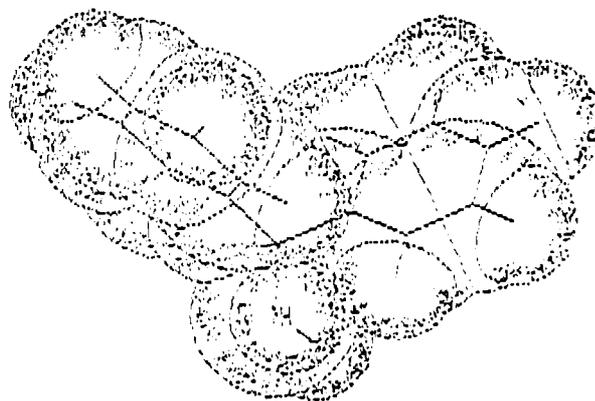


DISEÑO RACIONAL
aplicado a la optimización
de la actividad
antiespasmódica
de derivados de la
BENCIDRILAMINA



Handwritten signature and stamp

(043.2)
TESIS
00855

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Biblioteca
50 y 115 1º subsuelo
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar
Tel 0221 422-6977/79 int. 129



DEX-53634

E. Bruno Blanch

-UNLP- 1990-

Pudo realizarse gracias al apoyo de:

- Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia de Bs.As.
- Colegio de Farmacéuticos de la Pcia de Bs.As.
- Centro de Cómputos del Colegio de Farmacéuticos de la Pcia de Bs.As.
- COFARQUIL (Cooperativa Farmacéutica de Quilmes)
Facultad de Ciencias Exactas -UNLP-

còntando con la colaboración de:

- Dr. Pedro J. Aymonino. Cátedra de Química Inorgánica.Cs.Exactas -UNLP-
- Dr. Benjamín Frydman. Farmacia y Bioquímica -UBA-
- Dr. Eduardo A. Castro. Sección Química Teórica -INIFTA-UNLP-

*Alabado sea el infinito
laberinto de los efectos y de las causas*

*que antes de mostrarme el espejo
en que no vere a nadie o vere a otro
me concede esta pura contemplacion
de un lenguaje del alba.*

J.L. Borges

Agradezco a mi Directora,
Dra. Amalia Gasparri de Vázquez,
el haberme permitido
crear en libertad.

INDICE

	<i>Página</i>
<i>Capítulo 1-</i>	<i>1</i>
<i>Introducción. Desde el fármaco natural al producto optimizado. Etapas de la investigación</i>	
1.1.- Descubrimiento del prototipo activo.	
1.1.1.- Serie de ensayos (screening) farmacológicos.	7
1.1.2.- Aislamiento de productos naturales.	8
1.1.3.- Descubrimiento por casualidad (azar).	8
1.1.4.- Diseño práctico	8
1.2.- Generación del compuesto líder.	
1.2.1.- Modificación química de productos naturales.	9
1.2.2.- Modificación química de sustancias endógenas.	9
1.2.3.- Aprovechamiento y optimización de efectos colaterales y secundarios.	11
1.2.4.- Empleo de metabolitos de drogas.	12
1.2.5.- Modificación racional de la estructura elegida.	13
1.3.- Optimización del líder.	13
Breve discusión de los contenidos presentados.	14

- Capítulo 2-	15
<i>Descubrimiento del Prototipo Activo</i>	
2.1.- Selección de la actividad biológica.	16
2.2.- Análisis de las estructuras que presentan esta actividad.	17
- Capítulo 3-	24
<i>Generación del líder por modificación racional del prototipo activo.</i>	
3.1.- Parámetros de diseño- Descriptores moleculares.	27
a- Parámetros extratermodinámicos, derivados de la aproximación extratermodinámica de Hansch.	27
a.1- Expresión de la hidrofobicidad a través de parámetros extratermodinámicos para una familia de congéneres.	29
a.2- Parámetros descriptores de la influencia electrónica en la actividad biológica	34
a.3- Parámetros descriptores del efecto estérico en relación a la actividad biológica.	42
b- Parámetros estructurales	46
b.1- Parámetros estructurales propiamente dichos	46
b.2- Parámetros subestructurales	47
c- Descriptores geométricos.	51

3.2.-	Descriptores moleculares aplicados al diseño racional del subsistema.	52
-	Capitulo 4-	62
	<i>Familia de congéneres. Su obtención</i>	
4.1.-	Consideraciones generales.	65
4.2.-	Lineamientos generales de la reacción de Leuckart.	68
4.3.-	Método de Leuckart en la preparación de los elementos de la familia de congéneres.	72
4.3.1.-	Síntesis de Bencidrilamina	72
4.3.2.-	Preparación de derivados 4-sustituídos.	75
4.3.3.-	Preparación de derivados 4-sustituídos-N-sustituídos	79
4.3.4.-	Preparación de derivados N-sustituídos.	82
-	Capitulo 5-	89
	<i>Familia de congéneres. Su actividad antiespasmódica</i>	
5.1.-	Principales conceptos vinculados a la cuantificación y expresión del dato biológico.	91
5.2.-	Modelo metactóide para la interacción biológica de los derivados de la Bencidrilamina.	98

5.3.- Expresión numérica de la actividad biológica.	99
5.4.- Actividad biológica de los derivados ensayados.	101
5.4.1.- Condiciones experimentales generales del ensayo biológico	103
- Capítulo 6-	104
<i>Relación Estructura-Actividad aplicada a la cuantificación de las modificaciones estructurales introducidas en la etapa de generación del líder. Elección de los parámetros de diseño mas adecuados para su optimización.</i>	
6.1.- Relaciones estructura-actividad en el análisis de la familia de congéneres.	108
6.1.1.- Parámetros fisicoquímicos clásicos como descriptores moleculares.	108
6.1.2.- Empleo de métodos químico-cuánticos para la caracterización de las estructuras (elementos de la familia de congéneres)	117
a- Análisis conformacional. Modelado molecular.	121
b- Métodos químico cuánticos para el cálculo de descriptores moleculares. Hückel Extendido	132

Optimización del líder.

7.1.- Lineamientos del diseño de las modificaciones estructurales en base a la racionalización del comportamiento de la serie de congéneres.	151
7.2.- Elección del líder	152
7.3.- Optimización del líder	153
7.3.1- Diseño de las modificaciones	153
7.3.2- Síntesis de los derivados	158
a)Preparación de derivados 4-aril sustituídos.	158
b)Preparación de derivados N- sustituídos.	160
c)Preparación de derivados 4-sustituídos-N-sustituídos	169
d)Ausencia de la porción estructural $\text{>C-N} \begin{matrix} \text{R} \\ \text{R} \end{matrix}$	172
e)Ausencia de un resto fenilo	173
7.3.3.- Determinación de la actividad antiespasmódica	175
7.4.- Análisis del conjunto de derivados de la Bencidrilamina que constituyen la familia farmacológica.	176
7.5.- Discusión de la actividad lograda en la etapa de optimización	181

<i>Capítulo 8-</i>	<i>182</i>
<i>Conclusiones.</i>	
<i>Bibliografía</i>	<i>185</i>
<i>Apéndice</i>	<i>209</i>

- CAPITULO 1 -

- Introducción-

**Desde el fármaco natural
al producto optimizado**

- Etapas de la investigación-

El análisis de la relación entre la estructura química de grupos de sustancias y su actividad biológica ha demostrado ser de gran utilidad para la síntesis de nuevas drogas de mayor efectividad y/o selectividad [1-4]. Debido al enorme esfuerzo científico y económico dedicado al descubrimiento de fármacos específicos, el intento de encontrar reglas, empíricas o no, que vinculen características individuales de la estructura de la sustancia y su efecto en el sistema biológico encuentra sobrada justificación.

Muchos son los datos experimentales publicados [5-12] cuya conjunción demuestra la existencia de relaciones definidas entre las propiedades fisicoquímicas de las sustancias y su actividad biológica. La elucidación del origen de tales relaciones entre las propiedades de los compuestos y su acción biológica en el organismo hace posible arribar a ideas concernientes al mecanismo de las interacciones químicas y/o fisicoquímicas biológicamente importantes y establecer, sobre esta base, los requerimientos estructurales de la nueva molécula. Este tipo de análisis conduce simultánea e indiscutiblemente a la predicción de la acción biológica de la sustancia a sintetizar.

La idea de que la actividad biológica de un compuesto dado es función de su estructura química fue propuesta ya en en 1869 por Crum-Brown y Frazer [13], quienes observaron que la intensidad de la acción narcótica de ciertas sustancias decrecía con el aumento de solubilidad en agua. La evolución posterior de este concepto llevó a considerar la actividad biológica como función de las propiedades fisicoquímicas [2,14-18] asociadas a la estructura molecular que la posee, con la consecuente comprensión de la causa estructural generadora de su actividad.

Este mutuo aporte de ambos campos del conocimiento se ha afianzado en el tiempo, quedando definido en sí mismo como *RELACIÓN ESTRUCTURA ACTIVIDAD* (*Structure Activity Relationship-SAR*) [2,14,15]. La consiguiente sistematización de estos procedimientos condujo a un empleo ordenado de las distintas etapas necesarias para su implementación, vinculadas principalmente a:

- 1) búsqueda de relaciones cuantitativas,
- 2) examen de su origen,
- 3) interpretación de sus implicancias,

constituyéndose ya en una metodología de investigación ampliamente aceptada e identificada como *RELACIÓN ESTRUCTURA ACTIVIDAD CUANTITATIVA (Quantitative Structure Activity Relationship-QSAR)*

El término droga se asigna a una molécula biológicamente activa que no existe en el organismo o, existiendo previamente, se administra a éste de manera de elevar notoriamente los niveles naturales. En esta definición quedan no sólo incluidos los compuestos de uso en la terapéutica humana, sino también aquellos de uso veterinario o agroquímico [14,15,19].

Resultan innumerables las drogas diferentes, en cuanto a su estructura y/o su actividad, que se han sintetizado o aislado durante los pasados 100 años, principalmente por métodos empíricos. Como consecuencia natural de este excesivo empirismo surgió, entre los investigadores abocados a la síntesis de compuestos biológicamente activos, el deseo de lograr una predicción cualitativa de la actividad de las sustancias ya al planificar su preparación. Esta investigación programada fue originando gradualmente una rama de la *Química Medicinal*, llamada diseño de drogas, la cual, en forma muy general, puede definirse por la incorporación de nuevas estructuras activas, racionalmente diseñadas, a la *Farmacología Clínica*. Sin embargo, no deben dejarse de lado en esta definición las etapas previas de investigación, sin duda las más laboriosas, en las cuales las propiedades biológicas se ensayan en animales de experimentación, recibiendo en consecuencia el nombre de *Farmacología Experimental*.

Entre las drogas sintetizadas en las distintas etapas de estas investigaciones, muy pocas son las que llegan a ser introducidas en la práctica terapéutica. Datos estadísticos [14,15,20-22] indican la necesidad de preparar y analizar entre 6.000 y 10.000 compuestos por cada nueva droga que llega a ser empleada. En determinados casos esta cifra crece, como en la investigación de estructuras con propiedades

anticonvulsivas, que hizo necesario ensayar 400.000 compuestos. Esta situación se torna aún más compleja en el caso de los compuestos con propiedades anticancerígenas y antivirales, donde el orden de los compuestos alcanzó los 40.000.000 [15,23]. Resulta ilustrativo al respecto mencionar que la comercialización de dos nuevos productos por Ciba-Geigy [24] en 1974 requirió la preparación previa de 10.000 compuestos incluyendo intermediarios, siendo 4.000 el número de éstos evaluados farmacológicamente y sólo 40 los sometidos a pruebas clínicas.

Por otro lado, aumentan en forma notoria y constante las exigencias para la aceptación de nuevos fármacos, tanto en relación a su especificidad y efectividad como a la disminución de efectos colaterales [14,15]. Es así cada vez menor el número de drogas que reúnen los requisitos necesarios para su aceptación en uso comercial, aparejando ésto el aumento simultáneo del costo total de producción, de aproximadamente 4.000.000 a 140.000.000 de dólares desde la década del 60 a la actualidad [25].

Las primeras investigaciones orientadas a la optimización de una droga para un fin determinado consistían en la síntesis de compuestos elegidos más o menos al azar, sobre la única base de la intuición científica, los que posteriormente se evaluaban farmacológicamente. Tal procedimiento de prueba y error requiere obviamente la síntesis de un gran número de compuestos, proceso que consume largo tiempo de investigación sin asegurar una línea exitosa, elevando además los costos de manera considerable. Con el objetivo fundamental de mejorar esta relación desfavorable entre el costo de la investigación necesaria para la obtención de cierta información y la relevancia de la misma, se han desarrollado y existen en la actualidad varios métodos, especialmente teóricos [15,26], fundamentados en la existencia de una relación cuantitativa, expresable por una ecuación matemática, entre la estructura de un compuesto dado y sus propiedades de interés. En la práctica, estos métodos permiten decidir en forma racional las características de los compuestos a sintetizar,

aumentando así la probabilidad de que estos manifiesten las propiedades buscadas.

Las técnicas más antiguas partían del análisis de un conjunto de compuestos elegido "cuasi arbitrariamente". La evolución posterior no prescinde de esta selección inicial, pero adjudica mayor relevancia a la posterior optimización de los compuestos, miembros del conjunto. En un proceso de racionalización, se ha pasado a elegir un conjunto inicial de compuestos químicos caracterizado por presentar una actividad biológica común que lo define. A partir de éste debe poder ser generado un subconjunto (subsistema) por variaciones sustanciales sobre una estructura básica común, perteneciente al conjunto (sistema) inicial, a la cual se hace referencia como *Prototipo activo* [19,20]. Siendo imposible la inclusión de todas las posibles estructuras así derivadas en el subsistema, conocido como *familia de congéneres*, sólo se busca la representatividad en la elección de este subconjunto (capítulo II).

Todas las etapas de generación de este subsistema incluyen, sin duda, un cierto grado de incerteza, que disminuye a medida que se va llegando al compuesto final, debido a que no existen suficientes criterios racionales para su selección. El proceso global así descrito se conoce como *Generación del Compuesto Líder* [14,15,19] (Capítulo III). En forma muy general, un compuesto líder se define como la estructura más favorable perteneciente a este subsistema, tanto en relación a sus propiedades biológicas como a su posibilidad de optimización (con eliminación de los efectos colaterales no deseados) por modificaciones en su estructura química.

Este compuesto líder generará posteriormente, a través de las modificaciones de su estructura ya mencionadas, un nuevo subconjunto, en un procedimiento que puede ahora conducirse en base a una metodología más racional y programada, derivada del estudio exhaustivo de las estructuras químicas y actividad biológica de los compuestos del subconjunto original. Por conducirse en forma más racional, esta última etapa de "optimización del líder" se constituye en la etapa más relevante del diseño racional de fármacos.

El descubrimiento y/o desarrollo de una nueva droga puede entonces describirse como un proceso que comprende tres etapas, las que pueden ser todas necesarias o no, en cada uno de los diferentes casos.

1-DESCUBRIMIENTO DEL PROTOTIPO ACTIVO.

2-GENERACIÓN DEL COMPUESTO LÍDER.

3-OPTIMIZACIÓN DEL COMPUESTO LÍDER.

Antes de detallar las distintas metodologías que permiten llevar a cabo cada una de estas etapas, debemos recordar que una investigación farmacológica involucra el aporte conjunto de las ciencias química y farmacológica. Por lo tanto, la eficiencia de la investigación no dependerá exclusivamente del eficiente manejo químico en la modificación de las estructuras, sino también de la correcta elección de los tests biológicos en función de la actividad elegida. Tres elementos principales deben tenerse en cuenta al elegir la forma de determinación de una actividad biológica [19]:

* **Capacidad del test biológico** , dada por el número de compuestos que pueden ser ensayados en un tiempo determinado. Se deben buscar ensayos que , en la medida de lo posible sean rápidos, permitiendo evaluar y resolver el mayor número de derivados en el menor tiempo posible.

* **Poder de discriminación**, dado por la aptitud del ensayo biológico para diferenciar un compuesto promisorio de aquellos que no lo son.

***Relevancia farmacológica**, dada por la correlación (no necesariamente correspondencia) entre el efecto biológico medido y la actividad clínica requerida.

La selección en base a estas tres características permite disminuir el número de ensayos biológicos a los que se somete una sustancia de interés.

Distintas metodologías resultan apropiadas para cada una de las tres etapas involucradas en la generación de una nueva estructura farmacológicamente activa:

1-DESCUBRIMIENTO DEL PROTOTIPO ACTIVO.

1.1-Serie de ensayos (screening) farmacológicos [15]

Consiste en someter a varios compuestos, objeto de estudio, a una serie de tests biológicos a fin de determinar que actividad biológica poseen. En los primeros estadios de este tema de investigación la mayoría de las drogas fueron descubiertas por este procedimiento estocástico. Es un buen método, pero de alto costo en la búsqueda de nuevas drogas. A pesar de estas limitaciones se continúa aplicando en aquellos casos donde no se conocen los mecanismos responsables de la actividad.

1.2- Aislamiento de productos naturales.

El conocimiento de la actividad biológica de un producto natural está, en la mayoría de los casos, aportada por la medicina popular. El procedimiento consiste básicamente en la separación del compuesto químico que posee dicha actividad del medio natural en el cual se encuentra. Las etapas que se pueden diferenciar en este procedimiento son : acondicionamiento del material, extracción de distintas fracciones, purificación de la fracción que mostró mayor actividad, caracterización del compuesto/s activo/s, identificación y elucidación de la estructura responsable de la actividad biológica.

Entre las drogas de uso clínico que fueron introducidas por este procedimiento podemos citar a la morfina, atropina, quinina, glicósidos cardíacos y prostaglandinas, además de ciertos compuestos antibacterianos derivados de hongos y bacterias [19].

1.3- Descubrimiento por casualidad (azar).

Como en toda rama de la investigación científica, no pueden dejar de mencionarse hechos fortuitos o accidentales que han llevado a la introducción de nuevas drogas ya sea por error o casualidad . Entre ellos puede mencionarse la administración de acetanilida como antipirético, en la creencia errónea de que lo que se estaba administrando era naftaleno, al cual se le asignaban dichas propiedades [27]. Investigaciones posteriores a su comercialización como antifebrina llevaron al desarrollo de la fenacetina (p-etoxiacetanilida), llegando finalmente al compuesto de uso terapéutico actual paracetamol (p-hidroxiacetanilida) que resultó ser su metabolito.

1.4- Diseño práctico.

En oposición a los procedimientos más clásicos antes descriptos, el diseño práctico apunta directamente al objetivo medicinal [19] . El conocimiento de las características estructurales de varios compuestos con actividad farmacológica común permite seleccionar una estructura química suficientemente sencilla la cual, conteniendo una "porción estructural clave" (subestructura), permita caminos sencillos de modificación con generación de nuevos derivados.

Aceptando que cada subestructura no contribuye en forma independiente a la actividad, su aparición reiterada en compuestos con la misma actividad biológica, aunque con distintas características, tanto en relación a su potencia como a la importancia de los efectos colaterales, permite el empleo de este "parámetro de similitud" para la elección o diseño práctico del prototipo activo.

El procedimiento así descrito tiene cierta vinculación con el rudimentario screening farmacológico, pero descarta las condiciones de selección al azar. Si bien coincide en la elección del prototipo activo a partir del análisis de un conjunto inicial, difiere en la metodología de generación de este conjunto.

2- GENERACIÓN DEL COMPUESTO LÍDER.

Los mecanismos de generación del compuesto líder consisten fundamentalmente en la introducción de modificaciones químicas en la estructura del prototipo activo, en un testeo de las características generales que deben reunir estas modificaciones para lograr el sentido de variación de la actividad biológica deseada.

2.1- Modificación química de productos naturales.

Consiste en la introducción de modificaciones estructurales en un dado producto natural de actividad biológica conocida, analizando simultáneamente la modificación producida en la actividad medida. Un ejemplo de esta metodología se encuentra en el descubrimiento de drogas anticoagulantes del grupo de las cumarinas [15,28], estudio originado en la enfermedad producida por el "trébol dulce", que permitió la detección del agente tóxico "dicumarol" (bishidroxicumarina), compuesto que actúa como anticoagulante inhibiendo la síntesis de protombina. Pueden también mencionarse las modificaciones introducidas en la cadena 6-acilamínica de la penicilina G , mediante las cuales se lograron penicilinas más resistentes a los jugos gástricos y a las penicilinasas (ampicilinas, flucloclaxiclina) [29].

2.2-Modificación química de sustancias endógenas.

Mediante la introducción o reemplazo de átomos o grupos de átomos (isósteros), o alterando la estructura básica de forma tal de generar antimetabolitos, antivitaminas o antihormonas, se obtienen drogas de acción semejante a los compuestos endógenos originales, que exhiben a su vez propiedades biológicas más favorables.

Las modificaciones introducidas a la noradrenalina (Fig.1.1) ejemplifican este procedimiento. Siendo ésta estimulante de los receptores α y β adrenérgicos, variaciones estructurales permiten

llegar al isoprotenerol (fig.1.2), agonista de ambos receptores β_1 y β_2 y de éste al salbutamol (fig.1.3), predominantemente estimulante β_2 y por consiguiente de importancia terapéutica como antiasmático [30].

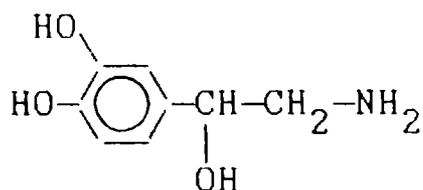


Figura 1.1- noradrenalina,
estimulante adrenérgico α y β

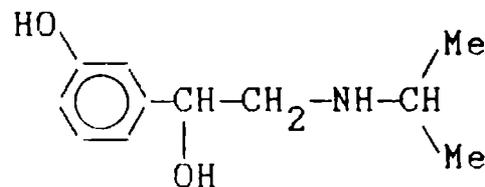


Figura 1.2- isoprotenerol,
predominantemente estimulante β_1 y β_2

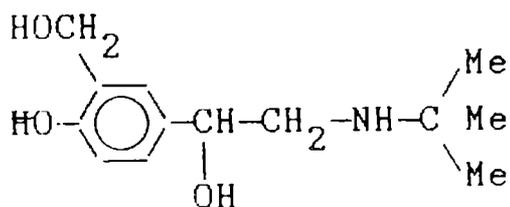


Figura 1.3. Salbutamol,
estimulante β_2

Similarmente en el campo de los contraceptivos, la hormona natural progesterona (fig.1.4) se caracteriza por su efecto débil y corto. Usada como punto de partida, su modificación permitió la obtención de (+)-norgestrel (fig.1.5), de marcada e intensa actividad progestacional y larga duración, sumando la ventaja de su vía oral de administración [31].

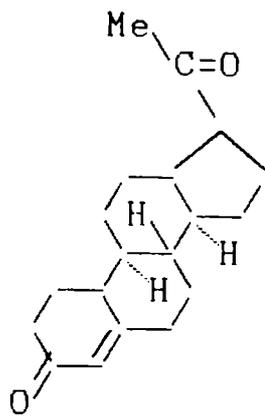


Figura 1.4. Progesterona
efecto corto y débil

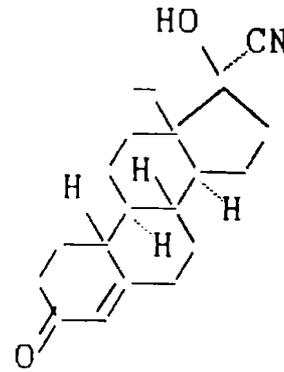


Figura 1.5.(+)-norgestrel
marcada actividad y larga duración

2.3-Aprovechamiento y optimización de efectos colaterales o secundarios .

La experiencia adquirida en clínica médica y farmacología juega a menudo un rol decisivo en la incorporación de drogas conocidas a nuevas actividades, distintas a las aprovechadas hasta el momento, a partir de la observación de los efectos secundarios y la consiguiente introducción de modificaciones estructurales que logren potenciar el efecto elegido.

El estudio de los efectos colaterales de las sulfonamidas, inicialmente usadas como agentes quimioterapéuticos, permitió, por ejemplo, mediante la elección de las modificaciones estructurales más adecuadas, la obtención de compuestos de acción antidiabética de administración oral (tolbutamida, clorpropamida), saluréticos (clorotiazidas, furseמידا) y antihipertensivos (diazóxido) (fig.1.6) [14,15,28]. El procedimiento aquí descrito involucra, en realidad , las etapas 1 y 2 del desarrollo de un fármaco.

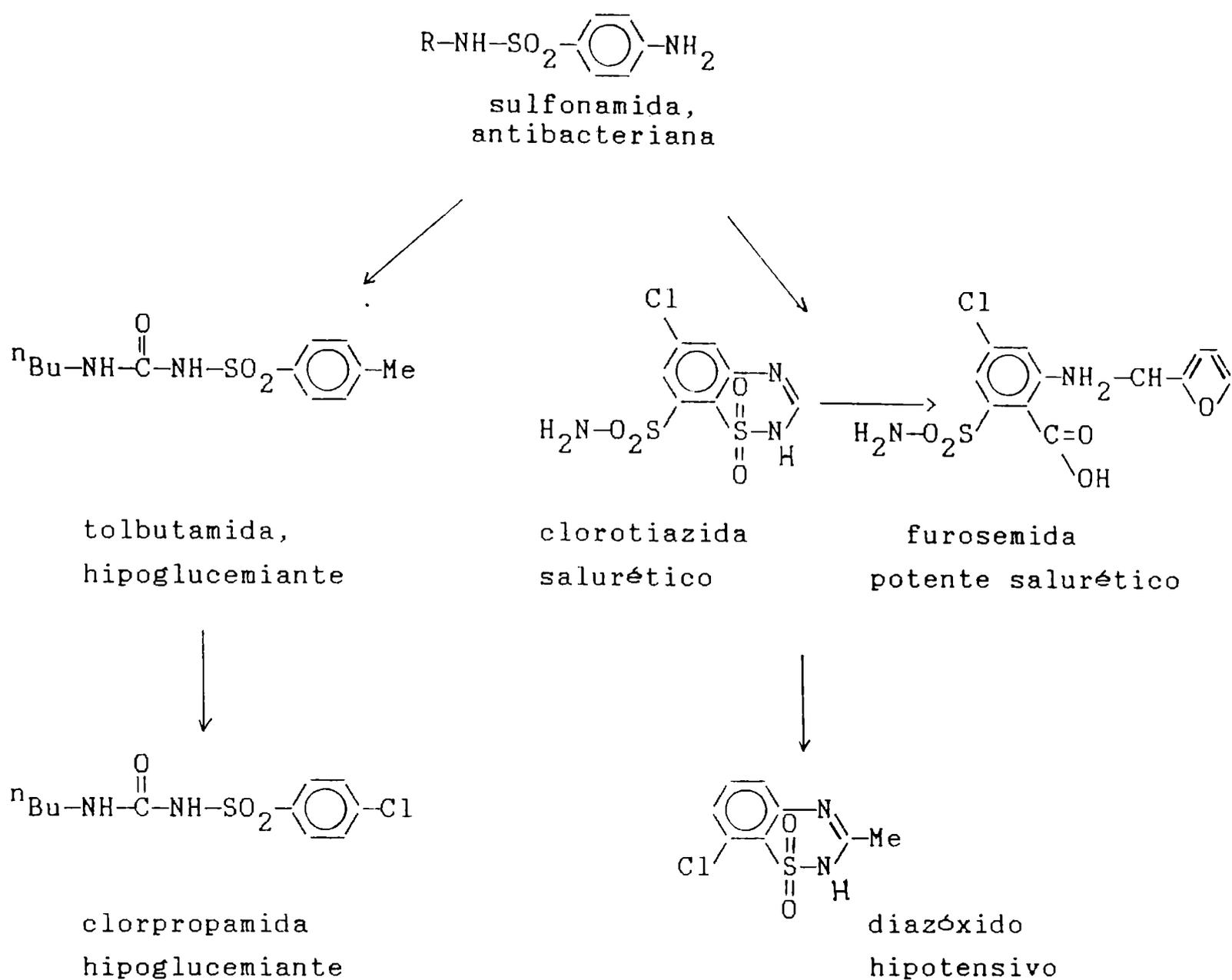


Figura.1.6 - Derivados de sulfonamidas por optimización de sus efectos colaterales

2.4- Empleo de metabolitos de drogas

La metabolización de un precursor, en general no activo, (prodroga) en un medio adecuado, genera el principio activo. Así, el colorante azoico prontosil, marcadamente tóxico, inactivo in vitro pero activo in vivo genera en su metabolización la sulfanilamida (metabolito), agente antibacteriano [15,20,32,33], (fig.1.7)

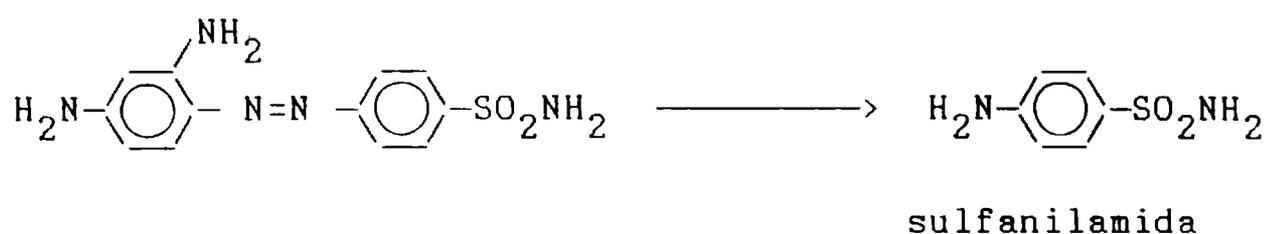


Figura.1.7. Metabolización del Prontosil.

2.5- Modificación racional de la estructura elegida.

La introducción de modificaciones estructurales sobre una estructura inicial (prototipo activo) y el paralelo análisis de la variación de la respuesta biológica frente a cada una de estas modificaciones, permite no sólo generar un conjunto de compuestos de características similares, tanto en el aspecto estructural como farmacológico, sino analizar en forma racional el sentido de las modificaciones más adecuadas para el logro de la respuesta buscada.

Esta metodología de generación de un líder puede ser aplicada a un prototipo activo descubierto por cualquiera de los mecanismos antes mencionados. Sin embargo, la tendencia actual remarca la importancia de una "metodología racional" de trabajo, que asocie las etapas 1.4 y 2.5.

3- OPTIMIZACIÓN DEL LÍDER

En base al conocimiento del comportamiento modificación química-respuesta biológica adquirido en la etapa de "generación del líder", es posible trabajar sobre una metodología más racional que pretenda el conocimiento previo cuali-cuantitativo de los logros a obtener.

Dada la importancia de esta metodología racional, conocida como etapa de optimización del líder, en relación al trabajo aquí presentado, se tratará en forma detallada en el Capítulo VII.

Breve discusión sobre los contenidos presentados.

La implementación de este tipo de metodología de trabajo, en la cual la racionalidad matemática se suma a la intuición química con el fin común de la obtención de nuevas drogas, data principalmente de la década del 70. Por lo tanto no existen aún criterios coincidentes entre los distintos autores, tanto en relación a la definición de prototipo activo o compuesto líder como a la diferenciación de las distintas etapas involucradas en el diseño de un fármaco [14,15,28,34]. En contraposición con la metodología de trabajo aquí propuesta, ciertos esquemas parten de la elección de un compuesto líder sobre una base comparativa de las características de compuestos ya conocidos, aplicando los criterios de diseño en la etapa de optimización.

Se encuentran también discrepancias entre la importancia relativa conferida a la intuición química y a los resultados de análisis estadísticos.

La metodología aquí presentada está condicionada, en consecuencia, por la subjetividad inherente a la elección del autor. Su lectura detallada pone de manifiesto que, dada la cantidad de factores que influyen en una dada respuesta biológica, no existe parámetro descriptor ni análisis estadístico que, exento del criterio químico, permita volcar la interpretación de los datos obtenidos a la ubicación de las porciones moleculares indispensables para la manifestación de la actividad o a una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en la acción biológica.

- CAPITULO 2 -

**Descubrimiento del
prototipo activo**

Con la intención de desarrollar un estudio metódico y programado, en el cual de ninguna manera se descarta la importancia de la intuición química, se opta por los métodos de diseño práctico, los que analizan características estructurales comunes de compuestos que presenten una dada actividad terapéutica de relevancia clínica.

En esta primera etapa del diseño de drogas reviste particular importancia el criterio intuitivo en la elección de un esqueleto estructural base sobre el cual trabajar para el logro de mejores índices terapéuticos. Frente al particular interés en una determinada actividad farmacológica, un simple y exhaustivo estudio de los datos publicados, ya reconocidos, nos definirá un primer conjunto de sustancias que la poseen [19].

2.1- SELECCIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Casi con total rigor puede afirmarse que no existen actualmente drogas cuyo índice terapéutico no merezca ser sometido a estudios profundos orientados principalmente al logro de una acción más específica con simultánea disminución de efectos colaterales.

El avance del conocimiento permite definir cada vez más específicamente ciertos factores que resultan determinantes en relación a la vida humana. Algo tan rutinario como una contracción muscular permite descubrir su importancia ante la toma de conciencia de que contracciones involuntarias (espasmos) participan en la definición de los límites de nuestra vida, desde el nacimiento (contracción involuntaria del útero), hasta la muerte (espasmo coronario, espasmo bronquial).

Resulta así un desafío el control, a través de la comprensión de su origen, de estos espasmos involuntarios y del mecanismo que induce su aparición en el organismo humano. La aceptación de este desafío nos lleva a abordar el estudio de la actividad espasmolítica.

2.2-ANÁLISIS DE LAS ESTRUCTURAS QUE PRESENTAN ESTA ACTIVIDAD.

Un grupo de compuestos químicos que poseen una o más propiedades comunes definen un conjunto por comprensión. En esta etapa de descubrimiento de nuestro prototipo activo definimos en primer lugar un conjunto CAE., formado por todos aquellos Compuestos que manifiesten Actividad Espasmolítica al actuar, por un mecanismo no competitivo, sobre la musculatura lisa.

Las contracciones involuntarias o espasmos en músculo liso son generados fisiológicamente por un aumento de la concentración de acetilcolina o histamina [35], la que produce a su vez un aumento de la concentración de ion Ca^{++} intracelular [19,36-39]. En respuesta a los efectos producidos por estos agonistas, la relajación del músculo liso puede lograrse por un mecanismo competitivo, en el cual los antagonistas bloquean los sitios receptores del agonista, o por un mecanismo no competitivo que implica la acción de la droga en la recuperación de los niveles de calcio intracelular [35,40]. Independientemente del mecanismo involucrado, la importancia del ion Ca^{++} en la contractilidad muscular queda hoy fuera de toda discusión.

Buscamos entonces una porción estructural común a los antiespasmódicos no competitivos de actividad relevante, que nos permita el diseño práctico de nuestro prototipo activo, dejando de lado por el momento toda discusión sobre los distintos mecanismos de acción asociados al efecto de las distintas estructuras en los niveles de Ca^{++} intracelular. Consideramos para esto otros dos conjuntos definidos por los Compuestos Aromáticos No Heterocíclicos (CANH) y Aromáticos Heterocíclicos (CAH) (Fig.2.1).

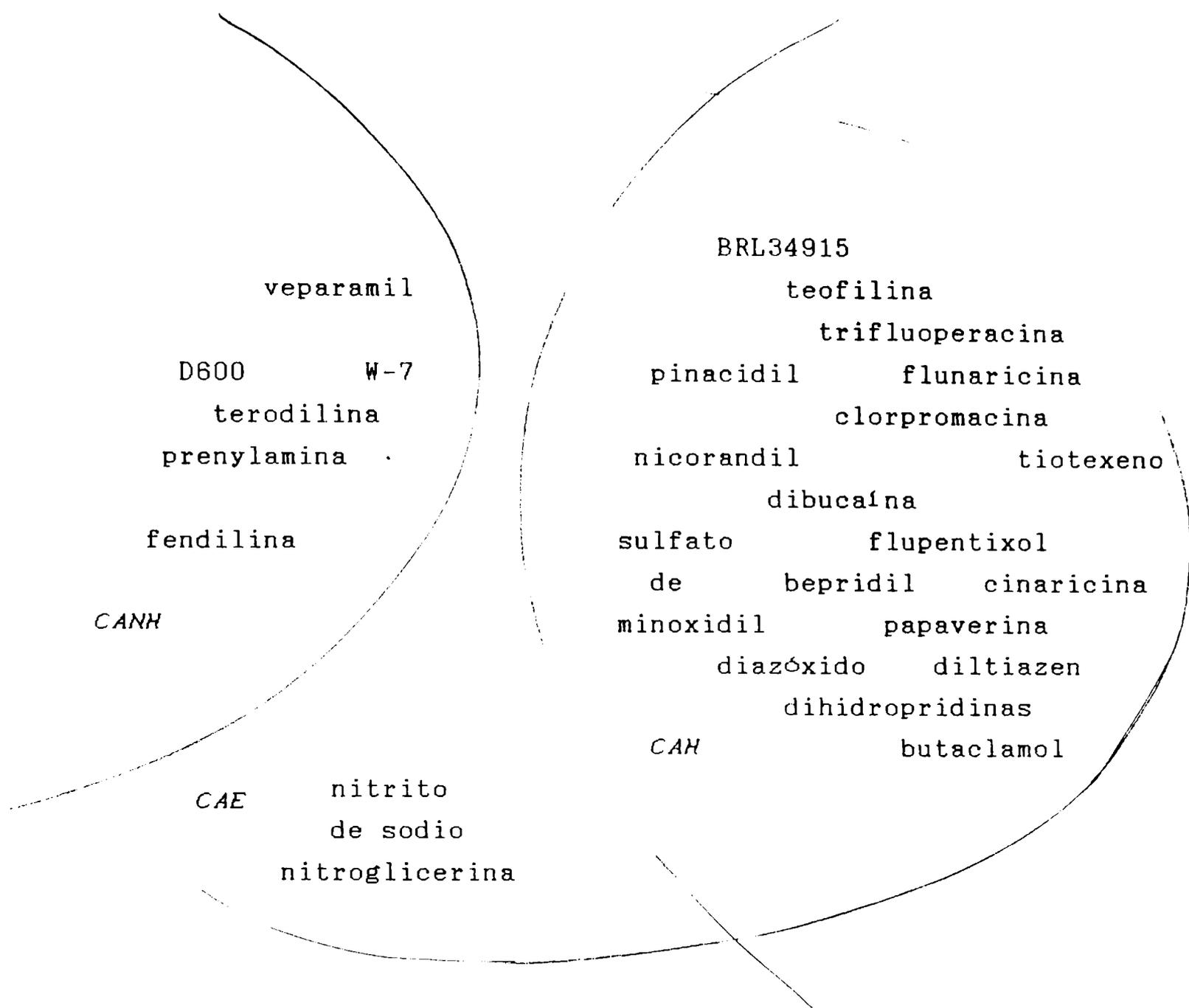
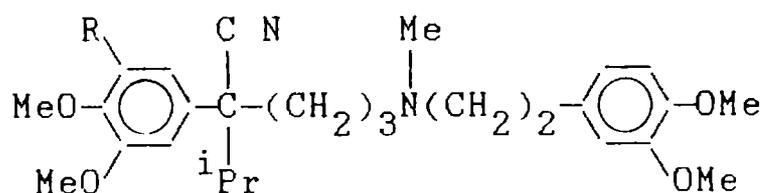


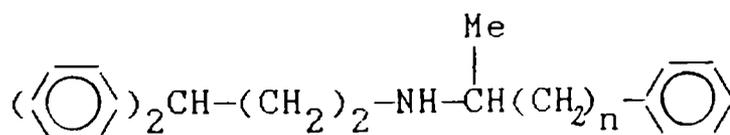
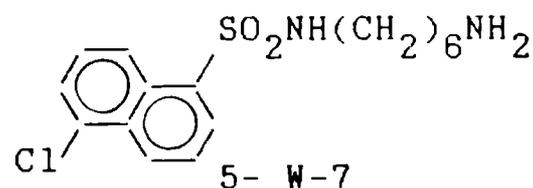
Figura 2.1- CAE : conjunto de compuestos antiespasmódicos no competitivos más representativos. $CAE \cap CANH$: conjunto de compuestos antiespasmódicos no competitivos aromáticos no heterocíclicos. $CAE \cap CAH$: conjunto de compuestos antiespasmódicos no competitivos heterocíclicos.

Las estructuras mencionadas se representan en las figuras 2.2 y 2.3.

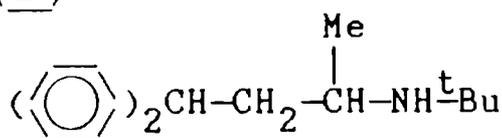
Definiendo por extensión los conjuntos intersección $CANH \cap CAE$ (fig 2.2) y $CANH \cap CAE$ (fig.2.3), el análisis de las estructuras participantes pone en evidencia la existencia de un Nitrógeno amínico común a todas, unido a su vez, en general, a un átomo de Carbono insaturado modificado por sustituyentes de distinta naturaleza, principalmente grupos voluminosos y/o aromáticos, que pueden formar o no parte de un ciclo. Sobre la base de estas consideraciones se genera la hipótesis de existencia de una subestructura mínima (Aromático— $\overset{\overset{C}{|}}{\underset{\underset{N}{|}}{<}}$), característica de la actividad analizada, en la cual un N amínico, con grado de sustitución variable se une, a través de un átomo de Carbono, a un resto hidrofóbico voluminoso.



- 1- R=H veparamil
 2- R=OMe D600



- 3- n=0 fendilina
 4- n=1 prenylamina



6- terodilina

Figura 2.2- $CAE \cap CANH$: conjunto de compuestos antiespasmódicos no competitivos aromáticos no-heterocíclicos

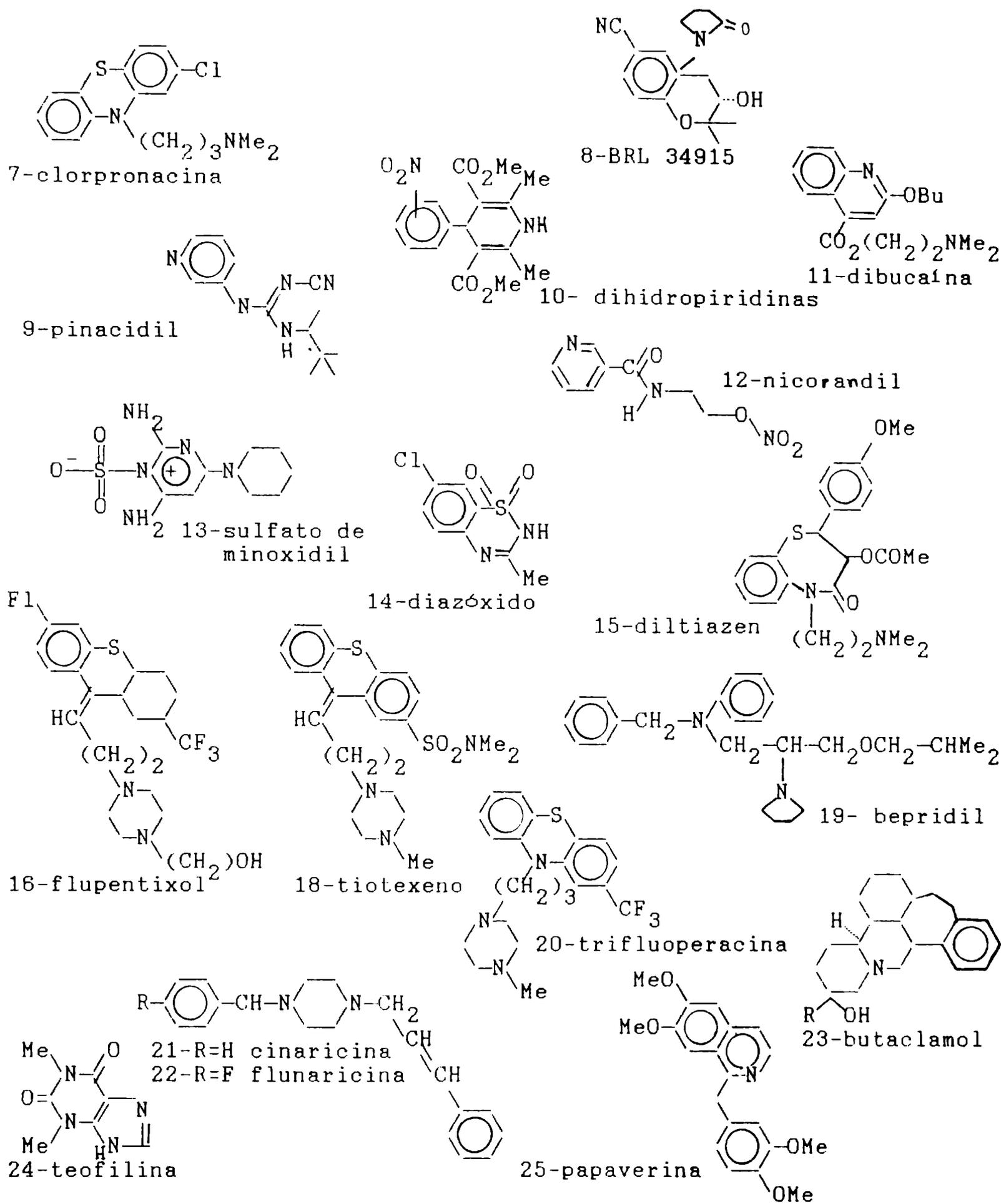


Figura 2.3- CAE \wedge CAH : conjunto de compuestos antiespasmódicos no competitivos heterocíclicos.

La búsqueda de una estructura sencilla que reúna ambas características nos lleva a la elección de la Bencidrilamina como prototipo activo (fig.2.4, 2.5), ya que, cumpliendo con nuestro requisito estructural, es además porción común de varias estructuras de nuestro CAE [3,4,6,19,20], si bien puede también caracterizar fármacos de actividad diferente. La presencia de dos núcleos aromáticos define un considerable número de sitios, tanto equivalentes como no equivalentes en su estructura, lo que permite un análisis más exhaustivo del efecto de los distintos tipos de modificaciones. Así, los sitios no equivalentes resultan aptos para el estudio del efecto producido por la introducción de un mismo grupo funcional en distintas posiciones de la molécula, logrando una primera aproximación a los centros claves (sitios activos) en relación a la interacción con receptores biológicos. Por otro lado, la existencia de sitios no equivalentes permite reforzar por disustitución el efecto de un sustituyente determinado, con la consiguiente cuantificación relativa de la importancia de cada modificación.

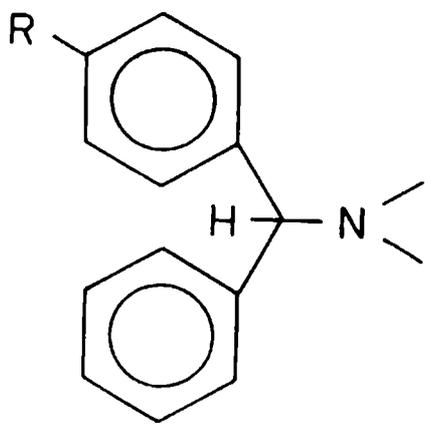


Figura 2.4.
Estructura plana de la
1,1-Difenilmetilamina
(Bencidrilamina)

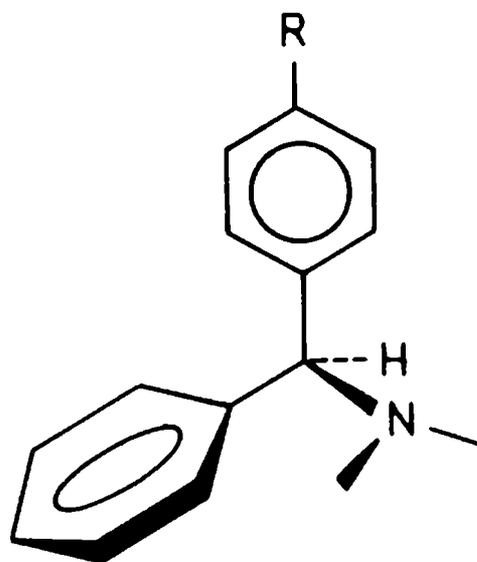


figura 2.5.
Estructura espacial de la
1,1-Difenilmetilamina
(Bencidrilamina)

En esta metodología de diseño práctico del prototipo activo, basada en la búsqueda de una porción estructural común, se ha dejado de lado la posible clasificación de los antagonistas no competitivos en relación a su mecanismo de acción. El mecanismo no competitivo de relajación muscular se asocia frecuentemente a una recuperación de los niveles normales de Ca^{++} intracelular libre, mediante la acción sobre procesos Ca^{++} -dependientes, ya sea por modificación del transporte de Ca^{++} intracelular o por bloqueo de los canales y consiguiente inhibición del influjo de Ca^{++} desde el exterior de la célula [37,42]. Se pueden diferenciar así dos grupos principales de compuestos en cuanto a su mecanismo de acción [42]:

- i) antagonistas de la calmodulina, que modifican el mecanismo de contracción muscular por interacción directa con esta proteína [43-46] o inhibición de la enzima fosfodiesterasa [47],
- ii) antagonistas de canales de Ca^{++} , que actúan por bloqueo de los canales, tanto potencial dependientes (PDC) u operados por receptor (ROC) [39,42]. Los canales operados por receptor son aquellos asociados a la existencia de receptores en las membranas, que se activan por interacciones específicas agonista-receptor, mientras que los potencial-dependiente se activan por un mecanismo de despolarización de la membrana por elevación del contenido de ion K^+ . En relación a la importancia de este catión en los mecanismos de balance del contenido de Ca^{++} , estudios recientes [49] han demostrado la existencia de compuestos que, por apertura directa de canales de K^+ , producen relajación del músculo liso vascular.

Se conoce en este momento con precisión el mecanismo de acción de varios agentes farmacológicos en el proceso de relajación del músculo liso. Así, los compuestos 1-4 y 6, (Fig.2.2) y 10, 15, 19, 21 y 22 (Fig.2.3) bloquean los canales de Ca^{++} . Los compuestos 5 (fig.2.2) y 7, 11, y 20 (fig.2.3) son antagonistas de la calmodulina, mientras que los 16, 18,23 y 25 (fig.2.3) inhiben la fosfodiesterasa. En relación a los compuestos 8, 9, 12, 13 y 14 (fig. 2.3) se postula

una acción por apertura directa de los canales de K^+ .

Un análisis asociado a la dilucidación de mecanismos de acción debería iniciarse en la definición de conjuntos por características fisicoquímicas comunes y el posterior análisis de su intersección con CAE, ya que interacciones hidrofóbicas [49-52] parecen dominar la posibilidad de interacción con calmodulina, mientras que cierta estereoselectividad caracteriza los bloqueantes de canales de Ca^{++} [42]. En un planteo más general, el mecanismo de acción parece asociarse no a características estructurales sino a características fisicoquímicas comunes [53-56].

Sin embargo, no es el objetivo de este estudio el logro de una droga que responda a un mecanismo de acción bien conocido y determinado, sino el aumento de su potencialidad sobre la base de modificaciones estructurales, lo cual justifica el camino de diseño práctico elegido para el descubrimiento del prototipo activo.

- CAPITULO 3 -

**Generación del líder
por modificación racional
del prototipo activo**

El prototipo activo es, en sí mismo, un esqueleto estructural común a un conjunto de compuestos que manifiesta la actividad biológica buscada.. Partiendo de la base de que ha sido éste correctamente seleccionado, el conjunto de compuestos que puede ser generado por sustitución sobre cada una de las distintas posiciones de este esqueleto base es, sin lugar a duda, infinito, ya que, en teoría, es infinito el número de combinaciones posibles de sustituyentes que pueden conectarse a estas distintas posiciones de sustitución. Es, sin embargo, finito el número de estos sustituyentes de potencial interés y, sin duda, todo criterio práctico indica la importancia de una elección a priori de los elementos de este conjunto finito [19], para poder generarlo manipulando el menor número de compuestos, tanto en su síntesis como en su evaluación farmacológica.

El mismo razonamiento, simultáneamente lógico e intuitivo, aplicado al diseño práctico del prototipo activo, que nos indica que de estructuras semejantes es dable esperar propiedades farmacológicas y fisicoquímicas semejantes, puede aplicarse ahora para diseñar, sobre un criterio práctico, modificaciones estructurales que logren un conjunto de estructuras derivadas de características distintas. Para esta metodología de programación "por disimilitud" de las modificaciones a introducir, en una etapa previa a la síntesis y determinación de la actividad biológica de las estructuras derivadas del prototipo activo reviste particular importancia el empleo de "parámetros de diseño", descriptores de propiedades estructurales, fisicoquímicas y/o electrónicas de los compuestos.

Un criterio objetivo generalmente empleado [19,56] se fundamenta en el estudio de la distancia entre los distintos compuestos en un espacio de parámetros, generado al asociar una coordenada espacial a cada propiedad (parámetro) fisicoquímica. Cada compuesto del conjunto en estudio queda así representado por un punto en el espacio de parámetros. La distancia entre los puntos da una medida de su disimilitud. El conjunto de elementos elegidos como muestras será representativo del conjunto total si los puntos en el espacio geométrico que representan se encuentran adecuadamente

distribuidos dentro del espacio total definido por el conjunto , vale decir, si la distancia entre dos muestras excede cierto valor mínimo arbitrariamente fijado.

En un espacio biparamétrico el problema puede resolverse gráficamente. Para lograr de este modo una correcta selección se trata de asociar una coordenada a una propiedad hidrofóbica y otra a una propiedad electrónica, ya que es dable esperar que compuestos que difieran en sus propiedades hidrofóbicas y electrónicas en grado suficiente como para mostrarse suficientemente separados en el espacio de los parámetros difieran también en sus características biológicas. El criterio práctico que incluye, entre otros factores, la complejidad del camino de síntesis, indicará el compuesto a descartar como elemento del conjunto entre aquellos cuya separación en el espacio de parámetros resulte inferior a la distancia crítica.

De esta manera se logran minimizar las etapas de trabajo experimental y los costos que éste trae aparejado en la generación del subconjunto de sustancias derivadas del prototipo activo, la más activa de las cuales definirá el compuesto líder.

Tradicionalmente, y en base a los procedimientos presentados por Topplis [57-59], se han usado como parámetros de diseño σ y π , sobre la aceptación de que, usualmente, la actividad biológica de varios análogos depende de los efectos hidrofóbicos y electrónicos de los sustituyentes. En este esquema, toda desviación de un comportamiento lógicamente preconcebido podría ser adjudicable a propiedades estéricas de los sustituyentes [15]. Sin embargo, se acepta actualmente que la probable variación de la actividad biológica puede asociarse a distintos valores de cualquier par de parámetros, convenientemente elegidos de acuerdo a las características de los compuestos a analizar. Más aún, en un análisis óptimo, todas las propiedades fisicoquímicas y estructurales deben modificarse en forma sistemática e independientemente unas de otras en un rango suficientemente amplio para obtener un conjunto prueba tal que las varianzas de los parámetros hidrofóbicos, estéricos y moleculares

estén maximizadas y las colinealidades minimizadas (los puntos seleccionados no deben caer en una línea recta [60]).

Para poder discutir en detalle las consideraciones que condujeron nuestra selección de compuestos generados por sustituciones químicas con modificación de la estructura base de la bencidrilamina, debemos introducir previamente una somera descripción de cada uno de estos "parámetros de diseño"

3.1- PARAMETROS DE DISEÑO-DESCRIPTORES MOLECULARES.

Los intentos de desarrollar nuevas drogas sobre requisitos preconcebidos quedan "cuantificados" en numerosos parámetros, descriptores moleculares, de complejidad variable, tanto en cuanto a su cálculo, como a su interpretación.

En forma muy general, pueden clasificarse en:

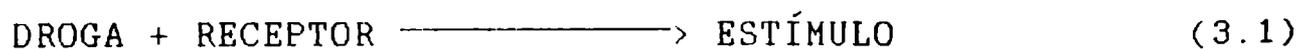
a - Parámetros extratermodinámicos, derivados de la aproximación extratermodinámica de Hansch.

b - Parámetros estructurales, que describen la molécula como una estructura química bidimensional, considerando el aporte de las distintas porciones moleculares a la actividad.

c - Descriptores geométricos o conformacionales, asociados a la distribución tridimensional de las porciones moleculares.

a-Parámetros extratermodinámicos, derivados de la aproximación extratermodinámica de Hansch.

Esta aproximación plantea un modelo termodinámico de equilibrio, describiendo la interacción droga-receptor por una ecuación:



caracterizada por una constante de equilibrio K_D que se modificará cuando se introducen cambios en la estructura química de la droga. En base a la existencia de relaciones lineales de entalpía libre para una familia de congéneres (lineal free enthalpy relationships- LFERS) [61], estas modificaciones pueden expresarse en forma lineal por una suma de efectos hidrofóbicos, electrónicos y estéricos, según:

$$\lg K_D = f_h(x_h) + f_e(x_e) + f_s(x_s) \quad (3.2)$$

donde $f_h(x_h)$, $f_e(x_e)$ y $f_s(x_s)$ caracterizan la influencia de las propiedades hidrofóbicas, electrónicas y estéricas de las moléculas en las interacciones droga-receptor a través de los parámetros x_i que introducen una dependencia funcional ($i=h,e,s$).

