

Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC  
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas – CFM

**Planejamento Racional de Imidas Cíclicas e Sulfonamidas com  
Atividade Antinociceptiva**

Maria Elena Walter

Florianópolis – SC  
Março/2004

Maria Elena Walter

**Planejamento Racional de Imidas Cíclicas e Sulfonamidas com  
Atividade Antinociceptiva**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do título de Doutora em Química Orgânica.

Orientador : Ricardo José Nunes

Florianópolis – SC  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

2004

“A melhor maneira de ter boas idéias é ter muitas idéias.”

Linus Pauling

“Eu não me envergonho de corrigir e mudar as minhas opiniões, porque não me envergonho de raciocinar e aprender.”

Alexandre Herculano

## AGRADECIMENTOS

- A Deus que me proporcionou a oportunidade deste aprendizado maravilhoso que é a vida.
- Ao meu porto seguro, minha família, por tanta compreensão, dedicação e entusiasmo incondicional.
- Aos meus pais, Valmor e Luci, minhas irmãs, Cecília, Lourdes e Lúcia, e meu irmão, Vander, por todo apoio, amor e respeito em todos esses anos.
- Aos meus amigos tão dedicados, sempre firmes ao meu lado, apesar de todo meu estresse.
- Aos meus grandes amigos Regina, Vera e Marcelo, sem os quais com certeza não teria chego até aqui.
- Ao meu namorado, Patrick, que tem como um dos maiores méritos me faz rir mesmo nas horas tristes e de desânimo pelo cansaço do trabalho. Seu carinho me faz lembrar que existe vida após a pós-graduação.
- Aos amigos do LABSEAT (Evilázio, Marcelo, Mora, Karoline) pela colaboração e amizade.
- Aos amigos do NEQUIM (Vera, Donnici, Ramon, Luísa, Marcelo, Antônio, Patrícia, Erúzia, Andrei, André, Vinícius, Jaqueline, Tânia, Andrely, Ronaldo, Irwin, Luciana, Luciano) pelos muitos momentos de discussão científica que tanto contribuíram para o meu trabalho e pelas “miorinhas” de descontração.
- Aos orientadores “informais” Vera, Ramon, André, Andrei, Antônio e Luísa.
- Ao professor Carlos A. Montanari, NEQUIM/UFMG, pela oportunidade de obter os dados computacionais, dos compostos sintetizados na UFSC e testados biologicamente na UNIVALI, no seu grupo de pesquisa e por todo aprendizado em sua companhia.
- Ao meu orientador, Ricardo J. Nunes, pela sua irrepreensível orientação e principalmente por seu apoio em momentos tão delicados da minha vida. Você é certamente a pessoa mais humana que já conheci.
- Aos amigos do plano espiritual, por seu apoio e pelos muitos momentos de auxílio e inspiração, sem os quais não teria chego até aqui!
- Finalmente, as pessoas que não acreditaram em mim, pois em determinados momentos foi pensando nelas que segui em frente com mais garra.

- CNPq pelo suporte financeiro.
- A professora Márcia M<sup>a</sup> de Souza, NIQFAR/UNIVALI, responsável pela realização dos testes biológicos.
- A Central de Análises, Departamento de Química/UFSC, pela caracterização dos compostos.
- UFSC, UNIVALI, UFMG .

**SUMÁRIO**

1. Introdução	1
1.1. Imidas	4
1.2. Sulfonamidas	5
1.3. Atividade Biológica	
1.3.1. Atividade Analgésica	6
1.3.1.1. Imida como Inibidor de PGHS	9
1.3.2. Atividade Antimicrobiana	9
1.3.2.1. Sulfonamida, um agente antibacteriano	10
1.3.2.2. Mecanismo de Ação	11
1.4. Planejamento Racional	12
2. Parte Experimental	40
2.1. Sínteses	41
2.1.1. Síntese de 3,4-Dicloro- <i>N</i> -aril e <i>N</i> -alquilmaleimidas	41
2.1.2. Síntese de 3-cloro-4- <i>X</i> - <i>N</i> -aril e <i>N</i> -alquilmaleimidas	42
2.1.3. Clorossulfonação de 3-cloro-4- <i>X</i> - <i>N</i> -aril e <i>N</i> -alquilmaleimida e de 1-fenilpirrolidina-2,5-diona ( <u>48</u> )	43
2.1.4. Preparação de derivados 3,4-diclorofenil e 3-cloro-4- <i>X</i> - <i>N</i> -fenilmaleimidobenzenossulfonílicos e derivados do cloreto de 4-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)benzenosulfonila ( <u>49</u> )	44
2.2. Atividade Antinociceptiva	54
2.2.1. Teste de Contorções Abdominais	54
2.3. Planejamento Racional	55
2.3.1. Modelagem Molecular	56
2.3.2. PCA	57
2.3.3. Análise de <i>cluster</i>	57
2.3.4. QSAR	58
2.3.5. Algoritmo Genético	58
2.3.6. Anelação	59
2.3.7. CoMFA	59
2.3.8. Análise de QSAR-4D	61
3. Resultados e Discussão	62

3.1. Síntese	63
3.1.1. Clorossulfonação de 3-cloro-4-X-N-fenilmaleimida (3-4)	63
3.1.2. Clorossulfonação de 3,4-dicloromaleimidas (11-12)	66
3.1.3. Clorossulfonação de N-fenilsuccinimida (48)	68
3.1.4. Reação de Diels-Alder de N-benzilmaleimida (58) com Antraceno	70
3.2. Planejamento Racional de Imidas e Sulfonamidas (Atividade Analgésica)	71
3.2.1. Análise de PCA	71
3.2.1.1. Conjunto 1	72
3.2.1.2. Conjunto 2	74
3.2.1.3. Conjunto 3	75
3.2.1.4. Conjunto 4	78
3.2.2. QSAR clássica	87
3.2.3. QSAR-3D	96
3.2.3.1. Modelo 3	109
3.2.3.2. Modelo 32	116
3.2.4. QSAR-4D	127
3.3. Atividade Antinociceptiva	141
4. Conclusão	149
5. Referências Bibliográficas	151

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Banco de dados utilizado na análise quimiométrica.	73
Tabela 2 – Compostos planejados com base no diagrama de Topliss.	81
Tabela 3 – Compostos planejados e suas potências biológicas.	83
Tabela 4 – Compostos sulfonados sintetizados e testados durante o trabalho.	84
Tabela 5 – Banco de dados utilizado no estudo de QSAR-2D.	88
Tabela 6 – Parâmetros estérico e eletrônicos, valores experimentais e valores previstos pelo modelo (Eq 14), resíduos e erros percentuais dos compostos da série de treino ( <u>1</u> , <u>3-5</u> , <u>7</u> , <u>8</u> , 11-19, <u>21</u> , <u>23-26</u> , <u>30-33</u> ), série de teste ( <u>2</u> , <u>6</u> , <u>9</u> , <u>10</u> , <u>20</u> , <u>22</u> , <u>27</u> ) e série validação lateral ( <u>36-39</u> ).	92
Tabela 7 – Moléculas constituintes do banco de dados utilizado na QSAR-3D.	97
Tabela 8 – Modelos de QSAR-3D/CoMFA obtidos da série de treino – compostos <u>2</u> , <u>3</u> , <u>5</u> , <u>7-15</u> , <u>18-21</u> , <u>24-27</u> , <u>29-31</u> , <u>33</u> .	101
Tabela 9 – Caixas utilizadas na construção dos modelos 1-26.	101
Tabela 10 – Valores de pDI <sub>50</sub> experimentais, previstos pelos modelos 3, 8, 29, 32 e seus respectivos resíduos e erros %.	104
Tabela 11- Modelos de QSAR-3D/CoMFA obtidos a partir do banco de dados composto pelos compostos <u>1-54</u> .	106
Tabela 12 – Modelos de QSAR-3D/CoMFA obtidos a partir do banco de dados composto pelos compostos <u>38-52</u> .	108
Tabela 13 – Caixas utilizadas na construção dos modelos 33-39.	108
Tabela 14 – Possíveis substituintes do GUIDE.	122
Tabela 15 – Compostos planejados a partir do modelo 3, utilizando a ferramenta <i>Leapfrog</i> .	123
Tabela 16 – Valores de pDI <sub>50</sub> previstos para os compostos planejados ( <u>L3-L7</u> ) pelo modelo 3.	125
Tabela 17 – Compostos planejados a partir do modelo 32, utilizando a ferramenta <i>Leapfrog</i> .	126
Tabela 18 – Valores de pDI <sub>50</sub> previstos para os compostos planejados ( <u>L8-</u>	126



L10) pelo modelo 32.

Tabela 19 – Resultados da análise de PLS dos conjuntos 1 (GA) e 2 (SA).	129
Tabela 20 – Caixas utilizadas na construção dos modelos 40-49.	129
Tabela 21 – Potências previstas pelo modelo 46 encontrado para o conjunto 2.	134
Tabela 22 – Série de teste do conjunto 2, potências experimentais, potências previstas pelo modelo 46 e seus respectivos resíduos e erros experimentais.	138
Tabela 23 – Previsão da potência antinociceptiva da série de validação lateral.	139
Tabela 24 – Potências de imidas, compostos sulfonados e drogas referência injetados intraperitonealmente contra contorções abdominais induzidas por ácido acético ( <i>writing test</i> ) em camundongos (numeração correspondente a síntese).	143

## LISTA DE FIGURAS

página

Figura 1 – A anelação. Minimizações de estruturas dinâmicas a altas temperaturas podem levar a mínimos de alta energia. Um resfriamento e posterior dinâmica pode ajudar a encontrar mínimos de energia mais baixa. Os números 1, 2 e 3 mostram as transições conformacionais.	18
Figura 2 – Representação da relação entre os vetores de dados (variáveis).	24
Figura 3 – Gráfico de <i>loadings</i> .	25
Figura 4 – Análise de PCA.	26
Figura 5 - Ilustração de um dendograma.	27
Figura 6 – Representação esquemática de uma análise de PLS.	30
Figura 7 – Processo de validação lateral.	32
Figura 8 – Fluxograma mostrando o procedimento de QSAR-3D.	37
Figura 9 – As energias de interação entre a sonda (átomo ou molécula) e a molécula são medidas num acaixa 3D regular ( <i>grid</i> ) e cada ponto no espaço torna-se um descritor eletrostático e estéreo numa análise de QSAR.	37
Figura 10 – Moléculas alinhadas colocadas numa caixa regular.	60
Figura 11 – Alinhamento das imidas e sulfonamidas a partir da sobreposição do fragmento (C <sub>4</sub> O <sub>2</sub> N) do anel imídico.	60
Figura 12 – <i>Scores</i> da PC1 versus PC2 (conjunto 1).	74
Figura 13 - <i>Scores</i> da PC1 versus PC2 (conjunto 2).	75
Figura 14 – Gráfico dos <i>scores</i> da PC1 versus <i>scores</i> da PC2.	75
Figura 15 – Dendograma obtido da análise de <i>cluster</i> do conjunto 3.	76
Figura 16-a – Gráfico dos <i>scores</i> da PC1 versus <i>scores</i> da PC2.	80
Figura 16-b – Gráfico amplificado da região B dos <i>scores</i> da PC1 versus <i>scores</i> da PC2.	80
Figura 17 – Dendograma do conjunto 4.	82
Figura 18 - <i>Scores</i> da PC1 e PC2 dos compostos sulfonados (Tab. 4, minimizados por GA).	85
Figura 19 – Dendograma dos compostos sulfonados (Tab. 4), minimiz. por GA.	85

Figura 20 – Scores da PC1 e PC3 dos compostos sulfonados, minimizados por AM1.	86
Figura 21 – Dendograma dos compostos sulfonados, minimizados por AM1.	87
Figura 22 – Gráfico da potência antinociceptiva experimental versus potência prevista pela equação 14 das imidas cíclicas.	93
Figura 23 – Gráfico de resíduos versus potência antinociceptiva prevista pela equação 14 das imidas cíclicas.	93
Figura 24 – Scores de PC2xPC1, conforme parâmetros da Equação 14.	95
Figura 25 – Gráfico da potência antinociceptiva experimental versus potência prevista pelo modelo 3.	109
Figura 26 – Gráfico da potência prevista versus resíduos do modelo 3.	110
Figura 27 – Mapas estéreo e eletrostático do modelo 3 (Tabela. 8), tendo o composto <u>12</u> como referência.	111
Figura 28 – Mapa estéreo do modelo 3 (Tabela 8), tendo o composto <u>14</u> como referência.	112
Figura 29 – Mapa eletrostático do modelo 3 (Tabela 8), tendo o composto <u>14</u> como referência.	113
Figura 30 – Gráfico da potência antinociceptiva experimental versus potência prevista pelo modelo 32.	116
Figura 31 – Gráfico da potência prevista versus resíduos do modelo 32.	116
Figura 32 – Mapas estéreo e eletrostático do modelo 32 (Tabela 8), tendo o composto <u>14</u> como referência.	117
Figura 33 – Mapa eletrostático do modelo 32 (Tabela 8), tendo como referência o composto <u>14</u> .	117
Figura 34 – Mapa estéreo do modelo 32(Tabela 8), tendo o composto <u>14</u> como referência.	118
Figura 35 – Resultado visual de <i>Leapfrog</i> , com uma bisnaftalimida planej. ( <u>L2</u> ).	121
Figura 36 – Molécula L3 colorida conforme regiões favoráveis a interação com a enzima (violeta) e regiões desfavoráveis (vermelho, amarelo ou brnaco) Figura obtida do <i>Leapfrog</i> /SYBYL.	124
Figura 37 – Molécula L3 nas suas duas conformações encontradas durante o planejamento : (A) molécula com $pDI_{50}$ previsto = 7,317; (B) $pDI_{50}$ previsto = 6,695.	128
Figura 38 - Mapa estéreo das imidas cíclicas obtido do modelo 49 (conjunto 1).	130

Figura 39 – Mapa eletrost. das imidas cíclicas, obtido do modelo 49 (conj.1)	131
Figura 40 – Gráfico da potência antinociceptiva experimental versus potência prevista pelo modelo 49. No eixo y têm-se as potência previstas e no eixo x as potências experimentais.	132
Figura 41 – Gráfico da potência prevista pelo modelo 49 (Tabela 19) versus resíduos (conjunto 1). No eixo y têm-se os resíduos das previsões e no eixo x os valores de potências previstas pelo modelo.	133
Figura 42 – Mapas estéreo e eletrostático obtidos do modelo 46/Tabela 19.	135
Figura 43 – Mapa estéreo das imidas cíclicas, obtido do modelo 46 (conjunto 2).	135
Figura 44 – Mapa eletrostático das imidas cíclicas (modelo 46/Tabela 19).	136
Figura 45 – Gráfico da potência antinociceptiva experimental versus potência prevista pelo modelo 46/Tabela 19.	136
Figura 46 – Gráfico da potência prevista pelo modelo 46 versus resíduos.	137
Figura 47 – “Conformações bioativas” dos compostos <u>2</u> , <u>3</u> , <u>10</u> , <u>12</u> , <u>18</u> , <u>19</u> , <u>20</u> , <u>21</u> , <u>24</u> , <u>25</u> , <u>27</u> , <u>30</u> , <u>31</u> , <u>32</u> , respectivamente.	140
Figura 48 – Compostos <u>5</u> , e <u>14</u> , Tabela 1.	146
Figura 49 – Composto <u>5</u> (Tabela 1).	148

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

3D – Tridimensional

4D – Tetradimensional

AM1 – *Austin Model 1*

CoMFA – Análise Comparativa de Campo Molecular

DRAGON – programa para cálculo de descritores moleculares

GA – Algoritmo Genético

HCA – Análise de *cluster*

DI<sub>50</sub> – Dose Inibitória de 50% da dor

LOO – *leave-one-out* (método de validação cruzada)

MNDO – *Modified Neglect of Diatomic Overlap*.

MRL – Regressão Múltipla Linear

PCA – Análise das Componentes Principais

pDI<sub>50</sub> –  $\log 1/DI_{50}$

PGHS – Prostaglandina Endoperoxi Sintase.

PLS – Mínimos Quadrados Parciais

QSAR – Relação Estrutura-Atividade Quantitativa

RMS – Raiz Quadrada dos Erros Médios Quadráticos

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SA - Anelação

SYBYL – programa de Modelagem Molecular para construir, estudar e manipular moléculas

TSAR- Pacote de Programas para Estudo de Relação Estrutura-Atividade

## OBJETIVOS

Este trabalho têm por objetivos a síntese de compostos imídicos que apresentem atividade antinociceptiva, realizar o teste biológico dos mesmos e jcom estes dados juntamente com dados da literatura montar um banco de dados para poder planejar de maneira racional, com redução de trabalho e custos, a síntese de compostos imídicos com atividade antinociceptiva.

## RESUMO

Neste trabalho foram sintetizados 48 compostos, sendo 37 compostos inéditos. Alguns destes compostos foram testados quanto a atividade antinociceptiva e estes dados juntamente com dados da literatura foram utilizados na montagem de um bando de dados para o trabalho de planejamento racional de novos compostos imídicos biologicamente ativos. Neste trabalho foram utilizados métodos quimiométricos, análise de componentes principais e análise de *cluster*, e relação estrutura-atividade quantitativa, QSAR-2D, 3D e 4D. Na análise de PCA foi possível separar os compostos mais potentes do que a aspirina, dos menos potentes. Nesta separação foi constatada a importância da dupla ligação no anel imídico. A partir da PCA foi possível selecionar novos compostos para teste de analgesia. Na primeira análise quantitativa, QSAR-2D, obteve-se uma equação que relaciona parâmetros estereo e eletrostáticos, gerados no programa DRAGON, com a potência biológica. Esta equação foi utilizada para prever a potência analgésica de compostos até então não testados, validando com isso sua utilidade na previsão destes dados. Um estudo de CoMFA foi desenvolvido para uma QSAR-3D, onde avalia-se a energia de interação estereo e eletrostática entre uma sonda e as moléculas. São gerados vários parâmetros que são reduzidos através da análise de PLS e um modelo (equação) é gerado para ser utilizado no planejamento de novos compostos. Isto é feito com base nos mapas de contorno estereo e eletrostáticos gerados e utilizando uma ferramenta do programa SYBYL, o *Leapfrog*. Novos substituintes são idealizados e a potências destes compostos planejados são previstas pelo modelo. Ao analisar os resultados biológicos dos compostos da literatura e dos sintetizados neste trabalho, juntamente com os resultados obtidos através dos métodos de planejamento racional, foram verificadas algumas semelhanças entre estes resultados e o mecanismo de ação proposto por Kalgutkar e colaboradores.

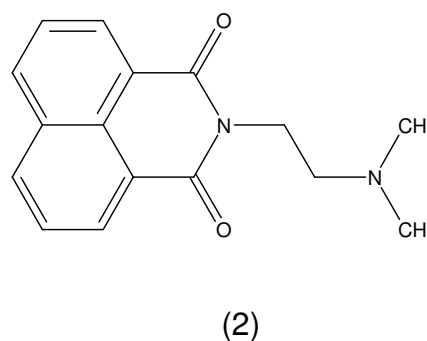
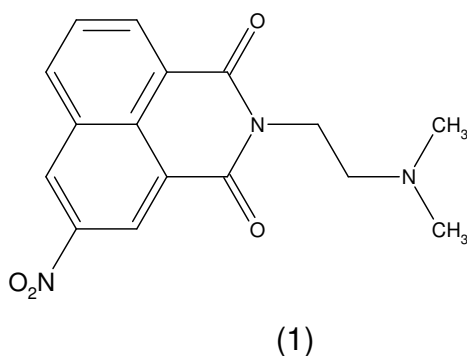
## ABSTRACT

In this work 48 compounds were synthesized, being 37 unpublished. Some of these compounds were tested about the antinociceptive activity and those data, along with data of literature were used in the assembly of a database for the work of rational planning of new imidic compound biologically active. In this work chemometric methods, principal components and cluster analyses, and quantitative structure-activity relationships, QSAR-2D, 3D and 4D were utilized. In the PCA it was possible to separate the compounds which were more potent than aspirin, from those which were less potent. In this separation, the importance of the double bond of the imide ring was verified. From the PCA it was possible to select new compounds for analgesic test. In the first quantitative analysis, QSAR-2D, an equation was obtained which relates steric and electrostatic parameters, generated with the DRAGON program, with biological potency. This equation was utilized to predict the analgesic potency of compounds, not tested until now, validating in this way its utility in the prediction of these data. A CoMFA study was developed for QSAR-3D, where the energy of the steric and electrostatic interaction between the probe and the molecules was evaluated. Various parameters are generated which are reduced through PLS analysis and a model (equation) to be utilized in the planning of new compounds is generated. This is carried out based on the steric and electrostatic contour maps generated, utilizing the SYBYL programming tool, Leapfrog. New substituents are idealized and the biological results of the compounds in the literature and of those synthesized in this study, along with the results obtained through the rational planning methods, some similarities between these results and the action mechanism proposed by Kalgutkar and collaborators were verified.



## **1- INTRODUÇÃO**

Devido à necessidade de obter-se tratamentos farmacológicos mais eficientes e mais baratos, faz-se necessário a busca de novos fármacos. Um grupo de compostos promissores neste sentido são as imidas cíclicas. Estes compostos são obtidos através de síntese rápida, de certa forma fácil e com bons rendimentos (**Campos et al, 2002**), o que é essencial para o uso na área de Química Medicinal. O crescente interesse pelo estudo desta classe de compostos é decorrente de seus usos farmacológicos (antinociceptivo, sedativos, hipnóticos, anticonvulsivantes, carcinostático, antimitótico, etc). Os efeitos biológicos de maleimidas e compostos relacionados vêm sendo estudados há anos. Hargreaves e colaboradores (**Hargreaves et al, 1970**) destacam especialmente os efeitos antifúngico, antibacteriano e inseticida destes compostos. Nunes (**Nunes, 1986**) verificou que as maleimidas são mais ativas que as succinimidas em relação à atividade antifúngica, sugerindo a importância da dupla ligação imídica na ação biológica. Algumas naftalimidas possuem atividade citostática, sendo utilizadas na oncologia. Muitos destes compostos tiveram tal atividade avaliada e já são utilizadas na terapêutica. Um exemplo característico é a mitonafida 1, a qual apresentou atividade citostática contra diversos tipos de tumores (**Suarez et al, 1994; Arbury, 1994**). A Amonofida 2 foi utilizada em estudos contra tumores malignos, exercendo atividade em adenocarcinoma de mama e próstata, não sendo, porém, efetiva em células tumorais do pulmão e do colo de útero (**Arbury, 1994**).



Com relação à atividade antinociceptiva, estudos relativos ao mecanismo de ação já são realizados, onde se verifica a participação do anel imídico na interação com a enzima PGHS (**Kalgutkar et al, 1996; Nunes,**

1986). As imidas cíclicas podem ser sintetizadas, por exemplo a partir: a) da reação de ácido dicarboxílico e amônia (**Hargreaves et al**, 1970); b) da reação de anidrido adequado com amina e posterior desidratação do ácido âmico formado (**Campos et al**, 2002; **Nunes**, 1986); c) da reação do anidrido dicloromaleico e amina em ácido acético (**Walter et al**, 1999; **Andricopulo et al**, 1998); d) da condensação de ésteres glioxilatos com acetanamida (**Faul et al**, 1999).

Estudos já realizados em nosso grupo de pesquisa constataram que imidas cíclicas (**Andricopulo et al**, 1998; **Cechinel Filho et al**, 1996; **Corrêa et al**, 1997), assim como sulfonamidas têm potente ação analgésica. Todas as sulfonamidas testadas nestes estudos exibiram considerável ação analgésica e algumas foram mais eficazes do que a aspirina e o paracetamol, sob as mesmas condições.

Em vista dos progressos feitos no campo relacionado a macromoléculas e do desenvolvimento no campo da informática, é possível realizar um planejamento racional de fármacos, para com isso otimizar o trabalho fundamental da síntese. Este planejamento consiste de metodologias com o propósito de descobrir novas substâncias químicas que possuam atividade farmacológica. Dentre estas metodologias tem-se: Análise das Componentes Principais (*Principal Component Analysis* / PCA-método quimiométrico), Relação Estrutura-Atividade Quantitativa clássica (2D) (*Quantitative Structure-Activity Relationship* / QSAR), QSAR 3D e QSAR 4D. A PCA é um método de redução de variáveis e investigação da existência de grupos. Em QSAR, as relações estrutura-atividade são representadas através de modelos matemáticos bem definidos, os quais são avaliados quanto a sua capacidade de previsão da potência de compostos cujos valores de potência biológica já são conhecidos. Um dos métodos utilizados na QSAR 3D é a Análise Comparativa de Campo Molecular (*Comparative Molecular Field Analysis* - CoMFA), baseada na hipótese de que as diferenças da propriedade alvo estão relatadas na forma do campo não covalente em torno das moléculas testadas. Em QSAR 4D, a quarta dimensão consiste na amostragem de conformações (**Hopfinger et al**, 1997; **Vedani et al**, 2000). Neste método, busca-se, além da

previsão da potência de novos compostos, localizar a conformação bioativa para melhor compreensão da interação enzima-fármaco.

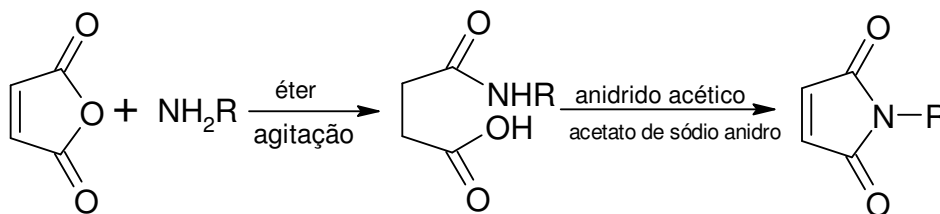
Por serem as imidas compostos que apresentam promissoras propriedades medicinais e tendo a possibilidade de planejar racionalmente a síntese, sínteses estas que são de fácil execução com bons rendimentos, têm-se boa justificativa para dar continuidade aos estudos das imidas.

### 1.1. Imidas

Muitas classes de compostos têm demonstrado promissores efeitos biológicos e a literatura científica relata um crescimento significativo de novas moléculas com potência similar ou superior àquelas requeridas para um fármaco, sendo que muitos deles encontram-se em estudos pré-clínicos e clínicos avançados e pormenorizados. Entre estas substâncias, pode-se inserir as imidas cíclicas (**Cechinel Filho**, 2003).

Imidas são compostos que contêm o grupo  $-\text{CO}-\text{N}(\text{R})-\text{CO}-$ , sendo R um átomo de hidrogênio, grupo alquila ou grupo arila.

Em um dos métodos de síntese de imidas cíclicas, anidridos de ácidos dicarboxílicos, dissolvidos em éter, são tratados com amônia ou uma amina superior, obtendo-se o respectivo ácido âmico. O ácido é então ciclizado na forma imídica, através da ação do anidrido acético, a quente, na presença de acetato de sódio anidro. Este método apresenta bons rendimentos e tem sido intensivamente utilizado, constituindo-se numa forma segura (com relação a pureza do produto) de obter imidas cíclicas (Esquema 1) (**Nunes**, 1986).

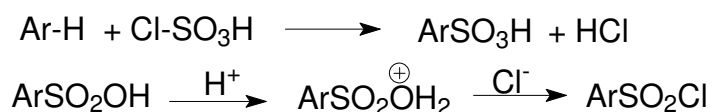


Esquema 1 – Síntese de imidas cíclicas a partir do respectivo anidrido.

Nosso grupo de pesquisa tem alcançado êxito na síntese de maleimidas derivadas do anidrido 3,4-dicloromaleico, numa única etapa, usando ácido acético sob refluxo (**Walter et al**, 1999; **Andricopulo et al**, 1998).

A N-fenilmaleimida e outras maleimidas são substâncias muito usadas para a síntese de derivados com potencial farmacológico. A clorossulfonação da N-fenilmaleimida, usando 6 mois de ácido clorossulfônico e aquecimento, leva ao respectivo cloreto de sulfonila, com rendimento superior a 80%. Tal composto pode ser usado para a obtenção de diferentes sulfonamidas, através de reações com aminas apropriadas.

O ácido clorossulfônico é um reagente muito usado para a síntese direta de cloretos de sulfonila aromáticos (**Gilbert**, 1977). O processo provavelmente envolve a sequencia de reações mostrada no Esquema 2:



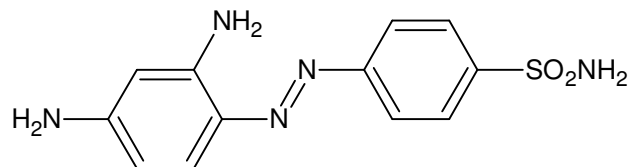
Esquema 2- Síntese direta de cloretos de sulfonila aromáticos.

Como a reação com o ácido clorossulfônico é reversível, um excesso considerável de reagente é requerido para assegurar um bom rendimento do cloreto de sulfonila (**Gilbert**, 1977).

A 3,4-dicloro-N-fenilmaleimida reage com aminas por substituição nucleofílica do átomo de cloro imídico (**Walter et al**,1999; **Andricopulo et al**,1998; **Nunes**, 1986).

## 1.2. Sulfonamidas

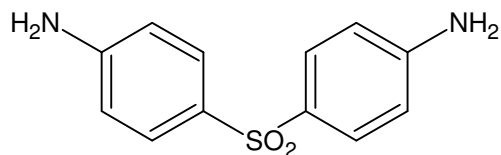
O desenvolvimento de sulfonamidas é um dos capítulos mais fascinantes e informativos da química medicinal. Considera-se que a verdadeira era da química medicinal iniciou-se nos anos 30, do século passado, com a preparação e uso de prontossil 3, uma sulfonamida de atividade anti-bacteriana (**Anand**, 1996).



(3)

Novas sulfonamidas foram introduzidas no uso clínico com sucesso até aproximadamente 1945 quando, gradualmente os interesses mudaram para os antibióticos, mas novos fatores, tais como super infecções e reações alérgicas aos antibióticos usuais, ressurgiu o interesse pelas sulfonamidas. Os conhecimentos obtidos durante esse período quanto à seletividade de ação de sulfonamidas nos parasitas e a relação entre sua solubilidade e toxicidade e sua farmacocinética, deram nova direção para o desenvolvimento neste campo.

As sulfonamidas, como a sulfona 4, possuem o mesmo mecanismo de ação e têm um amplo espectro antimicrobiano (**Anand**, 1996). Em todos os casos sua ação está relacionada ao antagonismo do ácido p-aminobenzóico (PABA).



(4)

Por serem estruturalmente similares ao PABA, sulfonamidas impedem a incorporação deste na molécula do ácido fólico por competição. Desde que o ácido fólico é essencial ao processo metabólico normal das bactérias, estes fármacos interferem no seu crescimento e reprodução. A presença da porção p-aminofenil torna possível ao fármaco entrar no sistema enzimático. A atividade bacteriostática de sulfonamidas é altamente dependente da sua habilidade de dissociar em pH neutro (**Wermuth**, 1996).

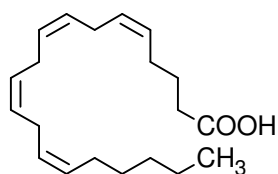
### 1.3. Atividade Biológica

#### 1.3.1. Atividade Analgésica

Analgésicos são compostos que decrescem ou suprimem a percepção da dor em doses terapêuticas e não geram efeito anestésico.

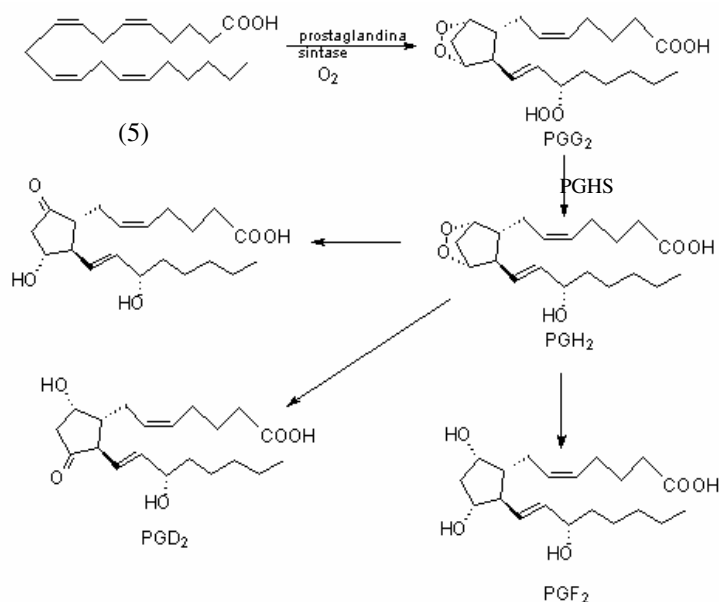
Dentre os vários métodos para o tratamento da dor com fármacos, há o método onde evita-se a sensibilização de receptores de dor inibindo a prostaglandina sintase com analgésicos não opióides (analgésicos com propriedades antipirética e usualmente anti-inflamatório e anti-reumático).

Prostaglandinas (PGs) são derivadas do ácido araquidônico 5 pela ativação da prostaglandina endoperoxido sintase (PGHS), também conhecida como ciclooxygenase (COX).



(5)

A PGHS catalisa os dois primeiros passos da biosíntese da prostaglandina (Esquema 3). Há evidências que várias prostaglandinas estão envolvidas na patogênese de febre e inflamação. Agora é conhecido que todas

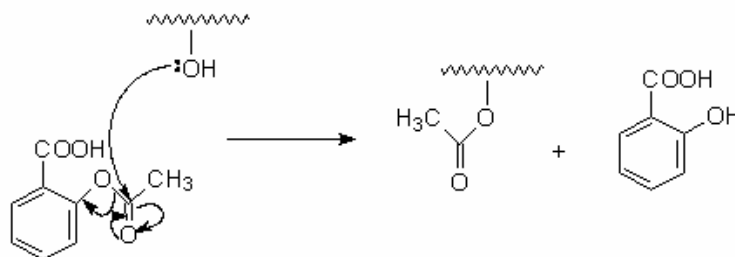


Esquema 3- Biosíntese de prostaglandina (PGs).

as células de mamíferos possuem enzimas que catalisam a biosíntese de prostaglandinas, as quais são sempre liberadas quando as células são danificadas, sendo encontradas em concentrações crescentes em inflamações. Quando as prostaglandinas são injetadas em animais, os efeitos remanescentes são observados durante respostas inflamatórias, nomeadas vermelhidão da pele (eritema) e fluído corporal local crescente. Uma longa e duradoura ação vasodilatadora também é predominante. Prostaglandinas podem causar dor de cabeça e dor vascular quando infundida em humanos. Elevação da temperatura corporal durante infecções também é mediada pela liberação de prostaglandinas.

Da discussão acima, é visto que a inibição de prostaglandina sintase, enzima responsável pela biosíntese de prostaglandinas e compostos relacionados, é um método desejável para o desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios, analgésicos e anti-piréticos (**Silverman**, 1992).

O mecanismo para acetilação (Esquema 4) é uma trans-esterificação pelo ácido acetilsalicílico (aspirina), por exemplo, atuando com um agente de afinidade marcada (**Silverman**, 1992).



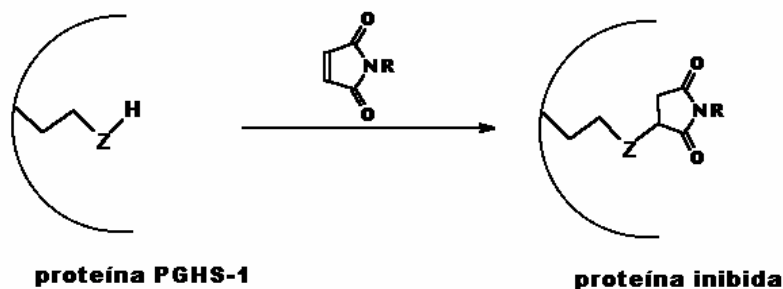
Esquema 4 - Mecanismo hipotético da inativação da PGHS pela aspirina.

Atualmente, o interesse por novas substâncias com atividade antinociceptiva utilizadas principalmente para o controle de vários tipos de dor vem aumentando significativamente. Vários modelos de nocicepção em animais de laboratório podem ser utilizados para análise da atividade antinociceptiva de diferentes compostos. No entanto, de uma maneira geral, eles possuem características próprias que devem ser consideradas, tais como simplicidade, reprodutibilidade, e validade dos resultados obtidos e, principalmente, a possibilidade de serem correlacionados com estudos clínicos (**Silverman**, 1992).



### 1.3.1.1. Imida como Inibidor de PGHS

Imidas são inibidores de PGHS e a inibição ocorre através da ligação desta ao carbono olefínico (no caso das maleimidas) ou ao carbono carbonílico (no caso das succinimidas e naftalimidias) do anel imídico (Esquema 5) (Kalgutkar, 1996). Em seu trabalho, Kalgutkar e colaboradores estudaram a interação de várias maleimidas e succinimidas com a enzima PGHS. Através de estudos de enzimologia, sugeriram que a inibição da enzima resulta de uma modificação covalente da proteína. Verificaram que variando-se o tamanho da cadeia alquílica das maleimidas alterava-se a velocidade, mas não sua habilidade para inibir a enzima. Sugeriram que ocorre primeiro uma interação não covalente com um resíduo de arginina carregado positivamente, o que proporciona o posicionamento adequado do fármaco. Posteriormente, ocorre uma interação covalente entre o anel imídico e um resíduo de tirosina, via substituição nucleofílica. Note que tanto neste mecanismo quanto no mecanismo proposto para a interação da PGHS pela aspirina (Esquema 4), a interação ocorre via adição-eliminação.



Esquema 5- Inibição da Prostaglandina Endoperoxido Sintase (Kalgutkar et al, 1996).

### 1.3.2. Atividade Antimicrobiana

O Homem, desde longa data, vem utilizando compostos químicos no combate a moléstias causadas por microrganismos, os quais podem ser nocivos à sua própria saúde ou às suas culturas agrícolas (Wermuth, 1996).

Os trabalhos de Pasteur estabeleceram claramente a existência de microrganismos e forneceram a primeira idéia para o desenvolvimento racional de fármacos para combater doenças. A partir disto, Ehrlich viu que era necessário encontrar uma química que fosse tóxica ao microorganismo e razoavelmente não tóxica ao hospedeiro (**Wermuth, 1996**).

Previsivelmente, muitos dos trabalhos recentes tem caminhado no sentido de fazer um “retorno às origens”. Especialmente no caso dos compostos biologicamente ativos, o retorno aos compostos sulfonílicos (sulfas e derivados) foi bastante natural, já que os modernos produtos de amplo espectro, apesar da incontestável efetividade, não tem correspondido de maneira eficaz à constante procura por maior segurança na administração de medicamentos.

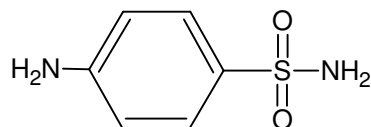
#### **1.3.2.1. Sulfonamida, um agente antibacteriano (Hansch and Leo, 1995).**

Os primeiros fármacos antibacterianos seletivamente tóxicos foram os fármacos da família sulfas, uma tentativa de Domagk para levar adiante as idéias de Ehrlich. Paul Ehrlich impressionou-se com o fato de que certas tintas manchavam algumas células mas não outras. Ele fundamentou que deveria ser possível encontrar tintas que seriam seletivamente absorvidas pelos microrganismos, mas não pelas células do hospedeiro e usou esta idéia para descobrir um fármaco efetivo contra a sífilis.

Após Domagk realizar testes com muitos compostos, a tinta prontosil foi inserida no mercado como um agente antibacteriano de sucesso. Esta propriedade era inesperada, pois o prontosil 3 não apresentava atividade contra bactéria *in vitro*. Contudo, em contato com o agente redutor apresentou atividade biológica *in vivo* em função de sua metabolização, pela redução, ao agente antibacteriano ativo, chamado p-aminobenzenosulfonamida 6, também chamado sulfanilamida.

A descoberta do prontosil marcou o início da quimioterapia moderna. Durante a década seguinte milhares de sulfonamidas foram sintetizadas e testadas como agentes antibacterianos. Estes foram os primeiros estudos de

estrutura-atividade e demonstraram a importância da modificação molecular no desenvolvimento de fármacos. Isto foi um dos primeiros exemplos onde um novo composto levou a outros compostos para outras doenças revelando efeitos colaterais observados durante estudos clínicos e farmacológicos. Estes estudos levaram ao desenvolvimento de novos agentes antidiabéticos e diuréticos.

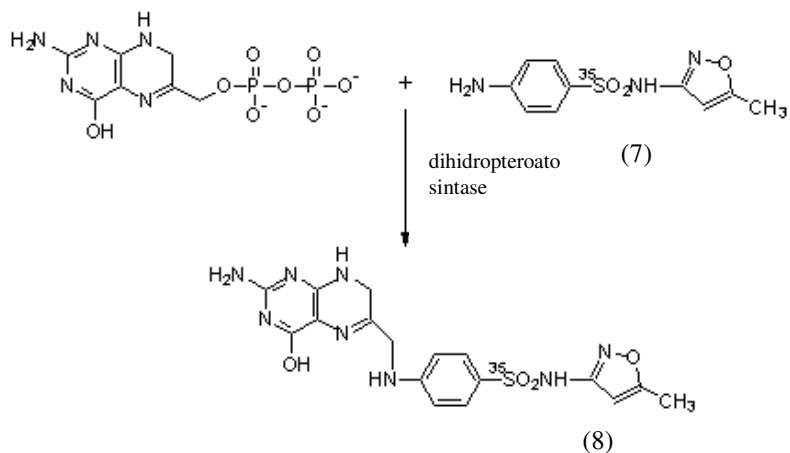


(6)

### 1.3.2.2. Mecanismo de ação

Em meados de 1940, Miller e colaboradores (**Miller et al**, 1944) demonstraram que sulfonamidas inibiam a biosíntese do ácido fólico, e em 1948 Nimmo-Smith e colaboradores (**Nimmo-Smith**, 1948) mostraram que a inibição da biosíntese do ácido fólico por sulfonamidas era competitivamente revertida pelo ácido p-aminobenzóico (PABA). A biossíntese do ácido dihidrofólico é específica para microrganismos (e algumas plantas) que não podem absorver ácido dihidrofólico pré-formado. Animais incluindo humanos não produzem o ácido dihidrofólico, mas o obtêm dos alimentos. A seletividade de ação das sulfonamidas é devido a esta diferença no metabolismo do ácido fólico entre humanos e microrganismos (**Foye et al**, 1995).

A dihidropteroato sintase (DHPS–EC2.5.1.15) é uma enzima que catalisa a condensação do PABA com 7,8-dihidropteridina-pirofosfato (DHPPP), eliminando pirofosfato para formar 7,8-dihidropteroato (**Achari et al**, 1997), o qual é subsequente convertido a tetrahidrofolato. A reversibilidade da inibição foi demonstrada por Weisman e Brown (**Weisman e Brown**, 1964) e eles sugeriram que sulfonamidas eram incorporadas no dihidrofolato. Isto foi verificado por Bock e colaboradores (**Bock et al**, 1974); que incubaram a dihidropteroato sintase com difosfato e [<sup>35</sup>S]sulfametoxazol 7 e identificaram o produto como 8 (Esquema 6). Este é um exemplo de inibição competitiva reversível, na qual o inibidor também é um substrato.



Esquema 6 – Conversão catalisada por dihidropteroato sintase de 7 à 8 (**Bock et al**, 1974).

Como os folatos são intermediários essenciais para a preparação de certas bases de DNA, sem as quais as bactérias não podem se multiplicar, esta inibição é bacteriostática e, ultimamente bactericida (**Foye et al**, 1995).

O ácido fólico é uma vitamina do complexo B e deve ser ingerido por humanos. Além disso, como a bactéria tem de biosintetizar seu folato, ela não possui um sistema de transporte para isto. Conseqüentemente, pode-se ingerir todo o folato desejado que a bactéria não poderá utilizá-lo. Isto é outro exemplo de toxicidade seletiva, inibição do crescimento de um organismo “estranho” sem afetar o hospedeiro o que se encaixa na categoria de um inibidor ideal de enzima.

#### 1.4. Planejamento Racional

A maioria dos fármacos atualmente comercializados para o tratamento de doenças em humanos, animais e plantas foram descobertos por observações ou por experimentos sistemáticos em grandes séries de substâncias naturais ou sintéticas.

Para que se possa reduzir o tempo gasto na obtenção de um novo fármaco, é preciso reduzir o empirismo nos projetos para assegurar que os fármacos sintetizados e farmacologicamente testados sejam tão significativos

quanto possível. Desta forma, a química medicinal têm por objetivo entender as forças que governam a atividade de um composto em particular ou de uma classe de compostos e assim Ter-se mais habilidade para projetar fármacos para uma proposta específica. Os melhoramentos desejados são especificados pelo objetivo medicinal ou compromisso farmacodinâmico (por exemplo, tipos de efeitos, potência, seletividade) assim como propriedades farmacocinéticas, tais como absorção, distribuição e comportamento metabólico. Estas propriedades constituem o perfil da atividade do fármaco.

Sendo assim, o método tradicional de desenvolvimento de fármacos é atualmente substituído pelos métodos que exploram o crescente conhecimento dos alvos moleculares participantes de algumas doenças, a tecnologia computacional e os princípios físicos relacionados a interação fármaco-receptor.

O **planejamento racional de fármacos** torna-se cada vez mais importante pelo esforço de promover um ligante biologicamente ativo na busca de um fármaco útil à medicina humana e veterinária e no mundo fitofarmacêutico.

As modificações estruturais são a chave para manipular a atividade e a potência (quantificação da atividade). Vários métodos de modificação estrutural tem sido desenvolvidos objetivando uma melhora do índice terapêutico (em sistemas *in vivo* é a razão entre LD<sub>50</sub> e ED<sub>50</sub>, 50% da dose letal e 50% da dose efetiva, respectivamente) (**Silverman**, 1992).

