición 1 del puente éter del cromano que coincide con un sitio dador-aceptor de hidrogeno o enlace de hidrogeno.

El círculo siguiente de 4,5 Å, descrito por el parámetro RDF4,5e, engloba átomos tanto del anillo oxigenado como la unión del anillo B.

El siguiente círculo de 6 Å, descrito por el parámetro RDF6,0e, encierra el oxígeno del grupo carbonilo en posición 4 como importante para formar enlace de hidrogeno, según el modelo refinado de Cook.^{18,18*}

El anillo de 11 Å; descrito por el parámetro RDF11e, encierra casi la totalidad de la molécula en particular el Cl, Br, NO₂ en posiciones 6, 3', correspondiendo el Cl o Br al bolsillo lipofílico L2 y el NO₂ en 3', no tiene descripción en la literatura, pero por su alta densidad electrónica debido a su σ elevado (constante electrónica de Hammett) podría indicar una zona de aminoácidos con nitrógenos cargados positivamente, como la lisina, arginina o histidina, que sugerirían la explicación del cuadrupolo como descriptor preponderante en las ecuaciones de QSAR (modelos α y β). La suposición es que el NO₂ no formaría una unión covalente sino de tipo dipolo, dipolo inducido o uniones π - π con aminoácidos aromáticos (Zona LDi).

El sitio LDi indica una zona hidrofóbica o lipofílica indicando un probable anillo aromático cercano al anillo B del flavonoide.

La clase de unión química entre el anillo B y el sitio LDi es discutible porque siendo el NO₂ un fuerte atractor de electrones, desactivaría al anillo B y podría sin confirmar una unión química similar a la de transferencia de carga que se da entre anillos aromáticos, donde una de ellos tiene los electrones π deslocalizados por un fuerte grupo atractor de electrones como sustituyente. Esto empobrece la densidad

electrónica favoreciendo la unión a través de electrones compartidos con otros anillos aromáticos ricos en electrones.

La suposición de un posible dipolo del NO₂ solamente es explicable si la contraparte corresponde a un sitio con densidad de carga positiva; pero no explicaría uniones hidrofóbicas por su carácter polar.

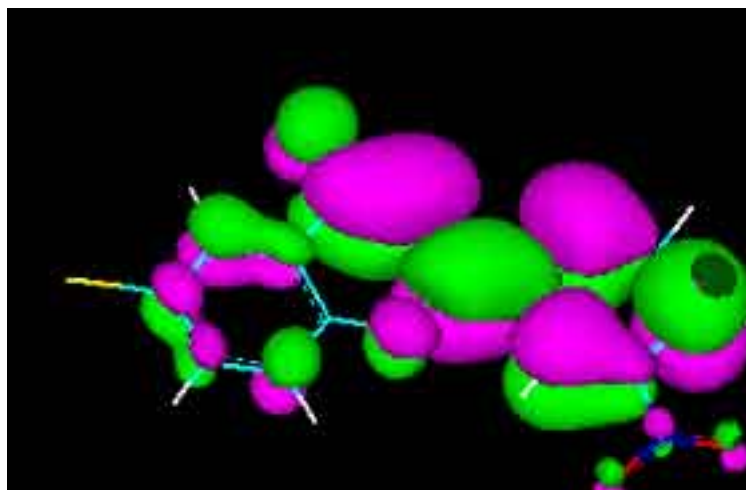
Finalmente el círculo de 12 Å, descrito por el parámetro RDF12e, encierra totalmente a la molécula, es la frontera del farmacóforo 3D que delimita las interacciones no requeridas con los sitios S1, S2; S3, S4 y S5 que son zonas repulsión estérica del modelo refinado de Cook, que hacen decrecer la actividad biológica.

Los sitios de repulsión estérica interaccionan con sustituyentes en posición 5, 8, 4' como Cl, Br, OCH₃, demostrado que no debe haber grupos voluminosos, que afectan la afinidad al sitio de unión.

2) Características de los orbitales moleculares y MEP (potencial electrostático molecular) de los flavonoides y BZD

Seguido al análisis QSAR se verifico de acuerdo a Huang y colaboradores (Figura 17 a y b), que el 6-bromo-3'-nitroflavona (compuesto **32**) de mayor afinidad con un sustituyente NO₂ en 3' produciría un desplazamiento orbitales moleculares del HOMO (es la energía del ultimo orbital ocupado), correspondiendo en términos químicos al potencial de ionización, al anillo B indicando una posible unión π-π o hidrofóbica. Esto se lo compara con los orbitales moleculares de la flavona (compuesto **1**) HOMO donde no se observa desplazamiento alguno, esta aseveración podría explicar la interacción con la zona LDi del modelo refinado de Cook, visto anteriormente en el análisis del modelo γ con el descriptor molecular (RDF 11e) que describe el anillo de 11 Å de radio.

a)



b)

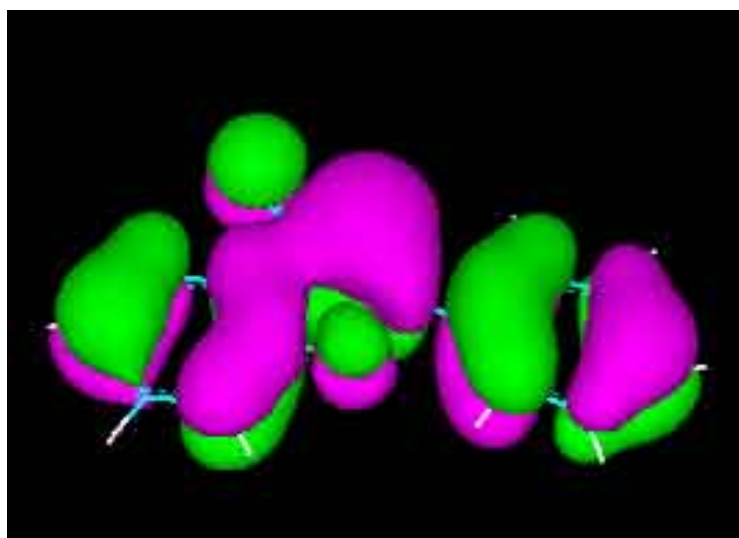
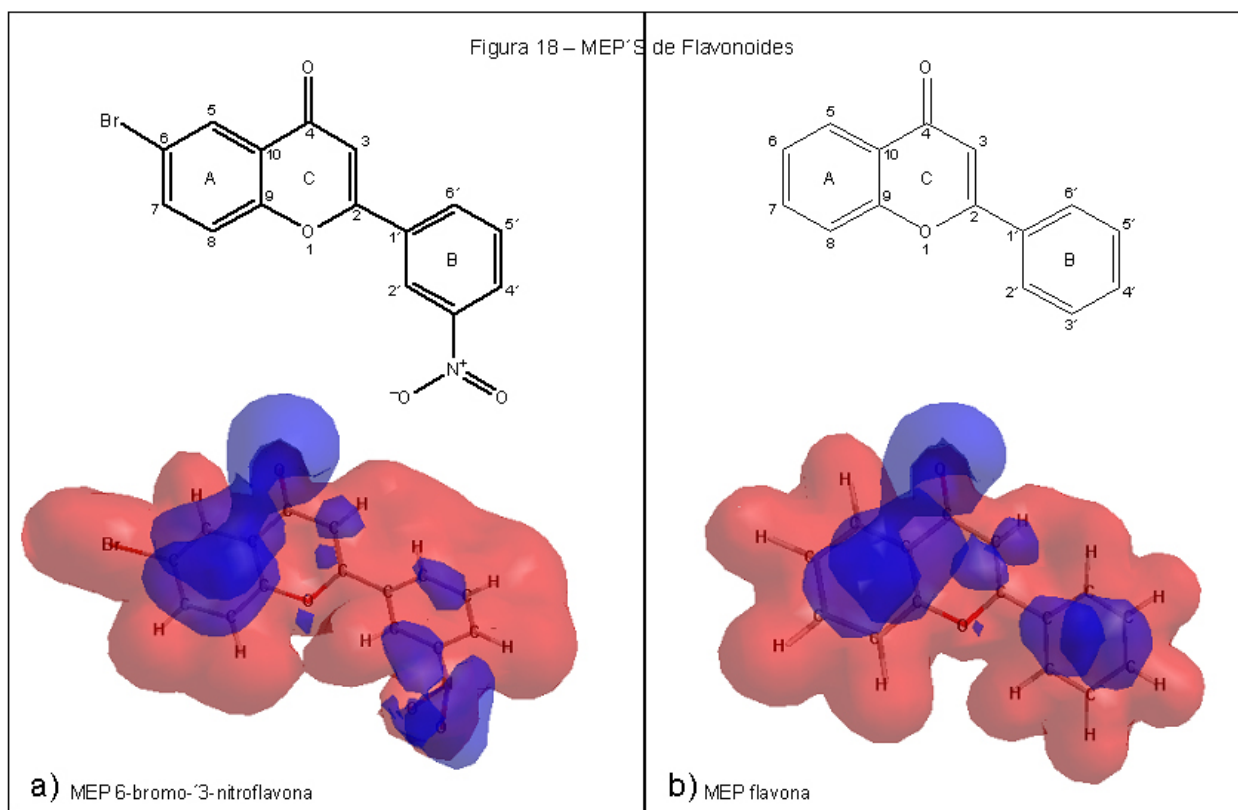