Asumiendo la validez de:

* igual estímulo - igual respuesta biológica,

* la diferencia entre el comportamiento *in vitro* e *in vivo* se debe fundamentalmente a efectos hidrofóbicos, que modifican tanto la interacción con el receptor como el transporte de la droga [14],

el logaritmo de la actividad biológica tiene la misma dependencia lineal que la constante de equilibrio

$$\lg A = f_h(x_h) + f_e(x_e) + f_s(x_s) \quad (3.3)$$

La ecuación (3.3), que describe la actividad biológica de una familia de congéneres, es la base de la "aproximación extratermodinámica al análisis cuantitativo estructura actividad" introducido por Hansch [62], llamado así por aplicar en su deducción relaciones lineales de entalpía libre extratermodinámicas.

La ecuación (3.3) puede también derivarse del análisis cinético de la ec. (3.1) o de consideraciones de termodinámica estadística. Su validez queda hoy sustentada en los resultados obtenidos de su aplicación [2,15,16,63,64], más que en el rigor de las consideraciones teóricas.

La forma analítica general de esta ecuación puede representarse por :

$$\log A = a_0 + \sum a_i x_i + \sum b_i x_i^2 \quad (3.4)$$

donde la variación logarítmica de la actividad biológica en una familia de congéneres se describe, para un dado parámetro estructural, como una ecuación pesada de sus primera y segunda potencias.

-a.1- Expresión de la hidrofobicidad a través de parámetros extratermodinámicos para una familia de congéneres.

Se fundamenta en la existencia de relaciones lineales, para una serie dada de compuestos, entre los datos termodinámicos para el equilibrio de transferencia entre agua y varias fases hidrofóbicas (incluso biofases), para interacciones soluto-solvente semejantes en ambas fases [15,66]. En consecuencia, para su empleo, se deben buscar fases hidrofóbicas que tengan suficiente similitud con las biofases. Entre los parámetros más usados pueden citarse : log P, R_M , datos HPLC, $-\lg c$ (donde c = solubilidad en agua), destacándose sin duda, por su frecuente empleo, el sistema de partición octanol-agua introducido por Hansch, para el cual se dispone de gran cantidad de datos [67,68]. Siendo el octanol suficientemente hidrofóbico y de poca solubilidad en agua, permite la formación de enlaces Hidrógeno, los que juegan un rol fundamental en la definición de la biofase.

En la práctica se emplea la cantidad π , introducida por Hansch [69] y definida por :

$$\pi_x = \log P_{MX} - \log P_{MH} \quad (3.5)$$

donde P_{MH} es el coeficiente de partición del compuesto padre (no sustituido) y P_{MX} el del derivado con el sustituyente X en el sistema octanol-agua. π caracteriza la hidrofobicidad del sustituyente X relativa a H y puede formalmente considerarse como el log del coeficiente de partición de ese sustituyente en el sistema octanol-agua. Como constante que caracteriza un sustituyente y de acuerdo a los principios de relación lineal de entalpía libre, representa el análogo hidrofóbico de la constante σ de Hammett. No sólo los sustituyentes, sino también ciertos aspectos estructurales, tales como ramificaciones de la cadena, enlaces múltiples, presencia de anillos aromáticos, pueden expresarse en términos de π . Los valores así calculados se emplean como términos correctivos, que tienen en cuenta su presencia.

Idealmente π posee propiedades aditivas, lo que permite el cálculo rápido de log P como :

$$\log P = \log P_{MH} + \Sigma \pi \quad (3.6)$$

en base al gran número de valores experimentales de π con que se cuenta al presente [67,68,70,71].

A pesar de la utilidad del empleo de los valores de π tabulados , que evitan la medida experimental del coeficiente de partición , debe tenerse extremo cuidado en su aplicación, ya que los valores no sólo dependen del sustituyente sino también de las interacciones electrónicas con el entorno, de modo tal que los valores de π medidos para una serie homóloga no pueden usarse para otra, a menos que ambas se caracterizen por igualdad de estas interacciones.

Correcciones adicionales , que tengan en cuenta interacciones intramoleculares, son también necesarias [72,74] debido a la pérdida de aditividad por :

- * proximidad de grupos fuertemente polarizantes o cargados,
- * enlaces H intramoleculares,
- * interacciones estéricas intramoleculares,
- * efectos estéricos de grupos vecinales en aromáticos (efecto orto),
- * conformación y equilibrio conformacional dependiente del solvente.

Los valores del parámetro R_M , y el derivado de éste, ΔR_M , definidos en las ecuaciones (3.7) y (3.8), que se determinan fácilmente por cromatografía de partición en fase reversa, están teniendo creciente aplicación como parámetros de hidrofobicidad [75,76]

$$R_M = \log \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right) = \log P + \log K \quad (3.7)$$

valiendo la última igualdad para el coeficiente de partición en el sistema usado en la cromatografía de partición, siendo K la constante cromatográfica del sistema.

En forma análoga a la definición de π (ec. 3.5)

$$\Delta R_M = R_{MX} - R_{MH} \quad (3.8)$$

donde R_{MX} y R_{MH} representan respectivamente los valores de R_M de los compuestos padre y los compuestos sustituidos. Igual que π , ΔR_M posee "idealmente" propiedades aditivas

$$R_M = R_{MH} + \Sigma \Delta R_M \quad (3.9)$$

donde todas las consideraciones hechas previamente sobre la aplicabilidad de la ec. (3.6) valen para la (3.9) considerando a R_M como caso particular de $\log P$ y ΔR_M como caso particular de π . Para rangos de hidrofobicidad no demasiado amplios, existen relaciones lineales entre R_M y $\log P$ y ΔR_M y π [75,77-79].

Una variable análoga a R_M se obtiene por HPLC [80-82], a partir de la medida de los tiempos o volúmenes de retención,

$$k' = (t_R - t_0)/t_0 \quad (3.10)$$

y, dada su analogía con la expresión $(1/R_F - 1)$:

$$\log k' = \log P + \log K \quad (3.10')$$

En consecuencia, su medida dará directamente los coeficientes de partición octanol-agua, si se usa agua saturada con n-octanol como fase estacionaria [81-83]. Además de una mayor precisión y exactitud, la medida del coeficiente de distribución a distintos pHs permite determinar valores aparentes del pK_a .

Rekker [84-86] introdujo la constante hidrofóbica fragmental f , definida por

$$\log P = \sum_{i=1}^n a_i f_i \quad (3.11)$$

donde f_i describe la contribución del fragmento i a $\log P$ y el factor a_i indica la frecuencia de aparición de ese fragmento en la molécula. Los valores de f de varios fragmentos, actualmente tabulados [85,86],

se determinan por un análisis de regresión sobre un gran número de valores de log P [84-86]. Los fragmentos considerados son grupos funcionales o fragmentos aún menores, hasta nivel atómico. Uno de los principales aportes de Rekker es la observación de que el H atómico en sí mismo contribuye a la hidrofobicidad ($f_H = 0,167$), lo que demuestra la inexactitud del cálculo de log P como sumatoria de valores de π .

A pesar de la similitud conceptual, f y π son definitivamente diferentes dado que, por la distinta aproximación usada en su evaluación, las reglas empíricas aplicadas para la corrección de anomalías no pueden extenderse directamente de π a f . El cálculo de log P a través de la constante fragmental se corrige como

$$\log P = \sum_{i=1}^n a_i f_i + \sum_{i=1}^n \text{anomalías} = \sum_{i=1}^n a_i f_i + \sum_{i=1}^n k_n c_M \quad (3.12)$$

donde c_M es un factor constante ($c_M = 0,28$) conocido como "constante mágica" de Rekker, sin interpretación física asignada. k_n (número clave) indica el número de veces que la constante mágica debe aplicarse para corregir una anomalía dada.

La ec. (3.12) permite determinar los valores de log P casi para toda estructura compleja, subdividiéndola en fragmentos y tratando también las anomalías como fragmentos.

La determinación estadística de f implica la parcial incorporación de ciertos efectos de proximidad intramolecular [87], que se encuentran en realidad ausentes en moléculas alifáticas pequeñas. Este efecto, que puede evitarse calculando los valores de f de pequeños fragmentos a partir de la medida experimental de coeficientes de partición de moléculas pequeñas [88], no se ha tenido en cuenta por no presentar inconvenientes en los cálculos prácticos (ec. 3.12).

**-a.2- Parámetros descriptores de la influencia
electrónica en la actividad biológica.**

Dada la diversidad de efectos electrónicos que influyen en la definición del valor de actividad biológica, tanto cantidades experimentales, parámetros químico cuánticos como relaciones lineales de entalpía libre, que emplean constantes electrónicas de los sustituyentes, se han usado para expresar x_e .

Las relaciones lineales de entalpía libre se fundamentan en la distinta variación de entalpía libre standard que acompaña una reacción dada (ec. 3.13) , cuando se modifica la estructura del reactivo por sustitución, la cual se refleja en la variación del término de interacción que representa las interacciones entre la porción estructural que contiene el sustituyente (R) y la que contiene el centro reactivo (Y, que cambia a Y' en el curso de la reacción).

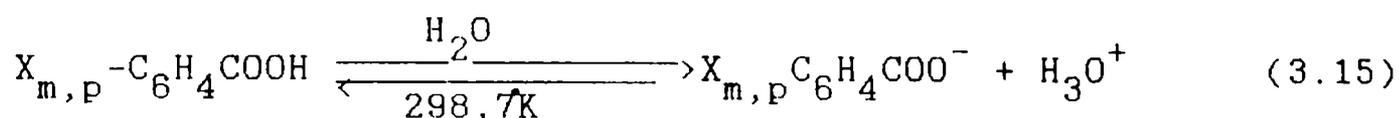


El término de interacción se asume factorizable sobre los mismos principios de factorizabilidad de una función de onda en los postulados químico cuánticos o de una función de partición en mecánica estadística. Esta suposición restringe la aplicabilidad de esta aproximación a modificaciones estructurales no muy drásticas [61].

La expresión matemática de que " los cambios de entalpía libre standard para un conjunto dado de sustituyentes de dos series de reacciones ,sobre la misma porción estructural base, están linealmente interrelacionados" tiene la forma :

$$\log K_X - \log K_{st} = \log (K_X / K_{st}) = (I_{Y'} - I_Y) (I_{XR} - I_{stR}) \quad (3.14)$$

donde X es un sustituyente distinto del standard, K_X y K_{st} , las constantes de equilibrio respectivas y los I los términos de interacción de las porciones reactivas y sustituida de la estructura. Considerando la disociación de ácidos benzoicos meta y para sustituidos, en agua, a 298,7° K,



como serie standard, y X = H como el sustituyente standard [14,15], la ec. 3.14 toma la forma :

$$\log (K_X / K_H) = (I_{COO^-} - I_{COOH}) (I_X - I_H) = 1 (I_X - 0) = I_X \quad (3.16)$$

donde la última igualdad vale si se define

$$(I_{COO^-} - I_{COOH}) = 1 \quad I_H = 0 \quad (3.17)$$

La variable I_X , característica del sustituyente X, es la constante σ de sustitución electrónica, la cual, para reacciones distintas de la disociación de ácido benzoico, se expresa por la ecuación de Hammett [89,90]:

$$\log (K_X / K_H) = (I_M - I_M) \sigma = \rho \sigma \quad (3.18)$$

donde ρ caracteriza la susceptibilidad de una reacción con respecto a la disociación de ácido benzoico. Dado que, por definición, $\rho = 1$ para esta reacción, que está favorecida por la presencia de sustituyentes

aceptores de electrones, un valor positivo (negativo) de ρ en la ecuación 3.18 indica que la reacción está favorecida (inhibida) por sustituyentes aceptores de electrones, siendo este efecto mayor cuanto mayor es el valor absoluto de ρ [14,15]. La constante σ (constante de Hammett) da una medida de la capacidad aceptora de electrones de un sustituyente con respecto a Hidrógeno. Es, por lo tanto, positiva para aceptores y negativa para donores.

La constante σ es idealmente aditiva, de modo tal que , para casos de multisustitución

$$\log K_X = \rho \Sigma \sigma + \text{cte} \quad (3.19)$$

El valor de σ depende además de la posición de sustitución, dependencia de la que no se encuentra exento el valor de ρ . Los valores de σ para las distintas posiciones están estadísticamente correlacionados y se cuenta en la actualidad con varias bases de datos, calculados sobre fundamentos más empíricos o más estadísticos, que tornan su empleo de utilidad para análisis QSAR [68,70,71,91].

La ecuación de Hammett se ha usado para describir la influencia de un sustituyente en varias propiedades físicas (espectros UV y IR, potencial polarográfico de media onda, espectros NMR, potenciales de ionización, momentos dipolares y momentos dipolares grupales), siendo este un enfoque muy importante ya que el rol de estas propiedades en la interacción con el receptor es aún más importante que el de las reacciones químicas mismas.

Varios requerimientos limitan su aplicabilidad :

- i) existencia de un sistema rígido,
- ii) existencia de una reacción o mecanismo de interacción común
- iii) ausencia de interacciones entre el sustituyente y el centro de reacción,

- iv) los sustituyentes no deben mostrar un efecto de solvatación especial ni deben estar involucrados en la reacción,
- v) no debe haber interacciones resonantes entre sustituyentes y centros de reacción,
- vi) la importancia relativa de los efectos inductivo y mesomérico en la serie de reacciones debe ser constante,
- vii) se requieren además tratamientos particulares para el caso de sustituyentes muy voluminosos o sustituyentes cargados.

Si se tiene presente que el efecto electrónico del sustituyente comprende en realidad la suma de dos efectos : inductivo (I) y mesomérico (o de resonancia, R)

$$\log K_X = \rho_I \sigma_I + \rho_R \sigma_R + \text{cte} = \rho_I (\sigma_I + [\rho_R / \rho_I]) \sigma_R + \text{cte} \quad (3.20)$$

La ecuación (3.20) es la expresión matemática del requisito vi) de aplicabilidad de la ecuación de Hammett ($\rho_R / \rho_I = \text{cte}$). El no cumplimiento de este requisito lleva a asignar, a cada sustituyente, dos constantes electrónicas que den cuenta separadamente de cada uno de los efectos. Surgen así diversos métodos que llevan a la definición de "escalas de σ " [92-94]. En la intención de corregir este efecto Swain y Lupton [95] definen la constante de campo \mathcal{F} , que representa los efectos inductivos (relacionada a σ_I) y la constante de resonancia \mathcal{R} , que representa los efectos de resonancia, siendo apta la combinación lineal de ambas para describir cualquier escala de valores de σ , variando adecuadamente los valores de los factores de peso f_i, r_i

$$\sigma_i = f_i \mathcal{F} + r_i \mathcal{R} \quad (3.21)$$

La ecuación (3.21) tiene la ventaja de que los vectores \mathfrak{F} y \mathfrak{R} son mutuamente ortogonales, lo que permite la consiguiente separabilidad matemática de ambos efectos. Dado que las escalas de \mathfrak{R} se fundamentan en la aceptación de que $\mathfrak{R} = 0$ para el grupo $\overset{\dagger}{\text{N}}(\text{CH}_3)$, el empleo de \mathfrak{F} , parámetro extensamente tabulado, adquiere utilidad práctica para la evaluación del efecto de sustitución sobre grupos amínicos.

Otras factorizaciones consideran factores entrópicos (σ_S) y entálpicos (σ_H) para un tratamiento más riguroso de las interacciones intermoleculares e intramoleculares [96,97].

El tratamiento de factorización en efectos inductivo y mesómero condujo a la relación de Taft para compuestos alifáticos, definiendo el parámetro σ^* (constante de sustitución polar de Taft [98]), de naturaleza puramente inductiva, a partir de consideraciones semejantes a las de Hammett para la hidrólisis ácida de ésteres alifáticos de ácidos carbónicos, reacción cuya velocidad no se encuentra influenciada por efectos estéricos y de resonancia, y sólo está determinada por efectos inductivos.

Ciertas cantidades experimentales se emplean exitosamente como parámetros electrónicos (Tabla 3.1) cuando describen propiedades electrónicas moleculares de importancia en relación a la actividad biológica en investigación. Un único parámetro experimental puede reemplazar una relación multiparamétrica más compleja en constantes electrónicas. Por otro lado, por caracterizar interacciones bien definidas, permiten una ventajosa interpretación fisicoquímica. Como todo parámetro experimental presentan, sin embargo, la desventaja de requerir su determinación en una etapa previa a cualquier análisis.

Tabla 3.1- Principales cuantificadores experimentales empleados como parámetros electrónicos moleculares [15].

$pK_a = -\log K_a$	K_a : constante de ionización de grupos ionizables
$\Delta pK_a = \log K_{aX}/K_{aH}$	X: compuesto sustituido con sustituyente X H: compuesto no sustituido .
μ	momento dipolar
μ_i	momento dipolar grupal.
α	polarizabilidad electrónica.
P_E	polarizabilidad electrónica grupal.
θ	corrimiento químico (espectroscopía NMR).
ν	frecuencia IR grupal.
$\Delta\nu$	corrimiento de ν por introducción de sustituyente.
HWP	potencial de media onda polarográfico.
I	potencial de ionización.
k	constante cinética de una reacción.
K	constante de equilibrio de una reacción.

La naturaleza de la información accesible a través de la aplicación de métodos químico cuánticos al cálculo de parámetros electrónicos depende de las aproximaciones que involucra el método empleado.

Consideraciones semejantes a las que implica el cálculo de parámetros estructurales codificados por posición permiten el análisis por el método de Hückel (HMO)[99-102] de una familia de congéneres. Sin embargo, el fundamento químico cuántico, en base a la teoría de Orbitales Moleculares (MO), que fundamenta las simplificaciones introducidas en el tratamiento del esqueleto molecular permite asociar los valores numéricos derivados de su aplicación a cuantificadores fisicoquímicos, permitiendo así interpretaciones orientadas al postulado de mecanismos de reacción o posible localización de centros reactivos.

El aumento de complejidad del método de cálculo empleado favorece, dentro de ciertos márgenes, la exactitud del valor del parámetro calculado, pero no permite, en general, el cálculo de nuevos parámetros. Logra sí relajar las condiciones impuestas al esqueleto molecular (separabilidad σ - π , interacción relegada a átomos adyacentes) en relación a su aplicabilidad [100,101].

Este relajamiento de las condiciones de aplicabilidad se encuentra acotado para el tema que nos ocupa. Los métodos ab-initio, de mayor exactitud, se encuentran aún relegados al tratamiento de sistemas sencillos (estructuras moleculares constituidas por pocos átomos de bajo número atómico). La estructura compleja de las moléculas biológicamente activas restringe el campo de la aplicación de la química cuántica al empleo de métodos semiempíricos, principalmente Hückel Extendido (Extended Hückel Method, EHM) [100, 103-106] o CNDO (Complete Neglect of Differential Overlap) [107-111]. Dado que el carácter empírico está sólo asociado a la definición original de los términos monoeléctronicos de los Hamiltonianos de átomos individuales (potenciales de ionización atómicos), no afecta la evaluación del comportamiento de una familia de congéneres.

Los resultados obtenidos son fuertemente dependientes de los estados conformacionales de la molécula. Si bien la conformación que caracterice la molécula "en interacción" no será la de mínima energía y será además dependiente del sitio de interacción y por consiguiente de la actividad analizada, la correlación de una actividad biológica exige la comparación de parámetros determinados en igualdad de condiciones. Esta igualdad de condiciones se define, para la droga aislada (in vitro), por el estado conformacional de mínima energía. Dado que los métodos semiempíricos no resultan prácticos para caracterizar este estado, se complementan en la actualidad con métodos de mecánica molecular (MM2) [112]. Luego de su empleo para la determinación de la conformación de mínima energía, se calculan semiempíricamente los parámetros electrónicos de diseño.

Una ventaja incuestionable de esta metodología reside en la determinación no experimental de parámetros de la misma fuerza, que reúnen las mismas ventajas que los experimentales, de clara interpretación fisicoquímica orientada a la comprensión de mecanismos de reacción y localización de centros reactivos.

Sin detenernos en el tratamiento detallado de las interacciones electrónicas en el marco de los principios de la mecánica de Hamilton [113] o de Heissemberg [114], merece sí destacarse la convergencia de los resultados derivados de vías de análisis tan disímiles ya desde sus postulados básicos, a la interpretación de los mecanismos (interacciones) determinantes de la actividad de la estructura molecular. Esta convergencia se pone, sin duda, de manifiesto en la posibilidad de calcular cuánticamente varios descriptores electrónicos experimentales de la tabla 3.1, tales como μ o I, entre otros.

Varios parámetros pueden calcularse rápidamente por aplicación de HMO. Sin embargo, nos interesa presentar ahora los de mayor utilidad, derivados de cálculos semiempíricos más precisos, en relación a la información que proveen:

-Entre las energías asociadas a cada uno de los orbitales moleculares revisten particular interés las correspondientes al orbital ocupado de mayor energía (Highest Occupied Molecular Orbital- HOMO) y el desocupado de menor energía (Lowest Unoccupied Molecular Orbital- LUMO), E_{HOMO} y E_{LUMO} , respectivamente. La dependencia directa de la actividad biológica con una de estas energías o con su diferencia (ΔE_{HL}) conduce a no descartar un mecanismo de excitación electrónica con probable transferencia de carga en su interacción con el sitio activo. La correlación de la actividad con E_{HOMO} indica una interacción donora droga-sitio activo, siendo esta interacción aceptora cuando E_{LUMO} es la variable independiente. Si la interacción está gobernada por el valor de ΔE_{HL} una activación de la droga por excitación electrónica es una etapa imprescindible para una interacción efectiva.

- Resulta también importante, para el análisis de las interacciones droga - receptor el conocimiento de la distribución electrónica en la molécula droga, vale decir, el conocimiento de las densidades locales de carga sobre cada uno de los centros atómicos. La dependencia de la actividad con la densidad de carga sobre un determinado centro indica la importancia de éste como posible sitio activo en el proceso de interacción droga-receptor. Por otro lado, el conocimiento del sentido de variación de la actividad con la densidad de carga sobre este centro permite el diseño racional de las modificaciones estructurales más adecuadas para modificar la actividad en la forma deseada, en base al conocimiento de las características donoras oceptoras de cada grupo funcional (sustituyente estructural).

-a.3- Parámetros descriptores del efecto estérico en relación a la actividad biológica.

Los efectos estéricos más relevantes en el marco de la aproximación extratermodinámica se deben a [63,115] :

- i) influencias estéricas intramoleculares de los sustituyentes en las propiedades moleculares,
- ii) influencia específica en la unión al receptor debida al volumen y arreglo espacial de los sustituyentes,
- iii) diferencia entre isómeros ópticos o estereoisómeros,
- iv) influencias conformacionales,
- v) casos particulares en los que una configuración estérica particular resulta esencial para la actividad biológica.

i) Interacciones estéricas intramoleculares ocurren en moléculas flexibles, como compuestos alifáticos y en compuestos aromáticos o-sustituídos. En consecuencia, Taft [116] definió una constante estérica del sustituyente E_S para compuestos alifáticos y otra E_S^O para aromáticos o-sustituídos, en base a las constantes de velocidad de la hidrólisis ácida de ésteres X-sustituídos (k_x) y ésteres metil-sustituídos (k_o)

$$E_S = (\log k_x / k_o)_{a, XCOOR} \quad (3.22)$$

$$E_S^O = (\log k_x / k_o)_{a, X_{orto}C_6H_4COOR} \quad (3.23)$$

cuyos valores tabulados permiten el cálculo del efecto estérico según:

$$f_S(x_S) = \theta E_S + cte \quad (3.24)$$

$$f_S^O(x_S) = \theta E_S^O + cte \quad (3.25)$$

E_S es menor cuanto más voluminoso es el sustituyente, de modo tal que una dada reacción se encuentra inhibida por sustituyentes voluminosos para valores positivos de θ .

Para sustituyentes simétricos E_S se correlaciona linealmente con el radio de van der Waals [117], relación que ha sido usada para su determinación.

Existen también expresiones que derivan de modificaciones del parámetro estérico de Taft, basadas en la consideración del número de átomos de Hidrógeno y Carbono unidos al grupo que soporta el sustituyente [16].

ii) Cuando las interacciones intermoleculares entre sustituyente y receptor son importantes, el radio de van der Waals de los sustituyentes resulta un parámetro importante y fácilmente derivable de los valores tabulados de E_S [117-119].

La refractividad molar también caracteriza este efecto a través de su vinculación con el volumen molar V

$$MR = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} V = \frac{4}{3} \pi N_L \alpha \quad (3.26)$$

donde : n es el índice de refracción, N_L el número de Avogadro y α la polarizabilidad.

La segunda igualdad demuestra que MR no es un parámetro puramente estérico sino que tiene también un componente electrónico. Más aún, en varias series homólogas de compuestos hidrofóbicos, de propiedades electrónicas constantes y similar geometría básica, se ha encontrado una correlación de MR con la hidrofobicidad.

A pesar de las dificultades derivadas de esta convergencia de mutuas contribuciones, la facilidad que caracteriza su cálculo aditivo justifica su difundido empleo.

El índice de conectividad molecular, introducido por Kier al QSAR [120-122], que se calcula fácilmente a partir del conocimiento de la fórmula estructural bidimensional, se clasifica, en algunas oportunidades, como un parámetro estérico, si bien, por el procedimiento empleado para su cálculo y por la dificultad inherente a su interpretación física puede también considerarse un parámetro estructural[15]. De acuerdo a esta clasificación se remite para su descripción a la sección b.2.

En base al conocimiento ineludible de la estructura tridimensional de los sustituyentes, se han desarrollado varios parámetros (STERIMOL de Verloop) [63 a,b] en los cuales cada sustituyente se caracteriza por 5 valores que cuantifican su longitud y sus anchos, máximo y mínimo, en direcciones perpendiculares.

Otros parámetros estéricos analizan la influencia del volumen molecular en el solapamiento con el "sitio receptor" [115]. Estas aproximaciones no revisten importancia práctica cuando no existen, como en el caso que nos ocupa, modelos de farmacóforo para la actividad investigada.

Teniendo en cuenta que cada uno de los distintos sustituyentes modifica la conformación de la molécula, las "modificaciones estéricas" no son fácilmente parametrizables, por medio de cuantificadores, si se tiene en cuenta este efecto. A pesar de la importancia que reviste la consideración de la conformación en un correcto análisis QSAR, no existe una parametrización en tablas de los datos derivados de estudios conformacionales. Esto se tuvo presente al emplear parámetros estéricos (MR) para la elección de los elementos constitutivos de la familia de congéneres. La discusión de la influencia de la conformación se presentará en relación a la optimización racional de la estructura líder (Capítulo VI).

iii) Los mismos parámetros estéricos introducidos por Verloop pueden emplearse para describir las sustituciones estereoisoméricas.

Cuando sólo uno de los isómeros es responsable de la actividad, resultan más prácticas las codificaciones numéricas (indicadores variables que toman el valor 1 para una forma y 0 para la otra).

iv) La aproximación extratermodinámica no es la más adecuada para abordar problemas conformacionales. La aplicación de parámetros estéricos a barreras de energía entre conformeros es quizás la única posibilidad de tratamiento de problemas conformacionales en el marco de esta aproximación.

v) Se encuentran, por ejemplo, casos particulares de dependencia de la actividad con el parámetro de Taft, en forma directa para los derivados o- y p- sustituidos e inversa para el derivado m-sustituido [15].

b - Parámetros estructurales.

El cálculo de estos parámetros se fundamenta en la fragmentación de la estructura molecular bidimensionalmente simplificada, asignando un codificador que cuantifica la aparición de cada uno de estos fragmentos, sobre la base de una contribución aditiva a la actividad biológica total [15].

- b.1 - Parámetros estructurales propiamente dichos.

Un parámetro estructural, tal como el índice de Free-Wilson [123-125] codifica, mediante un cero o un uno, la aparición o no de un sustituyente dado en una posición específica de un determinado compuesto. Tiene la ventaja, sobre el método extratermodinámico, de no necesitar valores de parámetros moleculares para caracterizar los sustituyentes, ya que emplea una codificación binaria.

La codificación simultánea de tipo de sustituyente y posición de sustitución genera una matriz, cuya resolución posterior permite la evaluación de la importancia de la existencia de las distintas porciones en relación a la actividad investigada, e incluso la predicción de las sustituciones más adecuadas para lograr el sentido buscado de variación de la actividad.

Para que el tratamiento matricial sea estadísticamente significativo, tanto las características del sustituyente como las posiciones de sustitución tienen que variar en grado suficiente. En una serie de congéneres generada por la introducción de modificaciones en pocas posiciones de sustitución resulta más adecuado el empleo de la aproximación extratermodinámica.

Se ha demostrado que los coeficientes matriciales de Free-Wilson, que indican la contribución a la actividad de cada sustituyente en cada posición de sustitución, son combinaciones pesadas de los parámetros moleculares de Hansh, siendo la relación aún más directa cuando se trabaja con la aproximación de Fuyita-Ban [126]. En consecuencia, ambos análisis son complementarios y resultarán uno u otro más adecuado según el caso particular, pero no puede considerarse que el método de Free-Wilson aporte información adicional a la derivada de la aproximación extratermodinámica.

- b.2 - Parámetros subestructurales.

En otros tratamientos la codificación, dejando de ser binaria, se limita a aspectos subestructurales, como ausencia o presencia de determinados átomos, subestructuras o tipos de unión. Describe la molécula como totalmente particionada en subestructuras sin considerar la existencia de una porción estructural (esqueleto molecular) común, dado que, de hecho, esta aproximación ha surgido como un tratamiento necesario cuando las modificaciones son tan variadas que no permiten la definición de tal porción estructural.

Por su forma de cálculo, que puede tener en cuenta o no la ubicación relativa de los fragmentos en la molécula, se diferencian [127,128]:

-b.2.1- Descriptores no codificados por posición, que incluyen:

* Descriptores de átomos y enlaces.

Codifican átomos (cuántos y de qué tipo, excepto Hidrógeno) y tipo de enlace [129].

* Descriptores subestructurales.

Codifican la ausencia o presencia de porciones estructurales explícitamente definidas como ensambles de átomos o grupos funcionales, tomando un valor igual al número de veces que aparecen en la molécula. Requiere la selección previa de la porción molecular que se definirá como subestructura, para lo cual se recomienda un criterio basado en el tipo de modificaciones a introducir.

* Descriptores de entorno.

Describen el entorno incluyendo el primer y segundo vecinos más próximos a la subestructura considerada, resultando así complementarios de los descriptores subestructurales. Un único parámetro puede emplearse, en distintas aproximaciones, para reflejar el átomo y tipo de enlace:

- Descriptores de los enlaces inmediatos (bond environment descriptor-BED), que se construyen sumando los enlaces, distintos de Hidrógeno, para primeros y segundos vecinos.

- Descriptores pesados (weighted environment descriptor- WED), construye la misma suma asociando además un número a cada tipo de enlace.

- Descriptores aumentados (augmented environment descriptor -AED), asocia unívocamente un número a cada tipo de átomo, de modo tal que una posición dada contribuye con un número calculado como el producto (átomo x enlace).

* Descriptores de camino.

Describen la distancia entre ciertos centros, por ejemplo heteroátomos, en la molécula.

* Descriptores de conectividad.

Quizás la forma más útil de describir la molécula en términos de estas subestructuras es la introducida por Kier y Hall [120-122], en base al estudio de topología angular de Randić [130], que describe el tipo de uniones que existen en la molécula, quedando los átomos definidos por ser terminales de cada unión.

A pesar de originarse en conceptos tan abstractos como una codificación numérica, se llega a una descripción detallada de la estructura molecular. Más aún, su análisis ha demostrado que está vinculada a propiedades químicas fundamentales a un punto tal que, según se vió previamente (sección 3.a.3) se lo clasifica también como un parámetro estérico. Esta relación se entiende a partir de la definición del índice de conectividad de valencia χ^v en términos de los valores de la conectividad atómica δ [120-121]. La cuantificación de las uniones que definen el esqueleto molecular asigna un valor cardinal δ^v a cada átomo, que es igual al número de electrones de valencia, no involucrados en enlaces σ -hidrogénicos, que éste aporta. Estos electrones pueden estar involucrados en enlaces σ , π , o ser no enlazantes.

$$\delta_i^v = \delta_i + \pi_i + n_i = \sigma_i + \pi_i + n_i - h_i \quad (3.27)$$

donde δ_i es el número de electrones del átomo i que participan en enlaces σ_i no hidrogénicos y σ_i , π_i , n_i y h_i son el número de

electrones aportados por el átomo i a enlaces σ , π , electrones no enlazados y enlazados a Hidrógeno respectivamente.

En su carácter de descriptores orbitales, los valores de δ describen el espacio que éstos ocupan. Dado que la definición del número de electrones involucra el estado de valencia del átomo, y por éste la ocupación orbital, su definición lleva implícita una definición de volumen, y al sumar las contribuciones de los enlaces presentes en la molécula, cuantifican el volumen molecular.

Por otro lado, los parámetros δ_i^ν y δ_i son de neto carácter electrónico y la existencia de una correlación resulta, por lo tanto, obvia.

Dado que dos átomos contribuyen a cada unión y ésta se describe por el producto $(\delta_i^\nu \delta_j^\nu)^{-1/2}$ (índice de enlace) [121], la suma sobre los enlaces define el índice de conectividad molecular

$$\chi^\nu = \sum (\delta_i^\nu \delta_j^\nu)^{-1/2} \quad (3.28)$$

La ecuación (3.28) indica las características netamente matriciales del cálculo de este parámetro. Debe tenerse presente que, a pesar de que se le ha querido asignar contenido fisicoquímico en la búsqueda de una interpretación de las correlaciones encontradas empíricamente, estos índices, descriptores de conexiones moleculares, *no representan* propiedades físicas. Por el contrario, son números adimensionales, computados a partir de asignaciones no empíricas de adyacencia atómica.

-b.2.2- Descriptores codificados por posición, que codifican simultáneamente sustituyente y posición de sustitución. Esta codificación simultánea de ambos parámetros lleva a asociar estos descriptores con los derivados del método Free-Wilson. Sin embargo, éstos se refieren exclusivamente al análisis de la estructura totalmente particionada, por no poder definirse una porción estructural común a la serie.

El método, originalmente desarrollado por Cammarata [124], se fundamenta en el diseño de una supermolécula por superposición de todas las estructuras. La posterior superposición de cada una de las moléculas de la serie con esta supermolécula genera una codificación binaria asignando, en cada posición un valor 0 ó 1, según exista o no coincidencia del fragmento estructural.

c - Descriptorios geométricos.

Son los más cercanos a la realidad tridimensional de la interacción droga-receptor. Describen la estructura molecular en su totalidad con una exactitud directamente dependiente del método de determinación [15]. Así, el volumen molecular, que puede inicialmente aproximarse sustituyendo los índices de una matriz de conexión por las longitudes de enlace, se calcula con mayor exactitud por métodos químico-cuánticos o puede incluso determinarse experimentalmente.

Estos tres tipos de parámetros, presentados ahora para el diseño del conjunto inicial (generación del líder), se emplean también en el posterior estudio racional en la etapa de optimización de la estructura generada. Sin embargo, cada uno de los parámetros elegidos involucra en su tratamiento distintas aproximaciones. Correlaciones estructura-actividad, con fundamento en la aproximación extratermodinámica de Hansch, permiten cuantificar los primeros parámetros presentados, mientras que la racionalización de los parámetros estructurales se fundamenta básicamente en análisis matriciales. Los parámetros geométricos son dables de ser analizados por cualquiera de las dos aproximaciones. Esta clasificación de la metodología de evaluación no es, sin embargo, excluyente, como tampoco

es totalmente rígida la clasificación presentada, según quedó manifestado en la posible clasificación de χ^v como parámetro estérico o como índice topológico subestructural.

Razonamientos meramente lógicos llevan a otra clasificación de los mismos parámetros, agrupándolos en :

-aquellos que consideran la molécula como una unidad (parámetros geométricos, cuánticos, conformacionales),

-aquellos que la consideran como sumatoria de propiedades de fragmentos mínimos, mutuamente independientes, sobre la base de un principio de aditividad (parámetros extratermodinámicos, estructurales).

La clasificación presentada no es, por lo tanto, única y puede considerarse, en cierto aspecto, fundamentada en el respeto a quienes desarrollaron los razonamientos básicos que apuntalaron la ciencia implícita en el Diseño Racional de Fármacos.

3.2- DESCRIPTORES MOLECULARES APLICADOS AL DISEÑO RACIONAL DEL SUBSISTEMA.

Nos ubicamos ahora en la primera etapa de empleo de estos cuantificadores estructurales para el diseño de la composición química de los elementos del conjunto inicial.

La selección de los parámetros debe centrarse en el análisis de la viabilidad de su empleo para la correcta descripción de las similitudes o diferencias de los derivados , "elementos del subsistema", cuantificados a través de la distancia en el espacio biparamétrico. La estructura elegida como prototipo activo (Figs. 2.4, 2.5 , pag. 21) presenta dos sitios de sustitución de particular interés:

* Sustitución sobre el Nitrógeno amínico.

* Sustitución sobre el núcleo aromático, limitándonos al estudio de derivados p-sustituídos a fin de cuantificar el efecto electrónico sin necesidad de considerar separadamente contribuciones inductivas y mesoméricas, evitando al mismo tiempo efectos espurios presentes en los casos de o-sustitución (efecto orto).

Aunque, tradicionalmente, parámetros hidrofóbicos y electrónicos definen las coordenadas del espacio de parámetros, la existencia de dos posiciones de sustitución, una alifática y otra aromática, genera una subdivisión al no poder definir un único parámetro electrónico común a todos los elementos del conjunto (sección 3.1-a.2., pag.34).

Para tener la certeza de una correcta elección del subconjunto-familia de congéneres, se prefirió trabajar con los dos subgrupos en forma independiente, a fin de poder comparar, en un único diagrama, las propiedades predecibles de todos los derivados, en una etapa previa a su síntesis. La tabla 3.2 contiene los valores de los descriptores moleculares correspondientes a la serie de derivados de la Bencidrilamina, generada por sustitución sobre los sitios indicados.

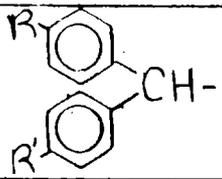
		R	R'	MR	π^+	δ	σ
sustituciones aromáticas							
BB ₂	NH ₂	H	H	0,103	0.000	-----	0,000
BB ₁₃	NH ₂	NO ₂	H	0,736	-0,280	-----	+0,780
BB ₈	NH ₂	Me	H	0,565	+0,560	-----	-0,170
BB ₁₀	NH ₂	OMe	H	0,787	-0,020	-----	-0,270
AB ₁₆	NHMe	Me	H	0,565	+0,560	-----	-0,170
AB ₂₈	NMe	Cl	Cl	0,603	+0,710	-----	+0,230
sustituciones sobre el Nitrógeno amínico							
BB ₂	NH ₂	H	H	0,437	-1,540	+0,020	-----
AB ₁₀	NHMe	H	H	0,911	-1,380	-0,110	-----
AB ₁₆	NHMe	Me	H	0,911	-1,380	-0,110	-----
AB ₄	NMe ₂	H	H	1,414	-0,640	+0,100	-----
AB ₇	NEt ₂	H	H	2,344	+0,160	+0,010	-----
AB ₂₈	NMe	Cl	Cl	0,911	-1,380	-0,110	-----

Tabla 3.2.- Descriptores moleculares para la serie de derivados de la Bencidrilamina (familia de congéneres)

(*) calculados de acuerdo al criterio de Hansch y Leo [68]

Dos requerimientos básicos deben tenerse presentes en la elección de los parámetros de diseño:

* Que cuantifiquen correctamente las disimilitudes estructurales : un parámetro estérico no es óptimo para describir una familia cuyos elementos hayan sido generados por sustitución sobre distintos centros (átomos), ya que un mismo sustituyente puede afectar de distinta manera el entorno de acuerdo a la posición de sustitución. En consecuencia, dado que las posiciones de sustitución involucran sitios alifáticos y aromáticos, lo cual dificulta también el empleo de descriptores electrónicos, se usa un parámetro estérico (MR) analizando en forma independiente ambas posiciones de sustitución.

* No elegir dos parámetros mutuamente correlacionados, lo que se manifiesta en una colinealidad en su representación gráfica. Este análisis de colinealidades resulta también de interés en relación al empleo de ciertos parámetros cuya magnitud está definida por más de un efecto. Se conoce, por ejemplo, que MR está definida por una contribución estérica, a través del volumen molar, y una electrónica por depender de la polarizabilidad (ecuación 3.26). La mayor importancia de uno u otro efecto no es común a cualquier familia de compuestos. Las figuras 3.1 , 3.2 , indican que MR es un descriptor estérico para el subconjunto aquí analizado, por no correlacionarse con los descriptores electrónicos.

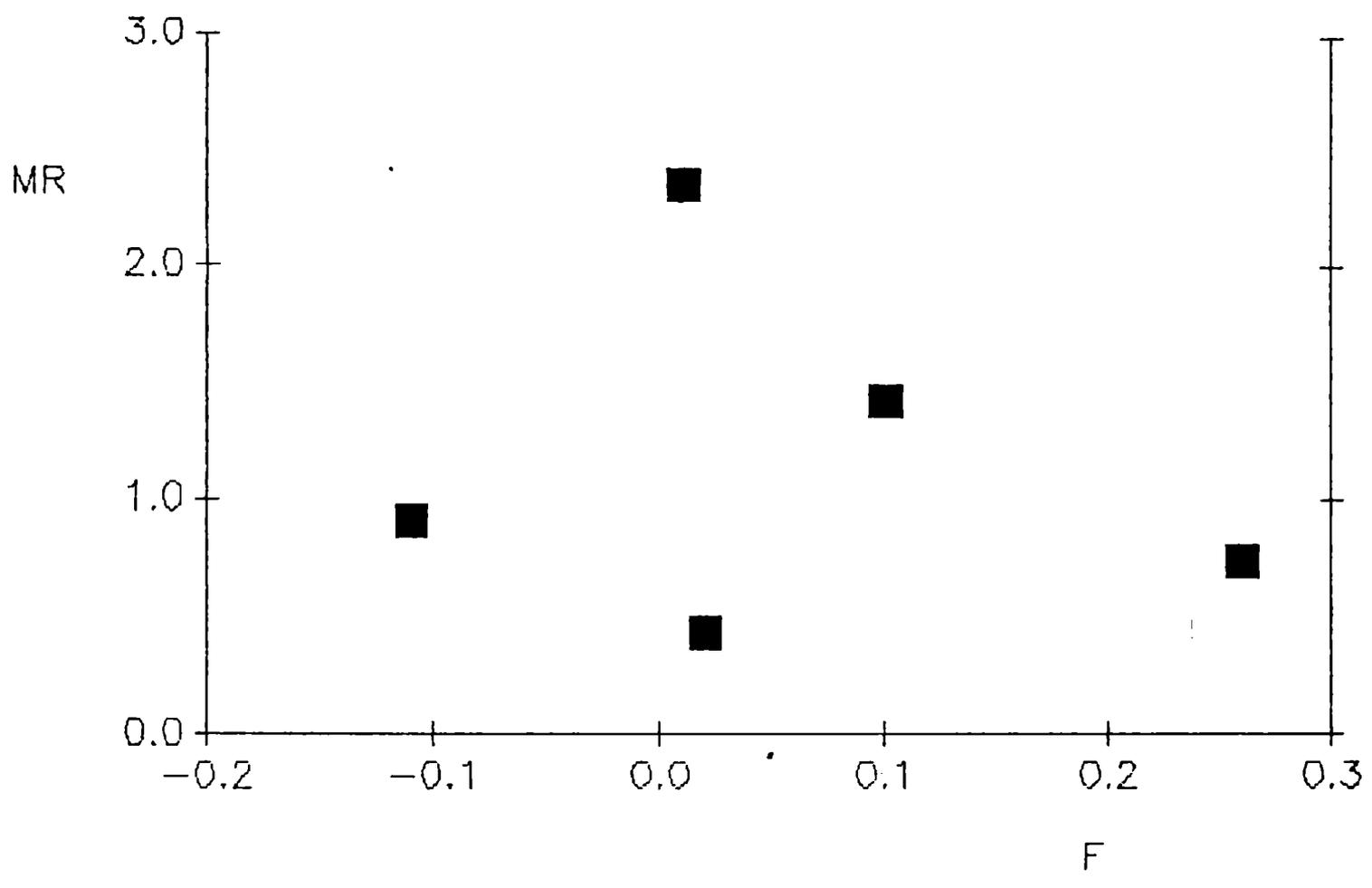


Figura 3.1 .MR vs δ . Derivados obtenidos por sustitución sobre el N-amínico.

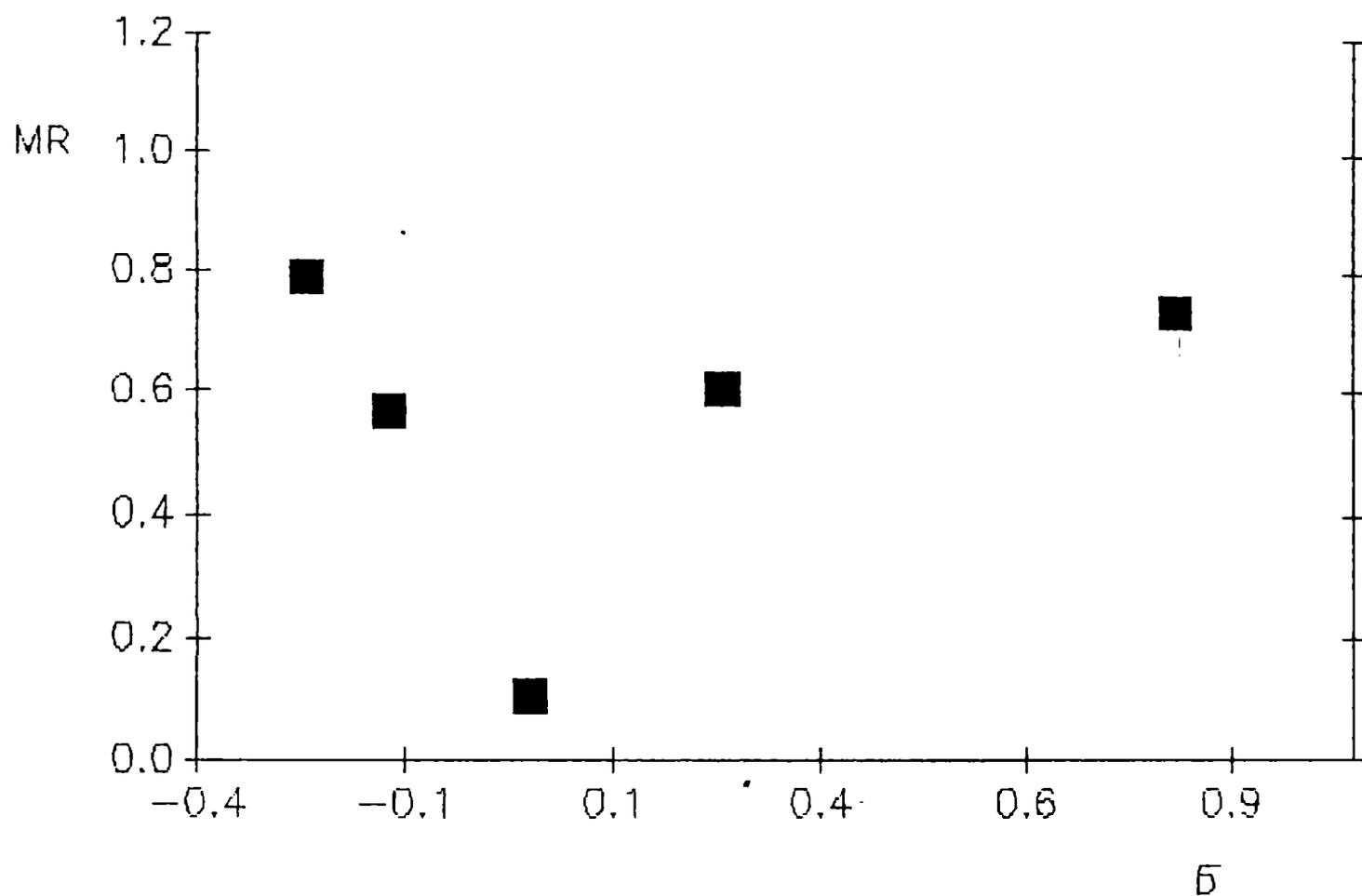


Figura 3.2. MR vs σ . Derivados obtenidos por sustitución sobre el núcleo-aromático

Se han discutido previamente las distintas acepciones del índice de conectividad molecular χ^{ν} , que lo vinculan tanto a descriptores electrónicos, estéricos e hidrofóbicos. La representación de χ^{ν} vs MR (Figura 3.3) demuestra que, dada su colinealidad, el

análisis de χ^ν no aportará datos adicionales a los derivados del análisis de la variación de MR para esta familia de derivados de la Bencidrilamina.

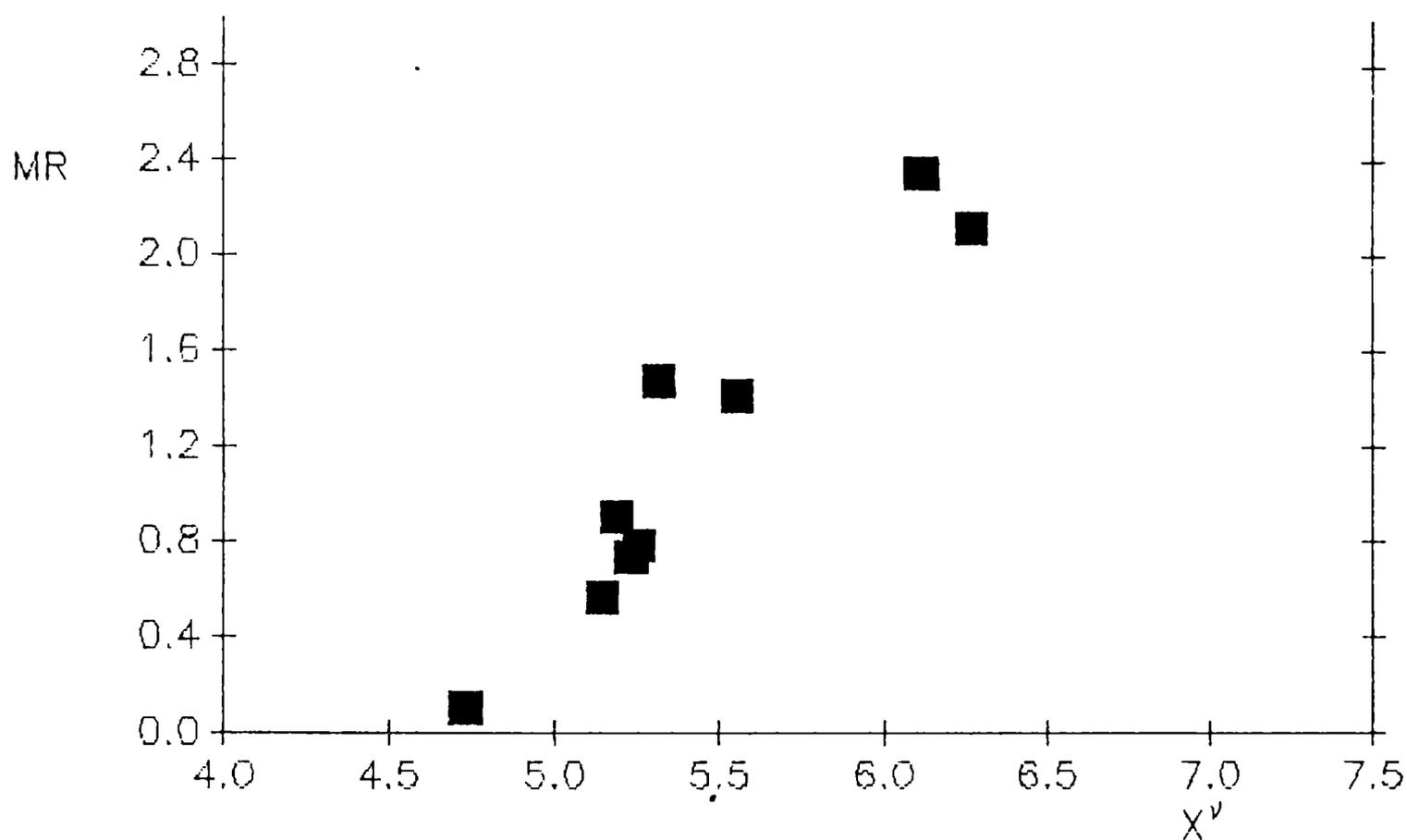


Figura 3.3 Ubicación de los derivados en el espacio de parámetros definido por χ^ν y MR.

El gráfico MR vs. π permitió seleccionar las modificaciones a introducir, sobre el núcleo aromático (Fig.3.4).

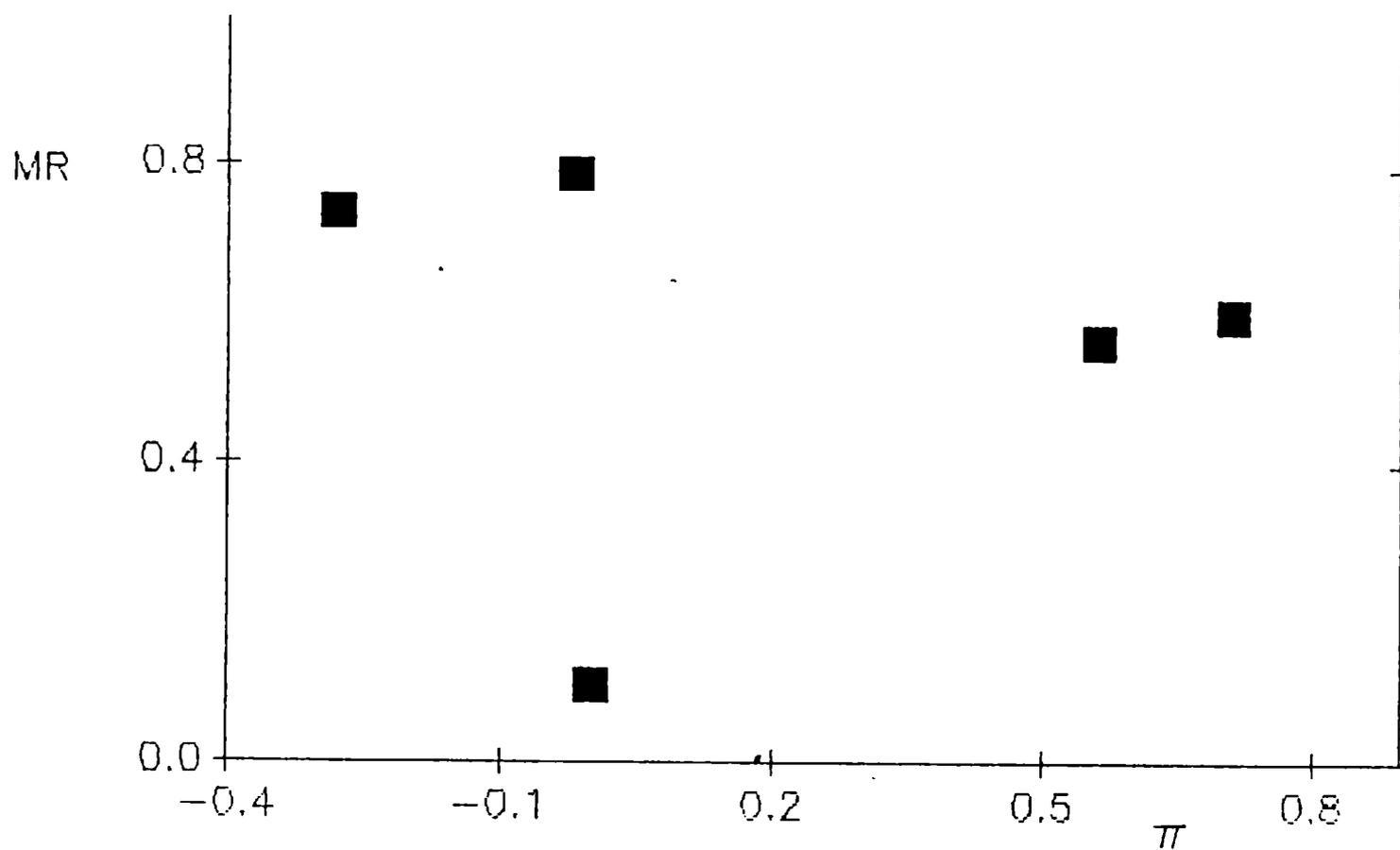


Figura 3.4 .MR vs π . Derivados obtenidos por sustitución sobre el núcleo aromático.

La figura 3.5 pone de manifiesto que los mismos parámetros no pueden usarse para la elección de derivados obtenidos por sustitución sobre el Nitrógeno amínico por no cumplir los requisitos de no-colinealidad.