A base da QSAR como ferramenta para o desenvolvimento de fármacos foi concretizado na década de 1960 com o trabalho de Hansch (**Hansch**, 1964) e Free e Wilson (**Free e Wilson**, 1964). O modelo de Free e Wilson é baseado na hipótese de que, numa série de compostos que diferem entre si pela presença de substituintes em certas posições da molécula, a contribuição dos substituintes para a atividade biológica é aditiva e depende somente do tipo e da posição do substituinte.

Topliss (**Silverman**, 1992; **Hansch e Leo**, 1995; **Topliss**, 1997) desenvolveu um método não matemático e não computacional, orientado pelos princípios de Hansch, mais usado quando a síntese de grande número de compostos é difícil e quando os testes biológicos de compostos são

prontamente disponíveis. Este método foi intitulado árvore de decisão de Topliss. Esta análise é baseada somente nos valores de  $\pi$  e  $\sigma$  (parâmetros lipofílico e eletrônico, respectivamente); outros fatores tais como efeito estereo tem sido negligenciados.

Existem diferentes métodos para os casos onde a estrutura do receptor é conhecida e onde a estrutura não é conhecida, para interpretar relações estrutura tridimensional-atividade e para designar novas estruturas ativas.

Nos casos onde a estrutura 3D do receptor é desconhecida, não se tem escolha além de desenhar novas moléculas baseados na estrutura 3D de ligantes naturais ou fármacos conhecidos. Para isto, é necessário presumir de forma adequada as exigências tridimensionais para a atividade, com base no conhecimento de moléculas ativas. Conformações ativas, grupos funcionais ou átomos essenciais para a atividade, forma e o volume ocupado pelo ligante são requerimentos tridimensionais importantes.

Suposições de grupos químicos ou átomos essenciais para a atividade são chamadas hipóteses farmacofóricas. Farmacóforo era inicialmente um conceito 2D, mas agora é um conceito 3D. Moléculas com grupos farmacofóricos arranjados tridimensionalmente em posições apropriadas são consideradas por ter alta probabilidade de apresentarem atividade. Naturalmente, o ponto conhecido mais importante é como presumir ou assumir as exigências 3D para a atividade e isto determina o sucesso ou a falha do trabalho.

Se a estrutura 3D do receptor é desconhecida, uma aproximação pode ser feita com base na estrutura conhecida do ligante, se a conformação ativa de uma molécula ativa é conhecida ou se há uma molécula ativa com estrutura rígida. Desde a década de 80, muitos programas de computador para uso em química têm contribuído na construção de hipóteses na suposição que a conformação ativa de um fármaco é a mesma conformação estável encontrada no cristal ou em solução ou, simplesmente, é a conformação de menor energia. Entretanto, é agora aceito que a conformação ativa não é necessariamente alguma destas conformações estáveis desde que o importante é a estabilidade total do sistema ( **Itai et al**, 1993).

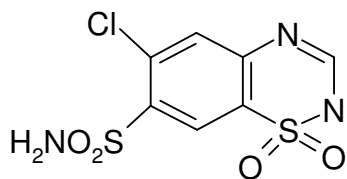
No **desenvolvimento de novos fármacos** há uma variedade de Planejamento Racional de Imidas Cíclicas e Sulfonamidas com Atividade Antinociceptiva. 14

métodos para identificar um composto protótipo, que será utilizado na pesquisa de futuros análogos:

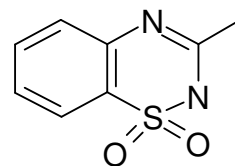
- Análise Aleatória (todos os compostos são testados num ensaio sem considerar suas estruturas);
- Análise não aleatória (compostos com alguma semelhança descobertos no teste aleatório ou com diferentes grupos funcionais com relação ao composto modelo podem ser testados seletivamente);
- Estudo do Metabolismo do Fármaco (compostos resultantes do metabolismo dos fármacos são analisados para verificar qual é o responsável pela atividade);
- Observações clínicas (durante testes em animais ou testes clínicos um composto pode apresentar mais de uma atividade farmacológica, pode produzir efeito colateral e ser usado como modelo para outra atividade.

Tendo um composto modelo em mãos, modificações são feitas para melhorar a atividade farmacológica. Contudo, somente uma pequena parte do composto pode ser envolvido na interação com o receptor (farmacóforo) (**Silverman**, 1992). Uma vez identificado o farmacóforo, faz-se a manipulação de grupos funcionais.

Em alguns casos um químico medicinal experiente sabe que determinado grupo funcional pode provocar um efeito particular. Clorotiazida 9, por exemplo é um agente anti-hipertensivo que tem um forte efeito diurético bem conhecido. Sabe-se, com base em estudos de sulfonamida, que a cadeia lateral sulfonamida pode apresentar atividade diurética. Consequentemente, diazoxida 10 foi preparada como um fármaco anti-hipertensivo sem atividade diurética (**Wermuth**, 1996).



(9)



(10)

Na modelagem do composto modelo e demais compostos da série faz-se uso de **métodos computacionais**.

A **modelagem molecular** consiste numa visualização gráfica computacional e da representação da geometria de uma molécula. Envolve a manipulação e a modificação de estruturas moleculares. **Cálculos teóricos** no campo da química (mecânica molecular, dinâmica molecular e cálculos quântico-mecânicos) são usados para estimar as estabilidades energéticas relativas, as propriedades eletrônicas e as interações moleculares. Esses métodos são muito úteis no refinamento de estruturas na modelagem molecular. Cálculos de dinâmica molecular monitoram a evolução temporal de cada átomo no sistema em função de sua energia cinética e potencial. A energia cinética é determinada pela temperatura de simulação e pela energia potencial, descrita pelo campo de força. Para o propósito de planejamento de novos ligantes deve-se considerar que, em geral, as reações químicas se processam a partir das estruturas estáveis das moléculas envolvidas, enquanto que a atividade biológica surge de interações entre as moléculas do fármaco e o receptor.

Cálculos de mecânica molecular são usados em muitas áreas de pesquisa para compreensão, modelagem e exploração da relação estrutura-atividade.

Tais áreas incluem análise conformacional, identificação de farmacóforo, “encaixe” (*docking*) de ligantes a macromoléculas, CoMFA e identificação de sítios de ligação favoráveis, a partir de campos de interação molecular.

A **minimização de energia** é uma das técnicas de modelagem molecular mais antigas e mais utilizadas. Fornece uma estrutura de baixa energia. Em muitos casos o interesse está, dentre todas as conformações, na de menor energia, a mínima global. Em outros casos é mais importante amostrar um amplo (preferencialmente representativo) conjunto de mínimos locais. Contudo, existem muitas conformações com mínimos locais. Isto significa que nenhum algoritmo pode garantir que a conformação de menor energia (mínimo global) será encontrada. Este problema é conhecido como problema do mínimo global. Considerando que o número de mínimos tipicamente cresce exponencialmente com o número de variáveis, o problema mínimo global é um trabalho extremamente difícil para uma função multidimensional (**Jensen**, 1999).



O último dos métodos químico-quânticos semi-empírico proposto, modificado e desenvolvido por Dewar e colaboradores foi o AM1 (*Austin Model 1*). Este é um método MNDO (*Modified Neglect of Diatomic Overlap*) (Dewar et al, 1985; Dewar and Dieter, 1986).

Numa simulação de **dinâmica molecular** (Jensen, 1999) as equações clássicas de movimento de Newton são resolvidas para um sistema de N átomos interagindo de acordo com os termos do campo de força (Eq.1).

$$m_i d^2 r_i / dt^2 = - \nabla [ V(r_1, r_2, \dots, r_N) ]; i = 1, N \quad (1)$$

Para um sistema molecular de N partículas tendo uma massa  $m_i$ , posição atômica  $r_i$  num tempo  $t$ , são deduzidos do gradiente da energia potencial  $V$ , o qual é classicamente obtido pela mecânica molecular. Como  $r_i$  é calculado dentro de um certo intervalo de tempo  $\Delta t$  de 1-2 fs (Eq.2), a trajetória de todos os átomos pode ser monitorada e então ter acesso à propriedades dinâmicas que podem ser de interesse para estudar uma grande variedade de sistemas, por exemplo moléculas de interesse biológico, polímeros, mecanismo catalítico e processos de ligação.

$$r_i(t + \Delta t) = 2r_i(t) - r_i(t - \Delta t) - \Delta t^2 \nabla_i V(t)/m_i \quad (2)$$

Durante uma simulação de dinâmica molecular, o sistema sofre mudanças conformacionais (coordenadas atômicas) e no *momentum* (velocidades), de forma que diferentes partes do espaço conformacional acessível à molécula possam ser exploradas.

A capacidade de realizar buscas conformacionais é um dos casos mais importantes da dinâmica molecular. Além disso, vários mecanismos de controle da temperatura e pressão dos sistemas simulados permitem amostragens estatísticas a partir das quais várias propriedades dinâmicas, termodinâmicas, estruturais e energéticas podem ser calculadas.

As moléculas reais encontram suas conformações de mínimo global fluando sobre uma coleção de configurações. Em princípio, se os movimentos e flutuações experimentados por uma molécula são simulados,

então o mínimo global é eventualmente amostrado nessa simulação. Esta é a principal aproximação feita em uma dinâmica molecular.

Há procedimentos que podem ser utilizados para melhorar a **busca conformacional**. O procedimento chamado **anelação (*Simulated Annealing - SA*)** pode ser usado para este fim. Consiste em resfriar o sistema às temperaturas mais baixas, à temperatura ambiente por exemplo, e efetuar uma nova dinâmica a essa temperatura para procurar por conformações de energias mais baixas (Figura 1).

Anelção é um tipo de experimento de dinâmica molecular no qual a temperatura do sistema é variada em função do tempo com o objetivo de amostrar amplamente o espaço conformacional. A razão usual para utilizar este método é obter diferentes conformações de baixa energia de uma única molécula ou diferentes configurações de baixa energia de um sistema de moléculas, por exemplo, um ligante “encaixado” ao receptor.

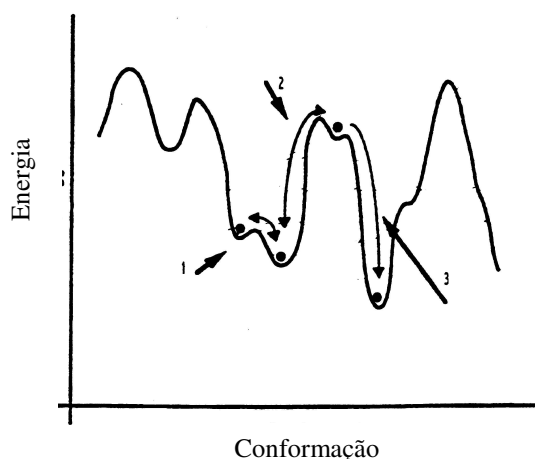


Figura 1- A anelção. Minimizações de estruturas dinâmicas a altas temperaturas podem levar a mínimos de alta energia. Um resfriamento e posterior dinâmica pode ajudar a encontrar mínimos de energia mais baixa. Os números 1, 2 e 3 mostram transições conformacionais.

Este é um método computacional de duas idéias diferentes. A primeira idéia é criar um análogo computacional da técnica experimental de anelção e a segunda idéia é usar um mecanismo controlado para obter diferentes

estruturas iniciais usando temperatura para ultrapassar barreiras. Para ambas as idéias, a proposta é a mesma: aplicar altas temperaturas para permitir ao sistema rearranjar seu estado presente e baixar a temperatura levando o sistema ao estado estável. O ciclo é repetido várias vezes até que múltiplas conformações possam ser obtidas e analisadas usando a Tabela Molecular do pacote de programas SYBYL v6.7 – Tripos 2000. Após, as conformações retidas pelo método de SA são minimizadas diretamente para assegurar que o sistema está realmente no estado de baixa energia.

Com consideração à primeira idéia, a anelacão experimental é uma técnica na qual uma matéria é repetidamente aquecida e esfriada lentamente para criar uma estrutura que seja favorecida mais pelas considerações termodinâmicas do que pelas inicialmente limitadas considerações cinéticas, dependendo da taxa de resfriamento. Um exemplo disto é um experimento para crescer um amplo cristal aquecendo um material e então resfriando lentamente para permitir o rearranjo no estado cristalino termodinamicamente preferido. A SA fornece a habilidade para aquecer o sistema e resfriar lentamente para encontrar o arranjo atômico preferido dentro do sistema molecular.

Outro método de busca conformacional é o **algoritmo genético** (GA) (Jensen, 1999; Blommers et al, 1992) que tira seus conceitos e terminologias da biologia. O conceito deste algoritmo foi primeiramente introduzido por Holland (Holland, 1975). A idéia é ter uma “população” de conformações, cada uma caracterizada por um conjunto de “genes” (ângulos de torção). Os “pais” são cruzados para gerar “filhos” que tem uma mistura de genes dos “pais”, este processo é denominado mutação. É um método de otimização baseado na evolução Darwiniana, que consiste de transformações sucessivas de uma geração de uma série de confôrmeros numa outra geração usando as operações de seleção (confôrmeros com menor energia são mais aptos do que confôrmeros de maior energia), permutação e mutação. Desde que o processo de seleção é influenciado pela conformação de menor energia, o método GA leva à uma coleção de confôrmeros de menor energia.

No primeiro estágio, os ângulos torcionais da estrutura de partida são aleatoriamente escolhidos dentre os ângulos de ligação torcionais. Assumindo

que a distância de ligação e os ângulos de ligação são constantes, a conformação de uma molécula pode ser descrita por um conjunto de ângulos torcionais. Usando este conjunto de ângulos torcionais inicial, uma população de conformações é gerada.

Tendo gerado 100 “filhos”, por exemplo, suas energias são determinadas e porções de melhores estruturas “pais” e “filhos” são carregadas sobre a próxima geração. Cada indivíduo (cromossomo) da população tem um valor de “saúde”. As conformações obtidas de um cromossomo mutante são evoluções e este procedimento é repetido por várias gerações.

Uma pequena quantidade de “mutações” é usualmente permitida no processo, isto é, ângulos são aleatoriamente mudados para produzir conformações fora da faixa contendo a população corrente.

É aceito que propriedades físico-químicas e características estruturais de compostos químicos governam sua potência biológica.

Os **descritores físico-químicos** representam uma forma de informações químicas, contidas na estrutura molecular, os quais são transformados e codificados de acordo com problemas toxicológicos, farmacológicos e químicos nos estudos de QSAR. Descritores moleculares levam em conta diferentes aspectos das informações químicas. O modo de obter estas informações pode (a) ser através de experimentos ou de cálculos teóricos; (b) considerar a molécula toda, fragmentos desta ou grupos funcionais; (c) requerer o conhecimento da estrutura 3D da molécula ou seu gráfico molecular ou simplesmente sua fórmula; ou (d) exigir informações definidas pelos valores escalares, campos escalares ou vetoriais. Nos últimos anos, vários métodos tem sido explorados e muitos tipos de descritores moleculares tem sido propostos.

Dentre os descritores teóricos, os mais conhecidos são o peso molecular e os descritores estruturais (descritores 1D, isto é, a quantidade de ligações, átomos de diferentes tipos, quantidade de grupos funcionais e fragmentos, e o número de anéis de tamanhos diferentes), obtidos de um simples conhecimento da fórmula e descritores topológicos (descritores 2D), obtidos do conhecimento da topologia molecular.

A complexidade das informações químicas contidas nas estruturas moleculares 3D exige descritores hábeis a levar em conta propriedades relacionadas a representações tridimensionais mais completas das moléculas.

O tipo de parâmetro apropriado para a pesquisa de novos fármacos depende do problema em questão, isto é, se há interesse no desenvolvimento de uma série ou na dedução de relações estrutura-atividade. No primeiro caso, somente parâmetros que possam ser calculados diretamente da estrutura química podem ser usados, enquanto que no segundo caso pode-se também usar parâmetros medidos.

Usando valores medidos em análise de estrutura-atividade relações mais realísticas podem ser obtidas, mas altos custos experimentais são normalmente requeridos. No caso do experimento requerer menos esforço do que os cálculos, usa-se as medidas experimentais.

**Índice de conectividade molecular  $\chi$  (Kubinyi, 1993)** é calculado a partir de fórmulas moleculares num único caminho e devido a sua definição matemática, algumas propriedades físico-químicas de isômeros ramificados e não ramificados podem ser descritos com alta precisão.

Hall e Kier desenvolveram índices de conectividade molecular (**Kier *Chi***) que refletem a identidade do átomo, o ambiente ligado e o número de ligações de hidrogênio. Estes índices Kier são úteis numa ampla variedade de aplicações (**Hall e Kier, 1992**).

Os índices *Chi v* são definidos em termos de  $\delta^V$  (número de vizinhos *i*), o qual possui informações sobre a identidade do átomo *i*:

- para a primeira fileira de átomos,  $\delta^V_i = Z^V_i - h_i$
- para outros átomos,  $\delta^V_i = (Z^V_i - h_i) / (Z_i - Z^V_i - 1)$

onde  $Z^V_i$  é o número total de elétrons de valência do *i*, e  $Z_i$  é o número atômico de *i*.

Muitos índices topológicos tem sido criados nos últimos anos. **Similaridade molecular**  $R_{AB}$  é determinada a partir das propriedades estruturais  $P_A$  e  $P_B$  de duas moléculas comparadas, através do **Índice Carbo** (**Carbo et al, 1980**). Em 1980, Carbo e colaboradores propuseram uma medida de similaridade: duas moléculas comparadas são sobrepostas

computacionalmente, e sua similaridade  $S$  é expressa em termos de distribuição de carga ( $\rho_1$  e  $\rho_2$ , Eq. 3)

$$R_{AB} = \int \rho_1 \rho_2 dv / (\int \rho_1^2 dv)^{1/2} (\int \rho_2^2 dv)^{1/2} \quad (3)$$

A **similaridade de forma** é avaliada de uma maneira similar usando uma versão modificada da equação Carbo (Eq.3) (**Good et al**, 1953) proposta por Meyer (**Meyer e Richards**, 1991). O mecanismo de avaliação da similaridade é o mesmo aplicado a densidade de carga. Para similaridade de forma, cada ponto da caixa é testado para ver se cai dentro da superfície de van der Waals de cada molécula. Os resultados são aplicados para a seguinte versão modificada do **índice Carbo**:  $S_A = B / (T_A T_B)^{1/2}$  (Eq. 4), onde  $B$  é o número de pontos que caem dentro de ambas as moléculas, enquanto  $T_A$  e  $T_B$  são o número de pontos que caem dentro de cada molécula individualmente.

**Descritores WHIM** (*Weighted Holistic Invariant Molecular*) são índices moleculares 3D que representam diferentes fontes de informações químicas. Estes descritores contêm informações sobre forma, simetria e distribuição atômica. Estes índices são calculados de coordenadas  $x$ ,  $y$ ,  $z$  de uma estrutura 3D da molécula, usualmente de uma conformação espacial de energia mínima (**Todeschini e Gramatica**, 1997).

O programa **DRAGON** v1.1-2000 (**Todeschini and Consonni**, 2000) calcula descritores moleculares a partir dos gráficos moleculares através do somatório dos produtos dos pesos dos átomos terminais em todas as trajetórias da extensão considerada. Autocorrelogramas 2D são plotados para mostrar a similaridade molecular com base na conectividade. Estes gráficos podem ser “pesados” com uma propriedade atômica, por exemplo raio de van der Waals (**Broto et al**, 1984). DRAGON calcula autocorrelações-2D para Moreau-Broto (**ATS**) e Moran (**MATS**) (**Moran**, 1950). Também calcula descritores através do somatório dos pesos dos átomos vistos por uma função escalonada angular diferente (**Mor**) (**Schuur e Gasteiger**, 1997).

A atividade biológica raramente depende de uma ou duas propriedades químicas isoladamente e, portanto, uma matriz complexa de dados deverá ser analisada. Dados biológicos podem ser de dados de afinidade (**DI<sub>50</sub>**) a

complexos dados *in vivo*, refletindo somente a atividade ou inatividade de um composto. Os dados biológicos e outras propriedades são conhecidos como variáveis dependentes. São usualmente determinadas por medidas experimentais ou observações de alguns sistema teste relevante (**van de Waterbeemd**, 1994).

As variáveis independentes são propriedades físico-químicas, tais como  $\pi$  e  $\sigma$ , as quais dependem da estrutura química e não dependem dos dados biológicos. Podem ser determinadas experimentalmente ou podem ser calculadas.

Centenas de parâmetros físico-químicos podem ser calculados através de programas computacionais. Porém, quantos e quais parâmetros estão realmente relacionados a atividade biológica? Empregando regressão múltipla linear (MRL) para regressão de dados, deve-se respeitar a razão de, no mínimo, 1 parâmetro para cada 5 compostos e observar que são altas as chances de correlação (multicolinearidade) e isto pode causar soluções superestimadas. Isto pode ser resolvido realizando uma seleção de variáveis e só depois empregar a **MRL** ou pode empregar as técnicas multivariáveis baseadas na componente principal como mínimos quadrados parciais (*Partial Least-Squares Regression – PLS*) (**Ferreira**, 2002).

Os parâmetros físico-químicos devem ser padronizados, através de um pré-processamento. A matriz original normalmente não apresenta uma distribuição de valores ótimo para as análises (possui diferentes unidades ou variância nas variáveis), que requerem algum pré-tratamento para a análise de dados. O auto escalonamento, em geral é empregado, resultando em variáveis com variância entre zero e um.

A **PCA** (**Ferreira**, 2002; **Levingstone**, 1995, **Kubinyi**, 1993; **Cupon**, 1990) é o método mais adequado para análise de dados multivariáveis.

A PCA pode ser encarada por três pontos de vista:

- método de transformar variáveis correlacionadas em variáveis não correlacionadas;
- método para encontrar combinações lineares com variabilidade relativamente pequena ou grande;
- ferramenta para redução de dados.

Um banco de dados contendo informações estruturais, eletrônicas e/ou estereoquímicas sobre os compostos estudados é construído. A análise inicia com uma **normalização** do banco de dados. Cada parâmetro físico-químico, ou descritor, é padronizado para que sejam evitados problemas quanto a ordem de grandeza destes. Usualmente, estes são padronizados empregando-se um procedimento conhecido como “média dividida pelo desvio padrão da média” para cada parâmetro (Eq.5). Desta forma, todos os parâmetros estariam dentro de um intervalo de 0 a 1.

$$\hat{X}_{ij} = X_{ij} - X_{(med)j} / \sigma \quad (5)$$

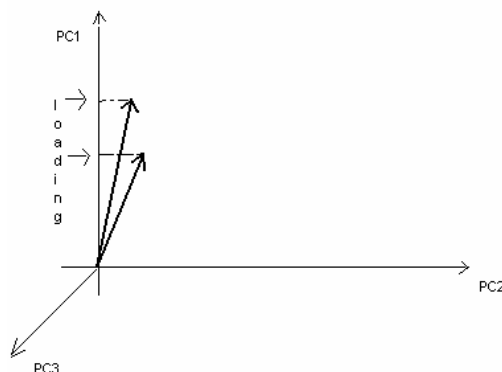


Figura 2 – Representação da relação entre os vetores de dados (variáveis).

Trabalhando os pontos representando variáveis, pela origem do gráfico da PC é possível construir vetores (**loading**) em duas dimensões de espaço PC (Fig.2).

Os *loadings* dessas variáveis são encontrados pela projeção das linhas nos eixos PC. *Loadings* é a contribuição da variável em cada PC.

Os parâmetros mais importantes são selecionados em um gráfico de pesos. A figura 3 ilustra como seria este gráfico.

Por exemplo:  $PC1 = x_1Par1 + x_2Par2 + \dots$ , onde  $x_1, x_2, \dots$  são coeficientes dos parâmetros,  $Par1, Par2, \dots$  são os descritores ou parâmetros físico-químicos.

PC1 é definida na direção da variância máxima do conjunto de dados. PC2 é a direção que descreve a variância máxima, ortogonal à PC1. As





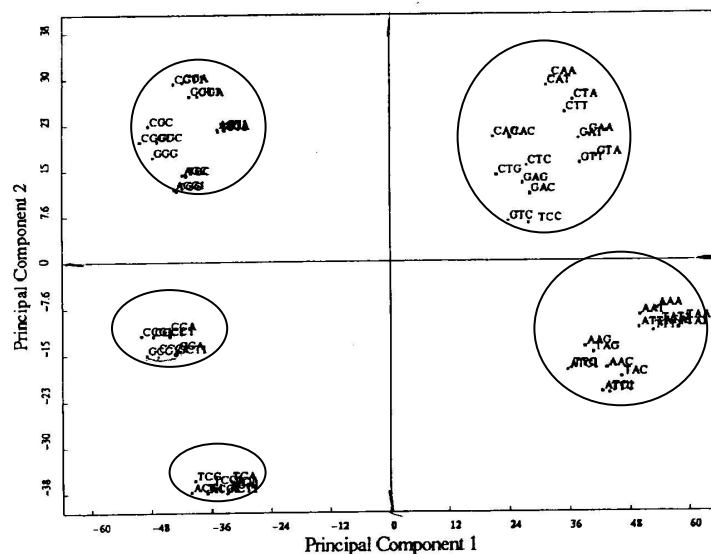


Figura 4 – Análise de PCA

A análise de grupos investiga a existência de grupos naturais (*cluster*) de objetos (Fig. 4). Quando grupos podem ser determinados, a similaridade entre os membros de um grupo tem de ser estabelecida.

**Análise de *cluster*** (*Hierarchical Cluster Analysis, HCA*) é outro importante método multivariável de análise de dados. Seu objetivo é dispor os dados de maneira a enfatizar seus grupos (*cluster*) naturais (Ferreira, 2002; Levingstone, 1995, Kubinyi, 1993).

HCA opera pelo uso de medidas da distância entre pares de objetos no espaço multidimensional, tal como a familiar distância Euclidiana. Objetos (compostos) são “aproximados” num espaço tornando-os membros de um único grupo. Para um nível de similaridade um dado número de grupos será formado de um conjunto de dados particular.

A base é o cálculo de distâncias entre objetos num espaço multidimensional usando uma equação como (Eq.6):

$$d_{ij} = (\sum (d_{i,k} - d_{j,k})^2)^{1/2} \quad (6)$$

Os resultados, os quais são de natureza qualitativa, são apresentados na forma de um dendograma (Fig. 5), o que permite visualizar os dados num espaço bidimensional.

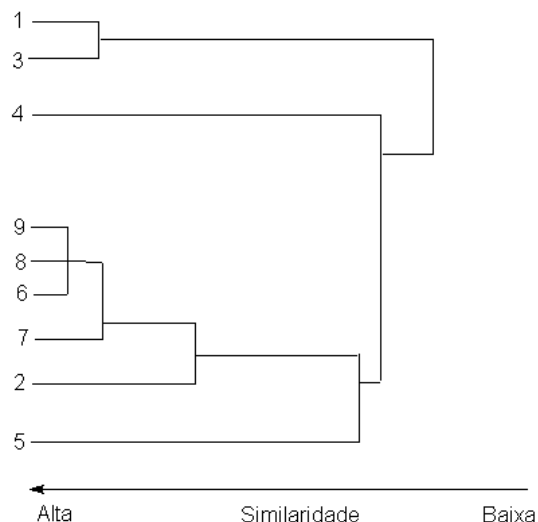


Figura 5 – Ilustração de um dendograma.

Já quando se busca resultados quantitativos é necessário realizar uma **análise de QSAR**. O estudo de QSAR representa um importante estágio no desenvolvimento da compreensão dos processos e fatores controladores da ação dos fármacos, incluindo o papel da hidrofobicidade. Muitas predições com sucesso tem sido realizadas a partir de equações de QSAR, levando a identificação de compostos com potência aumentada. Equações de QSAR tem fornecido a direção para melhorar a seletividade de ação e decidir quando terminar uma série de compostos. Desta forma, com o desenvolvimento de uma série de compostos baseado em QSAR, mais informações por composto sintetizado podem ser obtidas, levando a um aumento da eficiência.

Uma equação de QSAR é uma correlação entre dados biológicos e químicos obtidos por regressão MRL.

O papel dos métodos estatísticos é identificar correlações entre propriedades físicas (descritores) e a atividade. Esta correlação não pode surgir por chance, ou seja, é necessário mostrar que há uma real relação entre propriedades físicas-químicas e a atividade.

A **regressão múltipla** calcula uma equação (modelo) (Eq.7) que descreve a relação entre uma única variável dependente  $y$  (por exemplo,

resposta biológica) e várias variáveis independentes  $x$ ; é uma extensão da regressão linear (**Levingstone**, 1995).

$$y = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_nx_n + c \quad (7)$$

onde  $a_1$ ,  $a_2$ , etc. e  $c$  são constantes escolhidas para dar o menor erro entre os valores reais de  $y$  e os valores preditos de  $y$  usando esta equação.

Na **MRL** as equações são constituídas para maximizar a explanação da correlação entre variáveis dependentes e independentes. A variância no conjunto independente é ignorada, os coeficientes de regressão são calculados baseado no ajuste de  $y$  às variáveis  $x$ .

Em geral, a equação de regressão pode ser aceita em estudos de QSAR,

- se o coeficiente de correlação  $r$  está em torno de ou melhor que 0,9 para dados *in vitro* e 0,8 para dados em animais (esses valores não dependem somente da qualidade do modelo, mas também da variância total dos dados biológicos);
- se o desvio padrão  $s$  não é maior do que o desvio padrão do dado biológico;
- se o valor de  $F$  indicar que os níveis de significância totais são melhores do que 95%;
- se o intervalo de confiança de todos os coeficientes de regressão provam que eles são justificados ao nível de 95% de significância (ou seja, seus valores de intervalos de confiança são menores que os valores absolutos dos coeficientes de regressão) (**Kubinyi**, 1993).

Dados biológicos devem cobrir uma faixa de no mínimo um, melhor dois ou mais unidades de logaritmo.

Por razões estatísticas, a análises de regressão múltipla não podem ser usadas em métodos de QSAR-3D por considerarem mais descritores 3D do que compostos. A alternativa estratégica (PLS) pode ser usadas para encontrar um modelo quantitativo em tais situações. A validação cruzada é uma importante técnica para assegurar a robustez do modelo proposto.

A análise de **PLS** (**Ferreira**, 2002; **Levingstone**, 1995, **Kubinyi**, 1993) pode ser usada para explicar potências biológicas quando um grande número

de descritores intercorrelacionados são usados na análise. Quando várias propriedades mostram uma variação similar com relação a todos os compostos, essas propriedades podem ser vistas como sendo membros de uma única família. PLS descobre as famílias de variáveis que estão correlacionadas com a atividade biológica, gera um conjunto de variáveis perfeitamente ortogonais, chamadas variáveis latentes (LVs), cada uma altamente correlacionada com uma única família de descritores e “pobremente” correlacionada com as demais famílias.

Uma análise de PLS pode, a grosso modo, ser descrita como uma PCA somada a uma regressão múltipla linear.

Durante uma análise de PLS, uma PCA, é realizada no banco de dados de forma que a maior variância possível seja descrita pelo menor número de componentes. Ou seja, o método PLS é uma técnica de regressão que faz uso de quantidade tipo PCs deduzidas do conjunto de variáveis independentes. As PCs em PLS são chamadas variáveis latentes (LV) (Eq.8).

$$Y = a_1 LV_1 + a_2 LV_2 + \dots + a_n LV_n + C \quad (8)$$

onde  $a_1 \rightarrow a_n$  coeficientes produzidos pela PLS.

A PLS é um método de ajuste de curva muito poderoso. Este método caracteriza-se por ser capaz de tratar bancos de dados muito grandes com eficiência e rapidez e principalmente, possuir uma grande capacidade de evitar vícios de análise tais como os conhecidos por “correlações pôr chance”.

Durante o processo de construção das PCs, ou componentes principais, a variável dependente, o parâmetro biológico é incluído de forma que em cada PC contenha os parâmetros físico-químico, ou descritores, mais importantes para a descrição da diversidade estrutural do banco de dados. Simultaneamente, uma correlação matemática, através de uma regressão múltipla com os dados dependentes, é procurada (Figura 6).

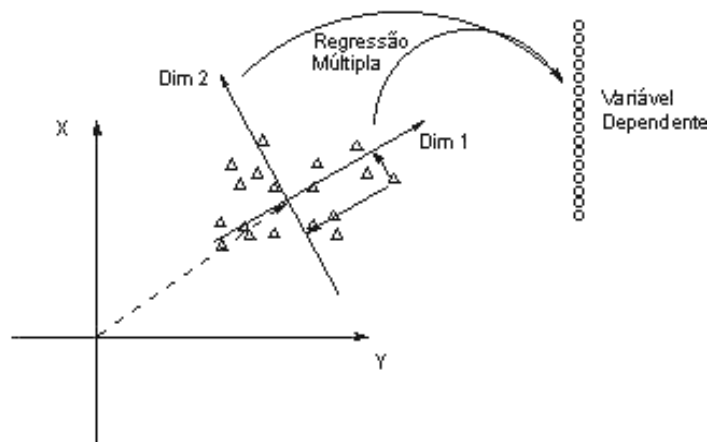


Figura 6 – Representação esquemática de uma análise de PLS.

Isto implica, matematicamente, em realizar-se uma operação de redução de variáveis onde não só a significância estatística de cada parâmetro físico-químico em uma determinada componente principal seja avaliada, mas também sua correlação com a propriedade desejada será testada e, mais ainda, que ela influencie na determinação da composição das componentes.

Um procedimento de validação cruzada (Fig.7) pode ser usado para selecionar o modelo com alta habilidade preditiva. Em corridas de PLS, muitas validações cruzadas são realizadas nas quais um ou vários objetos são eliminados do conjunto de dados aleatoriamente ou de forma sistemática. Somente os objetos excluídos são preditos pelo correspondente modelo.

Um procedimento comumente usado para estimar o erro do modelo de PLS é a validação cruzada **LOO** (*leave-one-out*):

A diferença em habilidade de previsão entre dois modelos é avaliada por PRESS (Eq.9).

$$\text{PRESS} = \sum (Y_i - Y_{\text{med. } i})^2 \quad (9)$$

O desvio padrão  $s_{\text{press}}$  é tomado como critério para o número ótimo de componentes.  $S_{\text{Press}}$  é calculado a partir do PRESS, a soma do erro ao quadrado dividido pelo número de graus de liberdade (Eq.10).

$$S_{\text{Press}} = \sum \text{PRESS}^2 / n-k-1 \quad (10)$$

onde  $n$  é o número de objetos e  $k$  é o número de variáveis (**Kubinyi, 1993**).

Quão mais significativas forem as componentes deduzidas numa análise de PLS, PRESS e  $s_{\text{PRESS}}$  decrescerão; se muitas componentes são extraídas, resultados superestimados são obtidos e PRESS e  $s_{\text{PRESS}}$  aumentam.

O **coeficiente de correlação  $r^2$**  é definido em análise de PLS como numa análise de regressão.

A análise de PLS tem um número de importantes vantagens quando comparada com análise de regressão, entretanto somente em poucos casos tem sido usado em estudos de QSAR clássico. Uma explicação pode ser a complexidade do algoritmo e a melhor disponibilidade de programas de computador para análise de regressão. Considerando a aplicação de métodos de QSAR 3D, por exemplo CoMFA, análise PLS é o método de escolha devido a sua habilidade para manusear grande número de parâmetros físico-químicos. Neste caso, PLS é usada para modelar a relação entre as energias de interação dos pontos da grade e a variável dependente.

As **relações estrutura-atividade quantitativa tridimensional (QSAR-3D)** são modelos quantitativos que relacionam a atividade biológica de pequenas moléculas com suas propriedades calculadas no espaço 3D. Todos os métodos de QSAR-3D combinam modelagem molecular e análise estatística da potência biológica em estudo dentro de um conjunto de compostos.

Todas as técnicas de QSAR assumem que (1) todos os compostos estudados ligam-se da mesma forma ao alvo biológico; (2) compostos estruturalmente similares são orientados de forma similar no sítio receptor em comum; (3) a dinâmica do sistema pode ser negligenciada. Os métodos diferem na forma de descrever os compostos e em como achar a relação entre propriedades 3D e bioatividade. Como em todos os métodos QSAR, modelos de QSAR-3D são posteriormente usados para prever a potência de compostos ainda não testados.

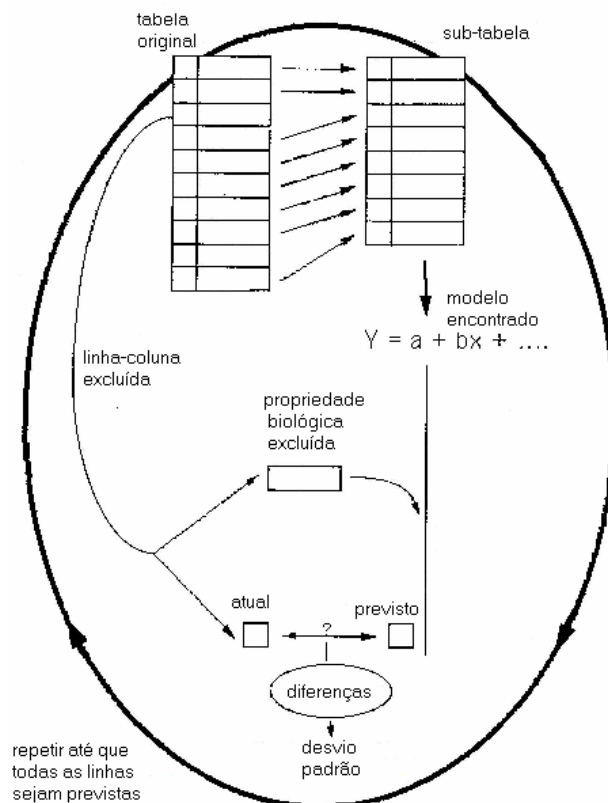


Figura 7 – Processo de validação cruzada.

O **3D** significa que os compostos são descritos pela localização relativa de propriedades no espaço tridimensional. Usualmente, os métodos consideram propriedades estereoquímicas, eletrônicas, ligação de hidrogênio e hidrofóbica (lipofílica). Os descritores moleculares 3D de cada composto são variáveis independentes da atividade biológica em questão. As propriedades 3D usadas podem ser associadas explicitamente ou implicitamente com as posições XYZ e podem chegar a milhares.

Para aplicar uma metodologia QSAR-3D, em muitos casos o usuário ou o programa seleciona a conformação mais adequada para cada molécula e realiza o alinhamento com as demais moléculas estudadas. Sendo assim, o alinhamento molecular inclui duas decisões geométricas: uma para determinar a relevância conformacional e a segunda para decidir como sobrepor as conformações. Este é provavelmente o passo mais crucial em QSAR-3D.

De modo geral, QSAR pode ser uma estratégia mais fácil para responder questões do tipo: como a lipofilicidade destes substituintes tem



alguma influência na potência? Experiências sugerem que é útil aplicar ambos os métodos de QSAR 2D e 3D.

O “**Q**” e o “**R**” distinguem os métodos QSAR e QSAR-3D de outros métodos de desenvolvimento de fármacos. A relação quantitativa descreve como a mudança estrutural relata a correspondente mudança em algumas propriedades, tais como atividade biológica.

O “**S**” em QSAR designa a estrutura de, geralmente, pequenas moléculas que servem como ligante para exercer o efeito biológico de interesse. QSAR-3D trata um conjunto de compostos estruturalmente diversos, chamado **série de treinamento**, assumindo que ligam-se ao mesmo alvo e provocam a mesma resposta biológica. Um conjunto de compostos não usado para deduzir o modelo é reservado para testar a capacidade preditiva (**série de teste**).

Usualmente, um mínimo de 15 compostos são necessários para realizar uma análise de QSAR-3D, porém quanto maior o número de compostos incluídos na análise mais robusto é o modelo. No mínimo 5 compostos são requeridos para cada propriedade incluída no modelo final. Uma segunda consideração é o problema de correlação por chance que pode ocorrer se muitas propriedades independentes são exploradas com um pequeno número de compostos. Este risco é pequeno para os modelos estatísticos comumente usados em QSAR-3D.

O “**A**” em QSAR se refere a propriedade biológica medida apresentada pelos compostos. Usualmente, é expresso como o logaritmo do inverso da concentração molar necessária para produzir uma resposta biológica predeterminada, tal como 50% de inibição de uma enzima ( $pDI_{50}$ ).

A metodologia de QSAR-3D consiste de três passos fundamentais: alinhamento de todas as moléculas num mesmo sistema de coordenadas, cálculo de propriedades moleculares e análise computacional das relações. Os processos adotado em três fases estão intercorrelacionados num dado método, a ligação entre estes é somente uma questão de conveniência. Novas estratégias para todos esses passos são continuamente desenvolvidas.

A conformação bioativa não necessariamente corresponde ao confôrmero de energia mínima global calculado no vácuo ou detectado experimentalmente em solução ou num cristal. Entretanto, determinar as conformações e os alinhamentos a serem usados facilita propor uma plausível sobreposição de diversos compostos se há no mínimo um composto ativo rígido no banco de dados.

Se uma série treinamento incluir somente congêneros, pode-se sobrepor os compostos mediante o esqueleto em comum, alinhando tanto quanto possível cada estrutura. Nestes casos, a conformação escolhida como subestrutura comum pode não afetar os resultados estatísticos.

O conceito de farmacóforo fornece um maneira de identificar um alinhamento para um conjunto não congênere. Um farmacóforo é um arranjo tridimensional de pontos que o composto deve possuir para apresentar uma propriedade biológica particular.

O melhor alinhamento para QSAR-3D não necessariamente coincide com os ligantes na conformação ligante-receptor (**Norinder**, 1998). Para investigar como melhor alinhar as moléculas para QSAR-3D, Klebe e Abraham estudaram 20 compostos usando alinhamentos deduzidos experimental e teoricamente (**Klebe e Abraham**, 1993). Os alinhamentos baseados em dados cristalográficos do complexo ligante enzima foram estatisticamente piores do que os resultados obtidos através do alinhamento deduzido da modelagem dos ligantes. Os autores explicaram que compostos estruturalmente similares não sobrepõem exatamente no mesmo sítio de ligação. Numa QSAR-3D, tais alinhamentos aparentemente ruins a princípio acrescentam mais “ruídos” do que “sinais” às propriedades usadas para obter o modelo. Investigações similares com inibidores de HIV-1 protease demonstraram que a melhor habilidade preditiva de compostos não está no conjunto de dados, assim como a melhor estatística para estes no conjunto de dados, é encontrada através do alinhamento que ignora o sítio de ação, exceto para encontrar a conformação bioativa de cada um dos ligantes da série utilizada na análise.

A prática de sobreposição de compostos com alta e baixa potência não é fisicamente realista, todavia produz modelos QSAR-3D preditivos. Um alinhamento molecular efetivo reflete mais do reproduz a realidade; isto é, as

moléculas sobrepostas descrevem as causas melhor do que as conseqüências das suas diferentes afinidades com o receptor.

Desde que Cramer e colaboradores (**Cramer et al**, 1988) introduziram a análise de **CoMFA**, em 1988, este tem-se tornado o ponto chave em QSAR-3D. Neste método, PLS é utilizado para relacionar atividade biológica de um conjunto de compostos com um alinhamento específico e seus campos de energia de interação 3D. Estes campos são determinados numa grade 3D colocada sobre as estruturas químicas.

O método CoMFA é intuitivamente diferente de todos os outros métodos conhecidos como QSAR-3D e é baseado na análise estatística dos campos de interação 3D. Estes são gerados medindo sobre uma caixa 3D regular a energia de interação entre uma sonda (átomo ou grupo) e o sítio de ação.

Das primeiras formulações de um modelo de grade para comparar moléculas alinhadas com um farmacóforo e mapeando seus campos num grade tridimensional, foram aproximadamente 10 anos até o modelo CoMFA ser definido, como usado atualmente. Para ilustrar o grau de inovação, pode ser mencionado que o livro *Quantitative Drug Design*, compreendendo 766 páginas e publicado em 1990, contém menos que 1 página sobre métodos de QSAR relacionado à CoMFA, no qual somente três anos após numerosas aplicações tem provado a utilidade do método CoMFA (**Kubinyi**, 1993).

A idéia básica de CoMFA é que uma amostragem adequada de campos estéreo e eletrostático em torno da molécula pode fornecer todas as informações necessárias para explicar suas propriedades biológicas. As contribuições estéreo e eletrostáticas para a energia de interação entre o ligante e a sonda selecionadas são calculadas numa grade tridimensional de pontos regularmente espaçados abrangendo o ligante. Este método só está disponível no pacote de programas SYBYL .

Há vários passos importantes e críticos num estudo de CoMFA. O procedimento utilizado num estudo de QSAR-3D para chegar num modelo preditivo é apresentado na Figura 8.

Inicialmente, um grupo de compostos tendo uma atividade comum é selecionado. Então, estruturas tridimensionais de justificada conformação podem ser geradas de estruturas bidimensionais. Alternativamente, estruturas

tridimensionais deduzidas de análises cristalográficas ou estudos de RMN 2D podem ser usadas.

As estruturas 3D do conjunto de treinamento são alinhadas com base em fatores moleculares em comum, tal como ocupação de mesmo volume no espaço. A energia de interação de uma pequena sonda é medida com cada um dos compostos do conjunto treino colocados na grade coordenada no espaço. As estruturas minimizadas são colocadas em um banco de dados de forma apropriada de acordo com suas similaridades químicas usando uma hipótese de farmacóforo e postulando regras de orientação. O alinhamento molecular, isto é, a seleção da orientação relativa de uma certa estrutura 3D, é o mais importante determinante num estudo de CoMFA.

Os campos que uma certa sonda experimenta num ponto da grade são calculados para cada molécula, levando a centenas de colunas no bloco X (Figura 9).