Figura 17- OM de 6-bromo-3'-nitroflavona y la Flavona: a) HOMO del 6-bromo-3'-nitroflavona; b) HOMO de la flavona

Posteriormente se analizó el MEP (potencial electrostático molecular) indicando la distribución de cargas en la molécula fortaleciendo las variables de carga que se seleccionaron en modelos de QSAR (modelo α y β).

En la figura 18 a, b de los compuestos **32** y **1** se representan los potenciales electrostáticos por un coeficiente de contorno en tres dimensiones, mostrando la densidad de carga positiva en rojo y la densidad de carga negativa en azul.

Análisis de los MEP de los compuestos 1 y 32 mostrados en la figura, utilizando los sitios del modelo refinado de Cook ^{18,18*}:



La presencia del grupo nitro en 3' en el compuesto **32** produce una gran zona de densidad de carga negativa (Azul) por sus propiedades atractoras de electrones, produciendo una disminución de la densidad de carga negativa sobre el anillo B, donde se encuentra este como sustituyente. Comparándolo con la flavona, la densidad de carga sobre su anillo se encuentra intacto. Este efecto inductivo producido por el grupo nitro en 3', verificaría la especulación sobre el empobrecimiento de electrones π del anillo B produciendo una unión de transferencia de carga con aminoácidos aromáticos con la zona LDi (ver figura 16); como se indicó anteriormente en el análisis QSAR (modelo **c**). Por otra parte se puede observar en los compuestos **1** y **32** un contorno azul sobre los oxígenos en posición 1 y 4 del puente éter y del grupo carbonilo respectivamente, mostrando que son centros para la formación de enlaces de hidrógeno, ya que son zonas cargadas negativamente y van a interactuar con sitios dadores de hidrógeno, como se describió en el modelo refinado de Cook y verificando la importancia del descriptor molecular TPSA seleccionado en el modelo **a**, de las ecuaciones de QSAR.

El Br en posición 6, se encuentra en una zona de densidad de carga positiva (contorno rojo), eso no significa que tenga esa carga, sino que su interacción sobre el sitio L2 (modelo Cook) es netamente lipofílico (carácter entrópico) y no de interacción hidrofóbica.

Las zonas azules de los anillos A de **1** y **32** tienen un comportamiento similar, mostrando que la densidad de carga negativa interactúa con la zona L1. Así se comprueba que las diferencias importantes para el incremento de la afinidad se encuentran en la interacción con el sitio LDi y el bolsillo L2, dado por los sustituyentes.

3) Superposición molecular de flavonoides y BZD por mecánica molecular

Después de verificar por MEP las diferencias más importantes para el incremento de la afinidad al receptor GABAA entre flavonoides, se procedió a la superposición (Figura 19) realizada en el programa Chemoffice entre el 6-bromo-3'-nitroflavona y el Diazepam (BZD), utilizando conformeros de baja energía por dinámica molecular.⁷⁵

Siendo así se llevó a cabo la superposición que se ajustó por mecánica molecular cuyo RMS tiene un valor 0,033165 Å, siendo RMS la raíz cuadrada del promedio de las distancias de acoplamiento, que indica la acercamiento o alejamiento entre los átomos superpuestos.

Este valor mínimo de RMS indica que ciertas moléculas se orientan de la misma manera en el fármaco 3D. El flavonoide interactúa con el sitio LDi mientras que el plegamiento del anillo B en la benzodiazepina, lejos del sitio LDi explicaría las diferencias de la acción farmacológica como agonista parcial.

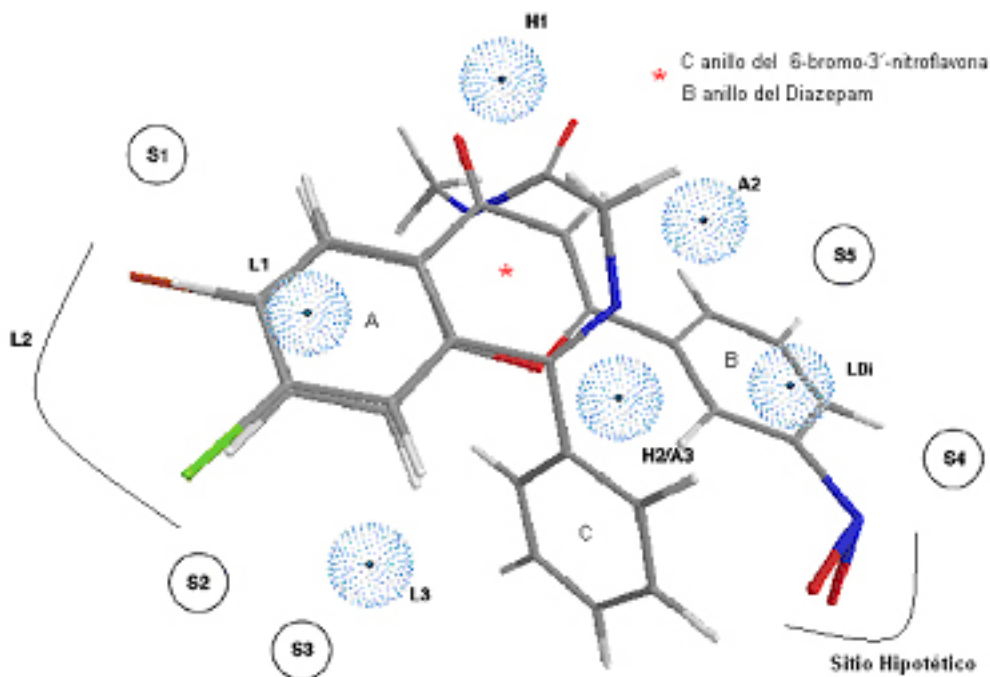


Figura 19 – superposición de 6-bromo-3'-nitroflavona y el Diazepam, sobre modelo refinado Cook

4) Modelos de interacción

De acuerdo a la distribución de carga, los oxígenos en posición 1 y 4, del puente éter y del grupo carbonilo, interactúan con dos sitios opuestos que forman enlaces de hidrógeno.