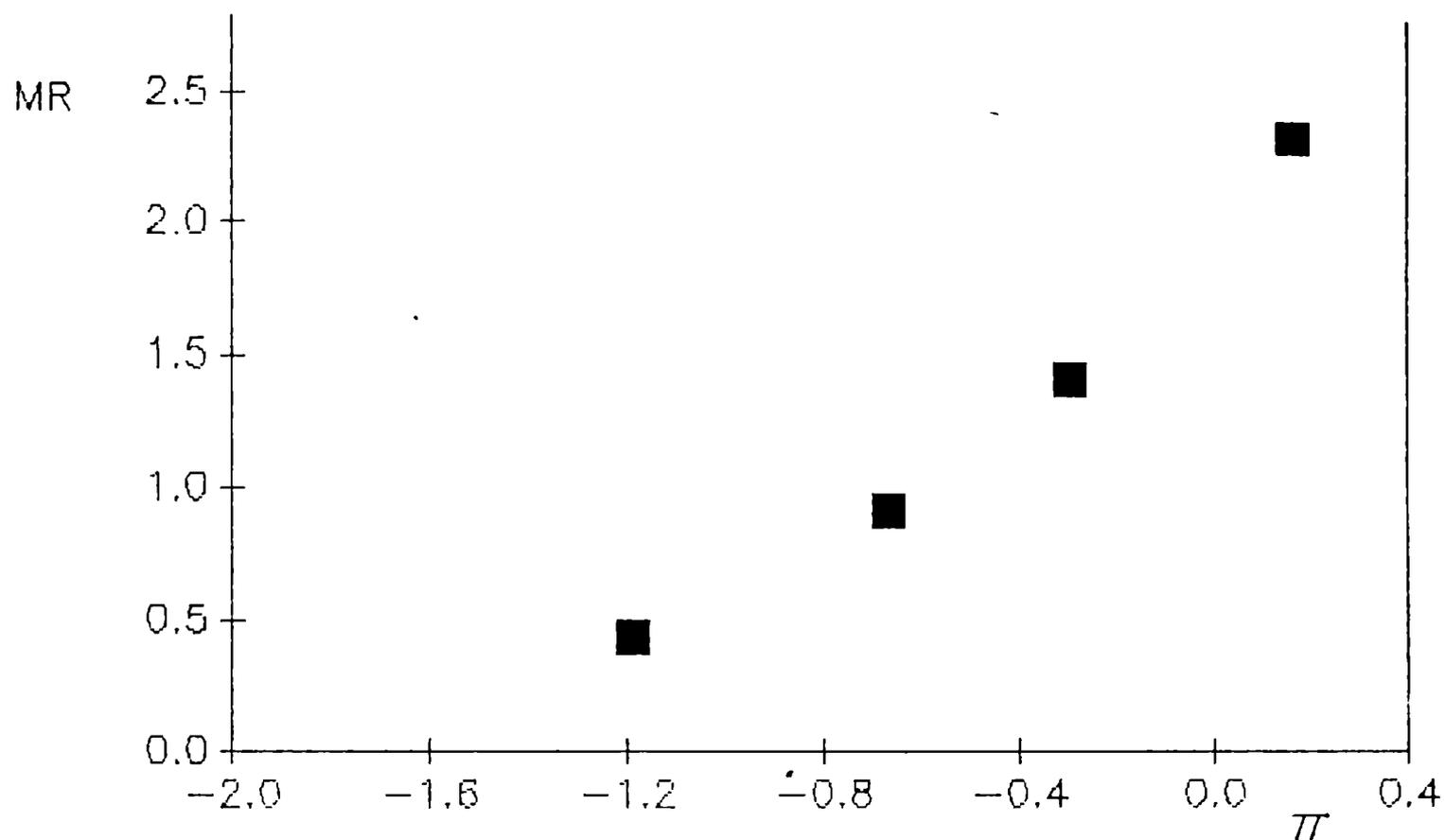


Figura 3.5.- MR vs π . Derivados obtenidos por sustitución sobre el Nitrógeno amínico.

En consecuencia, sólo se tuvo en cuenta, para este subconjunto, el comportamiento de parámetros electrónicos (δ) e hidrofóbicos (π).

El análisis presentado demuestra que la elección de los elementos del subsistema (miembros de la familia de congéneres) se ha basado en la maximización de las diferencias de las propiedades hidrofóbicas, electrónicas y estéricas, con simultánea minimización de las colinealidades.

Los parámetros estructurales no se emplean en esta primera etapa por no ser descriptores directos de alguna propiedad fisicoquímica y, por consiguiente, no directamente asociables a la potencial determinación de la actividad biológica. Por otro lado, la determinación de los coeficientes matriciales de Free-Wilson requieren el conocimiento de la actividad. Sólo podrían usarse en la etapa de selección inicial en aquellos casos en que se disponga de gran número de derivados y la actividad biológica elegida sea fácilmente determinable. En el caso posible de disponer de éstos no resultan, sin embargo, siempre aptos, debido a su demostrada correlación con los parámetros extratermodinámicos de Hansch [15]. Un análisis previo de las posibles correlaciones es imprescindible para su uso.

Distintos parámetros subestructurales caracterizan también las distintas estructuras, las que estarán posiblemente asociadas a distinta actividad. Dos de estos parámetros no pueden emplearse para definir un espacio bidimensional por estar asociados a la misma propiedad (BED, AED) ni pueden combinarse con parámetros extratermodinámicos por estar siempre la estructura electrónica correlacionada con las características fisicoquímicas de un compuesto dado. La caracterización de los elementos del conjunto por distintos parámetros subestructurales servirá solamente para avalar las conclusiones derivadas de la comparación de parámetros extratermodinámicos. Por no ser directamente asociables a una propiedad fisicoquímica particular no tienen la misma fuerza en esta etapa de selección.

- CAPITULO 4 -

- Familia de congéneres -

Su obtención

De acuerdo a la metodología de selección racional detallada en el Capítulo anterior, se seleccionaron los compuestos cuya estructura química se describe gráficamente en la figura 4.1.

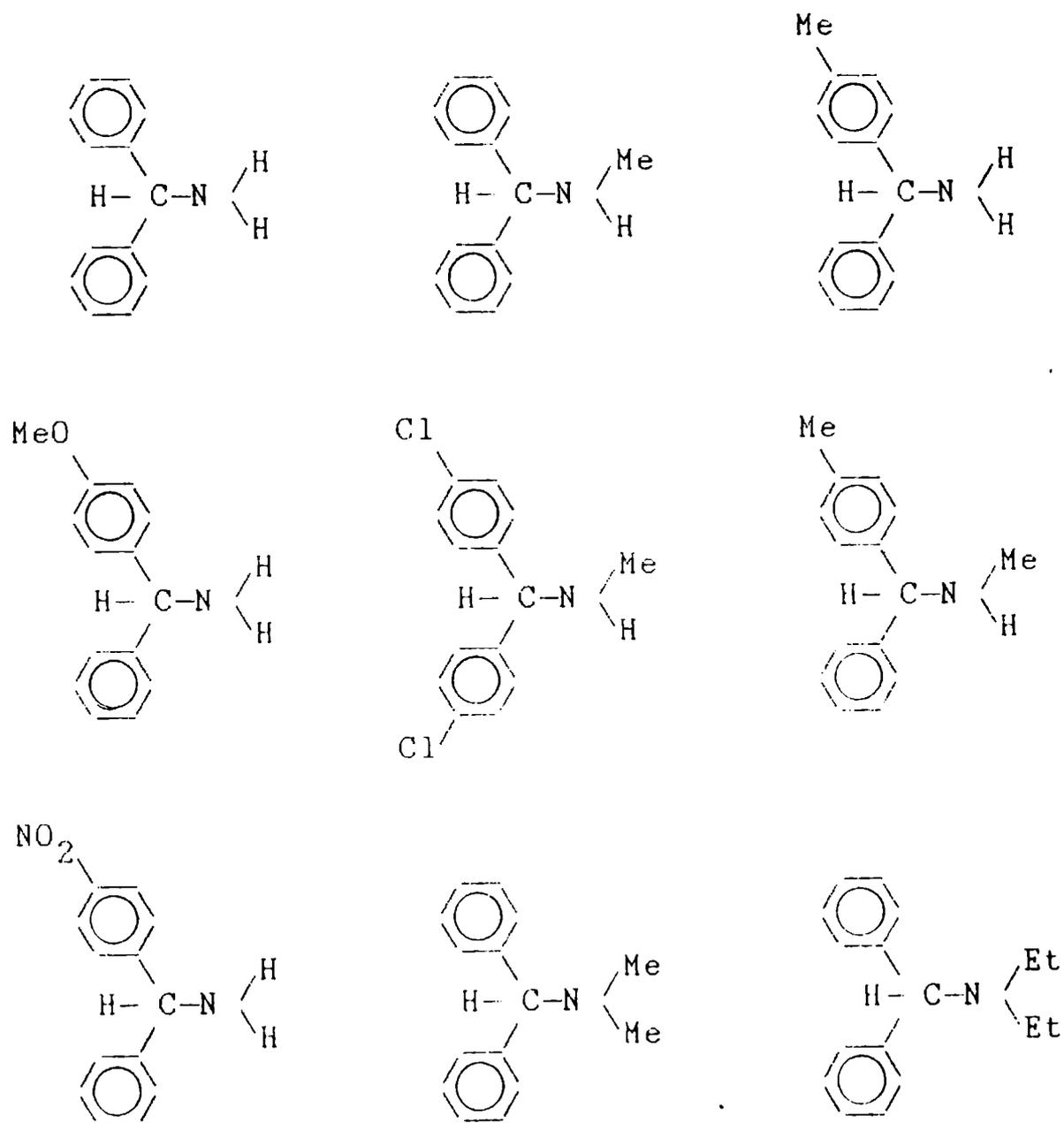


Figura 4.1- Derivados de la Bencidrilamina. Elementos constitutivos de la familia de congéneres.

Tres etapas fundamentales pueden distinguirse en el proceso de *Generación del Líder* :

* la selección de los elementos de la familia de congéneres en base a las propiedades fisicoquímicas y estructurales (Capítulo III),

* su obtención experimental por los caminos de síntesis más adecuados (incluyendo en esta etapa la caracterización e identificación del compuesto sintetizado) (Capítulo IV),

* la determinación de la actividad biológica (Capítulo V), que confirmará, o no, los resultados previstos del diseño racional.

Se dedica este Capítulo a la descripción de los procedimientos experimentales involucrados en la obtención, caracterización e identificación de los derivados previamente seleccionados como elementos de la familia de congéneres.

4.1- CONSIDERACIONES GENERALES-

La obtención del conjunto de derivados involucra modificación de las porciones estructurales hidrocarbonadas unidas al N- amínico y/o p-sustitución en uno o los dos núcleos aromáticos.

La reacción de Leuckart resulta particularmente apropiada para la síntesis de aminas primarias o secundarias y ha sido usada, adaptada de acuerdo a los requerimientos de cada caso, cuando las características del producto final así lo permitieran. Para las disustituciones sobre el N se consideró más adecuado el empleo de reacciones de N-alquilación (tabla 4.1)

El análisis de la Tabla 4.1 indica que 3 reacciones generales son suficientes para la descripción de los métodos de síntesis empleados. Siendo la reacción de Leuckart (método A) la de uso más frecuente en esta etapa de síntesis, cuya aplicación para la obtención de algunos de los derivados no está descripta previamente en la literatura, y mereciendo por lo tanto comentario detallado las modificaciones introducidas, se presentan brevemente los lineamientos generales de esta reacción, indicando luego las condiciones y características definitorias de cada caso particular.

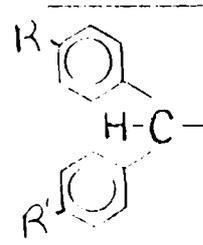
		R	R'	Método	pf(solvente de cristalización)	pf bibliográfico
BB ₁₃	NH ₂	NO ₂	H	A*	HCl.248-50°C(MeOH- Et ₂ O)	----
BB ₂	NH ₂	H	H	A	HCl.293-95°C(H ₂ O)	290°C [131]
BB ₈	NH ₂	Me	H	A	HCl.256-58°C(MeOH)	260°C [132]
BB ₁₀	NH ₂	OMe	H	A	HCl.182-82°C(MeOH)	173-6°C [133]
AB ₁₀	NHMe	H	H	A*	HCl.243-44°C(MeOH)	237-8°C [134]
AB ₁₆	NHMe	Me	H	A*	HCl.203-08°C(EtOH)	199-201°C [135]
AB ₄	NMe ₂	H	H	B	HCl.246,5-7,5°C(EtOH) 68,5-70°C(Et ₂ O) pier.198-201°C(Cl ₃ CH)	244-45°C [136] 68,5-70°C [137] 196-8°C [138]
AB ₇	NEt ₂	H	H	C	HCl.196,5-98°C(MeOH) 57-59°C(MeOH)	----- 58-59°C [139]
AB ₂₈	NMe	Cl	Cl	A*	HCl.229-32°C(MeOH- Et ₂ O)	-----

Tabla 4.1.- Lineamientos definitorios de la etapa de obtención de los elementos de la familia de congéneres. A : Reacción de Leuckart, B : Reacción de Escheiwler Clarke, C: Alquilación de amina.
(*) Técnica no descripta en la literatura para este compuesto.

En cada caso se prepararon los clorhidratos de las aminas respectivas por ser ésta la forma adecuada de administración para el ensayo de su actividad biológica.

Se emplearon solventes de origen comercial calidad pro-análisis tanto en las etapas de cristalización, extracción o etapas intermedias de síntesis, donde pueden cumplir un rol de medio de reacción o reactivo. De acuerdo al grado de pureza se sometieron, en algunos casos, a purificaciones especiales previas.

Los puntos de fusión (no corregidos) de los derivados se determinaron, en capilar cerrado, en aparato Electrothermal.

La homogeneidad de los productos se determinó por cromatografía en capa delgada (Thin Layer Chromatography-TLC) ; empleando cromatofolios comerciales de silica-gel o alúmina con indicador de fluorescencia a longitud de onda 254 nm, de espesor 0,2 mm, y placas de vidrio de silicagel HF₂₅₄ (Merck), de espesor 0,25 mm, preparadas con un aparato Desaga, usando para el revelado luz UV 254 y 366 nm y I₂ como métodos de visualización no destructiva. En relación a los métodos de visualización destructivos deben mencionarse el revelado por mezcla sulfomolibdica o fosfomolibdica.

Los espectros IR se registraron en un espectrofotómetro Perkin Elmer 457 (Cátedra de Química Inorgánica - UNLP), preparando pastillas de BrK.

Se dispuso de equipos Varian FT-80 L (Facultad de Farmacia y Bioquímica- UBA) para la determinación de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ¹³C (¹³C RMN). Se emplearon deuterometanol (MeOD) y dimetilsulfóxido-d⁶ (DMS-d⁶) referenciados a tetrametilsilano, como standards internos.

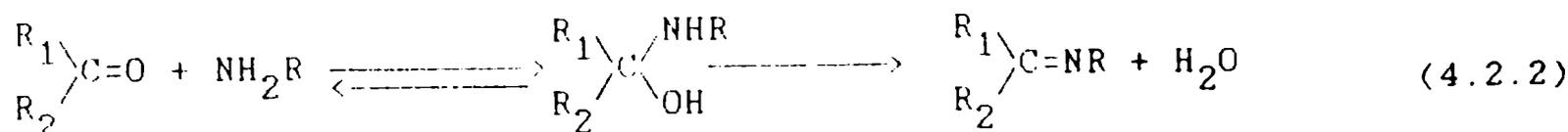
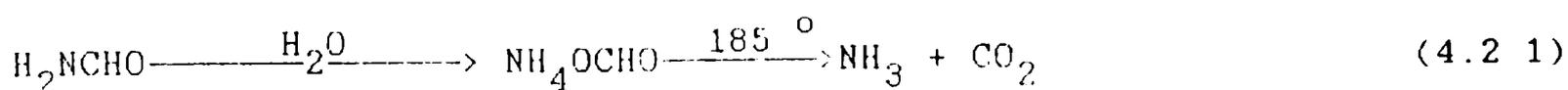
Los criterios empleados en cuanto a la identificación o caracterización de las sustancias se indican en cada caso.

4.2. - LINEAMIENTOS GENERALES DE LA REACCIÓN DE LEUCKART -

La reacción de ácido fórmico o sus derivados (sales, formamidas) con amoníaco, aminas o derivados, y compuestos carbonílicos, resulta en la alquilación reductiva de la amina, con el ingreso de un grupo alquílico proveniente del compuesto carbonílico [140]. Esta reacción, conocida como reacción de Leuckart, inicialmente usada para la síntesis de aminas primarias por calentamiento de cetonas con formamida o formiato de amonio [141], fue adaptada luego [142-144] a la obtención de aminas secundarias a partir de alquilformamidas. Actualmente, la selección adecuada de los reactivos permite la preparación de aminas primarias, secundarias o terciarias [140,145,146], si bien se requieren, en el último caso, condiciones más extremas [147,148] o presencia de catalizadores (cloruro de amonio, sulfato de amonio) [140,146].

Aunque su conocimiento data de 1885, el empleo de este método, indiscutiblemente más simple en su procedimiento (requerimientos experimentales) que las técnicas de hidrogenación catalítica, reducción con hidruros, metales o electroreducción [143], no se extendió a escala preparativa hasta que Ingersoll [150], en 1936, mejoró el rendimiento de la reacción trabajando en exceso de ácido fórmico o su derivado correspondiente.

El mecanismo, aunque algo discutido [151] en relación a las causas que originan la respuesta al catalizador empleado, responde al esquema general [142,145,152,153]



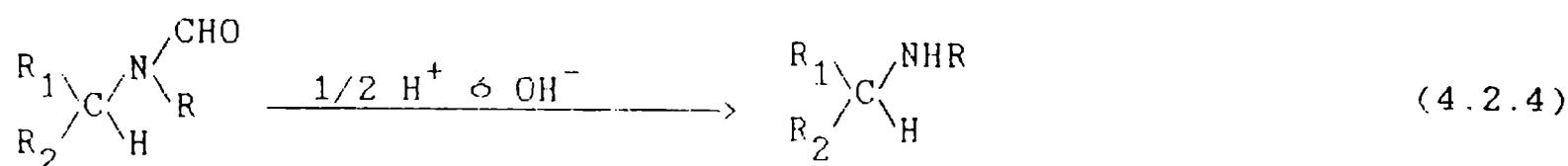
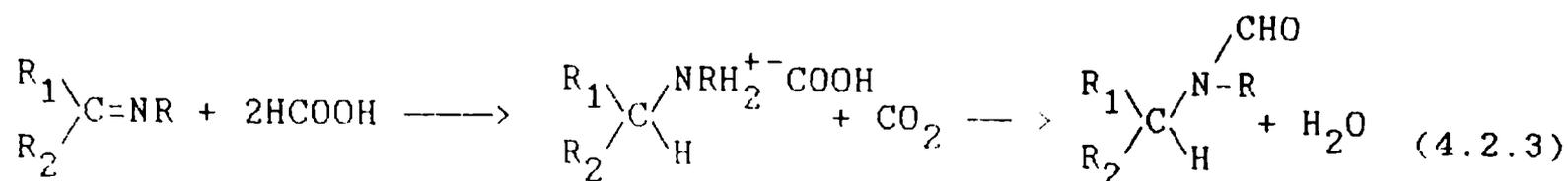


Figura 4.2.1 - Mecanismo general de obtención de aminas primarias por el método de Leuckart.

aunque se sugiere también [154,155,156] que la reacción inicia mediante la adición de formamida al grupo carbonilo :

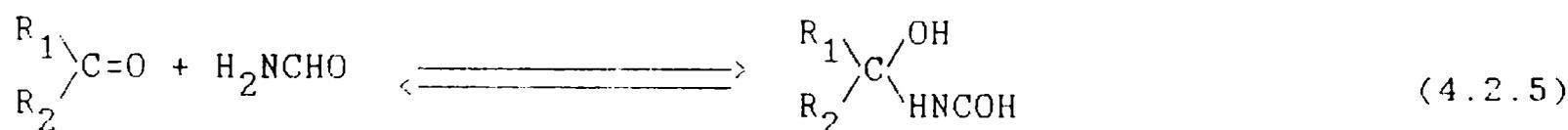


Figura 4.2.2 - Mecanismo de adición propuesto para la etapa inicial de la reacción de Leuckart.

con formación de un enlace C-N entre el átomo de C del grupo carbonilo y el átomo de N de la formamida. El alcohol así formado se reduce por acción del ácido fórmico o la formamida. En este esquema, los efectos catalíticos observados podrían deberse a la polarización inicial del grupo carbonilo de la cetona, tanto por la presencia de un protón (exceso de ácido, sales de amonio) (Fig.4.2.3) o por coordinación del átomo de Mg con el átomo de Oxígeno del grupo carbonilo. El aumento de la carga positiva efectiva sobre el átomo de C (aumento de su acidez) facilita la condensación con el átomo de N relativamente básico de la formamida

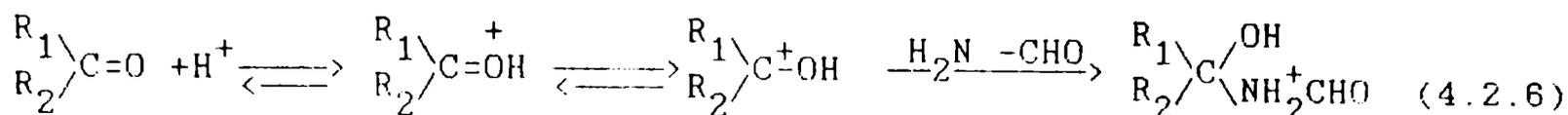


Figura 4.2.3.- Activación del enlace C=O.

Esta etapa de activación resulta imprescindible para que la reacción progrese en ciertos casos, tal como la reducción de benzofenona, debido a la disminución del carácter doble del enlace carbonílico por deslocalización del par de electrones sobre dos anillos bencénicos [153]. Este efecto, que se hace evidente en el corrimiento a menor número de onda, de la frecuencia (ν) IR característica del CO cuando grupos aromáticos reemplazan a los alifáticos (de 1745 a 1665 [157]), dificulta la etapa inicial de adición.

La reacción de Leuckart propiamente dicha llega al N-formilderivado, el cual posteriormente se hidroliza generando la amina.

Condiciones experimentales.

El empleo de formamida o formiato de amonio, extensamente discutido, resulta hoy en día una decisión no independiente de cada caso particular. En el caso que nos ocupa, de "formilación de benzofenona", desde el empleo inicial de formiato de amonio (Leuckart, 1985 [141]), se ha optimizado el rendimiento aumentando la concentración de ácido fórmico en el medio de reacción, generando el formiato in-situ por liberación ácida del carbonato de amonio [145,150,151].

El empleo de ácido fórmico en exceso (entre 1:2 y 1:3, ácido:amina [151,158]) provee el medio ligeramente ácido y sirve como agente reductor, disminuyendo además la importancia de reacciones secundarias (adiciones aldol) con captación simultánea del amonio presente, que aparecería como tal o como carbonato [151,159].

La relación molecular 1:4 , cetona:formiato de amonio

disminuye la formación de aminas secundarias o terciarias.

La temperatura de reacción más adecuada resulta de un compromiso entre la menor temperatura compatible con el producto deseado y la necesaria para que la reacción progrese satisfactoriamente (superior a 150°C, lo cual requiere la destilación del agua acumulada durante el curso de la reacción).

Los reactivos sirven, al mismo tiempo, como solventes de reacción dadas las características de solubilidad de las cetonas en formamida o ácido fórmico.

En relación a la etapa de hidrólisis, debe mencionarse el mejor rendimiento obtenido por hidrólisis ácida que por alcalina. Esta última sólo se usa, en consecuencia, en condiciones de descomposición del producto final en medio ácido.

Sin ocuparnos de una discusión exhaustiva del probable mecanismo de reacción en las condiciones de trabajo, se mencionan aquellas modificaciones que han mejorado el rendimiento y el posible origen de esta mejora, ya que han sido tenidas en cuenta, sin excepción, en las condiciones de síntesis.

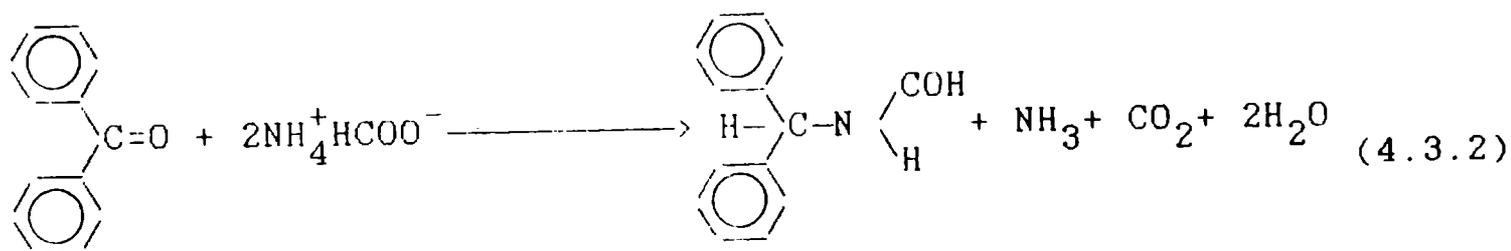
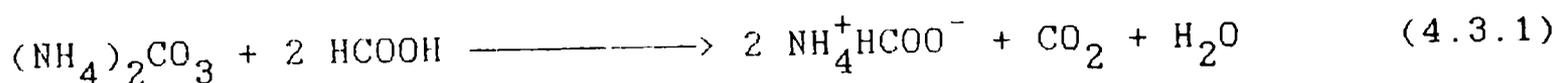
El método de Leuckart resulta particularmente apropiado para la síntesis de N-bencidrilformamida a partir de benzofenona [160] debido a la ausencia de reacciones colaterales [146]. Este fue empleado, en consecuencia, para la preparación de aquellos derivados asociados al método A (Tabla 4.1), combinado con la posterior liberación de la amina por hidrólisis ácida de la formamida correspondiente.

**4.3- Método de Leuckart en la preparación de los elementos
de la familia de congénères.**

4.3.1- Síntesis de Bencidrilamina.(BB₂)

El empleo de la reacción de Leuckart para obtener bencidrilamina a partir de benzofenona ha sido extensamente discutido en la literatura, tanto en relación a las condiciones de reacción-rendimiento [160-162] como al mecanismo asociado [146].

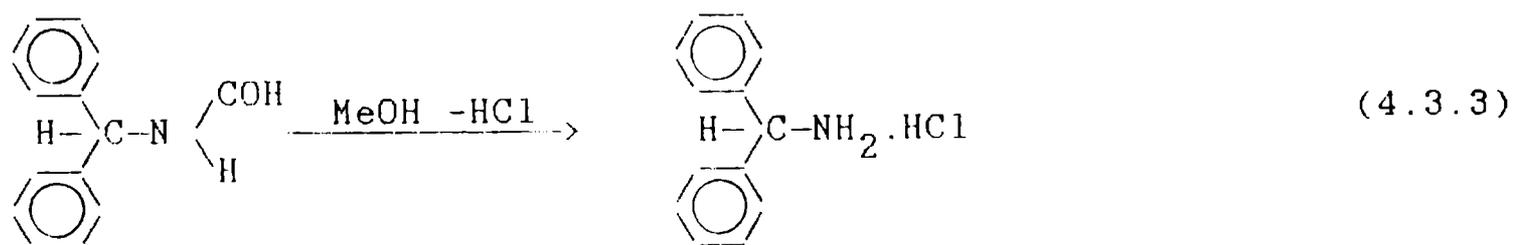
De acuerdo a esta técnica [161], una mezcla de 38 g (0,44 M) de carbonato de amonio (Anhedra) y 80 g (1,76 M) de ácido fórmico 98% (Merck) se calienta lentamente con agitación, previa adaptación de columna fraccionadora, a 100^o durante 2 hs y a 160^oC durante las 5 hs posteriores, separando por destilación el agua formada (ec. 4.3.1.). Se añaden 40 g (0,22 M) de benzofenona (Fluka) y se calienta a 170-180^oC durante 8 hs (N-formilbencidrilamina) (ec. 4.3.2). La solución homogénea formada se vuelca sobre 200 ml de agua, se enfría a 10^oC, se filtra y seca a peso constante. Se purifica por recristalización a pf constante. Rto :80%. pf = 129-132^oC (EtOH), lit.132^oC [131]. IR(KBr): ν_{NH} : 3180 , $\nu_{C=O}$: 1680 .



La misma reacción, realizada en presencia de Cl_2Mg permite obtener un producto del mismo pf pero con una disminución del rendimiento a 70%.

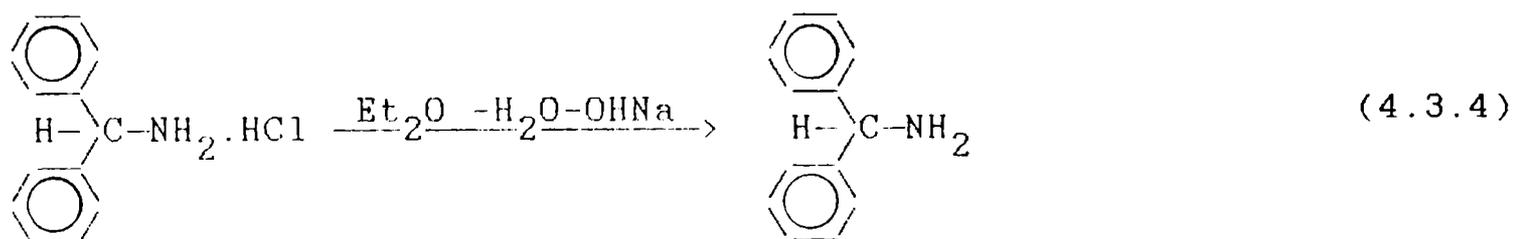
Mediante una ligera modificación de la técnica descrita en la literatura [163] se obtiene el clorhidrato de N-bencidrilamina por deformilación (hidrólisis ácida) de la N-formil bencidrilamina (ec.4.3.3), agregando a 20 gr (95 mM) de este derivado, 45 ml de metanol (agitando hasta formación de una solución límpida) y 45 ml de HCl 6N, con agitación magnética. Se calienta a reflujo, $72-75^\circ\text{C}$ durante 6 hs. Se observa la presencia de un insoluble blanco lechoso que desaparece por el agregado de HCl concentrado (25 ml) y calentamiento en iguales condiciones durante 48 hs. Por enfriamiento de la solución límpida a temperatura ambiente se separan cristales amarillos. Se concentra la solución a mitad de su volumen (evaporador rotatorio con vacío). En esas condiciones, se enfría a 0°C , se filtra al vacío y seca en tambor a peso constante. Rto :97%. pf: $292,5-293^\circ\text{C}$ (H_2O). Lit.: 293°C (H_2O) [131,164]. IR(KBr): 3000 y 2600. (bandas típicas de NH_3^+).

La modificación introducida emplea condiciones más enérgicas de reacción (HCl concentrado, 48 hs de calentamiento, en lugar de 1 h a reflujo en HCl 3N) elevando el rendimiento de 83% a 97% y evitando la extracción de la fase acuosa ácida con benceno:cloroformo (4:1) [163] que conduce a la formación de emulsiones.

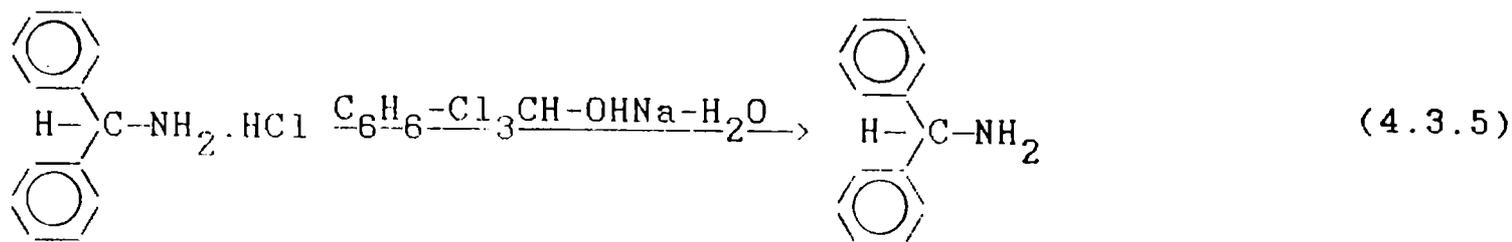


La amina puede liberarse del clorhidrato correspondiente usando $\text{Et}_2\text{O}-\text{OHNa}$ (i) o $\text{HCl}_3\text{C}-\text{C}_6\text{H}_6-\text{OHNa}$ (ii).

i) A 328 mg (1,49 mM) de clorhidrato de bencidrilamina se agregan 15 ml de Et₂O y 5 ml de agua. Enfriando en baño de hielo agua, se adapta agitación magnética y agrega, gota a gota, solución de OHNa 12% hasta reacción alcalina (tornasol). La fase acuosa se separa y extrae con 2x7 ml Et₂O. Los extractos etéreos reunidos se secan con Na₂SO₄, filtran y evapora el solvente, secando luego a peso constante en tambor desecador. Rto 98%. (aceite fácilmente carbonatable por contacto con el aire). El análisis TLC muestra una única mancha por revelado UV (253-366 nm) y sulfomolibdica. n_D = 1,5962. Lit.: 1,593 [131].



ii) A 15 gr (68 mM) de clorhidrato de N-bencidrilamina se agregan 30 ml de H₂O, 180 ml de C₆H₆:Cl₃CH (1:1), con agitación magnética sobre baño de hielo-agua. El posterior agregado de solución de OHNa 42% (7,5 ml) hasta reacción alcalina al tornasol conduce a la formación de cristales en fase acuosa. La agitación continúa durante 48 hs con periódica verificación de alcalinidad (tornasol). La fase orgánica se separa y la fase acuosa se extrae con 3x40 ml de benceno:cloroformo 1:1. Se reúnen los extractos orgánicos, se lavan (1x50 ml H₂O) se secan con Na₂SO₄ anhidro y, luego de filtrar, se concentra en evaporador rotatorio al vacío y seca a peso constante en tambor desecador. Rto: 83%. p.eb./10 = 161-165°C. Lit.: p.eb./10 = 160-64°C [164].



Entre los dos procedimientos ensayados se demuestra indiscutiblemente más apropiado el empleo de $\text{Et}_2\text{O}-\text{NaOH}$ (método i), ya que las extracciones con benceno:cloroformo complican significativamente el procedimiento separativo debido a la formación de emulsiones.

Por otro lado, la liberación de la amina no presenta, en general, importancia práctica en relación a este trabajo, ya que las drogas se ensayan biológicamente como clorhidratos. La amina se libera, como en el caso de BB_2 , cuando se requiere como tal para ser usada como intermedio en la síntesis de otro derivado.

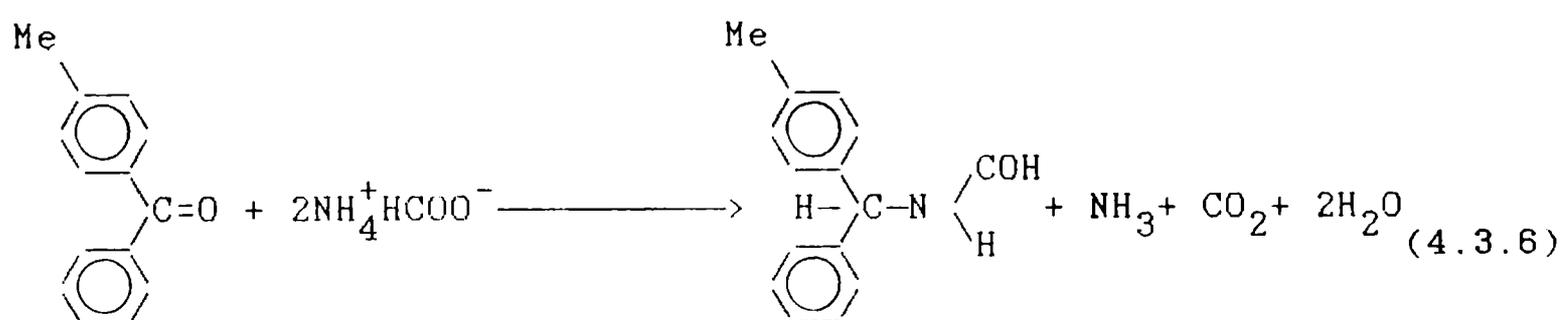
- 4.3.2- Preparación de derivados 4-sustituídos-

En ninguno de los casos descriptos se libera la amina correspondiente dado que se administra el clorhidrato en el ensayo biológico.

a) 4- Metilbencidrilamina- (BB_8)

Se procedió en la misma forma que para la obtención de bencidrilamina, partiendo de 4-metilbenzofenona en lugar de benzofenona.

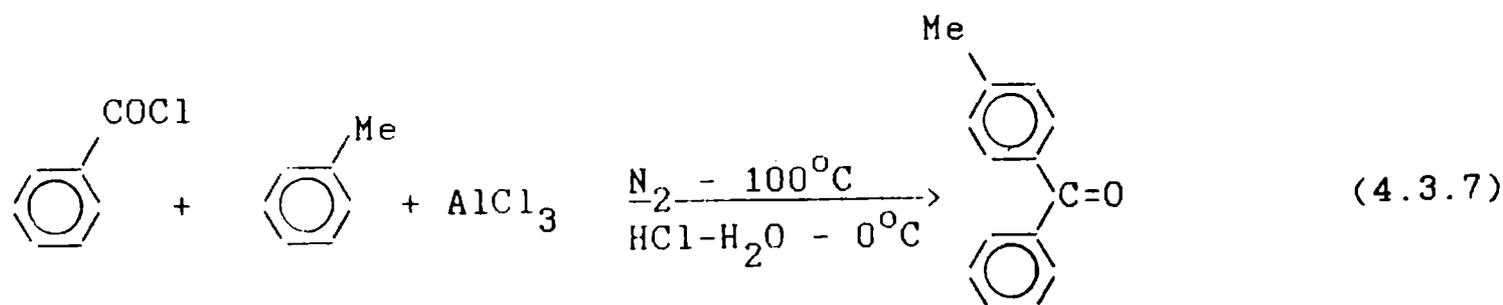
14,0 g (304 mM) de ácido fórmico se agregan lentamente, con agitación magnética, a 6,60 g (76 mM) de carbonato de amonio (Anhedra) (ec.4.3.1). Concluido el agregado se adapta una columna fraccionadora corta y se calienta a 140-160°C durante 4hs, agregando luego 7,5 gr (38 mM) de 4-metilbenzofenona, calentando a 140-160°C (12 hs) y a 160-190°C (12 hs). La solución homogénea formada se vuelca en agua, enfría a 10°C, filtra y seca en tambor (50°C) a peso constante. Rto: 98%.

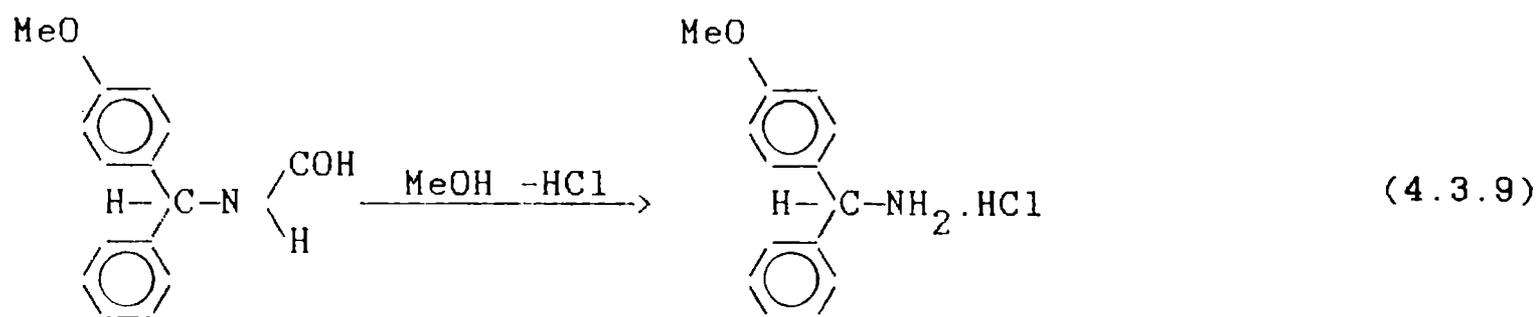


No se caracteriza el formil derivado porque, en general, su baja solubilidad impide su ensayo biológico. Se usa, en consecuencia, para preparar la amina.

Por hidrólisis ácida en metanol-HCl (sección 4.3.1) se obtiene el clorhidrato de 4-metilbencidrilamina. Rto 65%. Pf: 253-4°C (MeOH). Lit.: 260°C [132]. IR(KBr): ν_{NH^+} = 2950, varias bandas 2800-2000.

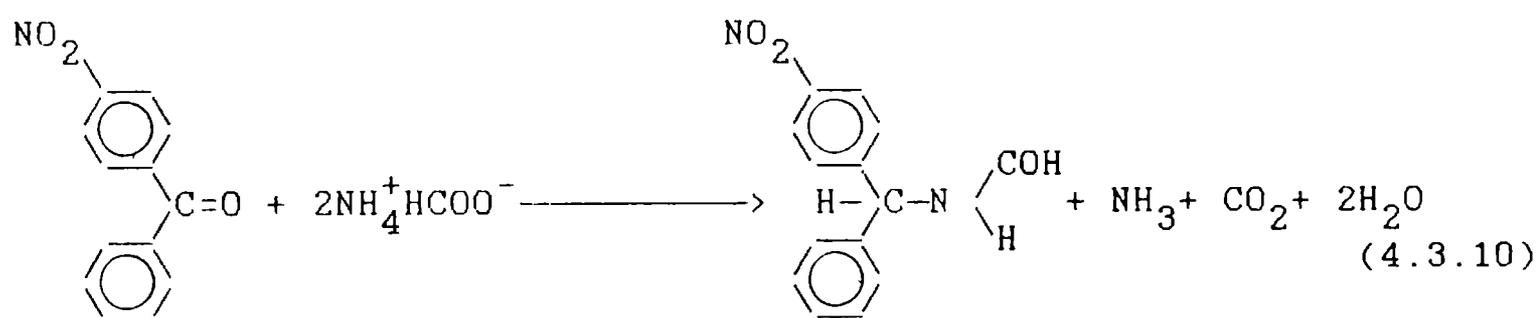
La 4-metilbenzofenona se preparó, según técnica bibliográfica [165], por reacción de tolueno y cloruro de benzoilo en presencia de Cl_3Al (ec. 4.3.7)



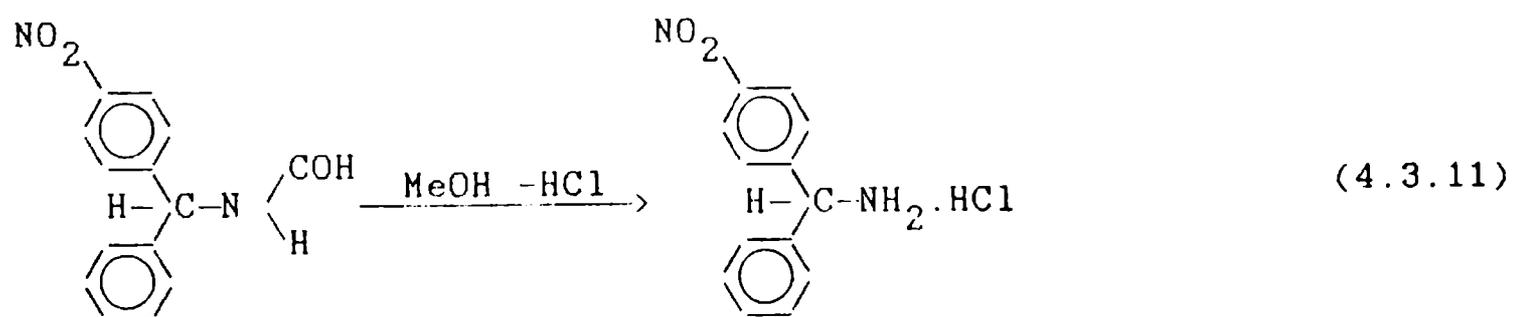


c) 4- Nitrobencidrilamina- (BB₁₃)

La técnica descrita en 4.3.2.a) permite obtener N-formil-4-nitrobencidrilamina a partir de 4-nitrobenzofenona (ec. 4.3.10)



con posterior formación del clorhidrato de 4-nitrobencidrilamina por hidrólisis ácida en MeOH-HCl (sección 4.3.1)(ec.4.3.11)



Se purifica por cromatografía en placa preparativa de sílica gel HF₂₅₄, eluyendo con EtOH y revelando por UV.

Rto:34% .Pf.: 248-250°C(MeOH-Et₂O).Lit: no figurà. IR(KBr) $\nu_{\text{NH}_3^+}$ 2890 y varias bandas 2800-2000.

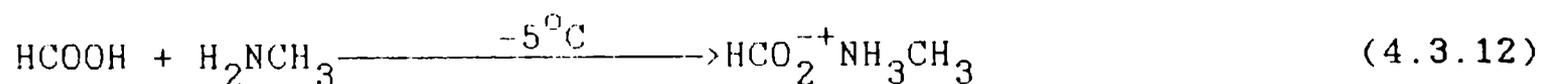
El espectro ¹³C NMR (DMS-d⁶) muestra descomposición en función del tiempo (dos espectros sucesivos aumentan el número de picos) indicando reacción con el solvente. La descomposición fue verificada por TLC. Debido a la labilidad de este derivado se intentó la preparación del picrato para su caracterización. Se descompone en la cristalización.

- 4.3.3- Preparación de derivados 4-sustituídos-N-sustituídos.

a) 4- Metil-N-Metilbencidrilamina- (AB₁₆)

La reacción de Leuckart se emplea también en la preparación de este derivado, mediante la reacción de 4-metilbenzofenona, preparada según técnica descripta en 4.3.2 a), con formiato de N-metilamonio, implicando ésta una técnica no descripta en la literatura.

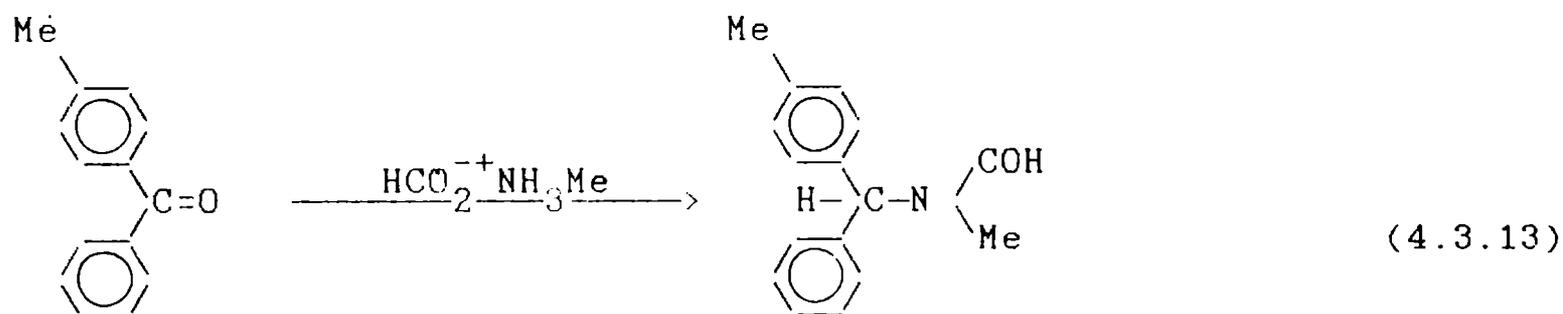
Se deja caer gota a gota 6,5 ml (69 mM) de una solución etanólica (33 %) de N-metilamina (p.a.Fluka) en 5,3 ml (140 mM) de ácido fórmico (Merck p.a. 98%), enfriado en baño de hielo, con agitación magnética, desde una ampolla cuyo vástago esté sumergido en éste (ec. 4.3.12)



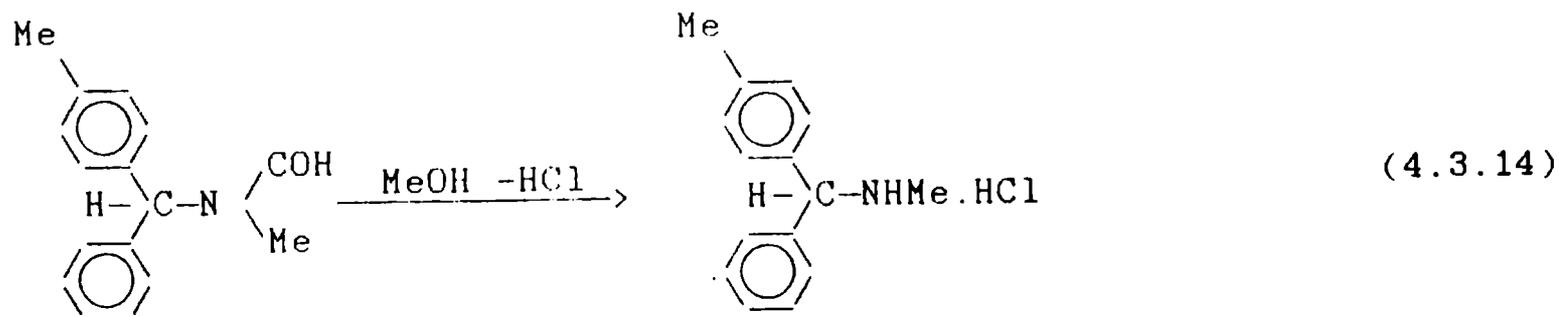
Concluido el agregado se lleva a temperatura ambiente, adapta columna corta de destilación fraccionada y se calienta, recogiendo la fracción 75-100°C.

A la solución así preparada (10,58 g) se le agregan 3,332 g (17 mM) de 4-metilbenzofenona (ec.4.3.13), calentando inicialmente a 140-145°C durante 12hs y luego a 180-185°C 6 hs. Al agregar 50 ml de agua-hielo y enfriar (10°C) se observa formación de aceite, con

separación de un producto pastoso a las 20 hs. Se extrae 3x10 ml Cl_2CH_2 , se seca con Na_2SO_4 anh., filtra, concentra en evaporador rotativo y seca en tambor a peso constante.



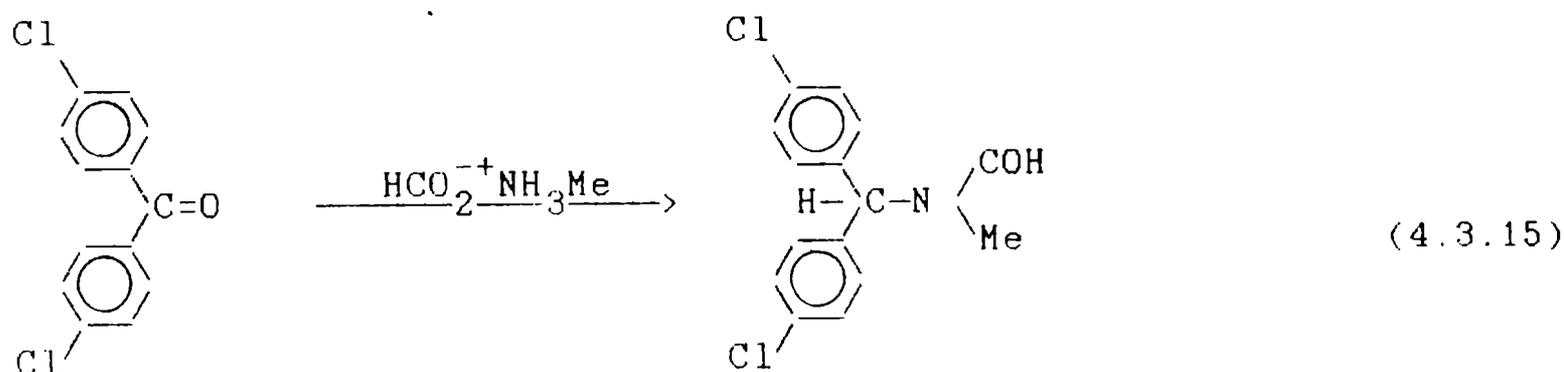
A 4,012 g (16,8 mM) del producto así obtenido (probable N-formil-N-metil-4-metilbencidrilamina) se le agregan 8 ml de MeOH (solución límpida) y 14 ml de HCl 6N (solución opalescente) (ec.4.3.14) y se calienta a 75-80°C durante 24 hs, con refrigerante a reflujo y agitación magnética, agregando 2 ml adicionales de HCl conc. (Douglas) a las 12 y 20 hs de calentamiento. Se separa abundante sólido al enfriar a 10°C. El sólido formado se separa por filtración al vacío, se lava 3x2 ml Et_2O anh, se seca en tambor a peso constante. Rto : 82% (mejora por recuperación de producto de las aguas madres) . pf : 200-203,5°C (EtOH). Lit.199-201°C (éter de petróleo) [135]. El producto fue identificado por pf, pf mezcla e IRcon muestra auténtica. IR: $\nu_{\text{NH}^+}=2710$, varias bandas 2700-2000.



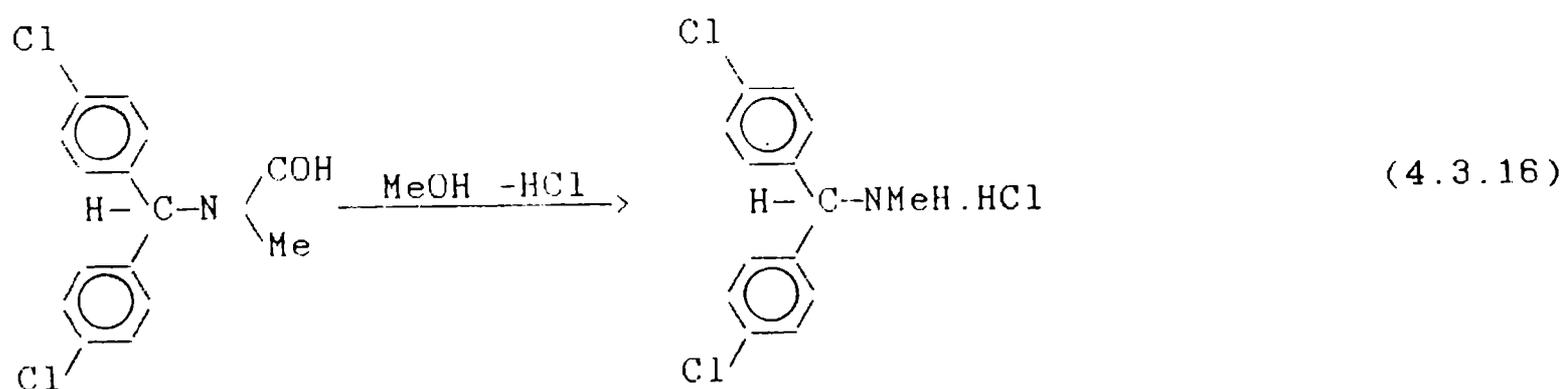
El compuesto se ensaya como clorhidrato en su actividad biológica.

b) 4,4'-Dicloro-N-Metilbencidrilamina- (AB₂₈).

El procedimiento descrito en 4.3.3.a) permite la preparación de 4,4'-dicloro-N-formil-N-metilbencidrilamina a partir de 4,4'-diclorobenzofenona (Aldrich) (ec.4.3.15)



con posterior formación del clorhidrato de 4,4'-dicloro-N-metilbencidrilamina por hidrólisis ácida (ec.4.3.16)



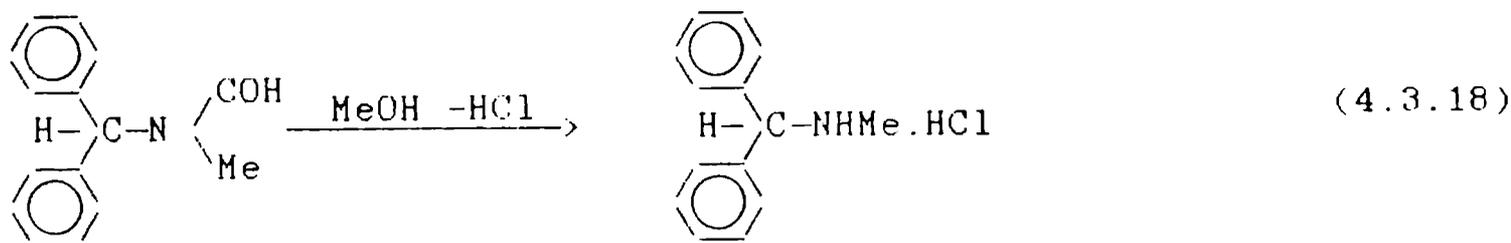
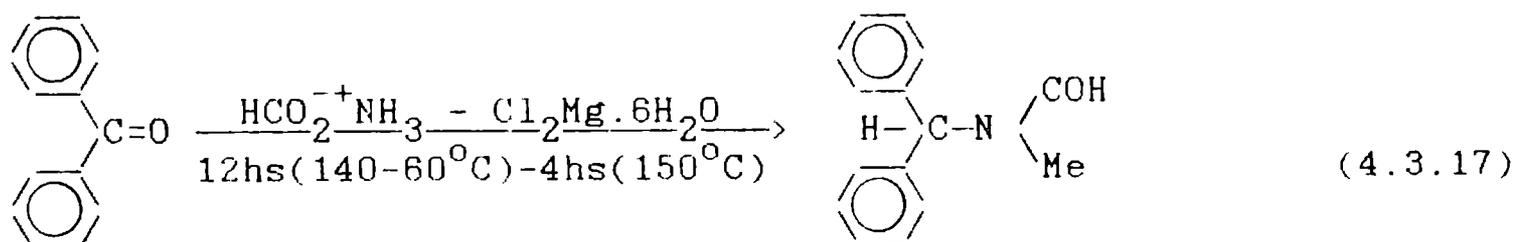
Rto.: 65 %. Pf.: 229-31(MeOH). Lit: no figura. IR: $\nu_{\text{NH}^+} = 2956$ y varias bandas entre 2770- 2000. ^{13}C NMR (MeOD) δ 136,18 (C-4), 134,81 (C-ipso), 130,26 130,15 (C-2, C-3), 66,30 (C-N), 32,13 (N-CH₃). (Espectro 1, Apéndice)

- 4.3.4- Preparación de derivados N-sustituídos-

a) N- Metilbencidrilamina- (AB₁₀)

A pesar de tratarse de un derivado N- sustituido se empleó la reacción de Leuckart , según se describe en 4.3.3.a), tanto en la etapa de obtención del formil derivado (ec. 4.3.12-4.3.14), en la que se emplea como reactivo benzofenona en lugar de 4-metilbenzofenona, como en la posterior hidrólisis ácida con formación del clorhidrato (ec.4.3.18).