O campo de força comumente usado nos estudos de CoMFA é muito simples e inclui dois termos (a) potencial de Leonard-Jones 6-12 para interações de van der Waals; (b) termo coulombico para interações eletrostáticas. Considerando o grande número de estudos de CoMFA com sucesso, estes dois termos tem sido suficientes em muitos casos (**Tand e Hecht**, 1995; **Kromer e Liedl**, 1996).

Grandes valores de energia positiva, isto é pontos da grade dentro da molécula, são agrupados a certos valores de *cut-off* para evitar valores de energia grandes e não realistas.

CoMFA normalmente considera as energias estereo e eletrostática separadamente para facilitar a interpretação dos resultados. Um estudo de CoMFA pode resultar numa tabela de dados contendo algumas centenas ou milhares de descritores (Figura 9).

PLS é usado para encontrar a correlação entre estes pontos no espaço e a atividade. A equação de regressão resultante relata a importância de cada ponto no espaço em descrever y (potência biológica) e pode ser mapeado gerando mapas de regressão estereo e eletrostático 3D. Estes mapas representam regiões no espaço externo em torno das moléculas onde é favorável ou desfavorável a interação dos fármacos com o receptor.

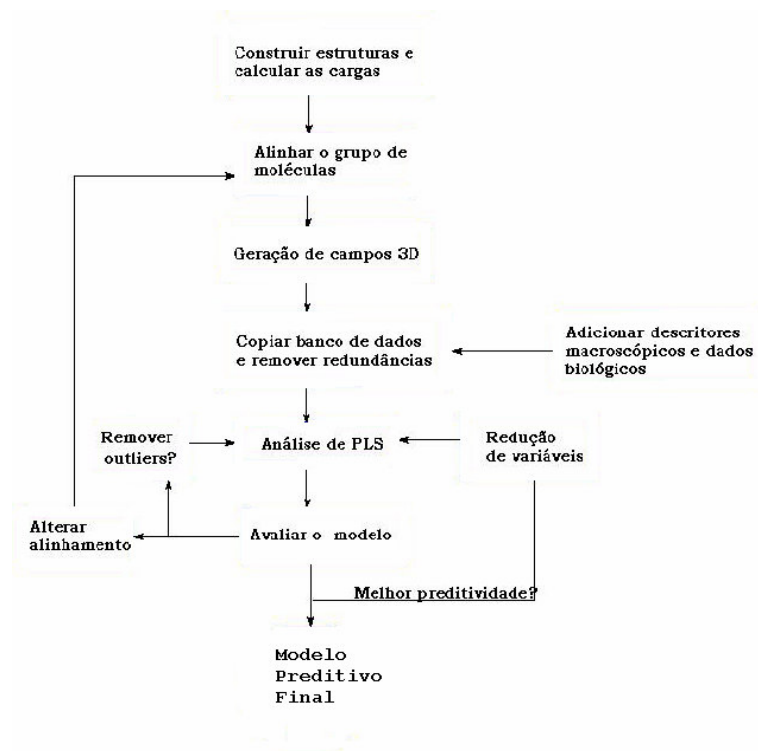


Figura 8 - Fluxograma mostrando o procedimento QSAR-3D (van de Waterbeemd, 1994).

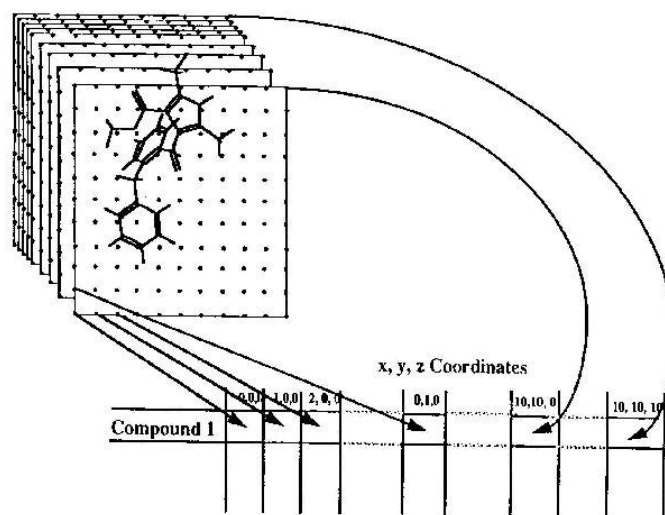


Figura 9 – As energias de interação entre a sonda (átomo ou molécula) e a molécula são medidas numa caixa 3D regular (*grid*) e cada ponto no espaço torna-se um descritor numa análise de QSAR. No caso do CoMFA, cada ponto no espaço torna-se um descritor eletrostático e estéreo numa análise de QSAR.

O risco de correlações por chance parece ser pouco em estudos de CoMFA se orientações arbitrárias de moléculas são selecionadas de um razoável alinhamento ou se uma série de números aleatórios são correlacionados com atividades biológicas. Por outro lado, CoMFA oferece muitos Grandes valores de energia positiva, isto é pontos da grade dentro da molécula, são agrupados a certos valores de *cut-off* para evitar valores de energia grandes e não realistas.

CoMFA normalmente considera as energias estereo e eletrostática separadamente para facilitar a interpretação dos resultados. Um estudo de CoMFA pode resultar numa tabela de dados contendo algumas centenas ou milhares de descritores (Figura 9).

PLS é usado para encontrar a correlação entre estes pontos no espaço e a atividade. A equação de regressão resultante relata a importância de cada ponto no espaço em descrever *y* (potência biológica) e pode ser mapeado gerando mapas de regressão estereo e eletrostático 3D. Estes mapas representam regiões no espaço externo em torno das moléculas onde é favorável ou desfavorável a interação dos fármacos com o receptor.

pontos diferentes, resultantes de alinhamentos pouco distintos das moléculas ou certo lado da cadeia, diferentes posições ou tamanhos da caixa, diferentes distâncias entre os pontos do *grid*, o uso de diferentes campos e variáveis adicionais, diferentes valores para *cut-off* de valores altamente positivos de energia, etc. Esta flexibilidade do método de CoMFA torna-se uma poderosa ferramenta para realizar estudos de QSAR, porém o risco de correlação por chance aumenta consideravelmente. Validação cruzada não garante evitar tal correlação por chance. Contudo, em conjunto de dados bem determinados, onde um pequeno número de objetos é selecionado para explorar um espaço paramétrico com um número mínimo de objetos, a validação cruzada falha porque os objetos eliminados não podem ser preditos pelo modelo deduzido a partir dos outros objetos. O procedimento de validação cruzada LOO dá um resultado muito otimista em dados redundantes, onde todos ou pelo menos muitos objetos tem vizinhos próximos num espaço paramétrico multidimensional.

A análise de **QSAR-4D** compreende liberdade conformacional e de alinhamento no desenvolvimento de modelos QSAR-3D para um conjunto treino de dados estrutura-atividade através de amostragem conformacional, a quarta “dimensão”. Hopfinger e colaboradores (**Hopfinger et al**, 1997) realizaram uma análise QSAR-4D onde os descritores eram medidas de ocupação (espacial), numa grade, dos átomos que compunham cada molécula num conjunto treino, obtidas da amostragem conformacional e alinhamento. Os descritores de ocupação da grade podiam ser gerados por átomo tipo, grupo e ou farmacóforo. Segundo Hopfinger, uma única conformação “ativa” pode ser postulada para cada composto no conjunto treino e combinada com o alinhamento ótimo para usar em outro estudo de QSAR-3D. Eles usaram PLS, regressão e algoritmo genético GA para reduzir os dados e identificar o melhor modelo.

Num outro trabalho, um estudo de QSAR-4D foi realizado por Vedani e colaboradores, utilizando o programa QUASAR, onde cada molécula pôde ser representada por uma amostragem conformacional, orientação e estado de protonação (**Vedani et al**, 2000).

## **2- PARTE EXPERIMENTAL**



## 2.1. SÍNTESES

A etapa sintética deste trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Síntese e Estrutura Atividade – LabSEAt, no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e as análises para caracterização dos compostos foram realizadas na Central de Análises do mesmo Departamento.

Os pontos de fusão foram determinados com um aparelho Microquímica AP-300. Os espectros de infravermelho (IV) foram registrados com um espectrômetro FT Perkin Elmer 16PC em pastilhas de KBr. Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- $H^1$ ) foram registrados num espectrômetro Bruker 200MHz com tetrametilsilano como padrão interno e os deslocamentos químicos apresentados em escala  $\delta$  (ppm). Os espectros de massas (MS) foram registrados num espectrômetro de massa Shimadzu GC-MS-2000<sup>A</sup> a 70 eV. A análise elementar foi determinada com um aparelho Perkin Elmer 2400. A pureza das substâncias foi monitorada por cromatografia de camada delgada (CCD) usando placas Merck de alumínio pré-revestido com sílica com 200 $\mu$ m de espessura com vários sistemas de solvente de diferentes polaridades. As manchas foram visualizadas usando lâmpadas de ultra violeta (UV). Os solventes e reagentes foram purificados de maneira usual. Todos os compostos foram caracterizados por dados espectrais (RMN- $H^1$ , MS, IV) e de análise elementar (CHN), os quais estavam de acordo com as estruturas propostas.

### 2.1.1. Síntese de 3,4-Dicloro-*N*-aril e *N*-alquilmaleimidias

#### 3,4-Dicloro-1 fenil-1*H*-pirrol-2,5-diona (11)

Ao anidrido dicloromaleico (3,13g; 18,7 mmol) foi adicionado ácido acético (30 mL). A mistura foi aquecida até refluxar. Anilina (1,75g; 18,0 mmol) foi adicionada e a mistura refluxada por 2 horas. Após, a mistura foi colocada sobre água/gelo (250 ml). O precipitado formado foi filtrado à vácuo, lavado com água, recristalizado em

etanol e seco em dessecador à vácuo, contendo hidróxido de potássio, produzindo 4,80g (70% de 11), p.f. 204-205°C (lit. 204-206°C (**Martins e Dickson**,1961)).

➤ Segundo o método descrito acima, o seguinte composto foi sintetizado:

### **1-Benzil-3,4-dicloro-1*H*-pirrol-2,5-diona (12)**

86,7%, p.f. 108-110°C (lit. 108-110°C (**Andricopulo et al**, 1998)).

### **2.1.2. Síntese de 3-cloro-4-X-*N*-aril e *N*-alquilmaleimidas, onde X = pirrolidino, piperidino, morfolino, deciltetrazolidinilfenóxi e p-metoxifenóxi.**

### **3-cloro-1-fenil-4-pirrolidin-1-il-1*H*-pirrol-2,5-diona (13)**

3,4-Dicloro-*N*-fenilmaleimida (3,0g;12mmol) foi dissolvida em 46mL de cloreto de metileno. Adicionou-se pirrolidina (1,70g; 24mmol). Esta solução foi mantida sob agitação por 2 horas, a temperatura ambiente. O solvente foi evaporado em rotavapor. O produto foi recristalizado em etanol e filtrado sob vácuo, e seco em dessecador à vácuo, contendo hidróxido de potássio, produzindo 2,62g (76,5% de 13), p.f. 135-136°C. C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requerida C,60.77; H,4.74; N,10.12; encontrada C,60.50; H,5.00; N,9.85; IV (KBr,cm<sup>-1</sup>) = 1762, 1706, 1634 (C=O), 1590 (Ar C=C); RMN-H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,40- 7,34 (m, 5H, ArH); 4,00 (t, 4H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>); 1,96 ( t, 4H, 2x CH<sub>2</sub>) ppm.

➤ Segundo o método descrito acima, os seguintes compostos foram sintetizados:

### **3-cloro-1-fenil-4-piperidin-1-il-1*H*-pirrol-2,5-diona (14)**

87%, p.f. 126-127°C (lit. 127-128°C (**Nunes**, 1986)).

### **3-cloro-4-morfolin-4-il-1-fenil-1*H*-pirrol-2,5-diona (15)**

67%, p.f. 160-161°C (lit. 160-161°C (Nunes, 1986)).

### **1-Benzil-3-cloro-4-pirrolidin-1-il-1H-pirrol-2,5-diona (17)**

54%, p.f. 98,5-99,30C. C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requerida C, 61.97; H, 5.20; N, 9.64 encontrada C, 61.78; H, 5.10; N, 9.36; RMN-H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,33-7,26 (m, 5H, ArH); 4,65 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,91 (t, 4H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>); 1,91-1,89 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>) ppm.

### **1-Benzil-3-cloro-4-morfolin-4-il-1H-pirrol-2,5-diona (18)**

46%, p.f. 95,5-96,5<sup>0</sup>C (lit. 96-97<sup>0</sup>C (Nunes, 1986)).

### **1-Benzil-3-cloro-4-piperidin-1-il-1H-pirrol-2,5-diona (19)**

70%, p.f. 53,5-55,0<sup>0</sup>C (lit. 53-54<sup>0</sup>C (Nunes, 1986)).

### **3-cloro-4-(4-metoxifenoxi)-1-fenil-1H-pirrol-2,5-diona (16)**

Ao p-metoxifenol (1,02g; 8,26mmol) e trietilamina (0,62g; 6,20 mmol) foi adicionada uma solução de 3,4-dicloro-1-fenil-1H-pirrol-2,5-diona 1 em 10 mL de cloreto de metileno. A solução foi mantida sob agitação por 2 horas. Após, a mistura foi extraída com ácido clorídrico aquoso 1M (4x 25mL), com hidróxido de sódio aquoso 10% (3x 25mL) e com água (3x 25mL), seca com MgSO<sub>4</sub>. O solvente foi evaporado sob vácuo, produzindo 0,68g (67% de 16), pf 128,6-129,8°C. C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>ClNO<sub>4</sub> requerida C,61.92; H, 3.67; N, 4.25; encontrada C,61.58; H, 4.00; N, 4.45; IV (KBr) = 1782, 1726, 1656 (C=O), 1598 (Ar C=C) cm<sup>-1</sup>; RMN-H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.46-7.35 (m, 5H, ArH), 7.16-6.89 (m, 4H, ArH OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-p-OMe), 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) ppm.

## **2.1.3. Clorossulfonação de 3-cloro-4-X-N-aril e N-alquilmaleimidas e de 1-fenilpirrolidina-2,5-diona (48)**

### **Cloreto de 4-(3,4-dicloro-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)benzenosulfonila (20)**

Ácido clorossulfônico (3,6g; 30mmol) foi adicionado lentamente a 3,4-dicloro-1 fenil-1*H*-pirrole-2,5-diona 1 (1,2g; 5mmol), a 0<sup>o</sup>C. A mistura reacional foi aquecida em banho-maria entre 50-60<sup>o</sup>C, por 15 minutos. Após, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e colocada sobre água/gelo (100mL) para formar o cloreto de sulfonila, que foi seco em dessecador à vácuo, contendo hidróxido de potássio (1,45g; 85%).

- Segundo o método descrito acima, os seguintes compostos foram sintetizados, salvo exceções descritas entre colchetes:

**Cloreto de 4-[(3,4-dicloro-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metil]benzeno sulfonila (21)**

80%, p.f. 186,5-187,5<sup>o</sup>C (lit. p.f. 186-187<sup>o</sup>C (**Nunes**, 1986)). M.S. 339, 345 (M<sup>+</sup>), 304, 308 (M<sup>+</sup>-Cl), 240, 242, 244 (M<sup>+</sup>-SO<sub>2</sub>Cl), 184, 166, 122, 118, 87.

**Cloreto de 4-(3-cloro-2,5-dioxo-4-pirrolidin-1-il-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il) benzeno sulfonila (22)**

90%, p.f. 122-123<sup>o</sup>C. M.S. 378, 377, 377(M<sup>+</sup>), 341, 339 (M<sup>+</sup>-Cl); C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S requerida C,44.81; H, 3.22; N, 7.47; encontrada C,44.91; H, 3.20; N, 7.45.

**Cloreto de 4-(3-cloro-2,5-dioxo-4-piperidin-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il) benzenosulfonila (23)**

74%, p.f. 88<sup>o</sup>C (decomposição). M.S. 392, 390, 388(M<sup>+</sup>), 355, 353(M<sup>+</sup>-Cl), 289, 291(M<sup>+</sup>-SO<sub>2</sub>Cl), 2187, 108, 87.

**Cloreto de 4-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)benzenosulfonila (49)**

[temperatura (80-90<sup>o</sup>C), tempo de reação (2horas)] (78%); p.f.193-195<sup>o</sup>C (lit. 192-194<sup>o</sup> (**Nunes**, 1986)).

#### 2.1.4. Preparação de derivados 3,4-dicloro-*N*-fenil e 3-cloro-4-*X-N*-fenilmaleimidobenzenossulfonílicos e derivados do cloreto de 4-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) benzenosulfonila (49).

##### **3-cloro-4-pirrolidin-1-il-1-[4-pirrolidin-1-ilsulfonil]fenil]-1*H*-pirrol-2,5-diona (24)**

Pirrolidina (0,42g; 5,88mmol) foi adicionada a mistura de cloreto de sulfonila 20 (0,5g; 1,47mmol) e metanol (10mL), a temperatura ambiente. A mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente, por 2 horas e colocada sobre água/gelo (30mL). O precipitado formado foi filtrado sob vácuo, lavado com água. O sólido obtido foi recristalizado em acetona/isopropanol e etanol e seco em dessecador à vácuo, contendo hidróxido de potássio, produzindo 0.71g (70% de 24); p.f. 178,7-180<sup>0</sup>C. C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S requerida C, 52.74; H, 4.92; N, 10.25; encontrada C, 52.46; H, 4.68; N, 9.95; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 3458 (NH), 1766, 1716, 1632 (C=O), 1594 (Ar C=C), 1344,1158 (SO<sub>2</sub>); RMN-H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>) 5: 7,91-7,58(m, 4H, ArH); 4,10-4,00 (t, 4H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>); 3,31-3,21 (t, 4H, SO<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>); 1,98-1,77 (t, 8H, 4x CH<sub>2</sub>); 1,79 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>) ppm.

- Segundo o método descrito acima, os seguintes compostos foram sintetizados, salvo exceções descritas entre colchetes:

##### **4-[(3-anilino-4-cloro-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metil]-*N*-fenilbenzenosulfonamida (25)**

82%, p.f. 190-191 °C (lit. 184-185<sup>0</sup>C (**Nunes**, 1986)). C<sub>23</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S requerida C, 59.04; H, 3.88; N, 8.98; encontrada C, 59.44; H, 4.91; N, 9.25; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 3468 (NH), 1772, 1716, 1666 (C=O), 1594 (Ar C=C), 1344,1158 (SO<sub>2</sub>).

##### **3-cloro-4-morfolin-4-il-1-[4-(morfolin-4-ilsulfonil)fenil]-1*H*-pirrole-2,5-diona (26)**

58%, p.f. 156,5-158,5<sup>0</sup>C (lit. p.f. 149-150<sup>0</sup>C (**Nunes**, 1986)). C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S requerida C, 48.92; H, 4.56; N, 9.51; encontrada C, 48.50; H, 4.34; N, 9.72 ; IV

(KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) = 3470 (NH), 1772, 1716, 1632 (C=O), 1592 (Ar C=C), 1343,1166 ( $\text{SO}_2$ ); RMN- $\text{H}^1$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,85- 7,60 (m, 4H,ArH); 4,08-3,01 (m, 16H, morfolino) ppm.

**4-{3-cloro-4-[(4-clorofenil)amino]-2,5-dioxo-2,5-1H-pirrol-1-il}-N-(4-clorofenil)benzenosulfonamida (28)**

70%, p.f. 215-216 $^{\circ}\text{C}$  (lit. p.f. 206-207 $^{\circ}\text{C}$  (Nunes, 1986)).  $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$  requerida C, 50.54; H, 2.70; N, 8.04; encontrada C, 50.35; H, 2.57; N, 8.35; IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) = 3330 (NH),1780, 1730, 1670 (C=O),1600 (Ar C=C), 1340,1160 ( $\text{SO}_2$ ).

**3-cloro-1-[4-(piperidin-1-ilsulfonil)benzil]-4-piperidin-1-il-1H-pirrol-2,5-diona(29)**

60%, p.f. 87-88 $^{\circ}\text{C}$ .  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}$  requerida C, 55.81; H, 5.80; N, 9.30; encontrada C, 55.80; H, 5.80; N, 9.30; IV (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) = 3452 (NH),1764, 1709, 1628 (C=O), 1344,1166 ( $\text{SO}_2$ ); RMN- $\text{H}^1$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,71-7,45(m, 4H, ArH); 4,69 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 3,90-3,80 (t, 4H,  $\text{N}(\text{CH}_2)_2$ ); 2,99-2,94(t, 4H,  $\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2$ ); 1,70-1,58 (m, 12H, 6x  $\text{CH}_2$ ) ppm.

**3-cloro-1-[4-(morfolin-4-ilsulfonil)benzil]-4-morfolin-4-il-1H-pirrol-2,5-diona (30)**

65%, p.f. 204-206 $^{\circ}\text{C}$ .  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}_6\text{S}$  requerida C, 50.05; H, 4.86; N, 9.22; encontrada C, 50.14; H, 4.68; N, 9.12; RMN- $\text{H}^1$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,68-7,55 (m, 4H, ArH); 4,70(s, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 3,99-2,96(m, 16H, 2x morfolino) ppm.

**4-metoxifenil-4-[3-cloro-4-(4-metoxifenoxi)-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il]benzenosulfonato (27)**

Cloreto de sulfonila 20 (0,5g; 2,06mmol) foi adicionado lentamente, em pequenas porções, a uma mistura de p-metoxifenol (1,02g; 8,26 mmol), trietilamina (0,627g; 6,20mmol) e diclorometano (20mL). A solução foi mantida sob agitação, a temperatura ambiente, por 2 horas. Em seguida, foi realizada uma extração adicionando inicialmente éter etílico (30mL) e água (7mL) a mistura reacional. Após, foi adicionado ácido clorídrico aquoso 2M (4x 25mL), com hidróxido de sódio 10% (4x 25mL) e com água (3x 25mL). O sólido obtido foi filtrado sob vácuo e seco em

dessecador à vácuo, contendo hidróxido de potássio, produzindo 0,153g (12% de 27); p.f. 140-141<sup>o</sup>C. C<sub>24</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>8</sub>S requerida C, 55.87; H, 3.52; N, 2.71; encontrada C, 55.39; H, 3.67; N, 2.95; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 3502 (NH), 1794, 1738, 1658 (C=O), 1594 (Ar C=C), 1340,1146 (SO<sub>2</sub>); RMN-H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,93-7,65 (m, 4H, ArH); 7,15-6,73 (m,8H, ArH-OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-p-OMe); 3,84 (s,3H, OCH<sub>3</sub>); 3,77 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) ppm.

**4-(3-cloro-2,5-dioxo-4-pirrolidin-1-il-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N,N-dimetilbenzenosulfonamida (31)**

Dimetilamina (0,14g; 3,12mmol) foi adicionada a mistura de cloreto de sulfonila 13 (0,59g; 1,56mmol) e metanol (10mL), a 0<sup>o</sup>C. A mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente, por 2 horas e colocada sobre água/gelo (30mL). O solvente foi evaporado em rota-vapor. O precipitado formado foi lavado com água e filtrado sob vácuo. O produto foi recristalizado em etanol e seco em dessecador à vácuo, contendo hidróxido de potássio, produzindo 0,15g (80% de 13), p.f. 199-200,6<sup>o</sup>C. C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S requerida C, 50.06; H, 4.73; N, 10.95; encontrada C, 50.17; H, 4.79; N, 10.64; RMN-H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,86-7,60 (m, 4H, ArH); 4,01 (t, 4H,N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>); 2,73 (s,6H,N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2,00-1,90 (m, 4H, 2x CH<sub>2</sub>) ppm.

- Segundo o método descrito acima, os seguintes compostos foram sintetizados, salvo exceções descritas entre colchetes:

**4-(3-cloro-2,5-dioxo-4-piperidin-1-il-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N,N-dimetilbenzenosulfonamida (37)**

47,5%, p.f. 217,5-219,5<sup>o</sup>C (lit. p.f. 218-219<sup>o</sup>C (**Andricopulo et al**, 1998)). RMN-H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,86-7,58 (m, 4H, ArH); 4,00-3,90 (t, 4H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>); 2,80-2,70 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,75-1,65 (m, 6H, 3x CH<sub>2</sub>) ppm.

**4-(3-cloro-2,5-dioxo-4-piperidin-1-il-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)benzenosulfonohidrazida (46)**

[tempo de reação (20 minutos), purificação (não foi purificado, devido a formação de uma substância altamente viscosa).

#### **4-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)-N,N-dimetilbenzenosulfonamida (50)**

69%, p.f. 202-203 (lit. p.f. 203-204<sup>0</sup>C (Nunes, 1986)). C<sub>21</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S requerida C, 51.05; H, 5.00; N, 9.92; encontrada C, 51.43; H, 4.91; N, 10.12; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 1780, 1712 (C=O), 1592 (Ar C=C), 1338, 1172 (SO<sub>2</sub>); RMN-H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,91- 7,53 (m, 4H, ArH); 2,94 (s, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 2,75 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub>) ppm.

#### **1-[4-(morfolin-4-ilsulfonil)fenil]pirrolidin-2,5-diona (51)**

[solvente utilizado na recristalização (acetona/isopropanol)] 57%, p.f. 237,5-238,5 (lit. 238-239<sup>0</sup>C (Nunes, 1986)). C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S requerida C, 51.84; H, 4.97; N, 8.64; encontrada C, 51.44; H, 4.79; N, 8.33; IV (KBr cm<sup>-1</sup>) = 1782, 1712 (C=O), 1594 (Ar C=C), 1340, 1182 (SO<sub>2</sub>).

#### **1-[4-piperidin-1-ilsulfonil)fenil]pirrolidin-2,5-diona (52)**

78%, p. f. 63,9-64,5<sup>0</sup>C. C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S requerida C, 55.88; H, 5.63; N, 8.69; encontrada C, 55.77; H, 5.34; N, 8.98; RMN-H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,88- 7,52 (m, 4H, ArH); 3,04-2,99 (t, 4H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>); 2,95 (s, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 1,75-1,38 (m, 6H, 3x CH<sub>2</sub>) ppm.

#### **4-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)benzenosulfonohidrazida (53)**

[tempo de reação (5 horas)] 41%, p.f. 162-163<sup>0</sup>C (lit. p.f. 163-164<sup>0</sup>C (Nunes, 1986)).

#### **N-(4-bromofenil)-4-(3-cloro-2,5-dioxo-4-pirrolidin-1-il-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)benzenosulfonamida (32)**

p-Bromoanilina (0,485g; 2,66mmol) foi adicionada a mistura de cloreto de sulfonila (22) (0,5g; 1,33mmol) e metanol (10mL), a temperatura ambiente. A mistura foi mantida sob refluxo, por 1 horas e colocada sobre água/gelo (30mL). O precipitado formado foi filtrado sob vácuo, lavado com água. O sólido obtido foi lavado com etanol e isolado por cromatografia Dry-flash em sílica gel usando acetato de



etila:hexano, 1:1 como eluente. (63%), p.f. 202-204<sup>0</sup>C. C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>BrClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S requerida C, 47.03; H, 3.35; N, 8.23; encontrada C, 47.32; H, 3.58; N, 8.47; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 3456 (NH), 1764, 1704, 1640 (C=O), 1590 (Ar C=C), 1342,1164 (SO<sub>2</sub>); M.S. 173, 156 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Br), 92 (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>N<sup>+</sup>), 65 (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub><sup>+</sup>), 64 (SO<sub>2</sub><sup>+</sup>), 44.

- Segundo o método descrito acima, os seguintes compostos foram sintetizados, salvo exceções descritas entre colchetes:

**4-(3-cloro-2,5-dioxo-4-pirrolidin-1-il-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(4-clorofenil)benzenosulfonamida (33)**

[tempo de reação (6,5 hora)] 56%, p.f. 177<sup>0</sup>C (decomp.). C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S requerida =C, 51.51; H, 3.67; N, 9.01; encontrada C, 51.78; H, 3.93; N, 8.75; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 3458 (NH), 1766, 1704, 1640 (CO), 1592 (Ar C=C), 1342, 1164(SO<sub>2</sub>); M.S. 156,127(C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>NCl.<sup>+</sup>), 92 (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>N<sup>+</sup>), 64 (SO<sub>2</sub><sup>+</sup>), 65(C<sub>5</sub>H<sub>5</sub><sup>+</sup>).

**4-(3-cloro-2,5-dioxo-4-pirrolidin-1-il-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(4-metilfenil)benzenosulfonamida (34)**

[tempo de reação (20 minutos)] 43%, p.f. 219-220<sup>0</sup>C. C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S requerida C, 56.56; H, 4.52; N, 9.42; encontrada C, 56.15; H, 4.78; N, 9.73; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 3452 (NH), 1762,1712, 1638 (CO), 1594 (Ar C=C), 1336, 1160 (SO<sub>2</sub>); RMN-H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>) δ:7,80-7,48 (m, 4H, ArH); 7,08-6,90 (m, 4H, ArH-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>p-Me); 6,30 (s,1H,NH); 3,99(t, 4H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>); 2,28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,00-1,92 (t, 4H, 2x CH<sub>2</sub>) ppm.

**4-(3-cloro-2,5-dioxo-4-pirrolidin-1-il-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(4-metoxifenil)benzenosulfonamida (35)**

[tempo de reação (30 minutos)] (58,5%); p.f.167<sup>0</sup>C (decomp.). C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S requerida C, 54.60; H, 4.36; N, 9.10; encontrada C, 54.61; H, 4.36; N, 9.11; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 3462 (NH), 1766,1710,1640 (C=O),1592 (Ar C=C),1340, 1162 (SO<sub>2</sub>); RMN-H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,71-7,54 (m, 4H, ArH); 6,96-6,80 (m, 4H, ArH-p-arizidino); 6,30 (s, 1H,NH); 4,00 (t, 4H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>);3,76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 1,97 (t, 4H, 2x CH<sub>2</sub>) ppm.

**3-cloro-1-[4-(morfolin-4-ilsulfonil)fenil]-4-pirrolidin-1-il-1H-pirrole-2,5-diona (36)**

[tempo de reação (20 minutos)] 63%, p.f.147,8-149,0°C. C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S requerida C, 48.81; H, 5.23; N, 12.65; encontrada C, 48.63; H, 5.10; N, 12.48; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 1766,1718, 1642 (C=O), 1586 (Ar C=C), 1340, 1162 (SO<sub>2</sub>); RMN-H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,83-7,63 (m, 4H, ArH); 4,05-3,98 (t, 4H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>); 3,77-3,01 (m, 8H, morfolino); 2,02-1,97 (m, 4H, 2x CH<sub>2</sub>) ppm.

**N-(4-bromofenil)-4-(3-cloro-2,5-dioxo-4-piperidin-1-il-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)benzenosulfonamida (38)**

75%, p.f. 187,0-189,0°C C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>BrClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S requerida C, 48.06; H, 3.65; N, 8.01; encontrada C, 48.27; H, 3.19; N, 8.30; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 3268 (NH), 1758,1708, 1622 (C=O), 1340, 1162 (SO<sub>2</sub>); M.S. 489, 289, 255, 172, 156 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Br), 108, 91 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>N<sup>+</sup>), 65 (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub><sup>+</sup>), 55, 41.

**4-(3-cloro-2,5-dioxo-4-piperidin-1-il-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(4-clorofenil)benzenosulfonamida (39)**

[tempo de reação (6,5 hora)] 32%, p.f. 195,9-196,8°C. C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S requerida C, 52.51; H, 3.99; N, 8.75; encontrada C, 52.32; H, 3.40; N, 8.750 IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 3450 (NH), 1758,1700, 1622 (CO), 1340, 1162 (SO<sub>2</sub>); M.S. 479 (M<sup>+</sup>), 445, 289, 253, 127(C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>NCl.<sup>+</sup>), 108, 99, 79, 65 (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub><sup>+</sup>), 55.

**4-(3-cloro-2,5-dioxo-4-piperidin-1-il-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(3,4-diclorofenil)benzenosulfonamida (40)**

[tempo de reação (4 hora)] 44,5%, p.f. 205-206°C. C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S requerida C, 48.99; H, 3.52; N, 8.16; encontrada C, 49.23; H, 3.15; N, 8.39; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 3450 (NH), 1758,1706, 1620 (C=O), 1594 (Ar C=C), 1332, 1164 (SO<sub>2</sub>); M.S. 479 (M<sup>+</sup> - Cl), 161 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NCl<sub>2</sub>), 127(C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>NCl.<sup>+</sup>), 90, 63, 40 (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub><sup>+</sup>).

**4-(3-cloro-2,5-dioxo-4-piperidin-1-il-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(4-metilfenil)benzenosulfonamida (41)**

[tempo de reação (20 minutos)] 73%, p.f. 189-190<sup>0</sup>C. C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S requerida C, 57.45; H, 4.82; N, 9.14; encontrada C, 57.62; H, 4.45; N, 9.50; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>)=3450 (NH), 1758,1706, 1620(C=O), 1594 (Ar C=C), 1332, 1164 (SO<sub>2</sub>); RMN-H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,85-7,50 (m, 4H, ArH); 7,10-6,90 (m, 4H, ArH-p-toluidino); 6,37 (s,1H,NH); 3,95-3,85 (t, 4H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>); 2,26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,70-1,80 (m, 6H, 3x CH<sub>2</sub>) ppm.

**4-(3-cloro-2,5-dioxo-4-piperidin-1-il-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(4-metoxifenil)benzenosulfonamida (42)**

[tempo de reação (30 minutos)] 73%, p.f. 172-173<sup>0</sup>C. C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S requerida C, 55.52; H, 4.66; N, 8.83; encontrada C, 55.21; H, 4.36; N, 8.75; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 3284(NH), 1760,1708, 1622 (C=O), 1340, 1160 (SO<sub>2</sub>); RMN-H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,75-7,48 (m, 4H, ArH); 7,00-6,75(m, 4H, ArH-p-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>p-OMe); 6,37 (s, 1H,NH); 4,00-3,90(t, 4H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>); 3,76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 1,80-1,70(m, 6H, 3xCH<sub>2</sub>) ppm.

**3-cloro-1-[4-(morfolin-4-ilsulfonil)fenil]-4-piperidin-1-il-1H-pirrole-2,5-diona (43)**

[tempo de reação (20 minutos)] 55%, p.f.207<sup>0</sup>C. C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S requerida C, 51.87; H, 5.04; N, 9.55; encontrada C, 51.46; H, 5.43; N, 9.32; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 1766,1718, 1642 (C=O), 1586 (Ar C=C), 1340, 1162 (SO<sub>2</sub>); RMN-H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,83- 7,61 (m, 4H, ArH); 3,95 (t, 4H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>); 3,77-3,01 (m, 8H, morfolino); 1,85-1,70 (m, 6H, 3x CH<sub>2</sub>) ppm.

**4-(3-cloro-2,5-dioxo-4-piperidin-1-il-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-piridin-2-ilbenzenosulfonamida (44)**

[tempo de reação (30 minutos), purificação (recristalização em acetona/isopropanol)] 17% p.f. 194-196<sup>0</sup>C. C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S requerida C, 53.75; H, 4.29; N, 12.54; encontrada C, 53.48; H, 4.70; N, 12.42; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 3318(NH), 1764,1710, 1634(C=O),1670(Ar C=C), 1398,1182 (SO<sub>2</sub>); RMN-H<sup>1</sup> (C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O/DMSO) δ: 8,05-7,74

(m, 4H,ArH); 7,40-6,85 (m, 4H, 2-piridil); 4,00-3,85 (t, 4H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>); 1,70 (t,6H, 3x CH<sub>2</sub>) ppm.

**4-(3-cloro-2,5-dioxo-4-piperidin-1-il-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(5-cloropiridin-2-il)benzenosulfonamida (45)**

40%, p.f.56,4-57,5<sup>0</sup>C. C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S requerida C, 49.90; H, 3.77; N, 11.64; encontrada C, 49.81; H, 3.54; N, 11.36; RMN-H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8,31-7,38 (m, 3H, p-Cl-piridil); 7,92-7,53 (m, 4H,ArH); 4,00-3,85 (t, 4H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>); 1,78-1,70 (t,6H, 3x CH<sub>2</sub>) ppm.

**4-(3-cloro-2,5-dioxo-4-piperidin-1-il-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N'-(1-metiletilideno)benzenosulfonohidrazida (47)**

Acetona (20mL) foi adicionada a hidrazida 46 (0,60g; 1,62mmol). A solução foi refluxada por 1 hora. Após, a solução foi deixada a temperatura ambiente por 45 minutos. O solvente foi evaporado em rota-vapor. O produto formado foi isolado por cromatografia *Dry-flash* em sílica gel usando acetato de etila:hexano, 1:1 como eluente, e seco em dessecador à vácuo, contendo hidróxido de potássio. (13%); p.f. 181,3-183<sup>0</sup>C. C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S requerida C, 50.88; H, 4.98; N, 13.19; encontrada C, 50.97; H, 4.78; N, 13.39; RMN-H<sup>1</sup> (C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O) δ: 7,58- 6,68 (m, 4H, ArH); 5,40(s,1H, NH); 2,85 (t, 4H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>); 2,07-2,03 (m, 6H, 3x CH<sub>2</sub>); 1,84 (s,3H, CH<sub>3</sub>); 1,81 (s,3H, CH<sub>3</sub>) ppm.

➤ Segundo o método descrito acima, o seguinte composto foi sintetizado:

**4-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)-N'-(1-metiletilideno)benzenosulfonohidrazida (54)**

50%, p.f. 188-189<sup>0</sup>C (lit. 189-190<sup>0</sup>C (Nunes, 1986)).

**1-Fenilpirrolidina-2,5-diona (48)**

Anilina (9,5g; 0,1mol) foi adicionado a uma solução de anidrido succínico (10g; 0,1mol) em éter (150mL) sob agitação. O ácido N-fenilsuccinâmico foi filtrado sob

vácuo e lavado com éter, produzindo 18,0g (92%), p.f. 204-206<sup>0</sup>C (lit. p.f. 203-204<sup>0</sup>C (**Nunes**, 1986)). Ácido N-fenilsuccinâmico (18g; 0,1mol) foi adicionado ao anidrido acético (40g; 0,05mol), contendo anidrido de sódio anidro e deixado em banho-maria por 30 minutos. A mistura reacional foi resfriada a temperatura ambiente e colocada sobre água/gelo (500mL). O precipitado foi filtrado sob vácuo, lavado com água (2 x 30mL) e éter de petróleo (p.e.30-60<sup>0</sup>C) (30mL) e seco em dessecador à vácuo, contendo hidróxido de potássio, produzindo 12,5g (77%); p.f. 155-157 <sup>0</sup>C (lit. 156-157<sup>0</sup>C (**Matsuo**, 1965)).

➤ Segundo o método descrito acima, os seguintes compostos foram sintetizados:

#### **1-Fenil-1H-pirrol-2,5-diona (57)**

78%, p.f. 87-88<sup>0</sup>C (lit. 88-89<sup>0</sup>C (**Cava**, 1961)).

#### **1-Benzil-1H-pirrol-2,5-diona (58)**

75%, p.f. 67-69<sup>0</sup>C (lit. 69-71<sup>0</sup>C (**Cechinel Filho et al**, 1996)).

#### **4-metoxifenil-4-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)benzenosulfonato (55)**

Cloreto de sulfonila 49 (1,0g; 4,2mmol) foi adicionado lentamente, em pequenas porções a mistura de p-metoxifenol (0,35g; 2,8mmol), trietilamina (0,57g; 5,6mmol) e clorofórmio (10mL). A solução foi mantida sob agitação, a temperatura ambiente, por 1 hora. Éter etílico (30mL) e água (7mL) foram adicionados a mistura reacional. A mistura foi extraída com ácido clorídrico aquoso 2M (4x 25mL), com bicarbonato de sódio aquoso 5% (4x 25mL) e com água (3x 25mL). O precipitado formado foi filtrado sob vácuo e seco em dessecador à vácuo, contendo hidróxido de potássio, produzindo 0,73g. 80%, p.f. 157,4-158,2<sup>0</sup>C. C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>6</sub>S requerida C, 56.50; H, 4.18; N, 3.88; encontrada C, 56.41; H, 4.37; N, 3.68; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 1776,1706 (C=O), 1594 (Ar C=C), 1350,1150(SO<sub>2</sub>); RMN-H<sup>1</sup> (DMSO) δ: 8,02-7,59 (m, 4H, ArH); 6,96-6,83 (m, 4H, ArH); 3,72 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 2,80 (s, 4H, 2x CH<sub>2</sub>) ppm.

- Segundo o método descrito acima, os seguintes compostos foram sintetizados, salvo exceção descrita entre colchetes:

**4-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)benzenosulfonato de 2-(metoxi-4-[(1E)-prop-1-enil]fenila (56)**

[tempo de reação (45 minutos)] 31%, p.f.179,7-180,2°C. C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>6</sub>S requerida C, 59.84; H, 4.77; N, 3.49; encontrada C, 59.45; H, 4.38; N, 3.78; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 1776,1712,1640 (C=O), 1594 (Ar C=C), 1376, 1150(SO<sub>2</sub>); RMN-H<sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.98-7.48 (m, 4H, ArH); 7,16-6,62 (m, 3H, ArH fenóxido);6,00- 5.75 (m, 1H, CH); 5.11-5.03 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,46 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.35-3.32 (d, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,94 (s, 4H, 2x CH<sub>2</sub>) ppm.

**N-benzildibenzobicyclo[2.2.2]octano[2.3-c]succinimida (59)**

N-benzilmaleimida (0,3g; 2.6mmol) e antraceno (0,29g; 1.6mmol) foram adicionados à tolueno (30mL). Deixou-se sob agitação e refluxo à 60-70°C, por aproximadamente 6 horas. O precipitado formado foi filtrado resultando em cristais brancos, cujo rendimento do material bruto foi de 0,46g (78.60%). O material foi submetido a recristalização em n-hexano/acetona, não oferecendo contudo o material puro, portanto foi submetido a sublimação e posterior recristalização em clorofórmio/n-hexano fornecendo 0,22g do produto puro, como precipitado branco (37.60%), p.f. 225-227°C. C<sub>25</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub> requerida C, 82.17; H, 5.24; N, 3.83; encontrada C, 82.24; H, 5.15; N, 3.91; IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) = 3060,3032 (CH, Ar) 2956 (CH, alifático) 1770,1696 (C=O), 690 (ArH, deformação angular fora do plano do anel mono-substituído).

## 2.2. ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

### 2.2.1. Teste de Contorções Abominais Induzidas pelo Ácido Acético.

Este trabalho foi desenvolvido no Núcleo de Investigação Químico Farmacêuticas, NIQFAR, na Universidade da Vale do Itajaí, UNIVALI.

Camundongos “Swiss” machos (23-30g) foram mantidos sob temperatura controlada ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e iluminação em ciclo de 12 horas com ração e água “ad libitum”. A resposta nociceptiva foi induzida utilizando-se *Writhing test* com ácido acético (0,6%) administrado intraperitonealmente (i.p.). Basicamente as contorções consistem na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores de acordo com os métodos descritos anteriormente (**Collier et al**, 1968; **Souza et al**, 1998).

Os animais foram pré-tratados com os compostos em estudo por via intraperitoneal 30 minutos antes da injeção do ácido acético. O grupo controle recebeu volume semelhante aos compostos de uma solução de NaCl (0,9%, 10 mL/Kg). Os animais foram então colocados individualmente em caixas de observação e as contorções indicativas de dor foram quantificadas cumulativas durante 20 minutos. O efeito analgésico foi avaliado em função da inibição das contorções e comparado ao grupo controle.

Os resultados estão apresentados com média  $\pm$  desvio padrão, e a significância estatística entre os grupos foi analisada por meio de uma análise de variância seguida pelo teste de comparação múltipla Dunnett's. Valores P iguais ou menores do que 0.05 foram considerados como indicativo de significância. Os valores de  $DI_{50}$  (a concentração do composto que reduz a resposta em 50% em relação ao valor controle) foi estimada por interpolação gráfica dos experimentos individuais. Os  $DI_{50}$  estão apresentados como valores médios e intervalos de 95% de confiança. O padrão utilizado foi a aspirina ( $DI_{50} = 133,00\mu\text{M/Kg}$ ).

### 2.3. PLANEJAMENTO RACIONAL

A etapa de planejamento racional deste trabalho foi desenvolvido no Laboratório de QSAR e Modelagem Molecular pertencente ao Núcleo de Estudos

em Química Medicinal (NEQUIM), no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O NEQUIM conta com uma infra-estrutura montada para o desenvolvimento de trabalhos na área de Química Medicinal, no planejamento racional de novos fármacos. As técnicas empregadas requerem o uso de computadores com interface gráfica, programas de modelagem molecular e de QSAR.

O Laboratório de QSAR e Modelagem Molecular está equipado com três estações de trabalho *Silicon Graphics* (uma "octane" e duas "O<sub>2</sub>"), onde estão implementados os pacotes de programas TSAR (versão 3.21) (**Tsar**, 1997) e SYBYL (versão 6.7) (**Sybyl**, 2000), empregados em estudos de QSAR, e os programas MacroModel (**MacroModel**, 1997) e Insight II/Discover (versão 97.0), que são pacotes de modelagem molecular.

Para desenvolver o presente trabalho foram utilizados o pacote TSAR, SYBYL e Insight II/Discover. O TSAR é um pacote de cálculo de descritores estruturais, de análises quimiométricas e análise de QSAR clássica. O pacote SYBYL é um pacote de cálculo de descritores estruturais, de análises quimiométricas e análise de QSAR clássica e QSAR 3D. O pacote Insight II/Discover contém alguns programas para análise de estruturas e dos resultados de dinâmica molecular.

O principal objetivo do NEQUIM é propor a síntese de novas moléculas com atividade.