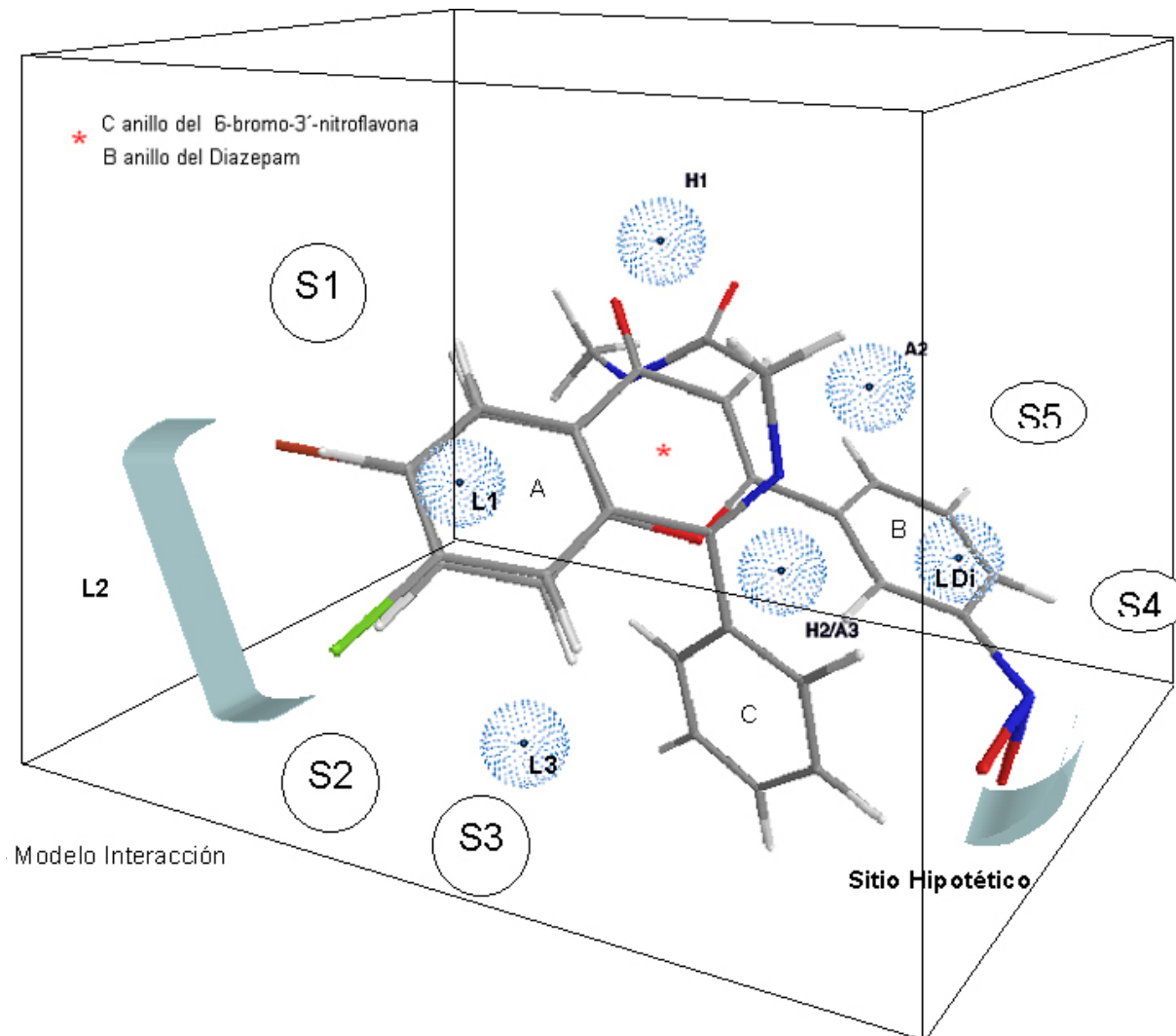
El halógeno en posición 6 interactuaría con zonas hidrofóbicas (L1, L2), donde contribuye también los anillos A tanto de la cromona (del flavonoide) como de la benzodiazepina.

Los grupos carbonilos de ambos compuestos presentan la misma orientación hacia uno de los sitios de unión hidrógeno.

En el caso de las benzodiazepinas el fenilo C se posiciona alejado del sitio LDI por el plegamiento que presenta el anillo 1,4-diazepínico, mientras que el fenilo B de la flavona, si se posiciona sobre el sitio LDI, explicando la diferencia de acción. Esta descripción se encuentra en diferentes trabajos en forma similar.

En este estudio se propone un modelo 3D donde el halógeno por su elevado radio atómico ocupa un volumen en forma de semiesfera, al igual que la orientación de ambos carbonilos.

La dificultad se presenta para explicar la mejor afinidad por la presencia del grupo nitro en 3', sugiriendo un sub-bolsillo que acomode el grupo nitro interactuando con aminoácidos de tipo aromáticos o con densidad de cargas positivas; faltando estudiar si este aumento se correlaciona con un incremento de la actividad farmacológica.



Conclusiones

Los trabajos descriptos en la literatura describen el probable farmacóforo de flavonoides dentro del receptor BZDpínico y aproximan una probable estructura tridimensional.

El presente estudio sugiere una estructura tridimensional del farmacóforo (figura 20) de flavonoides desde una óptica diferente. Los resultados de los cálculos de QSAR indican descripciones tridimensionales, dado por los parámetros ClogP, TPSA, RDF, Qzzp, que definen la distribución de los átomos en el espacio del entorno del receptor. Como lo describe el descriptor RDF y ClogP, mientras que los Qzzp o Qxxm indican la formación de más de un probable dipolo.

La zona lipofílica que engloban los halógenos en posición 6 de los flavonoides o en la posición 7 de las BZDs como así también los grupos metilos de ciertos derivados, adoptaría la forma de una semiesfera.

Ambos grupos carbonilos, en posición 2 y 4 de BZDs y flavonoides respectivamente, interactuarían con el sitio H1 del modelo refinado de Cook.^{18,18*}

La forma molecular es la propiedad que mejor define la estructura tridimensional del receptor debido a que las BZDs presentan un plegamiento en su anillo 1,4-diazepínico adquiriendo forma angular, mientras que la forma de los flavonoides es extendida pudiendo sugerir subsitios distintos que a su vez indican la acción de agonista parcial de los flavonoides.

Esta diferencia explicaría la actividad ansiolítica de los flavonoides sin relajación muscular ni hipnosis, diferenciándose así de las BZDs, ya que el anillo B de los flavonoides interactuaría en el sitio LDI, en el cual no interactúa el anillo C de las BZDs.

El grupo nitro en posición 3' del anillo B de flavonoides aumenta notablemente el $-\log K_i$, no se halla analizado en la literatura, mientras que en este estudio el análisis QSAR propondría una interacción hidrofóbica con aminoácidos hidrofóbicos o con carga positiva como lisina o arginina dada su densidad de carga negativa.

El enfoque final de este estudio será el análisis de docking de flavonoides en la interfase de las subunidades alfa1 y gamma2 del receptor GABA_A y demostrar si el aumento de la afinidad de unión en derivados con grupos NO₂ en posición 3', se correlacionan con actividades farmacológicas similares a las BZDs.