La preparación del N-formil derivado requirió el empleo de Cl₂Mg.6H₂O [146] (ec. 4.3.17), el que permite lograr un rendimiento de 92%.

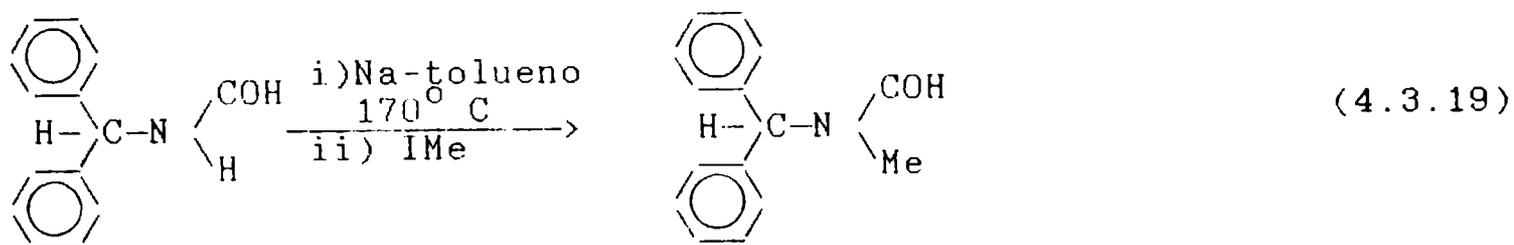


Se obtiene un rendimiento de clorhidrato de 90% (70%) respecto de la cetona. pf: 244,5-246^oC (MeOH). Lit. 238^oC (MeOH-Et₂O) [134]. IR (KBr): ν_{NH}⁺ 2700, varias bandas hasta 2000. ¹³C NMR (MeOD) δ 136,54 (C-4), 129,89 129,81 128,41 (C-1, C-2, C-3), 67,67 (C-N), 32,05 (N-CH₃). (Espectro 2, apéndice)

Se ensayaron también otros caminos de síntesis:

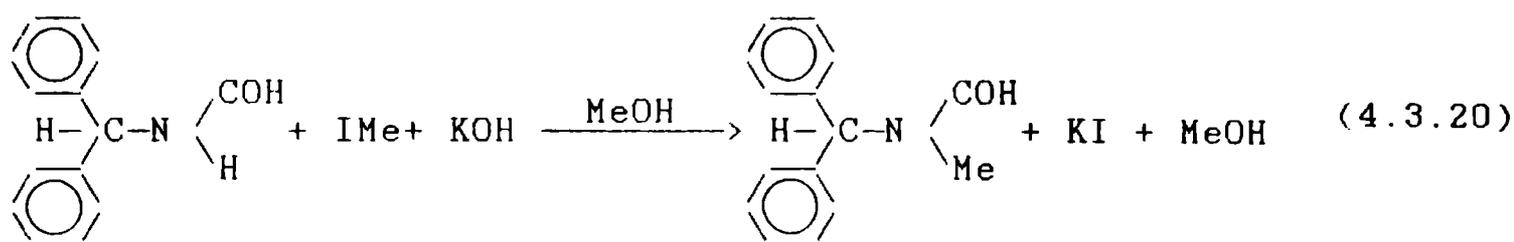
i) Obtención del formilderivado por metilación (ICH₃) de N-formilbencidrilamina:

* En un erlenmeyer con tapón de teflon y adaptador de dos vías en rama vertical, con refrigerante lateral protegido de la humedad con sicapen y agitación magnética, se colocan 2,11 g (10mM) de N-formil-N-bencidrilamina, 25 ml de tolueno (sobre Na) y 260 mg (11mM) de Na limpio (10% exceso). (formación de una suspensión gelatinosa blanca). Se calienta a 70-75°C durante 44 hs y a 110-120°C 4hs. Sobre baño de hielo-agua se agrega gota a gota, 0,68 ml (11 mM) de IMe, se tapa con tapón de teflon, asegura con resortes y se calienta 1 h a 50°C. Luego de enfriar nuevamente en baño de hielo-agua, se agregan 3x0,2 ml de isopropanol, 5 ml de agua y 2 ml de EtOH, se acidifica con HCl 1:1 llevando a pH=6. La emulsión formada se separa por centrifugación y se extrae la fase acuosa con 2x5ml de tolueno. El sólido formado se separa y la fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anh, se concentra en evaporador rotatorio al vacío y se seca en tambor a peso constante.



La técnica se descarta por los bajos rendimientos logrados como consecuencia de la formación de aceites.

* Se ensayó una técnica semejante cambiando el agente reductor (ec.4.3.20)

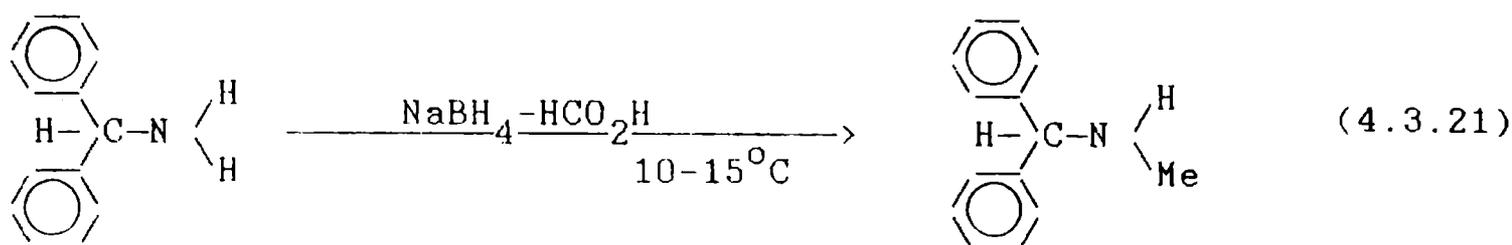


agregando a 422 mg (2 mM) de N-formilbencidrilamina, colocados en un tubo de reacción, 4 ml de MeOH anh (Carlo Erba) y 112 mg (2mM) de OHK (Carlo Erba). Se adapta agitación magnética y se agregan con pipeta Pasteur, a través de una torunda de algodón seco, 28 mg (2mM) de ICH₃ (p.eb. 41-42), gota a gota. Se agita 2 hs a temperatura ambiente y 6 hs a 35-40°C, se concentra en evaporador rotativo al vacío y se lleva a seco en tambor. El sólido blanco obtenido se extrae 3x5 ml Cl₃CH. La fase clorofórmica se separa, se seca con Na₂SO₄ anh., se evapora el solvente en evaporador rotativo al vacío y se seca en tambor a peso constante. Se controla por TLC y pf mezcla con reactivo de partida, observándose que no hubo reacción.

ii) Obtención de la amina secundaria por metilación de la amina primaria correspondiente.

Se adapta una técnica descrita en la literatura para la preparación de alquilaminas [166].

Se agregan lentamente, con agitación magnética, sobre baño de hielo-agua, 30 ml de ácido fórmico (Merck) a 905 mg (5mM) de bencidrilamina. Luego del posterior agregado de 1,9 g (50mM) de NaBH₄ en pequeñas porciones para evitar proyecciones (tiempo de agregado = 8 hs) se deja descansar 10 hs a temperatura ambiente, se agrega igual volumen de agua y, lentamente, solución de OHNa 42% p/p hasta reacción alcalina al tornasol (ec.4.3.21). Luego de gregar 30 ml de Et₂O se extrae 2x20 ml Et₂O.

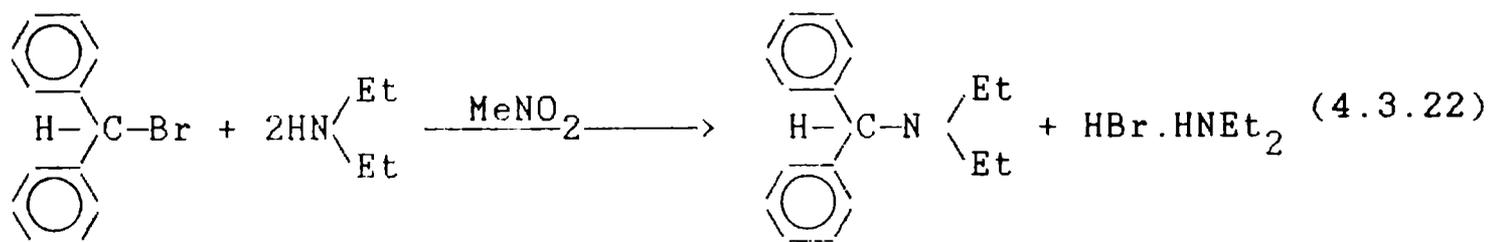


Los extractos se reúnen y se secan con Na_2SO_4 . Luego de pasar corriente de HCl (gas, seco) se filtra por placa, y se seca a peso constante en tambor desecador.

La técnica se descarta debido a que la formación de otros derivados disminuye el rendimiento a un 13%. Se obtiene el formilderivado según se confirma cotejando por TLC, pf mezcla con muestra auténtica e IR.

b) **N,N-Dietilbencidrilamina- (AB₇).**

El derivado se preparó según técnica descripta [139], colocando en un tubo de reacción, con agitación magnética, 3,6 ml (27 mM) de dietilamina y 4 ml de nitrometano (BDH) y agregando lentamente, con pipeta Pasteur, una solución de 4 g (16 mM) de bromuro de difenilmetano en 4 ml de nitrometano, lavando con 2 ml de nitrometano el recipiente que lo contenía (ec. 4.3.22)

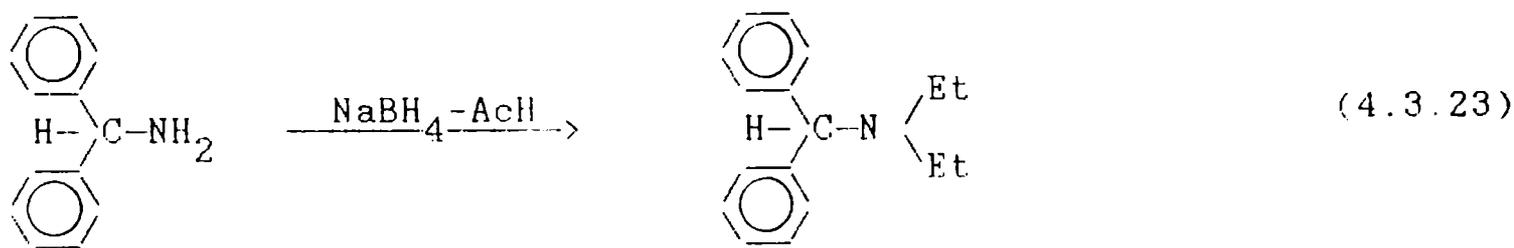


Luego de adaptar un refrigerante a reflujo se calienta lentamente el sistema desde 30°C a 95°C durante 1 h, se agrega agua y se lleva a pH 5,0 (papel universal) con solución de OHNa . Se extrae 1x25 ml y 2x 10 ml con Et_2O , se seca con Na_2SO_4 , se concentra en rotavapor, secando luego el sólido formado a peso constante. Sólido

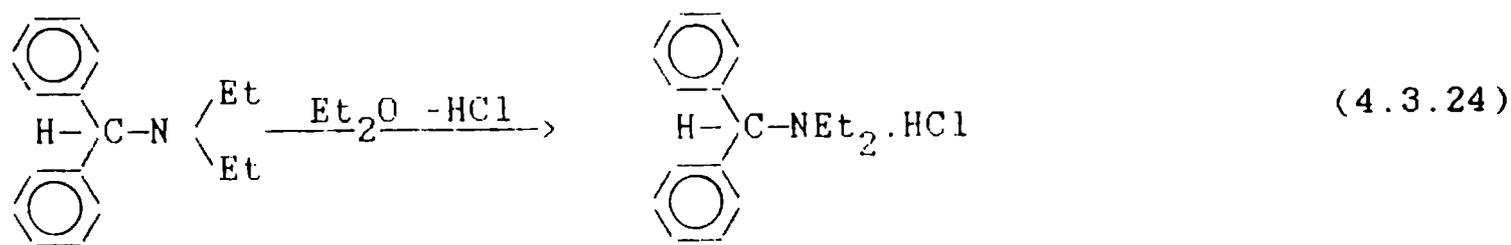
amarillo. Rto:66%. pf : 58,5-59,5^oC (MeOH). Lit. 58-59^oC [139].

Dado que la droga se administra como clorhidrato en el ensayo biológico, se prepara dicho derivado a partir de la amina por la técnica ya descripta (pag. 73). Rto 89%. pf: 196,5-198^oC (MeOH). IR (KBr) : ν_{N-H} 2945, varias bandas 2900-2200.

Una nueva vía de preparación ensayada permite obtener el mismo producto con rendimiento algo inferior (44%). En un tubo de reacción se agregan gota a gota 10 ml de AcOH (Fluka) a 366 mg (2 mM) de Bencidrilamina, enfriando en baño de hielo-agua. Se agregan en pequeñas porciones (50 mg) 800 mg (16 mM) de NaBH₄, calentando luego a 60^oC una vez concluido el agregado (ec.4.3.23). Manteniendo la temperatura a 0^oC (baño hielo-agua), se agregan 10 ml de Cl₂CH₂, alcaliniza (OHNa 45%) a reacción alcalina (tornasol), separa las fases y extrae 2x10 ml Cl₂CH₂. Los extractos orgánicos reunidos se secan con Na₂SO₄, filtra y concentra en rotavapor.



Luego de agregar 12 ml Et₂O seco, se filtra y pasa corriente de HCl(g). Se separa el sólido formado y cristaliza (ec. 4.3.24)



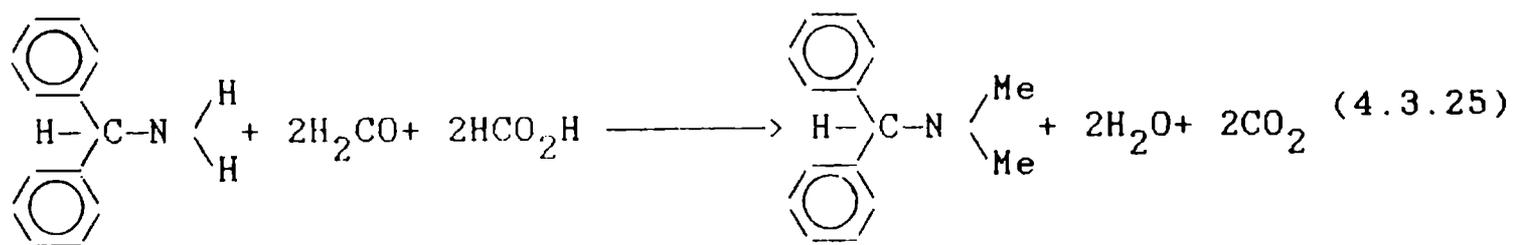
Rto:44%. Pf.: 194-96^oC (MeOH). Se identifica con muestra auténtica por pf mezcla e IR.

c) N,N-Dimetilbencidrilamina- (AB₄).

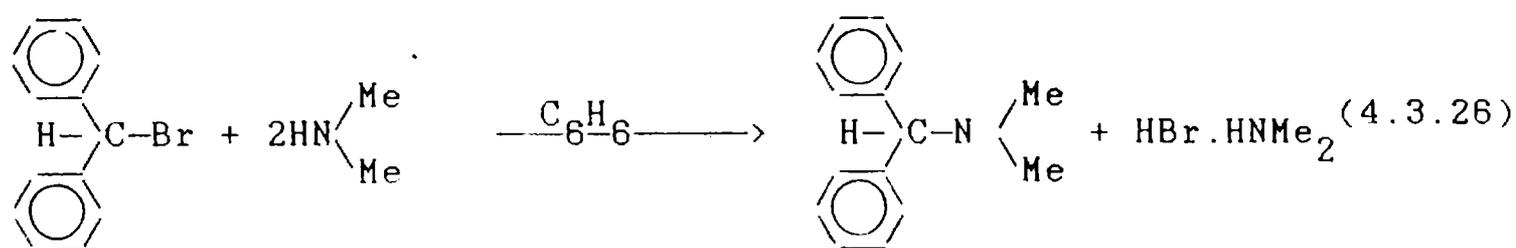
Se prepara a partir de la bencidrilamina no sustituida por el método de Eschweiler-Clarke [140,158,167].

La reacción de Eschweiler-Clarke (tratamiento con formaldehído y ácido fórmico) (ec 4.3.25) es un procedimiento standard de metilación de aminas primarias, considerado en general como el método más conveniente y económico de preparación de aminas terciarias N,N-dimetil sustituidas, ya que requiere condiciones menos drásticas que la reacción de Leuckart cuando se aplica, esta última, a la obtención de aminas terciarias.

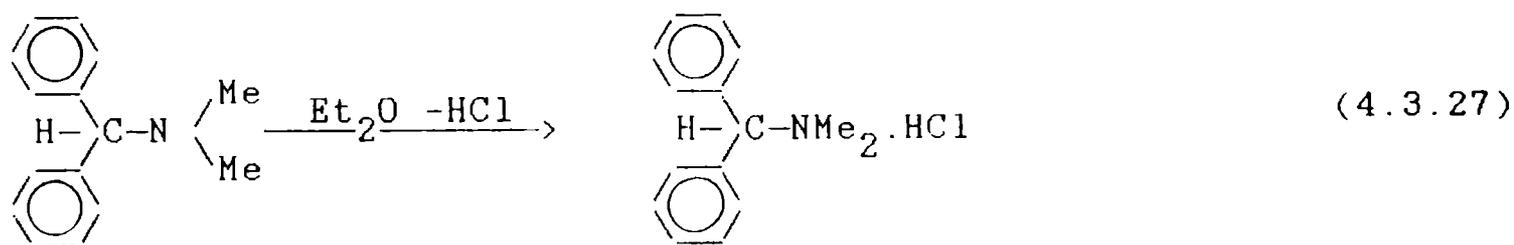
Se agregan lentamente 78 ml (1950mM) de ácido fórmico (Merck) a 12,44 g (65 mM) de bencidrilamina, con agitación magnética y enfriamiento (agua-hielo). A la solución límpida, ligeramente amarilla, formada, se le agregan 108 ml (1300 mM) de formalina (Douglas 36-38%). Se calienta a reflujo 15 hs a 70°C y 4 hs a 90-95°C. Por enfriamiento a temperatura ambiente o baño de hielo no se observa formación de precipitado. Se agregan 50 ml de agua, 80 ml Et₂O y 140 ml NaOH 42% hasta reacción alcalina al tornasol. Se separan las fases y extrae 5x40 ml de Et₂O. Se seca con K₂CO₃ anh., concentra en evaporador rotativo y seca en tambor desecador a peso constante. Se obtiene un producto pastoso, de color blanco, inodoro. Rto : 77%. pf: 68,5-70°C (EtOH). Lit. : 68,5-70°C [136]. IR (KBr): ν_N+ = 2945, varias bandas 2900-2000.



Dado que no se describe en la literatura la aplicación de esta técnica a la obtención de la N,N-dimetilbencidrilamina, el compuesto así obtenido se cotejó (TLC, pf mezcla) con una muestra de sustancia preparada por reacción directa de la amina secundaria con bromuro de difenilmetano [168] (ec.4.3.26).



El clorhidrato se obtiene según procedimiento análogo al descrito en 4.3.3-b) (ec. 4.3.27), por pasaje de corriente de HCl gas seco sobre una solución de la amina en benceno.



Se obtiene un sólido .Rto 89,4%. pf: 244-45^oC (EtOH).
 Lit: 244-45^oC [137]. Se preparó también el picrato,
 pf: 198-201,5^oC (Cl₃CH). Lit: 196-8 [138].

- CAPITULO 5 -

- Familia de congéneres -

**Su actividad
antiespasmódica**

La cuantificación de la actividad antiespasmódica de cada uno de los derivados preparados permitirá la racionalización de la modificación de la actividad biológica en respuesta a las características del cambio estructural introducido.

Adquiere sin duda indiscutible relevancia la precisión de la determinación del *dato biológico*, variable irremplazable cualquiera sea la relación cuantitativa estructura-actividad planteada. La exactitud en la determinación debe reflejarse en la obtención de valores reproducibles a lo largo del tiempo dentro de ciertos límites de error, lo que requiere la standarización de los ensayos biológicos para evitar posibles fluctuaciones [15].

Se dedica este capítulo a la definición del *dato biológico*, la forma como éste se expresa y su significado, en cuanto al tipo de interacción que representa.

Definiendo como *fármaco* a todo compuesto bioactivo, el término *farmacología* queda restringido al estudio de la acción del fármaco molecularmente dispersado, determinada por interacciones químicas y fisicoquímicas [28]. La *respuesta farmacodinámica* es, en consecuencia, el resultado de la interacción de moléculas del fármaco con parte de las moléculas de las que se compone el *objetivo biológico* [169], las que conforman, en algunos casos en que ciertos requerimientos estéricos y de distribución de carga se satisfagan, sitios macromoleculares de acción (*receptores específicos*).

Antes de definir la forma de cuantificación de la *respuesta biológica*, cabe comprender el proceso biológico implícito cuantificado en ésta.

La acción de una droga (o fármaco) se basa en una secuencia de eventos desde su administración a la determinación de la respuesta. Este proceso complejo puede dividirse en tres fases fundamentales [20,28,170]:

Fase farmacéutica o de aplicación que comprende la dispersión molecular de la droga administrada, lo que posibilita una efectiva absorción posterior por el sistema biológico.

Fase farmacocinética que comprende la absorción de la molécula droga, su distribución, conversión metabólica (activación o inhibición) y excreción, determinando la concentración de droga que , en su forma activa, alcanza el *tejido objetivo*.

Fase farmacodinámica concerniente a la inducción de un estímulo en base a la interacción de la molécula droga con sitios específicos de acción o *receptores* que conducen, a través de una secuencia de proceso bioquímicos, a la *respuesta*.

La relación entre el estímulo y la respuesta se considera independiente de las propiedades de la molécula droga. Esta última etapa no tiene, por lo tanto, importancia directa en relación al *diseño de drogas* [28,169]. Sin embargo, es la medida de una respuesta lo que nos permite cuantificar el efecto de las modificaciones introducidas, las que modifican en realidad el estímulo originado.

Sin entrar en una discusión detallada , se definen someramente algunos conceptos cuya comprensión es necesaria para el planteo de relaciones cuantitativas estructura-actividad, las cuales requieren tanto un dato químico estructural (descriptor molecular) como un dato biológico.

5.1- Principales conceptos vinculados a la cuantificación y expresión del "dato biológico"

5.1.1- Se diferencian usualmente dos tipos de datos biológicos : *dicotómico* y *cuantitativo* [21].

El dato *dicotómico* (o *cuantal*) se refiere a la mera información : activo/inactivo, tóxico/no tóxico, para una dosis determinada.

El *dato biológico cuantitativo* involucra la medida de la respuesta biológica en un dado intervalo de tiempo, entendiéndose por *respuesta biológica* (W) la magnitud del cambio de un parámetro biológico medible (contracción muscular, cambio de la presión sanguínea, etc) luego de la administración de una droga [15]. La expresión de esa cantidad en función de la concentración de droga administrada (dosis = C) resulta en curvas "dosis-respuesta", de forma sigmoidal en escala semilogarítmica (Fig.5.1).

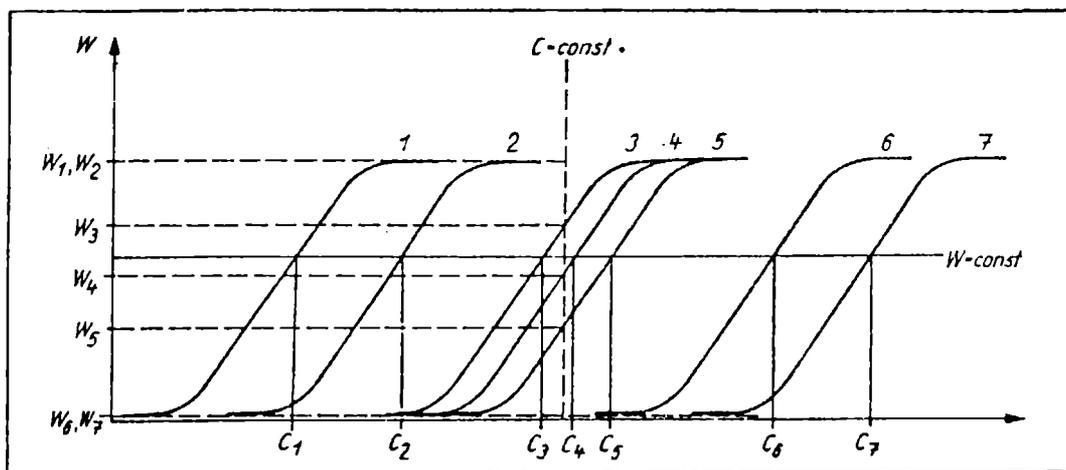


Figura 5.1- Curvas dosis-respuesta.

5.1.2.- La *actividad biológica* de distintas drogas puede compararse considerando:

i) la concentración C que produce una dada respuesta, lo que corresponde gráficamente a la intersección de una paralela al eje de las abscisas con cada una de las curvas

dosis-respuesta, y numéricamente a la recíproca de la dosis que produce una respuesta dada

$$A = 1/C, \quad W = \text{cte} \quad (5.1.1)$$

ii) la respuesta W para concentración constante, indicada gráficamente por la intersección de una perpendicular al eje de las abscisas (Fig. 5.1)

$$A = W, \quad C = \text{cte} \quad (5.1.2)$$

iii) el porcentaje de actividad relativo a un standard dado

$$A = \frac{\% \text{ actividad del standard}}{(100\% - \% \text{ actividad del standard})} \quad (5.1.3)$$

Se prefiere la medida a respuesta constante ya que la correspondiente medida a concentración constante implica el no conocimiento de la respuesta y la probabilidad de estar comparando zonas que no correspondan a relaciones lineales (así 1 y 2, Fig. 5.1, generarían la misma respuesta)

Si bien la respuesta a un estímulo se considera independiente de la droga y determinado por el sistema biológico y las condiciones en que se realiza el ensayo, la producción de este estímulo es el resultado directo de la interacción droga-sitio activo, fuertemente dependiente, no sólo de las características estructurales sino también de la conformación particular de la molécula-droga en el momento de la interacción. Una adecuada standarización de las

condiciones en que se realiza el ensayo biológico, que permite considerar : igual estímulo- igual respuesta (Cap.II), extiende linealmente la dependencia droga-estímulo a droga-respuesta.

5.1.3- La interacción de la droga con el sitio receptor produce una perturbación que resulta en un estímulo S , proporcional al grado de ocupación del receptor y

$$S \sim y, \quad S = F \times y \quad (5.1.4)$$

donde F (factor de proporcionalidad) provee una medida de la habilidad de la droga para perturbar al receptor en la forma específica que conduce al estímulo S , ya que no toda interacción será perturbativa.

Para una interacción



que puede describirse en términos de la ley de acción de masas, correspondiéndole una cte K_i

$$y = \frac{[DR]}{[R]+[DR]} = \frac{K_i[D]}{1+K_i[D]} \leq 1 \quad (5.1.5)$$

F se expresará como la fracción del complejo DR (droga-receptor) que resulta perturbado específicamente al estado SP para generar el estímulo y representa la actividad intrínseca de la droga.

$$F = \frac{[SP]}{[DR]} = \frac{[SP]}{[SP]+[NSP]} \quad (5.1.6)$$

donde SP = fracción del complejo perturbado específicamente :
 conduce a estímulo,
 NSP = fracción del complejo perturbado no específicamente : no
 conduce a estímulo.

Dado que las cantidades involucradas en la definición de F no son directamente medibles, las actividades intrínsecas de los miembros de una familia de agonistas se expresan en función de la actividad biológica de un compuesto de referencia, teóricamente el de mayor actividad intrínseca de una familia dada, resultando así, para la droga A :

$$\alpha = \frac{F}{F_{\max}} \quad (5.1.7)$$

En este contexto se incluyen en una *familia farmacológica* las drogas que pueden interactuar con los receptores de un cierto tipo de sistema receptor efector y que, al hacerlo, producen el mismo tipo de respuesta [21].

5.1.4.- F encierra las expresiones termodinámicas de los equilibrios involucrados en cada una de las etapas intermedias, desde la unión de la droga al sitio (o *sistema receptor*) hasta la producción del estímulo (*sistema efector*). No debe ser corregida por consideraciones extratermodinámicas ya que no se encuentra afectada por los procesos de la fase farmacocinética tales como absorción, distribución, excreción.

En base a la magnitud del factor F se diferencian:

- * - *Agonistas* [171] o activadores de los receptores [172] : *aquellas drogas que, en la dosis apropiada, originan la máxima respuesta biológica posible en un dado biosistema.*

- * - *Antagonistas parciales* [173], incapaces de producir máxima respuesta, aún cuando se administren en altas dosis, lo que está indicando fuerte contribución de [NSP].

- * - *Antagonistas*, los que, aún cuando se combinan con el receptor sólo producen NSP y, por lo tanto, ni estímulo ni acción. Dado que se combinan con el receptor pero no producen estímulo pueden inhibir la respuesta frente a un agonista. Es activo en este aspecto pero inactivo frente a "receptores vacíos" [170]. Por su acción se define un antagonista como aquella droga que se contrapone al efecto de un agonista [28]. Queda claro, en consecuencia, que sólo se puede hablar de agonismo-antagonismo en relación a una acción biológica y tipo de receptores perfectamente definidos.

Este efecto antagonista puede clasificarse de acuerdo a la fase de acción de la droga en la cual ocurre:

- reducción de la disponibilidad *farmacéutica* de la droga antagonizada, disminuyendo en consecuencia la cantidad de droga liberada en su forma activa o la velocidad de liberación de la preparación farmacéutica.

- reducción de la disponibilidad biológica de la droga antagonizada (antagonismo en la fase *farmacocinética*) que implica menores niveles de droga en sangre o tejidos por reducción de la absorción, aumento de la excreción o modificación de otra etapa del metabolismo. Actúan en esa etapa los "antagonistas químicos", en los cuales el efecto se debe a una interacción directa (química o fisicoquímica) entre el agonista y el antagonista. Las estructuras de un agonista y su antagonista químico son complementarias. El efecto antagonista puede superarse aumentando la dosis de agonista.

- reducción de los niveles de respuesta de la droga antagonizada (indicada usualmente como agonista) por interferencia del antagonista en la interacción de la droga con sus sitios de acción o sus receptores específicos (antagonismo en la fase *farmacodinámica*). Dado que la fase farmacodinámica comprende la

inducción de un estímulo y la secuencia de eventos posteriores que concluyen en la respuesta biológica, existen varios puntos de ataque para la acción antagonista, lo que lleva a una subclasificación en :

-a) antagonismo competitivo : ocurre a nivel de los receptores de un dado sistema receptor-efector. Existen en general relaciones estructurales entre agonista y antagonista como también entre varios antagonistas competitivos de un dado agonista. El efecto puede superarse por un aumento de la dosis.

-b) antagonismo no competitivo : se produce por interferencia en la secuencia de eventos bioquímicos desde la producción del estímulo a la respuesta final. No pueden superarse aumentando la dosis ya que producen una depresión del logaritmo de la curva dosis-respuesta del compuesto agonista. Se diferencian además de los competitivos por una falta de especificidad con respecto al agonista (un antagonista no competitivo puede antagonizar la acción de agonistas de distinto tipo). El antagonista interacciona con sus propios receptores, que son distintos de los del agonista, causando un cambio en la relación entre la concentración de agonista en la vecindad de sus receptores y su efecto. Este cambio producido a nivel de los receptores se puede manifestar en [170] :

b₁) antagonismo no competitivo

metafinoide : los receptores del agonista se modifican en respuesta al cambio en los receptores del antagonista reduciendo la afinidad entre las moléculas de agonista y sus receptores

b₂) antagonismo no competitivo

metactoide : el cambio en los receptores del antagonista disminuye la actividad intrínseca del agonista.

-c) antagonismo funcional se presenta cuando dos agonistas cambian un dado parámetro biológico en relaciones opuestas debido a que, interactuando con dos sistemas receptores independientes, causan efectos que interfieren en un único sistema efector de la respuesta.

-d) antagonismo físico : semejante al anterior, se diferencia de éste en que las dos drogas que oponen su efecto actúan sobre sistemas receptor-efector independientes.

5.2- Modelo metactóide para la interacción biológica de los derivados de la Bencidrilamina.

La actividad antiespasmódica de los derivados de la Bencidrilamina (Fig. 4.1), ensayada en músculo liso intestinal, responde a un modelo de antagonismo no competitivo metactóide.

En el modelo de interacción metactóide, dos drogas A y B interaccionan con receptores R y R' distintos e independientes uno de otro con respecto a sus interacciones con A y B, pero con sus sistemas receptor - efector interrelacionados. Tanto A como B son agonistas de sus propios receptores, pero el estímulo causado por la interacción de B con R' (S'_B) no se expresa en un efecto directamente medible sino en una alteración de la efectividad de la interacción de A con R, que se supone directamente proporcional al estímulo S'_B .

Llamando E_A al efecto producido por una dada concentración de droga [A], E_{AB} al efecto producido por [A] bajo la influencia de B y E_{ASmax} al efecto de A en presencia del máximo estímulo del sistema metactóide, el efecto de B resulta un factor de multiplicación entre la ocupación del receptor por A y el efecto causado por esta interacción.

El valor extremo se relaciona con el original E_A en una forma que depende de la interrelación entre ambos sistemas

$$E_{ASmax}' = p \times E_A \quad (5.2.1)$$

siendo por lo tanto p una constante que da cuenta de tal interrelación.

La combinación de las ecuaciones 5.1.5, 5.1.6, 5.1.7 y 5.2.1 conduce [170], para $[D] = [B]$, a la ecuación que interpreta las curvas dosis - respuesta

$$E_{AB'} = \left\{ 1 + (p-1) \frac{\beta'}{1 + K_{B'}/[B]} \right\} E_A \quad (5.2.2)$$

donde [B] es la concentración del antagonista metactóide, $K_{B'}$ su constante de afinidad y β' su actividad intrínseca.

5.3- Expresión numérica de la actividad biológica.

De acuerdo a las ecuaciones (5.1.5) y (5.1.6) la actividad de una droga depende de dos propiedades :

* su afinidad a ciertos receptores, que es una medida de la tendencia de la droga a asociarse con ellos . De acuerdo a la ley de acción de masas se define como la inversa de la constante de disociación del complejo DR. En la práctica se emplea la expresión logarítmica debido a la forma de las curvas dosis-respuesta.

* su actividad intrínseca, que determina en qué proporción la interacción con el receptor resulta en la generación de un estímulo.

Cada modo de interacción (químico, competitivo, no competitivo) responde a un mecanismo diferente y se interpreta, en consecuencia, por ecuaciones distintas, dando lugar a la definición de distintos cuantificadores de la actividad biológica , de aplicación específica de acuerdo al caso particular considerado :

- pD_2 , logaritmo negativo de la concentración molar del agonista que produce el 50% del efecto máximo de la droga en el sistema receptor - efector, para agonistas,

- pA_2 , logaritmo negativo de la concentración de antagonista en presencia de la cual se necesita el doble de la concentración original de agonista para lograr el efecto inicial, para antagonistas no competitivos,

- pD'_2 , logaritmo negativo de la concentración de droga metactóide que produce un cambio en el efecto (respuesta) del agonista igual a la mitad del cambio máximo de este efecto que puede causar la droga en cuestión, para antagonistas metactóides.

La expresión matemática de este funcional, que representa el comportamiento de los compuestos ensayados, se deriva fácilmente en base a la consideración de que tales compuestos son antagonistas totales, pudiendo por lo tanto reducir a cero el efecto del agonista. La ecuación 5.2.2 representa antagonismo completo para valor nulo del parámetro p ($p = 0$), lo que implica que el sistema metactóide permite antagonismo completo, y valor 1 del coeficiente β' ($\beta' = 1$), lo cual a su vez significa que el antagonista metactóide B, siendo un agonista completo de sus propios receptores, permite también que este antagonismo completo sea posible. Para el caso $p=0$, $\beta'=1$, la ecuación 5.2.2 se reduce a

$$\frac{[B]}{K_B} = \frac{E_A}{E_{AB'}} - 1 \quad (5.3.1)$$

o, en expresión logarítmica :

$$- \log [B] - \log \left\{ \frac{E_A}{E_{AB'}} - 1 \right\} = - \log K_B = pD'_2 \quad (5.3.2)$$

La ecuación (5.3.2) es la expresión matemática del parámetro pD'_2 antes definido.

5.4- Actividad antiespasmódica de los derivados ensayados.

Dado que el análisis de las curvas dosis-respuesta pone en evidencia que las drogas se comportan como antagonistas metactoides no competitivos, tanto frente a acetilcolina en duodeno de rata como frente a histamina en íleon de cobayo [174-176], se empleó la ec. (5.2.2.) para evaluar la respuesta de una droga agonista para distintas concentraciones de droga metactoide, según el modelo de Van den Brink [170], empleando, en consecuencia, el parámetro pD_2 para la expresión numérica de la actividad antiespasmódica medida.

Los valores, presentados en la tabla 5.1, corresponden al promedio de aproximadamente 8 determinaciones, cada una realizada con un animal diferente. El comportamiento de las drogas se ajusta al modelo de Van den Brick para concentraciones ensayadas entre $1 \times 10^{-5} M$ y $6 \times 10^{-5} M$.

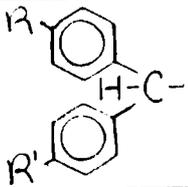
			R	R'	pD'_2	n
BB ₁₃	NH ₂	NO ₂	H	H	3,10 $\bar{+}$ 0,060	5
BB ₂	NH ₂	H	H	H	3,50 $\bar{+}$ 0,078	12
BB ₈	NH ₂	Me	H	H	3,60 $\bar{+}$ 0,070	9
BB ₁₀	NH ₂	OMe	H	H	3,80 $\bar{+}$ 0,060	8
AB ₁₀	NHMe	H	H	H	4,12 $\bar{+}$ 0,090	9
AB ₁₆	NHMe	Me	H	H	4,30 $\bar{+}$ 0,080	8
AB ₄	NMe ₂	H	H	H	4,20 $\bar{+}$ 0,031	10
AB ₇	NEt ₂	H	H	H	4,33 $\bar{+}$ 0,090	8
AB ₂₈	NHMe	Cl	Cl	Cl	5,11 $\bar{+}$ 0,090	5

Tabla 5.1.- Actividad antiespasmódica, expresada como pD'_2 para los elementos de la familia de congéneres. n: número de ensayos.

5.4.1- Condiciones experimentales generales del ensayo biológico.

Los ensayos biológicos (determinación, evaluación e interpretación) fueron realizados por el Licenciado Carlos Grand en el Laboratorio de la cátedra de Farmacodinamia de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP).

Para tal fin, se sacrificaron ratas de 300 g de peso, a las cuales se les extrajo el duodeno, del cual se usaron segmentos de 2-3 cm de longitud, suspendidos en cubas apropiadas de 25 cm³ de capacidad conteniendo solución Tyrode de composición (g/l) : ClNa 8,0; ClK 0,2; Cl₂Ca 0,24; Cl₂Mg.6H₂O 0,213; CO₃HNa 1,0; PO₄H₂Na 0,05; glucosa 1,0; aireada a 37⁰C .

Las concentraciones isotónicas se realizaron según el método de las dosis acumulativas y se registraron en papel ahumado con una sobrecarga de palanca de 1,0 g [174].

En estas condiciones ,se agregó una dosis de acetilcolina que permitiera obtener una concentración de 10µg/ml Tyrode, lavando luego de dejar 10' en contacto con el preparado. Este tratamiento conduce a respuestas reproducibles de los agentes estimulantes.

Se realizó un registro acumulativo de acetilcolina lavando al cabo de 60'. Se agregó el antagonista, realizando otro registro acumulativo del agonista luego de transcurrido el tiempo suficiente para que se establecieran condiciones de equilibrio. El preparado así tratado se deshecha.

Las dosis del agonista utilizadas (µg/ml Tyrode) responden a la secuencia: 0,01; 0,03; 0,10; 0,30; 1,00; 3,00; 10,00. Cada concentración se logró por el agregado sucesivo de 0,2 ml de solución del agonista.

Los registros se transformaron luego en curvas dosis-respuesta , donde el efecto se representa como porcentaje relativo a la máxima respuesta obtenida en el ensayo control [174-176].

- CAPITULO 6 -

**Relación estructura-actividad
aplicada a la cuantificación de
las modificaciones estructurales
introducidas en la etapa de
generación del líder**

**Elección de los parámetros
de diseño más adecuados
para su optimización**

Los valores de actividad antiespasmódica determinados nos permiten seleccionar, entre los elementos de la familia de congéneres (serie prueba), el compuesto líder que define la estructura (modificaciones estructurales) sobre la cual se trabajará en la etapa de su optimización.

Las relaciones cuantitativas estructura-actividad permiten describir la potencia biológica en términos de las propiedades de las drogas para una familia (serie) predeterminada. La posibilidad de que este análisis descriptor adquiera carácter predictor depende principalmente de la cantidad de información a la cual pueda accederse a través de éste y, en consecuencia, de la correcta elección de los miembros de la serie mediante el correcto empleo del espacio de los parámetros.

Los mismos parámetros de diseño (descriptores moleculares) empleados para la elección de los elementos (derivados de la Bencidrilamina) del conjunto inicial (familia de congéneres, serie prueba) (tabla 3.2), se vinculan ahora matemáticamente a la actividad antiespasmódica (tabla 5.1), en busca del descriptor más adecuado de la variación de esta actividad biológica en respuesta a las modificaciones estructurales. Este análisis no resulta inmediato dado que pueden plantearse diversas dependencias funcionales (sin limitarnos a una mera dependencia lineal) en uno o más parámetros (desde monoparamétricas hasta multiparamétricas).

Un correcto análisis pretenderá siempre la máxima exactitud (en el sentido estadístico) con miras a un enfoque predictivo de la actividad de una estructura en una etapa previa a su síntesis y ensayo biológico. Sin embargo, las dependencias lineales monoparamétricas, siempre que puedan ser planteadas, permiten una mejor comprensión del problema enfocado, en base a la interpretación fisicoquímica de las causas que originan la modificación de actividad, sobre cuyo conocimiento pueden incluso inferirse lineamientos generales de los mecanismos probables de acción. En consecuencia, no se puede postular una mayor importancia de un tipo de relaciones frente a otras.

No existe un criterio general que sea válido para cualquier serie considerada. En principio, el análisis de la dependencia de la actividad sobre factores estéricos, electrónicos e hidrofóbicos permite probablemente descartar alguno de ellos. Resulta siempre importante la adquisición de una conclusión de cada análisis parcial, la cual guiará el estudio subsiguiente. La eficiencia mejora también dividiendo el problema total en subproblemas, cada uno referido a un subgrupo de compuestos dado que comparten un aspecto estructural común [15], tales como variación de sustituyentes en una única posición, mono o polisustitución, etc. Siendo estos subgrupos menos complejos que la serie completa, permiten formular aproximaciones más sencillas y obtener información más exacta y directamente racionalizable para la serie completa. Sin necesidad de ser planteada a priori, tal separación surge a menudo en forma natural como resultado del análisis estadístico.

Vinculados numéricamente los parámetros estructurales (descriptores moleculares) y la actividad biológica, la selección de la mejor ecuación no debe basarse en un mero criterio estadístico sino también en consideraciones biológicas y fisicoquímicas.

Desde un punto de vista meramente estadístico debería seleccionarse aquella ecuación que, para un número suficiente de grados de libertad tenga el menor error residual [177], sobre la base de que todos los términos sean estadísticamente significativos. Dado que el número de grados de libertad implica en este caso número de variables (drogas y su forma de representación) y número de observaciones (determinaciones de actividad), debe tratarse con cuidado esta definición. Sin embargo, toda mala interpretación se evita mediante la aplicación correcta de criterios estadísticos que llevan a trabajar con valores incluidos en intervalos de confianza aceptables.

Las consideraciones estadísticas sólo tienen validez cuando no se contraponen a los conocimientos biológicos relativos al sistema dado, como, por ejemplo, al mecanismo de acción involucrado en el tipo de actividad considerada, y se basen en parámetros representativos de

las propiedades fisicoquímicas de las moléculas dentro del margen de los conocimientos previos.

Cuando la mejor ecuación ha sido seleccionada, el análisis de los valores de los parámetros moleculares y su relación con $\log A$ permite arriesgar ciertas conclusiones vinculadas al mecanismo de interacción al conocer las propiedades de las moléculas (o sustituyentes) de importancia primaria para la actividad biológica y la forma como influyen la acción de la droga.

El logro de correctas derivaciones en relación a este tópico debe fundamentarse no sólo en el significado (contenido fisicoquímico) del parámetro que permite el mejor ajuste, sino también en las consideraciones que han permitido acceder a tal ecuación. Las conclusiones vinculadas a este tópico merecen ser apoyadas por el aporte de parámetros químico-cuánticos dado su mayor contenido integral como descriptores moleculares, por depender no sólo del esqueleto estructural sino también del estado conformacional que varía (el correspondiente a mínima energía) en respuesta a cada sustitución. Por lograr una descripción más completa de la molécula-droga y por la mayor complejidad inherente a su cálculo, que no se fundamenta en el principio de aditividad que caracteriza a los otros parámetros (hidrofóbicos, estéricos, electrónicos) definidos, se calculan, en general, luego de comprobar la correcta elección de la familia de congéneres (viendo que son correctamente descriptos, en su actividad biológica, por otro descriptor molecular de cálculo más sencillo). Tienen la importancia potencial de permitir comprender el mecanismo por el cual las modificaciones estructurales generan variaciones específicas de las propiedades biológicas, lo que permite abordar la etapa posterior de optimización del líder en base a la potenciación de este mecanismo y no en base a la mera modificación (aumento o disminución) de un parámetro descriptor.

6-1. Relaciones estructura-actividad en el análisis de la familia de congéneres.

6.1.1-Parámetros fisicoquímicos clásicos como descriptores moleculares.

Los parámetros más usados, y el contenido fisicoquímico asociado a cada uno de ellos se describieron en el Capítulo III. La forma funcional que expresa la dependencia de la actividad biológica con cada uno de tales parámetros es propia de cada una de las familias consideradas.

Sin embargo, teniendo en cuenta el número de parámetros definidos y la posibilidad de combinar dependencias cuadráticas y lineales en uno o más parámetros, el número de ecuaciones de ajuste que pueden plantearse para una familia dada resulta demasiado elevado. Por otro lado, resulta obvio que carece de sentido el cotejar todas las posibles dependencias funcionales en busca de un ajuste estadístico vacío de significado físico. La forma de la dependencia debe ser tal que represente un modelo aceptable de interacción. En el marco de la aproximación extratermodinámica, las dependencias complejas de la actividad con parámetros fisicoquímicos se originan generalmente en contribuciones hidrofóbicas (dadas las características propias de los procesos de reparto) pudiendo también los términos electrónicos originar dependencias cuadráticas (por factores cinéticos o de las contribuciones mismas tales como interacciones dipolo-dipolo), lo cual no se contrapone a los conceptos fisicoquímicos que dieron origen a la definición de estos parámetros.

La introducción de relaciones complejas a través de parámetros de hidrofobicidad [178,179] se basa en el planteo de etapas de distribución (partición) de la droga entre las fases hidrofóbica y acuosa, simuladas, en un modelo multicompartimental, por barreras que la droga puede atravesar o no. La simulación matemática del transporte a través del sistema multicompartimental conduce a un conjunto de

ecuaciones diferenciales de cuya resolución se obtienen relaciones parabólicas entre el logaritmo de la concentración en el último compartimiento, que representa al receptor, y el parámetro hidrofóbico [180-182]. El posterior análisis probabilístico del factor hidrofóbico [183] y la posible asignación de distintos volúmenes a un único compartimiento [184-187] resultó en una dependencia que responde a un modelo bilineal (ec. 6.1), el que sólo satisface la ecuación cuadrática para igualdad de los coeficientes de la rama ascendente y descendente de la curva

$$\log A = a \log P - b \log (\beta P + 1) + c \quad (6.1)$$

Los efectos hidrofóbicos engloban tanto la hidrofobicidad de las drogas en su interacción con el receptor como en su transporte a través de las membranas celulares. Si bien el modelo compartimental se fundamenta en el análisis de este último efecto, relaciones semejantes se obtienen de la consideración de las interacciones hidrofóbicas propiamente dichas. En este caso la rama ascendente se asocia a la proporcionalidad del estímulo con el grado de ocupación del receptor (y, ec.5.1.4), mientras que la rama descendente se origina en la inhibición de esta interacción para estructuras de la molécula droga de tamaño tal que la conformación apta para la interacción no puede lograrse (modelo *cut-off* [188]).

La expresión más general considera al receptor como un compartimiento más y emplea el modelo multicompartimental para la descripción de ambos efectos, asumiendo que [189] :

* todo sistema biológico
consiste en t compartimientos lipofílicos (tejidos, lípidos, proteínas, etc) con volúmenes V_i , un compartimiento acuoso con volumen V_w y un receptor R ,

* el sistema se encuentra
en equilibrio termodinámico, obedeciendo, la distribución de la droga,
la ley de Nernst,

* la actividad biológica es proporcional a la extensión de ocupación del receptor y (ec.5.1.4)
 * sólo una pequeña proporción de la cantidad total de droga presente está unida al receptor.

En base a estas consideraciones se obtienen expresiones semejantes a la ec.6.1 que, respondiendo a la linealidad de la porción ascendente de la curva, divergen notoriamente en la complejidad de la porción descendente, la cual responde, a menudo, a una dependencia parabólica (Fig. 6.1)

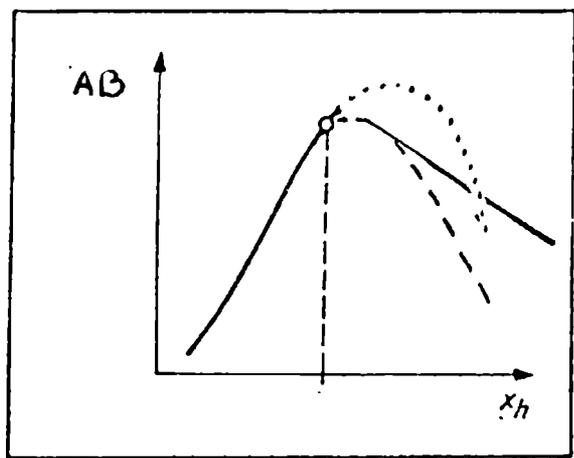


Figura 6.1- Curvas modelo que describen la dependencia de la actividad biológica con el parámetro hidrofóbico.
 ————— modelo bilineal
 - - - - - modelo parabólico
 modelo cut off o dependencias más complejas para la rama descendente de la curva.

En escasas oportunidades los parámetros electrónicos (σ , δ , \mathcal{R}) conducen a dependencias complejas de la actividad biológica. La existencia de tales dependencias complejas puede estar indicando la convergencia de más de un efecto electrónico del sustituyente [190] siendo, en consecuencia, separables en dependencias simples en cada uno de los efectos. Dejando de lado los parámetros químico-cuánticos (clasificables también como descriptores electrónicos), el empleo de parámetros experimentales conduce a relaciones complejas indicativas de procesos cinéticos en más de una etapa o propias del tipo de interacción descripta.

Relaciones parabólicas o bilineales en la dependencia de la actividad con parámetros estéricos indican la existencia de un tamaño óptimo del sustituyente en relación al logro de una interacción efectiva con el receptor.

- Su aplicación al análisis de la familia de derivados de la Bencidrilamina -

De acuerdo a lo discutido, se analizaron distintas dependencias de la actividad biológica de la familia de congéneres con parámetros fisicoquímicos clásicos usados previamente (Capítulo III) para la correcta selección de los elementos de esta familia.

Sin pretender asignar valor predictivo, ni aún interpretativo a los análisis estadísticos sobre un número cuestionable de grados de libertad [191], la elección del mejor descriptor molecular para la serie encierra una doble finalidad:

- Elegir el mejor parámetro descriptor para su posterior empleo en el diseño de las modificaciones a realizar sobre la estructura más activa (optimización del líder)

- Comprobar la correcta selección de los elementos de la familia de congéneres, caracterizada por una modificación cuantificable de la actividad

biológica en respuesta a cada cambio estructural. La correcta selección implica también la posibilidad de su descripción mediante el empleo de un parámetro adecuado, lo cual indica que las modificaciones elegidas actúan sobre un único mecanismo de interacción.

Teniendo ésto presente se analizaron tanto correlaciones monoparamétricas (lineales, bilineales y cuadráticas) como también bi- y triparamétricas.

Las dependencias lineales monoparamétricas de la actividad antiespasmódica (PD_2') con parámetros hidrofóbicos ($\log P$) (Fig.6.2), estéricos (MR) (Fig.6.3) y de contenido más complejo, dependiente en realidad del conjunto en análisis (χ^v) (Fig.6.4), indican, en su comportamiento estadístico, la correcta elección de los derivados.

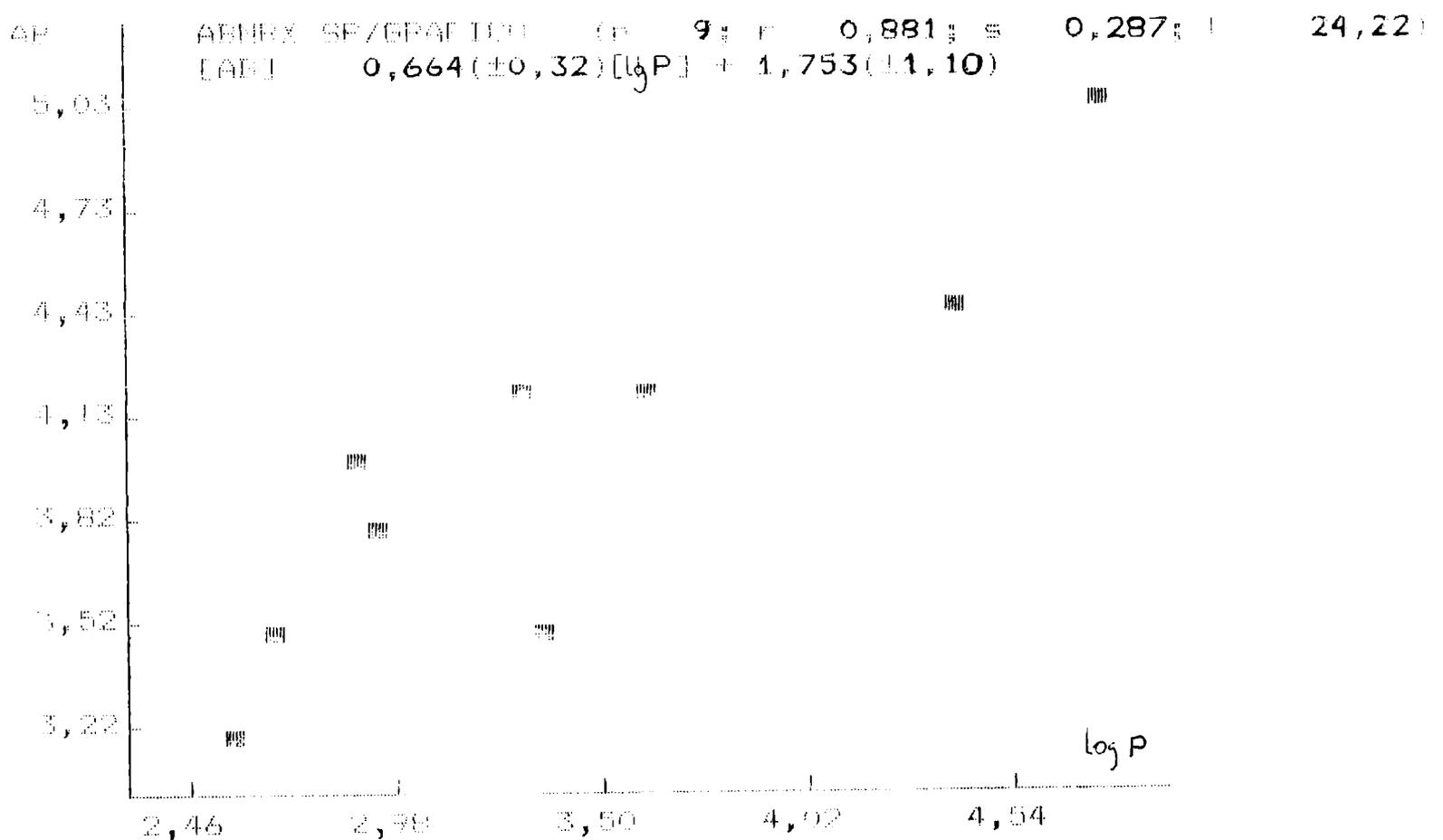


Figura 6.2- Dependencia lineal de la actividad antiespasmódica con el parámetro hidrofóbico ($\log P$).