### 2.3.1. Modelagem Molecular

As estruturas tridimensionais de 40 imidas e 16 sulfonamidas foram construídas usando o programa de modelagem molecular SYBYL numa estação de trabalho *Silicon Graphics*. Cada estrutura inicialmente teve sua energia minimizada usando o campo de força padrão Tripos com uma função dielétrica dependente da distância e o critério de convergência 0.01. Cargas atômicas parciais requeridas para o cálculo das interações eletrostáticas foram calculadas usando o método



Gasteiger-Hückel. As estruturas de energia minimizadas foram então submetidas a análise conformacional empregando GA, no SYBYL, nas seguintes condições: constante dielétrica 80,0; população 100; número de gerações 100. Outra minimização paralela foi realizada por hamiltoniano AM1, no programa GAMESS (**Schmidt et al**, 1993).

As estruturas foram alinhadas pelo método do peso molecular, utilizando o programa Tsar.

Usando o WHIM-3D, 110 parâmetros foram calculados para cada molécula. Usando o programa TSAR v3.21, 75 descritores foram calculados para cada molécula. Já o programa DRAGON v1.1-2000, calcula cerca de 800 parâmetros para cada molécula.

Todos os descritores são padronizados para apresentarem uma variância entre 0 e 1.

De posse destes parâmetros, fez-se os estudos para o planejamento racional da síntese de novos compostos, inicialmente por métodos quimiométricos.

### 2.3.2. PCA

Para investigar a presença de intercorrelações múltiplas na matriz de descritores, uma análise de PCA foi realizada com 32 compostos (compostos da literatura e compostos sintetizados no presente trabalho de doutorado), subdivididos em quatro conjuntos para verificar se uma separação em grupos era viável analisando caso a caso.

Conjunto 1-compostos imídicos obtidos da literatura, sendo que todos foram sintetizados por membros do LABSEAT (**Andricopulo**, 1998-a, 1998-b, **Cechinel Filho**, 1996; **Corrêa**, 1997). Compostos 01 à 12 da Tabela 1.

Conjunto 2-compostos imídicos sintetizados no presente trabalho de doutorado.

Compostos 13 à 17 da Tabela 1.

Conjunto 3-compostos 01 à 17 da Tabela 1.

Conjunto 4-compostos do conj. 3 acrescidos de compostos imídicos planejados.

Compostos 01 à 17 da Tabela 1 e compostos 18 à 32 da Tabela 2 .

### 2.3.3. Análise de *cluster*

A análise de *cluster* investiga a existência de grupos naturais (*cluster*) de objetos, com base no cálculo de distâncias entre objetos num espaço multidimensional usando uma equação como :

$$d_{ij} = (\sum (d_{i,k} - d_{j,k})^2)^{1/2} \quad (11)$$

Essas distâncias são usadas para produzir um diagrama (Figura 6), conhecido como dendograma, que permite a fácil identificação de grupos (*cluster*) de objetos similares.

### 2.3.4. QSAR

Uma investigação estatística PLS foi realizada no SYBYL. Esta análise foi utilizada para estudar a relação entre os dados experimentais ( $DI_{50}$ ) e os valores calculados no programa DRAGON, das imidas cíclicas apresentadas na Tabela 5.

### 2.3.5. Algoritmo Genético

Uma análise conformacional sistemática por Algoritmo Genético foi realizada, nas seguintes condições: constante dielétrica 80.0, função dielétrica distancia, *cutoff* 16.0, H Bond RS 0.17, população 100, número de gerações 100. Nesta análise foram gerados 20 confôrmeros por composto analisado (Tabela 7, compostos 1-32).

### 2.3.6. Anelção (*Simulated Annealing – SA*)

Uma segunda análise conformacional foi feita por SA, com as seguintes condições: corrida de 10 ciclos, temperatura máxima de 1000K por 2000 fs, anelção à 300K por 10.000 fento segundos, em função exponencial, campo de força TRIPOS, função dielétrica distancia, constante dielétrica 80.0, *cutoff*

8.0. Nesta análise, foram gerados em média 10 confôrmeros por composto e o tempo de cálculo para os 17 compostos (Tabela 7, compostos 1-4, 6-11, 13-19) foi de 1 semana.

As conformações de cada molécula obtidas por estes métodos foram colocadas em dois bancos de dados para análises de CoMFA e para análise quimiométrica de PCA.

As conformações geradas por GA, assim como as geradas por SA tiveram seus RMS's calculados no pacote *Insight*.

### 2.3.7. CoMFA

Um estudo de QSAR 3D foi realizado com dois bancos de dados:

- a) banco 1 – 39 imidas (compostos 1 a 37, 53, 54 , Tabela 7;
- b) banco 2 – 39 imidas e 15 compostos sulfonados (compostos 1 a 54 , Tabela 7.

Valores de campo CoMFA foram calculados para cada estrutura colocadas numa região definida por pontos em intervalos de 2.0Å dentro da caixa de, por exemplo 14Å de extensão nas direções x, y e z (Figura 10).

Todas as estruturas foram previamente alinhadas baseadas na sobreposição do fragmento (C<sub>4</sub>O<sub>2</sub>N) do anel imídico em cada molécula (Figura 11), pelo método ponto a ponto, utilizando o programa SYBYL. Os campos estéreo e eletrostático foram calculados em cada ponto de interseção da caixa usando função potencial de Leonard-Jones e de Coulomb do campo de força Tripos.

As sondas utilizadas foram nitrogênio trigonal planar (Npl<sub>3</sub>), nitrogênio de amida (Nam), nitrogênio sp<sup>2</sup> (N<sub>2</sub>), nitrogênio sp<sup>3</sup> (N<sub>3</sub>), oxigênio sp<sup>3</sup> (O<sub>3</sub>) e carbono sp<sup>3</sup> (C<sub>3</sub>).

As energias de interação das sondas N<sub>3</sub><sup>+1</sup>, Npl<sub>3</sub><sup>+1</sup>, Npl<sub>3</sub><sup>+0,425525</sup>, N<sub>2</sub><sup>+1</sup>, Nam<sup>+1</sup>, Nam<sup>+0,425525</sup>, O<sub>3</sub><sup>-1</sup>, O<sub>3</sub><sup>-0,4792</sup>, C<sub>3</sub><sup>+1</sup> foram truncadas em valores de 30Kcal/mol para energia estéreo e eletrostática.

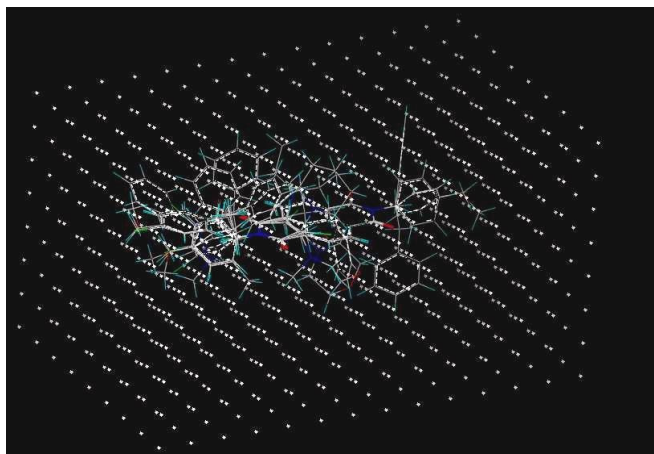


Figura 10 - Moléculas alinhadas colocadas numa caixa regular.

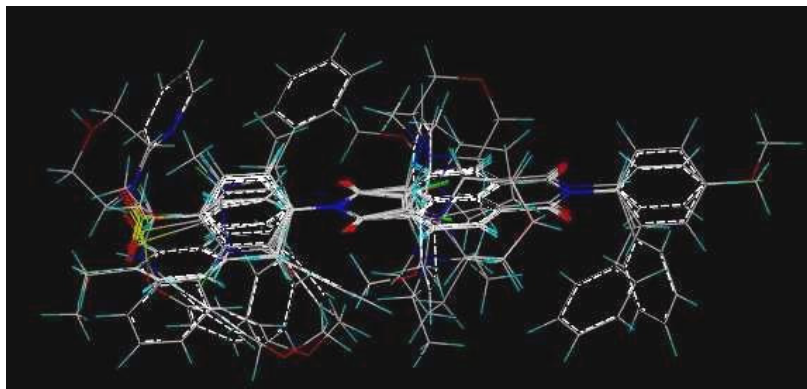


Figura 11- Alinhamento das imidas e sulfonamidas a partir da sobreposição do fragmento (C<sub>4</sub>O<sub>2</sub>N) do anel imídico.

Para melhorar a eficiência e reduzir o “ruído”, um filtro de coluna foi empregado para excluir colunas com variância menor que 2.0Kcal/mol.

A metodologia PLS foi usada para extrair a relação entre o potencial farmacológico (pIC<sub>50</sub>) e fatores tridimensionais (estéreo e eletrostático) das moléculas.

Para encontrar o número ótimo de componentes principais correspondente ao menor erro de predição, um procedimento de validação cruzada “*leave-one-out*” (LOO) foi realizado fornecendo o coeficiente de correlação validação cruzada ( $r^2_{cv}$ ).

### 2.3.8. Análise de QSAR 4D

Um estudo de QSAR 4D foi realizado com base no trabalho do Professor Hopfinger e seus colaboradores (**Hopfinger et al**, 1997), onde é feito um estudo de QSAR 3D com vários compostos e seus respectivos confôrmeros.

Análises conformacionais foram realizadas conforme descrito na metodologia de GA e SA.

A análise de QSAR 4D foi aplicada a dois conjuntos treino:

1. 19 imidas cíclicas substituídas (compostos 1-19; Tabela 7) e seus confôrmeros gerados por GA;
2. 17 imidas cíclicas substituídas (compostos 1-4, 6-11, 13-19; Tabela 7) e seus confôrmeros gerados por SA.

Todas as estruturas foram previamente alinhadas com base na sobreposição do fragmento (C<sub>4</sub>O<sub>2</sub>N) do anel imídico em cada molécula (Fig. 13). Os campos estéreo e eletrostático foram calculados em cada ponto de interseção da caixa usando função potencial Leonard-Jones e de Coulomb do campo de força Tripos. As energias de interação das sondas foram truncadas em valores de 30Kcal/mol para energia estéreo e eletrostática

As condições do estudo de CoMFA são apresentados na Tabela 19.

O composto 14 (Tabela 7) foi usado como composto referência para realizar o alinhamento. No caso do conjunto 2, foi utilizado para este fim o composto 9 (Tabela 7).

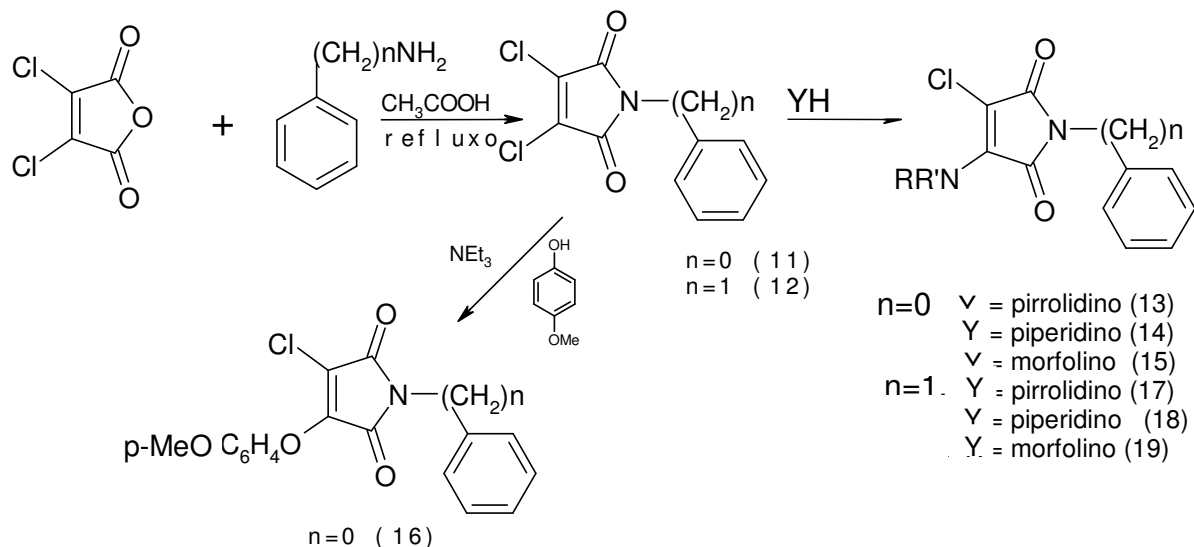
### **3- Resultados e Discussão**

### 3.1.Síntese

#### 3.1.1.Clorossulfonação de 3-cloro, 4-X-N-fenilmaleimida (3-4)

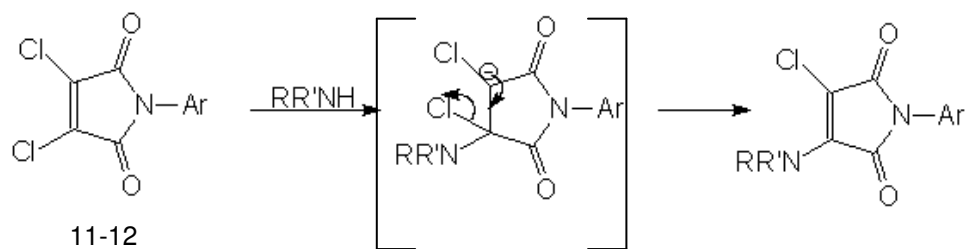
(X = pirrolidino, piperidino).

3,4-Dicloro-N-fenilmaleimida **11** e 3,4-Dicloro-N-benzilmaleimida **12** foram sintetizadas segundo método já descrito na página 41 (Esquema 7).



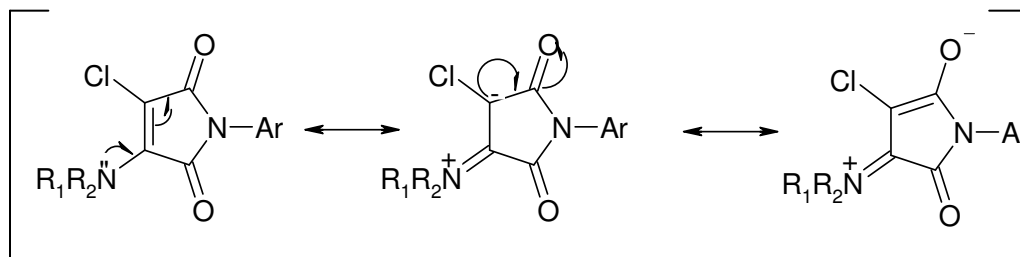
Esquema 7 - Síntese de 3,4-dicloromaleimidias e 3-cloro-4-X-maleimidias, onde X = morfolino, piperidino, pirrolidino e p-metóxfenil.

As reações de 3,4-dicloromaleimida com aminas secundárias, como pirrolidina, piperidina e morfolina ocorrem com a troca de um átomo de cloro, provavelmente via mecanismo de adição eliminação, envolvendo um intermediário (Esquema 8), o qual perde um átomo de cloro para formar os produtos (**13-19**), conforme o Esquema 7.



Esquema 8 – Intermediário do mecanismo de adição eliminação.

Os espectros no infravermelho e de RMN- $H^1$  confirmaram as estruturas propostas (13-16; 17-19). Os dados espectroscópicos foram obtidos de amostras purificadas por cromatografia *Dry-Flash*. O espectro no infravermelho do composto 13, por exemplo, mostrou três absorções de carbonila, uma banda fraca em  $1762\text{ cm}^{-1}$  e uma forte em  $1706\text{ cm}^{-1}$ , correspondentes às absorções simétrica e assimétrica, respectivamente, uma vibração adicional foi observada em  $1634\text{ cm}^{-1}$  devido a conjugação do grupo pirrolidino com a carbonila como representado pelas estruturas canônicas, no Esquema 9. Também foi observado uma banda em  $1590\text{ cm}^{-1}$  (Ar C=C).



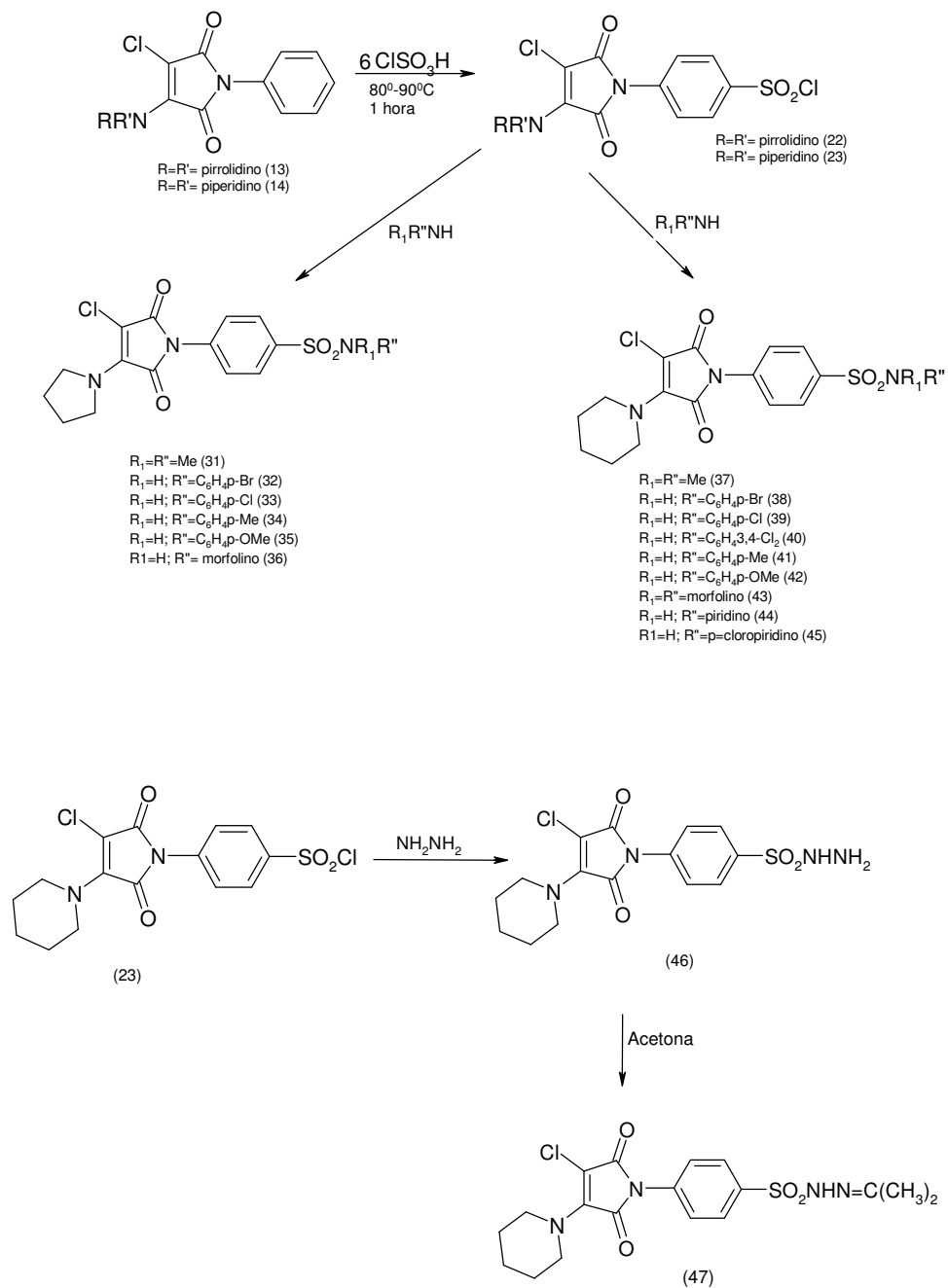
Esquema 9 – Formas canônicas.

O espectro de RMN- $H^1$  do composto 13, por exemplo, mostrou 5 prótons aromáticos como um multipeto ( $\delta\ 7,40\text{-}7,34$ ), 4 prótons dimetilamino como um tripleto ( $\delta\ 4,00$ ) e 4 prótons dimetilamino (pirrolidino) como um tripleto ( $\delta\ 1,96$ ). O espectro de RMN- $H^1$  do composto 16 apresentou, além dos prótons comentados, 3 prótons ( $\text{OCH}_3$ ) como um singleto ( $\delta\ 3,63$ ).

As maleimidas 13-14 foi aquecida com ácido clorossulfônico, em excesso (6 equivalentes) produzindo o cloreto de sulfonila 22-23 (80% de rendimento), os quais foram caracterizados pela reação com aminas e hidrazina dando os derivados 31-47



(Esquema 10). A reação subsequente da hidrazina **46** com acetona formou a hidrazida **47**.



Esquema 10 - Clorossulfonação de 3-cloro,4-X-maleimida, onde X= pirrolidino, piperidino.

Planejamento Racional de Imidas Cíclicas e Sulfonamidas com Atividade Antinociceptiva.

Maria Elena Walter

Os cloretos de sulfonila são extremamente úteis como intermediários sintéticos, pois o átomo de cloro pode ser facilmente substituído através de reações com diferentes reagentes nucleofílicos.

Os cloretos de arilsulfonila podem ser prontamente isolados pela adição em água gelada, seguida de rápida filtração, ou por extração com solventes orgânicos. Por outro lado, os ácidos sulfônicos, que poderiam ser eventualmente formados são solúveis em água. Os cloretos de arilsulfonila são, em geral, de difícil purificação, sendo muito sensíveis à umidade que leva a sua decomposição. Geralmente, são caracterizados quimicamente pelo tratamento com reagentes nucleofílicos, como por exemplo aminas, fenóis, etc. As sulfonamidas, em particular, após recristalização, são geralmente sólidos cristalinos bem definidos (Nunes, 1986).

Os substituintes utilizados foram escolhidos segundo o método de Topliss (Topliss, 1997).

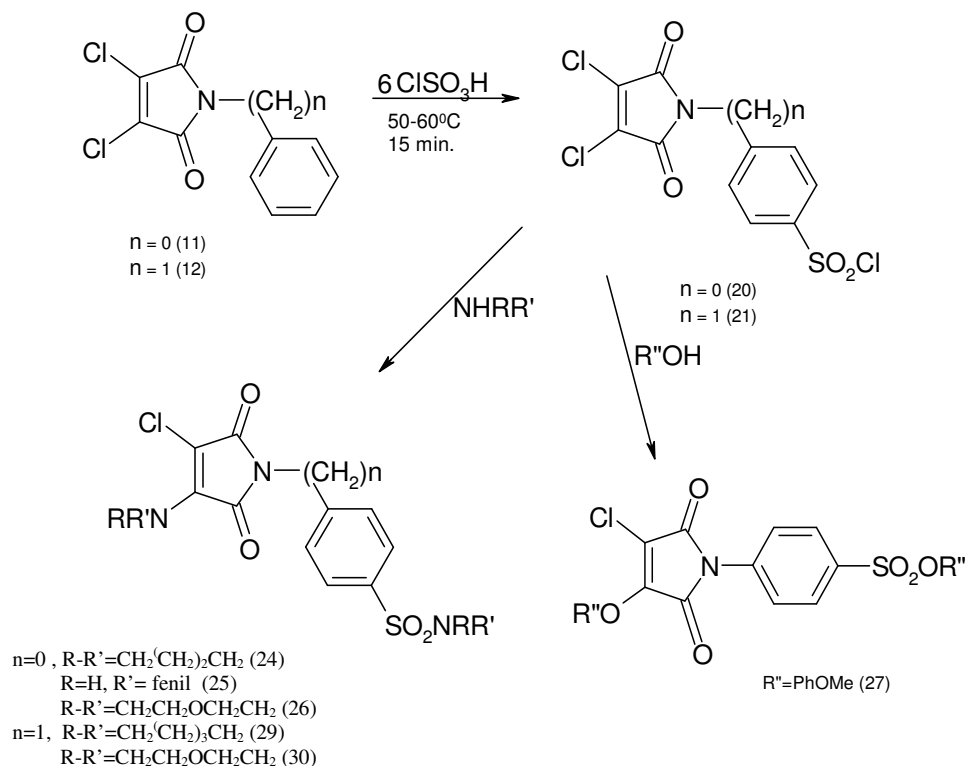
O espectro no infravermelho do composto 34 mostrou, além das bandas características de maleimidas, duas bandas fortes em  $1336\text{cm}^{-1}$  e  $1160\text{cm}^{-1}$ , correspondentes às absorções assimétricas e simétricas, respectivamente, do grupamento  $\text{SO}_2$  da sulfonamida e uma banda em  $3452\text{cm}^{-1}$  do grupo NH da sulfonamida.

O espectro de RMN- $^1\text{H}$  mostrou 4 prótons aromáticos como um multipletto ( $\delta$  7,80-7,48), 4 prótons aromáticos p-toluidino como um multipletto ( $\delta$  7,08-6,90), 1 próton amino como um singleto ( $\delta$  6,30), 4 prótons dimetil amino como um triplete ( $\delta$  3,99), 3 prótons metil como um singleto ( $\delta$  2,28) e 4 prótons pirrolidino como um triplete ( $\delta$  2,00-1,92).

### 3.1.2. Clorossulfonação da 3,4-dicloromaleimida (11-12).

3,4-Dicloromaleimida 11 foi preparada pelo procedimento descrito anteriormente (Esquema 7). A maleimida foi aquecida com 6 equivalentes de ácido

clorossulfônico, fornecendo o cloreto de sulfonila 20 (85% de rendimento), o qual foi caracterizado pela reação com aminas e fenóis dando os derivados 24-28 (Esquema 11).



Esquema 11- Clorossulfonação de 3,4-dicloromaleimida (20-21).

Os espectros no infravermelho e de RMN-<sup>1</sup>H confirmaram as estruturas estimadas. O espectro de infravermelho do composto 24, por exemplo, mostrou uma banda em 3458cm<sup>-1</sup> correspondente ao grupo NH da sulfonamida, três absorções carbonílicas, duas bandas em 1766cm<sup>-1</sup> e 1716cm<sup>-1</sup> correspondentes às absorções simétrica e assimétrica, respectivamente. Uma vibração adicional foi observada em 1632cm<sup>-1</sup>.

O espectro de RMN-<sup>1</sup>H, do composto 24 por exemplo, apresentou 4 prótons aromáticos como um multipeto ( $\delta$  7,91-7,58), 4 prótons dimetilamino (pirrolidino) como um tripleto ( $\delta$  4,10-4,00), 4 prótons dimetilamino (N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) como um tripleto ( $\delta$

3,31-3,213,26), 8 prótons metilênicos como um tripleto ( $\delta$  1,98-1,77) e 4 prótons metilênicos com um tripleto (1,79).

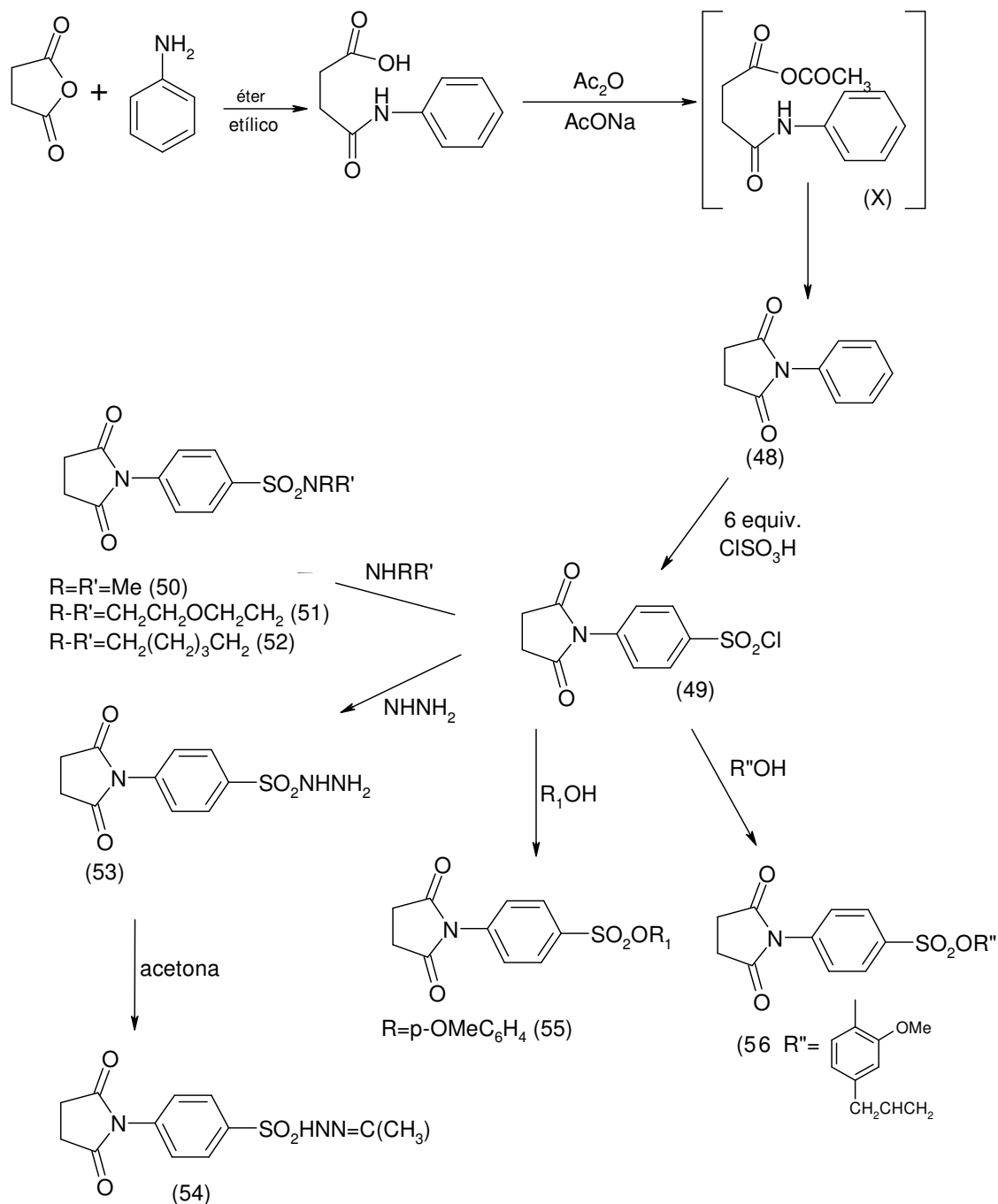
### 3.1.3. Clorossulfonação de *N*-fenilsuccinimida 48.

Anidrido succínico foi tratado com anilina em éter para formar o ácido *N*-fenilsuccinâmico (Esquema 12), o qual foi desidratado com anidrido acético aquecido contendo acetato de sódio anidro, fornecendo a *N*-fenilsuccinimida 48.

A última etapa provavelmente envolve o intermediário acilado (X), o qual fornece um excelente grupo de saída.

*N*-fenilsuccinimida foi tratada com ácido clorossulfônico (6 equivalentes) a 80<sup>o</sup>-90<sup>o</sup>C fornecendo o cloreto de sulfonila 46 (Esquema 12). O cloreto de sulfonila 49 foi caracterizado por reação com aminas, fenol e hidrazina, dando os derivados (50-53; 55, 56). Subsequente reação da hidrazida 53 com acetona forneceu a hidrazona 54.

O espectro no infravermelho, do composto 55, por exemplo, mostrou duas absorções de carbonila, uma banda em 1776cm<sup>-1</sup> e uma banda em 1706cm<sup>-1</sup>, correspondentes às absorções simétrica e assimétrica, respectivamente, uma banda em 1594cm<sup>-1</sup> (Ar C=C), duas bandas em 1350cm<sup>-1</sup> e 1150cm<sup>-1</sup> correspondentes às absorções assimétrica e simétrica, respectivamente, do grupamento SO<sub>2</sub> da sulfonamida.



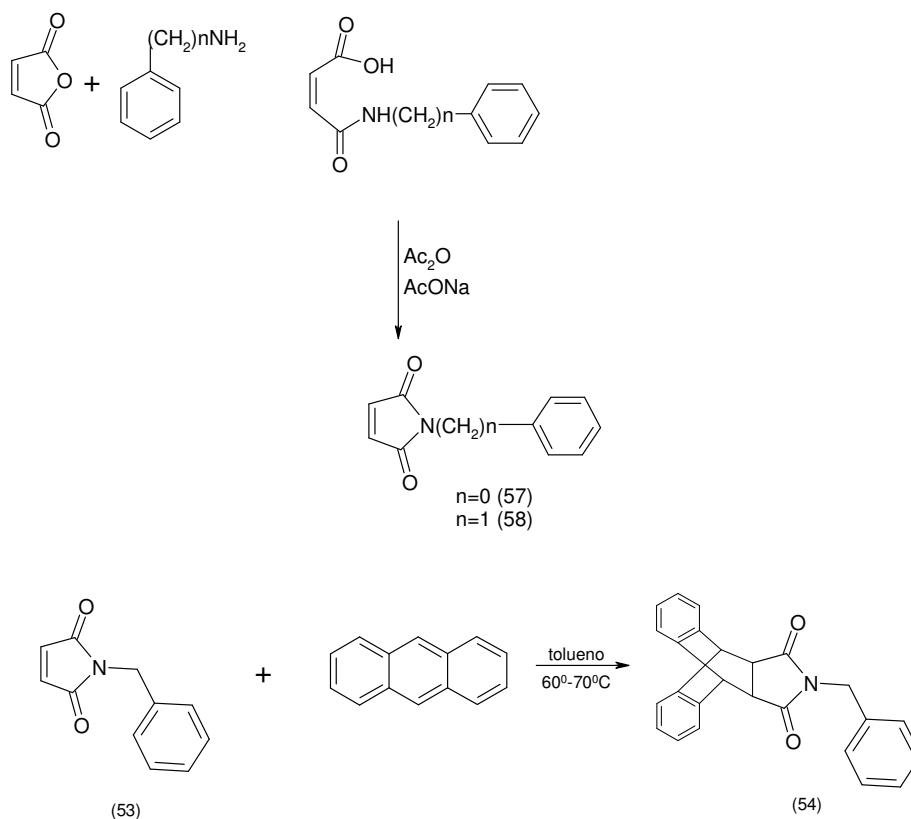
Esquema 12- Reação de *N*-p-clorosulfonilsuccinimida 49 com nucleófilos.

O espectro de RMN- $\text{H}^1$ , do composto 55, apresentou 4 prótons aromáticos fenólicos como multiplete ( $\delta$  8,02-7,59), 4 prótons aromáticos como um multiplete ( $\delta$

6,96-6,93), 3 prótons metóxido como um singlete ( $\delta$  3,72) e 4 prótons metileno como um singlete ( $\delta$  2,80).

### 3.1.4. Reação de Diels-Alder da *N*-benzilmaleimida (58) com antraceno.

*N*-Benzilmaleimida 58 foi sintetizada seguindo o método descrito por Nunes (Nunes, 1986) (78% de rendimento), a partir da reação de quantidades equimolares de anidrido maleico e benzilamina em éter, e subsequente desidratação do intermediário ácido maleâmico por aquecimento ( $80^{\circ}$ - $90^{\circ}$ C) com anidrido acético contendo acetato de sódio (Esquema 13).



Esquema 13- Reação de Diels-Alder da *N*-benzilmaleimida 58 com antraceno.

Utilizando o mesmo método, foi realizada a síntese da *N*-fenilmaleimida **57** (Esquema 13) (75% de rendimento).

A succinimida **59** foi obtida da reação da maleimida (**55**) com o antraceno (Esquema 12) em tolueno aquecido (60<sup>0</sup>-70<sup>0</sup>C) (37,6% de rendimento). O espectro no infravermelho apresentou duas bandas em 3060cm<sup>-1</sup> e 3032cm<sup>-1</sup> correspondentes a CH aromático, uma banda em 2956cm<sup>-1</sup> correspondente a CH alifático, duas absorções carbonil correspondentes a vibrações simétrica e assimétrica em 1770cm<sup>-1</sup> e 1696cm<sup>-1</sup>, respectivamente e uma banda em 690cm<sup>-1</sup> correspondente a deformação angular fora do plano do anel monosubstituído.

### **3.2. Planejamento Racional de Imidas e Sulfonamidas (Atividade Antinociceptiva)**

Com o intuito de analisar as semelhanças e diferenças estruturais dos compostos biologicamente testados e relacionar esta análise com os dados biológicos, realizaram-se análises quimiométricas, análises de QSAR-2D, QSAR-3D e QSAR-4D (ou QSAR-3D utilizando conformações).

Estas análises objetivam o planejamento racional de novos compostos, de forma a obter informações que auxiliem na decisão de sintetizar ou não estes compostos.

#### **3.2.1. Análise de PCA**

Buscando uma separação estrutural dos compostos (Tabela 1) em grupos que tenha relação com a potência biológica, realizou-se uma análise de PCA. Parâmetros físico-químicos calculados no programa TSAR e WHIM, para estes compostos, foram submetidos a uma análise de componentes principais.

O conjunto de compostos utilizados neste estudo foi dividido em 4 conjuntos (conjunto 1-compostos da literatura; conjunto 2-compostos sintetizados neste trabalho; conjunto 3-compostos da literatura e compostos sintetizados neste trabalho; conjunto 4-compostos da literatura e compostos sintetizados neste trabalho, com atividade conhecida (conjunto 3) e compostos sintetizados neste trabalho com atividade desconhecida) para verificar se uma separação em grupos através da análise de PCA era viável, analisando caso a caso.

### 3.2.1.1. Conjunto 1

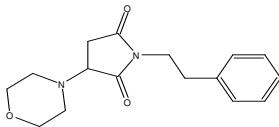
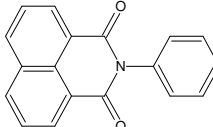
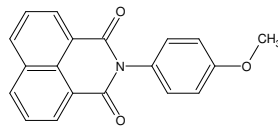
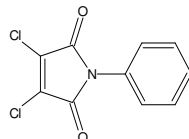
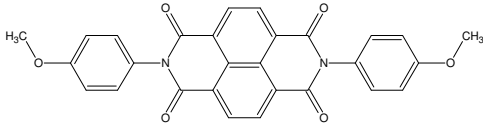
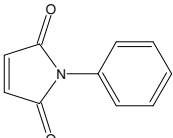
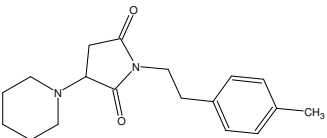
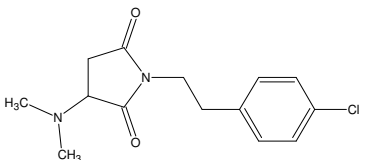
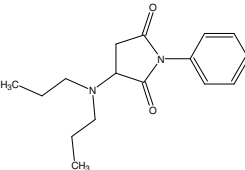
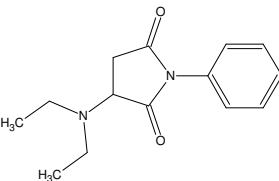
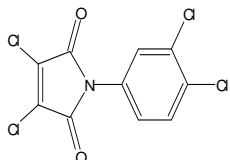
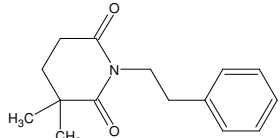
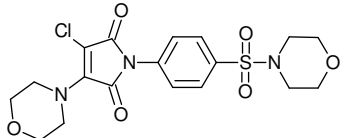
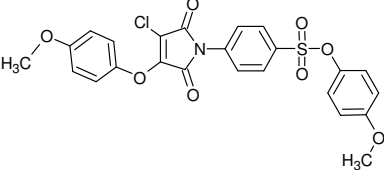
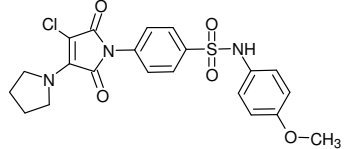
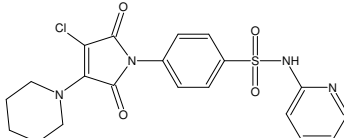
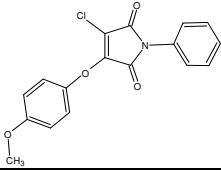
PCA foi realizada para o banco de dados (12x60 – nº de compostos x nº de parâmetros) para visualizar os complexos dados estruturais calculados no programa TSAR (compostos 1-12, Tab.1). As três PC's podem explicar 74,4% da variação do conjunto 1, um valor bom. Os *scores* da primeira e da segunda componentes de cada classe são mostrados na Figura 12.

Os resultados de PCA mostram que a segunda componente, PC2, separa os compostos menos potentes dos compostos mais potentes (*scores* na Figura 12 separados por uma linha), com relação a aspirina ( $DI_{50} = 133,00 \mu\text{M/Kg}$ ). Acima da linha estão os compostos mais potentes (2-6, 11), os compostos com anel imídico insaturado. Abaixo da linha estão os compostos menos potentes (1, 7-10) e de potência moderada (12).

Na PCA deste conjunto os compostos também foram divididos em 3 grupos (Figura 12): grupo 1- compostos de alta potência (2, 3 e 6); grupo 2- dicloromaleimidias de alta potência (4 e 11) e grupo 3- compostos de baixa potência (1, 7, 8, 9, 10 e 12). O composto 5, composto de maior potência, ficou isolado por se tratar da única bisnaftalimida do conjunto.



Tabela 1- Banco de dados utilizado na análise quimiométrica.

Número	DI <sub>50</sub> (μM/Kg)	Número	DI <sub>50</sub> (μM/Kg)	Número	DI <sub>50</sub> (μM/Kg)
1	35,00	2	1,72	3	0,69
					
4	2,78	5	0,46		
					
6	19,00	7	210,00	8	220,00
					
9	300,00	10	300,00	11	3,14
					
12	123,00	13 (26)	64,95		
					
14 (27)	7,36	15 (35)	50,66		
					
16 (44)	10,92	17 (16)	13,31		
					

Tendo esta análise como objetivo verificar a viabilidade de uma separação em grupos que tivesse relação com os dados biológicos, não se buscou uma relação matemática entre os descritores físico-químicos e a resposta biológica.

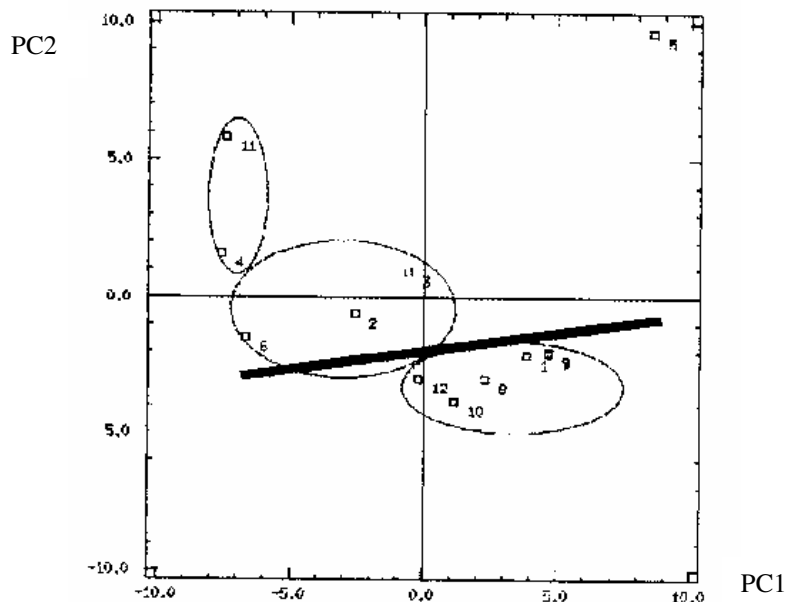


Figura 12- Scores da PC1 versus PC2 (conjunto 1).

#### 3.2.1.4. Conjunto 2

Uma análise de PCA foi realizada com o conjunto treino (05x39) e os parâmetros calculados no programa TSAR (compostos 13-17/Tabela 1). Os compostos sintetizados neste trabalho possuem sua numeração correspondente a síntese entre parênteses na Tabela 2. Nesta análise não foi possível encontrar uma separação conclusiva com relação aos dados biológicos (Figura 13), pois o banco de dados é muito reduzido. Contudo, isto não invalida a continuidade do estudo, somente demonstra a necessidade de expansão deste banco de dados e isto confirma a necessidade de juntar o conjunto 1 e 2 num único conjunto: o conjunto 3.

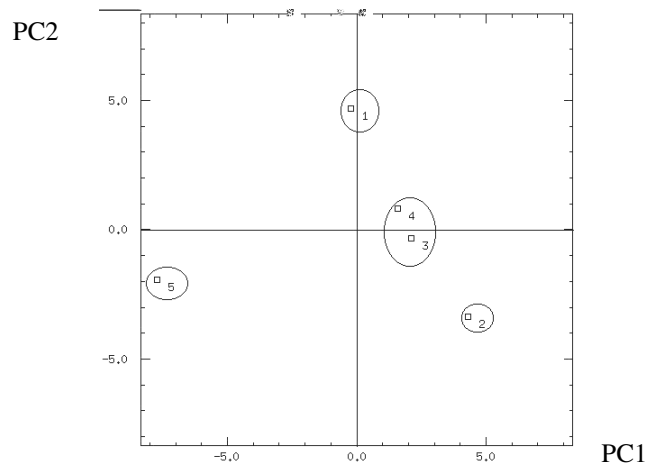


Figura 13- Scores da PC1 versus PC2, obtida do conjunto 2.