Anexo

Compuestos	Y = -logKi	ClogP	AlogP	MlogP	TPSA	AMR	Hy	HOMO ev	LUMO ev	H-L ev
F21	6.21	2.84	3.801	3.666	30.21	71.851	-0.818	-9.3849	-1.0087	8.3762
F22	6.7	2.98	4.006	4.056	30.21	72.068	-0.776	-9.4123	-1.1512	8.2611
F23	7.64	3.35	4.465	4.177	30.21	76.656	-0.776	-9.4184	-1.1309	8.2875
F24	7.77	3.63	4.549	4.296	30.21	79.474	-0.776	-9.4609	-1.1472	8.3137
F25	6.38	3.11	3.885	3.788	30.21	74.669	-0.818	-9.396	-1.0238	8.3722
F26	6.63	3.25	4.09	4.177	30.21	74.886	-0.776	-9.4219	-1.1651	8.2568
F27	7.64	3.63	4.549	4.296	30.21	79.474	-0.776	-9.4274	-1.1447	8.2827
F28	7.72	3.9	4.633	4.415	30.21	82.292	-0.776	-9.4702	-1.1607	8.3095
F29	7.15	3.11	3.885	3.788	30.21	74.669	-0.818	-9.3668	-0.9946	8.3722
F30	6.7	3.06	3.923	3.723	76.03	80.976	-0.704	-9.7293	-1.8702	7.8591
F31	7.92	2.23	3.212	3.17	121.85	79.661	-0.643	-10.2442	-1.8485	8.3957
F32	9	3.06	3.923	3.723	76.03	80.976	-0.704	-9.6553	-1.6009	8.0544
F33	6.15	3.33	4.099	2.771	70.67	85.68	0.378	-9.317	-0.9648	8.3522
F34	5.52	1.75	2.602	2.041	70.67	70.435	0.341	-9.1942	-0.7508	8.4434
F35	5.52	1.46	2.334	1.253	90.9	72.129	1.103	-9.0122	-0.7505	8.2617
F36	5.1	2.27	3.266	2.29	70.67	75.239	0.361	-9.1972	-0.9122	8.285
F37	5.1	1.89	2.807	2.166	70.67	70.651	0.361	-9.1903	-0.9088	8.2815
F38	6	1.21	2.318	0.731	100.13	78.592	1.069	-9.0383	-0.7923	8.246
F39	5.25	1.46	2.334	1.253	90.9	72.129	1.103	-9.2452	-0.8233	8.4219
F40	4.92	1.18	2.067	0.481	111.13	73.823	1.921	-9.143	-0.7288	8.4142
F41	5.69	1.5	2.585	1.502	79.9	76.898	0.331	-9.0409	-0.7543	8.2866

Tabla 7

f H/L ev.	Pzy	PZZ	Det P	ASP	Dipolo D	Dip X	Dip Y	Dip Z	Energía de Unión Kcal/mol
9.304	49.8039	42.6107	154.9704	0.5	2.264	-1.806	1.199	0.649	-3180.063
8.1761	52.1982	43.3415	156.9959	0.55	3.465	-1.514	2.946	1.016	-3190.644
8.3282	56.7647	44.6546	163.2496	0.6	3.144	-1.545	2.572	0.939	-3163.155
8.2469	59.1303	45.6128	166.4498	0.7	3.251	-1.483	2.725	0.973	-3149.115
9.1776	54.2137	46.3081	156.9613	0.56	2.148	-1.708	1.139	0.637	-3165.861
8.0868	56.6154	47.0379	159.9941	0.57	3.369	-1.401	2.877	1.052	-3176.436
8.2357	61.4402	48.497	166.2539	0.59	3.042	-1.433	2.504	0.967	-3148.946
8.159	64.0248	49.5855	169.4525	0.65	3.151	-1.377	2.652	1.001	-3134.905
9.4177	60.2267	47.0119	158.79	0.77	4.502	-2.526	3.409	1.504	-3165.864
5.2023	70.9662	53.527	178.7089	0.81	3.237	-2.396	-2.396	-0.187	-3340.332
5.5419	71.6677	59.601	181.7303	0.62	5.581	2.672	4.847	0.711	-3545.884
6.0312	71.5061	57.4605	175.1492	0.7	1.977	1.826	0.704	-0.28	-3340.519
9.6569	73.0459	61.5429	178.2022	0.48	1.759	-1.45	0.764	0.638	-3330.596
12.2459	60.6687	54.8218	157.6592	0.49	2.796	-2.685	-0.029	0.776	-3400.862
12.0083	67.9263	57.7166	166.0816	0.56	1.661	-1.585	-0.095	0.487	-3505.048
10.0824	61.0885	56.4062	164.2503	0.39	1.915	-1.774	0.311	0.652	-3376.879
10.1126	61.8311	56.174	159.7909	0.45	1.92	-1.658	0.657	0.71	-3409.788
11.4077	65.2052	64.4019	181.836	0.62	2.011	-1.81	0.66	-0.602	-3877.334
11.2294	54.0829	54.2058	162.8913	0.54	2.946	-2.279	0.604	1.766	-3503.393
12.5453	60.4573	70.2025	170.0639	0.6	2.467	-0.814	0.286	2.311	-3607.8
11.9858	56.2738	58.1186	173.1593	0.44	3.051	-2.615	-0.736	1.388	-3767.753

Tabla 7

ΔH Kcal/mol	SPP	RPCG	PCWTe	DISPm [1612]	QXXm [1613]	QYYm [1614]	QZZm [1615]	DISPv [1616]	QXXv [1617]	QYYv [1618]
0.313	0.616	0.162	13.888	11.056	62.657	217.426	249.358	5.258	46.262	204.284
-43.48	0.608	0.166	13.657	5.795	62.781	268.797	300.67	4.479	46.277	209.038
-5.891	0.609	0.171	13.211	7.84	62.846	328.719	360.484	4.759	46.317	233.635
5.899	0.609	0.164	13.925	20.165	63.171	483.406	514.953	7.009	46.347	250.988
12.265	0.616	0.157	14.202	25.631	101.182	300.894	345.868	9.005	50.828	213.479
-31.522	0.608	0.16	13.954	19.286	101.264	352.638	397.561	8.221	50.839	218.272
6.068	0.609	0.165	13.537	13.511	101.27	413.075	457.914	5.79	50.873	242.932
17.859	0.609	0.158	14.253	14.769	101.56	568.031	612.707	7.085	50.898	260.312
12.262	0.612	0.156	14.549	28.873	37.194	420.456	444.143	10.823	39.044	234.714
17.81	0.918	0.224	16.238	18.423	42.097	602.352	627.65	10.758	41.057	298.616
17.636	0.929	0.182	20.739	6.182	68.126	395.48	433.787	1.057	52.918	280.869
17.623	0.922	0.224	16.299	21.485	65.404	528.009	564.689	10.343	51.776	271.152
-58.714	0.719	0.119	16.026	22.909	129.958	460.101	571.013	8.798	60.539	254.891
-78.256	0.668	0.121	18.995	7.202	52.499	202.854	242.039	1.664	46.454	210
-122.883	0.669	0.112	21.764	4.191	53.425	255.487	295.493	1.217	47.386	230.445
-77.385	0.668	0.126	18.603	6.769	74.766	234.842	268.951	5.276	52.766	218.07
-120.394	0.669	0.121	19.697	6.385	61.401	219.094	255.702	2.254	47.462	211.372
-160.516	0.618	0.107	25.234	3.345	56.894	332.311	370.006	5.098	50.129	309.856
-121.228	0.61	0.118	22.597	9.198	52.983	239.084	277.95	3.424	46.664	227.867
-166.076	0.613	0.109	25.534	6.261	54.032	296.029	335.757	1.702	47.62	249.117
-110.494	0.659	0.119	19.138	5.392	81.232	263.525	325.017	4.775	73.683	239.551