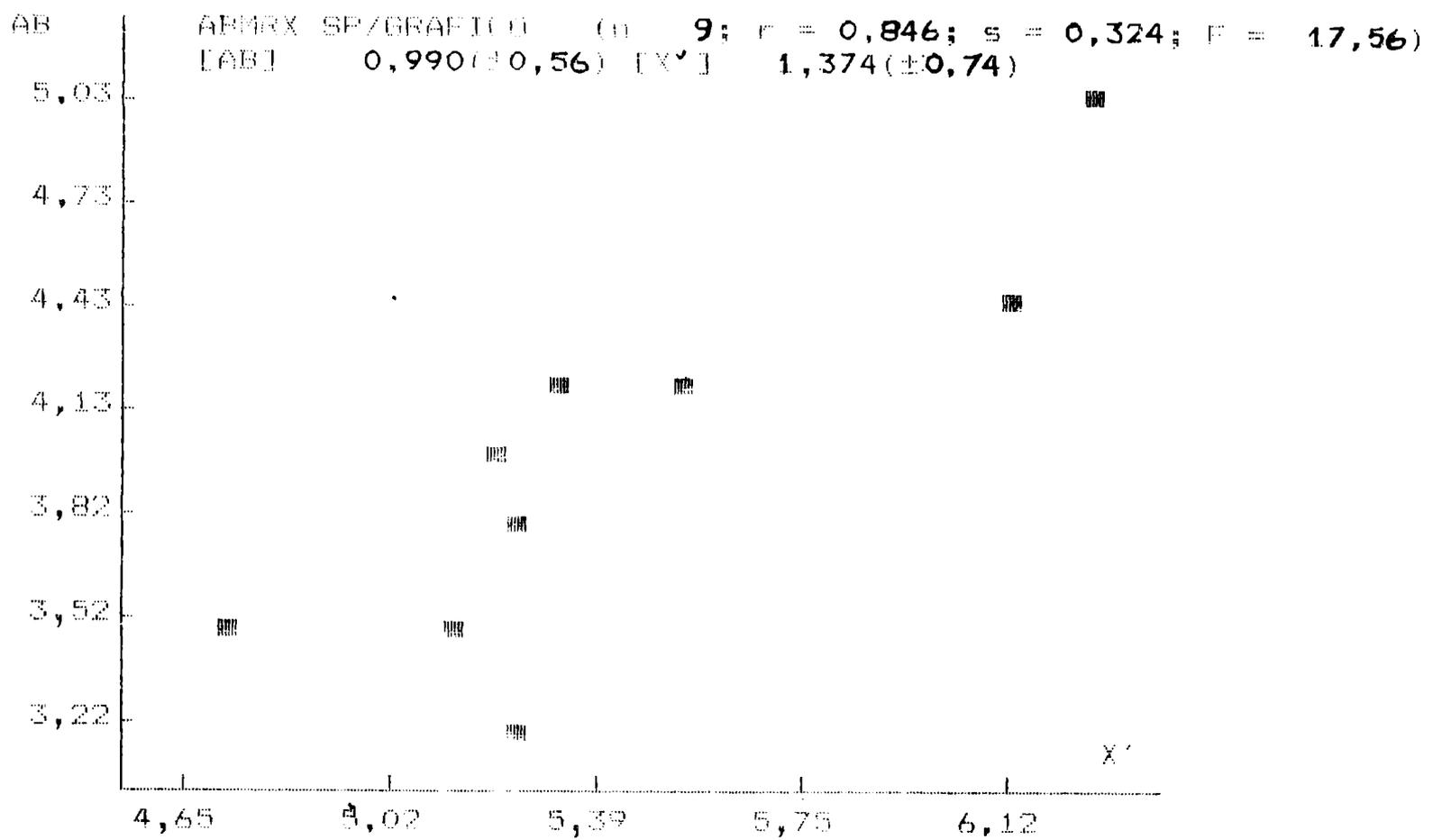


Figura 6.4- Dependencia lineal de la actividad antiespasmódica con el parámetro χ^ν .

Las correlaciones bilineales o cuadráticas en un único parámetro resultan estadísticamente no significativas (Tabla 6.1), según deriva del valor de F, a pesar de los valores aceptables del coeficiente de partición para una primera aproximación estadística.

Variables descriptoras analizadas	relaciones bilineales			relaciones cuadráticas		
	r	s	F	r	s	F
log P	0,855	0,334	6,03	0,881	0,310	10,39
MR	0,873	0,350	5,32	0,867	0,327	9,04
χ^{ν}	0,855	0,372	4,54	0,854	0,341	8,08

Tabla 6.1 - Parámetros estadísticos asociados a las correlaciones monoparamétricas de la actividad biológica con descriptores fisicoquímicos clásicos.

r: coeficiente de correlación,

s: desviación standard,

F: intervalo de confianza.

Las correlaciones bi y triparamétricas resultan estadísticamente comparables a las monoparamétricas, (ecs 6.2-6.5). bilineales y cuadráticas, y, en consecuencia, no significativas.

$$pD_2' = 0,498 (\pm 1,22) MR + 0,272 (\pm 1,86) \chi^{\nu} + 1,942 (\pm 8,72)$$

$$n = 9 \quad r = 0,869 \quad s = 0,324 \quad F = 9,27 \quad (6.2)$$

$$pD_2' = 0,306 (\pm 0,74) MR + 0,396 (\pm 0,72) \log P + 2,295 (\pm 1,73)$$

$$n = 9 \quad r = 0,899 \quad s = 0,286 \quad F = 12,69 \quad (6.3)$$

$$pD'_2 = 0,309 (\pm 1,28) \chi^{\nu} + 0,484 (\pm 0,82) \log P + 0,687 (\pm 4,57)$$

$$n = 9 \quad r = 0,888 \quad s = 0,301 \quad F = 11,16 \quad (6.4)$$

$$pD'_2 = 0,374 (\pm 1,27) MR - 0,152 (\pm 2,09) \chi^{\nu} + 0,427 (\pm 0,92) \log P + 2,942 (\pm 9,10)$$

$$n = 9 \quad r = 0,900 \quad s = 0,313 \quad F = 7,11 \quad (6.5)$$

Siendo siempre menos clara su interpretación fisicoquímica y , por consiguiente, más complejo el diseño de modificaciones que logren el cambio previsto de ambos parámetros en forma simultánea, se opta, frente a esta "equivalencia estadística", por una cuantificación monoparamétrica de la actividad biológica. Entre los parámetros analizados se eligió, en primera aproximación, un descriptor hidrofóbico en el conocimiento de que, dada la similitud del peso estadístico de las correlaciones obtenidas, no es posible tener la certeza a priori de que, al agregar nuevas estructuras al conjunto en análisis, puede resultar más conveniente el empleo de otro descriptor.

La bondad de las correlaciones obtenidas, que responden a un correcto comportamiento estadístico, sin oponerse a la interpretación fisicoquímica que justifique el cambio de las propiedades en respuesta a las modificaciones introducidas vía "mecanismos tipo" de interacción biológica (ya que la buena descripción se logra para un parámetro específicamente definido para un mecanismo de acción no competitivo metactoide) permite definir, sobre la certeza de la correcta elección de la familia de congéneres, la estructura líder como aquella de mayor actividad biológica.

Pretendemos que esta estructura líder no sólo caracterice la maximización de la actividad biológica sino que, al mismo tiempo, y sobre el conocimiento de los efectos que produjeron un aumento de actividad desde la estructura inicial (prototipo activo) defina las modificaciones estructurales que permitan continuar trabajando racionalmente en la etapa posterior de optimización del líder.

Para un mejor conocimiento de estos efectos cabe, recién en esta etapa, intentar un análisis más complejo que aportará, en la medida en que sea correctamente realizado e interpretado, información de mucho valor en el diseño posterior de las modificaciones.

6.1.2- Empleo de métodos químico-cuánticos para la caracterización de las estructuras (elementos de la familia de congéneres).

De acuerdo a las discusiones previamente presentadas, los métodos químico cuánticos, aunque ofreciendo una mejor descripción de las características electrónicas de las moléculas que los parámetros derivados de relaciones lineales de entalpía libre (LFER), no se emplean sistemáticamente en análisis QSAR debido a los costos y dificultades inherentes a su cálculo. Su empleo cobra, sin embargo, creciente importancia debido a que los valores derivados dependen, sin excepción, de la conformación de la molécula-droga y, por lo tanto, la representan, siendo hoy en día unánime la aceptación de la existencia de una conformación óptima de una molécula droga para su interacción efectiva en un sitio específico.

Considerando las moléculas como una unidad, los métodos químico-cuánticos se basan en el análisis de las funciones de onda que describen un dado sistema y sus energías asociadas en distintos niveles de aproximación. Correspondiendo los tratamientos más rigurosos a métodos ab-initio (a primeros principios), su potencialidad resulta acotada por la restricción de su aplicación a

sistemas sencillos (pocos átomos de bajo número atómico), lo cual requiere un fraccionamiento y "análisis por porciones" de la molécula droga. La correcta descripción de una molécula no puede, obviamente, fundamentarse en una descripción rigurosa de sus porciones estructurales negligente del entorno molecular. Mejores resultados se obtienen mediante el empleo de métodos que, más gruesos en cuanto a la consideración de cada una de las interacciones presentes en la molécula, permiten, mediante una simplificación adecuada del problema abordado (tales como las asignaciones numéricas definidas, experimentales o calculadas a primeros principios, a funciones de onda orbitales) derivar datos que describen la molécula como una única unidad estructural, resultando, por lo tanto, de indiscutible importancia el análisis conformacional dada la influencia de cada centro (átomo) sobre el resto y la dependencia de esta influencia con la distancia mutua entre las porciones interactuantes.

La opción de *simplificación de metodología* en lugar de *simplificación de estructura* conduce al empleo de métodos semiempíricos de cálculo, denominación derivada de la introducción de parámetros empíricos para la simplificación de los procedimientos de cálculo. Sin considerar oportuna una discusión de los beneficios relativos asociados a cada uno de los distintos métodos, interesa solamente consignar que el empleo de Hückel Extendido (EHM) permite el tratamiento de sistemas extensos en cuanto al número de bases (átomos/número atómico) al definir las interacciones a través de los orbitales de valencia, teniendo en cuenta las interacciones más internas (carozo-carozo, núcleo-núcleo, núcleo-carozo) como términos correctivos, mutuamente cancelables para las geometrías correspondientes a los sistemas en equilibrio [103].

Ciertamente, la definición de la conformación de la molécula droga resulta el punto más vulnerable de esta metodología. En primer lugar, no se conoce la conformación de la molécula droga en el momento de la interacción. Tal conformación estará determinada por los requerimientos del sitio específico (receptor biológico) y será probablemente la misma para una dada familia de congéneres, en el

entorno del *farmacóforo*, entendiendo por farmacóforo un arreglo específico de átomos (ensamble) cuya presencia en la droga resulta condición necesaria y suficiente para la producción del estímulo ya que :

- representa el ensamble que reconoce el receptor,
- interactúa con éste satisfaciendo los requerimientos conformacionales dinámicos que tal interacción implica,
- logra la inducción del estímulo a través de la perturbación específica que puede involucrar nuevas modificaciones conformacionales.

Dado que tampoco puede precisarse la porción estructural que define el farmacóforo para el conjunto que nos ocupa (y es difícilmente identificable cualquiera sea el conjunto de sustancias biológicamente activas) se opta por trabajar con la conformación de mínima energía [15,192], en el conocimiento de que , desviaciones no fácilmente explicables de un compuesto del comportamiento asignable a los demás deben llevar a descartar su evaluación por este método, por no poder ser superable esta etapa asociada al cálculo en relación a este compuesto individual.

Admitiendo la elección de la conformación de mínima energía como standarización de las condiciones de análisis de las distintas estructuras, resulta obviamente compleja la elección de esta conformación mediante técnicas de "prueba y error", basadas en la comparación de las energías calculadas para las distintas geometrías que describen las conformaciones posibles. De la consideración de las posibles torsiones angulares de la estructura más sencilla (prototipo activo, Bencidrilamina) alrededor de cada uno de los enlaces que definen su geometría, resulta fácilmente comprensible la posibilidad de elegir una conformación molecular asociable a una energía mínima relativa, no correspondiente en forma exacta a la energía más baja entre todas las correspondientes a las posibles estructuras tridimensionales. El análisis conformacional representa en sí mismo un problema combinatorio. Un análisis que involucre rotación en 360° mediante incrementos de Δ grados alrededor de N enlaces distintos,

requiere la evaluación de $(360/\Delta)^N$ conformaciones. El número de conformaciones aumenta exponencialmente con el número de enlaces, pudiendo llegar al orden de 10^5 - 10^6 para incrementos pequeños [193]. Este número se reduce notoriamente mediante la aplicación del criterio químico a la elección de las estructuras estereoespaciales probables, en base a una minimización e efectos de superposición orbital por visualización a través del empleo de estereomodelos que simulan, en escala, el esqueleto molecular (dreiding stereomodels).

Debido al considerable grado de probabilidad de que la conformación resulte erróneamente estimada por técnicas químico-cuánticas, se han desarrollado métodos basados en principios de la mecánica clásica. La molécula se reduce a un conjunto de partículas definible como tal por la existencia de fuerzas elásticas o armónicas entre ellas. Estas fuerzas pueden expresarse por una función potencial empírica y la energía conformacional se calcula, en consecuencia, como la suma de interacciones no enlazantes sobre todos los átomos que constituyen la molécula, considerando la variación de sus distancias mutuas relativas.

Las contribuciones más importantes a esta función potencial provienen de interacciones atractivas y repulsivas no enlazantes, deformaciones de los enlaces, enlaces Hidrógeno, tensiones torsionales e interacciones electrostáticas. Debido a la mayor rapidez del cálculo en relación al empleo alternativo de métodos semiempíricos para el análisis de un mismo problema, éstos permiten una exploración rápida de todo el espacio conformacional. La precisión alcanzable depende directamente de la adecuada parametrización (selección de los potenciales) de los grupos funcionales de las moléculas. Varios sistemas de cálculo se han desarrollado en base a estos principios [192], empleándose para todos ellos la definición general de métodos de modelado molecular [192,194]. Dado que no proveen información suficientemente precisa sobre las propiedades electrónicas, se emplean métodos clásicos y cuánticos en forma conjunta, aproximando la energía de la hipersuperficie por potenciales empíricos simples y calculando luego cuánticamente puntos definidos de especial interés (máximos,

mínimos, puntos de ensilladura)

En este esquema general de trabajo se emplearon métodos de modelado molecular para la elección de la conformación de mínima energía de cada uno de los derivados (familia de congéneres, Fig.4.1), evaluando luego cuánticamente (EHM) las características electrónicas de la estructura que la define [106].

a- Análisis conformacional. Modelado molecular.

Los métodos de modelado molecular eligen la conformación óptima como aquella que minimice la energía asociada a interacciones intramoleculares definidas a través de potenciales empíricos (campos de fuerza) característicos de unidades estructurales, permitiendo, a través de una parametrización adecuada, el cálculo de la energía que corresponde a cada geometría molecular.

La primera etapa del cálculo consiste, por lo tanto, en el análisis de la geometría molecular generada en la computadora por procedimientos gráficos o por definición de las coordenadas (cartesianas o internas). La interacción gráfica con la computadora aumenta la eficiencia del análisis conformacional ya que la visualización estereoespacial de las estructuras permite una mejor programación de las modificaciones angulares a realizar, tales que no sean incompatibles con la estructura real asequible.

El modelo estereoquímico generado en esta rutina inicial sirve como geometría inicial del análisis conformacional. Las condiciones de este análisis deben definirse especificando los incrementos, número total de grados y enlaces afectados a la rotación, además de los detalles del método (tipos de potencial) y la forma de presentación de los resultados (energía de cada conformación, geometría de una conformación determinada)

El análisis del conjunto de derivados presentado en este trabajo se basa en el empleo de Macromodel (Macromodel Molecular Modelling System) [195,196] para el modelado de las estructuras, definiendo gráficamente las geometrías y empleando los campos de fuerzas según Allinger (MM2)[197] para la simulación de los potenciales internos, considerando las correcciones existentes desde los inicialmente parametrizados [198] hasta su inclusión en los métodos de modelado molecular.

El cálculo de las energías conformacionales en base a la consideración de la existencia de interacciones mutuas (expresables por potenciales clásicos) entre las distintas porciones moleculares puede realizarse en distintos niveles de aproximación. El empleado en este caso contiene todas las modificaciones existentes a la fecha que optimizan la mecánica molecular (MM2) de Allinger original [112], tanto en relación al cálculo más exacto de los distintos parámetros tales como las energías de torsión o campos de fuerza [199] como a la parametrización de nuevos grupos funcionales [200]. La parametrización de grupos funcionales deriva inicialmente del análisis espectral de moléculas pequeñas, las más pequeñas que puedan contenerlos. Dado que se asume, en primera aproximación, que las características grupales se mantienen al variar el entorno molecular, los valores se modifican ligeramente de forma tal de representar simultáneamente, lo más fielmente posible, las características estructurales del grupo en cuestión en varias moléculas sencillas.

Las energías calculadas tienen en cuenta varias contribuciones [192]:

$$E_{\text{total}} = E_{\text{estiramiento}} + E_{\text{balanceo}} + E_{\text{angular}} + E_{\text{van der Waals}} + E_{\text{electrostática}} + E_{\text{enlace Hidrógeno}} \quad (6.6)$$

Cada uno de los términos individuales tienen posiciones preferenciales de equilibrio (longitudes angulares, ángulos de enlace, ángulos diedros, distancias de interacción de van der Waals, etc.) y

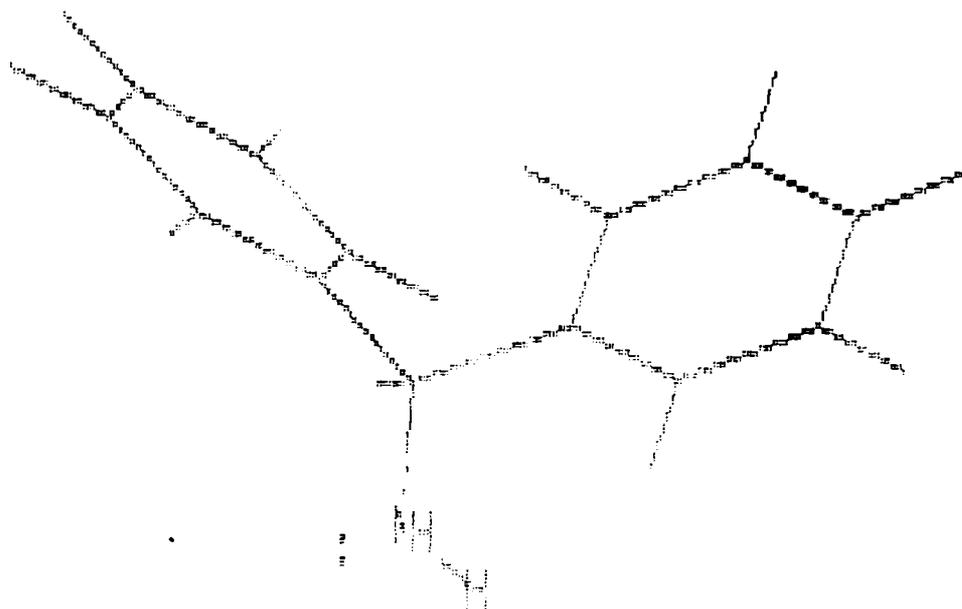
constantes de fuerza que pueden ser conocidas experimentalmente o estimadas teóricamente. El "campo de fuerzas" consiste, por lo tanto, en un conjunto de funciones analíticas de energía y su conjunto de parámetros numéricos asociado. La energía total de una molécula dada será la suma de varias contribuciones individuales.

La minimización de energía en mecánica molecular involucra una sucesión de cálculos iterativos en los cuales una conformación inicial se somete a completa optimización de la energía. Los parámetros que definen la geometría del sistema se modifican por sucesivos incrementos hasta que la energía estructural total alcanza un mínimo local, guiando la minimización a través de las derivadas primera y segunda de la función energía. La minimización de energía finaliza al encontrar el primer mínimo local, independientemente de su profundidad. Mediante una investigación sistemática se explora, a partir de geometrías iniciales distintas, el espacio conformacional de la molécula, en busca del mínimo absoluto.

Las mismas consideraciones permiten el cálculo de la distribución de carga en la molécula y, en particular, sobre cada uno de los centros atómicos.

Sin embargo, dado que el método fue inicialmente parametrizado en base a las geometrías grupales, no tiene la misma precisión en relación al cálculo de otros parámetros (así como es conocido que el MM3 es más adecuado para el cálculo de frecuencias vibracionales). En consecuencia, el método presentado sólo se emplea como descriptor geométrico. Las geometrías que minimicen las energías asociadas a las interacciones descritas en la ecuación (6.6) definen la conformación óptima.

En esta forma se seleccionaron las conformaciones de mínima energía de : Bencidrilamina (BB_2), 4-metilbencidrilamina (BB_8), 4-metoxibencidrilamina (BB_{10}), 4-metil,N-metilbencidrilamina (AB_{16}), N-metilbencidrilamina (AB_{10}), N,N-dimetilbencidrilamina (AB_4), N,N,-dietilbencidrilamina (AB_7), 4,4'-dicloro-N-metilbencidrilamina (AB_{28}) (Fig. 6.5-6.12).



a-

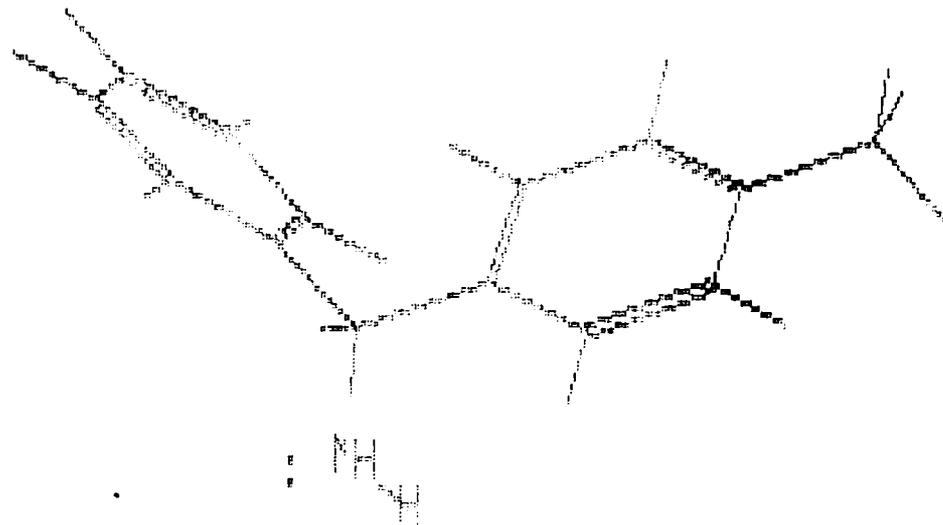


b-

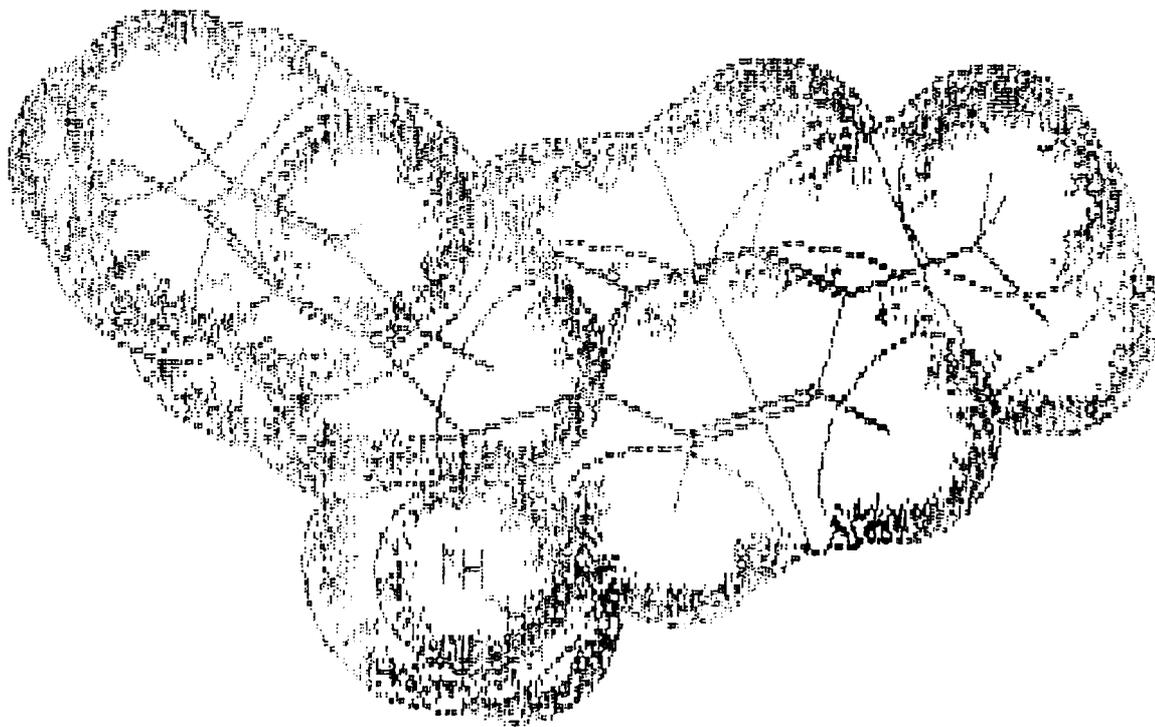
Figura 6.5- Bencidrilamina (BB_2). Estructura correspondiente a la conformación de mínima energía, según resulta del análisis por Macromodel.

a) Estructura estereoespacial.

b) Modelo estereoscópico.

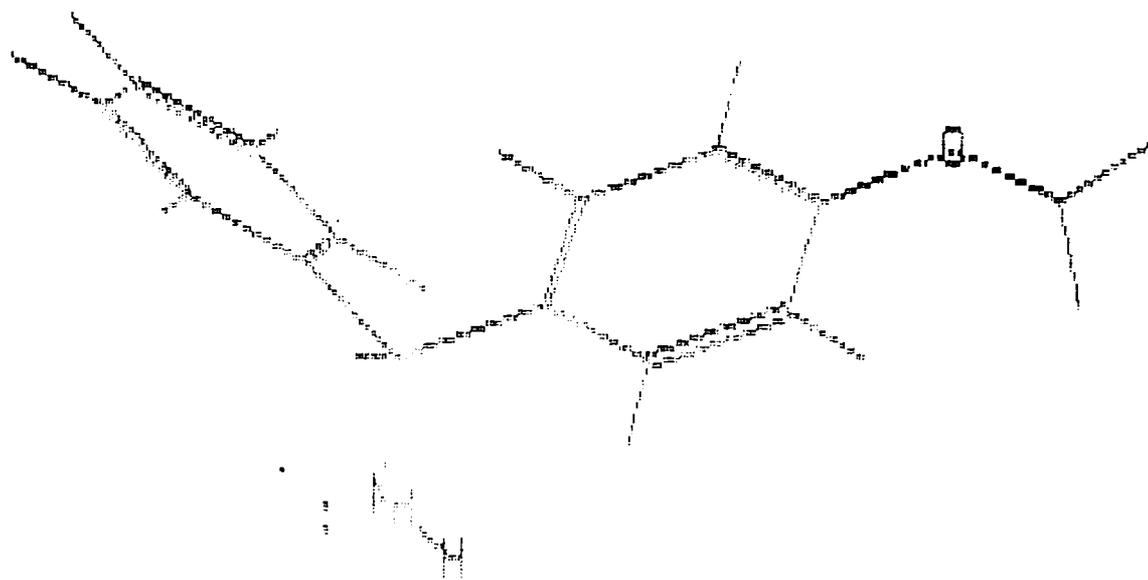


a-

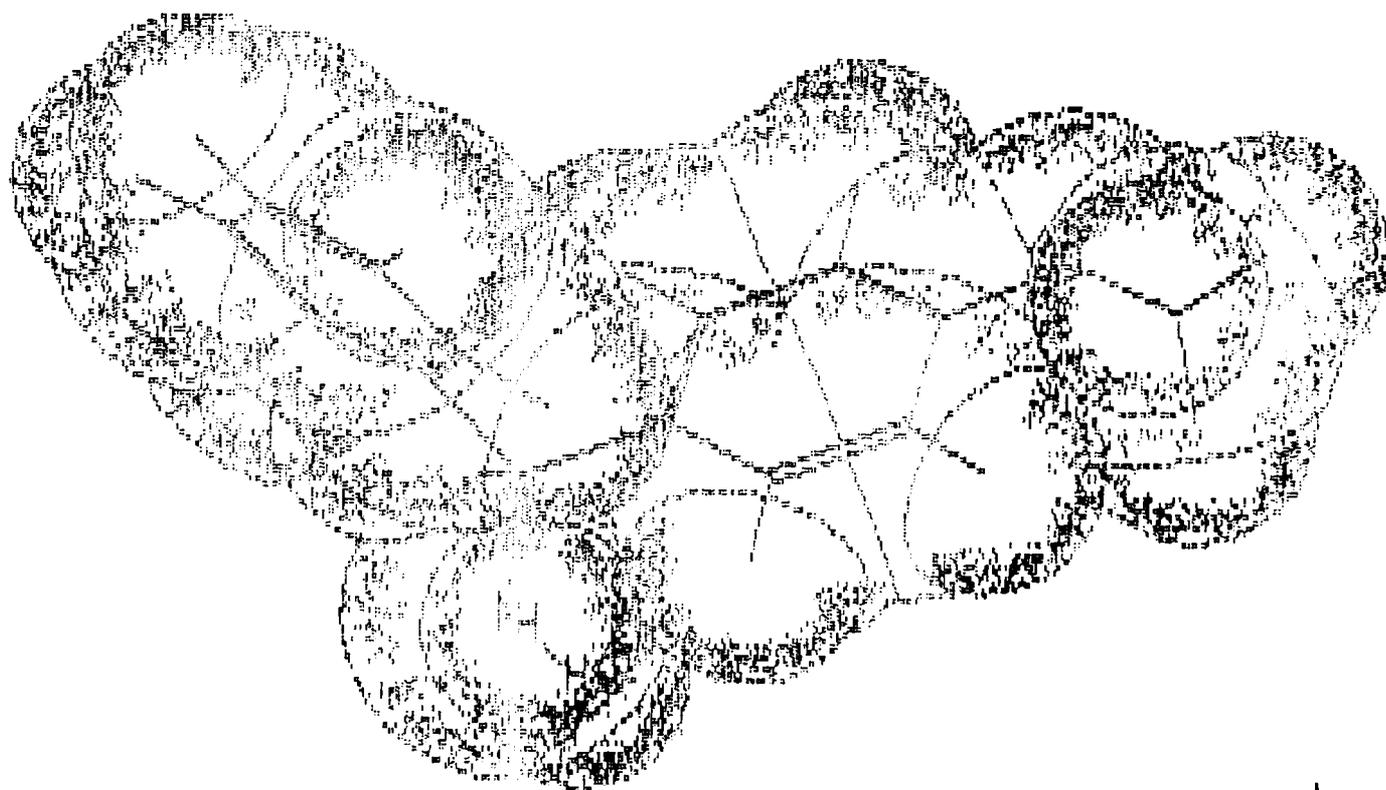


b-

Figura 6.6- 4-Metilbencidrilamina (BB₈). Estructura correspondiente a la conformación de mínima energía según resulta del análisis por Macromodel.
a) Estructura estereoespacial.
b) Modelo estereoscópico.



a-

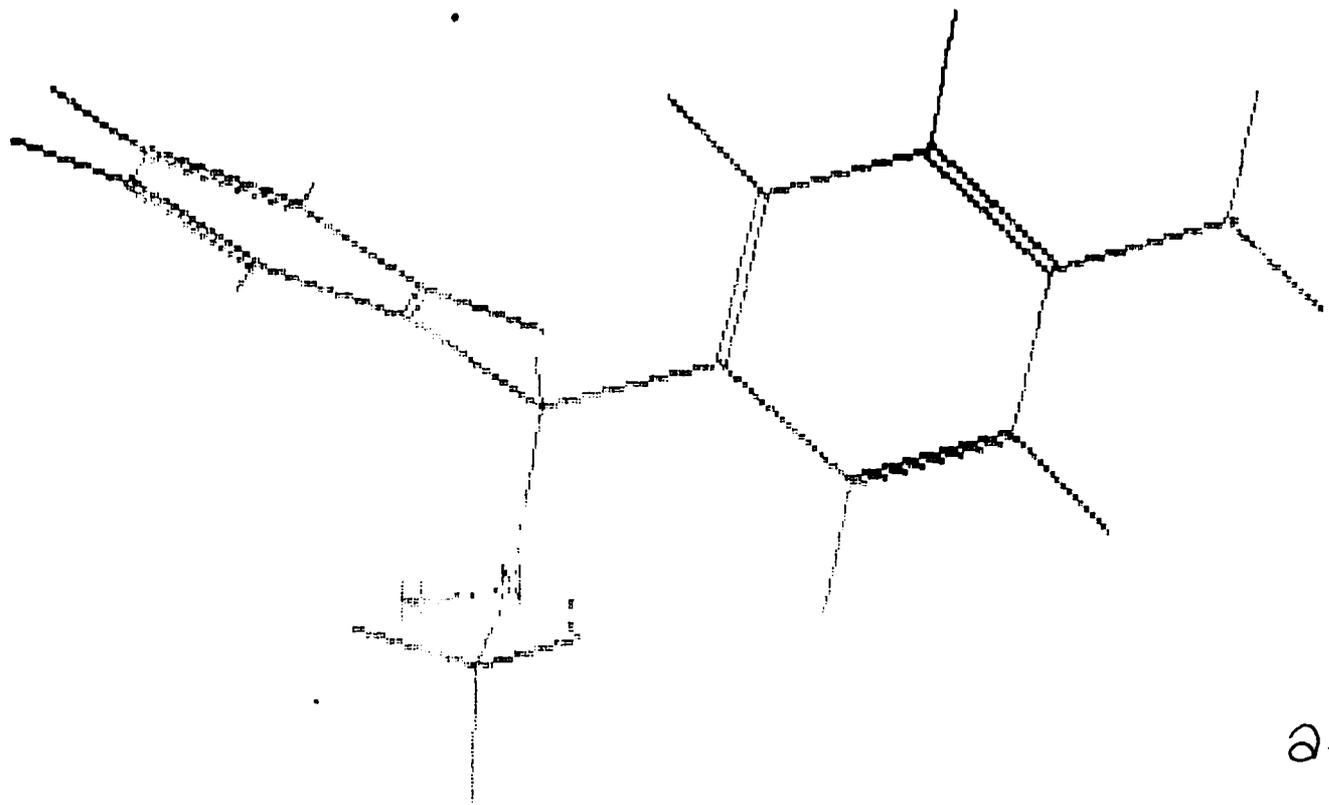


b-

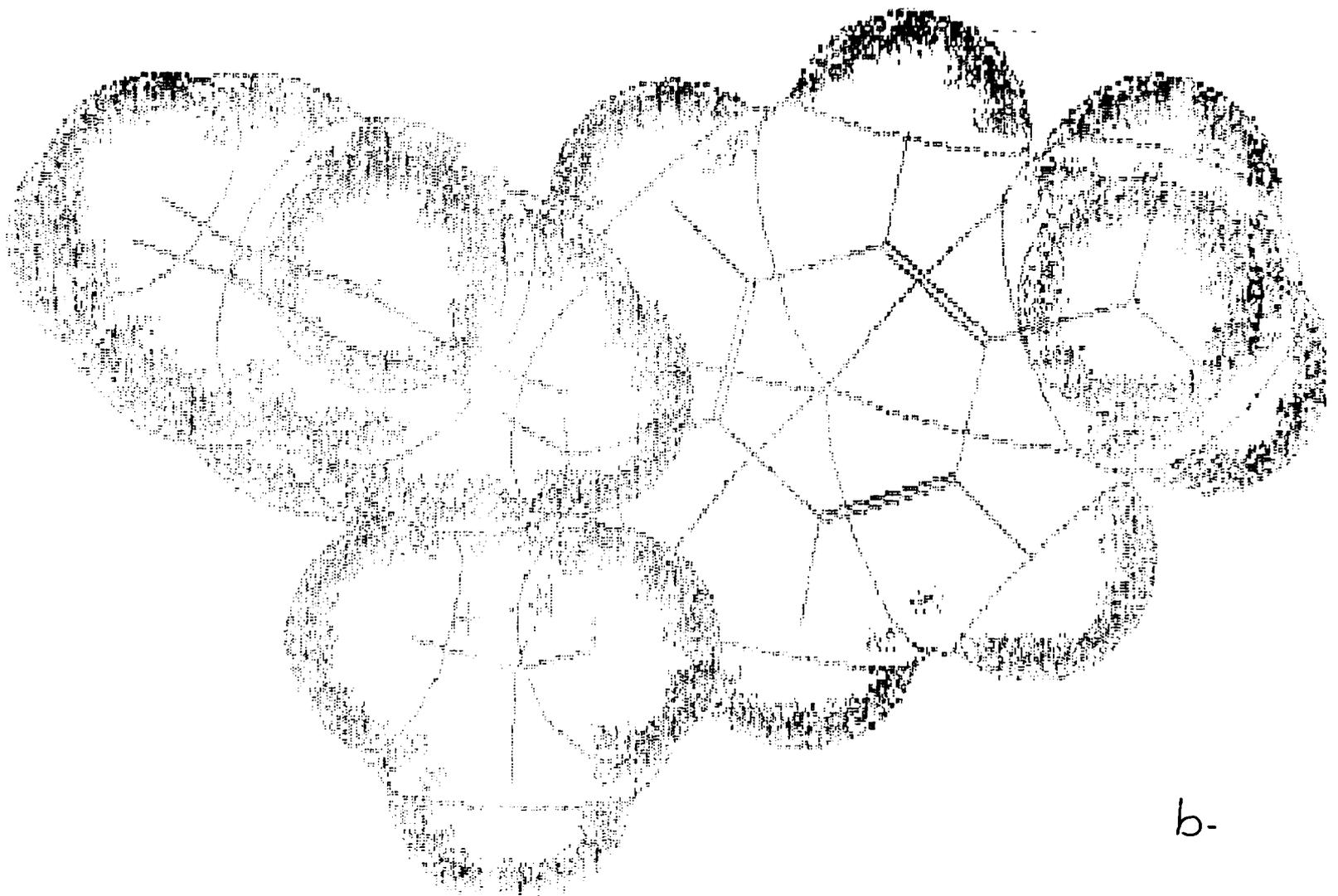
Figura 6.7- 4-Metoxibencidrilamina (BB₁₀). Estructura correspondiente a la conformación de mínima energía según resulta del análisis por Macromodel.

a) Estructura estereoespacial.

b) Modelo estereoscópico.



a-



b-

Figura 6.8- 4-Metil-N-metilbencidrilamina (AB_{16}). Estructura correspondiente a la conformación de mínima energía, según resulta del análisis por Macromodel.
a) Estructura estereoespacial.
b) Modelo estereoscópico.

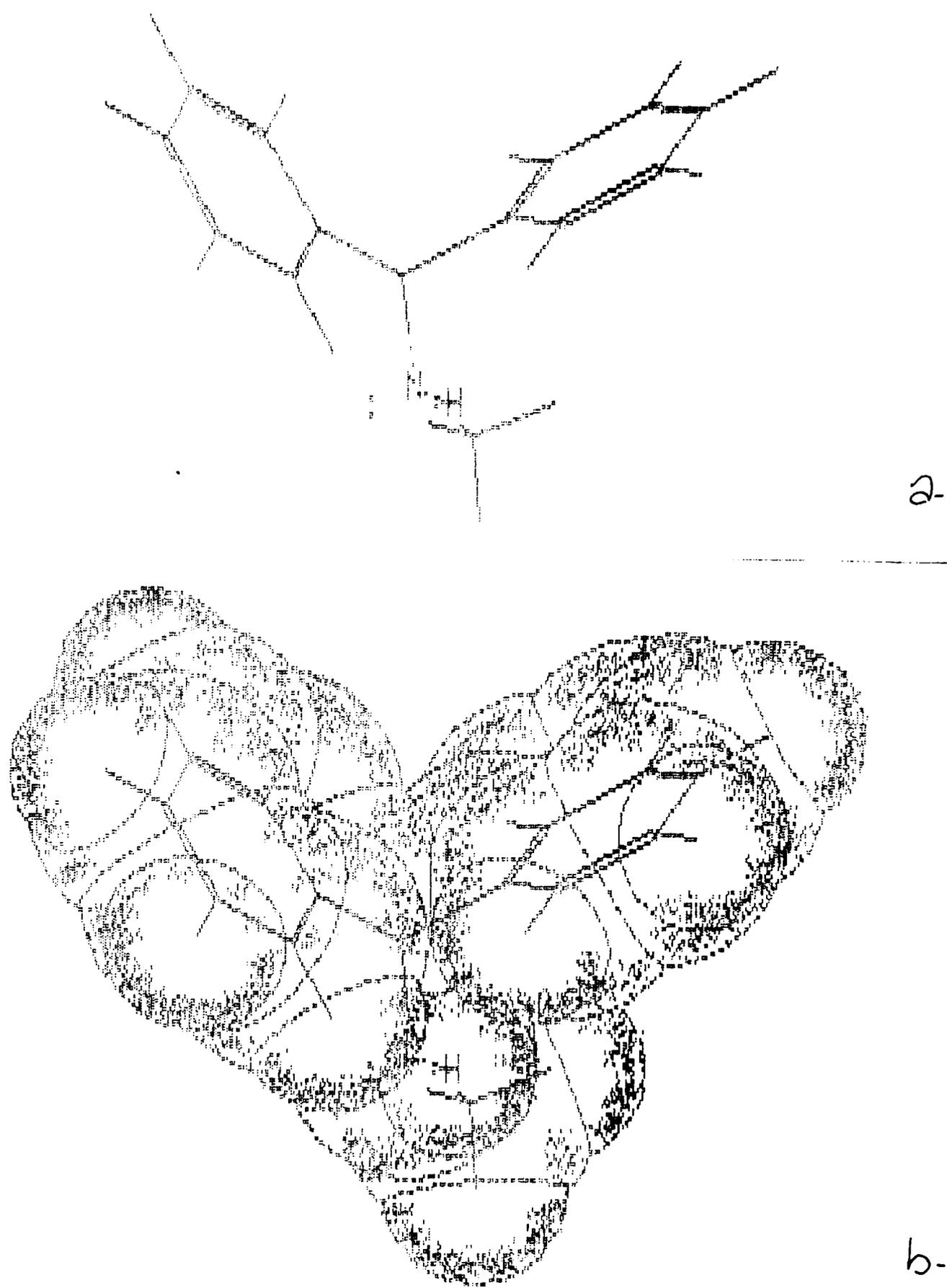


Figura 6.9- N-Metilbencidrilamina (AB₁₀). Estructura correspondiente a la conformación de mínima energía según resulta del análisis por Macromodel.

- a) Estructura estereoespacial.
- b) Modelo estereoscópico.

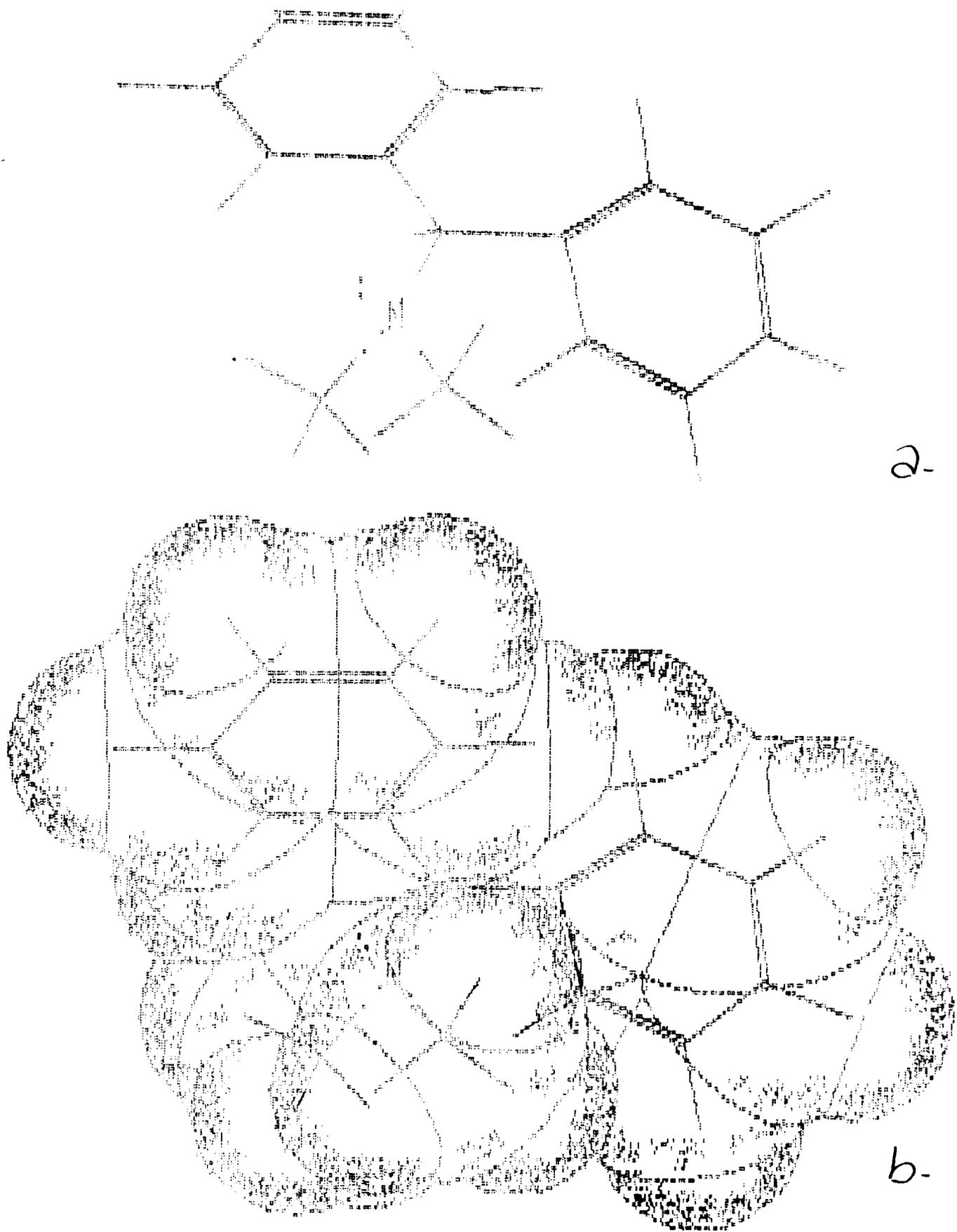
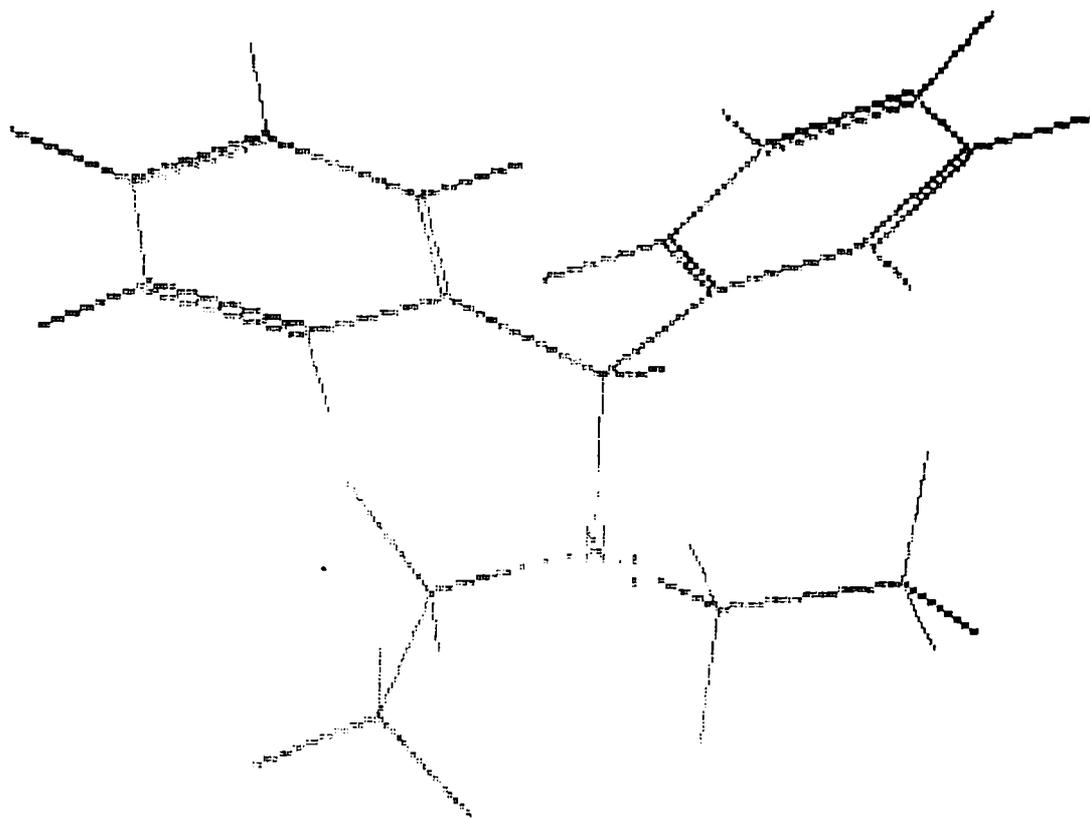
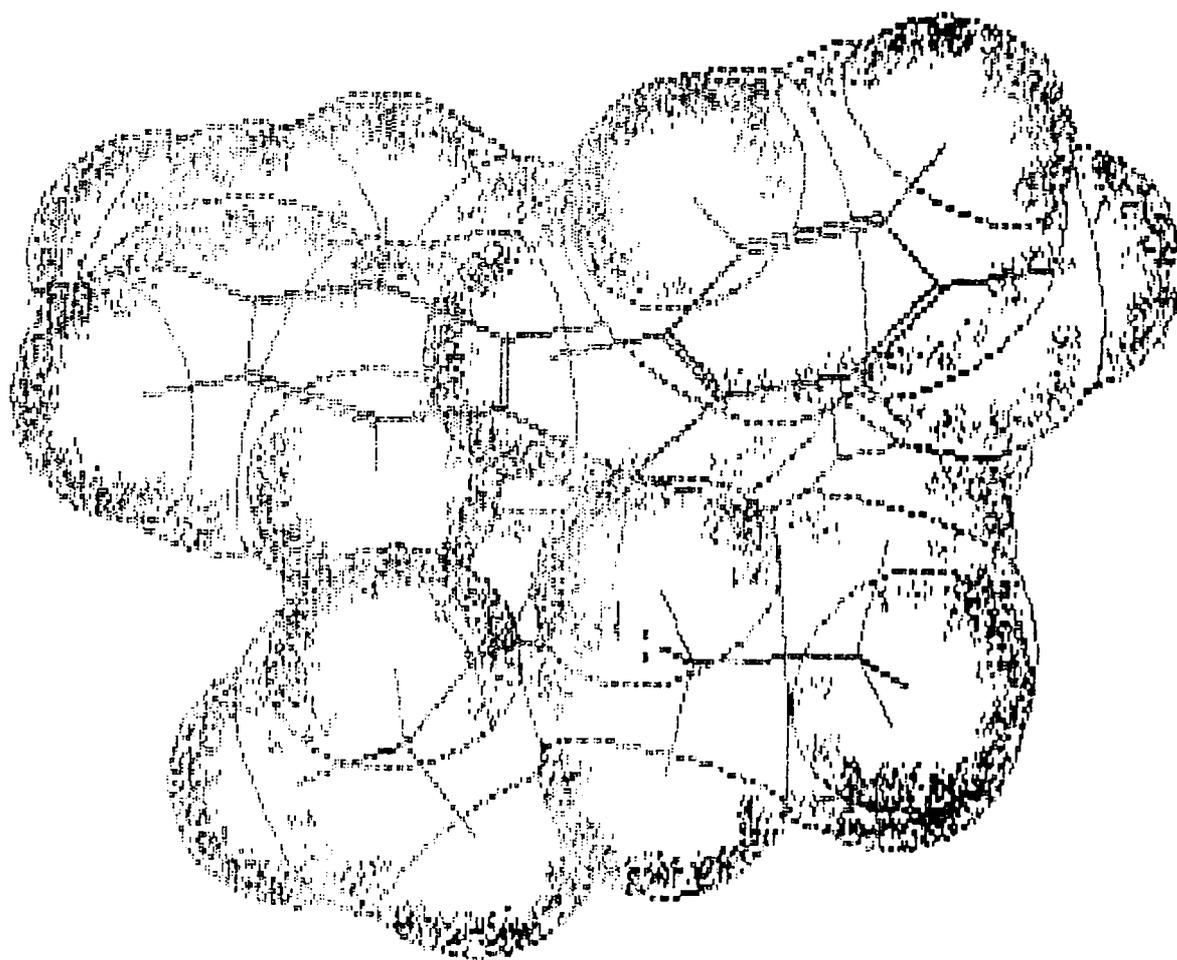


Figura 6.10- N,N-Dimetilbencidrilamina (AB_4). Estructura correspondiente a la conformación de mínima energía según resulta del análisis por Macromodel.
a) Estructura estereoespacial.
b) Modelo estereoscópico.



a-



b-

Figura 6.11- N,N-Dietilbencidrilamina (AB_7). Estructura correspondiente a la conformación de mínima energía según resulta del análisis por Macromodel.

a) Estructura estereoespacial.

b) Modelo estereoscópico.

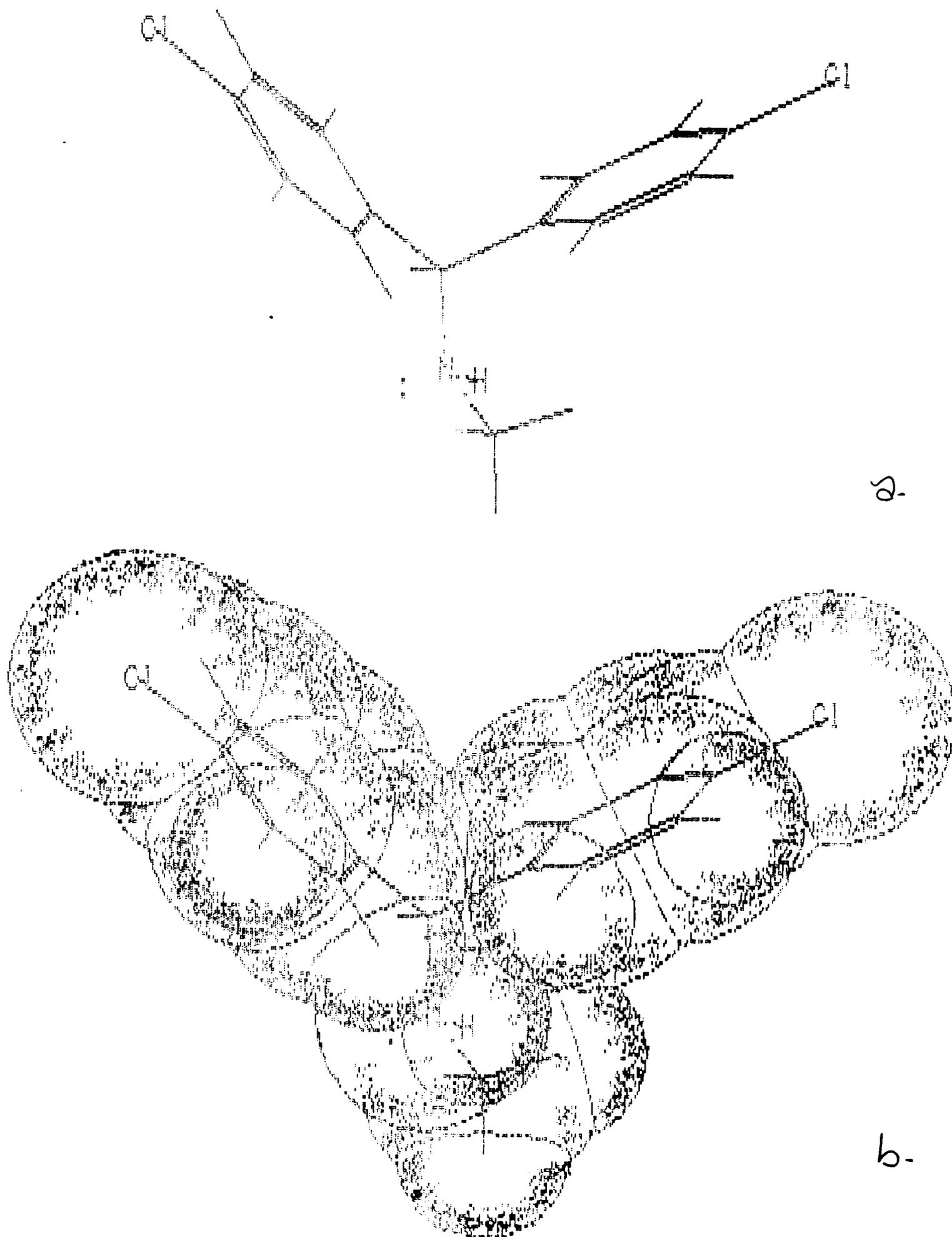


Figura 6.12- 4,4'-Dicloro-N-metilbencilamina (AB_{28}). Estructura correspondiente a la conformación de mínima energía según resulta del análisis por Macromodel.
a) Estructura estereoespacial.
b) Modelo estereoscópico.

Las energías calculadas representan correctamente los valores relativos de cada conformación. Sin embargo, dado que su cálculo se fundamenta en la consideración de potenciales clásicos para la representación de la molécula droga, no tienen la misma fuerza que las calculadas como suma de energías orbitales. Los descriptores electrónicos derivados de estos cálculos (momentos dipolares, etc) se encuentran afectados de la misma imprecisión [197].

En consecuencia, luego de la elección de la conformación óptima (mínima energía) de cada una de las estructuras, se emplean métodos químico-cuánticos (basados en la teoría de orbitales moleculares) para la descripción electrónica y el cálculo de parámetros de cada una de las moléculas

b- Metodos químico-cuánticos para el cálculo de descriptores moleculares. Hueckel Extendido.