### 3.2.1.3. Conjunto 3

Nesta etapa, uma análise foi realizada com os mesmos objetivos já citados acima com o banco de dados completo (17x75) e os parâmetros calculados no programa TSAR. As três primeiras componentes podem explicar 75,3% da variação do banco de dados. Nos *scores* das duas primeiras componentes (*scores* na Figura 15 separados por uma linha) é possível verificar que a PC2 separa os

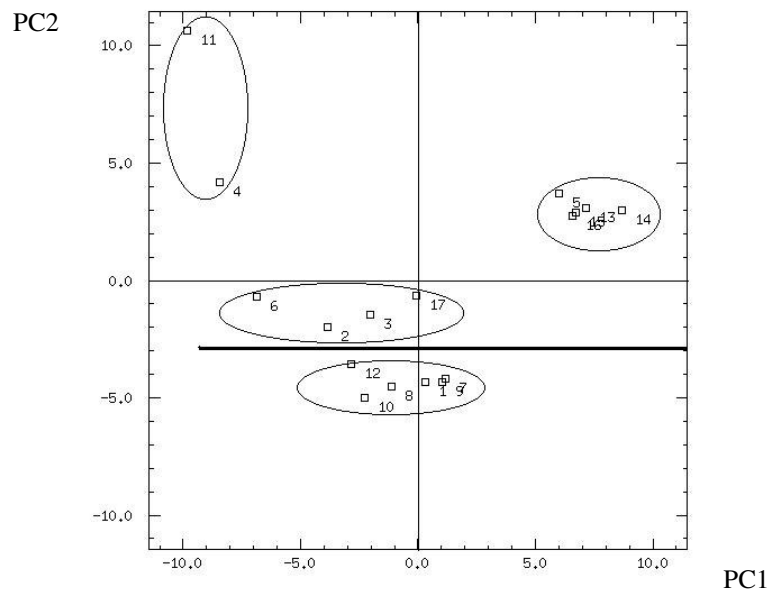


Figura 14- Gráfico dos *scores* da PC1 versus *scores* da PC2.

compostos menos potentes e os de potência moderada (1, 7-10, 12) dos mais potentes (2-6, 11, 13-17), como ocorreu na PCA do conjunto 1.

É possível observar os compostos mais potentes que a aspirina estão separados em 3 grupos: grupo1- éster sulfonado (14), sulfonamidas (13, 15, 16), bisnaftalimida (5), grupo 2- maleimidias (2, 3, 6, 17) e grupo 3- 3,4-dicloromaleimidias (4 e 11).

O dendograma/HCA também mostra os compostos separados em dois grupos: A – compostos não sulfonados e G3- compostos sulfonados e bisnaftalimida (5, 13-16). O grupo A por sua vez apresenta dois subgrupos (G1- 1, 7-10, 12; G2- 2-4, 6, 17) de forma concordante com a PCA, exceto pelo composto 4 (Figura 15).

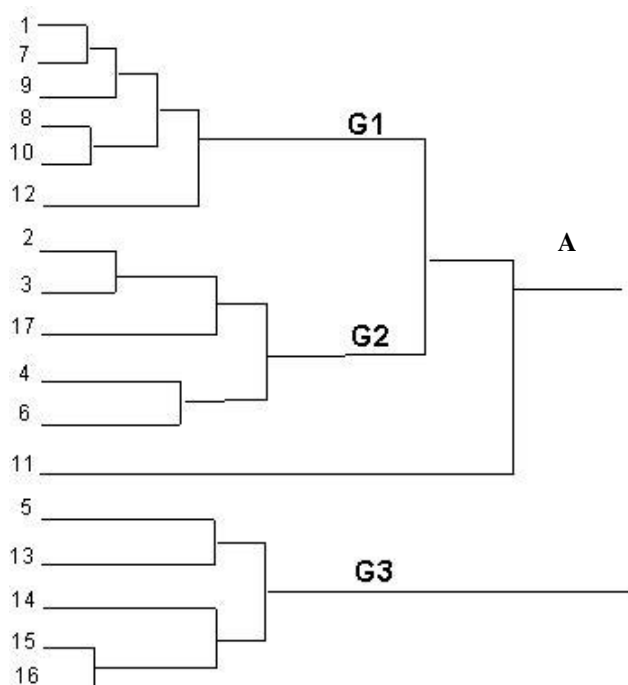


Figura 15 – Dendrograma obtido da análise de *cluster* do conjunto 3.

É importante destacar que, na PCA, o composto 12 situa-se entre os compostos 1, 7, 8, 9 e 10 (succinimidias) e os compostos 2, 3, 6 e 17. Sua posição corresponde as suas características estruturais e sua potência antinociceptiva. O composto 12 não é apenas intermediário em termos estruturais, mas também em relação a sua potência biológica.

Tanto a HCA quanto a PC1 separas imidas das sulfonamidas (13, 15, 16) e éster sulfonado (14). Esta separação não é relacionável às potências, devido a diversidade estrutural. Contudo, a localização do composto 5, por se tratar de uma bisnaftalimida, no grupo dos compostos sulfonados (G3) é interessante. O composto 5 é o mais potente dentre todos os compostos do banco de dados.

Na seqüência do trabalho buscou-se elucidar quais dentre as diversas combinações de parâmetros seria capaz de relacionar os compostos de acordo com sua potência antinociceptiva. Para tanto, uma seleção de variáveis dentre os 75 parâmetros físico-químicos calculados foi realizada primeiro por análise dos gráficos de *loading* (gráfico das variáveis), onde a significância de cada parâmetro em cada componente principal foi considerada. Em seguida, uma seleção definitiva foi obtida analisando a matriz de correlação dos parâmetros para eliminar os parâmetros altamente correlacionados. É importante ressaltar que esta relação com a potência biológica, neste momento deve ser intuitiva, pois em nenhum momento no algoritmo da PCA o dado biológico foi introduzido.

Desta forma, a seguinte equação (Eq.12) foi obtida

$$PC = - 0,205 (\text{Carbo}_{\text{similaridade, carga, massa, Mol(8)}}) - 0,188 \text{Carbo}_{\text{similaridade, carga, Mol (12)}} \quad (12)$$

A equação 12 sugere que serão mais potentes os compostos que apresentarem distribuição de massa e carga diferente daquela dos compostos 8 e 12. Estes compostos não apresentam dupla ligação no anel imídico, o que deve dificultar a interação com a enzima.

Estes resultados são concordantes com a separação obtida para o conjunto, onde os compostos menos potentes que a aspirina (1, 7, 8, 9, 10 e 12) ficaram separados dos demais membros do conjunto.

Na análise do conjunto 3 (conjuntos 1 e 2) obteve-se bons resultados. Já ao trabalhar somente com o conjunto 2 não foi possível obter uma separação em grupos relacionável aos dados biológicos, o que não ocorreu na PCA do conjunto 1.

Ou seja, só será possível trabalhar com o conjunto 2 quando for possível aumentar o número de dados.

Utilizou-se esta análise de PCA (conjunto 3) para a previsão da atividade biológica de 15 análogos de potência desconhecida (Tabela 2), inicialmente planejados com base no diagrama de Topliss (**Topliss**, 1977), conforme síntese previamente relatada (**Walter et al**, 1999).

#### 3.2.1.4. Conjunto 4

Uma análise de PCA foi realizada com o conjunto de treino (1-17) juntamente com os compostos planejados (32x123), com o intuito de prever a atividade biológica dos compostos planejados (18-32). As três primeiras componentes principais explicam 73% da variação do conjunto 4. Os *scores* da primeira e da segunda componentes são apresentados na Figura 16-b, onde se observam todos os compostos (região A). Para visualização da região B, os compostos 4 e 11 foram excluídos e esta região do gráfico foi amplificada (Figura 16-b).

Assim como na análise de PCA do conjunto 3, na PCA do conjunto 4 os *scores* das duas primeiras componentes (*scores* na Figura 18a separados por uma linha) separam os compostos menos potentes (1, 7-10) dos mais potentes (2-6, 11, 13-17) e de potência moderada (12).

Analisando as diversas combinações dos parâmetros físico-químicos, conforme procedimento anteriormente descrito, foi possível encontrar uma relação entre os parâmetros Kier ChiV e similaridade de carga ao composto (26), conforme equação 13.

$$PC1 = 0,132 (\text{Kier ChiV}) + 0,100 (\text{Carbosimilaridade, carga, Mol (26)}) \quad (13)$$

A bisnaftalimida (composto 5) não foi agrupada em nenhuma família, ou seja é um *outlier*, porque possui um alto valor de Kier *ChieV* como as sulfonamidas. Porém, não pode ser agrupada a estas porque seu valor de Carbo-similaridade não é tão elevado quanto o das sulfonamidas.

Possivelmente o aumento da potência desses compostos é favorecido por estruturas com densidade de carga semelhante a do composto 26. Esta molécula apresenta uma densidade negativa no grupo  $\text{SO}_2\text{NHR}$  que, segundo o mecanismo proposto para imidas, participaria da interação não covalente com a PGHS.

As separações de todos os grupos foram confirmadas através de Análise Hierárquica de *Cluster* (HCA – dendograma; Figura 18), onde os compostos são divididos em dois principais grupos (A – imidas, B – sulfonamidas, éster sulfonado e bisnaftalimida). O grupo A apresenta 3 subgrupos (G1-G3). G1 é constituído por imidas de baixa potência. G2 é constituído por uma mistura de imidas de potência conhecida (alta potência – 2,3, exceto 12) e de potências desconhecidas (28, 29, 31, 32). O grupo G3 também é uma mistura de compostos de potência conhecida (6, 17) e de potência desconhecida (30).

O grupo B também apresenta 3 subdivisões (G4-G6). G4 apresenta compostos de potência conhecida (5, 13) e compostos de potência desconhecida (19, 20, 21). G5 é constituído de dois compostos de potências desconhecidas (18, 22). G6 apresenta compostos de potência conhecida (14, 15, 16) e compostos de potência desconhecida (23-27).

No grupo B, os compostos sulfonados (13-16) são separados em dois grupos, mais potentes – G6 e menos potentes – G4, exceto o composto 15.

Através da análise de PCA e HCA, é possível verificar que os compostos 28, 29, 31 e 32 ficaram agrupados com os compostos 2, 3 e 12, devendo apresentar alta potência. Os compostos 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26 e 27 ficaram agrupados com os compostos 13, 15 e 16 o que indica uma provável potência média. O composto 30 ficou agrupado com o composto 6. Já os compostos 18 e 22 não estão agrupados com nenhum composto de potência conhecida.

O composto 14 não foi agrupado na PCA, pois é o único éster sulfonado do banco de dados. Esta situação é melhor visualizada num gráfico tridimensional, pois ele está projetado para trás e fica difícil demonstrar na Figura 16b.

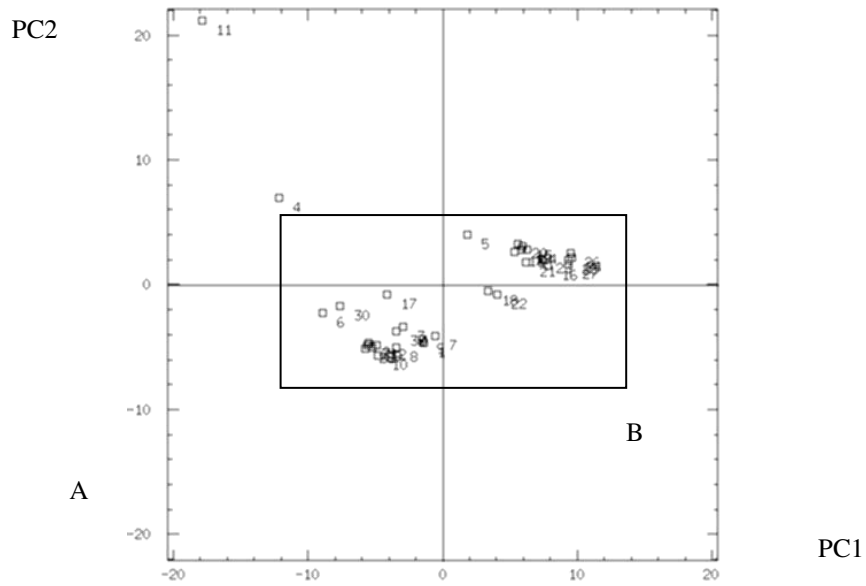


Figura 16a- Gráfico dos *scores* da PC1 versus *scores* da PC2.

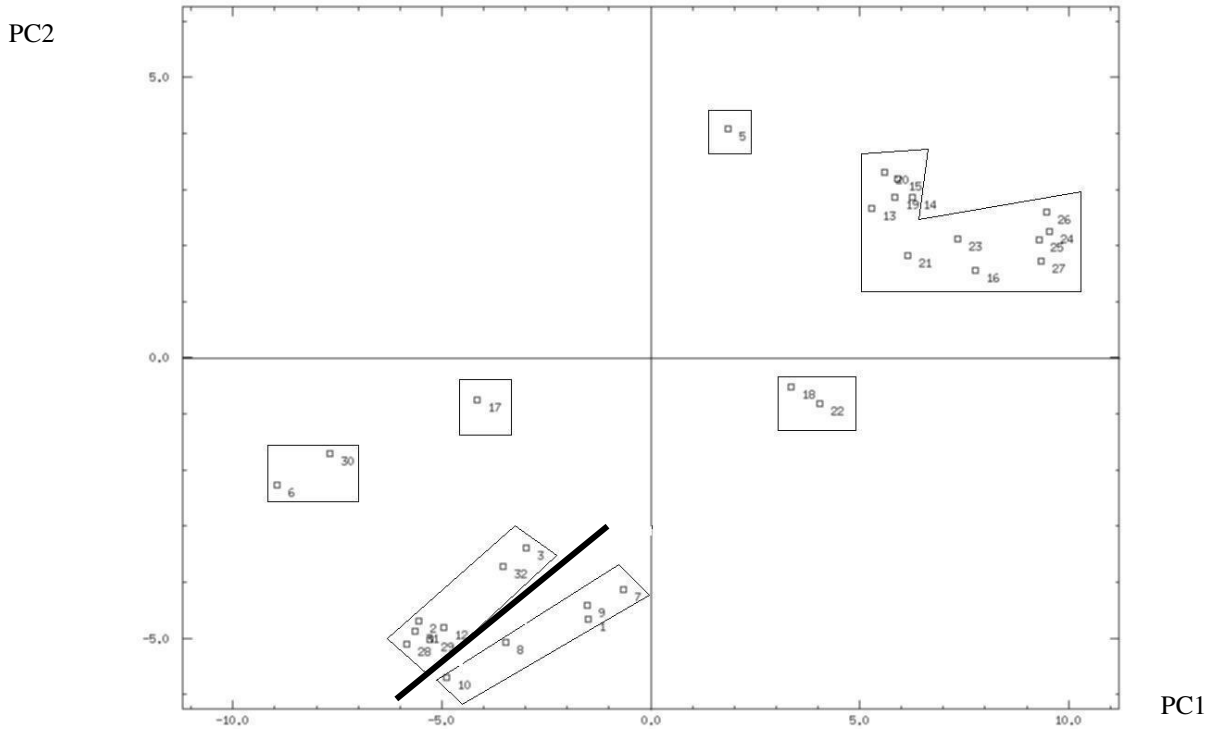
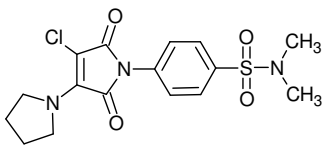
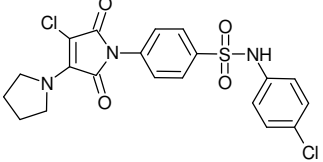
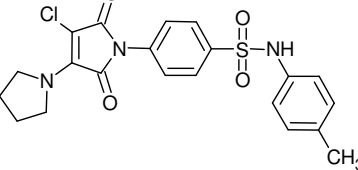
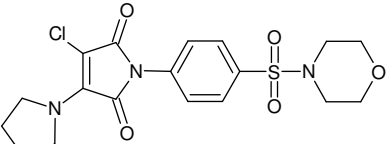
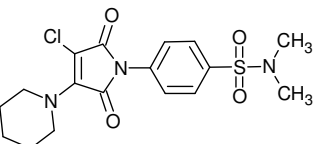
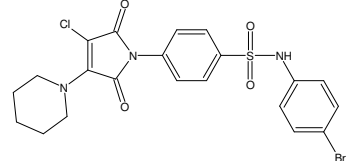
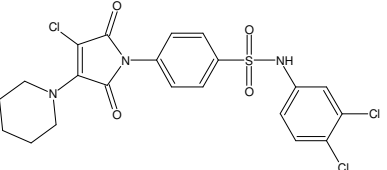
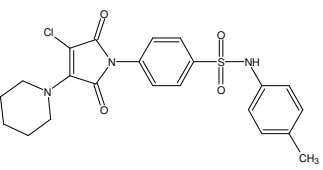
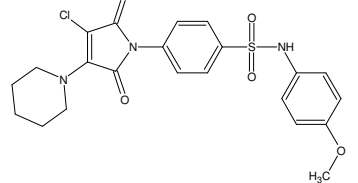
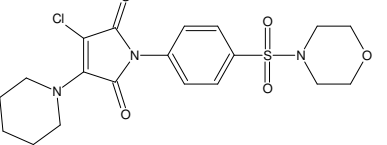
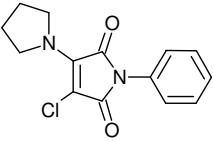
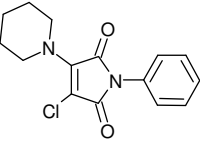
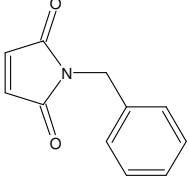
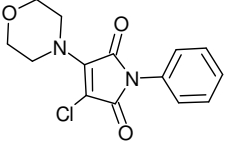
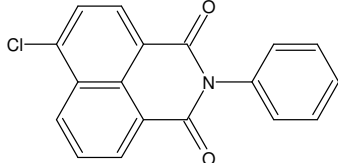


Figura 16b- Gráfico amplificado da região B dos *scores* da PC1 versus *scores* da PC2.



Tabela 2- Compostos planejados com base no diagrama de Topliss (Topliss, 1977). Os compostos sintetizados neste trabalho possuem sua numeração correspondente a síntese entre parênteses.

Número	Número	Número
18 (31) 	19 (33) 	20 (34) 
21 (36) 	22 (37) 	23 (38) 
24 (40) 	25 (41) 	26 (42) 
27 (43) 	28 (13) 	29 (14) 
30 (58) 	31 (15) 	32 (60) 

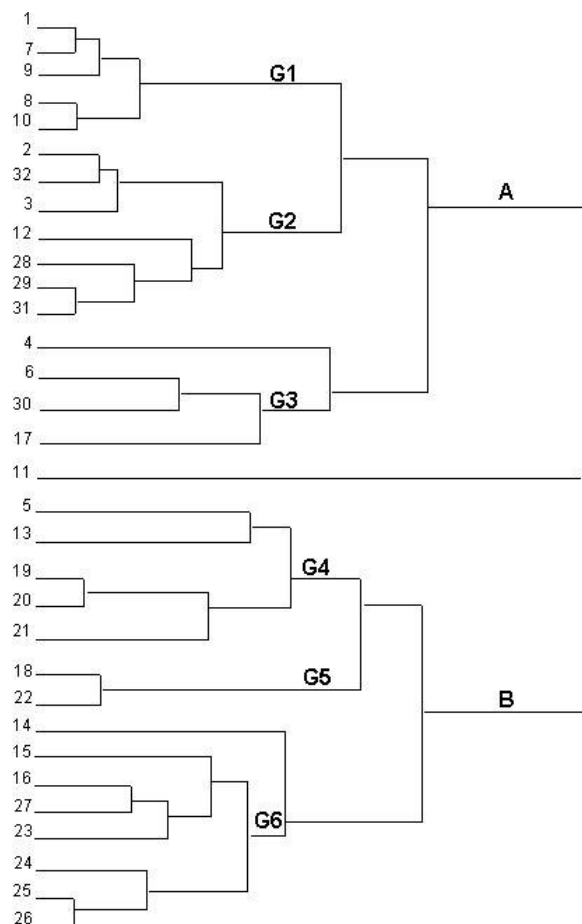


Figura 17– Dendrograma do conjunto 4.

Com base neste estudo de PCA, os compostos 19, 22, 24, 27, 30 e 32 foram selecionados para teste biológico. Foram selecionados compostos de cada grupo para poder não só realizar o teste biológico de um número reduzido de compostos como também validar a PCA realizada. Os compostos e seus respectivos resultados biológicos obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Sendo esta uma análise não supervisionada, os resultados biológicos estão dentro da faixa esperada. Contudo, se fosse possível utilizar ferramentas que o programa usado não apresenta, poderia ter-se buscado uma separação ainda mais refinada. Por exemplo, poderia ser feito uma análise da influência dos parâmetros na separação, dois a dois.

Uma análise de PCA também foi realizada com parâmetros calculados no programa WHIM-3D, porém nenhuma separação satisfatória foi obtida.

Uma nova análise de PCA foi realizada com o mesmo banco de dados, porém com as moléculas minimizadas por AM1, no programa GAMESS. Nesta análise não foi possível obter uma separação compatível com as potências. Somente foram separadas as bisnftalimididas (compostos mais potentes), porém as menos potentes ficaram agrupadas com os compostos de alta potência.

Tabela 3 – Compostos planejados e suas potências biológicas.

Composto	DI <sub>50</sub> (μMKg <sup>-1</sup> )
19 (33)	26,24
22 (37)	44,96
24 (40)	22,75
27 (43)	18,87
30 (58)	24,73
32 (60)	34,57

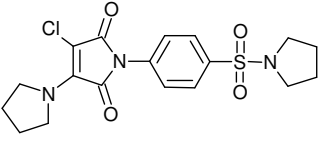
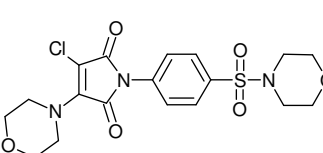
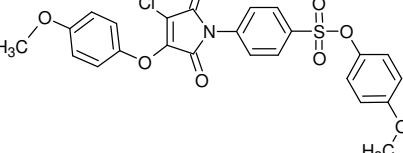
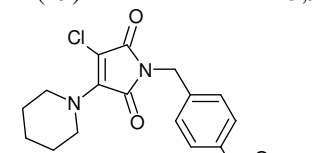
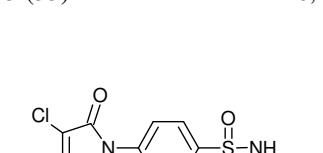
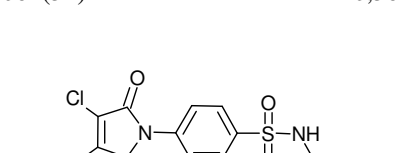
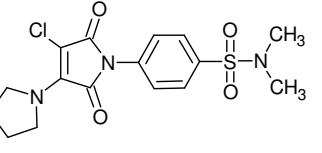
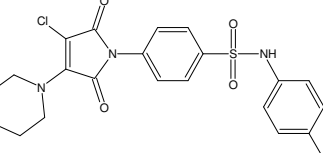
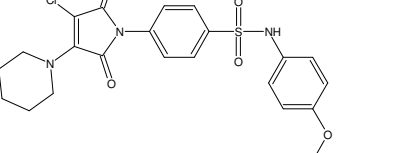
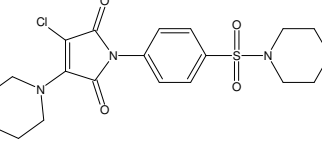
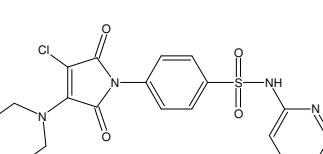
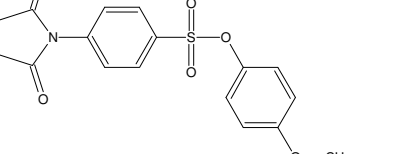
Desta forma, verifica-se que a minimização da estrutura de entrada por GA é mais eficiente para este tipo de análise do que a minimização por AM1.

Outro estudo de quimiometria foi realizado com um banco constituído apenas pelos compostos sulfonados, compostos estes que foram sintetizados e testados durante a realização deste trabalho de planejamento racional (Tabela 4). Estes compostos foram planejados com base no diagrama de Topliss.

Uma análise de PCA foi realizada com o banco de dados, cujas moléculas foram minimizadas por GA, no programa SYBYL, utilizando parâmetros calculados no programa TSAR (13x87). As três primeiras componentes principais podem explicar 65% da variação do banco de dados, um valor baixo (<70%). Os *scores* das duas primeiras componentes são apresentadas na Figura 19, onde se verifica que nenhuma separação em grupos foi obtida. Nesta análise só foi possível a separação do composto 3 (mais potente) dos demais.

O mesmo resultado foi obtido no HCA destes compostos (Figura 19).

Tabela 4- Compostos sulfonados sintetizados e testados durante o trabalho Os compostos sintetizados neste trabalho possuem sua numeração correspondente a síntese entre parênteses.

N.º	DI <sub>50</sub> (µM/Kg)	N.º	IDI <sub>50</sub> (µM/Kg)	N.º	DI <sub>50</sub> (µM/Kg)
01 (24)	50,25	02 (26)	64,95	03 (27)	7,36
					
04 (29)	13,94	05 (33)	26,24	06 (34)	10,36
					
08 (31)	44,96	09 (41)	25,66	10 (42)	19,10
					
11 (43)	18,87	12 (44)	10,92	13 (55)	7,35
					

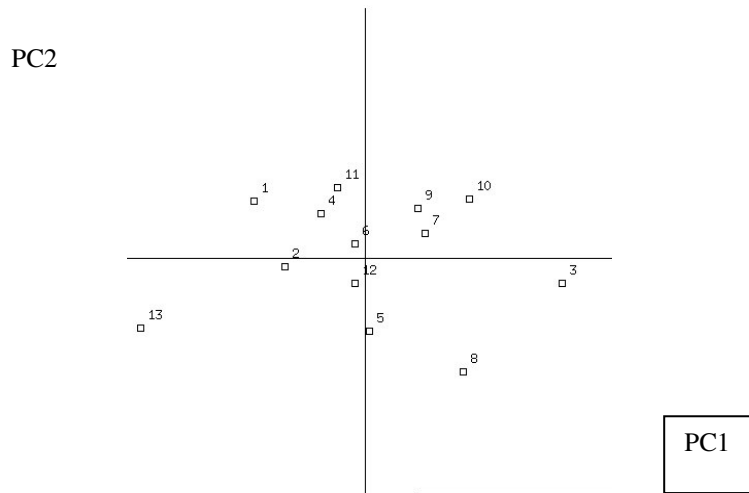


Figura 18- Scores da PC1 e PC2 dos compostos sulfonados (Tab. 4, minimizados por GA).

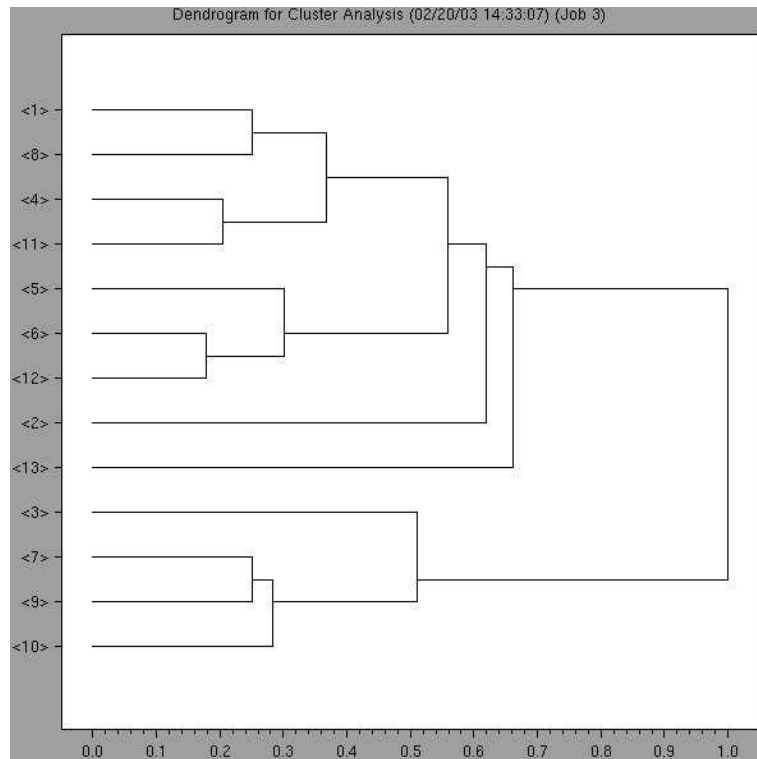


Figura 19- Dendrograma dos compostos sulfonados (Tab. 4), minimizados por GA.

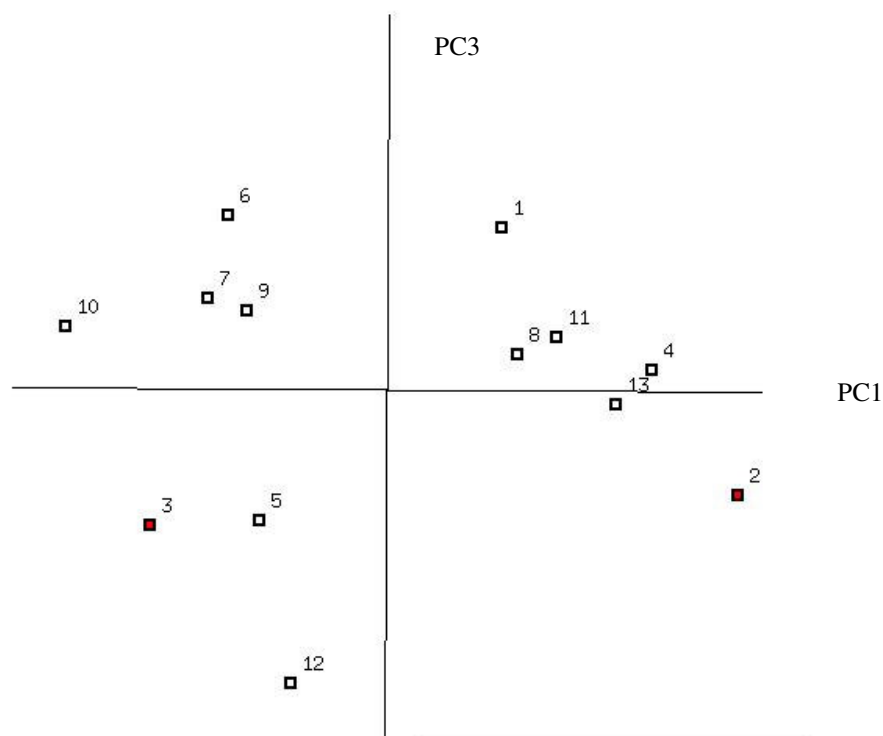


Figura 20- Scores da PC1 e PC3 dos compostos sulfonados, minimizados por AM1.

Uma segunda análise de PCA foi realizada com o mesmo banco de dados acima descrito, porém com as moléculas minimizadas por AM1, no programa GAMESS, utilizando parâmetros calculados no programa TSAR (13x103). As três primeiras componentes principais explicam 69% da variação do banco de dados. Os *scores* da PC1 e PC3 são mostrados na Figura 20, onde novamente não foi possível encontrar uma separação. Apenas foi possível isolar o composto 2 (menos potente) dos demais.

A análise de HCA (Figura 21) é concordante com a análise de PCA.

Desta forma, verificou-se que o banco de dados composto por sulfonamidas e éster sulfonado não é adequado a este tipo de análise, sendo necessário uma maior variação estrutural e/ou uma maior variação nos dados biológicos ou ainda, um maior número de moléculas.

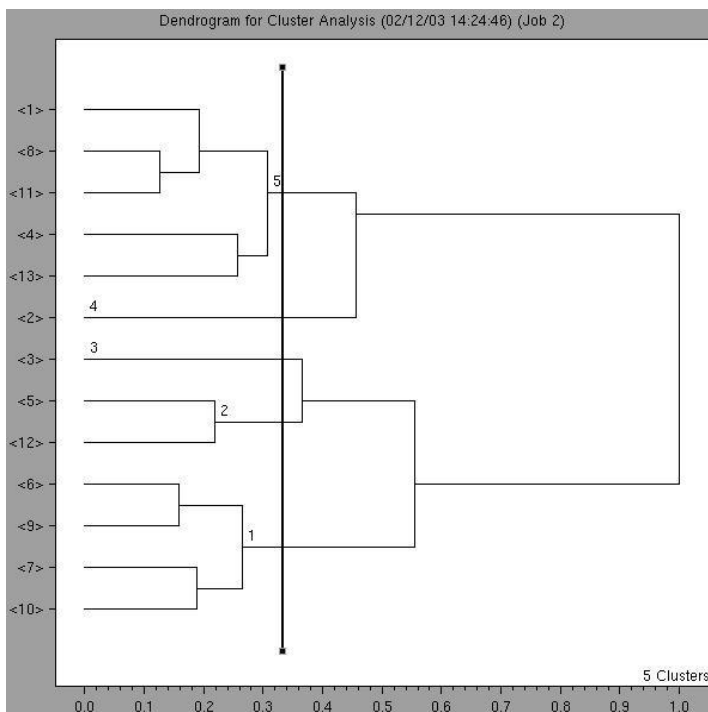


Figura 21 - Dendrograma dos compostos sulfonados, minimizados por AM1.

Buscando uma relação quantitativa entre a estrutura e os dados biológicos dos compostos sulfonados, fez-se um estudo de QSAR clássica.

### 3.2.2. QSAR Clássica

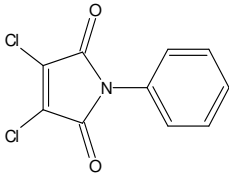
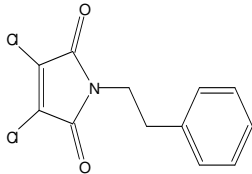
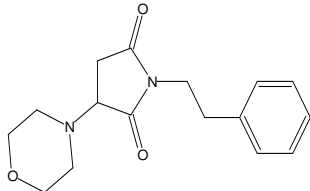
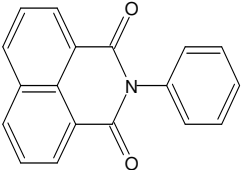
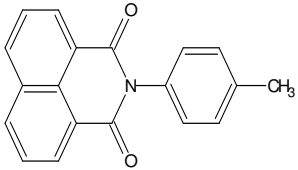
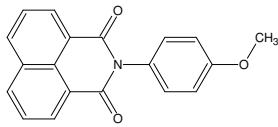
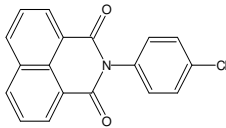
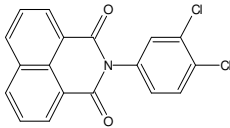
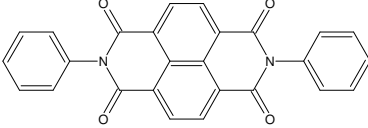
Tendo como objetivo planejar de forma racional novos compostos biologicamente ativos, buscou-se uma relação quantitativa entre a atividade antinociceptiva e a estrutura dos respectivos compostos já sintetizados e biologicamente testados (Tabela 5). Na Tabela 5 os compostos são identificados pela numeração designada no banco de dados. Para facilitar a identificação dos compostos sintetizados neste trabalho, entre parênteses está a numeração que identifica estes compostos na síntese.

Através de um modelo de QSAR é então possível prever a potência biológica de novos compostos. Este modelo de QSAR nada mais é do que uma equação matemática que relaciona parâmetros físico-químicos (x) e dados biológicos (y).

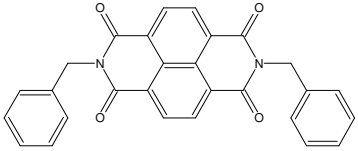
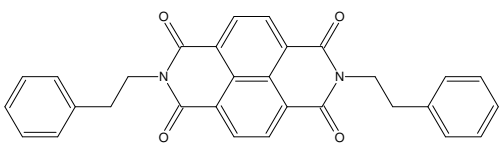
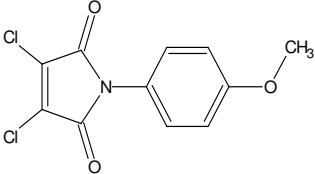
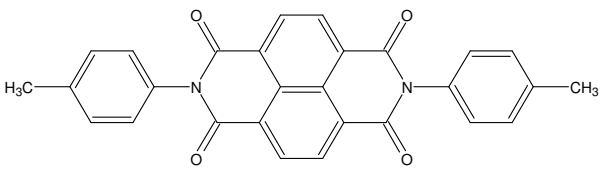
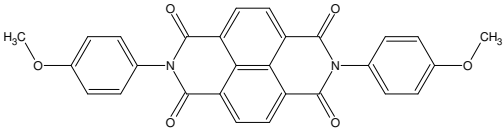
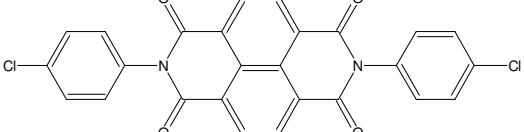
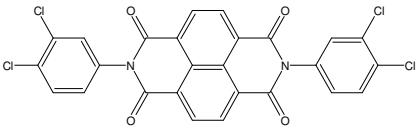
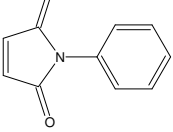
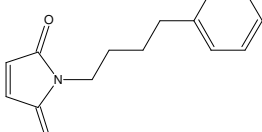
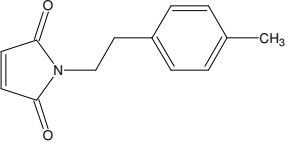
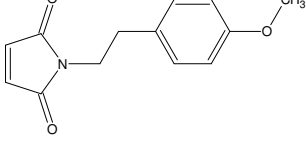
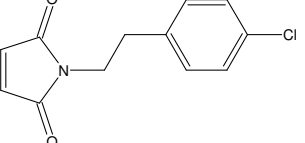
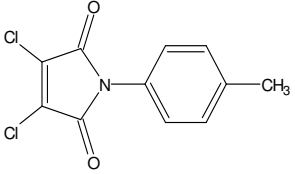
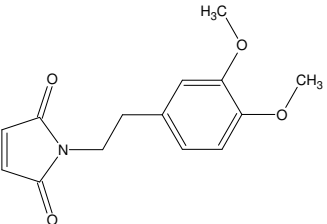
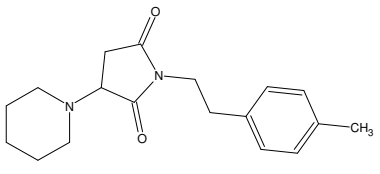
O estudo envolve o desenvolvimento de um modelo de QSAR para uma série de imidas previamente estudadas (1-35/Tab. 5) (Andricopulo et al, 1998, Cechinel Filho et al, 1996, Correa et al, 1997) e imidas sintetizadas neste trabalho (33-39/Tab. 5). Todos os compostos foram testados quanto a atividade antinociceptiva.

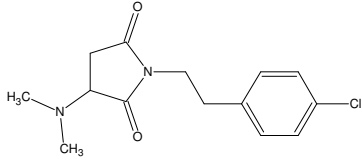
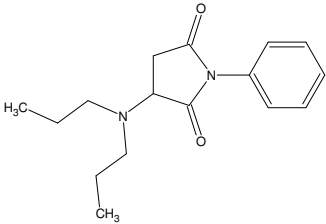
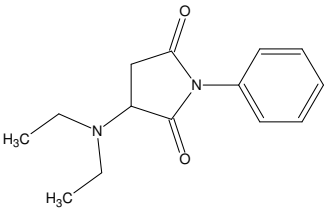
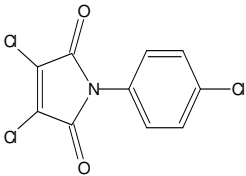
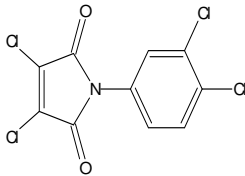
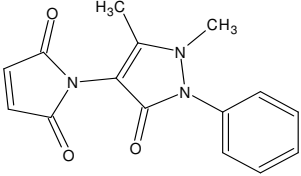
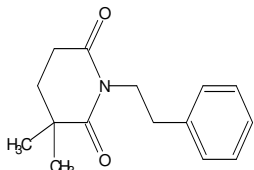
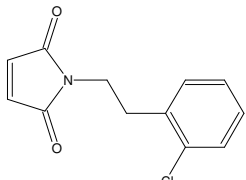
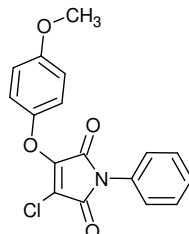
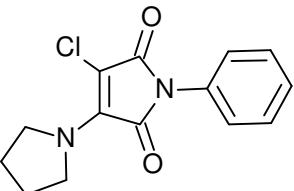
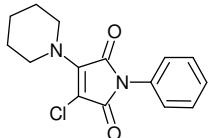
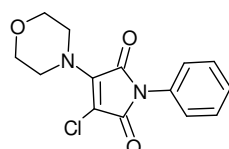
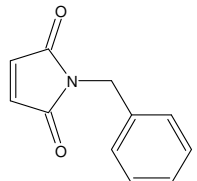
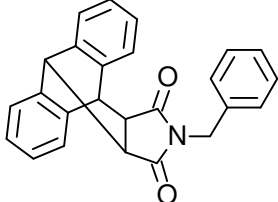
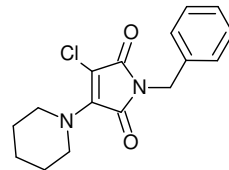
Após o modelo ser criado (Eq.14), tabela de dados finais (Tabela 6) e gráficos de valores experimentais versus previstos (Figura 23), assim como gráfico de resíduos versus valores previstos (Figura 24) foram obtidos, no programa SYBYL e Origin.

Tabela 5 - Banco de dados utilizado no estudo de QSAR 2D.

Número	pDI <sub>50</sub> Previsto Resíduo	Número	pDI <sub>50</sub> Previsto Resíduo	Número	pDI <sub>50</sub> Previsto Resíduo
01	5.555 5.220 -0.335	02	5.398 5.069 -0.329	03	4.450 4.064 -0.392
					
04	5.764 5.809 0.045	05	5.660 5.583 -0.077	06	6.161 5.607 -0.554
					
07	5.488 5.821 0.333	08	6.000 5.822 -0.178	09	6.000 6.108 0.108
					



Número	pDI <sub>50</sub> Previsto Resíduo	Número	pDI <sub>50</sub> Previsto Resíduo	Número	pDI <sub>50</sub> Previsto Resíduo
10	5.672 5.452 -0.220	11	5.733 5.882 0.149		
					
12	4.928 4.958 0.030	13	5.921 5.722 -0.199		
					
14	6.337 5.949 -0.388	15	5.775 6.120 0.345		
					
16	5.928 6.084 0.156	17	4.726 5.121 0.395	18	5.125 4.937 -0.188
					
19	5.292 4.804 -0.488	20	5.004 4.637 -0.367	21	4.710 4.997 0.287
					
22	4.972 5.028 0.056	23	4.943 4.630 -0.313	24	3.678 3.758 0.107
					

Número	pDI <sub>50</sub> Previsto Resíduo	Número	pDI <sub>50</sub> Previsto Resíduo	Número	pDI <sub>50</sub> Previsto Resíduo
25	3.658 3.758 0.107	26	3.523 4.009 0.486	27	3.523 4.004 0.481
					
28	5.031 5.294 0.263	29	5.503 5.307 -0.196	30	5.602 4.687 -0.915
					
31	3.910 4.188 0.278	32	4.886 5.064 0.178	33	4.876 5.132 0.256
					
34 (13)	4.086 4.490 0.404	35 (14)	4.412 4.211 -0.201	36 (15)	4.061 4.279 0.218
					
37 (58)	4.610 5.121 0.511	38 (59)	----- 5.997 -----	39 (18)	----- 4.078 -----
					

Um conjunto de mais de 800 parâmetros físico-químicos foram calculados para as 33 imidas constituintes do banco de dados (Tabela 5). Os parâmetros físico-químicos usados na relação estrutura-atividade quantitativa estão na Tabela 6. Estes parâmetros passaram por um análise estatística, onde buscou-se parâmetros que apresentassem uma baixa correlação. Uma baixa correlação entre os parâmetros é indispensável para evitar a colinearidade e relacionar a verdadeira contribuição da estrutura química para a atividade biológica.

O modelo obtido (Eq.14), com 5 variáveis estereo e eletrostáticas, é descrito a seguir:

$$\begin{aligned}
 \text{pIC}_{50} = & 0.93\text{Mor24v}(\pm 0.38) - 1.47\text{Mor31v}(\pm 0.35) + 1.24\text{Mor28p}(\pm 0.22) \\
 & + 3.03\text{ATS1v}(\pm 0.43) + 3.96\text{MATS1v}(\pm 1.11) + 3.17 \quad (14) \\
 n = 26 & \quad F = 79.178 \quad s = 0.340 \quad r^2_{cv} = 0.788 \quad r^2 = 0.805
 \end{aligned}$$

As quantidades entre parênteses são os desvios padrões dos coeficientes. Uma análise estatística dos dados experimentais e dos valores calculados da resposta biológica foi realizada, onde o modelo encontrado é avaliado quanto a sua capacidade preditiva ( $r^2_{cv}$ ) com base no método LOO.

Os valores experimentais, valores calculados, resíduos e erros percentuais do conjunto treino estão na Tabela 6. Os compostos sintetizados neste trabalho estão com as suas numerações correspondentes a síntese identificadas entre parênteses na Tabela 6.

O modelo apresenta uma boa capacidade preditiva, pois além de apresentar 78% da referida capacidade, os erros percentuais ficaram abaixo dos 20% aceitáveis. Das 37 previsões (série treino, série teste e série validação lateral) feitas para compostos com potência antinociceptiva conhecida, 31 tiveram erro inferior a 10%.

Na Figura 22 está apresentado o gráfico dos valores de potência antinociceptiva experimental versus potência prevista pela equação 14. Nesta figura nota-se a boa adequação do modelo.

Tabela 6- Parâmetros estéreo e eletrônicos, valores experimentais e valores previstos pelo modelo (Eq.14), resíduos e erros percentuais dos compostos da série de treino (1, 3-5, 7, 8, 11-19, 21, 23-26, 30-33) , série de teste (2, 6, 9, 10, 20, 22, 27) e série de validação lateral (36-39).