Tabla 7

QZZv [1619]	DISPe [1620]	QXXe [1621]	QYYe [1622]	QZZe [1623]	DISPp [1624]	QXXp [1625]	QYYp [1626]	QZZp [1627]
226.99	0.129	83.488	308.756	349.057	0.555	51.31	221.218	245.399
231.74	0.386	83.551	329.111	369.386	0.607	51.308	220.354	244.536
256.295	0.264	83.508	328.474	368.715	0.436	51.378	257.27	281.397
273.626	0.195	83.491	327.086	367.333	0.589	51.417	279.55	303.651
237.704	0.107	83.639	307.695	347.971	0.913	57.157	233.012	259.174
242.493	0.427	83.703	328.054	368.306	0.965	57.148	232.194	258.357
267.117	0.306	83.661	327.404	367.622	0.535	57.209	269.195	295.311
284.482	0.238	83.644	326.009	366.233	0.657	57.243	291.511	317.609
255.333	0.341	77.445	316.931	355.752	0.938	42.429	259.666	281.159
319.988	0.326	82.037	438.671	479.081	1.158	44.293	316.013	338.268
307.059	0.367	107.515	494.88	547.452	0.087	54.751	278.651	304.995
296.605	0.351	103.836	385.193	435.363	1.13	53.947	291.563	317.412
295.113	0.602	104.758	371.493	434.008	0.797	67.155	278.427	322.337
237.149	0.449	97.715	354.947	410.838	0.246	49.562	222.358	249.975
258.369	0.223	100.463	410.184	468.445	0.067	50.636	240.773	269.284
243.89	0.43	103.081	359.312	414.075	0.574	57.332	232.214	258.283
238.242	0.411	101.839	360.851	415.654	0.222	49.646	221.889	249.503
336.469	0.252	106.41	565.929	622.329	0.409	53.522	326.519	353.823
254.903	0.599	98.136	399.472	455.141	0.416	49.748	239.598	267.125
276.948	0.377	100.968	458.576	516.708	0.216	50.836	258.541	286.981
290.565	0.243	153.338	428.198	532.468	0.332	78.783	250.731	304.355

Tabla 7

Compuestos	Y = -logKi	RDF1e	RDF1.5e	RDF2.0e	RDF2.5e	RDF3e	RDF3.5e	RDF4e	RDF4.5e	RDF5e	RDF5.5e	RDF6e
F1	6	5.741	7.867	3.94	24.689	5.511	9.959	9.093	11.31	12.318	4.547	10.5
F2	5.6	5.868	8.281	3.583	24.359	6.745	10.116	11.136	14.494	14.902	7.059	11.443
F3	6.07	5.868	8.115	3.596	22.99	6.975	9.65	13.498	14.28	13.728	5.347	10.574
F4	6.22	5.868	8.11	3.955	22.948	8.733	9.641	11.219	13.168	14.668	6.64	11.606
F5	6.74	4.774	9.172	3.892	28.015	5.538	11.079	10.023	12.594	18.239	5.52	15.8
F6	8.1	4.774	9	3.901	26.647	5.771	10.613	12.377	12.397	17.065	3.811	14.936
F7	5.9	6.004	8.918	6.374	26.013	6.068	11.301	13.319	16.965	12.897	6.385	10.236
F8	5.68	6.004	8.913	6.737	25.981	7.825	11.29	11.048	15.851	13.836	7.687	11.276
F9	6.68	4.774	8.995	4.411	25.219	8.202	14.384	10.498	12.614	17.009	9.354	15.69
F10	7.6	4.774	8.989	4.265	26.592	7.564	10.615	10.113	11.509	19.925	4.826	7.722
F11	6.38	4.747	8.06	3.376	24.013	6.457	10.556	10.778	15.255	13.283	4.762	10.57
F12	6.42	4.747	8.055	3.742	23.971	8.207	10.559	8.51	14.141	14.211	6.045	11.588
F13	5.45	5.244	8.043	3.656	24.519	5.511	10.184	9.376	12.545	13.304	4.713	9.878
F14	6.04	4.747	8.232	3.363	24.433	5.509	10.23	9.364	13.681	14.31	6.616	10.188
F15	6.93	4.747	8.06	3.372	23.069	5.742	9.763	11.709	13.477	13.117	4.897	9.291
F16	7.38	4.747	8.055	3.735	23.022	7.493	9.753	9.449	12.36	14.057	6.202	10.323
F17	5.44	5.244	8.043	3.656	24.524	5.504	10.193	9.417	14.061	12.347	4.756	8.59
F18	5.6	4.747	8.232	3.359	24.437	5.498	10.243	9.388	15.199	13.357	6.659	8.896
F19	6.74	4.747	8.06	3.368	23.069	5.731	9.777	11.743	14.985	12.171	4.952	8.017
F20	6.94	4.747	8.055	3.731	23.027	7.481	9.767	9.479	13.881	13.11	6.244	9.049
F21	6.21	5.244	7.878	3.66	23.204	5.755	9.604	11.533	12.439	11.514	4.118	11.431
F22	6.7	4.747	8.067	3.372	23.118	5.754	9.649	11.515	13.577	12.528	6.022	11.722
F23	7.64	4.747	7.895	3.373	21.75	5.986	9.183	13.867	13.37	11.326	4.307	10.848
F24	7.77	4.747	7.89	3.74	21.708	7.737	9.173	11.593	12.254	12.263	5.608	11.874
F25	6.38	5.244	7.873	4.016	23.17	7.521	9.599	9.319	11.274	12.415	4.478	10.944
F26	6.63	4.747	8.056	3.727	23.084	7.519	9.644	9.306	12.408	13.419	6.381	11.241
F27	7.64	4.747	7.89	3.729	21.716	7.752	9.18	11.651	12.202	12.244	4.666	10.36
F28	7.72	4.747	7.879	4.095	21.673	9.503	9.173	9.381	11.098	13.18	5.967	11.393
F29	7.15	5.244	7.879	4.019	23.192	7.496	9.528	9.163	11.118	13.086	6.036	10.944
F30	6.7	4.774	8.995	4.264	26.605	7.521	10.601	10.106	11.7	15.593	6.022	7.951
F31	7.92	4.801	10.087	4.433	31.523	5.572	12.045	10.817	11.555	22.674	4.008	15.7
F32	9	4.774	8.995	4.264	26.605	7.521	10.601	10.107	11.283	18.007	5.105	15.955
F33	6.15	5.996	8.349	3.993	23.865	11.784	8.634	11.685	12.504	16.727	7.293	13.1
F34	5.52	6.989	8.324	3.783	25.533	7.523	9.724	12.781	11.528	16.234	4.88	10.412
F35	5.52	7.613	8.549	3.719	25.277	8.771	9.855	14.892	14.961	16.503	4.995	9.181
F36	5.1	6.492	8.335	3.504	25.373	9.044	9.928	13.633	13.846	16.899	5.516	9.89
F37	5.1	6.492	8.5	3.503	26.31	8.236	10.751	12.12	14.562	17.374	4.901	11.123
F38	6	8.374	9.601	5.938	27.453	11.341	11.338	23.242	18.179	19.286	7.762	11.769
F40	4.92	8.238	8.799	3.734	25.446	13.369	9.446	16.356	16.748	17.259	7.228	9.15
F41	5.69	8.374	9.602	5.924	26.945	11.008	11.434	23.549	20.134	20.143	8.677	21.473