Los tratamientos descriptos en la sección anterior pueden realizarse, en principio, empleando métodos químico cuánticos, usando la ecuación de Schrödinger para el cálculo de las energías en el marco del formalismo de la teoría de Orbitales Moleculares (OM). Sin embargo, según se comentó previamente, resulta excesivo el tiempo de cómputo asociado, tanto en relación al empleo de métodos a primeros principios como semiempíricos.

El método elegido para el análisis de esta serie (EHM) permite un cálculo suficientemente preciso de sistemas extensos (hasta 50 átomos). La precisión inherente a los resultados obtenidos, para una adecuada optimización previa de las geometrías moleculares, depende de una correcta lectura de su significado. Debe tenerse presente en

relación al empleo de métodos semiempíricos, su potencialidad para la descripción de tendencias de variación de una propiedad por modificaciones específicas en un sentido determinado. Los parámetros electrónicos calculados de esta manera no tienen la fuerza de cuantificadores absolutos, comparables con los datos experimentales (si existiera, por otro lado, certeza en relación a la precisión de tal dato experimental) sino la fuerza de una correcta descripción del sentido y magnitud relativo de la modificación de sus valores en respuesta a las modificaciones estructurales introducidas. En relación a este tópico, que ha sido tema de frecuentes discusiones, no se considera válida la descalificación de un método semiempírico frente a otro. Cada método es más adecuado para el análisis de un problema particular, dado que implican aproximaciones (simplificaciones) distintas y emplean magnitudes de diversa índole (electrónicas, geométricas, espectroscópicas) en su parametrización. En este aspecto el Hückel Extendido, al no despreciar el solapamiento orbital y parametrizar electrónicamente el sistema, resulta particularmente apto para el cálculo de descriptores electrónicos.

En un contexto estrechamente vinculado con la química orgánica y, en relación al fármaco con el cálculo de parámetros *descriptores moleculares* resulta de interés presentar los fundamentos del método de *Hueckel Extendido* [103] a través de la discusión de sus similitudes y diferencias con el más rudimentario, pero de gran utilidad en fisicoquímica orgánica, método de *Hueckel* (*Hueckel Molecular Orbital - HMO*) [99].

Aunque basado en los principios de de la mecánica cuántica, este último tiene la importancia de racionalizar la experiencia empírica relativa a los sistemas π -electrónicos, considerando :

i) orbitales moleculares (OM) φ_r , autofunciones de un Hamiltoniano monoeléctrico efectivo \hat{H}^h propio de la configuración. El estado de este sistema queda entonces descrito por la ecuación a autovalores

$$\hat{H}^h \varphi_r = \varepsilon_r \varphi_r \quad (6.7)$$

donde φ_r es el r -ésimo MO y ε_r su energía.

Considerando únicamente el aporte de los electrones π a la determinación de las propiedades características de los sistemas en estudio, los núcleos y electrones σ definen un carozo responsable del campo de potencial que sienten los primeros, lo cual conduce a la expresión del Hamiltoniano electrónico según

$$\hat{H}^\pi = \sum_i (\hat{T}_i + \hat{V}_i^{\text{core}}) + \sum_{i < j} e^2/r_{ij} = \sum_i (\hat{H}_i^{\text{core}} + \hat{V}_i^\pi) = \sum_i \hat{H}_i^h \quad (6.8)$$

siendo : i, j índices que caracterizan los electrones π ,

T_i el operador energía cinética del electrón i -ésimo,

V_i el operador energía potencial del mismo electrón en el campo definido por el carozo,

e^2/r_{ij} el término que tiene en cuenta los efectos de repulsión entre los electrones i -ésimo y j -ésimo.

La segunda igualdad de la ecuación (6.8) define

$$\hat{H}_i^{\text{core}} = \hat{T}_i + \hat{V}_i^{\text{core}}, \quad \hat{V}_i^\pi = \sum_{i < j} e^2/r_{ij} \quad (6.9)$$

\hat{V}_i^π como el potencial efectivo que actúa sobre el electrón i debido a la influencia de los demás electrones y permite expresar el \hat{H} total como una suma de términos monoeléctricos.

ii) La expresión de los OM como combinación lineal de orbitales atómicos (CLOA), correspondiendo un orbital atómico a cada uno de los centros comprometidos en la definición de la molécula

$$\varphi_r = \sum_{\mu} c_{r\mu} \chi_{\mu} \quad (6.10)$$

iii) El empleo del Teorema Variacional para el cálculo de los coeficientes $c_{r\mu}$ asociados al conjunto óptimo (de menor energía) de OMs.

La combinación de las ecuaciones (6.7) y (6.10) indica:

$$\sum_{\mu} c_{\mu} (\hat{H}^h - \epsilon) \chi_{\mu} = 0 \quad (6.11)$$

ecuación que, trabajada matemáticamente en el campo de las funciones complejas:

$$\sum_{\mu} c_{\mu} (\langle \chi_{\nu} / \hat{H}^h / \chi_{\mu} \rangle - \epsilon \langle \chi_{\nu} / \chi_{\mu} \rangle) = 0 \quad (6.12)$$

equivale a :

$$\sum_{\mu} c_{\mu} (\hat{H}_{\nu\mu} - \epsilon S_{\nu\mu}) = 0 \quad (6.13)$$

al introducir las definiciones de $H_{\nu\mu}$ y $S_{\nu\mu}$:

$$H_{\nu\mu} = \langle \chi_{\nu} / \hat{H}^h / \chi_{\mu} \rangle, \quad S_{\nu\mu} = \langle \chi_{\nu} / \chi_{\mu} \rangle \quad (6.14)$$

Del cumplimiento de la ecuación (6.12) resulta el requisito :

$$|\hat{H}_{\nu\mu} - \epsilon S_{\nu\mu}| = 0 \quad (6.15)$$

como única solución distinta de la trivial.

Si N orbitales atómicos participan en la definición, como combinación lineal, de cada OM, se obtienen, de la resolución del determinante secular, N valores de energía asociados a los N OM linealmente independientes que pueden construirse a partir de éstos.

Si ϵ_r es una solución específica, su sustitución en las ecuaciones seculares permite obtener relaciones entre los coeficientes, cuyos valores absolutos se conocen con el aporte adicional de la condición de normalización

$$\langle \varphi_r / \varphi_s \rangle = \delta_{rs} \quad (6.16)$$

que expresa el buen comportamiento de las funciones orbitales.

iv) La introducción de reglas empíricas que simplifican la evaluación del determinante secular, responsables de la restricción del empleo del HMO a compuestos planos no saturados :

* solapamiento diferencial nulo, aún entre vecinos más próximos :

$$\langle \chi_\mu / \chi_\nu \rangle = S_{\mu\nu} = \delta_{\mu\nu} \quad (6.17)$$

* Los elementos diagonales del Hamiltoniano $\hat{H}_{\mu\mu}$ (integrales de Coulomb) tienen el mismo valor para todos los átomos de Carbono:

$$\hat{H}_{\mu\mu} = \langle \chi_\mu / \hat{H} / \chi_\mu \rangle = \alpha \quad (6.18)$$

* Los elementos no diagonales $\hat{H}_{\mu\nu}$ (integrales de resonancia) tienen valor constante, distinto de cero, para μ, ν vecinos más próximos

$$\begin{aligned} \hat{H}_{\mu\nu} &= \langle \chi_\mu / \hat{H} / \chi_\nu \rangle = \beta & \mu, \nu &= \text{vecinos próximos} \\ &= 0 & \mu, \nu &\neq \text{vecinos próximos} \end{aligned} \quad (6.19)$$

Valores distintos, expresables en función de éstos, se han calculado para heteroátomos a través del ajuste de cálculos HMO a valores experimentales, extendiendo su aplicación a moléculas que contengan átomos distintos que Carbono

El conocimiento de las energías (en términos de α y β) y de los coeficientes de peso en la expresión de los orbitales moleculares a través del cálculo determinantal, permite el cálculo de energías de deslocalización π , E_{HOMO} , E_{LUMO} , densidades de carga π u órdenes de enlace π -electrónicos entre átomos adyacentes, además de otros parámetros (índice de valencia libre, momentos dipolares) calculables a partir de los anteriores.

Las mismas consideraciones i)-iii), dejando de lado las reglas empíricas, simplificadoras del cálculo iv), permiten delinear los criterios sustentativos del método de Hückel Extendido el cual, relajando las aproximaciones más crudas del HMO permite el cálculo de cualquier entidad química moléculas orgánicas o inorgánicas, saturadas o insaturadas, radicales o especies cargadas.

Conservando su naturaleza empírica monoeléctronica:

* No desprecia el solapamiento orbital, considerando la interacción entre todos los átomos que componen la molécula como una función dependiente de la distancia.

* Los términos no diagonales del Hamiltoniano electrónico no se limitan a vecinos más próximos, satisfaciendo una dependencia funcional con la distancia semejante a la inherente al solapamiento orbital.

* Considera en forma implícita los electrones internos que definen un carozo electrónico no polarizable. Lejos de separar los sistemas σ y π electrónicos, el carozo está definido, en el marco de EHM, por los electrones distintos a los de valencia, en lugar de estarlo, como en el HMO, por los electrones σ (distintos a los π).

* Al considerar el efecto de todos los electrones de valencia la teoría no se limita a sistemas planos.

* Los términos diagonales ($\hat{H}_{\mu\mu}$) y no diagonales ($\hat{H}_{\mu\nu}$) del Hamiltoniano se aproximan, en el marco del razonamiento semiempírico, pero en forma menos cruda que en el HMO, distintivas del tipo de orbital atómico y del átomo mismo

Los términos diagonales se igualan al valor negativo de los potenciales de ionización de valencia (*Valence Orbital Ionization Potentials - VOIP*) del orbital atómico correspondiente :

$$\hat{H}_{\mu\mu} = -\text{VOIP}(\chi_{\nu}) \quad (6.20)$$

resultando así la definición de un átomo dependiente también de la carga que lo caracteriza en el sistema en el cual se lo define.

La integral de resonancia se calcula en función de ésta de acuerdo a la ecuación de Wolfsberg-Helmholtz [201]

$$\hat{H}_{\mu\nu} = k S_{\mu\nu} (\hat{H}_{\mu\mu} + \hat{H}_{\nu\nu})/2 \quad (6.21)$$

donde $k=1,75$ [202], S es la integral de solapamiento , que contiene la dependencia con la distancia y se construye sobre orbitales atómicos definidos como funciones de Slater monodeterminantales. Esta forma de aproximación de los términos bicéntricos en función de los monocéntricos se basa en la aproximación de Mülliken [203], que aproxima el valor esperado ($\langle \chi_{\mu}/\hat{f}/\chi_{\nu} \rangle$) de una función f , definida en la región comprendida entre los orígenes de coordenadas de χ_{μ} y χ_{ν} y simétrica alrededor del punto medio entre esos dos orígenes por :

$$\langle \chi_{\mu}/\hat{f}/\chi_{\nu} \rangle \sim (S_{\mu\nu}/2)(\langle \chi_{\mu}/\hat{f}/\chi_{\nu} \rangle + \langle \chi_{\nu}/\hat{f}/\chi_{\mu} \rangle) \quad (6.22)$$

Un análisis poblacional de Mülliken [204] permite, conocidas las poblaciones orbitales, el cálculo de densidades locales de carga sobre los centros atómicos, energías orbitales, energías totales, E_{HOMO} , E_{LUMO} .

Al depender cada cuantificador de las distancias mutuas entre los centros atómicos, la mayor precisión de los valores derivados del EHM no recae solamente en la mayor exactitud inherente al método de cálculo sino también en su dependencia con la conformación particular de la molécula.

- Su aplicación al análisis de la familia de derivados de la Bencidrilamina.

De la descripción del método (sección 6.1.2-b) resulta evidente que su aplicación al cálculo de parámetros electrónicos (descriptores moleculares) requiere el conocimiento de los potenciales de ionización, coeficientes y exponentes de Slater, que permitan la expresión funcional de los orbitales atómicos para cada uno de los átomos constitutivos de las moléculas de la serie (tabla 6.2), además de las coordenadas espaciales (cartesianas) que definan la respectiva geometría asociada al cálculo.

Orbital	VOIP (eV)	ξ
1s H	-13,60	1,300
2s O	-32,30	2,275
2p O	-14,80	2,275
2s C	-21,40	1,625
2p C	-11,40	1,625
2s N	-26,00	1,950
2p N	-13,40	1,950
3s Cl	-30,00	2,033
3p Cl	-15,00	2,033
3d Cl	-9,00	2,033

Tabla 6.2 - Parámetros electrónicos que definen los orbitales atómicos (de ref. 202).

VOIP : Potencial de ionización de valencia del orbital atómico correspondiente.

ξ : exponente de Slater en la expresión de la función que describe el orbital atómico.

Las coordenadas cartesianas son las que resultan del empleo del Macromodel para la elección de la conformación de menor energía. Debe mencionarse como excepción, la determinación de la conformación de la 4-Nitrobencidrilamina, para la cual debió usarse una laboriosa metodología de "prueba y error" por no estar el grupo nitro parametrizado en la mecánica molecular (MM2) de Allinger. Varias geometrías posibles, cuya factibilidad se analizó con la ayuda de modelos estereoespaciales, se estudiaron comparativamente, a través de sus valores de energías totales calculadas por medio de Hückel Extendido. La elección de la conformación de mínima energía se encontraba inicialmente condicionada a la coherencia de las expresiones estructura actividad que incluyeran los parámetros que la

representan. Sólo en base a la bondad de las correlaciones obtenidas se adoptó la conformación que minimizaba la energía total (suma de energías orbitales) como geometría representativa de este compuesto dentro de límites de tolerancia comparables a los asociables a las determinaciones basadas en la consideración de la existencia de interacciones clásicas intramoleculares. La cuasi ortogonalidad de los planos que contienen los anillos bencénicos, común a los derivados 4-sustituídos, llevó a una mayor confianza en la aceptación de esta estructura.

Entre los parámetros electrónicos se analizaron en particular las densidades locales de carga sobre los centros atómicos y las energías de los orbitales de frontera (E_{HOMO} , E_{LUMO}), singularmente asociadas a la reactividad química de las especies.

El análisis de las densidades locales de carga permite evaluar separadamente el efecto de cada sustituyente en las distintas porciones estructurales. Debido a la mayor deslocalización de la carga electrónica en las porciones aromáticas, la variación de la densidad de carga por sustitución se torna particularmente evidente en el resto

$$\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagup \text{C} \diagdown \\ \text{N} \end{array} \begin{array}{c} \text{R} \\ \diagup \text{R} \diagdown \\ \text{R} \end{array}$$

Considerando la Bencidrilamina como compuesto de referencia, la introducción de grupos donores/aceptores de electrones en un anillo bencénico disminuirá/ aumentará la densidad local de carga positiva sobre el Carbono del bencidrilo. Por otro lado, la cesión parcial del par de electrones no apareados del átomo de Nitrógeno puede ser potenciada o no de acuerdo al grupo que se encuentre involucrado en la N-sustitución, disminuyendo o aumentando respectivamente esta densidad local de carga positiva. El átomo de Carbono del grupo bencidrilo se muestra así como un centro de particular importancia, ya que convergen en él los efectos de ambos tipos de sustitución.

El logro de una buena correlación de la actividad biológica con la densidad local de carga puede considerarse indicativo e la existencia de interacciones específicas donador-aceptor entre la droga y el receptor biológico, o de fuerzas electrostáticas condicionantes de

la efectividad de la interacción que conduce a estímulo. En forma general, si algún tipo de transferencia de carga estuviera involucrado en el mecanismo de acción de la droga, la diferencia de energía $E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$ (ΔE_{HL}) debería ser un buen descriptor de la actividad. Los valores de la tabla 6.3 indican que la actividad aumenta cuando disminuye este parámetro, comportamiento asociable a una activación de la molécula como parte del mecanismo de acción que puede deberse a un cierto carácter donador localizado en una porción estructural definida o a una transferencia de carga intramolecular que resulte en la activación de la porción responsable de la interacción. Esta dependencia no es, sin embargo parametrizable ya que, si se consideran simultáneamente todos los elementos de la familia de congéneres, según demuestra la ecuación 6.23, no se obtiene una buena correlación

$$pD'_2 = 5,799 - 0,494 \Delta E_{\text{HL}} \quad (6.23)$$

$$n = 9, \quad r = 0,355, \quad s = 0,334$$

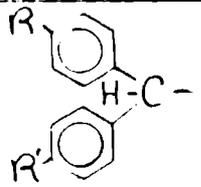
		R	R'	energía total (eV)	δN	δC	δH	ΔE_{HL}
BB ₁₃	NH ₂	NO ₂	H	-1574,9210	-0,7360	0,2908	-0,00322	4,1505
BB ₂	NH ₂	H	H	-1244,0322	-0,7397	0,2890	-0,00341	3,9056
BB ₈	NH ₂	Me	H	-1349,6739	-0,7400	0,2887	-0,00356	3,7730
BB ₁₀	NH ₂	OMe	H	-1475,2351	-0,7408	0,2886	-0,00359	3,6200
AB ₁₀	NHMe	H	H	-1349,2945	-0,7088	0,2861	-0,00380	3,9340
AB ₁₆	NHMe	Me	H	-1454,8066	-0,7094	0,2860	-0,00430	3,9280
AB ₄	NMe ₂	H	H	-1453,4092	-0,6364	0,2291	+0,01800	3,7657
AB ₇	NEt ₂	H	H	-1660,1904	-0,6990	0,2382	+0,01400	3,2343
AB ₂₈	NHMe	Cl	Cl	-1589,5521	-0,7006	0,2820	-0,00443	2,6347

Tabla 6.3.- Parámetros electrónicos cuánticos que caracterizan los elementos de la familia de congéneres. δN = densidad local de carga sobre el átomo de Nitrógeno del grupo amino, δC = densidad local de carga sobre el átomo de Carbono bencidrílico, δH = densidad local de carga sobre el átomo de Hidrógeno del resto bencidrilo. ΔE_{HL} = diferencia de energía HOMO-LUMO.

A partir de la dependencia de la actividad biológica con este parámetro (ΔE_{HL}) (Figura 6.13) resulta evidente que se deben considerar separadamente:

- modificaciones por sustitución en la porción arílica,
- modificaciones por N-sustitución,
- el efecto de ambos tipos de sustitución en un único compuesto.

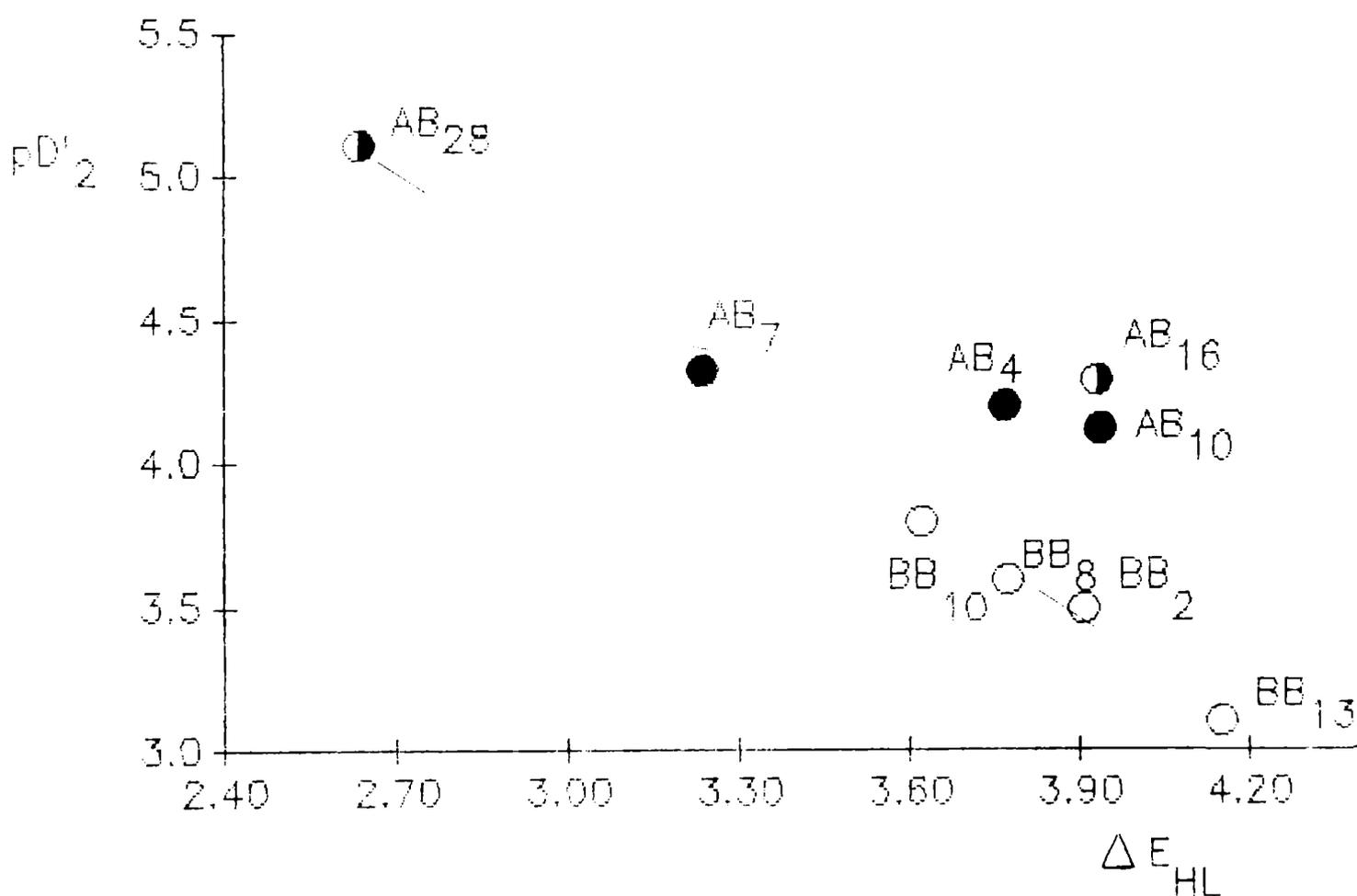


Figura 6.13- Variación de la actividad antiespasmódica, expresada como pD'_2 , en función del parámetro electrónico ΔE_{HL} .

- (o) derivados obtenidos por sustitución en el núcleo aromático
- (●) derivados obtenidos por N-sustitución,
- (◐) derivados modificados en ambos centros.

Es así inmediata, en este caso particular, la mencionada subdivisión del problema total en subproblemas, cada uno de los cuales, aunque con menor rigor estadístico, permite derivar importantes conclusiones en relación al criterio práctico orientador de las posteriores modificaciones. Del análisis del conjunto total resulta evidente que la actividad aumenta por la introducción de grupos que incrementen la disponibilidad del par de electrones del átomo de Nitrógeno amínico. Del análisis por subgrupos se concluye la mayor eficacia de su introducción en la porción arílica. La comparación de la diferencia de actividad biológica $AB_{16}-AB_{10}$, que difieren en una 4-metil sustitución, con la diferencia correspondiente entre BB_8 y BB_2 , que escribe la misma sustitución en ausencia del N-metil sustituyente indica una cierta aditividad de ambos efectos, que permite una optimización de la actividad abordando simultáneamente ambos sitios de sustitución en el mismo sentido. En la misma forma, cuando átomos de Cloro, en lugar de grupos CH_3 modifican el grupo arílico se observa, junto al aumento de actividad, una marcada disminución de la diferencia de energía entre el último orbital ocupado y el primero desocupado, indicativo de una mayor disponibilidad electrónica de la molécula más activa. El análisis aditivo no puede hacerse extensivo a los casos de disustitución sobre el Nitrógeno amínico, dada la pérdida de independencia relativa de ambos grupos al coordinar en un único sitio de sustitución.

El análisis de la correlación de la actividad con la densidad local de carga confirma esta aseveración, ya que los derivados N,N-disustituídos no resultan correlacionables con la densidad local de carga, ya se considere como centro el Nitrógeno amínico o el Carbono metilénico. Los cambios en la densidad local de carga no producen el cambio predecible en la actividad biológica. La influencia tan directa de la introducción de grupos voluminosos modificando el entorno inmediato del resto $>C-N\begin{matrix} R \\ R \end{matrix}$, desvía nuevamente la atención hacia esta porción estructural. Cabe inferir entonces la probable ubicación del sitio activo en esa porción, asociada a las características electrónicas de un centro atómico, a la labilidad de

un enlace, o a una conformación definida por los requerimientos estructurales del receptor. La introducción de grupos voluminosos impediría entonces el acercamiento al receptor o el logro de la conformación necesaria para una interacción efectiva. El análisis de las conformaciones de mínima energía permite visualizar la falta de disponibilidad del par de electrones del Nitrógeno amínico, que lleva a asociar el efecto de disustitución a un efecto estérico de grupos voluminosos.

Si se considera la densidad local de carga sobre el Nitrógeno amínico, sólo se logra una buena correlación cuantificando el efecto de sustitución sobre el núcleo. Los derivados que resultan de una N-sustitución modifican demasiado fuertemente este parámetro, ya que la introducción de grupos alquílicos induce una cesión parcial de carga al Carbono a través de los electrones no enlazantes del Nitrógeno, que se refleja en una variación inversa de la densidad local de carga negativa sobre este centro por introducción del mismo grupo en el grupo arílico o coordinado directamente con el Nitrógeno (compuestos BB₈ y AB₁₀, Tabla 6.3). Este efecto no influye en la densidad local de carga positiva sobre el átomo de Carbono, ya que este no es centro directo de sustitución. El parámetro electrónico δC disminuye por la introducción de grupos donores de electrones, tanto sobre el Nitrógeno amínico como en posición 4 del anillo aromático (Fig. 6.14).

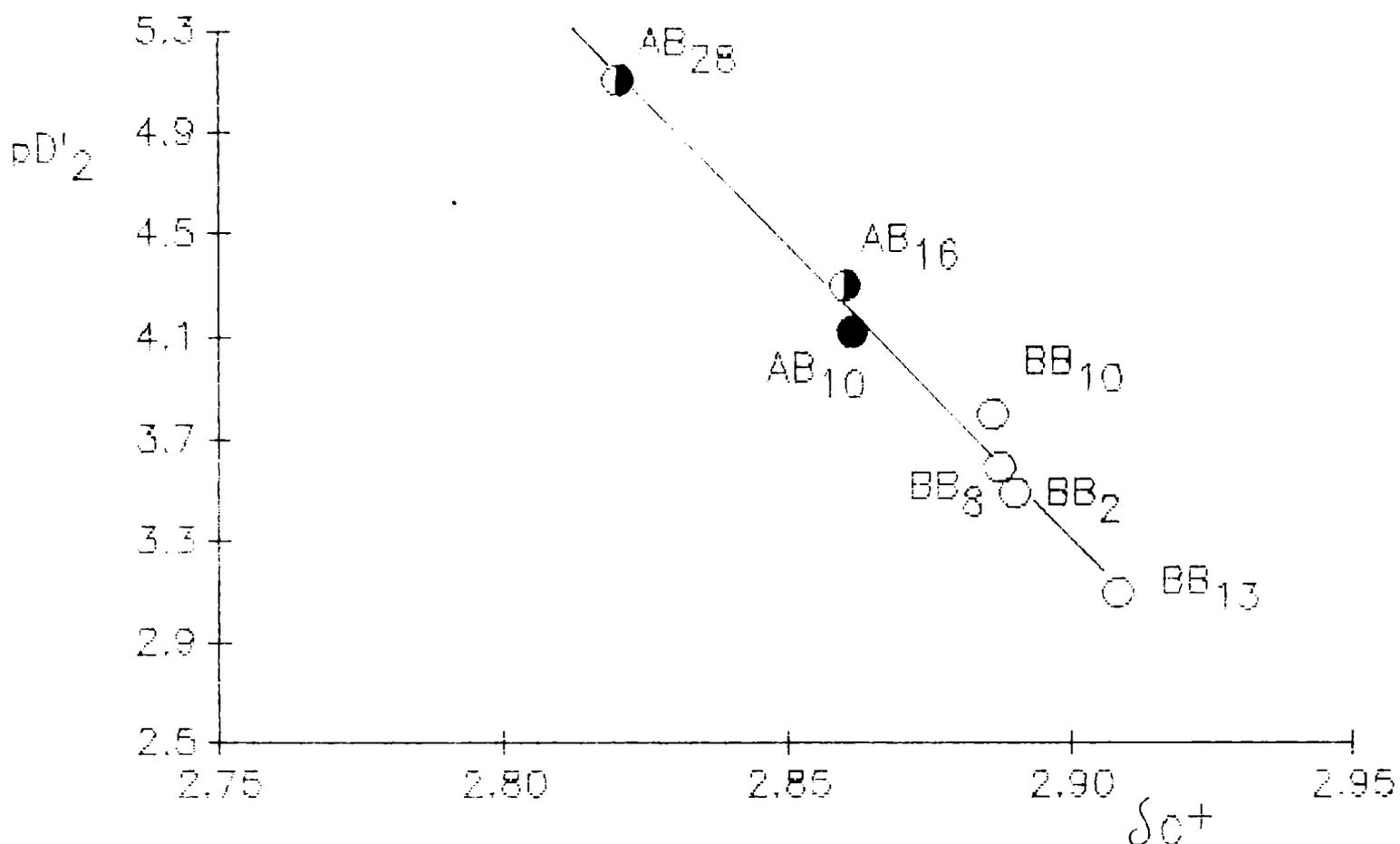


Figura 6.14- Variación de la actividad antiespasmódica, expresada como pD'_2 , en función del parámetro electrónico δC .

- (○) derivados obtenidos por sustitución en el núcleo aromático
- (●) derivados obtenidos por N-sustitución,
- (●) derivados modificados en ambos centros.

Sólo es necesario dejar de lado los derivados obtenidos por N,N-disustitución para lograr una buena correlación con la actividad antiespasmódica, expresable por :

$$pD'_2 = 71,215 - 234,1313 \delta C \quad (6.24)$$

$$n = 7, \quad r = 0,9924, \quad s = 0,0029$$

La densidad local de carga sobre el átomo de Carbono del difenilmetano resulta así el mejor cuantificador cuántico de la actividad antiespasmódica de la familia de congéneres de la Bencidrilamina. Sin embargo, no resulta sencillo predecir el sentido y magnitud de cambio de este parámetro ante cada sustitución dada la multiplicidad de factores que convergen a su definición. Resulta sí concluyente la importancia de la introducción de grupos que logren, al trabajar sobre ambas posiciones de sustitución, un aumento de la densidad local de carga sobre el Nitrógeno amínico, para el logro del mejor aumento de actividad.

Las conclusiones más importantes que pueden derivarse del análisis químico cuántico de esta familia pueden ennumerarse según :

1- La sustitución simultánea posición 4- del grupo aromático y sobre el Nitrógeno amínico genera la mejor modificación de la actividad deseada.

2- La disustitución sobre el Nitrógeno amínico inhibe la actividad en lugar de incrementarla. Esto conduce a postular también un tamaño crítico del sustituyente en los casos de monosustitución.

3- El resto $>C\begin{matrix} H \\ \diagdown \\ N < \end{matrix}$ se muestra como una porción estructural de importancia singular en la definición de la actividad antiespasmódica.

Estas conclusiones guían la etapa siguiente de optimización de la estructura líder, fundamentada en la confirmación de las premisas enunciadas en los puntos anteriores.

Cabe recalcar que las conclusiones expuestas derivan de un análisis de subgrupos individuales. lo que pone de manifiesto la importancia del empleo del criterio químico frente al mero análisis estadístico de valores numéricos para la interpretación de los resultados.

- CAPITULO 7 -

- Optimización del líder -

7.1 - LINEAMIENTOS DEL DISEÑO DE LAS MODIFICACIONES ESTRUCTURALES EN BASE A LA RACIONALIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LA SERIE DE CONGÉNERES.

La aptitud relativa de los descriptores analizados para cuantificar la actividad biológica vuelve a direccionar la investigación a un tratamiento de prueba y error que resulta obviamente inevitable en la superación de ciertas etapas clave definidas como parte de la misma. Estos análisis de prueba y error han sido llamados *fase sistemática* de la investigación, en la cual se comprueba la validez o no de las hipótesis generadas en la etapa previa (*fase creativa*) [19].

Los distintos parámetros clásicos analizados tienen una fuerza comparable en la correcta descripción del comportamiento biológico (figs.6.2-6.4, ecs.6.2-6.5). No es dable, sin embargo, extrapolar la validez de este comportamiento al aumentar el número de compuestos a incluir en la familia de derivados. Es la elección del mejor parámetro lo que nos enfrenta nuevamente a la dualidad verdadero-falso (*fase sistemática*). Sin deternos en consideraciones intermedias, que involucraron el empleo de otros parámetros, fundamentaremos la racionalización del comportamiento y la elección de las modificaciones sobre la elección de log P como descriptor molecular clásico. Elegido este parámetro hidrofóbico, su empleo en el diseño de las modificaciones estructurales que aumenten la actividad biológica se fundamenta en el análisis de la fig. 6.2. Siendo positiva la pendiente de la recta que describe la variación de la actividad biológica en función de éste, toda modificación a realizarse debe ser tal que el valor total de log P del compuesto final sea mayor que el del compuesto inicial, lo que implica el reemplazo de grupos (grupo saliente) por otros de mayor valor de log P (grupo entrante)

$$\log P_{\text{grupo entrante}} - \log P_{\text{grupo saliente}} > 0 \quad (7.1)$$

Entre los parámetros químico cuánticos, la densidad de carga sobre el átomo de Carbono parece representar al mejor descriptor. Sin embargo, la modificación de esta densidad de carga no puede asociarse directamente a una característica particular y cuantificable de los grupos introducidos, ya que los efectos son generados sobre la estructura completa, por deslocalización de la carga o modificaciones conformacionales y, por lo tanto, no predecibles. No es, por lo tanto, tan inmediato su empleo como un cuantificador a priori, teniendo en cuenta los costos y tiempo de cómputo asociados al cálculo de cada nueva estructura imaginable. El análisis químico cuántico se empleó principalmente en relación a las conclusiones ennumeradas en el capítulo anterior, diseñando 4,N-disustituciones que involucren, en su efecto total, un aumento de disponibilidad del par de electrones no apareado del grupo amino, que resulta más directamente cuantificable a través de la densidad local de carga sobre el átomo de Carbono adyacente. Por otro lado, según se detallará, se diseñaron modificaciones orientadas a comprobar la existencia de un tamaño crítico del sustituyente a coordinar con el átomo de Nitrógeno amínico y la importancia del resto bencilidrido en relación a la potencia biológica de una dada estructura.

7.2 - ELECCIÓN DEL LÍDER -

Debe dejarse específicamente aclarado, en relación a su correcta acepción, que no existe una relación biunívoca entre el compuesto líder y la estructura más activa de una serie dada. Elegimos como *líder* a la estructura más activa que satisfaga además el requisito de ser diseñable de acuerdo a los criterios derivados de la racionalización del comportamiento de la serie resultando, en consecuencia, indicadora de la naturaleza de nuevas modificaciones.

Del análisis de la familia de congéneres resulta evidente que su comportamiento no sólo permite proponer correlaciones de la actividad antispasmódica con diversos parámetros estructurales sino también interpretar las causas que originan estos cambios de actividad.

La estructura más activa (4,4'-dicloro-N-metilbencidrilammina-AB₂₈) puede ser, entonces, denominada *compuesto líder* ya que, en base a la comprensión a nivel electrónico fundamental del mecanismo de modificación de su actividad, guiará futuras modificaciones que pueden manifestarse en efectos semejantes.

7.3 - OPTIMIZACIÓN DEL LÍDER -

7.3.1. - Diseño de las modificaciones.

Los caminos de optimización de la estructura líder se fundamentan en la racionalización del comportamiento observado en relación al cambio de actividad por modificación de la estructura. Esta racionalización conduce a menudo, como en el caso que nos ocupa, a la división del conjunto total en subconjuntos, caracterizables por un aspecto estructural común que los define.

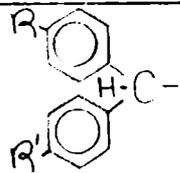
Resultan así diferenciables grupos de derivados:

- a) 4-aril sustituidos,
- b) N-sustituidos,
- c) 4-aril-N-sustituidos,
- d) caracterizados por la ausencia de la porción estructural $>C-N\langle\begin{matrix} R \\ R \end{matrix}$,
- e) caracterizados por la ausencia de un resto fenilo.

Revisando las etapas presentadas, cierta repetición caracteriza la metodología de esta investigación. Este *carácter secuencial* se compone del diseño (*etapa creativa*), síntesis y determinación de la actividad biológica (*etapa sistemática*) y análisis racional de los resultados que conduce al planteo de hipótesis

estructura-actividad. Esta etapa de racionalización contiene en sí misma características creativas y sistemáticas. Constituye una fase creativa en la generación de nuevas estructuras a partir de las hipótesis postuladas. En una posterior etapa sistemática se comprueba, luego de la síntesis, la actividad esperada de cada estructura, confirmando simultáneamente la validez de las hipótesis de relación estructura-actividad planteadas y la exactitud del parámetro de diseño seleccionado.

Inicialmente guiados por el aumento del valor absoluto del parámetro hidrofóbico en la sustitución, sin olvidar que los grupos introducidos deben reunir características bien específicas en relación a las densidades locales de carga sobre el resto C-N, y que la modificación óptima se logra por modificación simultánea de las porciones arilo y amino, se trabajó en los compuestos que se presentan, con sus parámetros fisicoquímicos clásicos, en la Tabla 7.1.

		R	R'	MR	$\pi^{(*)}$	δ	σ
sustituciones aromáticas							
BB ₆	NH ₂	Cl	H	0,603	0.710	-----	-0,150
AB ₂₀	NHBu	Cl	H	0,565	+0,560	-----	-0,150
AB ₃₀	NEt ₂	Cl	Cl	0,603	+0,710	-----	-0,300

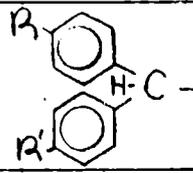
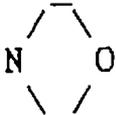
		R	R'	MR	$\pi^{(1)}$	δ	σ
sustituciones sobre el Nitrógeno amínico							
BB ₁	NHCHO	H	H	1,031	-3,725*	+0,250	-----
AB ₉	NMeCHO	H	H	1,371	-2,835*	-----**	-----
AB ₁₂	NHC ₆ H ₁₃	H	H	30256	2,080*	-----**	-----
AB ₁₃	NHC ₆ H ₁₁	H	H	2,934	1,620*	-----**	-----
AB ₁₈		H	H	2,312	-1,080	-----**	-----
AB ₂₀	NHBu	Cl	H	2,306	0,240	-0,280	-----
AB ₂₁	NHBu	H	H	2,306	0,240	-0,280	-----
AB ₂₂	NPr ₂	H	H	2,894	+0,907	-----**	-----
AB ₂₇	NHEt	H	H	2,344	+0,160	+0,010	-----
AB ₃₀	NEt ₂	Cl	Cl	2,344	+0,160	+0,010	-----
AB ₆	OMe	H	H	0,733	-1,540	0,260	-----

Tabla 7.1- Parámetros fisicoquímicos clásicos que guiaron la síntesis de los derivados (familia de congéneres) analizados en la etapa de optimización de la estructura líder. (*) Calculada a partir de homólogos menores. (**) Los valores correspondientes no figuran en tablas. (1) calculados según el criterio de Hansch y Leo [68].

La elección de las estructuras se basó en un criterio de *verificación y falsificación* de hipótesis estructura-actividad [19]. Un criterio de verificación conduce al diseño de estructuras por sustitución en el Nitrógeno amínico, en posición 4- de los restos aromáticos o en ambas posiciones simultáneamente. La falsificación de la importancia de la presencia de ciertas porciones estructurales en relación a la actividad conduce a la determinación de la actividad biológica luego de la eliminación de dichas porciones. Este enfoque dual de la investigación disminuye el riesgo de mala interpretación de los resultados.

Del análisis del nuevo grupo de sustancias así generado se lograrán hipótesis más refinadas, en un procedimiento que puede repetirse tantas veces como resulte necesario hasta el logro de la actividad óptima.

7.3.2.- Síntesis de los derivados.

Dado que se trata de compuestos semejantes a los que constituyen la familia de congéneres, se repitieron, casi sin excepción, los procedimientos generales de síntesis (Tabla 7.2)

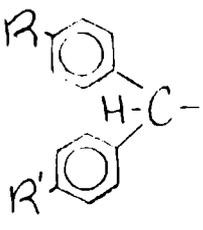
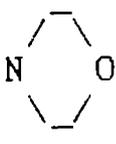
		R	R'	Método	pf(solvente de cristalización)	pf bibliográfico
BB ₆	NH ₂	Cl	H	A	HCl. 278-9°C	279°C [132]
AB ₁₂	NHC ₆ H ₁₃	H	H	C*	HCl. 174-6,5°C (EtOH) picr. 121-2°C	[206]
AB ₁₃	NHC ₆ H ₁₁	H	H	D	HCl. 268-70°C (MeOH- Et ₂ O) picr. 183-5°C	269-70°C [207] 184-6°C [207]
AB ₁₈		H	H	C	70-74°C (EtOH) HCl. 229-33°C (EtOH)	74-76 [208] 227-30°C [209]
AB ₂₁	NHBu	H	H	C	HCl. 258-61°C (C ₆ H ₆)	261-3°C [210]
AB ₂₂	NPr ₂	H	H	C*	HCl. 174-78°C (C ₆ H ₆)	[211]
AB ₂₇	NHEt	H	H	A*	HCl. 253-54°C (MeOH)	246-247°C [212]
AB ₂₀	NHBu	Cl	H	C*	HCl. 231-2,5°C (MeOH- Et ₂ O)	-----
AB ₃₀	NEt ₂	Cl	Cl	C*	HCl. 245-6°C (MeOH- Et ₂ O)	-----
AB ₆	OMe	H	H	C	p. eb./17= 147-8°C	147-9°C/17 [213]

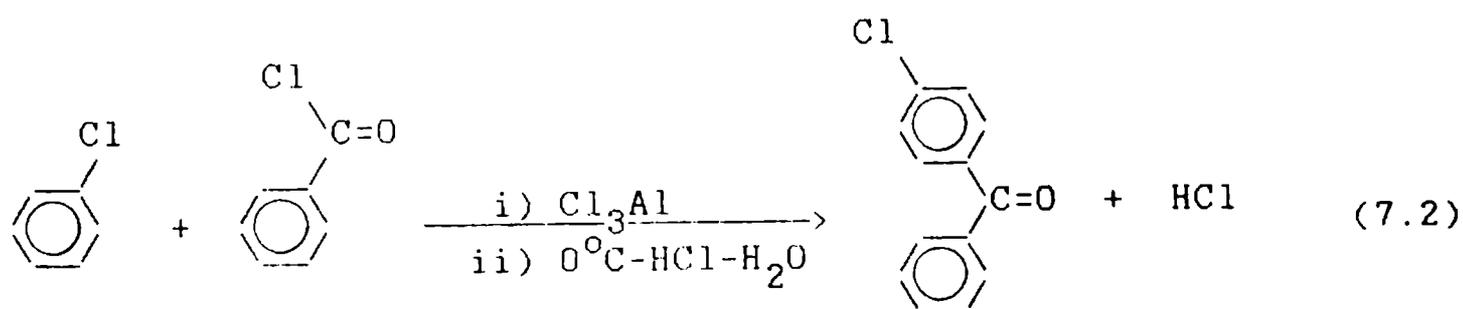
Tabla 7.2- Procedimientos de síntesis de los derivados de la bencidrilamina vinculados a la etapa de optimización del líder. A: reacción de Leuckart. C: alquilación de amina. D: reacción de Grignard. (*) Técnica no descripta en la literatura para este compuesto.

Habiendo presentado ya, en el Capítulo IV, las características generales de los métodos empleados, se presenta aquí un breve detalle de cada procedimiento individual.

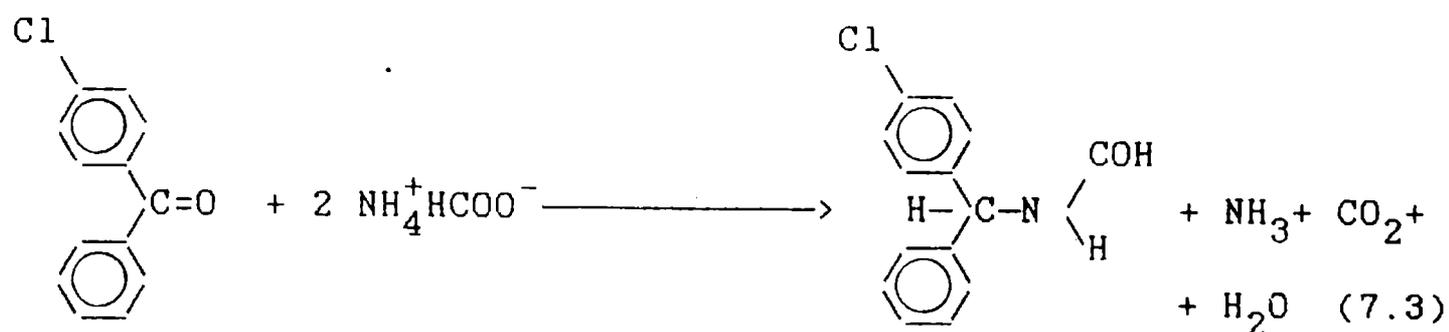
- a) Preparación de derivados 4-aril sustituidos.

i) 4- Clorobencidrilamina (BB₆)

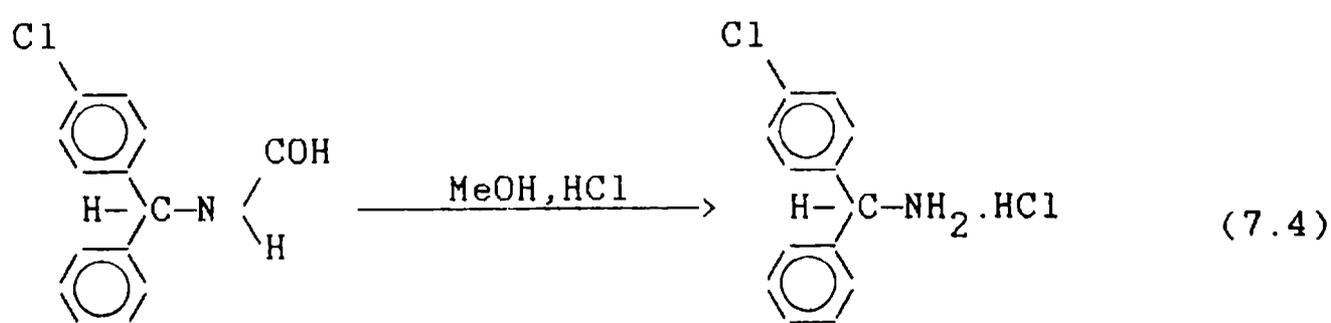
Si bien esta amina es un producto comercial, la reacción de Leuckart permite la obtención del formiato de 4-clorobencidrilamina a partir de 4-clorobenzofenona resultante de la reacción de cloruro de benzoilo y clorobenceno (ec.7.2). En condiciones semejantes a las descritas para la 4-metilbenzofenona, se agregan 10,85 ml (86mM) de clorobenceno (p.eb. 130-131°C) a 10 ml (86mM) de cloruro de benzoilo, en un erlenmeyer de tres bocas, con agitación mecánica. Luego de agregar en 3 veces 11,5 gr (86mM) de Cl₃Al (tiempo de agregado = 30'), calentando a 100°C hasta no más desprendimiento gaseoso (HCl), se enfría en baño de hielo-agua y se agregan 32 ml HCl conc. y 71 gr de hielo. Las fases se separan, se extrae 4x10 ml benceno y los extractos orgánicos reunidos se secan con Na₂SO₄ anh.. Se filtra, se elimina el solvente a presión reducida y seca en tambor desecador a peso constante. Rto. : 37%. p.eb./17= 193-96°C. Lit.= 195-6°C. Pf.=73-74°C(C₆H₆).Lit.= 75-7°C [205].



1,5 gr. (7 mM) del producto (4-clorobenzofenona) así obtenido se agregan a 35 mM de formiato de amonio generado in situ según técnica descrita en 4.3.2.a), calentando a 160°C durante 18 hs. La reacción se esquematiza en la ec.7.3.



Se controla el fin de reacción por TLC e interrumpe enfriando a temperatura ambiente y volcando sobre 10 ml de agua. Precipita un sólido que se separa por filtración a presión reducida y se seca a peso constante en tambor desecador. Rto.80%. La posterior hidrólisis ácida (ec. 7.4) libera el clorhidrato, forma adecuada para la realización del ensayo biológico



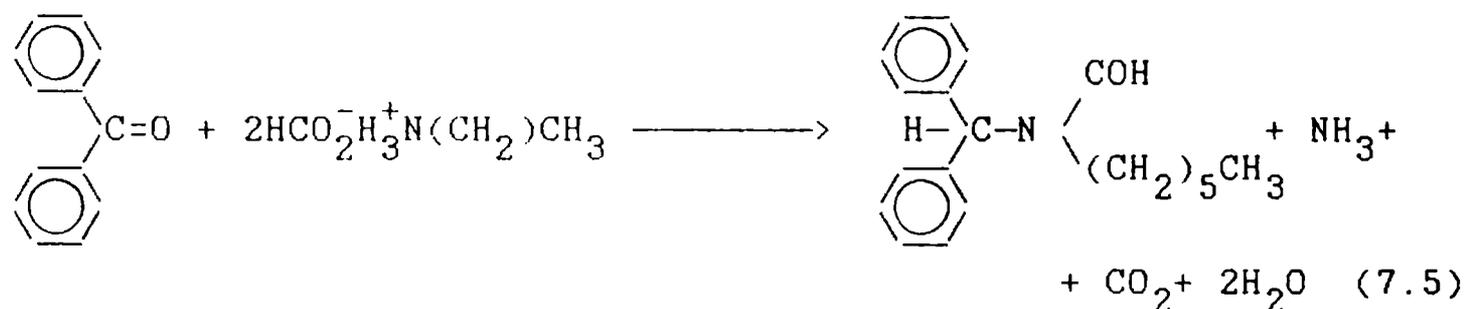
calentando a reflujo (60-80°C) durante 24 hs, con agitación magnética, 1,11 gr (4,5 mM) de N-formil-4-clorobencidrilamina, 4,2 ml de MeOH y 2 ml de HCl 6N (agregando 2 ml adicionales de HCl conc. a las 16 hs). El progreso de la reacción se controla por TLC.

El sólido separado al enfriar se filtra y seca a peso constante. Rto 60%. El producto crudo obtenido fue purificado por destilación. P.eb.= 165-8°C/4mm. Se cristaliza de EtOH, pf.= 278-9°C. Lit.= 279°C [132].

- b) Preparación de derivados N-sustituídos.

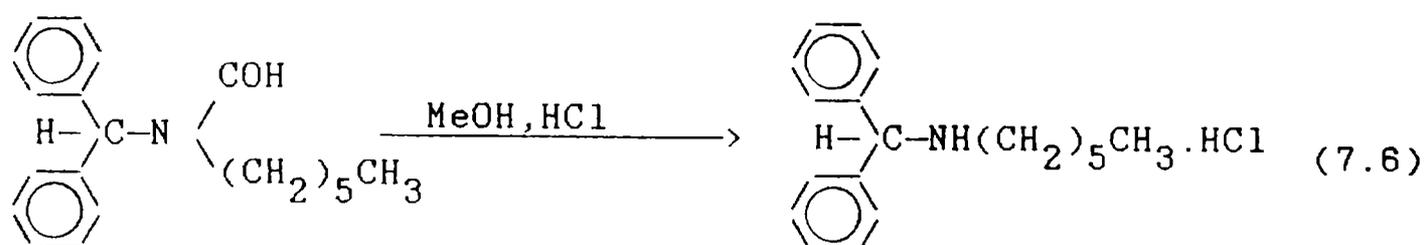
i) N- Hexilbencidrilamina (AB₁₂).

Según se describió en 4.3.3.a) en relación al derivado N-metilsustituído, la reacción de Leuckart permite la síntesis de N-hexilbencidrilamina partiendo del formiato de N-hexilamina preparado dejando caer gota a gota desde ampolla una solución de 3,412 gr (33,8 mM) de N-hexilamina (Fluka) en 10 ml de EtOH sobre 3 ml (60 mM) de ácido fórmico, bajo agitación magnética. Concluído el agregado se añaden 2,73 gr (15 mM) de benzofenona y se calienta a 70°C (2 hs) y a 160-170°C (24 hs) (ec 7.5) con tubo lateral para eliminación de EtOH y H₂O

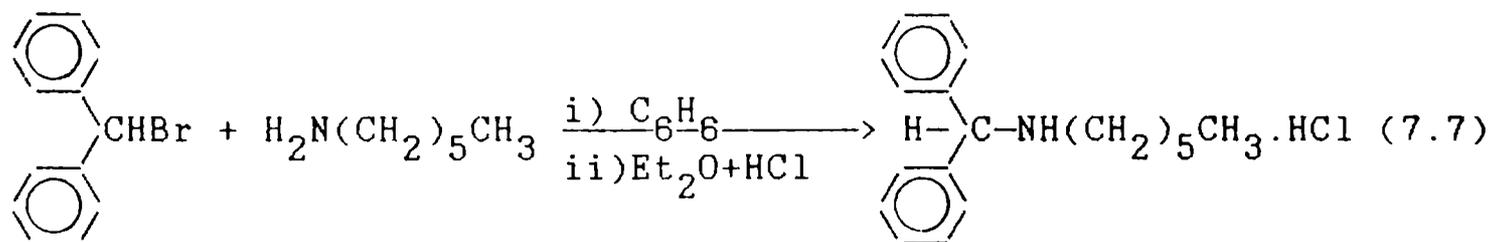


El producto resultante se vuelca en agua, se agregan 20 ml Et₂O y extrae 2x15 ml Et₂O. Los extractos se reúnen, se lavan con H₂O, se secan con Na₂SO₄ anh., filtra, concentra en evaporador rotatorio al vacío y seca en tambor a peso constante.(Aceite viscoso color amarillo).

La posterior hidrólisis ácida (ec.7.6) (calentamiento a reflujo con MeOH-HCl) según condiciones descritas en 7.3.2.a) separa un sólido pardo grisáceo. Rto: 73%. pf.=174-176,5^oC (EtOH) [206]. IR ν_{NH^+} = 2950 y varias bandas entre 2900 y 2000. ¹³C NMR (MeOD) δ 137,01 (C-4), 129,94 129,70 128,65 (C-1 C-2 C-3), 66,58 (C-N) 47,68 (C α), 31,73 (C β), 26,85 (C γ), 26,30 (C δ), 22,88 (C ϵ), 13,98 (C ζ). (espectro 3, apéndice).



El rendimiento es muy inferior (32%) cuando el derivado se prepara por reacción de N-hexilamina con Bromuro de difenilmetano (ec. 7.7)



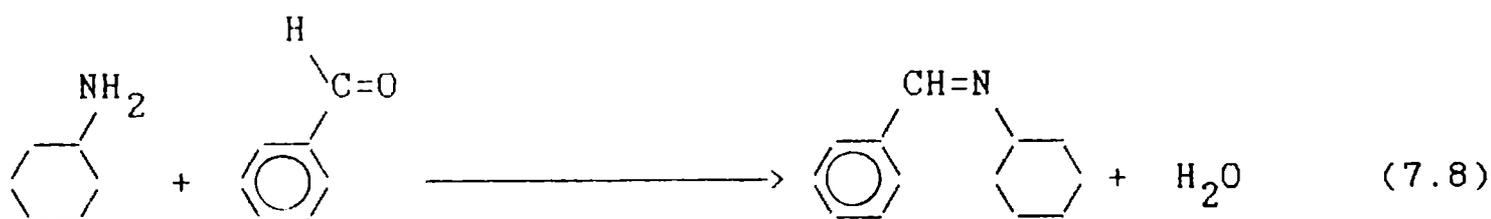
Se mezclan soluciones bencénicas s/OHNa de 1,346g (5,4 mM) de bromuro de difenilmetano en 2 ml de benceno y 430 mg (9 mM) de N-hexilamina en 3 ml de benceno, calentando (baño calefaccionante) con agitación magnética a 80^oC (4 hs). Al enfriar a temperatura ambiente se separan cristales. Se centrifuga y separa la fase bencénica. Los cristales se lavan 2x4 ml C₆H₆, 1x4 ml Et₂O. La fase orgánica se lava 2x5 ml de H₂O y seca con Na₂SO₄ anh. Luego de concentrar en evaporador

rotatorio al vacío se agrega nuevamente Et_2O , se pasa corriente de $\text{HCl}(\text{g})$, centrifuga, lavan los cristales con 1×4 ml Et_2O y seca en tambor a peso constante. Rto 32%. pf.=173,5-174,5 $^\circ\text{C}$ (EtOH) [206], picrato pf.=121-2 $^\circ\text{C}$.

ii) N- Ciclohexilbencidrila (AB₁₃).

a) Preparación de N-bencilidenciclohexilamina.