Composto	MOR24v	MOR31v	MOR28p	AT51v	MAT51v	pIC <sub>50</sub> previsto	pIC <sub>50</sub> real	Resíduo	Erro %
1	0,232	0,006	-0,191	0,746	-0,044	5,220	5,555	-0,335	6
2	0,234	0,053	-0,183	0,699	-0,032	5,069	5,398	-0,329	6
3	0,070	0,252	-0,212	0,586	-0,078	4,064	4,456	-0,392	9
4	0,137	-0,104	0,079	0,726	0,017	5,809	5,764	0,045	1
5	0,131	-0,025	0,024	0,710	0,020	5,583	5,660	-0,077	1
6	0,116	-0,133	0,077	0,693	-0,014	5,607	6,161	-0,554	9
7	0,100	-0,093	0,094	0,747	0,012	5,821	5,488	0,333	6
8	0,096	-0,066	0,098	0,768	0,006	5,822	6,000	-0,178	3
9	0,185	-0,067	0,347	0,733	0,006	6,108	6,000	0,108	2
10	0,352	0,177	0,016	0,712	0,011	5,452	5,672	-0,220	4
11	0,761	0,090	-0,018	0,695	0,015	5,882	5,733	0,149	3
12	0,169	-0,055	-0,152	0,692	-0,089	4,958	4,928	0,030	1
13	0,236	0,073	0,198	0,712	0,011	5,722	5,921	-0,199	3
14	0,194	-0,147	0,352	0,689	-0,034	5,949	6,337	-0,388	6
15	0,169	-0,066	0,324	0,762	-0,002	6,120	5,775	0,345	6
16	0,147	-0,018	0,320	0,791	-0,009	6,084	5,928	0,156	3
17	0,187	-0,056	-0,146	0,676	-0,042	5,121	4,726	0,395	8
18	0,119	0,057	-0,067	0,644	-0,031	4,937	5,125	-0,188	4
19	0,178	0,136	-0,111	0,633	-0,027	4,804	5,292	-0,488	9
20	0,076	0,044	-0,063	0,613	-0,079	4,637	5,004	-0,367	7
21	0,107	0,078	-0,053	0,672	-0,031	4,997	4,710	0,287	6
22	0,253	0,071	-0,244	0,720	-0,037	5,028	4,972	0,056	1
23	0,116	-0,077	-0,048	0,590	-0,122	4,630	4,943	-0,313	6
24	0,001	0,442	-0,32	0,591	-0,032	3,785	3,678	0,107	3
25	-0,110	0,223	-0,176	0,603	-0,077	4,040	3,658	0,382	10
26	0,039	0,243	-0,227	0,583	-0,081	4,009	3,523	0,486	14
27	-0,091	0,213	-0,169	0,583	-0,081	4,004	3,523	0,481	14
28	0,204	0,011	-0,187	0,781	-0,045	5,294	5,031	0,263	5
29	0,191	0,051	-0,205	0,816	-0,045	5,307	5,503	-0,196	4
30	0,146	0,107	-0,044	0,632	-0,080	4,687	5,602	-0,915	16
31	0,149	0,344	-0,282	0,600	-0,020	4,188	3,910	0,278	7
32	0,179	0,050	-0,086	0,672	-0,031	5,064	4,886	0,178	4
33 (16)	0,260	-0,110	-0,133	0,670	-0,076	5,132	4,876	0,256	5
34 (13)	0,141	0,224	-0,201	0,650	-0,050	4,490	4,086	0,404	10
35 (14)	0,222	0,284	-0,410	0,641	-0,045	4,211	4,412	-0,201	5
36 (15)	0,241	0,161	-0,339	0,632	-0,093	4,279	4,061	0,218	5
37 (58)	0,187	-0,056	-0,146	0,676	-0,042	5,121	4,610	0,511	11
38 (59)	0,299	-0,002	0,151	0,718	0,048	5,997	-	-	-
39 (18)	0,163	0,344	-0,395	0,633	-0,041	4,078	-	-	-

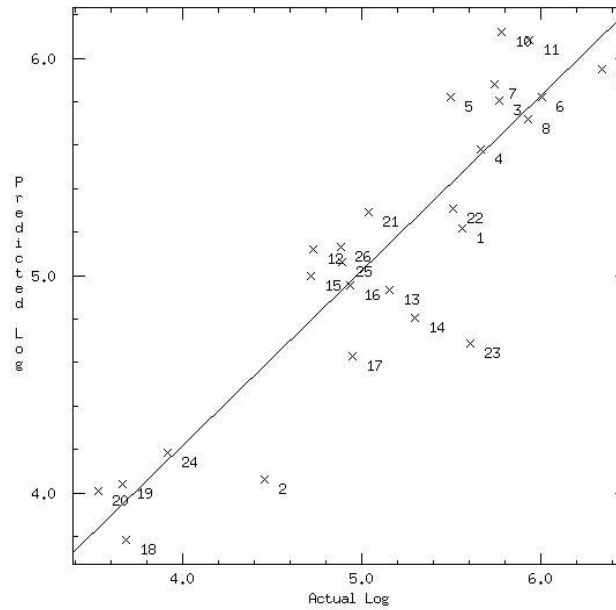


Figura 22- Gráfico da potência antinociceptiva experimental versus potência prevista pela equação 14 das imidas cíclicas (Tabela 5).

Na Figura 23 mostra-se a aleatoriedade dos resíduos, que é outra forma de avaliar quão bom é um modelo, pois os resíduos não podem apresentar uma variação previsível. No caso da equação 14 tem-se resíduos bem aleatórios.

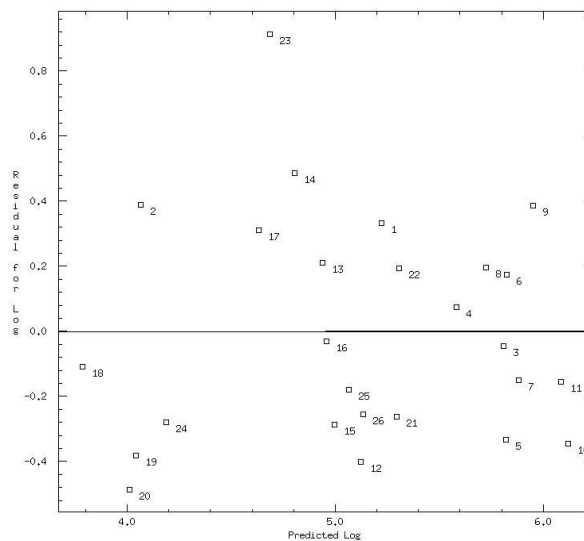


Figura 23- Gráfico de resíduos versus potência antinociceptiva prevista pela equação 14 das imidas cíclicas (Tabela 5).

Para avaliar a capacidade do modelo prever a potência biológica de novas moléculas, ou seja para averiguar se é um bom modelo no auxílio do desenvolvimento de novos compostos, o modelo (Eq.14) foi utilizado para prever a potência antinociceptiva de uma série teste constituída de 7 compostos (2, 6, 9, 10, 20, 22, 27, Tabela 5).

Como pode ser visto na Tabela 6, todos os compostos tiveram suas potências previstas com erros inferiores a 20%. Sendo assim, este é um bom modelo para ser utilizado no desenvolvimento de novas imidas cíclicas.

Através deste modelo, é possível verificar a importância de parâmetros eletrostáticos (Mor24v, Mor31v, Mor28p) (**Schuur & Gasteiger**, 1997) e estereo (ATS1v, MATS1v) (**Moran**, 1950) na descrição da atividade biológica. Porém, o significado prático destes parâmetros não está claro na literatura; são parâmetros meramente matemáticos.

Não é possível idealizar uma alteração na estrutura da molécula, com base nestes parâmetros, com o intuito de melhorar a resposta biológica. Ou seja, não é possível encontrar uma relação causal entre estes parâmetros e a atividade biológica. Contudo, isto não invalida o modelo para o planejamento de novos compostos biologicamente ativos, já que modelos de QSAR também são utilizados para prever a potência biológicas.

O modelo foi utilizado para prever a potência de compostos até então não testados – série validação lateral (34-39, Tabela 5). Os valores dos parâmetros e das potências previstas destes compostos estão relatados na Tabela 6.

Durante a execução deste trabalho os compostos 34-36 foram sintetizados e testados para poder validar o modelo, ou seja confirmar as previsões obtidas. As potências previstas, apresentadas na Tabela 6, divergiram dos valores experimentais numa faixa aceitável (erro < 20%). Isto comprova que a equação 14 relaciona de forma adequada as características estruturais e os dados biológicos.

Uma análise de PCA foi realizada com estes parâmetros e os compostos da série treino (26x5), para averiguar a capacidade destes parâmetros de explicar a variação do banco de dados, ou seja de separar os compostos conforme suas

características estruturais. Os *scores* das duas primeiras PC's podem ser vistos na Figura 25, onde é possível observar que a PC1 (eixo y) separa os compostos acima em mais potentes, abaixo em menos potentes e no meio estão os de potência intermediária.

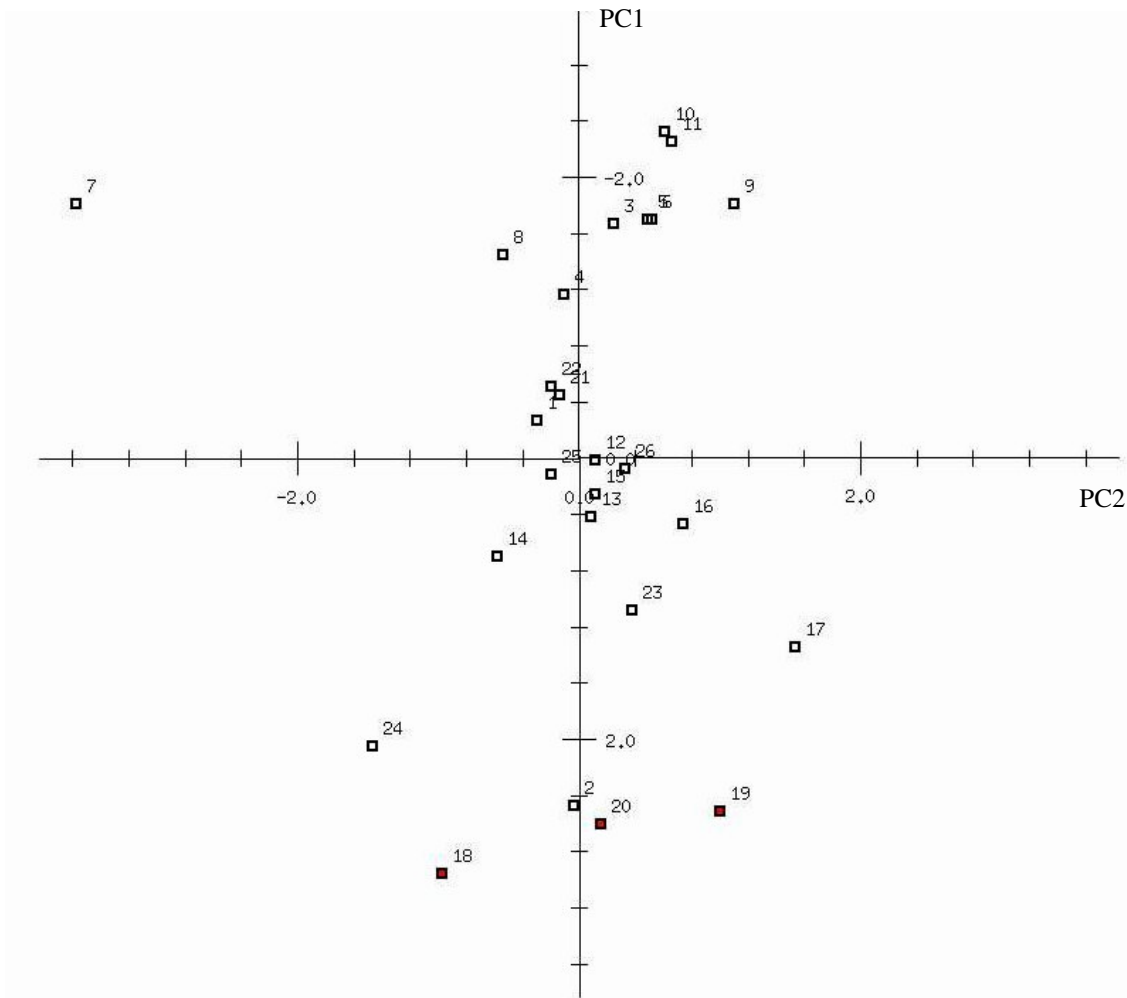


Figura 24- *Scores* de PC2xPC1, conforme parâmetros da Equação 14.

Na seqüência deste trabalho, buscou-se uma relação quantitativa que auxiliasse no desenho de um novo composto, além de prever sua potência biológica. Para tanto, fez-se um estudo de QSAR-3D/CoMFA, onde o modelo encontrado é concordante com o modelo de QSAR-2D, confirmando o tipo de parâmetro (estéreo, eletrostático) importante para a relação estrutura-atividade antinociceptiva de compostos imídicos.

### 3.2.3. QSAR 3D

Dando continuidade ao estudo da relação estrutura-atividade quantitativa, buscou-se uma relação com os parâmetros 3D- estérico e eletrostático. O método CoMFA realiza este tipo de análise, proporcionando um planejamento de novos compostos a partir da visualização dos mapas de contorno estérico e eletrostático, assim como a previsão das potências biológicas, através do modelo encontrado. As substâncias que compuseram o banco de dados com seus respectivos dados biológicos, assim como as substâncias planejadas estão apresentadas na Tabela 7. Nesta tabela os compostos estão identificados pela numeração designada no banco de dados e entre parênteses está a numeração que identifica estes compostos na síntese.

Desta forma, realizou-se estudos paralelos com dois banco de dados:

- imidas (compostos 1 a 33; Tabela 7)
- imidas e sulfonamidas (compostos 1 a 33, 39, 40, 44 e 51; Tabela 7).

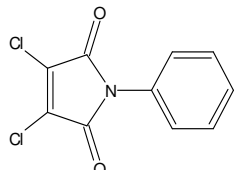
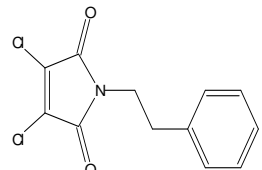
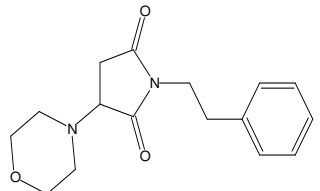
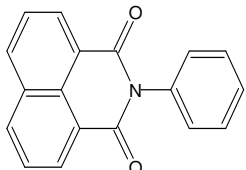
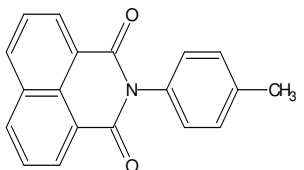
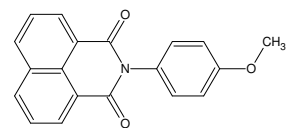
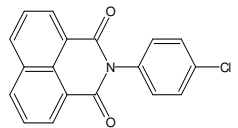
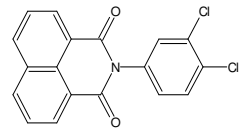
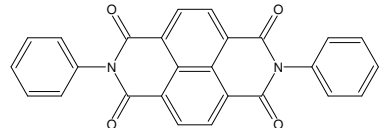
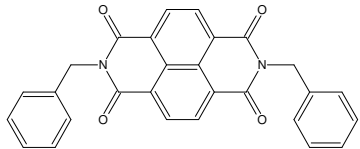
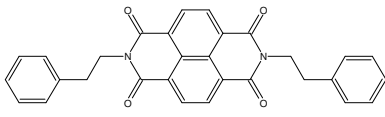
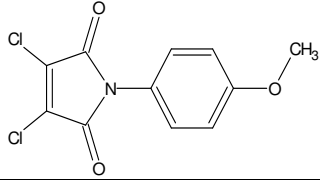
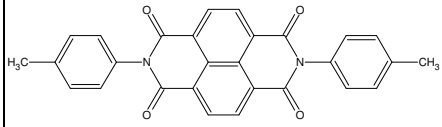
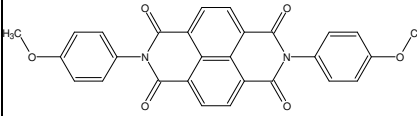
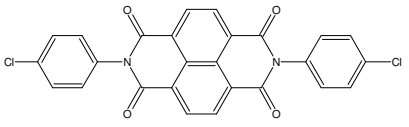
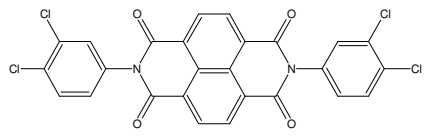
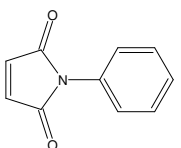
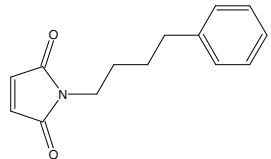
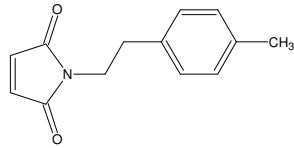
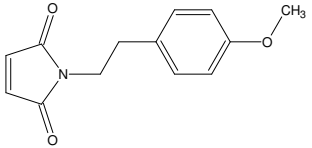
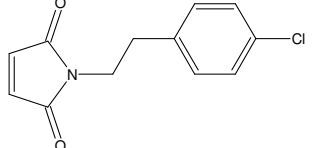
Os resultados das análises de PLS podem ser vistos na Tabela 8.

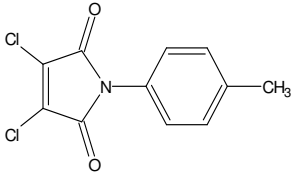
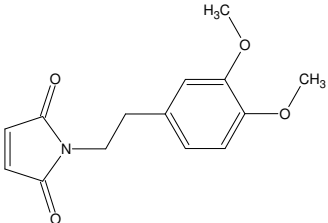
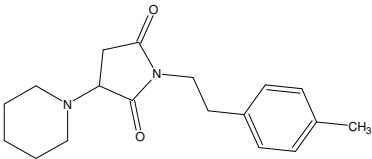
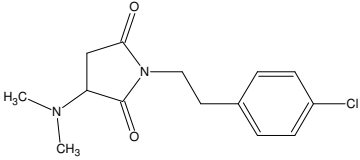
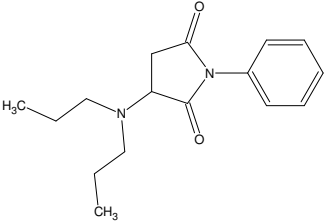
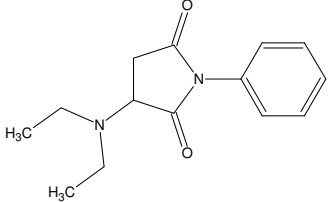
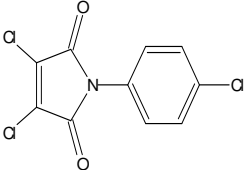
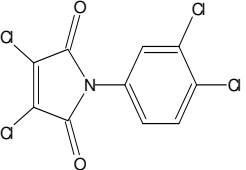
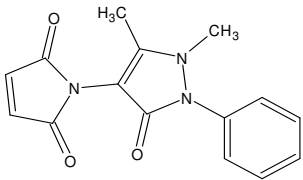
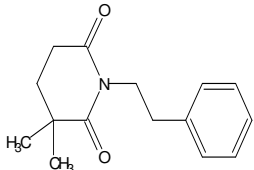
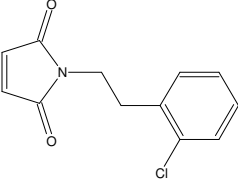
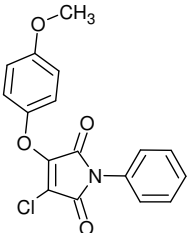
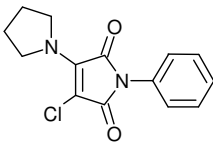
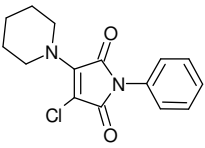
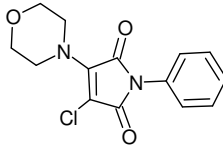
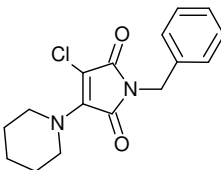
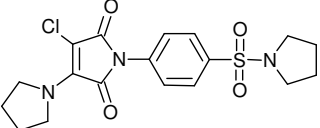
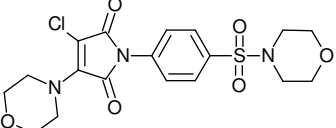
Nesta análise, trabalhou-se com diferentes tamanhos de caixa (*grid*) e diferentes sondas com várias cargas, além de dois métodos de minimização (GA e AM1) (Tabela 8).

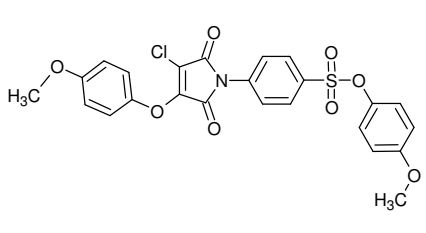
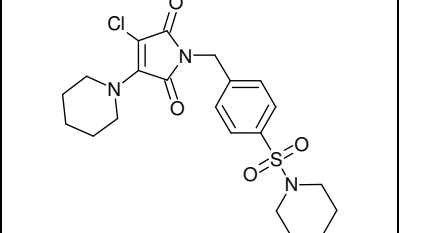
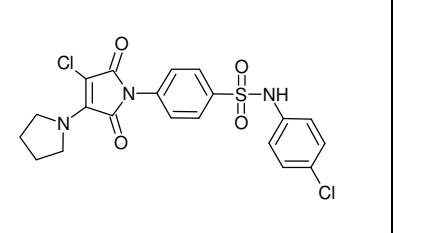
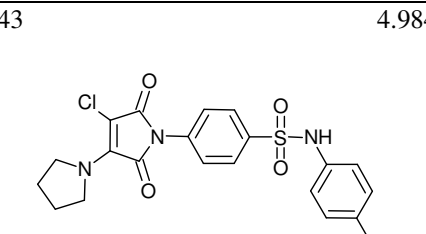
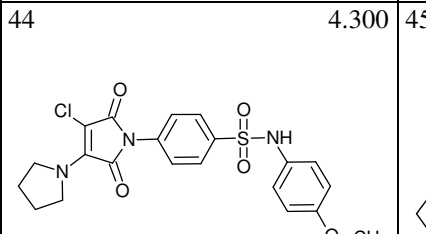
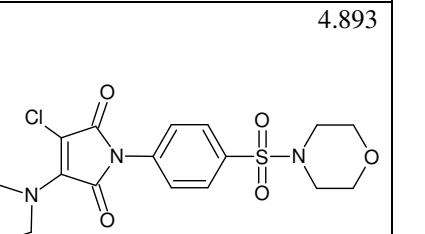
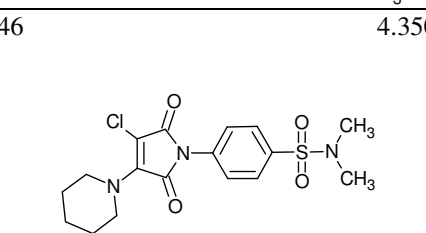
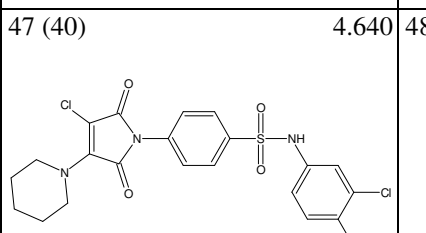
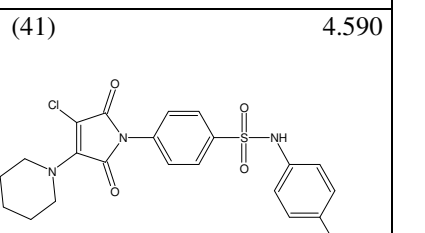
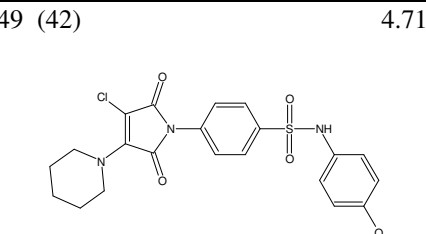
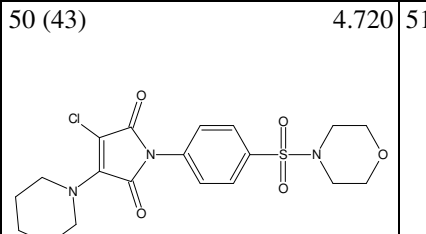
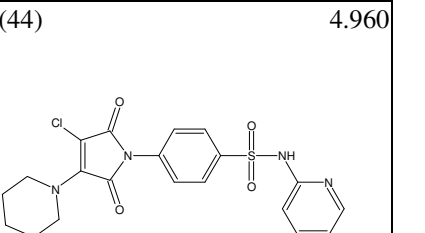
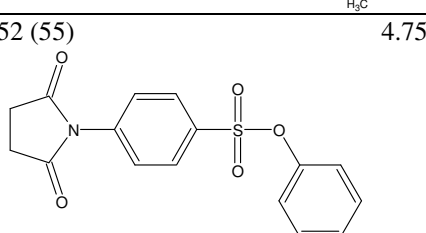
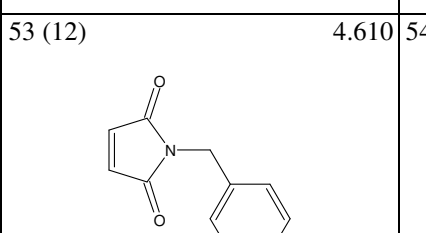
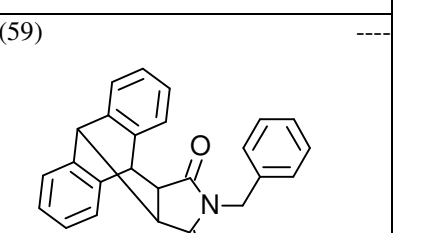
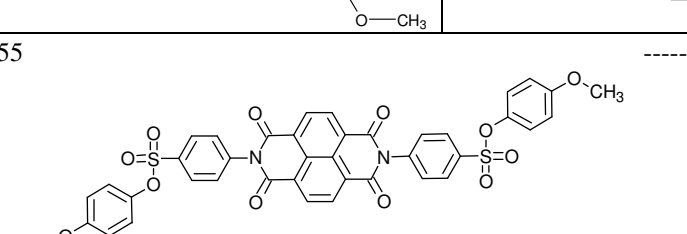
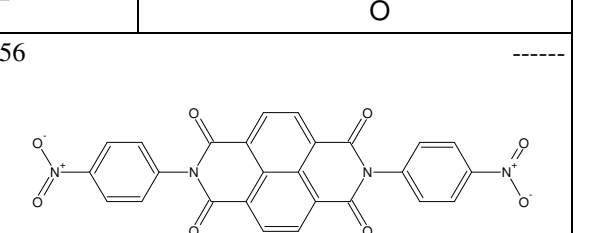
Inicialmente, foram utilizadas imidas na série treino (2, 3, 5, 7-15, 18-21, 24-27, 29-31, 33) e na série teste (1, 4, 6, 16, 17, 22, 23, 28, 32) – Tabela 7. Na construção do modelo foi dimensionada uma caixa que comportasse estas moléculas (caixa 1, Tab.9). Porém, ao longo do trabalho fez-se necessário construir um modelo com uma caixa maior que comportasse os compostos sulfonados (caixa 2, Tab.9). Por ter trabalhado com banco de dados minimizados de duas formas diferentes, foi necessário um novo dimensionamento de caixa para comportar tridimensionalmente as moléculas minimizadas por AM1 (caixa3, Tab.9). Ou seja, a variação do tamanho da caixa é em função da grande variedade no tamanho das moléculas trabalhadas, série treino, série



Tabela 7 – Moléculas constituintes do banco de dados utilizado na QSAR-3D.

Número	pDI <sub>50</sub>	Número	pDI <sub>50</sub>	Número	pDI <sub>50</sub>
01	5.555	02	5.398	03	4.450
					
04	5.764	05	5.660	06	6.161
					
07	5.488	08	6.000	09	6.000
					
10	5.672	11	5.733	12	4.928
					
13	5.921	14	6.337	15	5.775
					
16	5.928	17	4.721	18	5.125
					
19	5.292	20	5.004	21	4.710
					

Número	pDI <sub>50</sub>	Número	pDI <sub>50</sub>	Número	pDI <sub>50</sub>
22	4.972	23	4.943	24	3.678
					
25	3.658	26	3.523	27	3.523
					
28	5.031	29	5.503	30	5.602
					
31	3.910	32	4.886	33	4.876
					
34	4.086	35	4.412	36	4.061
					
37	-----	38	4.299	39	4.19
					

Número	pDI <sub>50</sub>	Número	pDI <sub>50</sub>	Número	pDI <sub>50</sub>
40	5.13	41	4.855	42	4.580
					
43	4.984	44	4.300	45	4.893
					
46	4.350	47 (40)	4.640	48 (41)	4.590
					
49 (42)	4.719	50 (43)	4.720	51 (44)	4.960
					
52 (55)	4.757	53 (12)	4.610	54 (59)	----
					
55		56			----
					

teste e moléculas planejadas. Tentou-se uma caixa que comportasse todas as moléculas, porém isto acarretou um grande aumento no número de pontos do *grid*. Isto não só piorou a capacidade de previsão do modelo encontrado, como também aumentou o tempo de cálculo. Entretanto, isto será analisado caso a caso.

No caso das sondas, quando estas são pensadas para o estudo de CoMFA, a idéia é ter uma sonda que simule o receptor.

Sabe-se através do estudo do Kalgutkar e colaboradores (**Kalgutkar et al**, 1996) que a enzima PGHS interage com a imida através da Arginina carregada positivamente numa primeira interação não covalente. Após este posicionamento no sítio receptor, ocorre uma interação covalente com a Tirosina, por ataque nucleofílico.

Desta forma, pensou-se em sondas N e O, representando a Arg e a Tyr, respectivamente.

No CoMFA as cargas disponíveis são valores inteiros +1, -1, etc.. Por isso, buscou-se no programa GAMESS o cálculo das cargas destes fragmentos (Arg e Tyr). Através destes cálculos encontrou-se as cargas +0,425525 para N e -0,4792 para O.

No caso do nitrogênio, tentou-se algumas opções de tipo de sonda N:

- N<sub>2</sub> (Nsp<sup>2</sup>);
- N<sub>3</sub> (Nsp<sup>3</sup>);
- Npl<sub>3</sub> (N trigonal planar);
- Nam (N amida); para testar os resultados.

A sonda C<sub>3</sub><sup>+1</sup> (Csp<sup>3</sup> positivo) foi utilizada por ser o padrão do programa.

É possível observar com estas diferentes tentativas de sonda que a variação destas não acarreta mudanças significativas nos modelos encontrados. Isto é verificado ao comparar os modelos 6 e 7, onde foram utilizadas as sondas N<sub>3</sub><sup>+1</sup> e N<sub>2</sub><sup>+1</sup>, respectivamente. Só ocorre diferenças significativas quando se compara uma sonda positiva e uma sonda negativa (modelo 8 e 9).

Tabela 8 – Modelos de QSAR-3D/CoMFA obtidos da série treino – compostos 2, 3, 5, 7-15, 18-21, 24-27, 29-31, 33.

Modelo	Minimização	Sonda	Caixa 1	Caixa 2	Caixa 3	R <sup>2</sup> <sub>cv</sub>	R <sup>2</sup>	F	Erro	N <sup>o</sup> ótimo de componentes	% contribuição Estéreo   Eletrost.		Filtragem de coluna (2.0)	SAMPLS	Região de Foco
1	GA	N <sub>3</sub> <sup>+1</sup>	X	-	-	0,642	0,962	120,295	0,196	4	66.3	33.7	X	-	-
2	GA	N <sub>3</sub> <sup>+1</sup>	X	-	-	0,645	0,962	120,295	0,169	4	66.3	33.7	-	X	-
3	GA	N <sub>3</sub> <sup>+1</sup>	X	-	-	0,727	0,965	132,387	0,187	4	69.5	30.5	-	-	X
4	GA	Npl <sub>3</sub> <sup>+0,425525</sup>	-	X	-	0,581	0,983	160,175	0,140	6	69.1	30.9	X	-	-
5	GA	Npl <sub>3</sub> <sup>+1</sup>	-	X	-	0,574	0,983	160,069	0,140	6	69.1	30.9	X	-	-
6	GA	N <sub>3</sub> <sup>+1</sup>	-	X	-	0,642	0,962	120,295	0,196	4	66.3	33.7	X	-	-
7	GA	N <sub>2</sub> <sup>+1</sup>	-	X	-	0,642	0,962	120,295	0,196	4	66.3	33.7	X	-	-
8	GA	N <sub>2</sub> <sup>+1</sup>	-	X	-	0,724	0,965	132,387	0,187	4	69.5	30.5	-	-	X
9	GA	O <sub>3</sub> <sup>+0,4792</sup>	-	X	-	0,544	0,962	120,357	0,196	4	69.6	30.4	X	-	-
10	GA	O <sub>3</sub> <sup>+1</sup>	-	X	-	0,570	0,974	135,895	1,666	5	69.3	30.7	X	-	-
11	GA	O <sub>3</sub> <sup>+1</sup>	-	X	-	0,677	0,982	154,420	0,143	6	70.9	29.1	-	-	X
12	GA	N <sub>2</sub> <sup>+1</sup> O <sub>3</sub> <sup>+1</sup>	-	X	-	0,700	0,977	152,321	0,157	5	(N)34.5 (O)34.1	(N) 16.2 (O) 15.3	-	-	X
13	GA	Nam <sup>+0,425525</sup>	-	X	-	0,581	0,983	160,175	0,140	6	69.1	30.9	X	-	-
14	GA	N <sub>2</sub> <sup>+1</sup>	-	-	X	0,486	0,948	85,828	0,231	4	66.6	33.4	-	X	-
15	GA	Nam <sup>+1</sup>	-	-	X	0,574	0,983	160,069	0,140	6	69.1	30.9	X	-	-
16	AM1	Npl <sub>3</sub> <sup>+0,425525</sup>	-	X	-	0,511	0,720	24,484	0,476	3	61.0	39.0	X	-	-
17	AM1	Npl <sub>3</sub> <sup>+1</sup>	-	-	X	0,421	0,809	25,384	0,405	3	73.5	26.5	X	-	-
18	AM1	Nam <sup>+1</sup>	-	X	-	0,454	0,678	20,032	0,511	2	63.4	36.6	X	-	-
19	AM1	Npl <sub>3</sub> <sup>+0,425525</sup>	-	-	X	0,459	0,816	26,609	0,397	3	65.3	34.7	X	-	-
20	AM1	N <sub>2</sub> <sup>+1</sup>	-	-	X	0,454	0,678	20,302	0,511	2	63.4	36.6	X	-	-
21	AM1	O <sub>3</sub> <sup>+0,4792</sup>	-	-	X	0,505	0,714	23,762	0,481	2	61.2	38.8	X	-	-
22	AM1	O <sub>3</sub> <sup>+0,4792</sup>	-	X	-	0,450	0,815	26,382	0,398	3	66.4	33.6	X	-	-
23	AM1	O <sub>3</sub> <sup>+1</sup>	-	X	-	0,421	0,809	25,425	0,404	3	73.6	26.4	X	-	-
24	AM1	O <sub>3</sub> <sup>+1</sup>	-	-	X	0,453	0,926	31,088	0,277	2	70.1	29.9	X	-	-
25	AM1	C <sub>3</sub> <sup>+1</sup>	-	-	X	0,448	0,674	19,630	0,514	2	62.9	37.1	X	-	-
26	AM1	N <sub>2</sub> <sup>+1</sup> O <sub>3</sub> <sup>+1</sup> C <sub>3</sub> <sup>+1</sup>	-	-	X	0,453	0,674	19,630	0,514	2			X	-	-

Tabela 9 – Caixas utilizadas na construção dos modelos 1-26.

Caixa	X		Y		Z		Volume (Å <sup>3</sup> )
1	-14	4	-9	7	-8	7	4,320
2	-19	14	-9	10	-9	8	11,286
3	-20	18	-8	10	-9	10	12,996

A mudança na carga da sonda resultou em diferentes capacidades de previsão (R<sup>2</sup><sub>cv</sub>); em alguns casos melhorou e em outros piorou.

Diferentes valores de *cutoff* (valor de corte) também foram testados, porém pouca variação nos resultados foi observada. Desta forma, para o grupo de compostos em estudo, o melhor valor de corte é o padrão do programa (30Kcal/mol), tanto para o campo estéreo como para o campo eletrostático.

No CoMFA, diferentes da QSAR-2D, a equação matemática (o modelo) não é apresentado ao operador. Somente são apresentados:

- os mapas de contorno estéreo e eletrostático, para idealizar novos substituintes;

- gráfico de potência prevista versus potência experimental, para avaliar a adequação do modelo ao banco de dados;
- gráfico de resíduos (de previsão) versus potência prevista, para avaliar a aleatoriedade dos erros das previsões;
- tabela com valores de CoMFA gerados na análise.

Por isso, na Tabela 8 estão apresentados apenas os valores da análise estatística de cada modelo. Estes valores são utilizados na avaliação destes modelos, onde o que apresentar maior  $R^2_{cv}$ , maior  $R^2$ , maior F e menor erro percentual é selecionado.

Os melhores modelos obtidos (modelo 1-15) foram os encontrados a partir de moléculas minimizadas por GA.

Os melhores modelos obtidos foram o modelo 3 e 8. Estes diferem no tipo de sonda e no tamanho da caixa. A diferença de sonda,  $N_2^{+1}$  e  $N_3^{+1}$ , já foi visto não influenciar muito no modelo resultante. Portanto, a diferença nos resultados é decorrente do tamanho das caixas. Uma caixa maior resulta numa maior quantidade de parâmetros gerados, pois em cada ponto é registrado a energia de interação estéreo e eletrostática da sonda com a molécula.

O modelo 3 não consegue prever bem as potências dos compostos sulfonados testados ao longo do trabalho (série validação lateral: compostos 38-52/Tab.7). Isto é avaliado através do erro percentual, sendo considerado um erro aceitável quando este é menor que 20%. As potências previstas pelos modelos 3 e 8, assim como os erros percentuais destas previsões são relatados na Tabela 10.

Como o modelo 3 apresenta este problema de previsão provavelmente em função da caixa 1 não comportar os compostos sulfonados de forma apropriada, o tamanho da caixa foi alterado (caixa 2) e encontrado um novo modelo (modelo 8). Este modelo apresenta resíduos maiores nas previsões das imidas, já que seu *grid* possui pontos em excesso com relação a estes compostos pequenos.

Contudo, prevê bem a potência da série validação lateral (compostos 38-52; Tab.7). A avaliação destas previsões pode ser feita através dos valores do erro percentual (Tab. 10).

Desta forma, têm-se um modelo bom para prever a potência de imidas – modelo 3 - e um modelo adequado para prever a potência de compostos sulfonados (compostos maiores) - o modelo 8.

Outra alternativa foi trabalhar com uma série treino composta por imidas (1-33/Tab. 7) e compostos sulfonados (39, 40, 51/Tab. 7), aumentando assim a contribuição destes últimos no modelo.

Num primeiro momento, três modelos foram encontrados. São estes os modelos 27-29, cujos resultados da análise de PLS estão na Tabela 11, abaixo. Nestes modelos foi utilizada uma caixa (caixa 4) de  $7290 \text{ \AA}^3$ , com as seguintes dimensões:

$$x = -14 \text{ à } 13;$$

$$y = -7 \text{ à } 8;$$

$$z = -9 \text{ à } 9.$$

Como no decorrer do trabalho, mais sulfonamidas foram testadas (compostos 41-43, 46, 47, 49-52/Tab.7) permitindo aumentar o banco de dados, outros três modelos foram encontrados. Trata-se dos modelos 30-32, cujos resultados da análise de PLS também estão na Tabela 11, abaixo.

Dentre os seis modelos, os melhores são os de número 29 e 32. Contudo, as suas capacidades de previsão ( $R^2_{cv}$ ) estão aquém do desejado ( $R^2_{cv} > 0,7$ ). Novamente, a falta de maiores informações biológicas a respeito dos compostos sulfonados em decorrência da pequena variação nestes dados dificulta o estudo da relação estrutura-atividade com este banco de dados.

As potências previstas pelos modelos 29 e 32, assim como os erros percentuais destas previsões são relatados na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores de pDI50 experimentais, previstos pelos modelos 3, 8, 29 e 32 e seus respectivos resíduos e erros %.

Compostos	pDI <sub>50</sub> experimental	Modelo 3			Modelo 8			Modelo 29			Modelo 32		
		pDI <sub>50</sub> previsto	Resíduo	Erro %	pDI <sub>50</sub> previsto	Resíduo	Erro %	pDI <sub>50</sub> previsto	Resíduo	Erro %	pDI <sub>50</sub> previsto	Resíduo	Erro %
1	5,555	4,256	1,299	<u>23,39</u>	3,702	1,853	<u>33,36</u>	4,415	1,140	<u>20,53</u>	4,567	0,988	17,78
2	5,398	5,364	0,034	0,62	5,426	-0,028	0,51	5,276	0,122	2,26	5,182	0,216	4,01
3	4,456	4,438	0,018	0,40	4,324	0,132	2,96	4,433	0,023	0,52	4,212	0,244	5,47
4	5,764	5,709	0,055	0,96	5,641	0,123	2,13	5,670	0,094	1,64	6,489	-0,725	12,59
5	5,660	5,743	-0,083	1,46	5,736	-0,076	1,34	5,720	-0,060	1,07	5,868	-0,208	3,68
6	6,161	5,712	0,449	7,29	5,759	0,402	6,52	5,523	0,638	10,36	6,189	-0,028	0,46
7	5,488	5,639	-0,151	2,74	5,483	0,005	0,08	5,656	-0,168	3,07	5,533	-0,045	0,81
8	6,000	5,703	0,297	4,96	5,588	0,412	6,86	5,770	0,230	3,83	6,095	-0,095	1,59
9	6,000	5,981	0,019	0,31	6,212	-0,212	3,53	5,942	0,058	0,97	5,743	0,257	4,28
10	5,672	5,469	0,203	3,58	5,273	0,399	7,03	5,647	0,025	0,43	5,952	-0,280	4,93
11	5,733	5,691	0,042	0,73	5,879	-0,146	2,55	5,620	0,113	1,97	6,094	-0,361	6,30
12	4,928	4,706	0,222	4,51	4,426	0,502	10,19	4,642	0,286	5,81	4,949	-0,021	0,43
13	5,921	6,013	-0,092	1,55	6,317	-0,396	6,69	6,011	-0,090	1,52	5,806	0,115	1,93
14	6,337	6,445	-0,108	1,70	7,055	-0,718	11,33	6,332	0,005	0,08	6,025	0,312	4,92
15	5,775	5,778	-0,003	0,05	5,859	-0,084	1,45	5,838	-0,063	1,09	5,852	-0,077	1,33
16	5,928	5,006	0,922	15,55	5,409	0,519	8,76	5,638	0,290	4,89	6,474	-0,546	9,20
17	4,726	4,731	-0,005	0,11	4,258	0,468	9,90	4,667	0,059	1,25	5,615	-0,889	18,81
18	5,125	4,997	0,128	2,50	4,627	0,498	9,72	4,917	0,208	4,05	4,748	0,377	7,36
19	5,292	5,150	0,142	2,69	4,920	0,372	7,04	5,032	0,260	4,91	4,737	0,555	10,49
20	5,004	5,063	-0,059	1,18	4,763	0,241	4,81	5,188	-0,184	3,68	4,769	0,235	4,70
21	4,710	4,972	-0,262	5,56	4,557	0,153	3,25	4,947	-0,237	5,03	4,813	-0,103	2,19
22	4,972	4,331	0,641	12,89	3,871	1,101	<u>22,14</u>	4,422	0,550	11,05	6,076	-1,104	<u>22,21</u>
23	4,943	4,984	-0,041	0,83	4,617	0,326	6,59	5,205	-0,262	5,30	5,331	-0,388	7,85



Compostos	pDI <sub>50</sub> experimental	Modelo 3			Modelo 8			Modelo 29			Modelo 32		
		pDI <sub>50</sub> previsto	Resíduo	Erro %	pDI <sub>50</sub> previsto	Resíduo	Erro %	pDI <sub>50</sub> previsto	Resíduo	Erro %	pDI <sub>50</sub> previsto	Resíduo	Erro %
24	3,678	3,577	0,101	2,75	2,928	0,750	<u>20,38</u>	3,737	-0,059	1,61	3,713	-0,035	0,95
25	3,658	3,520	0,138	3,78	2,741	0,917	<u>25,06</u>	3,575	0,083	2,28	3,751	-0,093	2,55
26	3,523	3,367	0,156	4,42	2,527	0,996	<u>28,27</u>	3,278	0,245	6,95	3,727	-0,204	5,79
27	3,523	3,535	-0,012	0,34	2,797	0,726	<u>20,62</u>	3,526	-0,003	0,08	3,771	-0,248	7,03
28	5,031	3,990	1,041	<u>20,69</u>	3,535	1,496	<u>29,74</u>	4,349	0,682	13,56	4,270	0,761	15,13
29	5,503	3,976	1,527	<u>27,74</u>	3,214	2,289	<u>41,60</u>	4,065	1,438	<u>26,13</u>	4,127	1,376	<u>25,01</u>
30	5,602	5,588	0,014	0,25	5,793	-0,191	3,41	5,554	0,048	0,85	5,069	0,533	9,51
31	3,910	4,120	-0,210	5,37	3,869	0,041	1,05	-	-	-	3,884	0,026	0,68
32	4,886	4,382	0,504	10,32	5,547	-0,661	13,54	5,305	-0,419	8,58	4,344	0,542	11,09
33	4,876	4,937	-0,062	1,26	4,582	0,294	6,02	3,885	0,991	<u>20,32</u>	4,602	0,274	5,63
34	4,086	5,308	-1,222	<u>29,91</u>	3,929	0,157	3,83	4,693	-0,607	14,86	4,246	-0,160	3,91
35	4,412	5,340	-0,928	<u>21,04</u>	3,845	0,567	12,85	4,682	-0,270	6,12	3,964	0,448	10,15
36	4,061	5,308	-1,247	<u>30,71</u>	3,810	0,251	6,19	4,592	-0,531	13,07	3,877	0,184	4,52
37	-	4,563	-	-	4,274	-	-	4,436	-	-	4,401	-	-
38	4,299	7,336	-3,037	<u>70,65</u>	4,273	0,026	0,59	-	-	-	4,605	-0,306	7,12
39	4,187	4,207	-0,020	0,47	5,225	-1,037	<u>24,76</u>	4,187	0,000	0,00	4,385	-0,197	4,71
40	5,130	7,816	-2,686	<u>52,37</u>	-	-	-	5,184	-0,054	1,06	5,054	0,076	1,48
41	4,855	6,474	-1,619	<u>33,34</u>	5,149	-0,294	6,06	-	-	-	4,476	0,379	7,81
42	4,580	7,871	-3,291	<u>71,85</u>	4,884	-0,304	6,64	-	-	-	4,771	-0,191	4,18
43	4,984	8,347	-3,363	<u>67,49</u>	-	-	-	-	-	-	5,065	-0,081	1,62
44	4,295	6,503	-2,207	<u>51,39</u>	4,800	-0,505	11,76	4,141	0,154	3,59	4,299	-0,004	0,09
45	4,893	2,800	2,093	<u>42,78</u>	10,090	-5,197	<u>106,22</u>	-	-	-	4,674	0,219	4,48
46	4,350	7,964	-3,614	<u>83,09</u>	4,675	-0,325	7,46	-	-	-	4,424	-0,074	1,70
47	4,640	6,867	-2,227	<u>48,00</u>	4,931	-0,291	6,27	-	-	-	4,523	0,117	2,53
48	4,590	6,503	-1,913	<u>41,68</u>	4,820	-0,230	5,01	-	-	-	4,415	0,175	3,82
49	4,719	7,101	-2,382	<u>50,49</u>	4,595	0,124	2,62	-	-	-	4,871	-0,152	3,22
50	4,720	7,237	-2,517	<u>53,32</u>	4,755	-0,035	0,75	-	-	-	4,794	-0,074	1,57

Planejamento Racional de Imidas Cíclicas e Sulfonamidas com Atividade Antinociceptiva.