Tabla 8

RDF6.5e	RDF7e	RDF7.5e	RDF8e	RDF8.5e	RDF9e	RDF9.5e	RDF10e	RDF10.5e	RDF11e	RDF11.5	RDF12e
5.521	8.364	2.279	3.078	2.561	4.368	1.863	2.032	0.687	0.073	0	0
7.633	11.413	2.067	3.143	5.988	6.219	3.091	2.169	1.142	0	0.898	0
8.865	10.224	1.957	4.73	5.054	7.451	2.467	2.535	0.066	0.646	0	0.045
7.169	11.21	2.81	3.187	4.578	7.242	2.467	1.558	0.943	1.554	0.001	1.025
6.402	13.582	2.777	6.801	6.784	7.249	3.488	3.875	1.881	0	1.741	0
7.635	12.405	2.676	8.388	5.833	8.475	2.817	2.639	1.325	0.615	0	1.554
12.615	9.635	2.495	4.401	6.686	6.622	1.802	3.262	4.835	0.992	0.002	2.265
10.919	10.615	3.348	2.829	6.222	6.401	1.802	2.344	4.666	0.833	0.003	0.375
7.341	10.657	2.731	5.067	2.328	4.966	1.88	1.888	1.044	0.451	0.001	0.995
7.905	10.984	1.23	1.601	6.695	9.239	2.18	1.175	2.58	3.757	0.315	0
8.078	8.585	1.393	4.682	2.952	5.535	1.794	2.579	1.102	0.571	0	0.039
6.379	9.571	2.245	3.126	2.482	5.422	1.786	1.636	0.993	0.461	0.001	1.008
5.173	9.575	2.24	3.811	3.891	5.923	1.863	2.935	0.687	0.066	0	0
6.519	10.814	1.459	3.099	5.228	5.925	2.407	2.181	0.325	0	0.874	0
7.758	9.649	1.351	4.688	4.293	7.145	1.757	2.56	0.082	0.621	0	0.04
6.049	10.637	2.203	3.129	3.821	6.939	1.757	1.599	0.934	0.612	0.001	1.014
5.554	8.365	2.225	1.613	4.01	4.387	0.648	0.865	2.218	0	0.804	0
6.876	9.606	1.447	0.911	5.337	4.38	1.228	1.197	1.807	0	0.04	0
8.118	8.431	1.343	2.496	4.41	5.599	0.545	1.417	2.648	0.621	0	0.924
6.426	9.414	2.196	0.931	3.932	5.387	0.545	0.498	2.512	0.463	0.001	0.006
5.936	7.818	2.749	3.012	3.841	3.684	3.013	1.79	0.693	0.069	0	0
7.271	9.069	1.97	2.304	5.165	3.685	3.574	2.195	1.878	0	0.863	0
8.506	7.886	1.861	3.892	4.22	4.907	2.904	2.564	0.029	1.385	0	0.039
6.802	8.866	2.714	2.334	3.758	4.711	2.908	1.62	0.933	1.421	0.001	1.008
5.067	7.919	3.425	2.984	3.112	3.565	2.377	1.797	0.856	0.071	0	0
6.394	9.167	2.642	2.276	4.434	3.565	2.924	2.201	0.569	0	0.851	0
7.631	7.987	2.536	3.872	3.482	4.791	2.265	2.569	0.03	2.095	0	0.039
5.927	8.966	3.391	2.312	3.041	4.587	2.264	1.626	0.933	0.572	0.001	1.002
6.379	9.42	2.242	2.405	2.49	5.39	1.751	1.641	0.966	0.454	0.001	0.995
9.527	13.461	1.307	1.274	7.015	8.182	2.685	1.037	4.996	3.693	1.194	0
6.842	14.887	3.473	7.145	9.631	10.844	4.497	3.231	5.636	1.393	1.112	0.075
5.931	13.386	3.527	6.826	5.382	8.283	2.809	1.71	3.606	1.102	0.001	1.355
7.993	11.146	4.891	2.186	4.708	4.953	3.93	1.004	3.447	0.556	0.001	1.055
6.175	9.415	4.993	3.257	4.846	3.9	4.025	1.444	3.158	0.054	0	0
7.542	9.551	4.745	1.874	6.936	4.007	2.762	2.522	3.488	2.417	0.976	0
6.557	8.089	4.931	3.135	4.775	4.071	4.045	1.42	3.155	0.054	0	0
6.173	9.456	5.229	3.169	4.733	3.882	4.079	1.398	3.167	0.052	0	0
10.503	13.811	4.574	4.105	9.877	5.213	4.06	4.01	5.373	3.409	2.25	4.047
10.081	10.786	3.87	2.086	9.029	5.109	3.107	3.252	3.671	2.441	0.011	1.646
12.283	13.019	8.329	2.48	7.634	3.889	3.321	2.514	3.432	2.315	1.002	0

Tabla 8

RDF12,5e	RDF13e	RDF13,5e
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0.699	0	1.186
0.687	0	0.08
0	0	0
0.191	2.761	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0.002	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0.214	0.869	0
1.064	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
1.528	0	0.337
0.083	0	0
0	0	0

Tabla 8

MODELOS	Var-01	Var-02	Var-03	Var-04	N	r	S	F
1	CLogP	Pzz	Dip X	QYYp	21	0.953	0.382	39.699
2	CLogP	Pzz	Dip X	QZZp	21	0.958	0.363	44.361
3	ALogP	ASP	Dip X	QXXe	21	0.95	0.394	37.18
4	MLogP	Dip X	QXXm	QZZp	21	0.951	0.392	37.486
5	TPSA	AMR	Dip X	QXXm	21	0.956	0.371	42.403
6	TPSA	Det P	ASP	Dip X	21	0.954	0.38	40.133
7	TPSA	Det P	Dip X	QXXm	21	0.956	0.368	42.968
8	TPSA	ASP	Dip X	QXXv	21	0.951	0.39	37.876
9	TPSA	ASP	Dip X	QZZv	21	0.956	0.37	42.616
10	TPSA	ASP	Dip X	QXXe	21	0.952	0.385	38.953
26	TPSA	Dip X	QXXm	QZZp	21	0.962	0.344	49.874

Tabla – 9 a) –De aquí se seleccionaron los modelos α y β .

MODELOS	Var-01	Var-02	Var-03	Var-04	Var-05	N	r	Q2	S	F
1	RDF1e	RDF3,5e	RDF6e	RDF8e	RDF11e	40	0.908	0.719	0.424	31.806
2	RDF1e	RDF3,5e	RDF6e	RDF11e	RDF12e	40	0.913	0.713	0.411	34.111
3	RDF1e	RDF4,5e	RDF6e	RDF11e	RDF12e	40	0.903	0.728	0.433	30.128
4	RDF1e	RDF5,5e	RDF6e	RDF11e	RDF12e	40	0.91	0.725	0.419	32.681

Tabla – 9 b) – De aquí se seleccionó el modelo γ .