Sobre 10 ml de solución etanólica de 6,25 g (59 mM) de benzaldehído se deja caer gota a gota, con agitación magnética, una solución de 58,4 g (59 mM) de ciclohexilamina en 10 ml de EtOH (ec 7.8). Luego de calentar a reflujo durante 2 hs, se concentra el líquido amarillo en evaporador rotatorio y seca en tambor a peso constante

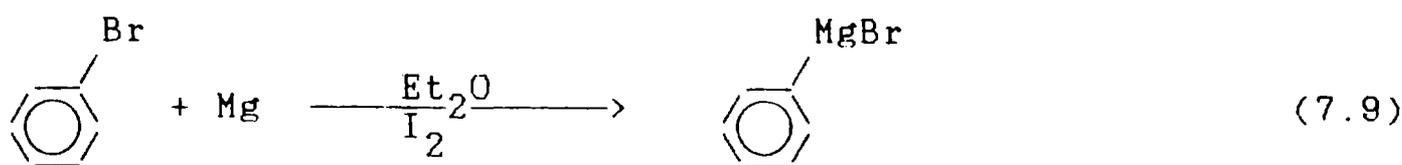


Se destila a presión reducida (5 mm) recogiendo la fracción entre 131-133 $^\circ\text{C}$.Rto 48% p.eb./16 mm = 136 $^\circ\text{C}$.

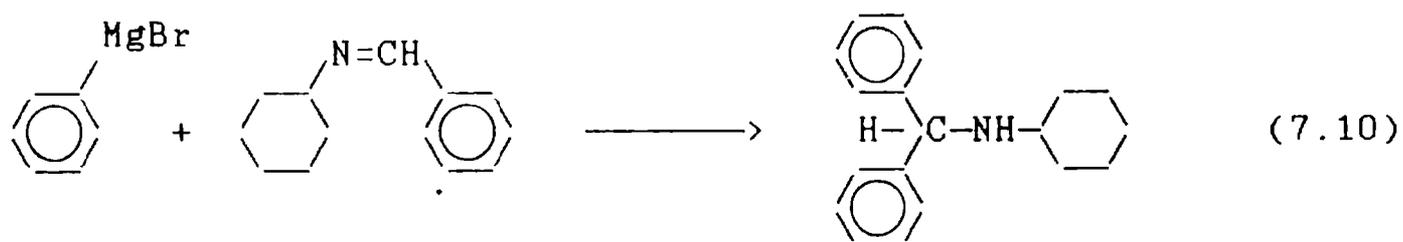
b) Preparación de N-ciclohexilbencidrila.

La reacción de la imina con bromuro de fenilmagnesio y cloruro de amonio conduce a la obtención de la N-ciclohexilbencidrila.

Se mezclan, bajo corriente de N_2 seco, en un balón de 3 bocas con agitación mecánica, 8 ml de Et_2O s/Na, 583 gr (24 mM) de Mg y 2,54 ml (30 mM) de bromuro de fenilo. Luego de adaptar ampolla para Br_2 y refrigerante a reflujo, protegiendo de la humedad con ampolla de CaCl_2 , se introduce una pizca de I_2 , como iniciador de reacción calentando suavemente en baño de agua (ec. 7.9).

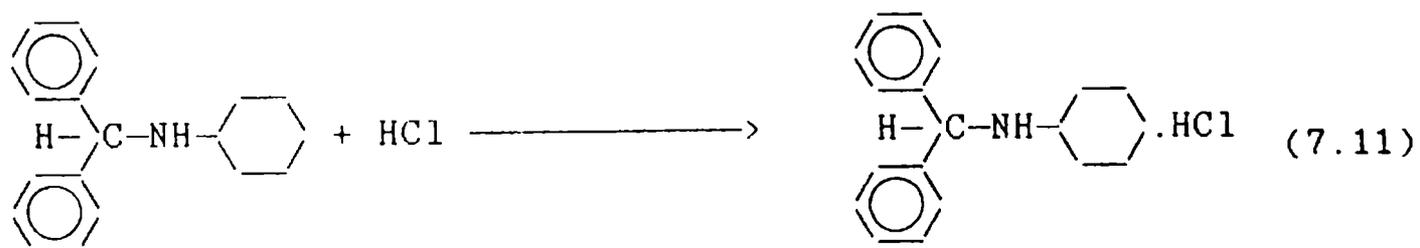


Se enfría en baño de hielo-agua y se agrega desde ampolla, gota a gota (tiempo de agregado = 1 h) una solución etérea de 3,74 gr (20 mM) de ciclohexilimina en 10 ml de Et₂O s/Na. Concluído el agregado se calienta a reflujo 90', se enfría en baño de hielo-agua y agrega una solución acuosa 20% de NH₄Cl (4,276 gr, 80 mM) (ec. 7.10)



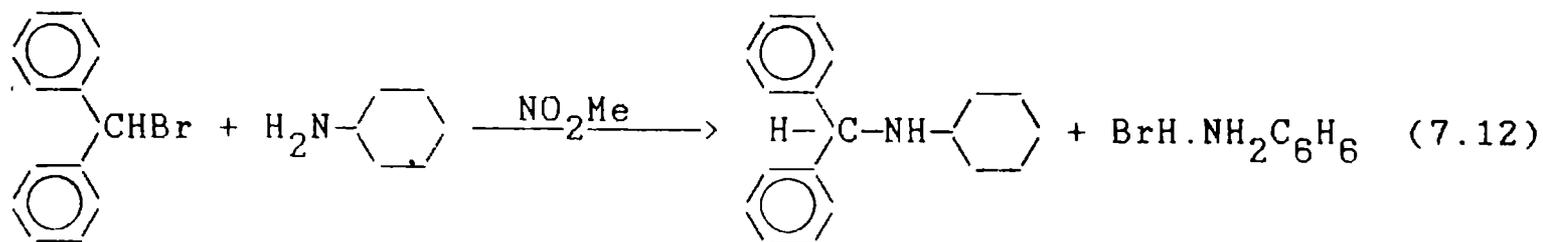
La fase etérea se separa , se extrae 2x7 ml Et₂O y los extractivos etéreos reunidos se secan con Na₂SO₄ anh.

Pasando corriente de HCl(g) sobre la solución etérea obtenida, luego de filtrarla, precipita el clorhidrato de N-ciclohexilbincidrilamina (ec.7.11)



Luego de filtrar a presión reducida se seca en tambor a peso constante. Rto 96%. pf.= 268-70°C (MeOH-Et₂O) Lit.= 269-70°C [207]. Picrato, pf.= 183-5°C. Lit= 184-6°C [207].

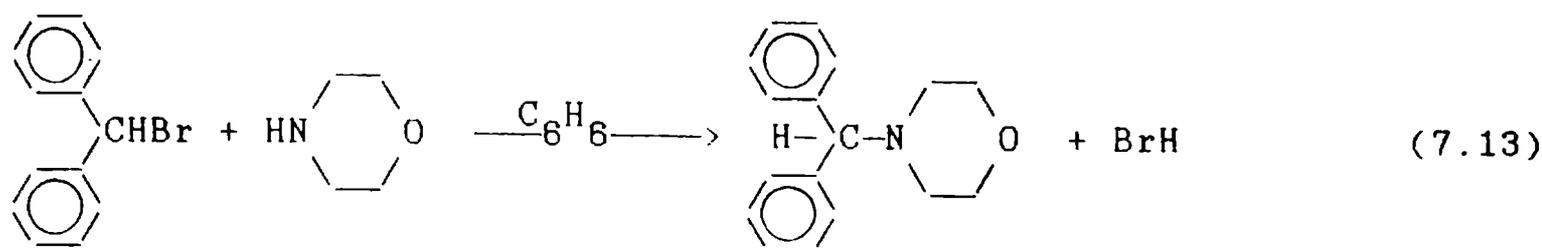
El mismo producto puede obtenerse por reacción del bromuro de difenilmetano con ciclohexilamina (método C) (ec. 7.12)



Sobre una solución de 1,03 ml (9mM) de ciclohexilamina en 1 ml de nitrometano, agitada magnéticamente, se deja caer, a temperatura ambiente, una solución de 1,1 gr (4,5 mM) de bromuro de difenilmetano en 1 ml del mismo solvente. Luego de calentar en baño con agitación a 65-70°C (14 hs) y a temp. amb.(48 hs) se separa por centrifugación el sólido formado (bromuro de la amina), reuniendo la fase líquida con la proveniente de la extracción 2x5 ml y 2x2 ml Et₂O. Se lava 1x5ml de H₂O, seca K₂CO₃, filtra y concentra en evaporador rotatorio al vacío, secando luego a peso constante en tambor desecador. Se optó por el método descrito en primer término para continuar con la preparación del clorhidrato.

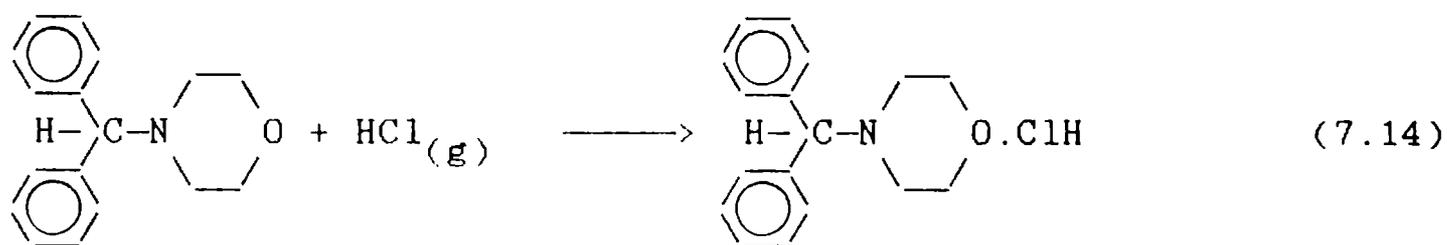
iii) N- Bencidrilmorfolina (AB₁₈).

Dejando caer gota a gota una solución bencénica (sobre OHNa) de 1,240 gr (5 mM) de bromuro de difenilmetano en 2 ml sobre otra solución de 0,9 ml (10 mM) de morfolina (p.eb.= 128°C) en 2 ml del mismo solvente, con agitación magnética, se separa un sólido, al enfriar en baño de hielo-agualuego de haber calentado a reflujo (80-85°C, 2 hs) (ec. 7.13).



El sólido así formado se separa y se lava con 2x1 ml de C_6H_6 . Los extractos orgánicos reunidos se lavan 2x2 ml C_6H_6 y secan con Na_2SO_4 anh.. Luego de filtrar y eliminar solventes se seca en tambor hasta peso constante. Rto: 78%. Pf.= $70-74^\circ\text{C}$ (EtOH). Lit.= $74-76^\circ\text{C}$ [208].

Se prepara luego el clorhidrato en la forma habitual. Pf.= $229-33^\circ\text{C}$ (EtOH). Lit.= 227-30 [209].

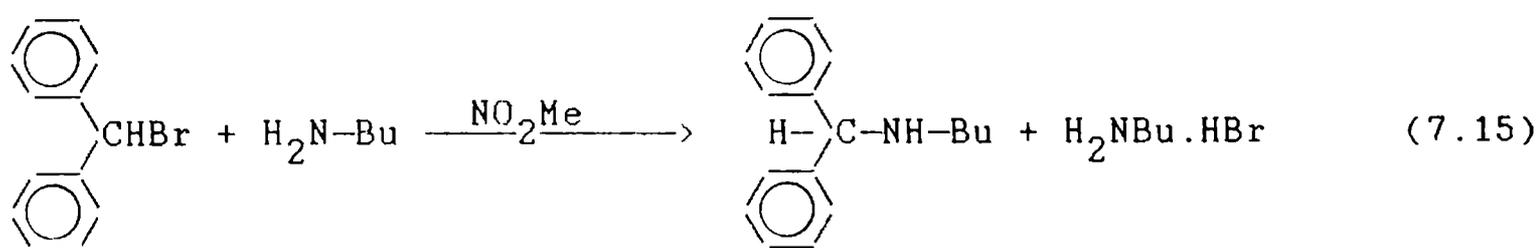


iv) N- Butilbencidrilamina (AB_{21}).

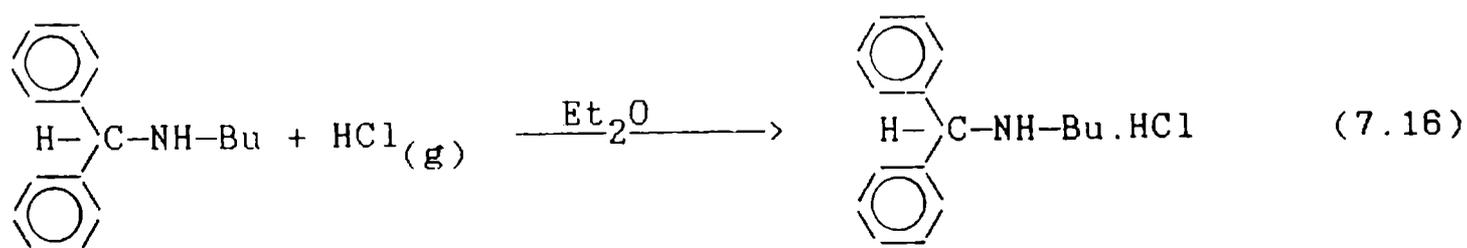
El mismo método, ya descrito, de reacción de la amina N-alquilsustituída con bromuro de difenilmetano en nitrometano y posterior tratamiento de la fase orgánica con corriente de $\text{HCl}_{(g)}$ seco permite obtener el clorhidrato de N-butilamina.

Se parte en este caso de soluciones de 1 gr (4 mM) de bromuro de difenilmetano en 1 ml de nitrometano y 9mM de N-butilamina en 1 ml del mismo solvente, dejando caer lentamente la primera sobre la segunda con pipeta Pasteur por torunda de algodón con agitación magnética constante. Luego de calentar a reflujo ($90-95^\circ\text{C}$) durante 2

hs se separa una sólido a temperatura ambiente (ec.7.15) el cual, luego de separado por centrifugación, se lava 2x3ml Et₂O y seca en tambor a peso constante (probable bromuro de N-butilamina). La fase orgánica reunida se lava con solución acuosa de OHNa (12%) hasta reacción alcalina (tornasol), se seca con Na₂SO₄, filtra, concentra en evaporador rotatorio al vacío y seca en tambor

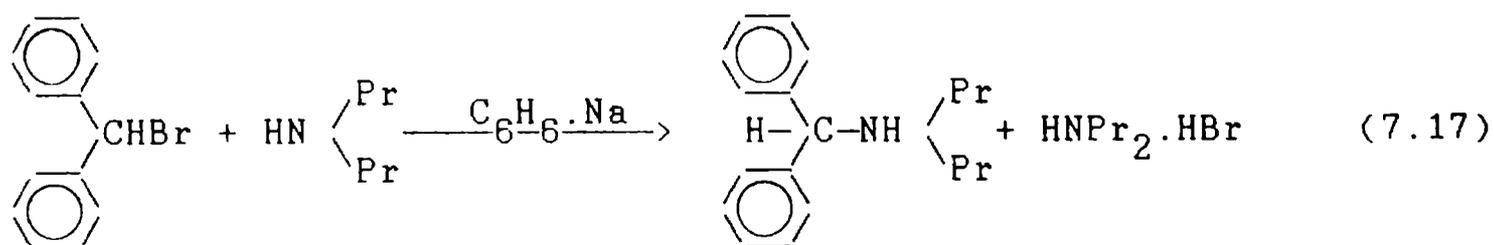


Agregando 10 ml de Et₂O s/NaOH y pasando corriente de HCl(g) se separa un sólido (ec. 7.16) que se filtra y seca en tambor a peso constante. El producto crudo se purificó por columna de SiO₂ (Kieselgel 100, 70-230 mesh) 80 veces el peso de la muestra, eluyendo con Cl₃CH-MeOH. Por reunión de fracciones analizadas por cromatografía en capa fina de SiO₂ se obtuvo un producto que se cristalizó en C₆H₆. Rto:73%. pf= 258-6^oC(H₂O). Lit.=261-263^oC [210].

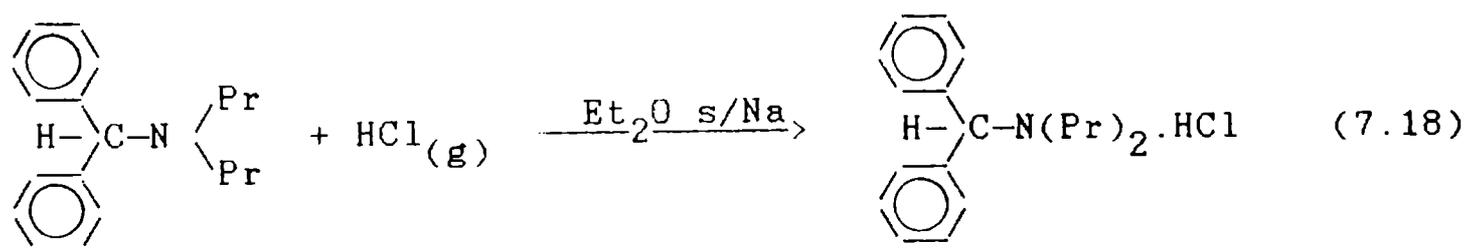


v) N,N- Dipropilbencidrila (AB₂₂).

En forma semejante a la descrita en iv), por adaptación de la técnica de preparación del N,N-dietilderivado [AB₄], se obtiene N,N-dipropilbencidrila trabajando en benceno s/NaOH como medio de reacción, por reacción de bromuro de difenilmetano con N,N-dipropilamina (ec.7.17). El calentamiento a reflujo se conduce en este caso a 80-85°C durante 2 hs 30', llegando a 10°C en el enfriamiento posterior



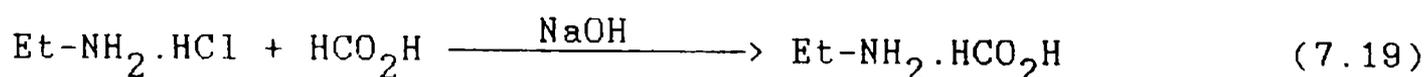
Se pasa corriente de HCl(g) seco directamente sobre la solución bencénica (ec.7.18). Rto :56%. Pf:174-178°C (C₆H₆). Remite erróneamente el Chemical Abstract, no figura en trabajo original (211). IR $\nu_{\text{N}^+} = 2950, 2450$ y varias bandas entre 2800 y 2000. ¹³C NMR δ 136,32 (C-4), 130,25 130,04 129,02 (C-1 C-2 C-3), 73,91 (C-N), 20,19 (C α), 17,02 (C β), 10,75 (C γ). (Espectro 4, apéndice).



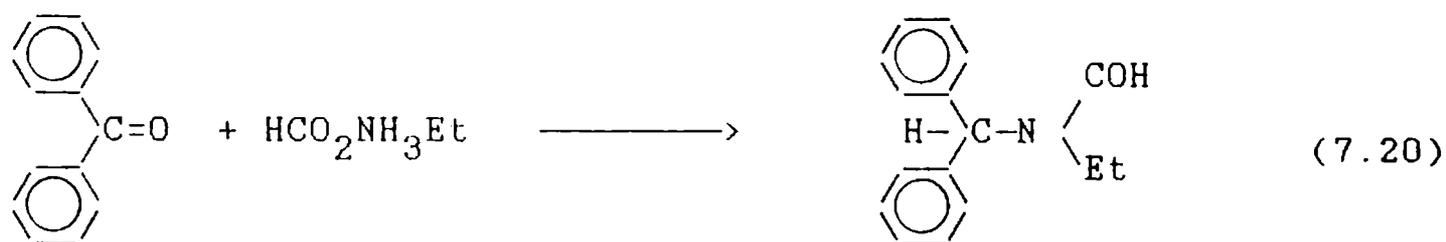
vi) N- Etilbencidrilamina (AB₂₇).

Se prepara según el método de Leuckart por reacción de benzofenona con formiato de etilamonio (formil etilamina) y posterior separación del clorhidrato por hidrólisis ácida (MeOH- HCl)

A 3,898 gr (48 mM) de clorhidrato de N-etilamina se agrega gota a gota 60 mM de OHNa 10 N, haciendo burbujear la etilamina generada en 2,76(60 mM) de ácido fórmico. Concluido el agregado de OHNa, la solución de fórmico-formiato de etilamina se calienta a ebullición (1 hr) y a 140-150°C (3 hs) (ec. 7.19)

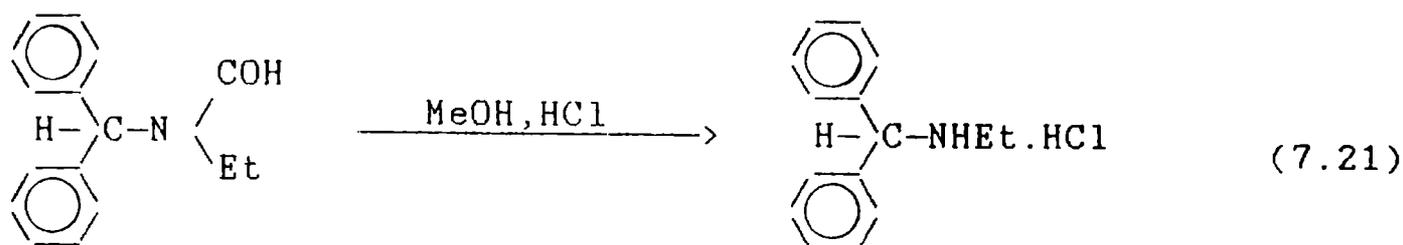


Se agregan 2 gr (11 mM) de benzofenona calentando a 140-150°C (3 hs) y 170-180°C (12 hs) controlando por TLC el progreso de la reacción (ec 7.20)



La posterior hidrólisis con MeOH-HCl, (calentamiento baño 78-80°C 24 hs) se controla también por TLC hasta fin de la reacción. Se agregan 15 ml Et₂O y solución de OHNa 2N a reacción alcalina (tornasol). La fase acuosa se separa y se extrae 2x5 ml Et₂O, secando luego los extractos etéreos reunidos con Na₂SO₄. Luego de concentrar a 2/3 de su volumen se pasa corriente de HCl(g) seco (ec.7.21). El sólido, separado por filtración, se seca en tambor a peso constante. Rto:56%. pf = 253-4°C (MeOH). Lit= 246-47°C [212].

¹³C NMR δ 136,76 (C-4), 130,01 129,80 128,44 (C-1 C-2 C-3) 66,42 (C-N) 42,86 (Cα), 11,00 (Cβ). (Espectro 5, apéndice).

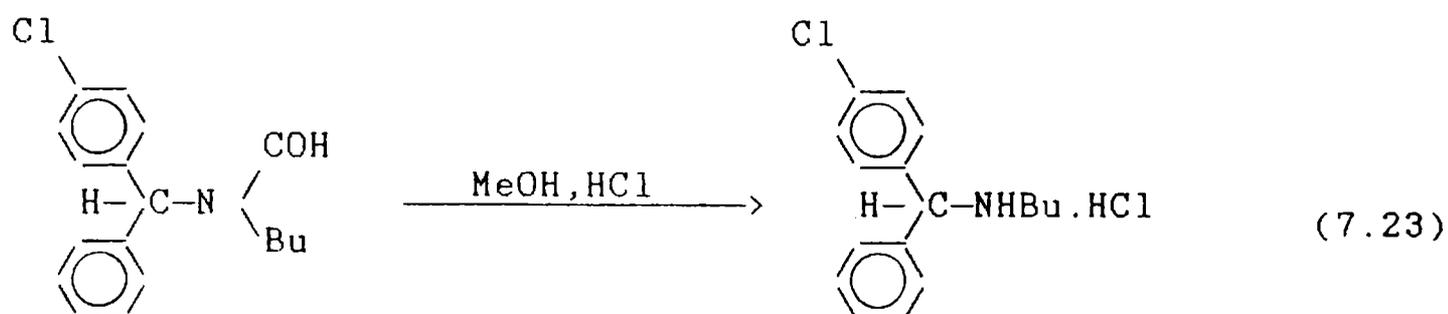
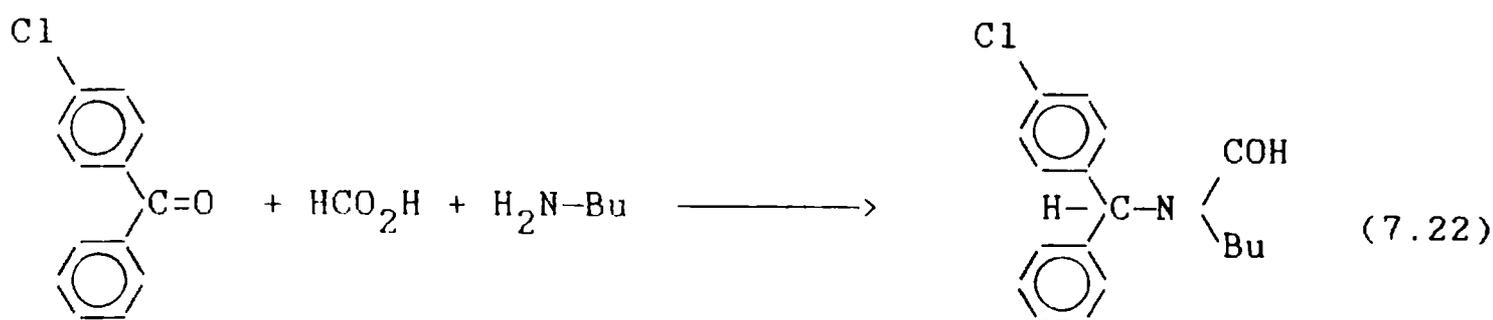


- c) Preparación de derivados 4-sustituídos N-sustituídos.

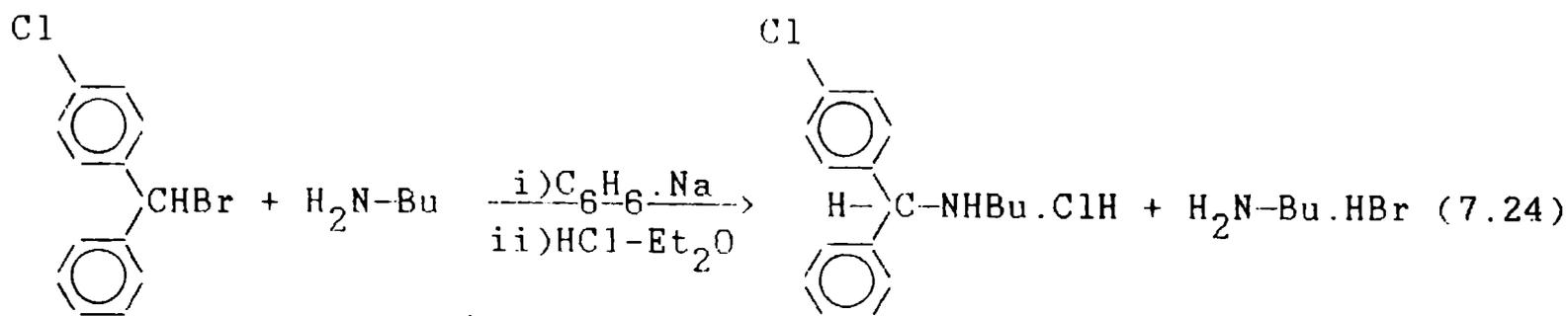
1) 4-Cloro-N-Butilbencidrilamina (AB₂₀).

Se ensayaron para la síntesis de este compuesto las dos vías generalmente usadas : método de Leuckart y reacción de la amina con bromuro de difenilmetano. Debido a la dificultad experimental asociada al manejo del clorhidrato de 4-cloro-N-butilbencidrilamina (aceite marrón) se obtuvieron mejores rendimientos empleando el segundo método.

La reacción de 5,415 gr (25 mM) de clorobenzofenona con la mezcla fría de 9,9 ml (100 mM) de N-butilamina y 150 ml (400 mM) de ácido fórmico separa un aceite marrón claro al enfriar a temperatura ambiente y agregar 30 ml de agua, luego de haberse calentado a reflujo (180°C, 48 hs) (agregando 15 ml adicionales de ácido fórmico a las 36 hs)(ec.7.22). Al volcar en 30 ml de H₂O se observa formación de aceite. Se separa fase acuosa y se agregan 20 ml MeOH (a solución límpida) y 15 ml HCl 6N. Se calienta a reflujo (80-85°C) adaptando agitación magnética y agregando a las 24 y 36 hs. 3 ml de HCl conc. Se enfría a 10°C, separa por filtración al vacío y seca en tambor (producto pastoso). Se agregan 20 ml Et₂O, alcaliniza con OHNa 12%, extrae 2x8ml Et₂O, seca con Na₂SO₄ anh. y pasa corriente de HCl(g). Se separa un aceite el cual, controlado por TLC indica la presencia de 4 productos (ec.7.23).

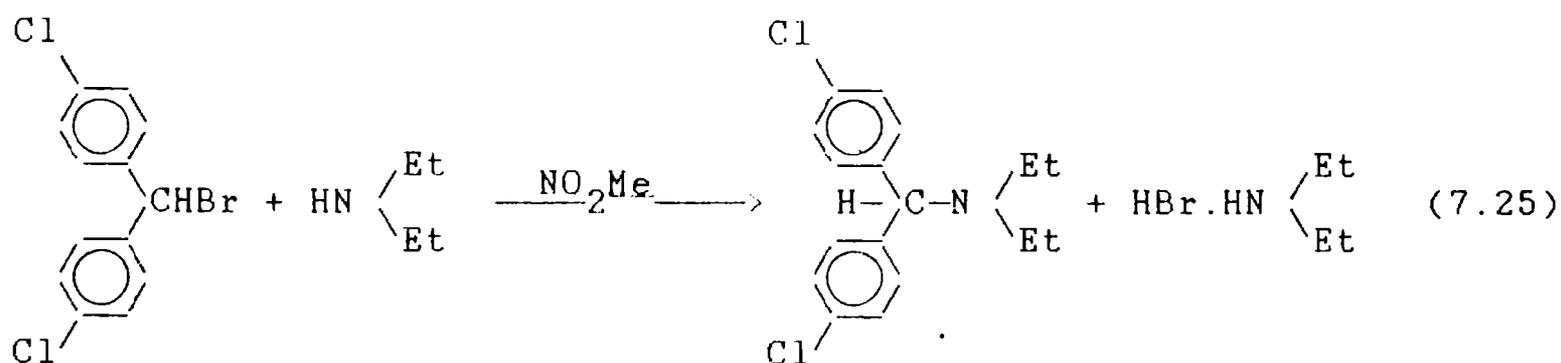


La reacción de alquilación de la amina se efectuó en forma semejante a la detallada en b-iv), por reacción de una solución de 7,7 mM (2,159 gr) de Bromuro de 4-Clorobencidrilo en 3 ml de C_6H_6 s/OHNa con una solución de N-butilamina en 5 ml de C_6H_6 s//OHNa agregada gota a gota sobre la primera. Luego de calentar a reflujo 12 hs se separa un sólido al enfriar (probable bromhidrato de N-butilamina). Se extrae 2x5ml Et_2O , reúnen extractos orgánicos, lava 1x10 ml H_2O y seca con Na_2SO_4 anh. Concentra en evaporador rotatorio al vacío y seca en tambor a peso constante. Agrega 15 ml Et_2O y pasa corriente de $\text{HCl}(\text{g})$ seco. El sólido formado se filtra y seca. Rto: 71%. Pf.=231-232,5°C (MeOH- Et_2O) (ec.7.24). IR ν_{NH^+} =2900 y varias bandas entre 2800 y 2000. ^{13}C NMR δ 136,29 (C-Cl), 135,68 153,55 (C-4), 130,31 130,03 128,51 (C-3), 66,04 (C-N), 47,60 (C α), 28,44 (C β), 20,46 (C γ), 13,41 (C δ). (Espectro 6, apéndice).

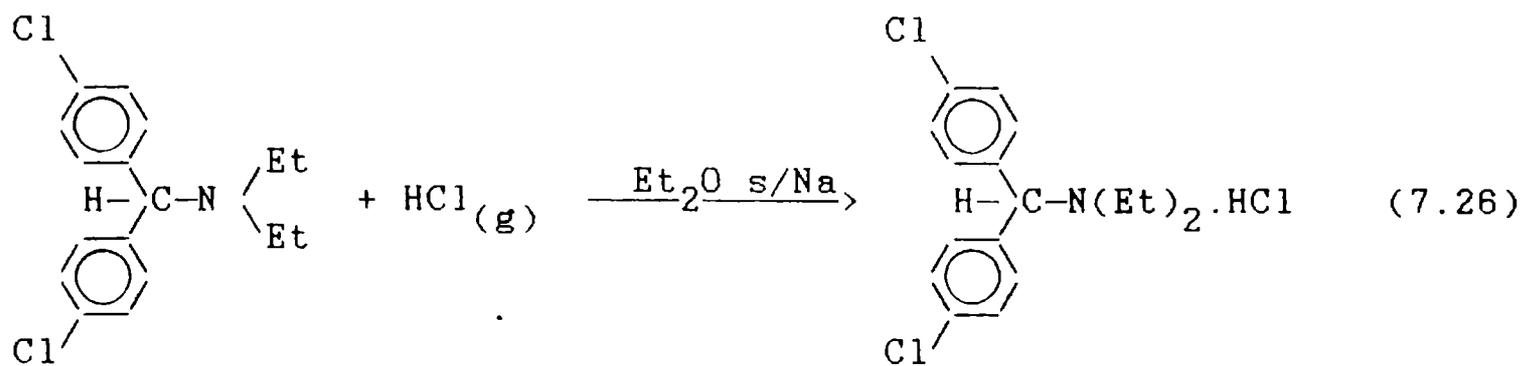


ii) 4,4'-Dicloro-N,N-Dietilbencidrilamina (AB₃₀).

Se prepara según técnica no descripta en la literatura, semejante a la detallada en b-iv), por reacción del bromuro de 4,4'-diclorobencidrilo con dietilamina en nitrometano (ec.7.25). Luego del calentamiento lento (90°C, 1,5h, 100-110°C, 2 hs) se separa sólido al enfriar a 0°C



El clohidrato (sólido blanco) precipita por pasaje de HCl(g) sobre la solución etérea (ec.7.26) Rto: 89,78%. pf.= 245-6°C (MeOH). IR ν_{N^+} = 2900 y varias bandas entre 2800 y 2000. ¹³C NMR δ 136,08 (C-Cl), 134,74 (Cipso), 130,71 130,41 (C-2 C-3), 71,33 (C-N), 46,11 (C α), 8,02 (C β). (Espectro 7, apéndice).

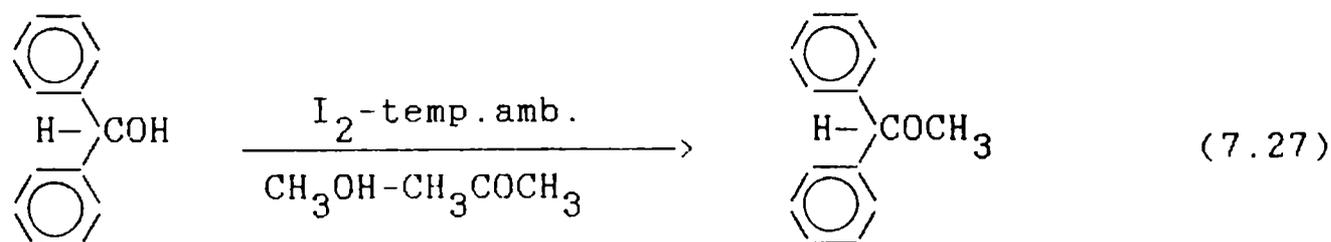


- d) Ausencia de la porcion estructural $\text{>C-N} \begin{array}{l} \text{R} \\ \text{R}' \end{array}$.

i) Bencidrilmetileter (AB₆).

Se ensayaron dos técnicas de preparación por metilación del bencidrol.

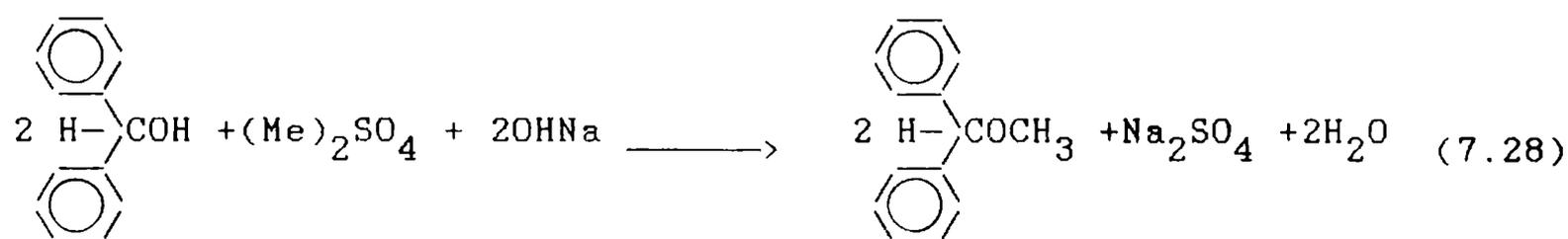
Tratando 500 mgr (2,7 mM) de bencidrol con 1,6 ml de metanol, 1,6 ml de acetona y 0,483 gr (1,9 mM) de I₂ se obtiene una solución marrón luego de 1 semana de agitación a temperatura ambiente [213] (ec 7.27). El final de al reacción se controló por TLC.



La solución se vuelca sobre una solución fría de 1,65 gr (10 mM) de tiosulfato de Na en 16,5 ml de agua (controlando por TLC final de reacción), se extrae 4x1,5 ml de cloroformo, se seca (Na₂SO₄anh.) concentra al vacío (evaporador rotatorio) y seca en desecador a peso constante. Rto :59,11%. P.eb./17=147-8°C. Lit.P.eb./17= 147-9°C [213].

Una muestra preparada en la misma forma se purificó por columna cromatográfica de SiO₂ (Kieselgel 100, 70-230 mesh) 100 veces, eluyendo con C₆H₆. Se reunieron las fracciones de igual R_F. El espectro IR no presenta banda N-H.

El mismo producto puede obtenerse agregando lentamente, desde ampollas adaptadas a un balón de tres bocas con refrigerante a reflujo 60 mM de OHNa 40% y 30 mM de sulfato de metilo sobre una solución de 32,99 gr (10mM) de bencidrol en 15 ml de acetona anh., calentando a 50°C durante el agregado y la hora posterior (ec. 7.28)



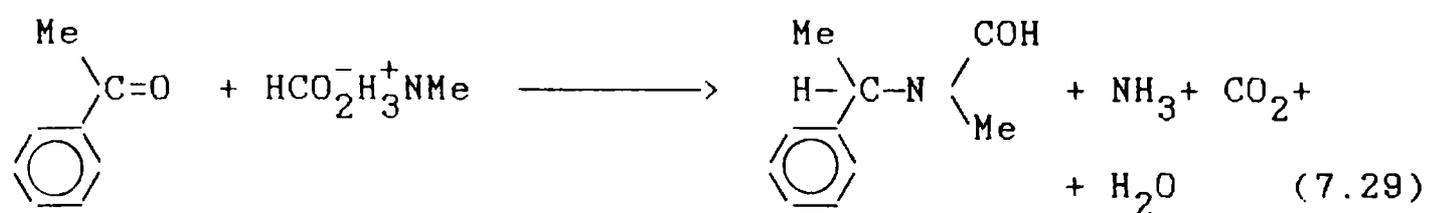
Luego de eliminar la acetona por destilación se separan las fases, lavando la fase acuosa con 4x5ml de diclorometano. Los extractos orgánicos reunidos se secan con Na₂SO₄ anh. y, luego de concentrar al vacío (evaporador rotatorio), se seca en tambor a peso constante. Rto: 35%. P.eb./17mm = 147-8°C.

Se comparan por TLC los productos obtenidos por ambos procedimientos

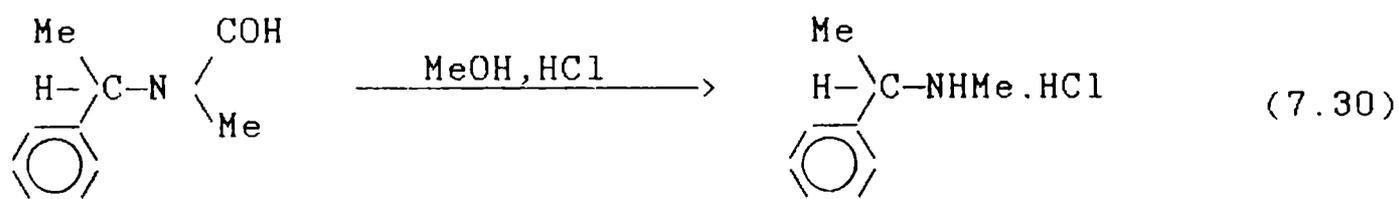
- e) Ausencia de un resto fenilo.

i) N-metil-α-metilbencilamina (AB₂₄).

El método de Leuckart conduce a la obtención de N-formil-N-metil-α-metilbencilamina por reacción de 0,9 ml (8 mM) de acetofenona (Polack y Schwartz) con 60 mM de formiato de N-metilamonio generado in situ (ec. 4.3.12), calentando con agitación a 140-150°C (12 hs) 180-190°C (6 hs) y enfriando (10°C) luego de volcar en 5 ml de agua (ec.7.29)



El producto obtenido se calienta a reflujo 2 hs luego de agregar 3 ml de MeOH y 1 ml de HCl 6N (ec. 7.30). Se concentra en evaporador rotatorio y seca en tambor desecador a peso constante. Rto:12%. Pf.= 174-5°C (EtOH). Lit.= 173°C [214]



7.3.3. - Determinación de la actividad antiespasmódica

Siguiendo el procedimiento detallado en el Capítulo V se determinó la actividad antiespasmódica de este nuevo conjunto de derivados, correspondiendo los valores encontrados a los reportados en la tabla 7.3.

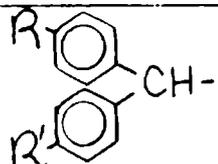
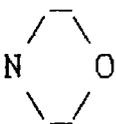
	R	R'	pD_2'	n
BB ₆	NH ₂	Cl	4,30 $\bar{+}$ 0,047	7
AB ₁₂	NHC ₆ H ₁₃	H	4,58 $\bar{+}$ 0,055	9
AB ₁₃	NHC ₆ H ₁₁	H	no activo	6
AB ₁₈		H	3,80 $\bar{+}$ 0,080	7
AB ₂₁	NHBu	H	4,52 $\bar{+}$ 0,080	7
AB ₂₂	NPr ₂	H	4,17 $\bar{+}$ 0,076	6
AB ₂₇	NHEt	H	4,50 $\bar{+}$ 0,069	8
AB ₂₀	NHBu	Cl	4,96 $\bar{+}$ 0,070	8
AB ₃₀	NEt ₂	Cl	4,20 $\bar{+}$ 0,030	6
AB ₆	OMe	H	3,70 $\bar{+}$ 0,085	9

Tabla 7.3.- Actividad antiespasmódica, expresada como pD_2' para los elementos del conjunto de derivados analizados en la etapa de optimización del líder. n= número de ensayos.

Algunos elementos , tanto de ste conjunto como del inicialmente analizado (familia de congéneres), presentan un centro quiral en su estructura. Los compuestos sintetizados en los casos correspondientes consisten, por lo tanto, en una mezcla racémica. No se abordó el problema de la separación de los enantiómeros, ya que sólo interesa, en esta etapa de la investigación, el conocimiento de la actividad asociada al producto sintetizado, vale decir, al racemato. Esto no implica en modo alguno la negación del conocimiento de que los distintos isómeros pueden estar caracterizados por una distinta potencia biológica.

7.4 - ANÁLISIS DEL CONJUNTO DE DERIVADOS DE LA BENCIDRILAMINA QUE CONSTITUYEN LA FAMILIA FARMACOLÓGICA.

A pesar de que su valor no se reporta en la Tabla 7.3, dado que finalmente no se tuvieron en cuenta como elementos de conjunto alguno analizado, los formilderivados (BB_1 [131] y AB_9 [134]) se ensayaron también en su actividad antiespasmódica, ya que su aislamiento constituye una etapa intermedia en la liberación de la amina correspondiente (BB_2 , AB_{10}) por hidrólisis ácida. Como era dable esperar, en base a las conclusiones derivadas del análisis mecanocuántico, debido al carácter desactivante del grupo formilo, la actividad antiespasmódica es menor que la de los clorhidratos de las aminas correspondientes. El bajo valor encontrado es además adjudicable a su baja solubilidad en agua.

El compuesto líder de la familia de congéneres se caracteriza por la presencia de grupos que, en su efecto total, aumentan la disponibilidad del par de electrones ubicado sobre el Nitrógeno del grupo amino. Este efecto podría también lograrse por 4-metil sustitución. La comparación de BB_8 y BB_2 ó AB_{16} y AB_{10} indica que ésta parece modificar relativamente poco la actividad. En

consecuencia, la mayor potencia biológica de AB_{28} que AB_{16} no parece originarse en el ingreso de un tercer grupo. Vale decir, no es de esperar actividad comparable en la 4,4'-dimetil-N-metilbencidrilamina.

El análisis químico cuántico (fig. 6.17) indicaba una potenciación más efectiva de la actividad antiespasmódica por sustitución en para del anillo aromático que por N-sustitución. Lo mismo deriva de la comparación de los valores de $\log P$ de BB_8 y AB_{10} . Sin embargo, sus valores de actividad no traslucen esta premisa. Siendo más efectiva la sustitución en 4-aril, el grupo metilo no parece ser el activante más adecuado para el logro de la actividad deseada. La evaluación de la 4-clorobencidrilamina (tabla 7.3) permite asociar a la presencia de dos átomos de cloro la marcada potencia antiespasmódica de la AB_{28} .

Asociando un $\Delta pD'_2 = 0,7$ a cada átomo de Cloro entrante en posición 4 y 0,6 por metilo en N-sustitución, la actividad del AB_{28} no se desvía mucho de la que sería predecible en base a un principio de aditividad. Esto no se concluye de la comparación de BB_6 , AB_{20} y AB_{21} . Los efectos de aditividad sólo son postulables en relación a grupos pequeños cuya modificación de actividad asociada no esté sujeta a requerimientos conformacionales.

La comparación de AB_{10} , AB_{21} y AB_{12} demuestra que, para cadenas lineales, la actividad aumenta inicialmente con la longitud de la cadena pero, a pesar de que el parámetro hidrofóbico predice lo contrario, alcanza un valor límite para una longitud de 4 a 6 átomos en la cadena hidrocarbonada. La inhibición parcial de la actividad por ciclación de la cadena de 6 átomos confirma el efecto estérico postulado para los casos de disustitución sobre el Nitrógeno. Esta disustitución está cuantificada por un valor elevado de $\log P$ que no se correlaciona con el aumento de la actividad. Intentando una cuantificación de este efecto se magnificó el efecto de grupos voluminosos (AB_{22}), resultando también estéril la introducción de activadores en posición para para su atenuación (AB_{30}).

El análisis químico cuántico tendía a asignar particular importancia al grupo $>C\begin{matrix} H \\ \diagdown \\ N < \end{matrix}$. Con la intención de comprobar su relevancia, se sustituyó el grupo amino con formación del metil éter. La estructura resultante (AB_6) no es inactiva. Sin embargo, la actividad determinada para ella (tabla 7.3) no es correlacionable con ninguno de los parámetros analizados y, en consecuencia, su actividad antiespasmódica debe ser resultado de otro mecanismo de interacción. El comportamiento antiespasmódico analizado está, en consecuencia, asociado a la presencia del grupo previamente mencionado y las modificaciones introducidas deben tender a la variación de sus características electrónicas.

La importancia de la presencia de dos grupos fenilo, que se hace evidente en la falta de actividad del AB_{24} , se asocia a los requerimientos conformacionales que se logran por una disposición estereoespacial adecuada de los 2 anillos planos, la cual se encuentra impedida por la sustitución por un grupo metilo. Esta disposición estereoespacial responde, dentro de las variaciones inherentes a la introducción de los distintos sustituyentes, a una cuasi-ortogonalidad de los anillos bencénicos.

En los compuestos presentados se ha trabajado, sin excepción, sobre modelos abiertos, vale decir, ninguna modificación ensayada lograba que el Nitrógeno amínico formara parte de un ciclo fusionado a uno de los restos fenilo. Los modelos que se obtendrían por esta vía de modificación estructural se conocen como modelos cerrados. La metodología de comparación de la actividad del modelo cerrado en oposición a la de su modelo abierto correspondiente (*modelo abierto vs modelo cerrado*) permite determinar la importancia de la flexibilidad del esqueleto molecular, asociable a la posibilidad de adquirir la conformación adecuada en el momento de la interacción. En relación a la serie aquí presentada, se sintetizó el clorhidrato de 4-feniltetrahidroisoquinoleína, modelo cerrado correspondiente a la N-etilbencidrilamina (AB_{27}). La menor actividad antiespasmódica de este compuesto ($pD_2 = 3,8 \pm 0,082$) demuestra:

- la necesaria disponibilidad del par de electrones ubicado sobre el átomo de Nitrógeno de la porción amínica, previamente comentada,

la existencia de una conformación óptima, determinada principalmente por la orientación relativa de los planos definidos por los anillos bencénicos, para el logro de una interacción efectiva con el sitio específico.

El análisis de las tablas 7.1, 7.3 muestra que la relación inicial obtenida, expresable por una dependencia lineal de la actividad antiespasmódica con el parámetro hidrofóbico $\log P$, no es extrapolable al conjunto completo. Sin descartar la validez de este descriptor, contando ahora con un mayor número de parámetros, se reevalúa la dependencia funcional que lo vincula a la actividad biológica ensayada. El nuevo análisis estadístico, abarcando ahora mayor número de valores, demuestra que éste sigue siendo el mejor parámetro descriptor, pero el comportamiento se ajusta en realidad a un clásico modelo bilineal [184; 187] (ec. 7. 31) (fig.7.1)

$$pD'_2 = 7,613 (\pm 0,94) \log P - 7,61 (\pm 1,94) \log (\beta P + 1) \quad (7.31)$$

$$n=19, \quad r=0,932, \quad s=0,425 \quad F=32,93$$

$$\beta = 1,775$$

La dependencia encontrada manifiesta claramente que no sólo efectos hidrofóbicos intervienen en la determinación de la actividad. Dejando de lado los efectos electrónicos, extensamente discutidos en relación a los cálculos de los parámetros químico-cuánticos, surgen también como condicionantes los factores estéricos, que influyen no sólo por el no logro de una interacción efectiva a través de un efecto de volumen, sino también a través de impedimentos rotacionales que restringen el logro de la conformación asignable a la *estructura activa*.

7.5 - DISCUSIÓN DE LA ACTIVIDAD LOGRADA EN LA ETAPA DE OPTIMIZACIÓN.

Luego de la nueva racionalización de la dependencia de la actividad antiespasmódica con descriptores moleculares, que indica una dependencia bilineal de ésta con el parámetro hidrofóbico $\log P$, debe decidirse, en base a algún criterio práctico, si se debe seguir trabajando sobre el mismo conjunto en busca de una estructura más activa. Dos criterios empleados simultáneamente deben guiar esta decisión:

* la observación de que se han logrado modificaciones estructurales de peso suficiente para que la actividad biológica asociada haya logrado, en alguna de las estructuras, su valor máximo,

* la observación de que, al diseñar un segundo o, en general, un nuevo conjunto en base a la racionalización del comportamiento del anterior, no se revelan nuevos factores (características estructurales, propiedades fisicoquímicas) cuya modificación pueda relacionarse con un nuevo logro en el cambio de la actividad.

El modelo bilineal que describe el comportamiento del conjunto analizado, habiéndose logrado en uno de los elementos del conjunto la representación del máximo de la curva (AB_{28} , Fig.7.1), indica que nuevas modificaciones estructurales no lograrán una potenciación de la actividad trabajando sobre este esqueleto base .

Podrían diseñarse nuevas modificaciones pero su análisis nos introduciría, con seguridad, en una nueva familia de congéneres, diferenciable de la estudiada en este trabajo.

Debe tenerse en cuenta que, a partir de la estructura inicial (prototipo activo, BB_2), se ha logrado un aumento de la actividad, expresable como pd'_2 , superior al 50%, lo que implica que se requiere una concentración 100 veces menor de droga (AB_{28}) para el logro de la misma respuesta.

- CAPITULO 8 -

- CONCLUSIONES -

Aunque en algunos casos el descubrimiento de una nueva droga puede provenir de un resultado azaroso, el diseño de una nueva estructura química que responda a una actividad deseada ha demostrado la necesidad de un trabajo metódico, del cual no pueden excluirse conocimientos básicos de síntesis orgánica, relaciones fisicoquímicas y consideraciones estadísticas, resultando además imprescindible el conocimiento de los mecanismos de acción asociados a las distintas actividades biológicas. De este último conocimiento podría prepostularse, ya desde el inicio de la investigación, la importancia de los efectos hidrofóbicos en la determinación de la actividad, dada la característica interacción lipídica de los antagonistas no competitivos.

Luego del análisis de la serie se concluye que el efecto hidrofóbico participa en la descripción de la interacción de los derivados de la Bencidrilamina en el sitio receptor, sin ser, de ninguna manera, el único efecto que condiciona ésta, según lo manifiesta el cálculo químico-cuántico al destacar la importancia de los efectos electrónicos y la porción descendente de la curva bilineal (Fig.7.1) que esboza el aporte simultáneo de efectos estéricos a la determinación de la actividad medida. La fuerza de estos efectos estéricos se manifiesta principalmente en los requerimientos estructurales necesarios para el logro de la conformación adecuada para una interacción efectiva con el sitio receptor. La comparación modelo abierto-modelo cerrado (pag.178) confirma la importancia de la existencia de esta conformación.

Para la serie de compuestos analizada no se puede enfatizar la mayor importancia de alguno de los efectos discutidos frente a otro en la definición de su actividad. No se puede asociar, en consecuencia, la interacción que conduce a la manifestación de actividad a una interacción hidrofóbica (dependiente de la naturaleza química de las sustancias) o electrónica (dependiente de la

distribución electrónica de quienes interactúan). Ambos efectos están presentes , condicionados en su eficiencia por requerimientos estructurales, cuantificables a través de parámetros estéricos.

*Si el mundo fenomenico requiere una explicacion
ella tiene que ser causal;
tiene que ser explicado
como una produccion o efecto
que requiere una causa
para llegar a ser lo que es.*

Emilio Estiu

-Bibliografía-

- 1.- K.R. Freter,
Phar. Res. 5 (7) (1988) 397.
- 2.- C. Hansh,
"Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design".
en : *Drug Design, Vol. I.* E.J. Ariens (ed.), Academic Press, New York, 1971. Capítulo 2, pag. 271.
- 3.- S.V. Nizhniy N.A. Epshtein,
Russian Chem. Rev. 47 (4) (1978) 383.
- 4.- T. Fujita,
Acta Pharm. Jugosl. 37 (1987) 43.
- 5.- C. Hansch,
Drug Inf. J. 18 (1984) 115
- 6.- Y.C. Martin, W.B. Martin y J.D. Taylor,
J. Med. Chem. 18 (1975) 883.
- 7.- C. Hansch, M. Yoshimoto y M.H. Doll,
J. Med. Chem. 19 (1976) 1068
- 8.- K. Mitani, S. Sakurai, T. Suzuki, K. Morikawa,
E. Koshinaka, H. Kato, Y. Ito y F. Toshio,
Chem. Pharm. Bull 36 (10) (1988) 4103.
- 9.- T. Fujita
en *Drug Design: Fact or Fantasy.* G. Jolles y K.R.H. Wooldrige (eds), Academic Press, New York, 1984.

- 10.- A. J. Hopfinger,
J. Am. Chem. Soc. 102 (1980) 7196.
- 11.- T. Fuyita,
Acta Pharm. Jugosl. 37 (1987) 43.
- 12 - R. Shimizu, H. Iwamura y T. Fuyita,
J. Agric. Food. Chem. 36 (6) (1988) 1276.
- 13.- A. Crum-Brown y T. Frazer,
Trans. Roy. Soc. Edimburgh, 25 (1968-1969) 151.
- 14.- Y. C. Martin,
Quantitative Drug Design. A Critical Introduction.
Marcel Dekker Inc., 1978.
- 15.- R. Franke,
Theoretical Drug Design Methods, Vol.7,
Pharmacochemistry Library, W.Th. Nauta y R.F.
Rekker (Eds.). Elsevier, 1984.
- 16.- J.K. Seydel ,
Physicochemical Approach to the Rational Development of
New Drugs.
en *Drug Design, Vol.1.* E.J. Ariens (ed.). Academic Press,
New York, 1971 Capitulo 3.
- 17.- A.J. Wöhrh,
"A Molecular Orbital Approach to Quantitative Drug
Design".
en *Drug Design Vol.1.* E.J. Ariens (ed.). Academic
Press, New York, 1971 . Capitulo 4.

- 18.- *Physical Chemical Properties of Drugs*.
S.H. Yalkowsky, A. A. Sinkula y S.C. Valvani (eds.),
Marcel Dekker, New York, 1980.
- 19.- V. Austel y E. Kutter,
"Practical Procedure in Drug Design"
en *Drug Design, Vol X*. E.J. Ariens (ed.). Academic
Press, New York, 1980. Capitulo 1.
- 20.- P.P. Moger,
*Multidimensional Pharmacochemistry. Design of Safer
Drugs*. Academic Press Inc., New York, 1984.
- 21.- K.C. Chu,
"The Quantitative Analysis of Structure-Activity
Relationships"
en: *Burger's Medicinal Chemistry*, M.E. Wolff (ed.)
John Wiley & Sons, 1980. Parte I, Capitulo 10.
- 22.- P.M. Craig,
"Guideling for Drug and Analog Design"
en: *Burger's Medicinal Chemistry*, M.E. Wolff (ed.),
John Wiley & Sons, New York , 1980. Parte I, Capitulo 8.
- 23.- A. Sinpks,
Chemistry and Industry 12 (1973) 885.
- 24.- D.A. Mattews y J. Kraut,
Nachr. Chem. Techn. 23 (1975) 52.
- 25.- W. Dench,
Association of the British Pharmaceutical Industry News
185 (1981) 5.