Maria Elena Walter

Compostos	pDI <sub>50</sub> experimental	Modelo 3			Modelo 8			Modelo 29			Modelo 32		
		pDI <sub>50</sub> previsto	Resíduo	Erro %	pDI <sub>50</sub> previsto	Resíduo	Erro %	pDI <sub>50</sub> previsto	Resíduo	Erro %	pDI <sub>50</sub> previsto	Resíduo	Erro %
51	4,962	7,981	-3,019	<u>60,84</u>	4,259	0,703	14,17	5,161	-0,200	4,02	5,040	-0,078	1,57
52	4,757	5,918	-1,161	<u>24,41</u>	4,233	0,524	11,01	-	-	-	5,026	-	-
53	4,610	4,850	-0,240	5,20	4,258	0,352	7,63	4,627	-0,017	0,36	4,786	-0,176	3,83
54	-	4,662	-	-	4,234	-	-	5,985	-	-	4,445	-	-
55	-	7,487	-	-	9,775	-	-	-	-	-	6,518	-	-
56	-	8,689	-	-	5,625	-	-	-	-	-	6,240	-	-

Obs.: - os valores de erro percentual sublinhados é para destacar os erros maiores que 20%;

- os números entre parênteses na primeira coluna são a correspondente numeração na síntese.

Tabela 11 - Modelos de QSAR-3D/CoMFA obtidos a partir do banco de dados composto pelos compostos 1-54.

Modelos	Minimização	Sonda	R <sup>2</sup> <sub>cv</sub>	R <sup>2</sup>	F	Erro	Filtragem de coluna (2.0)	SAMPLS	Região de Foco	Nº ótimo de componentes	%contribuição estéreo/eletrost
27	GA	N <sub>3</sub> <sup>+1</sup>	0,388	0,953	89,270	0,214	X	-	-	5	66/34
28	GA	N <sub>3</sub> <sup>+1</sup>	0,422	0,953	89,270	0,214	-	X	-	5	66/34
29	GA	N <sub>3</sub> <sup>+1</sup>	0,580	0,958	101,024	0,202	-	-	X	5	65,2/34,8
30	GA	N <sub>3</sub> <sup>+1</sup>	0,482	0,975	137,754	0,155	X	-	-	6	66,3/33,7
31	GA	N <sub>3</sub> <sup>+1</sup>	0,481	0,975	137,754	0,155	-	X	-	6	66,3/33,7
32	GA	N <sub>3</sub> <sup>+1</sup>	0,573	0,977	148,666	0,149	-	-	X	6	62,7/37,3



É interessante destacar que o modelo 32 tem uma capacidade preditiva ( $R^2_{cv}$ ) 0,07 menor do que o modelo 29, porém possui uma confiabilidade ( $R^2$ ) maior, um F maior e um erro menor. Isto se deve ao maior número de informações obtidos através de um maior banco de dados.

Já ao comparar o modelo 8, Tabela 8 (modelo que prevê bem os compostos sulfonados), com o modelo 32, verifica-se algo curioso. Apesar do modelo 32 possuir um  $R^2_{cv}$  baixo, ele prevê bem as potências da série treino e série teste (erro <20%). Têm-se apenas 1 previsão, dentre 51, com erro maior que 20%. Enquanto que o modelo 8 apresenta 10 previsões, dentre 50, com erro maior que 20%.

Numa primeira análise destes erros percentuais é de se concluir que um modelo originário de imidas, sulfonamidas e éster sulfonado (modelo 32) seria o ideal já que apresenta poucos erros acima de 20%. Porém, em função da diversidade química o modelo apresenta dificuldades em trabalhar com casos particulares. Ou seja, apresenta estas dificuldades por trabalhar com um banco de dados composto por diferentes tipos de imidas (dicloromaleimidas, maleimidas, succinimidas, naftalimidas e bisnaftalimidas), além de diferentes compostos sulfonados (sulfonamidas e éster sulfonado). Por exemplo, apresenta problemas ao prever a potência de bisnaftalimidas. No caso das bisnaftalimidas, o modelo 3 apresenta menor erro percentual.

Este é um problema de QSAR: - se utilizar um banco com pouca variação estrutural o modelo terá problemas para extrapolar seus resultados por falta de informações; - se utilizar um banco com uma diversidade química muito grande, o modelo também terá problemas em extrapolar seus resultados, por possuir muitas informações no geral, mas para um grupo de compostos apresenta poucas informações.

Portanto, de um modo geral o modelo 32 apresenta menores erros percentuais, mas analisando por tipo de compostos o modelo 3 possui erros menores que o modelo 32.

Para melhorar esta situação, a idéia é ter um modelo para imidas e um para compostos sulfonados, com um banco de dados exclusivamente composto por substâncias sulfonadas.

Sendo assim, um estudo de QSAR-3D/CoMFA foi realizado com um banco composto pelas substâncias 38-52, Tabela 7. Neste estudo utilizou-se moléculas minimizadas por dois métodos, GA e AM1, diferentes tipos de sonda (Tabela 12) e diferentes caixas (Tabela 13). As variações foram realizadas com o mesmo objetivo já descrito para os modelos 1-26 da Tabela 8. Desta forma foram obtidos os modelos 33-39 (Tab. 12). Porém, como a variação de  $pIC_{50}$  é muito pequena (1 unidade de log), os modelos encontrados são péssimos ( $R^2_{cv} < 0$ ). Os resultados da análise de PLS estão na Tabela 12 abaixo.

Tabela 12 - Modelos de QSAR-3D/CoMFA obtidos a partir do banco de dados composto pelos compostos 38-52.

Modelo	Minim.	Sonda	$R^2_{cv}$	$R^2$	Caixa	Filtragem de coluna (2.0)	F	Erro	% Contr. Est./Elet.	Nº Ótimo de comp.
33	GA	$N_2^{+1}$	-0,067	0,274	1	X	3,404	10,036	23,3/76,4	1
34	GA	$O_3^{-1}$	-0,066	0,275	1	X	3,415	10,027	23,7/76,3	1
35	GA	$N_2^{+1}$ $O_3^{-1}$	-0,066	0,275	1	X	3,409	10,027	11,8/38,2 11,9/38,2	1
36	AM1	$N_2^{+1}$	-0,561	0,576	3	X	8,150	0,198	73,1/26,9	2
37	AM1	$N_2^{+1}$	-0,496	0,559	2	X	7,617	0,202	79,6/20,4	2
38	AM1	$O_3^{-1}$	-0,556	0,576	3	X	8,136	0,198	72,9/27,1	2
39	AM1	$O_3^{-1}$	-0,497	0,562	2	x	7,690	0,202	79,6/20,4	2

Tabela 13 – Caixas utilizadas na construção dos modelos 33-39.

Caixa	X		Y		Z		Volume ( $\text{Å}^3$ )
5	-12	22	-12	8	-8	8	10.880
6	-13	12	-7	9	-9	10	7.600
7	-12	22	-7	10	-9	9	10.404

Desta forma, o modelo 3 é o melhor para imidas e o modelo 32 é o melhor para compostos sulfonados.

É necessário trabalhar com estes dois modelos no planejamento racional até ser possível obter um banco composto somente por compostos sulfonados que apresente variação nos dados suficiente para obter um bom modelo.

Diante destas possibilidades, foram selecionados para estudo de planejamento racional os modelos 3 e 32.

### 3.2.3.1. Modelo 3

A análise do modelo 3, tendo por série treino os compostos 2, 3, 5, 7-15, 18-21, 24-27, 29-31, 33, resulta num  $R^2 = 0,965$  e um erro padrão de 0,187. Este valor de  $R^2$  mostra a alta correlação entre os valores de  $pIC_{50}$  experimentais e preditos, o que pode ser verificado no gráfico dos valores de  $pIC_{50}$  experimentais versus preditos (Figura 26). Quase todos os pontos estão ao longo de uma reta, somente alguns pontos estão afastados, mas não muito. Portanto, este gráfico mostra uma razoável adequação do modelo em todos os casos. A Figura 27 mostra a aleatoriedade dos resíduos.

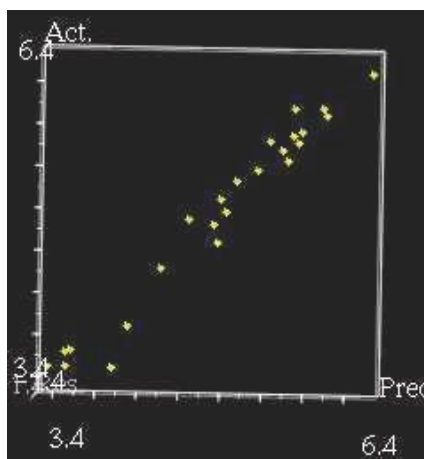


Figura 26- Gráfico da potência antinociceptiva experimental versus potência prevista pelo modelo 3.

Neste modelo de QSAR, há uma contribuição de 69.5% do campo estéreo e uma contribuição de 30.5% do campo eletrostático. Sendo assim, o modelo final é mais influenciado pelo campo estéreo do que pelo campo eletrostático.

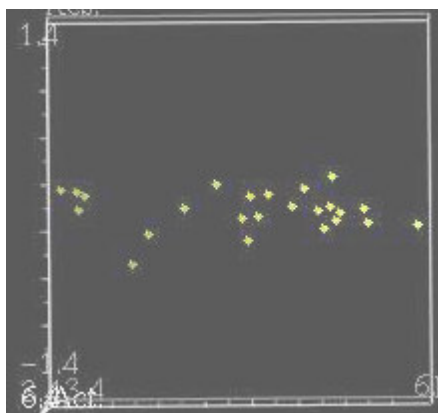


Figura 27- Gráfico da potência prevista versus resíduos do modelo 3.

Os fatores mais importantes do modelo CoMFA são apresentados na forma de superfícies – mapas de contorno. Os contornos do mapa estéreo são mostrados em amarelo e verde e os contornos do mapa eletrostático são mostrados em vermelho e azul. Valores maiores de medidas de bioatividade são correlacionadas com: substituintes mais volumosos próximo da região verde; substituintes menos volumosos próximo da região amarelo; substituintes que proporcionem um aumento da carga positiva próximo a região azul e substituintes que proporcionem um aumento da carga negativa próximo a região vermelha.

A Figura 27 mostra os mapas de contorno estéreo e eletrostático do modelo 3. Para referência, o composto 12 é mostrado dentro do campo. Para facilitar a análise dos mapas resultantes, é possível mostrar separadamente os mapas de contorno estéreo e eletrostático.

No mapa estéreo, as superfícies indicam regiões próximas a imida onde um aumento no volume do substituinte (região verde) ou uma redução no volume

(região amarela) é desejável para favorecer o aumento da potência antinociceptiva (Figura 28).

A superfície verde próxima ao anel imídico e próxima ao substituinte do anel benzênico sugere que a utilização de ligantes mais volumosos favorecem o aumento da atividade. Um ligante de menor volume na região do anel naftálico (Figura 28) favorece a interação estérea.

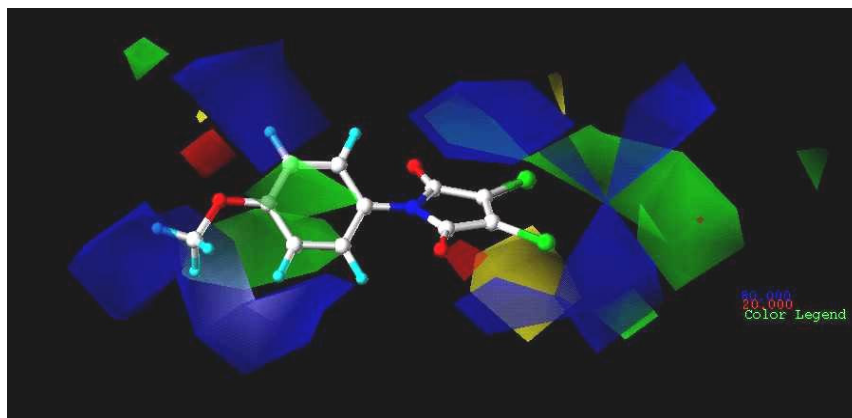


Figura 27- Mapas estéreo e eletrostático do modelo 3 (Tabela 8), tendo o composto 12 como referência.

As interações não covalentes entre fármaco e receptor podem ser do tipo dipolo-dipolo, íon-dipolo, ligação de hidrogênio. Tanto as interações não covalentes como as covalentes são dependentes das contribuições eletrostáticas dos substituintes. Contudo, a análise destas contribuições eletrostáticas é complicada devido a natureza das interações a longa distância. Um substituinte tem de ser analisado não só pela sua densidade de carga como também pelo efeito que exerce sobre a molécula. Por exemplo, no efeito indutivo um substituinte doador de elétrons possui uma densidade positiva e proporciona uma densidade negativa aonde está ligado. Sendo assim, ao analisar um mapa de contorno eletrostático onde há uma região azul é necessário imaginar um substituinte que possa produzir diretamente a densidade positiva desejada ou indiretamente.



Os principais fatores do modelo originário das contribuições eletrostáticas são indicadas nas regiões próximas a molécula de imida, onde um acréscimo no potencial negativo (região vermelha) é desejado (Figura 29). Os tipos de substituintes que são previstos para estas áreas eletrostáticas podem ser pensados em termos de suas eletronegatividades como grupo funcional. Um substituinte com uma alta eletronegatividade pode ser previsto para aumentar a atividade na região vermelha, enquanto que um substituinte com menor eletronegatividade deverá ser previsto para aumentar a atividade na região azul. Neste modelo, um aumento do potencial eletrostático positivo no anel imídico (lado esquerdo) e na região do anel benzênico (lado direito) pode consistir num acréscimo da atividade. Isto pode ser obtido por introdução de substituintes retiradores de elétrons nestes anéis. Também segundo este modelo, um substituinte que aumente o potencial eletrostático negativo deve aumentar a atividade quando adicionado na extremidade direita da molécula. No composto 14 utilizado como referência na Figura 29, esta substituição seria no grupo OMe, do lado direito. Isto é verificado através da região vermelha sob a região azul.

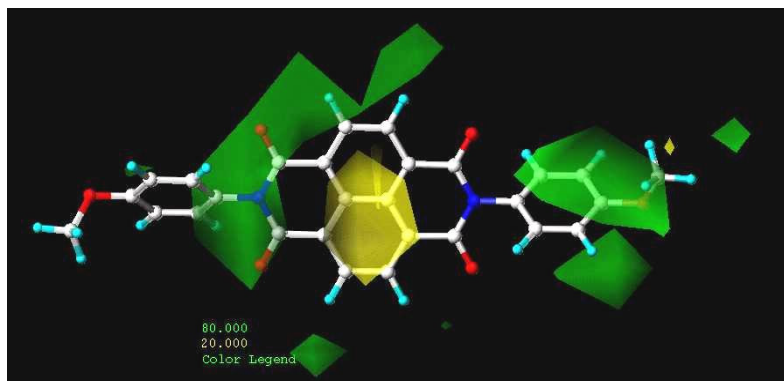


Figura 28- Mapa estéreo do modelo 3 (Tabela 8), tendo o composto 14 como referência.

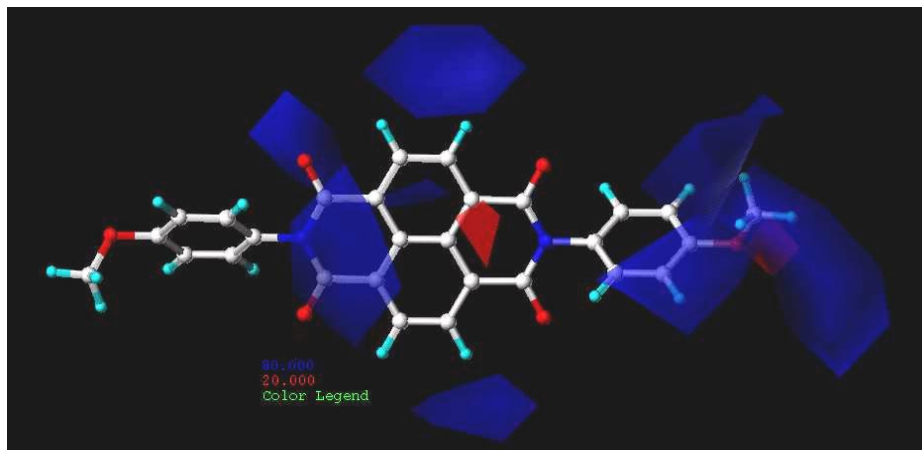


Figura 29- Mapa eletrostático do modelo 3 (Tabela 8) tendo o composto 14 como referência.

A capacidade preditiva do modelo 3 foi avaliada pela série teste formada por nove compostos (1, 4, 6, 16, 17, 22, 23, 28, 32 – Tabela 7). Os valores calculados juntamente com os resultados experimentais estão listados na Tabela 10.

Dentre as nove previsões realizadas pelo modelo 3, apenas as obtidas para os compostos 1 e 28 (dicloromaleimidas) apresentaram erro superior à 20%. O modelo já apresentava problemas em prever a potência para este tipo de composto na série treino (composto 29 – Erro = 27,74%). O modelo prevê bem as potências de compostos não utilizados na obtenção dele. A incapacidade de prever bem a potência de dicloromaleimidas deve ocorrer provavelmente porque as informações obtidas para estes compostos na análise de CoMFA não são suficientes para relacionar a estrutura e os dados biológicos.

O problema deve estar na falta de informações com respeito a influência dos átomos de cloro. Note que os compostos que apresentam substituintes diferentes de cloro no anel benzênico (composto 12 e 23) ou carbono espaçador entre o anel imídico e o anel benzênico (composto 2) tiveram suas previsões realizadas com erro < 20%.

O composto 23 apesar de não apresentar substituinte no anel benzênico, apresenta uma característica já conhecida do modelo através do banco de dados, os carbonos espaçadores. Esta característica estrutural é encontrada em 4 maleimidias (compostos 18, 19, 20, 21) da série treino.

Provavelmente, a dificuldade encontrada pelo modelo é a falta de informações em determinados casos, apesar da grande quantidade de informações em geral, isto é, da grande diversidade química do banco de dados.

Alguns compostos com potências antinociceptivas até então desconhecidas (34-56, Tab.7), sintetizados na primeira etapa deste trabalho, tiveram suas potências previstas pelo modelo 3. Alguns destes compostos foram testados durante a realização do trabalho e desta forma são usados como série validação lateral na avaliação do modelo. Os resultados das previsões e os valores experimentais, dos que foram testados, são apresentados na Tabela 10.

O modelo não previu bem as potências para estes compostos, apresentando erro >20%, exceto para o composto 39.

Como já havia sido comentado, o modelo 3 não prevê bem a potência de compostos sulfonados por não apresentar nenhum composto deste tipo no seu banco de dados.

Os compostos 34, 35 e 36 provavelmente não tiveram suas potências previstas de forma adequada por serem as únicas maleimidias que têm por substituinte no anel imídico um átomo de cloro e uma base nitrogenada cíclica. Novamente o modelo não tinha informações quanto a este tipo de característica.

Também foram idealizados dois compostos, 55 e 56, com base nas estruturas da bisnftalimida mais potente (14) e do composto sulfonado mais potente (40). Suas potências foram previstas pelo modelo 3 e estes valores estão na Tabela 10.

No caso destes dois compostos não é possível avaliar as previsões pois são apenas compostos idealizados. O que pode ser observado é a coerência entre estes valores e as potências dos compostos semelhantes.

O composto 55 por ser uma substância sulfonada já não era esperado uma boa previsão. As potências previstas para os compostos sulfonados foram em média igual a 7,00, o mesmo valor previsto para o composto 55. Provavelmente um erro de mesma magnitude.

Já o composto 56, uma bisnaftalimida, teve sua potência prevista com um valor muito superior as demais bisnaftalimidias. Portanto, deve estar ocorrendo algum erro por causa do grupo nitro.

As potências deste compostos devem ser mais bem previstas pelo modelo 32, que prevê bem compostos sulfonados e apresenta uma caixa que comporta grandes compostos como o 56.

### 3.2.3.2. Modelo 32

A análise do modelo 32 (série treino: compostos 1-33, 39-43, 46, 47, 49-52/Tab. 7) resulta num  $R^2 = 0,977$  e um erro padrão de 0,149. Este valor de  $R^2$  mostra a alta correlação entre os valores de  $pDI_{50}$  experimentais e preditos, o que pode ser verificado no gráfico dos valores de  $pDI_{50}$  experimentais versus preditos (Figura 30). Uma análise deste gráfico mostra uma razoável adequação do modelo em todos os casos. A Figura 31 mostra a aleatoriedade dos resíduos.

Neste modelo de QSAR, há uma contribuição de 62,7% do campo estéreo e uma contribuição de 37,3% do campo eletrostático. O modelo final é mais influenciado pelo campo estéreo do que pelo campo eletrostático, da mesma forma que o modelo 3, como era esperado já que os bancos de dados utilizados na construção dos dois modelos apresentam moléculas que atuam através do mesmo mecanismo de ação.

A Figura 32 mostra os mapas de contorno estéreo e eletrostático do modelo 32. Para referência, o composto 14 é mostrado dentro do campo. Novamente os mapas de contorno eletrostático e estéreo são mostrados em figuras separadas para facilitar a análise (Figura 33 e 34, respectivamente).

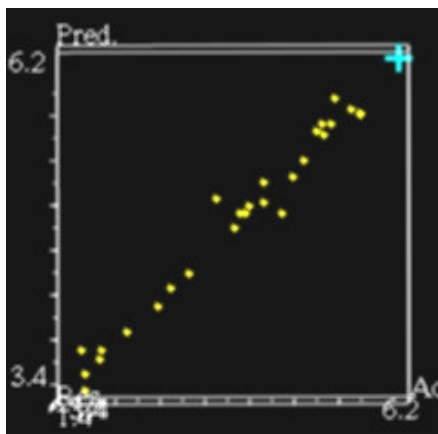


Figura 30- Gráfico da potência antinociceptiva experimental versus potência prevista pelo modelo 32.

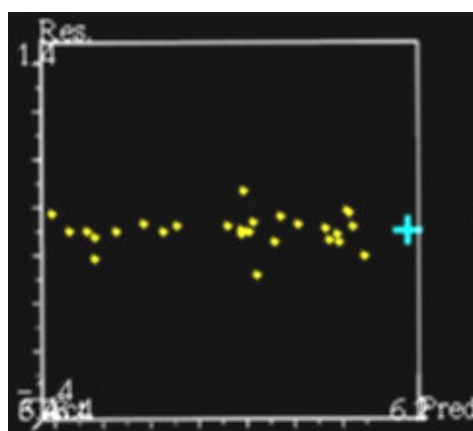


Figura 31- Gráfico da potência prevista versus resíduos do modelo 32.

No mapa eletrostático (Figura 33) pode ser observado uma região predominantemente negativa no lado esquerdo, uma região positiva na extremidade do substituinte do anel benzênico (lado esquerdo) e na região entre o anel naftálico e o anel imídico.

Como se trata de uma molécula simétrica é interessante analisá-la como duas partes (lado esquerdo e lado direito). Desta forma, segundo o mapa eletrostático, a interação com a enzima é favorecida numa molécula que tenha uma parte em que predomine a densidade de carga negativa (lado esquerdo) e, na região do farmacóforo (anel imídico) do lado oposto (lado direito), uma densidade positiva.

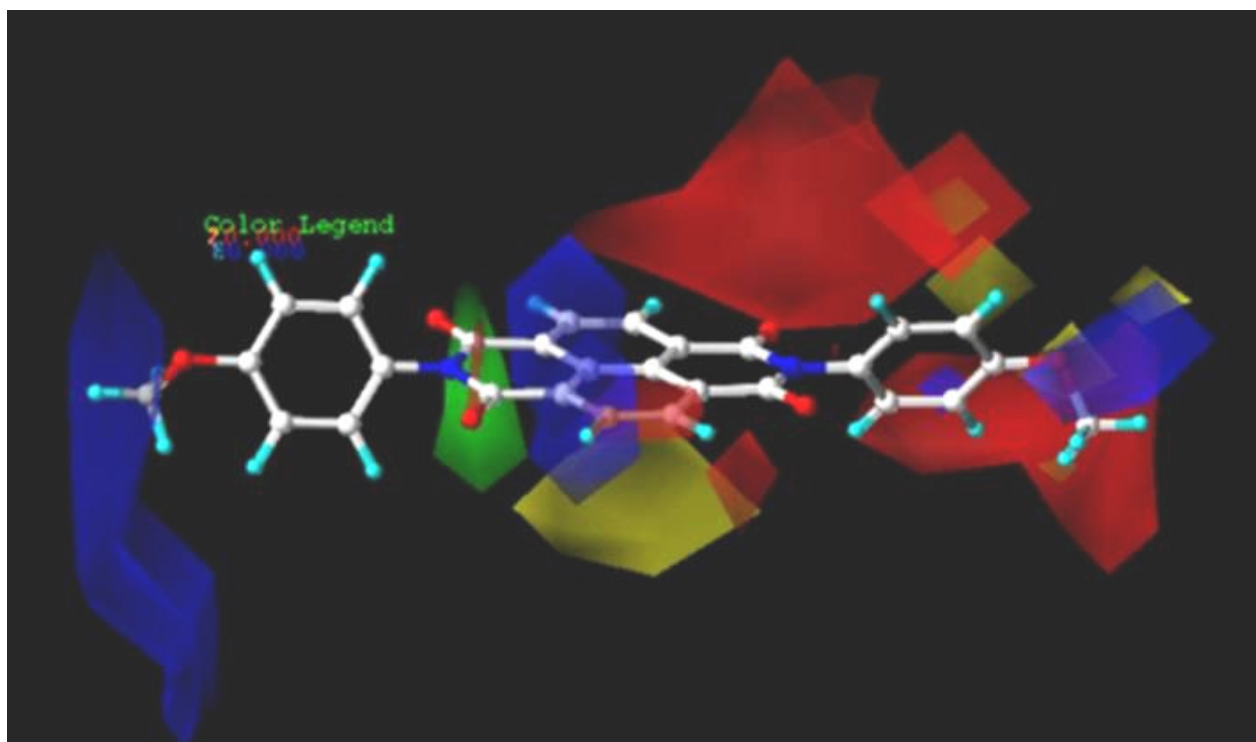


Figura 32- Mapas estéreo e eletrostático do modelo 32 (Tabela 8), tendo o composto 14 como referência.

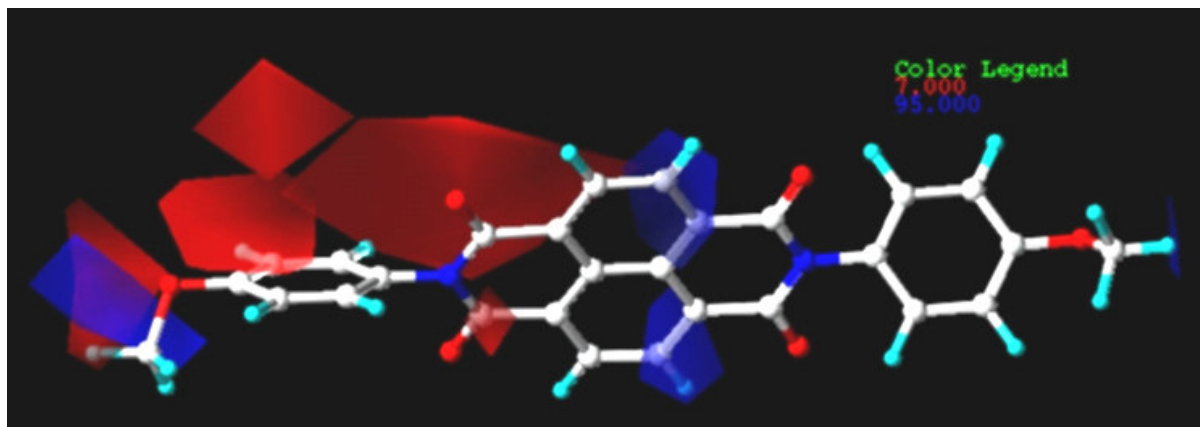


Figura 33- Mapa eletrostático do modelo 32 (Tabela 8), tendo como referência o composto 14.

No mapa estéreo (Figura 34), grupos menos volumoso (região amarela) perto dos anéis aromáticos centrais e próximo do substituinte do anel benzênico (lado

direito da figura), assim como grupos mais volumosos (região verde) na região do N imídico (lado esquerdo) favorecem o aumento da atividade.

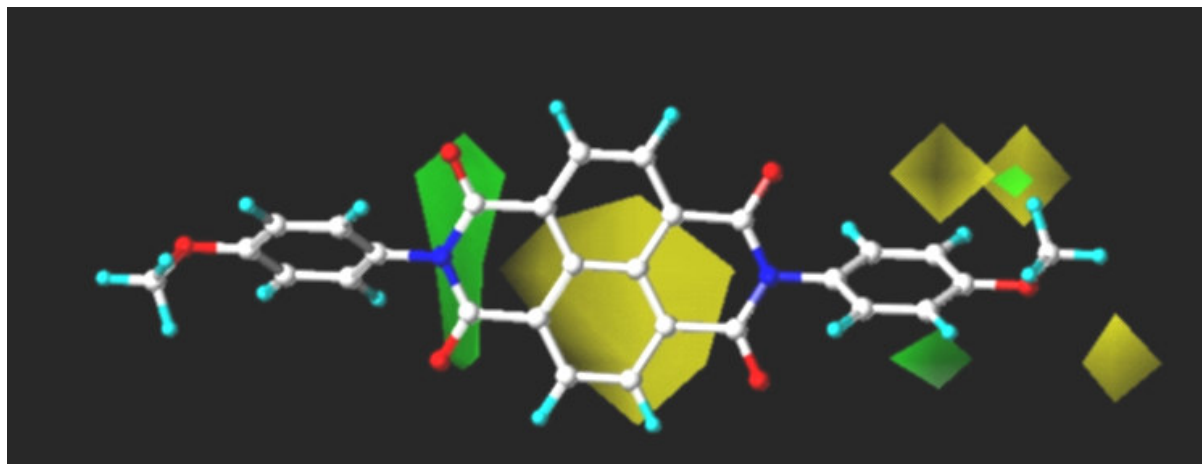


Figura 34- Mapa estéreo do modelo 32 (Tabela 8), tendo o composto 14 como referência.

A capacidade preditiva do modelo 32 foi avaliada pela série teste formada por nove compostos (1, 4, 6, 16, 17, 22, 23, 28, 32, 38, 44, 45, 48, – Tabela 7). Todos os valores previstos apresentam erro inferior a 20%, sendo que apenas dois têm erro superior a 10%. O modelo mostrou através da série teste ser um bom modelo. Os valores calculados juntamente com os resultados experimentais estão listados na Tabela 10.

É interessante observar que os compostos 1 e 28 tiveram suas potências previstas com erro inferior à 20%, o que não havia ocorrido nas previsões do modelo 3. A série treino utilizada na construção do modelo 32 apresenta vários compostos clorados no anel imídico, contribuindo assim para a obtenção de informações a este respeito.

Portanto, o que faltava eram informações sobre a influência destes átomos.

Da mesma forma ocorreu com os compostos sulfonados (38, 44, 45, e 48). Como o banco de dados é constituído por compostos sulfonados, o modelo obtido (modelo 32) é capaz de trabalhar com este tipo de substância.

Alguns compostos com potências antinociceptivas até então desconhecidas (37 e 54), sintetizados na primeira etapa deste trabalho, tiveram suas potências previstas pelo modelo 32. Os resultados das previsões são apresentados na Tabela 10. Estas previsões apresentam valores coerentes com a faixa de pIC<sub>50</sub> esperado para este tipo de composto (pDI<sub>50</sub>  $\cong$  4,5 $\mu$ M/Kg). Não é possível fazer nenhuma outra avaliação destas previsões, pois estes compostos não foram testados.

Também foram idealizados dois compostos, 55 e 56, com base nas estruturas da bisnaftalimida mais potente (14) e do composto sulfonado mais potente (40). Suas potências foram previstas pelo modelo 32 e estes valores estão na Tabela 9. Nestes dois casos também não foi possível avaliar a previsão já que os compostos ainda não foram testados. Contudo, levando em conta que um aumento de 1 unidade de log é muito grande em termos de concentração, a previsão do modelo 32 aparentemente deve ser mais realista, quando comparado aos valores de pIC<sub>50</sub> dos demais compostos. Levando em conta as previsões deste modelo (55, pIC<sub>50</sub> = 5,846; 56, pIC<sub>50</sub> = 5,828), o composto 56 deverá apresentar potência superior ao composto sulfonado mais potente, o éster sulfonado (40). Porém, o composto 55 não deverá apresentar potência superior a bisnaftalimida (14) mais potente (composto mais potente de todo banco de dados). Neste caso, não seria interessante tentar a sua síntese a não ser que se tenha como objetivo averiguar a previsão do modelo. É melhor sintetizar um composto que apresente resultados mais promissores.

Até este momento, os modelos 3 e 32 foram utilizados para prever a potência antinociceptiva de compostos sintetizados com potência conhecidas ou não, o que resultou em boas previsões. Porém, o objetivo principal na utilização de modelos da QSAR-3D/CoMFA é planejar novos compostos biologicamente ativos.



Sendo assim, a próxima etapa do trabalho é encontrar novos substituintes com base nas moléculas que apresentam as melhores potências e nos mapas de contorno dos modelos.

Normalmente, após a análise dos mapas estereo e eletrostáticos (análise já descrita acima), se idealiza novos substituintes e o modelo prevê a potência destes. Este trabalho torna-se muito demorado e depende muito do conhecimento do operador em possíveis substituintes e seus efeitos estereo e eletrostáticos, além da sua imaginação.

Para agilizar esta etapa do trabalho, o pacote SYBYL dispõe de um programa chamado *Leapfrog*.

*Leapfrog* realiza análises eletrostáticas fazendo mudanças estruturais repetidamente e então guarda ou descarta os resultados, dependendo da evolução (**Payne and Glen**, 1993; **Dixon et al**, 1993). Novas estruturas ligantes são avaliadas principalmente quanto as suas energias de ligação relativas ao seu precursor imediato (**Goodsell and Olson**, 1990; **Pattabiraman et al**, 1985).

Diferentes valores de dificuldades sintéticas são fornecidos, baseados em fatores como número de centros quirais, anéis, etc.. Os valores padrões são: cada átomo +0,5; cada anel +2,0; cada centro quiral +15,0. Estes valores podem ser alterados conforme o interesse do operador. Neste trabalho foram usados os valores padrões.

*Leapfrog* analisa o mapa de contorno do modelo em questão e codifica as informações na forma de pontos azuis, vermelhos e amarelos para indicar regiões favoráveis para ligantes positivos, negativos e lipofílicos, respectivamente.

No caso do modelo 3 aparecem pontos vermelhos e azuis, conforme é visto na Figura 35. Isto indica que para a interação entre a enzima PGHS e as imidas cíclicas, conforme o modelo 3, são importantes somente ligantes negativos e positivos.

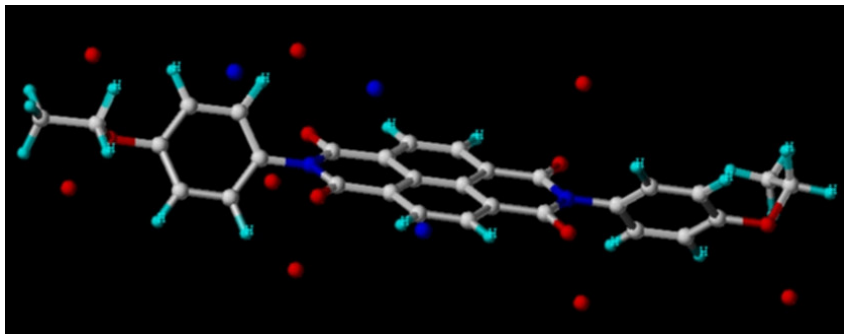


Figura 35 – Resultado visual de *Leapfrog*, com uma bisnftalimida planejada (L2).

Existem três formas de busca de novos ligantes:

1. *Guide*
2. *Dream*
3. *Optimize*

No primeiro, *Guide*, a busca é iniciada a partir de uma molécula indicada pelo operador, por exemplo a molécula mais potente.

No segundo, *Dream*, a busca é aleatória, o programa “sonha” realizando várias tentativas.

No terceiro, *Optimize*, realiza-se a busca a partir dos resultados obtidos com os dois primeiros métodos.

Neste estudo, primeiro foi realizada uma busca a partir do composto 9, usando *Guide*, utilizando o modelo 3 (Tab.8). Este composto foi escolhido por ser uma bisnftalimida (imidaz mais potentes) com anel benzênico não substituído. Neste caso o método apresenta uma variedade de possíveis substituintes (Tabela 14). É importante ressaltar que o método só substitui átomos de hidrogênio da molécula original.

Foram testadas todas as possibilidades e comparadas as energias de ligação dos compostos obtidos. O melhor substituinte foi o furano, em meta (composto L1- Tabela 15).

Tabela 14 – Possíveis substituintes do GUIDE.

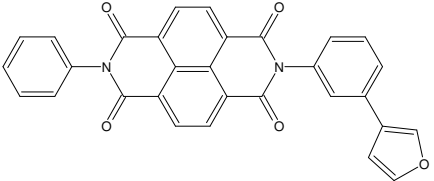
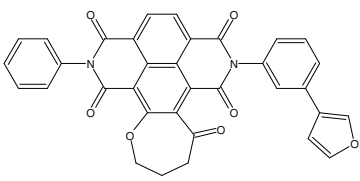
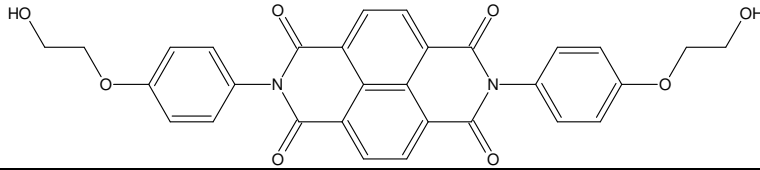
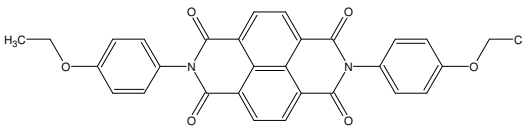
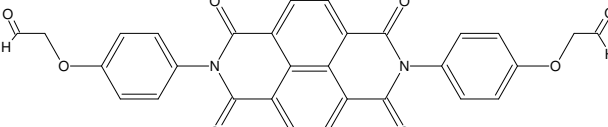
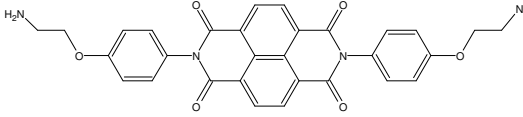
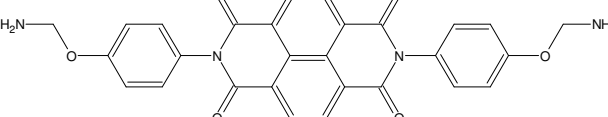
1H-1,2,4-triazol	Dimetilfosfato	Isoquinolina	Propano
1H-tetrazol	Etano	Isoxazol	Pteridina
7H-purina	Etanolamina	Metano	Pirazina
Ácido acético	Etileno	Metanol	Pirazol
Acetona	Formaldeído	Metilamina	Piridrazina
Adamatano	Formamida	n-butano (anti)	Piridina
Amônia	Ácido fórmico	n-butano (gauche I)	Primidina
Benzeno (meta)	Furano	n-butano (gauche II)	Pirrol
Benzeno (para)	Hexahidropirimidina	Naftaleno	Quinolina
Benzimidazol	Imidazol	Neopentano	Tetrahydroazepina
Benzopirazina	Indano	Oxazol	Tiazol
Benzotiazol	Indeno	Fenantrioo	Tiofeno
Ciclohexano (bote)	Indol	Fanazina	Tiazina
Ciclohexano (cadeira)	Indolino	Fenotiazina	Trimetilamina
Ciclohexano ( <i>twist</i> -bote)	Isobenzofurano	Ftalan	uréia
Ciclopentano	Isobutano	Piperazina	
dimetiléter	isoindol	Piperidina	

Em seguida, foi utilizado o método *Dream* com essa molécula (L1) e dentre os vários compostos apresentados, selecionou-se o de maior energia de ligação (composto L2 – Tabela 15).

De mão deste composto, fez-se o *Optimize*, onde não foi encontrado molécula melhor, com relação a energia de ligação.

O  $pDI_{50}$  previsto pelo modelo 3 para esta molécula (L2) foi de 6,008. A troca de substituintes melhorou apenas um pouco a potência do composto 9 (6,000), mas permaneceu inferior à potência do composto 14 (6,337). Tendo por objetivo encontrar um composto que apresente potência superior ao composto 14 – o mais potente, faz-se necessário mudar o composto modelo para a busca de novos ligantes.

Tabela 15 – Compostos planejados a partir do modelo 3, utilizando a ferramenta *Leapfrog*.

Composto	Composto
<b>L1</b> 	<b>L2</b> 
<b>L3</b> 	
<b>L4</b> 	<b>L5</b> 
<b>L6</b> 	<b>L7</b> 

Nova busca foi realizada partindo do composto 14, para tentar melhorar a potência, através da adição de substituintes no lugar do átomo de hidrogênio do grupo metóxi.

Novamente todas as opções do *Guide* foram testadas, sendo que a substituição nos três H do grupo metóxi foram experimentadas, pois diferentes conformações finais eram obtidas desta forma. O melhor resultado foi encontrado quando um dos hidrogênios do grupo p-OCH<sub>3</sub> foi substituído por HOCH<sub>2</sub>–, denominado pelo programa de metanol por ser originário desta substância. Por se tratarem de moléculas simétricas (bisnaphthalimidas), foi adicionado um novo grupo HOCH<sub>2</sub>– no H do p-OCH<sub>3</sub> do outro lado da molécula. Isto resultou no composto L3 (Tabela 15) e num aumento de mais de 100 vezes na energia de ligação.

O  $pIC_{50}$  previsto pelo modelo 3 para esta molécula é de 7,31708. A  $DI_{50}$  reduziria de 0,46  $\mu\text{M}/\text{kg}$  (composto 14) para 0,048  $\mu\text{M}/\text{kg}$  (L3), uma redução de mais de 90%. Ou seja, com este composto alcançaríamos  $DI_{50}$  na ordem de nmolar (48nM/kg).

O programa também apresenta a molécula colorida conforme regiões favoráveis (violeta) ou não (vermelho, amarelo ou branco) a interação, para distinguir entre átomos que favorecem ou desfavorecem a interação (Figura 36). O interessante nesta análise realizada pelo programa é que apesar da molécula ser simétrica, as regiões favoráveis não são iguais nos dois lados da molécula.

Utilizando esta metodologia, cinco novos compostos foram planejados a partir do composto 14 e do modelo 3, cujas  $pIC_{50}$  previstas pelo mesmo modelo estão na Tabela 16.