Referencias Bibliográficas

- 1) Ganellin C. R. (1992). Past Approaches to Discovering New Drugs. DRUG DESIGN In: Barton Derek H. R. and Wermuth C. G. (Ed), American Chemical Society, Washington D.C.
- 2) Janssen P. A. J. and Tollenaere (1992). Reflections and Perspectives DRUG DESIGN In: Barton Derek H. R. and Wermuth C. G. (Ed), American Chemical Society, Washington D.C.
- 3) Musser J.H. (1992). Trends in New Lead Identification. DRUG DESIGN In: Barton Derek H. R. and Wermuth C. G. (Ed), American Chemical Society, Washington D.C.
- 4) Schwartz J.C.S. (1992). Molecular Biology of Drug Receptors and the Advent of Reverse Pharmacology DRUG DESIGN In: Barton Derek H. R. and Wermuth C. G. (Ed), American Chemical Society, Washington D.C.
- 5) Marshal G.R. (1992). The Future of Computer Aided Drug Design DRUG DESIGN In: Barton Derek H. R. and Wermuth C. G. (Ed), American Chemical Society, Washington D.C.
- 6) Laduron P.M. (1992). From Membrane to Genomic Pharmacology or from Short-term to Long-term Effects DRUG DESIGN In: Barton Derek H. R. and Wermuth C. G. (Ed), American Chemical Society, Washington D.C..
- 7) Oprea T.; Ho C.M.; Marshall G.R. (1997). De Novo Design: Ligand Construction and Prediction of Affinity. Computer Aided Molecular Design In: Reynolds C., Holloway K. and Cox H. (Ed) American Chemical Society, Washington D.C.
- 8) Tomioka A.I.; Kato Y.; Nishibata Y. And Saito S. (1992). New Rational Approaches for Structure-Activity Relationships and Drug Design. DRUG DESIGN In: Barton Derek H. R. and Wermuth C. G. (Ed), American Chemical Society, Washington D.C.
- 9) Bohacek R.S. and McMartin C. (1997). De Novo Design of Diverse Structures Complementary to Enzyme Binding Sites: Application to Thermolysin. Computer Aided Molecular Design In: Reynolds C., Holloway K. and Cox H. (Ed), American Chemical Society, Washington D.C.
- 10) Willet P. (1997). Using Computational Tools to Analyze Molecular Diversity In: Czarnik A.W., and H. De Witt S. (Ed) A Practical Guide to Combinatorial Chemistry. American Chemical Society, Washington D.C.
- 11) Willet P. (1997). Screening of combinatorial libraries In: Czarnik A.W., and H. De Witt S. (Ed) A Practical Guide to Combinatorial Chemistry, American Chemical Society, Washington D.C.
- 12) Ross Elliot M. (1994) Farmacodinámica: mecanismos de acción y relación entre la concentración y el efecto de los fármacos In: Molinoff Pierry B. and Ruddon Raymon W. (ED). Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Mac Graw Hill Interamericana, 9ª ed.
- 13) Borea P. A.; Gilli G., (1986) et al. Stereochemical Features Controlling Binding and Intrinsic activity properties of benzodiazepine-receptor ligands. Mol. Pharm. 31:334-334
- 14) Villar H.O.; Uyeno T.; Toll L.; Polgar W.; Davies M.F., and Loew G.H. (1989). Molecular Determinants of Benzodiazepine Receptor Affinities and Anticonvulsant Activities. Mol. Pharm. 36:589-600
- 15) Hall David. (2000). Modeling the Functional Effects of Allosteric Modulators at Pharmacological Receptors: An Extension of the Two-State Model of Receptor Activation. Mol. Pharm. 58:1412-1423.
- 16) Baldressani Ross J. (1996). Fármacos y Tratamiento de los Trastornos Psiquiátricos: Psicosis y Ansiedad. In: Molinoff Pierry B. And Ruddon Raymon W. (ED). Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Mac Graw Hill, Interamericana, 9ª ED.

- 17) Young S.; Niehoff D.; Kuhar M.; Beer B., and Lipa A. (1981) Multiple Benzodiazepine Receptor Localization by Light Microscopic Radiohistochemistry. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 216: 425-430.
- 18) Qi Huang; Xiaohui He; Chunrong (2000) et al. Pharmacophore/Receptor Models For Gabaa/Bzr Subtypes (a1 b3 g2, a5 b3 g2 AND a6 b3 g2) Via a Comprehensive Ligand-Mapping Approach. *J. Med. Chem.* 43:71-95.
- 18*) Kahnberg, P.; et. al. (2002). Refinement and Evolution of a Pharmacophore Model for Flavone Derivates Binding to the Benzodiazepine Site of the GABAA Receptor. *J. Med. Chem.*, 45, pp.4188-4201.
- 19) Sigel E.; Schaerer M.T.; Buhr A. and Baur R. The Benzodiazepine Binding pocket of Recombinant a1 b2 g2 g-Aminobutyric Acid a Receptors: Relative Orientation of Ligands and Amino Acids Side Chains.
- 20) Anzini M. (2001) et al. Mapping and Fitting the Pheripheral Benzodiazepine Receptor Binding Site by Carboxamide Derivates. Comparison of Different Approaches to Quantitative Ligand-Receptor Interaction Modeling. *J. Med. Chem.*, 44:1134-1150
- 21) Greco G.; Novellino E., (1994). et al. A Comparative Molecular Field Analysis Model For 6-Arylpiprrolo (2, 1-D) (1, 5) Benzothiazepines Binding Selectively to the Mitochondrial Benzodiazepine Receptor. *J. Med. Chem.* 37: 4100-4108.
- 22) Hurlé M.A. (1997) *Fármacos Ansiolíticos y Sedantes* Florez J.: *Farmacología Humana*, 3ª edición. ED. MASSON, Barcelona.
- 23) Dekermendjian K.; Kahnenberg P.; Witt M., Sterner O.; Nielsen M., and Liljefors T. (1999). Structure-Activity Relationships and Molecular Modeling Analysis of Flavonoids Binding to the Benzodiazepine Site of the Rat Brain Gabaa Receptor Complex *J Med.Chem.* 42:4343-4350
- 24) Miller L.; Greenblatt D.J.; Payul M.S., and Shader R. (1986). Benzodiazepine Receptor Occupancy In Vivo: Correlation With Brain Concentrations and Pharmacodynamic Action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240: 516-522.
- 25) Haberlein H.; Tschiersch K. P., and Schaefer H.L. (1994) Flavonoids From *Leptospermum Scoparium* With Affinitie to the Benzodiazepine Receptor Characterized by Structure Activity Relationships and In Vivo Studies of a Plant Extract. *Pharmazie*, 49: 912-922.
- 26) Trease-Evans. (1991). *Fenoles y Heterósidos Fenólicos* *Farmacognosia* 13ª ED. Interamericana, MacGraw Hill, México, D.F.
- 27) Medina J.; Peña C.; Levi de Stein M.; Wolfman C., and Paladini A. (1989). Benzodiazepine Like Molecules, As Well as Other Ligands for the Brain Benzodiazepine Receptors, Are Relatively Common Constituents of Plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165:547-553
- 28) Paladini A., Marder M., and Medina J., (1996). et al. 6-Bromo Flavone. A High Affinity Ligands for the Chemical Benzodiazepine Receptor is a Member of Family of Active Flavonoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223: 384-389.
- 29) Paladini A.; Marder M.; and Medina J., (1998). et al. Detection of Benzodiazepine Receptor Ligands in Small Libraries of Flavone Derivates Synthetized by Solution Phase Combinatorial Chemistry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249: 481-485.
- 30) Paladini A.; Marder M.; Medina J.; Viola H.; Wolfman C., and Wasoski C. (1999). Flavonoids and the Central Nervous System: from Forgotten Factors to Potent Anxiolytic Compounds. *J. Pharm.* 51: 519-526.
- 31) Gordon M. Crippen. (1982). Distance Geometry Analysis of the Benzodiazepine Binding Site. *Mol. Pharm.* 22: 11-19
- 32) Huang Xiaoqin; Liu, T.; Gu J.; Xiaomin L.; Ruyun J., and Cao Y., (2001). et al.- 3-D QSAR Model of Flavonoids Binding at Benzodiazepine Site in GABAA Receptors. *J. Med. Chem.*, 44: 1883-1891.
- 33) Baldwin, S.L.; Shilady D., and Kier L.B. (1980). Approximate Molecular Potentials of Mescaline Analogues in a Study of Similarities to 5-Hydroxytryptamine. *Mol. Pharm.* 18:455-460
- 34) Diaz Peña, M. (1979) *Teoría de las Fuerzas Intermoleculares. Fuerzas Intermoleculares.* Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Programa Regional de Desarrollo Científico y tecnológico. Washington, D.C.
- 35) Espinosa A.; Gallo M.A. (1993) *Receptores. Naturaleza y Criterios de Identificación e Interacciones Fármaco-Receptor.* Introducción a la Química Farmacéutica In: C. Avendaño.(Ed) Interamericana. MacGrawHill, Madrid,.
- 36) Ivonne Connolly Martín. (1978). Noncovalent Interactions of Importance to Biological Systems In: Marcel Dekker (Ed.) *Quantitative Drug Design*, NEW YORK PRESS.
- 37) Ramsden, C.A., ed. (1990) *Quantitative Drug Desig (Comprehensive Medicinal Chemistry)* (Vol. 4), Pergamon Press.
- 38) Kubinyi, H. (1993) *QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches*, VCH.
- 39) Hansch, C. and Leo, A. (1995) *exploring QSAR. Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*, American Chemical Society.
- 40) Cramer III, R.D., Patterson, D.E. and Bunce, J.D. (1988b). Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). 1. Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 5959-5967.
- 41) Hansch, C., Maloney, P.P., Fujita, T. and Muir, R.M.(1962). Correlation of Biological Activity of Phenoxyacetic Acid with Hammett Substituent Constants and Partition Coefficients. *Nature*, 194, 178-180.
- 42) Hansch, C., Muir, R.M., Fujita, T., Maloney, P.P., Geiger, F. and Streich, M. (1963). The Correlation of Biological Activity of Plant Growth Regulators and Chloromycetin Derivates with Hammett Constants and Partition Coefficients. *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2817-2824.
- 43) Hansch, C. and Fujita, T. (1964). *rsp Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure.* *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 1616-1626.
- 44) Hansch, C., Deutsch, E.W. and Smith, R.N. (1965). The Use of Substituent Constants and Regression Analysis in the Study of Enzymatic Reaction Mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 2738-2742..
- 45) Hansch, C. and Anderson, S.M. (1967). Structure-Activity Relation in Barbiturates and Its Similarity to That in Other Narcotics. *J. Math. Chem.*, 10, 745-753.
- 46) Hansch, C. (1969). Quantitative Approach to Biochemical Structure-Activity Relationships. *Acc. Chem. Res.*, 2, 232-239.
- 47) Hansch, C. (1971). Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design. In *Drug Design*, Vol. 1 (Ariëns, E.J., ed.), Academic Press, New York (NY), pp. 271-342.
- 48) Hansch, C.(1978). Recent Advances in Biochemical QSAR. In *Correlation Analysis in Chemistry* (Chapman, N.B. and Shorter, J., eds.) Plenum Press, New York (NY), pp. 397-438.
- 49) Kubinyi, H. (1993b). *QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches.* VCH Publishers, Weinheim (Germany), 240 pp.
- 50) Kubinyi, H. (1988b). Free Wilson Analysis. Theory, Applications and its Relationships to Hansch Analysis. *Quant.Struct.-Act. Relat.*, 7, 121-133. [R]
- 51) Hansch, C., Leo, A. and Chokeman, D. (1995b). *Exploring QSAR. Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants.* American Chemical Society, Washington (DC), 557 pp.
- 52) Hansch, C. and Clayton, J.M. (1973). Lipophilic Character and Biological Activity of Drugs II: The Parabolic Case. *J.Pharm.Sci.*, 62, 1-21.
- 53) Kubinyi, H. (1977). Quantitative Structure-Activity Relationships. 7. The Bilinear Model, a New Model for Nonlinear Dependence of Biological Activity on Hydrophobic Character. *J. Med. Chem.*, 20, 625-629.