- 26.- M.C. Cohen, J.M. Blaney, C. Humblet, P.Gund y D.C. Barry
J. Med. Chem. 33 (3) (1990) 883.
- 27.- C. Hansch,
J. Chem. Educ. 51 (1974) 360.
- 28.- E.J. Ariens,
"Drug Design"
en *Drug Design. Vol.1.* E.J. Ariens (ed.). Academic
Press, New York, 1971 . Capítulo 1.
- 29.- J. Hoover y G.L. Dunn,
"The β -lactam Antibiotics"
en: *Burger's Medicinal Chemistry*, M.E. Wolff (ed.),
John Wiley & Sons, New York , 1979, Capítulo 15.
- 30.- L.H.C. Lunts,
"Salbutamol : A selective β_2 Stimulant Bronchodilator
en *Medicinal Chemistry. The role of the Organic
Chemistry in Drug Research.* S.M. Roberts y B.J.Price
(eds.). Academic Press, 1985, capítulo 4.
- 31.- F.J. Zeelen,
"Steroid Contraceptives"
en *Medicinal Chemistry. The role of the Organic
Chemistry in Drug Research.* S.M. Roberts y B.J.Price
(eds.). Academic Press, 1985, capítulo 10.
- 32.- T. Struller,
Progr.Drug. Res. 12 (1968) 389.
- 33.- L.K. Low y N. Castagnoli,
"Drug Biotransformations"
en: *Burger's Medicinal Chemistry*, M.E. Wolff (ed.),
John Wiley & Sons, New York , 1979, Capítulo 3.

- 34.- G. Jolles y K.R.H. Wooldridge,
en *Drug Design: Fact or Fantasy*. G. Jolles y K.R.H
Wooldrige (eds.), Academic Press, New York, 1984.
- 35.- B.V. Rama Sastry,
"Anticholinergics Antispasmodic and Antiulcer Drugs"
en: *Burger's Medicinal Chemistry*, M.E. Wolff (ed.),
John Wiley & Sons, New York ,parte III, 1981, Cap. 44.
- 36.- R.H. Thorp,
Proc. Int. Congr. Pharmacol. 3 (1970) 133.
- 37.- D.R. Holland, M.I. Steinberg y W. Armstrong,
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148 (1975) 1141.
- 38.- D.J. Triggle y R.A. Jarris,
"Calcium Antagonists and Ionofores"
en: *Calcium and Contractility*, A.K. Grover y E.E.Daniel
(eds.), Humana Press, Clifton, New Yersey, 1985,
capítulo 3.
- 39.- T. Godfranal y R.C. Miller,
"Mechanisms of smooth muscle relaxation"
en: *Calcium and Contractility*, A.K. Grover y E.E.Daniel
(eds.), Humana Press, Clifton, New Yersey, 1985,
capítulo 4.
- 40.- H. Karaki,
J. Pharm. Methods 18 (1987) 1

- 41.- D. Lednider y L.A. Mitscher,
en: *The Organic Chemistry of Drug Synthesis*.
John Wiley & Sons, New York
a) 1 (1977) capítulo 4
b) 2 (1980) capítulo 2
- 42.- R.A. Jarris y D.J. Triggle,
J. Med. Chem. 26 (6) (1983) 777.
- 43.- T. Godfraind,
Federation Proc. 4Q (1982) 2866
- 44.- T. Godfraind,
J. Pharmacol. Exp. Theor. 224 (1983) 443.
- 45.- S.B. Boström, B. Ljung, S. Mardh, S. Forsen y E. Thulin,
Nature 292 (1981) 777.
- 46.- T.B. Bolton,
Physiol. Revs. 59 (1979) 606
- 47.- P.M. Epstein, K. Firs, R. Hachisu y D.M. Adrenyak,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 105 (1982) 1142
- 48.- S.F. Flaim y R. Zelis (eds.),
Calcium Blockers Mechanism and General Implications.
Urban and Schwarzenberg, Baltimore and Munich, 1982.
- 49.- U. Quast y N.S. Cook,
J. Pharmacol. Exp. therap., en prensa.
- 50.- R.M. Levin y B. Weiss,
J. Pharmacol. Exp. Ther. 208 (1979) 454

- 51.- J.A. Norman, A.H. Drummond y P. Moser,
Mol. Pharmacol. 16 (1979) 1084
- 52.- B. Weiss, W.C. Prozialek y T.L. Wallace,
Biochem. Pharmacol. 31 (1982) 2217
- 53.- B. Roufogalis,
Calcium Cell Funct. 1 (1980) 330.
- 54.- G.B. Weiss (ed.),
New Perspectives Calcium Atagonists
American Physiological Society, Bethesda, MI 1981
- 55.- R.G. Rahwan y D.T.Witiak (eds.),
Calcium Regulation by Calcium Antagonists
American Chemical Society, Washington DC, 1982.
- 56.- R.C. Kowalsky y C.F. Bender,
J. Am. Chem. Soc. 94 (1972) 5632
- 57.- J.G. Topliss,
J. Med. Chem. 15 (1972) 1006
- 58.- J.G. Topliss,
J. Med. Chem. 20 (1977) 463
- 59.- J.G. Topliss y Y.C. Martin,
en : "Utilization of Operational Schemes for Analog
Synthesis in Drug Design".
Drug Design, Vol.5. E.J. Ariens (ed.). Academic Press,
New York , 1975.
- 60.- P. N. Craig,
J. Med. Chem. 14 (1971) 680

- 61.- J.E. Leffer y E. Grunwald,
Rates of Equilibria in Organic Reactions
Wiley, New York, 1963.
- 62.- C.Hansch y T. Fuyita,
J. Am. Chem. Soc. 86 (1964) 1616.
- 63.- A. Verloop
The Use of Linear Free Energy Parameters and Other
Experimental Constants in Structure-Activity Studies.
en *Drug Design, Vol.3*. E.J. Ariens (ed.). Academic Press,
New York, 1972 Capitulo.2
- 64.- Y.C. Martin,
J. Med. Chem. 24 (1981) 229.
- 65.- Y.C. Martin,
Advances in the Methodology of Quantitative Drug Design
en *Drug Design, Vol.8*. E.J. Ariens (ed.). Academic
Press, New York, 19// . Capitulo.???
- 66.- R. Franke,
Acta Biol. Med. Germ.25 (1970) 757
- 67.- A. Leo, C. Hansch y D. Elkins,
Chem. Rev. 71 (1971) 525.
- 68.- C. Hansch y A. Leo,
*Substituent Constants for Correlation Analysis in
Chemistry and Biology*. Wiley, New York, 1979.
- 69.- T.Fuyita, J. Iwasw y C. Hansch,
J. Am. Chem. Soc. 36 (1964) 5175

- 70.- C. Hansch, A. Leo, S. Unger, K.H. Kim, D Nikaitani y E.J. Lien,
J. Med. Chem. 16 (1973) 1207
- 71.- C. Hansch, S.D. Rockwell, P.Y.C. Jow, A. Leo y E.E. Steller,
J. Med. Chem. 20 (1977) 304.
- 72.- M.S. Tute,
Adv. Drug. Res. 6 (1971) 1.
- 73.- C. Hansch, a. Leo y D.Nikaitani,
J. Org. Chem. 37 (1972) 3090.
- 74.- A. Canas-Rodríguez y M. S. Tute,
Adv. in Chemistry Series 114 (1972) 41.
- 75.- G.L. Biagi, A.M. Barbaro y M.C. Guerra,
Adv. in Chemistry Series 114 (1972) 61.
- 76.- E. Tomlinson,
Methodol. Surv. Biochem. 7 (1978) 207.
- 77.- G.L. Biagi, A.M. Barbaro, O. Gondolfi, M.C. Guerra y G Cantelli,
J. Med. Chem. 18 (1975) 873
- 78.- J. Iwasa, T. Fuyita y C. Hansch,
J. Med. Chem. 8 (1965) 150
- 79.- M. Kuchar, V. Rejholec, B. Brunova y M. Jelinková,
J. Cromatogr. 195 (1980) 329.
- 80.- T. Yamana, A. Tsuji y E. Miyamoto,
J. Pharm. Sci. 66 (1977) 747.

- 81.- S.H. Unger, J.R. Cook y J.S. Hollenberg,
J. Pharm. Sci. 67 (1978) 1364.
- 82.- H. Terada,
Quant. Struct. Act. Relat. 5 (1986) 81.
- 83.- M.S. Mirless, S.J. Moulton, C.T. Murphy y P. Taylor,
J. Med. Chem. 19 (1976) 615.
- 84.- G.G. Nys y R. F. Rekker,
Chim. Theor. 8 (1973) 521.
- 85.- R.F. Rekker,
The Hydrofobic Fragmental Constant
en : Pharmacochimistry Library. W. Th. Nauta Y R.F.
Rekker (eds). Vol.1. Elsevier, Amsterdam, 1977.
- 86.- R.F. Rekker y H.M. de Kort,
Eur. J. Med. Chem. 14 (1979) 479.
- 87.- R. Franke,
Biological Activity and Chemical Structure. J. A.
Keverling Buisman (ed.) Pharmacochimistry Library. W
Th. Nauta Y R.F. Rekker (eds.). Vol.2. Elsevier,
Amsterdam, 1977.
- 88.- A. Leo, P.Y.C. Jow, C. Silipo y C. Hansch,
J. Med. Chem. 18 (1975) 865.
- 89.- L.P. Hammett,
J. Am. Chem. Soc. 59 (1937) 66.
- 90.- L.P. Hammett,
Trans. Faraday Soc. 34 (1938) 156.

- 91.- H.H. Jaffe,
Chem. Rev. 53 (1953) 191.
- 92.- Y. Yukawa, Y. Tsuno y M. Sawada,
Bull. Chem. Soc. Japan 39 (1966) 2274.
- 93.- M. Yoshioka, K. Hanamoto y T Kubota,
Bull. Chem. Soc. Japan 35 (1962) 1723.
- 94.- R. W. Taft,
J. Phys. Chem. 64 (1960) 1805.
- 95.- C. G. Swain y E.C. Lupton,
J. Am. Chem. Soc. 90 (1968) 4328.
- 96.- T. M. Krygowski y R.W. Fawcett,
Canad. J. Chem. 53 (1975) 3622.
- 97.- T. M. Krygowski y R.W. Fawcett,
J. Chem. Soc. Perkin II (1977) 2033.
- 98.- R. W. Taft,
en : *Steric Effects in Organic Chemistry*, M. S. Newman
(ed), Wiley, New York, 1956.
- 99.- E. Hückel,
Z. Physik., 70 (1931) 204.
- 100.- S.P.Me Glynn, L.G. Vanquickenborne, M. Kinoshita, D.G
Carroll.
Introduction to Applied Quantum Chemistry. Holt,
Rinehart & Winston Inc., 1972, USA.

- 101.- I. Levine,
Química Cuántica, Editorial AC, Madrid, España, 1977.
- 102.- Y. Shinagawa,
Int. J. Quantum Chem. Quantum Biology Symp. **1** (1976) 169.
- 103.- R. Hoffmann,
J. Chem. Phys. **39** (1963) 1397
- 104.- W.G. Richards, D.G. Aschman y J. Hammond,
J. Theoret. Biol. **52** (1975) 223
- 105.- H.D. Höltje y L.B. Kier,
J. Med. Chem. **17** (1974) 814.
- 106.- G.L. Estiú, R.E. Cachau, E.A. Castro y L.E. Bruno
Blanch,
Il Farmaco **45** (1990) 889.
- 107.- J.A. Pople y D.L. Beveridge,
Approximate Molecular Orbital Theory, Mc Graw-Hill Book
Co., USA, 1970.
- 108.- J.S. Gómez Jería y D.R. Morales Lagos,
J. Pharm. Sci. **73** (1984) 1725.
- 109.- J.S. Gómez Jería y D.R. Morales Lagos,
en; *QSAR in Design of Bioactive Compounds*.
M. Kuchar y J.R. Prous (eds.), Barcelona, 1985.
- 110.- J.S. Gómez Jería,
Int. J. Quant. Chem. **23** (1983) 1969.

- 111.- J.S. Gómez Jería, D.R. Morales Lagos, J.I. Rodríguez Gatica y J.C. Saavedra Aguilar,
Int. J. Quant. Chem. 28 (1985) 421.
- 112.- a) N.L. Allinger y J.T. Sprangue,
J. Am. Chem. Soc. 95 (1973) 3893.
b) N.L. Allinger, M.T. Tribble, M.A. Miller y D.H. Wertz,
J. Am. Chem. Soc. 93 (1971) 1637.
c) N.L. Allinger, M.T. Tribble y M.A. Miller,
Tetrahedron 28 (1972) 1173.
d) N.L. Allinger y J.T. Sprangue,
J. Am. Chem. Soc. 94 (1972) 5734.
- 113.- F.L. Pilar,
Elementary Quantum Chemistry, Mc Graw-Hill Book Co.,
USA, 1968.
- 114.- J.L. Linderberg y Y Ohrn,
Propagators in Quantum Chemistry, Academic Press,
Londres, 1973.
- 115.- A.T. Balaban, A. Chiriac, I. Motoc y Z. Simon,
Steric Fit in Quantitative Structure Activity Relations, Lecture Notes in Chemistry, Vol.15.
Springer Verlag, Berlin, 1980.
- 116.- R.W. Taft,
en : *Steric Effects in Organic Chemistry*. M.S. Newman
(ed.), Wiley, New York, 1956.
- 117.- M. Charton,
J. Am. Chem. Soc. 91 (1969) 615.

- 118.- M. Charton,
J. Am. Chem. Soc. 97 (1975) 1552.
- 119.- M. Charton,
Prog. Phys. Org. Chem. 8 (1971) 235.
- 120.- L.B. Kier, L.H. Hall, W.J. Murray y M. Randic,
J. Pharm. Sci 64 (1975) 1971.
- 121.- L.B. Kier,
en: *Physical Chemical Properties of Drugs*. A.A. Sinkula
y S.C. Valvani (eds). Marcel Dekker, New York, 1980.
- 122.- L.B. Kier y L.H. Hall,
Molecular Conectivity in Chemistry and Drug Research,
Academic Press, New York, 1976.
- 123.- S.M. Free y J.W. Wilson,
J. Med. Chem. 7 (1964) 395.
- 124.- A. Cammarata,
J. Med. Chem. 15 (1972) 573.
- 125.- H. Kubinyi y O.H. Kehrhahn,
J. Med. Chem. 19 (1976) 578.
- 126.- T. Fuyita y T. Ban,
J. Med. Chem. 14 (1971) 148.
- 127.- G.L.Kirschner y B.R. Kowalski,
en : *Drug Design, Vol. 8*. E.J. Ariens (ed.). Academic
Press, New York, 1979.

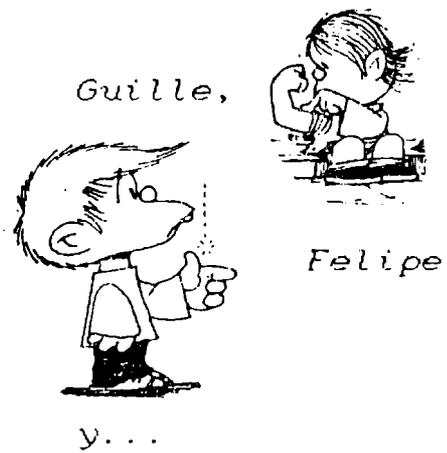
- 128.- P.C. Jurs, J.T.Chou y M. Yuan,
en: *Computer-Assisted Drug Design*. E.C. Olson y R.E.
Christofffersen (eds). ACS Symp.Series 112 (1979) 103.
- 129.- A.J. Stuper, W.E.Brugger y P.C. Jurs,
*Computer Assisted Studies of Chemical Structure and
Biological Function*. Wiley Interscience, New York,
1979.
- 130.- M. Randic,
J. Am. Chem. Soc. 97 (1975) 6609.
- 131.- CRC Handbook. *Organic Compound Identification*.
ZVI Rappoport. CRC Press Inc. 3rd. Edition. 1979.
- 132.- J.Kalamar y B. Ryban,
Chem. Zvesti 20 (1966) 79.
- 133.- S. Stanley, O. Winthrop, S.Sybulski, G. Gavin y G.A.
Grant,
J. Am. Chem. Soc. 79 (1957) 3496.
- 134.- H. Thies, H. Schönenberger y K. Borah,
Arch. Pharm.(Weinhein) 229 (1966) 1031.
- 135.- L. Semper y L. Lichteinstadt,
Ber. 51 (1918) 940.
- 136.- M. Sommelet,
Compt. Rend. 175 (1922) 1621.
- 137.- M.Protiva y O. Exner,
Chem. Lysty. 47 (1957) 1621.

- 138.- T.S. Stevens,
J. Chem. Soc. 1930 2107.
- 139.- A.H. Wragg, T.S. Stevens y .M. Ostwald,
J. Chem. Soc. 1958 4057.
- 140.- S.R. Sandler y W. Karo,
"Organic Functional Group Preparations" en : *Organic Chemistry*, A.T. Blonquist (ed.), Vol.12. Academic Press,
New York, 1968.
- 141.- R. Leuckart,
Ber. 18 (1885) 2341.
- 142.- A. Wallach,
Ann. 343 (1905) 54.
- 143.- A. Novelli,
J. Am. Chem. Soc. 61 (1939) 520.
- 144.- H. Milos,
Reductions in Organic Chemistry E. Horwood (ed). 1984.
- 145.- V.J. Webers y W. Bruce,
J. Am. Chem. Soc. 70 (1948) 142.
- 146.- J.F. Bunnett y J.L. Marks,
J. Am. Chem. Soc. 71 (1949) 1586.
- 147.- J.F. Bunnett, J.L. Marks y H. Moe,
J. Am. Chem. Soc. 75 (1953) 985.
- 148.- L.D. Quin y F.A. Schelbune,
J. Org. Chem. 30 (1965) 273.

- 149.- A.C. Cope, E. Ciganek, L.J. Fleckestein y M.A.P. Meisinger,
J. Am. Chem. Soc. 82 (1960) 4651.
- 150.- Ingersoll, Brown, Kim, Beauchamp y Jennings,
J. Am. Chem. Soc. 58 (1936) 1808.
- 151.- M.L. Moore,
Org. Reactions 5 (1949) 301.
- 152.- Crossley y Moore ,
J. Org. Chem. 9 (1944) 529.
- 153.- A. Vogel,
Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, 4^a
edición. Longman, New York, USA, 1978.
- 154.- Doevre y Courtais,
Bull. Soc. Chim. 11 (1944) 545.
- 155.- Davies y Rogers,
J. Chem. Soc. 126 (1944).
- 156.- Shive y Shive
J. Am. Chem. Soc. 68 (1946) 117.
- 157.- K.Nakanishi,
Infrared Absorption Spectroscopy. Nankodo Co, Tokio,
Japan, 1962.
- 158.- H.W. Gibson,
Chem. Rev. 69 (1969) 673.
- 159.- S.H.Pine y B.L.Sanchez,
J. Org. Chem. 36 (1971) 829.

- 160.- R. Leuckart,
Ber. 19 (1886) 2128.
- 161.- Ingersoll,
Organic Synthesis, Vol. II. J. Wiley & Sons, New York,
1943.
- 162.- Shiedt,
J.Prakt.Chem. 157 (1941) 203.
- 163.- J.C. Sheehan y Ding-Djung H Yang,
J. Am. Chem. Soc. 80 (1958) 1154.
- 164.- S. Takalci y T. Veda,
J. Pharm. Soc. Japan 58 (1978) 276.
- 165.- D.A. Shirley,
Preparation of Organic Intermediates, J. Wiley & Sons,
London, 1951.
- 166.- G.W. Gribble, P.D. Lord, J. Skotnicki, S.E. Dietz, J.T.
Eaton y J.L. Johnson,
J. Am. Chem. Soc. 96 (1974) 7812.
- 167.- E.E. Smissman, J.D. Reid, D.A. Walsh y R.T. Borchardt,
J. Med. Chem. 19 (1)(1976) 127.
- 168.- E. Stoelzel,
Ber. 74 B (1941) 982.
- 169.- E.J. Ariens
*Agonists and Antagonists-Their Structural Relationships
en Drug Design. Vol.1.* E.J. Ariens (ed.). Academic
Press, New York, 1971 . Capítulo 5, pag. 162.

Este trabajo, realizado en los talleres
graficos de Farmacoquimica, se termino de imprimir
el 16 de octubre de 1990, gracias a la
colaboracion de:



...Dolores.

El autor.

- 170.- F.G. Van Den Brink,
en: *Kinetic of Drug Action. Handbuch der Experimentellen
Pharmakologie*, J.M. Van Rossum (Ed.), Springer Verlag,
Berlin, 47 (1977) 169.
- 171.- J.J. Reuse,
Brit. J. Pharmacol. 3 (1948) 174.
- 172.- H.B. Higman y E. Bartels,
Biochim. Biophys. Acta 54 (1962) 543.
- 173.- R.P. Stephenson,
Brit. J. Pharmacol. 11 (1956) 379.
- 174.- C Grand, L.E. Bruno Blanch, A. Vázquez, P. Lufrano y
O. Baldini,
Acta Farm. Bonaerense 3 (1984) 39.
- 175.- A. Consolini, C. Grand, L.E. Bruno Blanch, P. Lufrano y
O. Baldini,
Acta Farm. Bonaerense 4 (1985) 99.
- 176.- C. Grand,
Tesis Doctoral. UNLP. En redacción.
- 177.- R.R Sokal y F.M. Rohlf,
Introducción a la Bioestadística. Ed. Reverté, España,
1984.
- 178.- C. Hansch, R.M. Muir, T. Fuyita, P.P. Maloney, F. Geiger
y M. Streitch,
J. Am. Chem. Soc. 85 (1963) 2817.

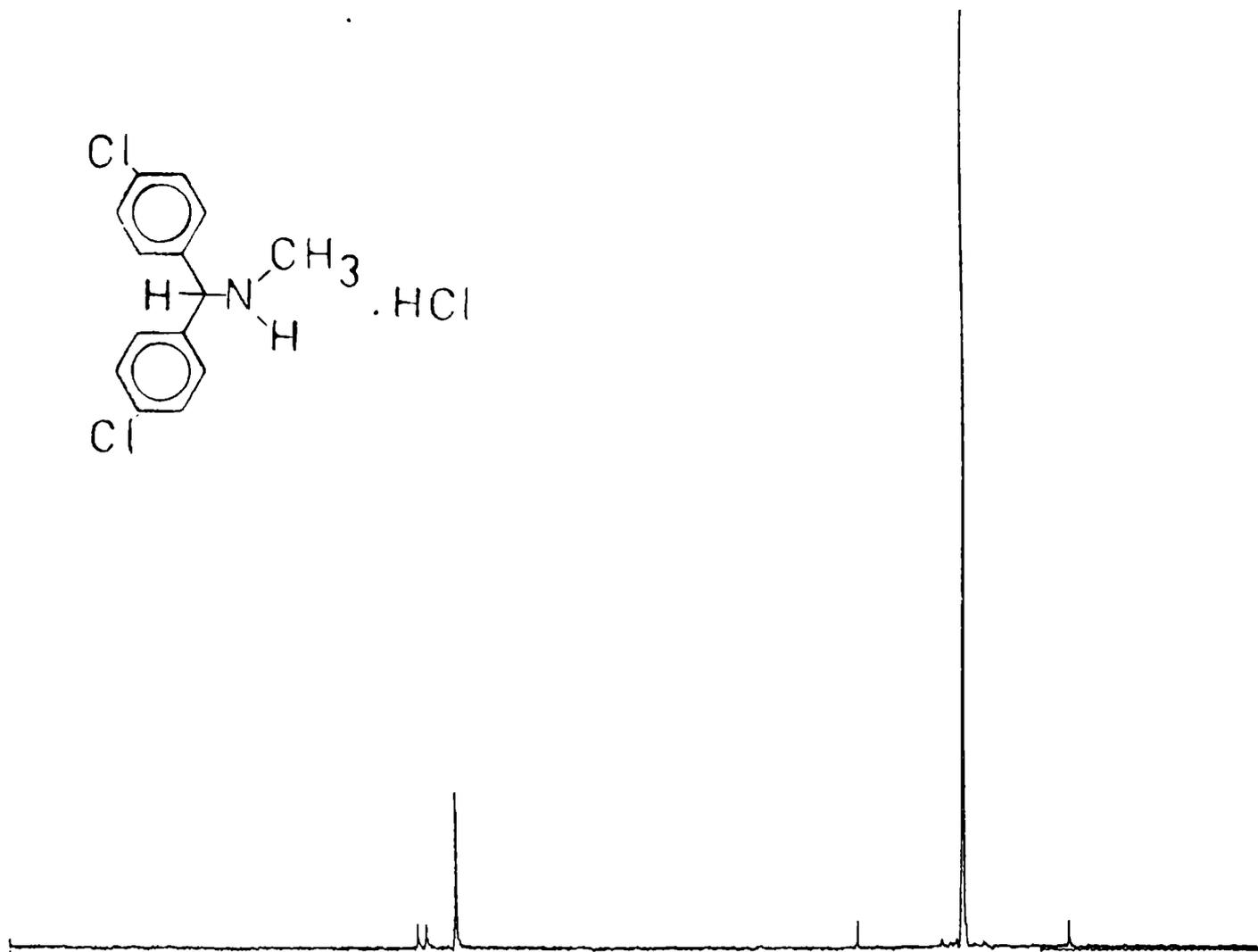
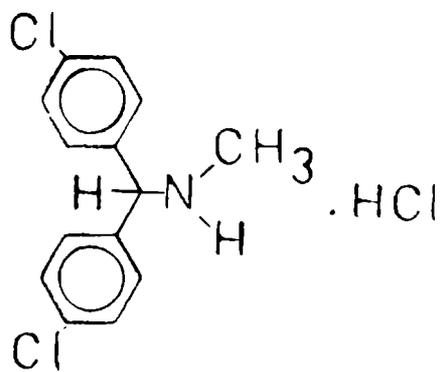
- 179.- C. Hansch y T. Fuyita,
J. Am. Chem. Soc. 86 (1964) 1616.
- 180.- J.T. Penniston, L. Beckett, D.L. Bentley y C. Hansch,
Mol. Pharmacol. 5 (1969) 333.
- 181.- J.C. Dearden y M.S. Townend,
J. Pharm. Pharmacol. 28S (1976) 13.
- 182.- J.C. Dearden y M.S. Townend,
en: *Quantitative Structure-Activity Analysis*, R.Franke y
P.Oehme (eds.), Akademie-Verlag, Berlin, 1978.
- 183.- J.C. McFarland,
J. Med. Chem. 20 (1970) 1192.
- 184.- H. Kubinyi,
Arzneim.-Forsch. 26 (1976) 1991.
- 185.- H. Kubinyi,
J. Med. Chem. 20 (1977) 625.
- 186.- H. Kubinyi,
en: *Biological Activity and Chemical Structure*, J.A.
Keverling Buisman (Ed.). Pharmacochemistry Library,
W.Th. Nauta y R.F. Rekker (Eds.), Vol.2, Elsevier,
Amsterdam, 1977.
- 187.- H. Kubinyi,
Progr. Drug Res. 23 (1980) 97.
- 188.- C. Hansch y J.M. Clayton,
J. Pharm. Sci. 62 (1973) 1.

- 189.- T. Higuchi y S.S. Davies,
J. Pharm. Sci. 59 (1970) 1376.
- 190.- R. Franke, E. Gabler y P. Oehme,
Acta Biol. Med. Germ. 32 (1974) 545.
- 191.- J.G. Topliss y R.J. Costello,
J. Med. Chem. 15 (1972) 1066.
- 192.- N.C. Cohn, J.M. Blaney, C. Humblet, P. Gund y D.C. Barry,
J. Med. Chem. 33 (1990) 883.
- 193.- T.M. Dyott, A.J. Stuper y G.S. Zander,
J. Chem. Inf. Comput. Sci. 20 (1980) 28.
- 194.- P. Gund, J.D. Andose, J.B. Rhodes y G.M. Smith,
Science 208 (1980) 1425.
- 195.- W.C. Still, L.J. MacPherson, T. Harada, J.F. Callhan y A.L. Rheingold,
Tetrahedron, 40 (1984) 2775.
- 196.- W.C. Still,
Macromodel, Department of Chemistry, Columbia University; New York, 1984.
- 197.- N.L. Allinger y H. Yuh,
Quantum Chemistry Program Exchange N^o395, Indiana University Chemistry Department, 1980.
- 198.- N.L. Allinger,
J. Am. Chem. Soc. 99 (1977) 8127.

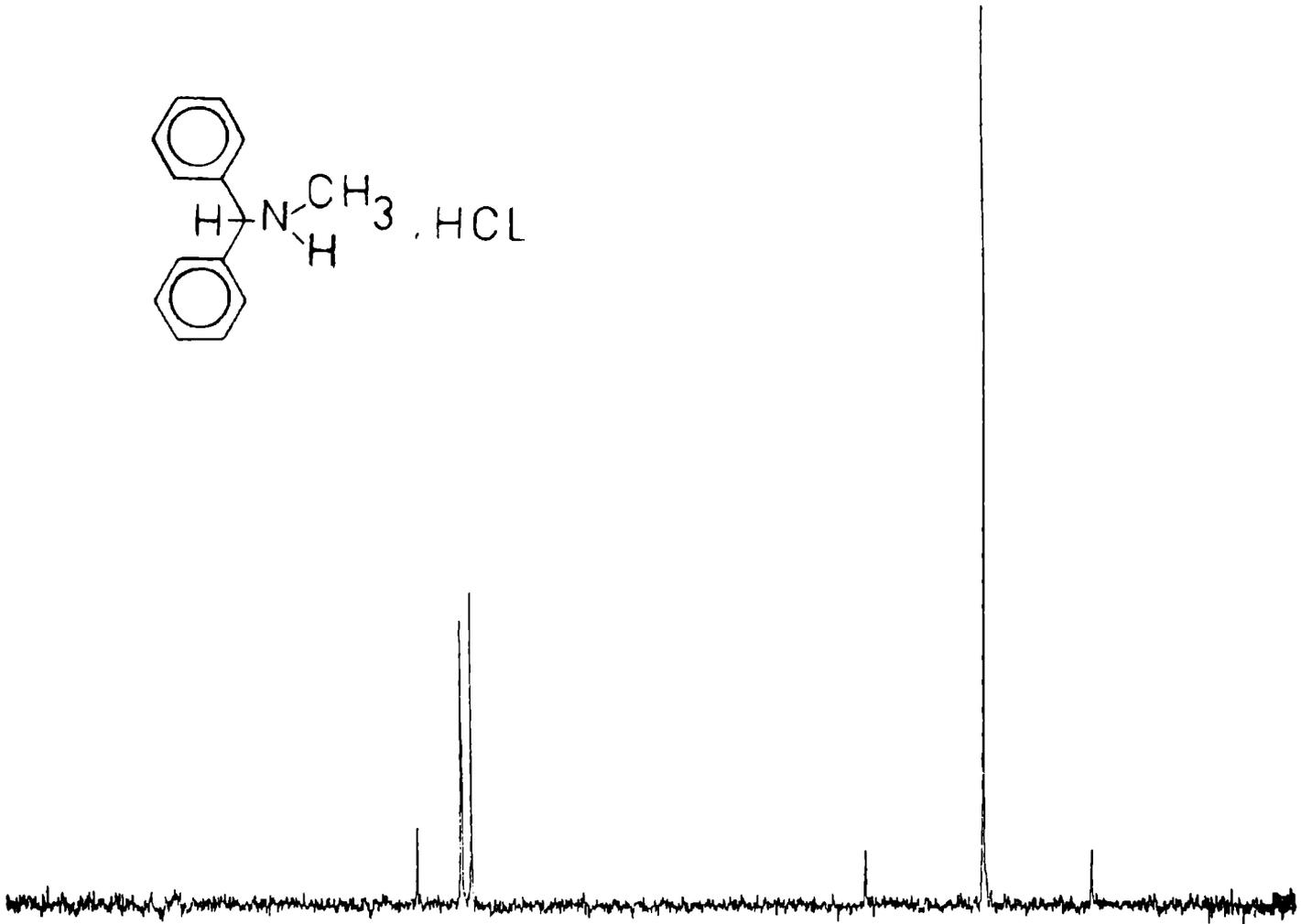
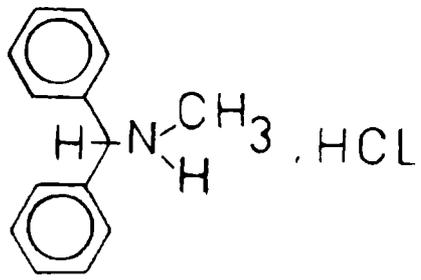
- 199.- N.L. Allinger, J.T. Sprague y T. Liljefors,
J. Am. Chem. Soc. 96 (1974) 5100.
- 200.- E. Goldstein y N.L. Allinger,
J. Mol. Struct. (TEOCHEM) 188 (1989) 149.
- 201.- M. Wolfsberg y L. Helmholtz,
J. Chem. Phys. 20 (1952) 837.
- 202.- J. Howell, A. Rossi, D. Wallace, K. Haraki y R. Hoffmann,
Quantum Chemistry Program Exchange N^o344, Department of
Chemistry, Cornell University, Ithaca, New York, USA.
- 203.- R.S. Mülliken,
J. Chim. Phys. 46 (1949) 497.
- 204.- R.S. Mülliken,
J. Chem. Phys. 23 (1955) 1833.
- 205.- A. Gomberg y R. Cone,
Ber. 39 (1906) 3278.
- 206.- Ranita Aiman y M.B. Charpure,
C.A.:44, 1201b (1950).Current. Sci.(India)18 (1949) 303
- 207.- S. Sarel, F. D'Angeli, J.T.Kister,
Israel J. Chem. 2 (1964) 167.
- 208.- Norman H. Cronwell,
J. Am. Chem. Soc. 69 (1947).
- 209.- A.T. Stewart Jr. y C.R. Hauser,
J. Am. Chem. Soc. 77 (1955) 1098.

- 210.- C. Gardner Swain y D.C. Dittmer,
J. Am. Chem. Soc. 77 (1955) 3924.
- 211.- W. Kirnse, L. Horner y H. Hovner,
Ann. 614 (1959) 19.
- 212.- Barbara K. Campbell y K.N. Campbell,
J. Org. Chem. 9 (1944) 178.
- 213.- K.G. Rutherford, O.A. Marners, J.M. Prokipcak y R.A. Jobin,
Can. J. Chem. 44 (1966) 2337.
- 214.- Busch L. y LeceFhelm,
J. Prakt. Chem 77 (1903) 21

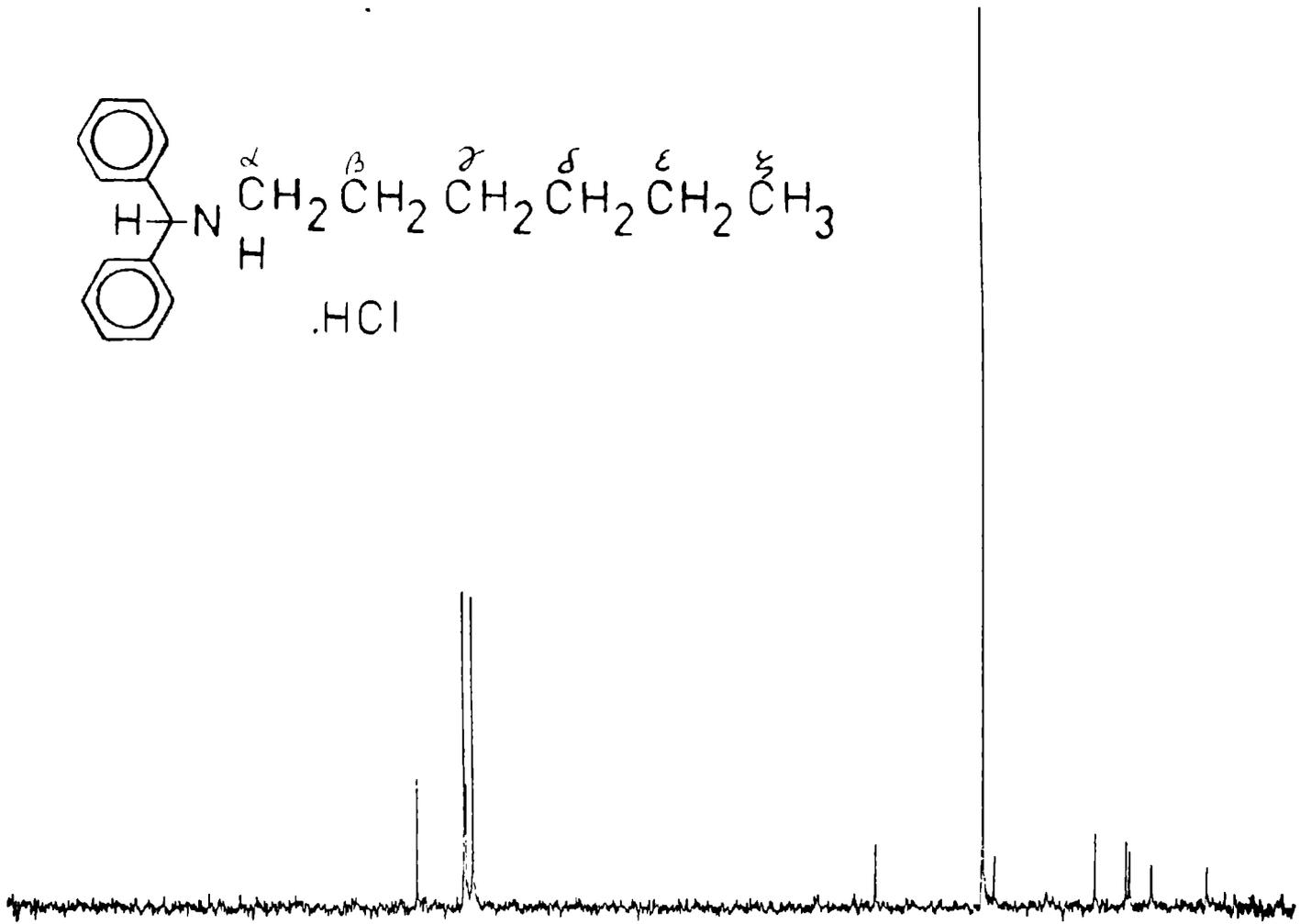
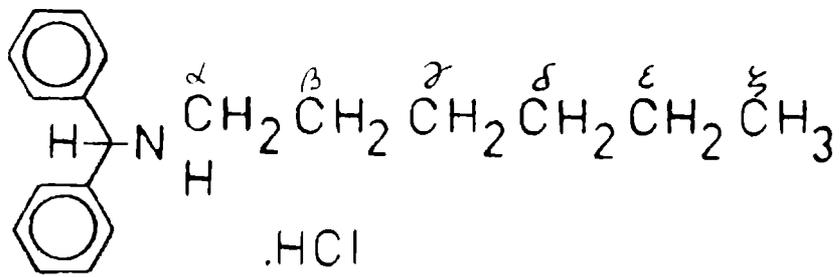
- APÉNDICE -



Espectro 1
4,4'-Dicloro-N-Metilbencidrila. HCl (AB₂₈)

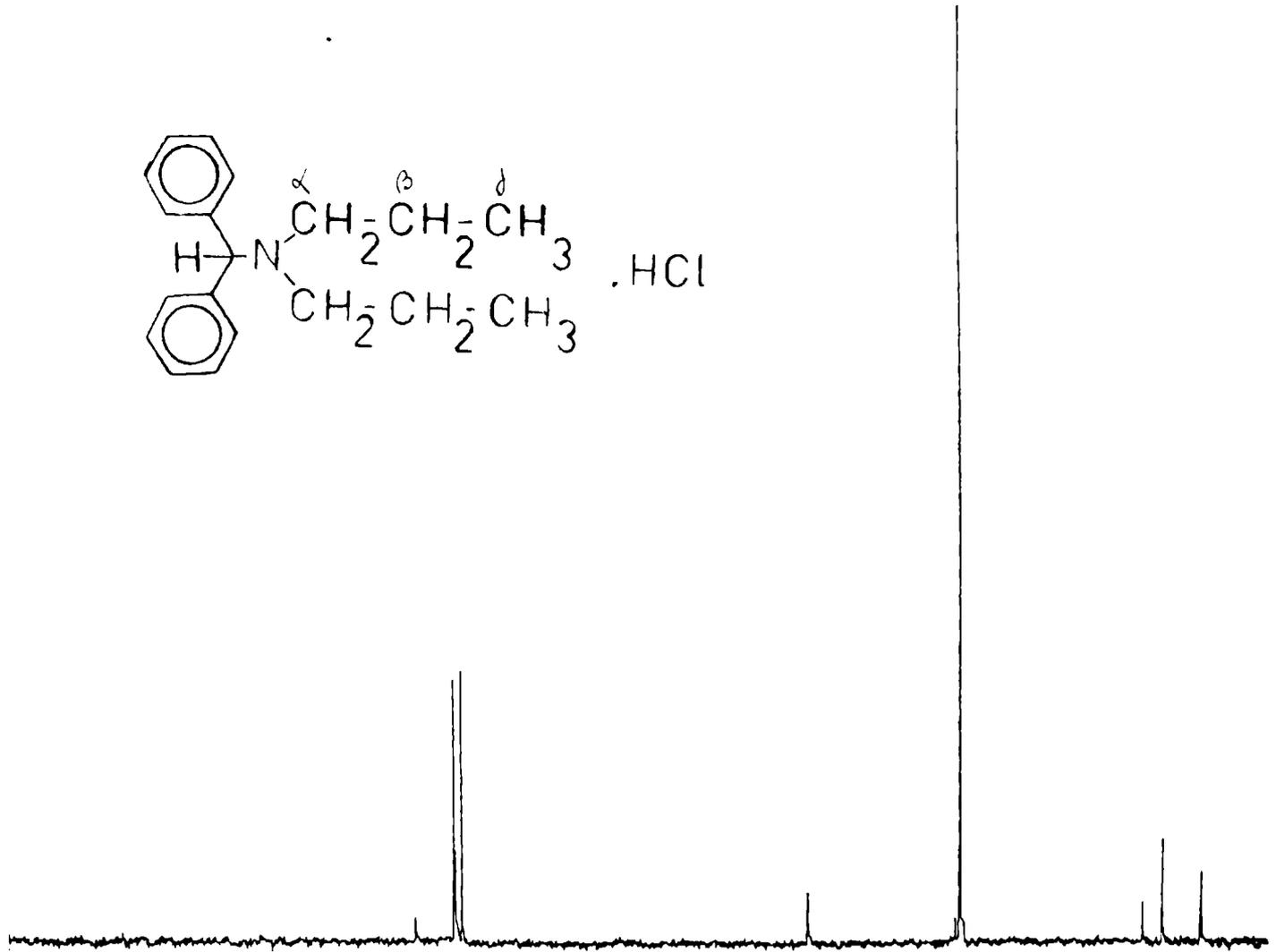
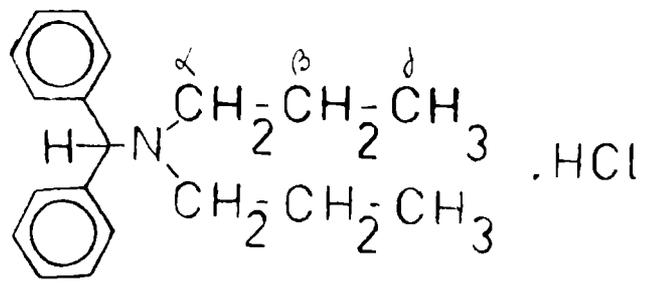


Espectro 2
N-Metilbencidrilamina. HCl (AB₁₀)

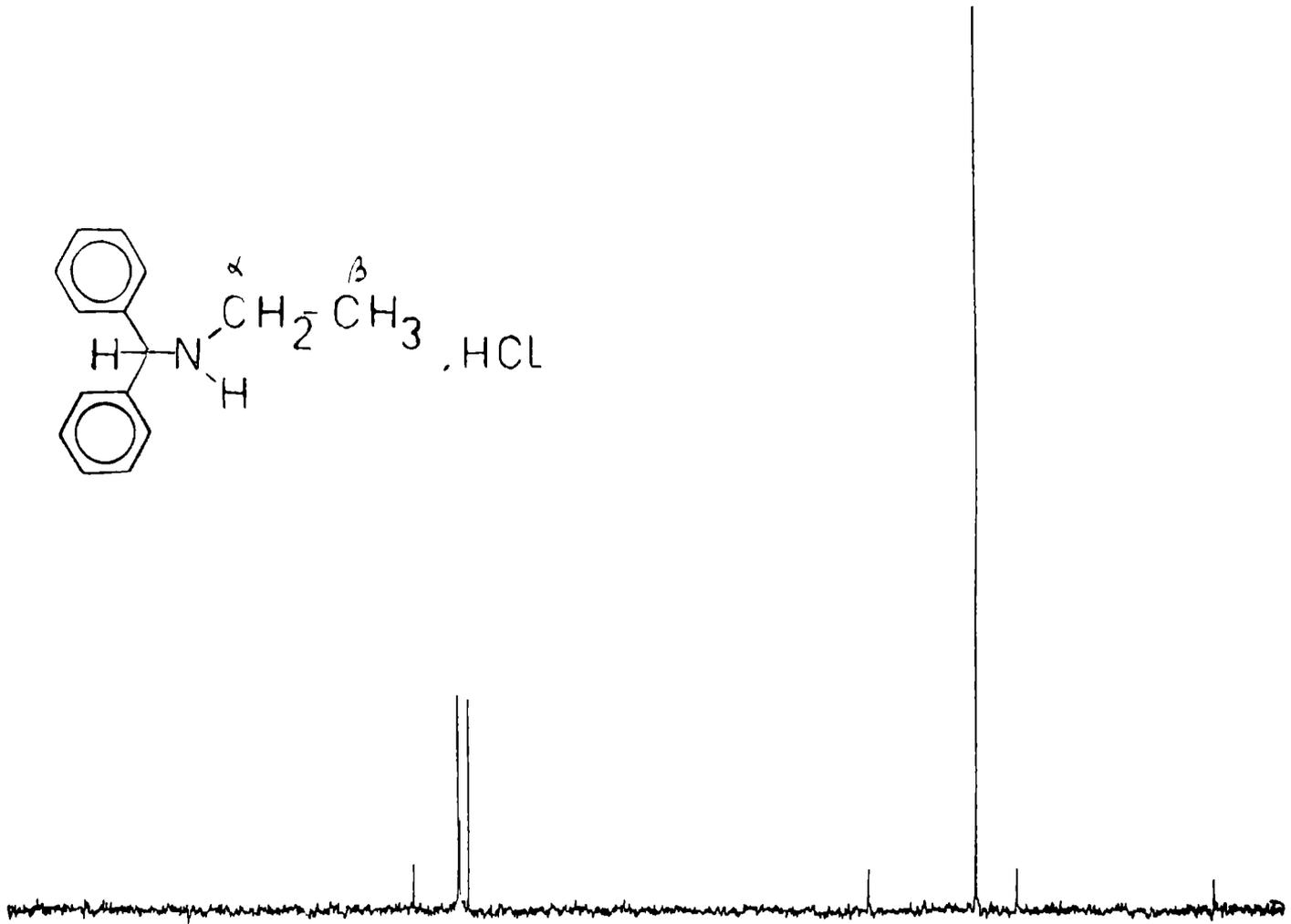
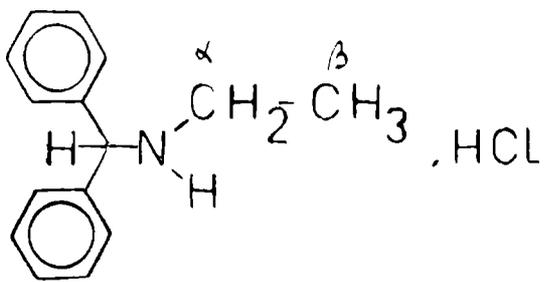


Espectro 3

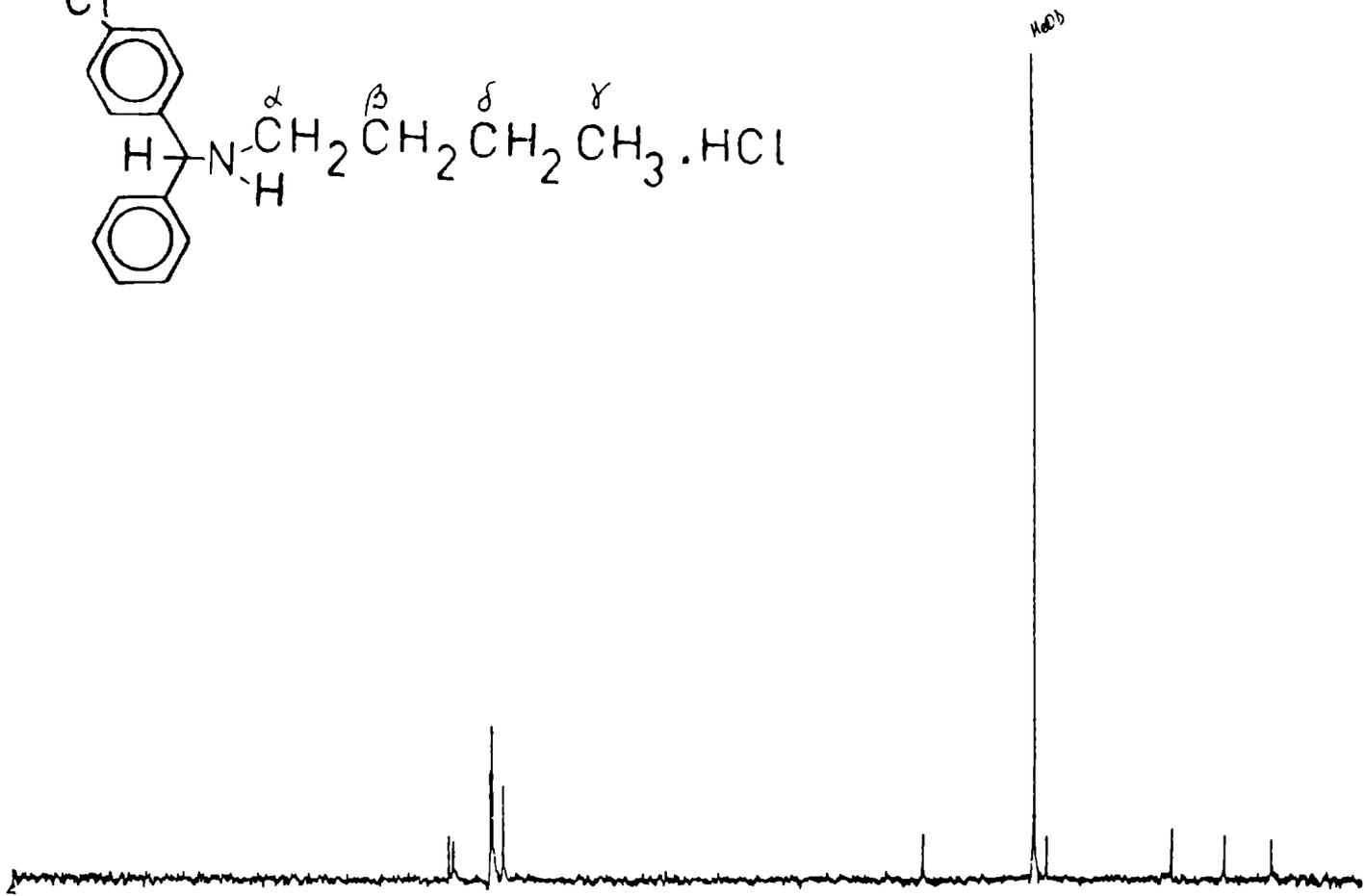
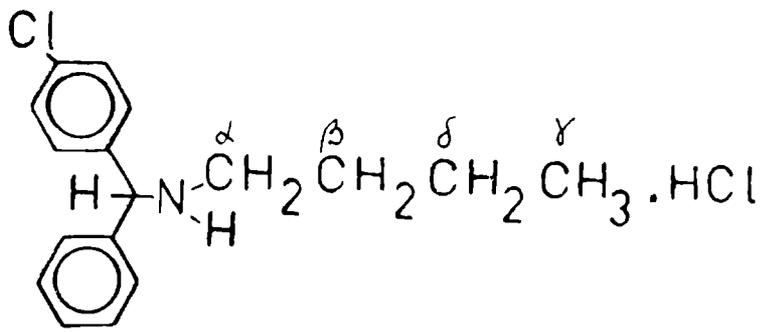
N-Hexilbencidrilamina. HCl (AB₁₂)



Espectro 4
 N,N-Dipropilbencidrilamina.HCl (AB₂₂)

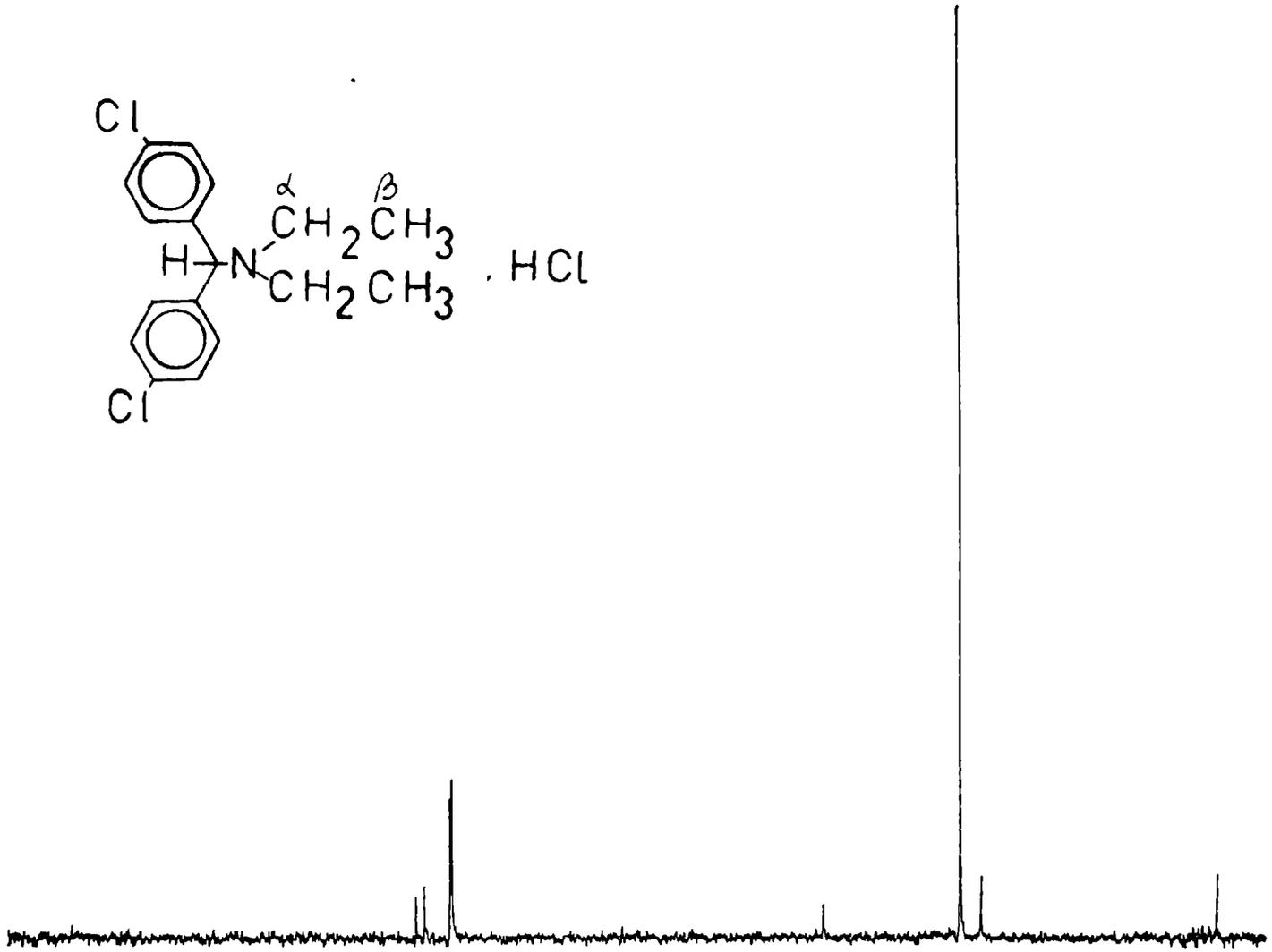
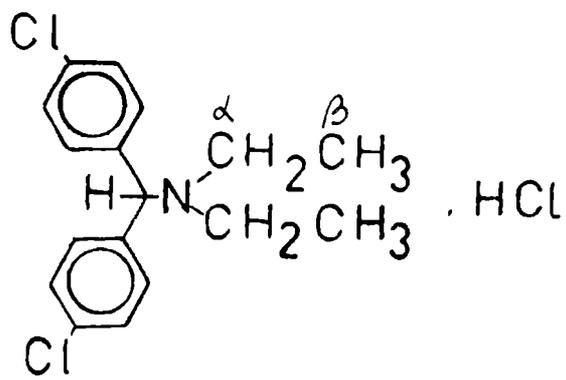


Espectro 5
N-Etilbencidrilamina.HCl (AB₂₇)



Espectro 6

4-Cloro-N-Butilbencidrilamina.HCl (AB₂₀)



Espectro 7
 4,4'-Dicloro-N,N-Dietilbencidrilamina.HCl (AB₃₀)