- 54) McFarland, J.W. (1970). On the Parabolic Relationships Between Drug Potency and Hydrophobicity. *J. Med. Chem.*, 13, 1192-1196.
- 55) Higuchi, T. and Davis, S.S. (1970). Thermodynamic Analysis of Structure-Activity Relationships of Drugs: Prediction of Optimal Structure. *J. Pharm. Sci.*, 59, 1376-1383.
- 56) Hopfinger, A.J. and Patel, H.C. (1996). Application of Genetic Algorithms to the General QSAR Problem and to Guiding Molecular Diversity Experiments. In *Genetic Algorithms in Molecular Modeling. Principles of QSAR and Drug Design. Vol. 1* (Devillers, J., ed.). Academic Press, London (UK).
- 57) Judson, R. (1996). Genetic Algorithms and Their Use in Chemistry. In *Reviews in Computational Chemistry-Vol. 10* (Lipkowitz, K.B. and Boyd, D., eds.), Wiley- VCH, New York (NY), pp. 1-73.
- 58) Kemsley, E.K. (1998). A Genetic Algorithms (GA) Approach to the Calculation of Canonical Variates (CVs). *Trac*, 17, 24-34.
- 59) Marder, J.H.; Blanch, L.B.; Viola, H.; Wasowski, C.; Medina, J.H. and Paladini, A.C. (2001). Molecular Modeling and QSAR Analysis of the Interaction of Flavone Derivative With Benzodiazepine Binding Site of the GABAA Receptor Complex. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9, pp. 323-335.
- 60) FolKers, G., Merz, A. and Rognan, D. (1993b). CoMFA: Scope and Limitations. In *3d QSAR in Drug Design. Theory, Methods and Applications*. (Kubinyi, H., ed), ESCOM. Leiden (The Netherlands), pp. 583-618.
- 61) Marshall, G.R. and Cramer III, R.D. (1988). Three-Dimensional Structure-Activity Relationships. *Trends Pharmacol. Sci.*, 9, 285-289.
- 62) FolKers, G., Merz, A. and Rognan, D. (1993a). CoMFA as a Tool for Active Site Modelling. In *Trends in QSAR and Molecular Modelling 92* (Wermuth, C.G., ed.), ESCOM. Leiden (The Netherlands), pp. 233-244.
- 63) Platt, J.R. (1947). Influence of Neighbor Bonds on Additive Bond Properties in Paraffins. *J. Chem. Phys.*, 15, 419-420.
- 64) Wiener, H. (1947c). Structural Determination of Paraffin Boiling Points. *J. Am. Chem. Soc.*, 69, 17-20.
- 65) Testa, B. and Kier, L.B. (1991). The Concept of Molecular Structure in Structure-Activity Relationships Studies and Drug Design. *Med. Res. Rev.*, 11, 35-48.
- 66) Jurs, P.C., Dixon, J.S. and Egolf, L.M. (1995). Representations of Molecules. In *Chemometrics –methods in Molecular Design-Vol.2* (van de Waterbeemd, ed.), VCH Publishers, New York (NY), pp. 15-38.
- 67) Weininger, D. (1988). SMILES, a Chemical Language and Information System. 1. Introduction to Methodology and Encoding Rules. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 29, 31-36.
- 68) Weininger, D., Weininger, A. and Weininger, J.L. (1989) SMILES. 2. Algorithm for Generation of Unique SMILES Notation. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 29, 97-101-
- 69) Weininger, D. (1990). SMILES. 3. DEPICT: Graphical Depiction of Chemical Structures. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 30, 273-283.
- 70) Charton, M. (1983). The Upsilon Steric Parameter X: Definition and Determination. In *Steric Effects in Drug Design (Topics in Current Chemistry, Vol. 114)* (Charton, M and Motoc, I., eds.), Springer-Verlag, Berlin (Germany), pp.1997-2001.
- 71) Todeschini, R., Consonni, V. and Maiocchi, A. (1998). The K correlation Index : Theory Development and its Applications in Chemometrics. *Chemon. Intell. Lab. Syst.*, 46, 13-29.
- 72) Randic, M. (1996a). Molecular Bonding Profiles. *J. Math. Chem.*, 19, 375-392.
- 73) HyperChem 7.0 (2002) (HyperCube, Inc).
- 74) ChemOffice, 2005. (2005). Cambridge Soft.
- 75) Levine, I.R. (2001). *Química Cuántica*. 5ta Ed, Prentice Hall, pp.524-633.
- 76) Todeschini, R.; Consonni, V. DRAGON Software for the Calculation of Molecular Descriptors, Web Version 3.0 for Windows.
- 77) Stanton, D.T. and Jurs, P.C. (1990). Development and Use of Charged Partial Surface Area Structural Descriptors in Computers-Assisted Quantitative Structure-Property Relationships Studies. *Anal. Chem.* 62, pp. 2323-2329.
- 78) Hemmet, M.C.; Steimhauer, V. and Gasteiger, J. (199). Deriving the 3D Structure of Organic Molecules From Their Infrared Spectro. *Vibrat. Spect.*, 19, pp. 151-164.
- 79) BuildQSAR 1.0 (2000), Universidad Federal de Espírito Santo, Brasil.