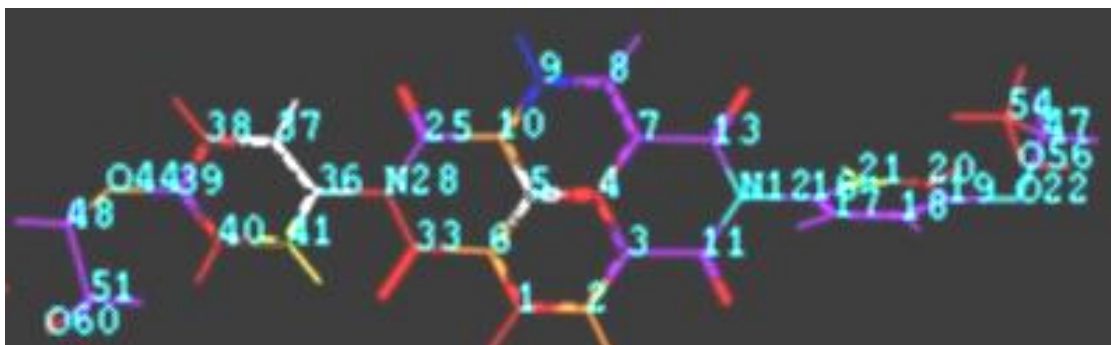


Figura 36 – Molécula L3 (Tab.16) colorida conforme regiões favoráveis a interação com a enzima (violeta) e regiões desfavoráveis (vermelho, amarelo ou branco). Figura obtida do *Leapfrog/SYBYL*.

Um outro planejamento de novos compostos foi realizada com o modelo 32, para obtenção de compostos sulfonados. Os mesmos passos acima descritos foram seguidos, no *Leapfrog*.

Ao utilizar como molécula modelo o composto 40 (composto sulfonado mais potente) obteve-se o composto L8 (Tabela 17). Já ao utilizar como molécula modelo o composto 43 (sulfonamida mais potente) obteve-se os compostos L9 e L10 (Tabela 17).

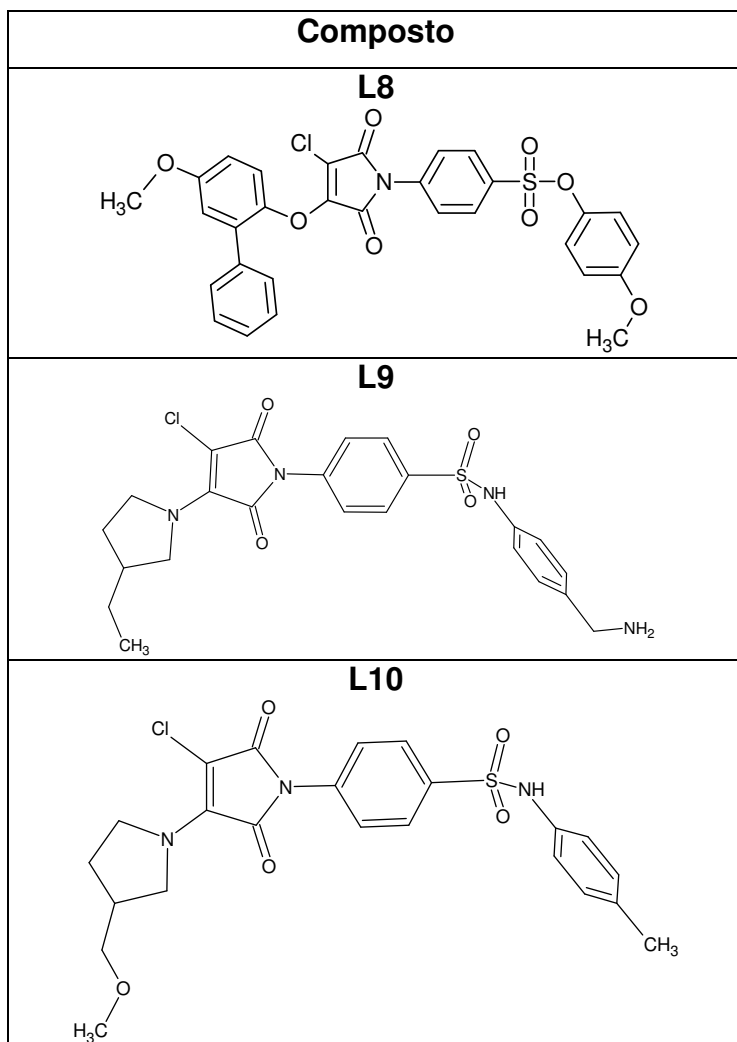
Tabela 16 – Valores de  $pDI_{50}$  previstos dos compostos planejados (L3-L7, Tab.15) pelo modelos 3.

Composto	Modelo 3
	$pDI_{50}$ previsto
L3	7,317
L4	7,106
L5	6,779
L6	6,601
L7	7,060

O composto L8 apresenta potência prevista, pelo modelo 32, maior que o composto 40 ( $pDI_{50} = 5,13$ ), o que é um resultado promissor no planejamento de novos compostos sulfonados.

O composto L9 apresenta potência prevista, pelo modelo 32, maior que o composto 43 ( $pDI_{50} = 4,98$ ). Já o composto L10 apresenta potência prevista inferior ao composto 43, contudo sua estrutura não deve ser desconsiderada.

As potências previstas para estes compostos pelo modelo 32 estão na Tabela 18.

Tabela 17 – Compostos planejados a partir do modelo 32, utilizando a ferramenta *Leapfrog*.Tabela 18 – Valores de  $pDI_{50}$  previstos dos compostos planejados (L8-L10, Tab.18) pelo modelo 32.

Compostos	Modelo 32
	$pDI_{50}$ previsto
L8	5,657
L9	4,975
L10	4,449

### 3.2.4. QSAR 4D

O modelo 32 e os demais modelos foram obtidos utilizando moléculas na sua conformação de menor energia encontrada.

A conformação adquirida pela molécula é muito importante para a interação com a enzima. Isto pôde ser visto quando planejava-se novos compostos utilizando *Leapfrog*. A substituição do átomo de hidrogênio do p-OCH<sub>3</sub> por novos substituintes apresentou resultados diferentes para os três H. Ou seja, dependendo do H que era substituído, diferentes conformações eram obtidas para uma mesma substância. Em alguns casos não era possível chegar a uma nova “molécula” por causa da “colisão” de átomos. Em outros casos eram obtidas “moléculas” (diferentes conformações) com diferentes energias de ligação.

Por exemplo, no planejamento da molécula L3 foram encontradas duas conformações (Figura 37) que apresentavam diferentes energias de ligação e potências previstas.

Quando não há informações sobre a conformação adquirida pelo fármaco no sítio receptor trabalha-se com a conformação de menor energia. Contudo, desta forma o universo de informações sobre a interação com o receptor fica muito restrito.

Para aumentar a probabilidade de trabalhar com moléculas na sua conformação biotiva ou pelo menos com conformações próximas a ela, monta-se um banco de dados com moléculas e suas respectivas conformações. Hopfinger e colaboradores realizaram este tipo de trabalho que foi denominado como construção de modelo QSAR-3D usando o formalismo de análise QSAR-4D (**Hopfinger et al, 1997**).

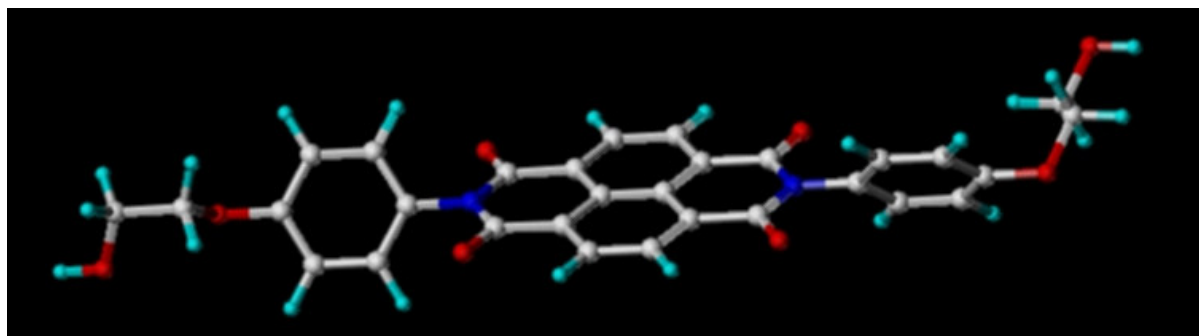
A idéia é obter um modelo melhor para o planejamento racional. Hopfinger sugere que se localize a conformação biotiva dentre os diferentes confôrmeros, para encontrar um modelo de QSAR-3D utilizando apenas estas conformações.

No presente trabalho, foi aplicada uma análise de QSAR 4D a dois conjuntos treino (compostos 1-33/Tabela 7) que diferem no método utilizado para

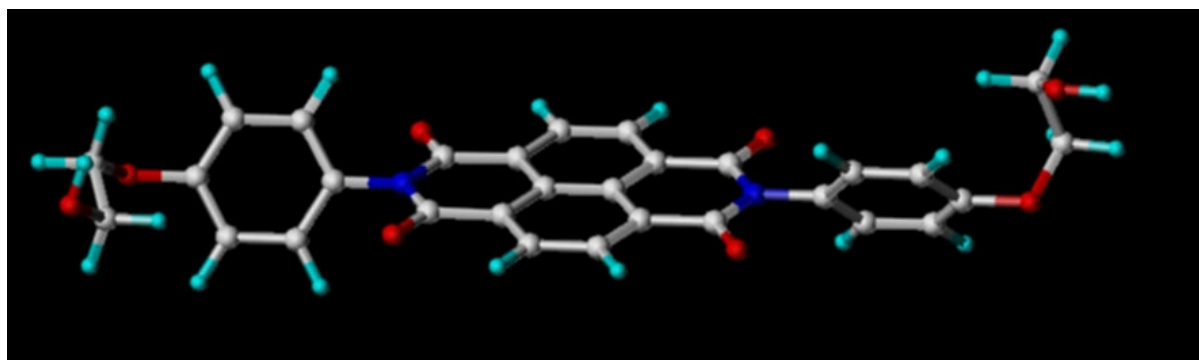


busca conformacional (GA e SA). O primeiro conjunto treino (conjunto 1) a ser discutido é uma série de imidas cíclicas substituídas e seus respectivos confôrmeros gerados por GA com atividade antinociceptiva, inibidores de PGHS. O segundo conjunto treino (conjunto 2) são imidas cíclicas do primeiro conjunto treino e seus respectivos confôrmeros gerados por SA.

Através da análise de QSAR 4D foram obtidos os modelos 40-49, cujos resultados estatísticos estão relatados na Tabela 19.



(A)



(B)

Figura 37 – Molécula L3 nas suas duas conformações encontradas durante o planejamento: (A) molécula com  $pDI_{50}$  previsto = 7,317; (B)  $pDI_{50}$  previsto = 6,695.

Tabela 19- Resultados da análise de PLS dos conjunto 1(GA) e 2 (SA).

Modelo	Minimiz.	Sonda	Caixa 8	Caixa 9	Caixa 10	$R^2_{cv}$	$R^2$	F	Erro	Filtragem de coluna (2.0)	SAMPLS	Região de Foco	% de contrib. (est./eletr.)	Nº ótimo de compon.
40	S A	$N_2^{+1}$	X	-	-	0,697	0,931	436,76	0,183	X	-	-	62,2/37,8	5
41	S A	$N_2^{+1}$	-	X	-	0,739	0,953	539,25	0,152	-	X	-	66,0/34,0	6
42	S A	Foco $N_2^{+1}$	-	X	-	0,767	0,932	366,76	0,182	-	-	X	67,1/32,9	6
43	S A	$O_3^{-1}$	-	X	-	0,737	0,953	540,98	0,152	-	X	-	66,2/33,8	6
44	S A	Foco $O_3^{-1}$	-	X	-	0,765	0,931	363,90	0,183	-	-	X	67,5/32,5	6
45	S A	Foco $N_2^{+1}$ Foco $O_3^{-1}$	-	X	-	0,766	0,932	392,92	0,185	-	X	-	66,5/33,5	6
46	S A	$N_3^{+1}$	-	X	-	0,739	0,953	539,42	0,152	-	X	-	69,9/34,1	6
47	SA	$N_3^{+1}$	-	X	-	0,767	0,932	366,65	0,182	-	-	X	67,1/32,9	6
48	GA	$N_3^{+1}$	-	-	X	0,924	0,940	966,770	0,185	-	X	-	72,1/27,9	6
49	GA	$N_3^{+1}$	-	-	X	0,935	0,948	1113,83	0,173	-	-	X	76,2/23,8	6

Neste trabalho foram experimentadas diferentes tamanhos de caixa (caixa 8-10/tabela 20) e diferentes tipos de sondas ( $N_2^{+1}$ ,  $N_3^{+1}$ ,  $O_3^{-1}$ ) pelos motivos já citados anteriormente no estudo de QSAR-3D.

Tabela 20 – Caixas utilizadas na construção dos modelos 40-49.

Caixa	X		Y		Z		Volume ( $\text{Å}^3$ )
8	-14	13	-9	9	-10	12	10,692
9	-14	12	-10	10	-9	9	9,360
10	-14	15	-9	9	-8	10	9,396

Ao comparar os modelos obtidos nos conjuntos 1 e 2 (Tabela 19) verifica-se que os modelos referentes ao conjunto 2 (modelos 40-47) não são tão bons quanto os outros modelos (48-49) do conjunto 1, por apresentarem menor capacidade preditiva ( $R^2_{cv}$ ).

Quando se realiza um estudo de QSAR-4D espera-se que o modelo encontrado (modelo 49) apresente melhores resultados que o correspondente modelo de QSAR-3D (modelo 3). Contudo, os resultados da QSAR-4D não devem diferir muito dos obtidos na 3D, por se tratarem das mesmas moléculas porém sem a variedade conformacional.

No mapa de contorno da interação estéreo do modelo 49 (Figura 38) existe esta coerência, pois o mapa é muito semelhante e concordante com os correspondentes mapas do modelo 3 (Figura 28) e do modelo 46 (Figura 43). Sugere a adição de grupos menos volumosos na região do anel naftálico (região amarela) e de grupos mais volumosos nas regiões vizinhas ao anel naftálico. Entretanto, não é o caso do mapa eletrostático do modelo 49 (Figura 39). Este mapa apresenta predominantemente regiões vermelhas que indicam a necessidade de utilizar substituintes que aumentem a adensidade de carga negativa. Porém, ao comparar este mapa de contorno como correspondente mapa do modelo 3 (Figura 29) observa-se que na Figura 29 há o predomínio da região azul, o que indica a necessidade de trabalhar com substituintes que aumentem a densidade de carga positiva. O mesmo tipo de sugestão é encontrada no mapa de contorno eletrostático do modelo 46 (Figura 44).

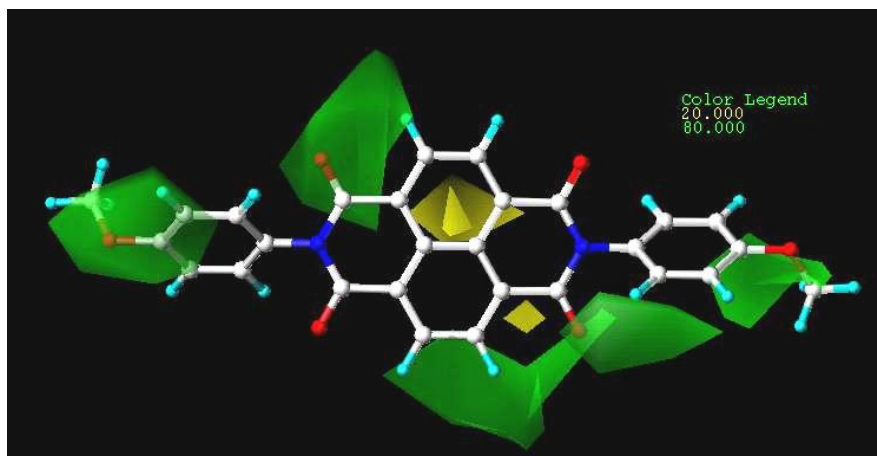


Figura 38- Mapa estéreo das imidas cíclicas obtido do modelo 49 (conjunto 1/Tabela 19).

O modelo 49 foi encontrado utilizando como série treino os compostos 2, 3, 8, 10, 12, 14, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 27, 30-33 (Tab.70). Neste modelo de QSAR (modelo 49), há uma contribuição de 76,2% do campo estéreo e uma contribuição de 23,8% do campo eletrostático. São valores semelhantes aos encontrados para o

modelo 3, nos dois casos a maior contribuição é do campo estéreo. Isto mostra a coerência entre os resultados encontrados, já que os dois modelos partem de banco de dados semelhantes, diferindo na presença de confôrmeros, no caso do modelo 49.

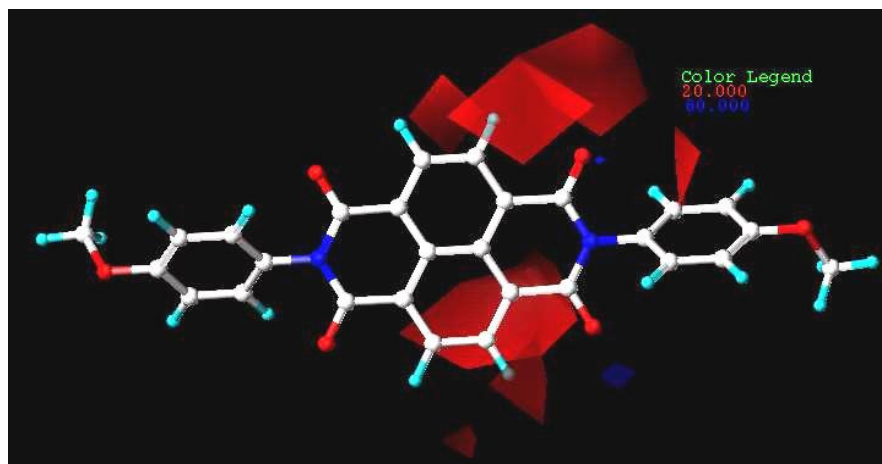


Figura 39- Mapa eletrostático das imidas cíclicas, obtido do modelo 49 (conjunto 1/Tabela 19).

A análise do modelo 49 resulta num  $R^2 = 0.953$  e um erro padrão de 0.173. Este valor de  $R^2$  mostra a alta correlação entre os valores de  $pIC_{50}$  experimentais e previstos. Um gráfico dos valores de  $pIC_{50}$  experimentais versus previstos é visto na Figura 40. Uma análise deste gráfico mostra uma razoável adequação do modelo em todos os casos. Esta figura apresenta alguns pontos próximos, na vertical. Isto ocorre em função da proximidade dos valores de potências previstos de confôrmeros de um mesmo composto. A Figura 41 mostra a aleatoriedade dos resíduos.

As potências previstas (modelo 49) para a série treino do conjunto 2 estão apresentadas na Tabela 21, onde os compostos estão identificados mediante numeração utilizada na Tabela 7.

Por estar trabalhando com os mesmos compostos porém acrescentando seus respectivos confôrmeros à série treino, o esperado é obter um modelo melhor, com maior capacidade de previsão, que seja coerente com correspondente modelo 3D.

O modelo 49 apesar de apresentar resultados surpreendentemente bons deve ser desconsiderado por apresentar mapa eletrostático não concordante ao modelo 3 da Figura 29, como já discutido anteriormente. A discussão está baseada no modelo 3 por ser este o melhor modelo QSAR-3D até então obtido para este banco de dados. Além disto, este trabalho de QSAR 4D é baseado no estudo do professor Hopfinger e colaboradores, onde a busca conformacional é realizada por Dinâmica Molecular com controle de temperatura (**Hopfinger et al**, 1997). No presente modelo, os confôrmeros foram gerados por GA com o intuito de buscar uma melhor forma de criar o banco de dados. Contudo, os resultados apresentados (mapas de contorno) não são satisfatórios. A busca conformacional por GA apresenta um problema. Quando não é encontrada uma nova conformação melhor do que a inicial, a conformação inicial é repetida. Desta forma, obtêm-se conformações muito semelhantes até mesmo idênticas. Provavelmente é por isso que o modelo 49 apresenta uma capacidade de previsão tão superior ao modelo 3.

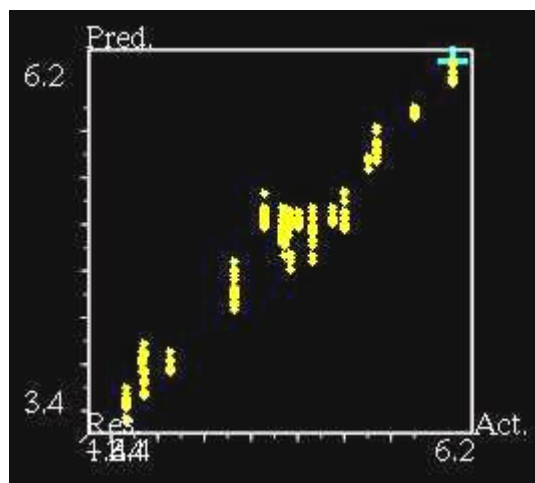


Figura 40- Gráfico da potência antinociceptiva experimental versus potência prevista pelo modelo 49/Tabela 19 (conjunto 1). No eixo y têm-se as potências previstas e no eixo x as potências experimentais.

Fica bem mais fácil prever a potência de um composto quando na série treino existe um confômero muito semelhante. Isto pode ter ocorrido mesmo após realização de cálculos de RMS, com o objetivo de localizar confômeros idênticos.

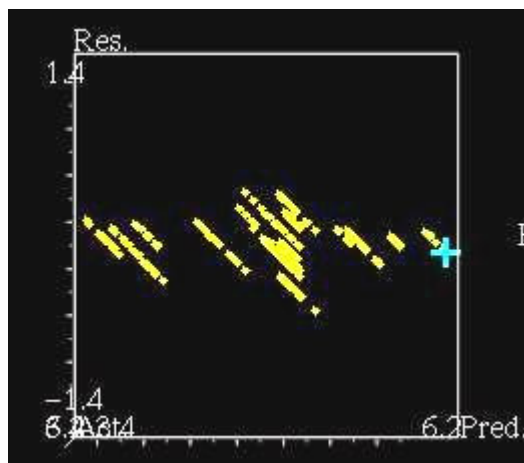


Figura 41- Gráfico da potência prevista pelo modelo 49 (Tabela 19) versus resíduos (conjunto 1). No eixo y têm-se os resíduos das previsões e no eixo x os valores de potência prevista pelo modelo.

O modelo 46 foi encontrado utilizando como série treino os compostos 2, 3, 8, 10, 12, 19, 20, 21, 24, 25, 27, 30-33 (Tab.8). O modelo 46 (conjunto 2), apresenta uma contribuição de 69,9% do campo estéreo e uma contribuição de 34,1% do campo eletrostático. Desta forma, o modelo final é mais influenciado pelo campo estéreo do que pelo campo eletrostático, assim como os modelos 3 e 49, onde foram estudados os mesmos compostos imídicos. Os resultados do CoMFA novamente são apresentados como mapas de contorno. A Figura 42 mostra os mapas de contorno de QSAR final. Para referência, o composto 5 (Tabela 7) é mostrado dentro do campo.

Tabela 21- Potências previstas pelo modelo 46 encontrado para o conjunto 1 .

Composto	pDI <sub>50</sub> experimental	Modelo 46 (SA)			Modelo 49 (GA)		
		pDI <sub>50</sub> previsto	Resíduo	Erro %	pDI <sub>50</sub> previsto	Resíduo	Erro %
2	5,398	1*		<b>0,24</b>	19**		<b>2,28</b>
		5,411	-0,013		5,275	0,123	
3	4,456	7		<b>0,07</b>	1		<b>0,15</b>
		4,459	-0,003		4,449	0,007	
8	6,000	1		<b>1,98</b>	15		<b>0,05</b>
		5,881	0,119		5,997	0,003	
10	5,672	8		<b>0,14</b>	9		<b>0,07</b>
		5,664	0,008		5,676	-0,004	
12	4,928	2		<b>0,06</b>	9		<b>0,59</b>
		4,931	-0,003		4,899	0,029	
14	6,337	-----	-----	----	10		<b>0,50</b>
					6,305	0,032	
18	5,125	6		<b>0,46</b>	16		<b>0,24</b>
		5,101	0,024		5,113	0,012	
19	5,292	3		<b>0,08</b>	18		<b>2,83</b>
		5,288	0,004		5,142	0,150	
20	5,004	3		<b>0,77</b>	18		<b>0,09</b>
		5,043	-0,039		5,009	-0,005	
21	4,710	7		<b>0,31</b>	10		<b>5,59</b>
		4,725	-0,015		4,973	-0,263	
23	4,943	-----	-----	----	17		<b>0,68</b>
					4,976	-0,033	
24	3,678	4		<b>0,48</b>	12		<b>0,17</b>
		3,696	-0,018		3,672	0,006	
25	3,658	2		<b>0,46</b>	20		<b>2,31</b>
		3,641	0,017		3,743	-0,085	
27	3,523	3		<b>0,57</b>	13		<b>0,23</b>
		3,503	0,020		3,515	0,008	
30	5,602	3		<b>0,13</b>	20		<b>0,42</b>
		5,610	-0,008		5,578	0,024	
31	3,910	5		<b>0,03</b>	11		<b>0,02</b>
		3,911	-0,001		3,909	0,001	
32	4,886	2		<b>0,07</b>	12		<b>0,67</b>
		4,890	-0,004		4,854	0,032	
33	4,875	9		<b>0,42</b>	20		<b>1,61</b>
		4,854	0,021		4,953	-0,078	

\* e \*\* número para identificação dentre os confômeros gerados para os composto.

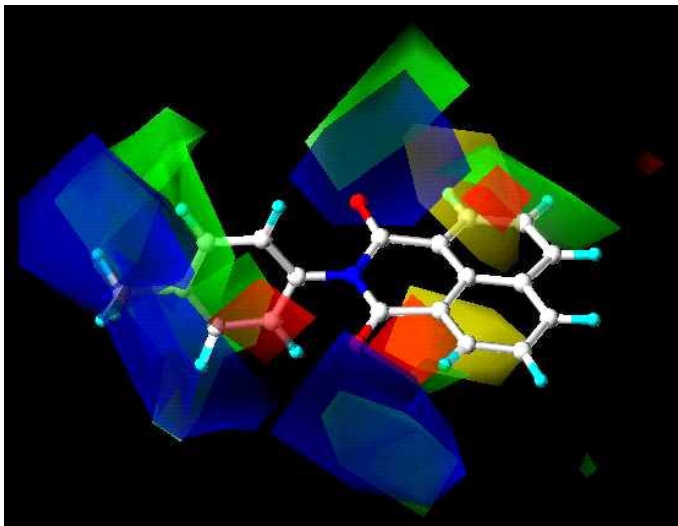


Figura 42- Mapas estéreo e eletrostático obtido do modelo 46/Tabela 19 .

Neste modelo, é possível verificar que a análise do mapa estéreo (Figura 28) é muito semelhante ao modelo do estudo de QSAR 3D (Figura 14), visto na seção anterior. A região verde sugere que a presença de um substituinte mais volumoso no anel benzênico favorecerá a potência, assim como um substituinte menos volumoso no anel naftálico.

A interação eletrostática (Figura 44) é favorecida por um aumento do potencial eletrostático positivo nas proximidades das carbonilas e no substituinte do anel benzênico. O que também é concordante com os mapas da Figura 29 (modelo 3).

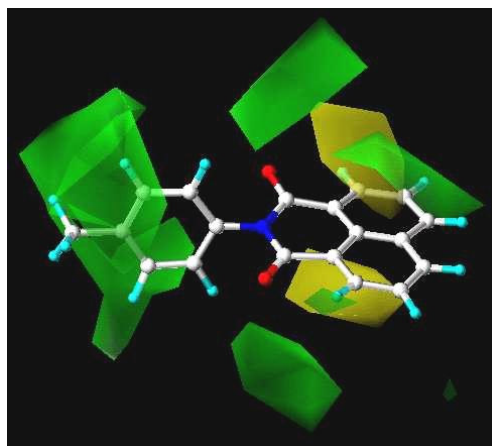


Figura 43- Mapa estéreo das imidas cíclicas, obtido do modelo 46 (conjunto 2).



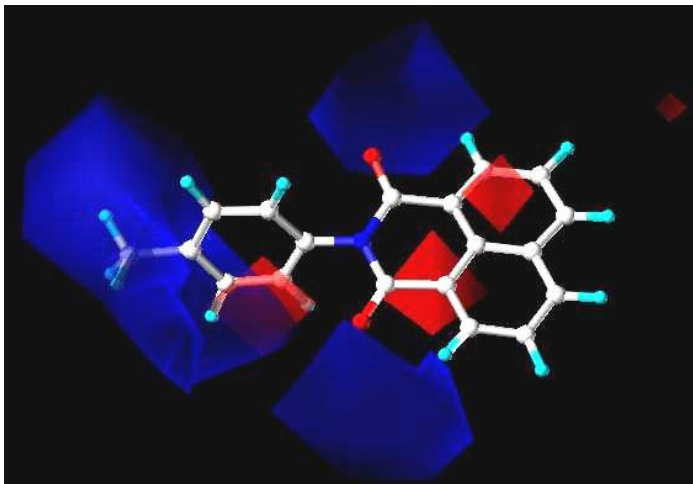


Figura 44- Mapa eletrostático das imidas cíclicas (modelo 46/Tabela 19).

Um aumento no potencial eletrostático negativo na região do anel imídico também favorece a interação com a enzima.

Sendo assim, é sugerido a utilização de substituintes volumosos e eletro retiradores.

O modelo encontrado possui uma boa capacidade preditiva, como pode ser verificado nas Figuras 46 e 47.

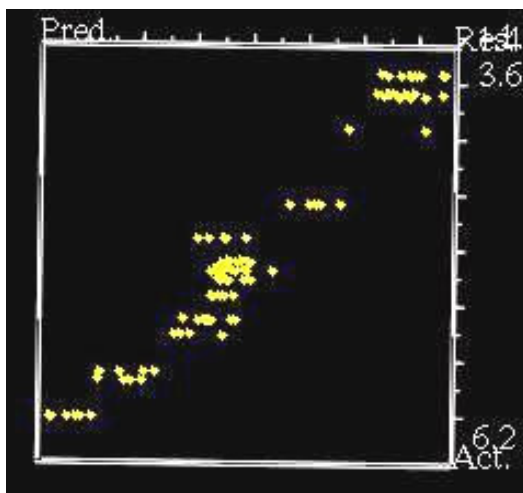


Figura 45- Gráfico da potência antinociceptiva experimental versus potência prevista pelo modelo 46/Tabela 19.

As potências previstas (modelo 46) para a série treino do conjunto 1 estão apresentadas na Tabela 21, onde os compostos estão identificados mediante numeração utilizada na Tabela 7. Ao analisar a Tabela 21 verifica-se que todas as previsões feitas pelo modelo 46 apresentaram erro menor que 2%, melhores que o modelo 49.

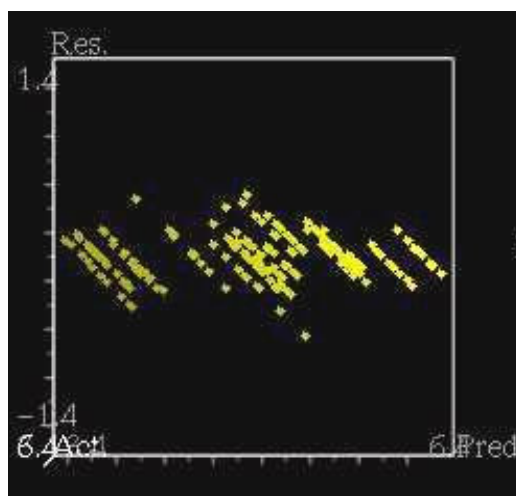


Figura 46- Gráfico da potência prevista pelo modelo 46 versus resíduos (Tabela 19).

A capacidade preditiva ( $R^2_{cv}$ ) foi avaliada pela série teste composta por dez substâncias (compostos 1, 4, 9, 11, 14, 16, 17, 22, 23, 29). Os valores calculados por este modelo, juntamente com os resultados experimentais estão listados na Tabela 22, onde estão identificados segundo numeração da Tabela 7.

Todos os valores de potência para a série teste foram previstos com erro inferior a 11%, ou seja, o modelo apresenta uma ótima capacidade de previsão. Isto indica que o modelo é capaz de trabalhar com compostos deste tipo, que não está condicionado aos compostos da série treino.

Ao comparar as potências previstas para a série teste do modelo 46 (Tabela 22) com os valores previstos pelo modelo 3 (Tabela 10), verifica-se que o modelo 46 prevê com menor erro percentual os compostos 1, 16, 22 e 29.

Tabela 22- Série teste do conjunto 2, potências experimentais, potências previstas pelo modelo 46 e seus respectivos resíduos e erros experimentais.

Composto	pDI <sub>50</sub> experimental	Modelo 46 (SA)		Erro %
		pDI <sub>50</sub> previsto	Resíduo	
1	5,555	5,373	0,1824	3,28
4	5,674	5,723	-0,0486	0,86
9	6,000	5,936	0,0644	1,07
11	5,733	5,611	0,1222	2,13
14	6,337	5,809	0,5280	8,33
16	5,928	5,334	0,5941	10,02
17	4,721	4,877	-0,1562	3,31
22	4,972	5,101	-0,1293	2,60
23	4,943	4,885	0,0581	1,17
29	5,503	5,043	0,4605	8,37

Alguns compostos com potência antinociceptiva até então desconhecidas – série validação lateral (compostos 34-54/Tabela 7) - tiveram suas potência previstas pelo modelo 46. O resultado das previsões para estes compostos, os resíduos e erros percentuais dos compostos que foram testados durante a realização deste trabalho estão na Tabela 23.

Previsões com erro acima de 20% para os compostos sulfonados já eram esperadas, assim como ocorreu com o modelo 3. O modelo 46 também foi construído com um banco de dados constituído apenas por imidas.

É interessante observar que o modelo 46 previu bem (erro <20%) as potências dos compostos 34, 35 e 36. O modelo 3 não havia feito boas previsões para estes compostos. Sendo assim, o fato de ter acrescentado ao bando de dados as conformações das moléculas da série treino deve ter aumentado suficientemente as informações necessárias.

Tabela 23- Previsão da potência antinociceptiva da série validação lateral.

Composto	pDI <sub>50</sub> experimental	SA		Erro %
		pDI <sub>50</sub> previsto	Resíduo	
34	4,086	4,787	-0,701	17,15
35	4,412	4,670	-0,258	5,84
36	4,061	4,403	-0,342	8,43
37	-	4,512	-	-
41	4,855	4,841	0,014	0,30
42	4,580	13,518	-8,938	195,15*
43	4,984	14,368	-9,384	188,28*
44	4,295	4,461	-0,166	3,86
45	4,893	13,810	-8,917	182,25*
46	4,350	12,396	-8,046	184,96*
47	4,640	13,117	-8,477	182,69*
48	4,590	4,662	-0,072	1,57
49	4,719	4,578	0,141	2,99
50	4,720	12,414	-7,694	163,02*
51	4,962	4,129	0,833	16,78
52	4,757	3,739	1,018	21,41*
53	4,610	5,251	-0,641	13,90
54	-	4,830	-	-

\* erros percentuais superiores a 20%.

Em seu trabalho, Hopfinger sugere que a conformação de um determinado composto que apresentar valor de potência previsto mais próximo do experimental seja a conformação bioativa.

Com base nesta hipótese, tentou-se a identificação das conformações bioativas. Na Tabela 21 estão apresentados os melhores resultados previstos pelo modelo 46 e na Figura 47 encontram-se as conformações que tiveram suas potências previstas mais próximas da experimental (“conformações bioativas”).

Com estas “conformações bioativas” foi montado um banco de dados com o objetivo de encontrar um modelo de QSAR-3D melhor do que o já obtido, que tenha como série treino as moléculas nestas conformações.

O modelo encontrado apresentou um  $R^2_{cv}$  igual a 0,067%, o que é muito baixo. Por este valor, verifica-se que não faz sentido, pelo menos para estas moléculas, trabalhar com estas conformações, como sugere Hopfinger.

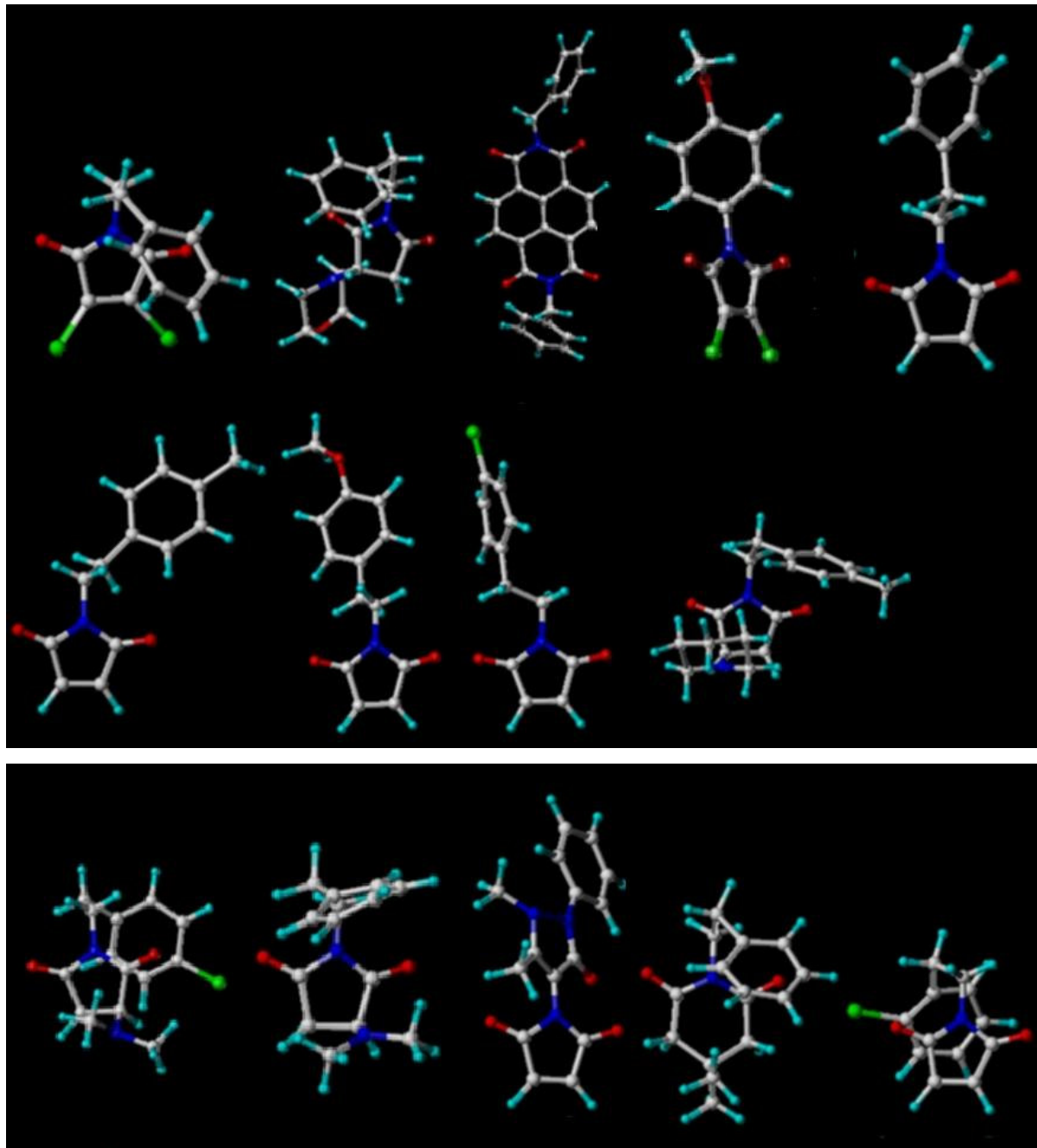


Figura 47 – “Conformações bioativas” dos compostos 2, 3, 10, 12, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 27, 30, 31, 32, respectivamente.

O melhor alinhamento para QSAR-3D não necessariamente coincide com os ligantes na conformação ligante-receptor (**Norinder**, 1998). Klebe e Abraham já haviam explicado, num estudo com 20 compostos usando alinhamentos deduzidos

experimental e teoricamente, que o alinhamento baseado em dados cristalográficos do complexo ligante-enzima eram estatisticamente piores do que os resultados obtidos através do alinhamento deduzido da modelagem dos ligantes (Klebe e Abraham, 1993).

O modelo de QSAR-4D (modelo 46) apresentou melhor capacidade de previsão em comparação ao correspondente modelo de QSAR-3D por ter maior número de informações.

Pelos resultados do modelo 3D utilizando as “conformações bioativas” verifica-se que para trabalhar com uma única conformação de cada composto imídico o melhor é utilizar a conformação de menor energia.

Estas “conformações bioativas” podem ser utilizadas num futuro trabalho de mapeamento do sítio receptor, contudo neste estágio do trabalho não é possível discutir mais nada sobre estas conformações.

### 3.3. Atividade Analgésica

Os resultados dos testes de atividade analgésica apresentados na Tabela 24, mostram que os compostos sintetizados neste trabalho apresentaram significativo efeito antinociceptivo quando comparados com fármacos não esteroidais como aspirina e paracetamol (NSAIDs). A atividade antinociceptiva dos compostos foi avaliada usando o modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. É evidente a diferença na atividade de maleimidas e succinimidas quando são comparados os compostos 11 (DI50 = 2,80 $\mu$ M/Kg) e a *N*-fenilsuccinimida (321,1 $\mu$ M/Kg). Também foi observado que a substituição de hidrogênio da dupla ligação do anel imídico por átomos de cloro (compostos 11; DI50 = 2,80 $\mu$ M/Kg) aumenta significativamente a atividade da *N*-fenilmaleimida (DI50 = 19,00 $\mu$ M/Kg). Quando administrada no peritônio de animais, o ácido acético libera vários mediadores inflamatórios incluindo prostaglandina (Dray, 1993; Dray and Bevan, 1991). Tem sido sugerido que os efeitos analgésicos e anti-inflamatórios de drogas não-esteroidais e anti-inflamatórias (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*-NSAIDs) resultam, em parte, da supressão da PGHS. Considerando a similaridade estrutural

das maleimidias deste trabalho com as do trabalho de Kalgutkar e colaboradores (Kalgutkar et al, 1996) e a similaridade na atividade das maleimidias com respeito a succinimidias, é possível assumir que estas imidas devem agir sob o mesmo mecanismo de ação: inibição de PGHS. De acordo com Kalgutkar e colaboradores, N-(carboxiheptil)-maleimida inibe a atividade da enzima segundos após misturado com uma quantidade estequiométrica da proteína PGHS. O leque de inibição de PGHS de N-(carboxiheptil)-succinimida sugere que esta inibição resulta de uma modificação covalente da enzima. O composto 11 apresentou uma reação muito rápida com alguns reagentes nucleofílicos que substituem um dos átomos de cloro. Este fato confirma a hipótese de Kalgutkar e colaboradores, que propõem que maleimidias inativam a PGHS devido a modificação covalente da proteína. A alta atividade do composto 11 comparada com os compostos 14-16 sugere que a modificação covalente ocorre pelo deslocamento do átomo de cloro do anel imídico. Quando um átomo de cloro do 11 é substituído por bases nitrogenadas, como nos compostos 14-16, o ataque nucleofílico na dupla ligação com substituição do segundo átomo de cloro não é esperado ocorrer, resultando em baixa atividade, como pode ser inferido das estruturas de ressonância no Esquema 9.

Kalgutkar e colaboradores (Kalgutkar et al, 1996) sugerem, em seu estudo, que a inibição da PGHS por compostos imídicos resulta de uma primeira interação não covalente com a arginina protonada, para posicionamento adequado na cavidade do receptor. Depois, ocorre uma segunda interação covalente com a tirosina. No mesmo trabalho propõem que a interação covalente ocorre no carbono olefínico do anel imídico, constatando assim a importância da ligação dupla. Esta característica importante para a ação analgésica foi observada na análise de PCA dos compostos imídicos (Figura 12), onde os compostos

Table 24- Potência de imidas, compostos sulfonados e drogas referência injetados intraperitonealmente contra contorções abdominais induzidas por ácido acético (*writhing test*) em camundongos (numeração correspondente a síntese).

Compostos	DI <sub>50</sub> (µM/Kg)
11	2,80 (2,00-3,20) ( <b>Andricopulo et al</b> , 1998)
13	81,88 (51,93-82,54)
14	38,66 (11,14-53,00)
15	86,84 (55,62-100,33)
16	13,31 (10,86-16,26)
24	50,25 (10,20-71,53)
26	64,95 (41,86-102,29)
27	7,36 (5,81-13,37)
29	13,94 (4,75-31,75)
33	26,24 (19,25-35,76)
34	10,36 (5,24-22,42)
35	50,66 (29,44-79,45)
36	12,78 (10,41-27,18)
37	44,96 (34,08-59,31)
40	22,75 (19,36-26,72)
41	25,66 (17,83-48,70)
42	19,10 (8,99-25,88)
43	18,87 (18,30-19,44)
44	10,92 (8,77-13,65)
N-Fenilsuccinimida	321,1(280,10-480,2) ( <b>Souza</b> , resultados não publicados)
N-Fenilmaleimida	19,00 (11,50-31,80) ( <b>Cechinel Filho et al</b> , 1996-b)
Aspirina	133,00 (73,00-247,00) ( <b>Cechinel Filho et al</b> , 2000)
Paracetamol	125,00 (104,00-250,00) ( <b>Cechinel Filho et al</b> , 2000)

mais potentes foram separados dos menos potentes. Estes compostos diferem estruturalmente na existência ou não da ligação dupla no anel imídico.



Na equação 12 também é constatada a importância da dupla ligação para favorecer o ataque nucleofílico da enzima. Segundo esta equação, serão mais potentes os compostos que apresentarem distribuição de carga diferente dos compostos 8 e 12 – imidas sem a dupla ligação no anel imídico (Tabela 1).

Contudo, a interação com a enzima não deve ocorrer apenas através do ataque nucleofílico no C olefínico. Se esta fosse a única possibilidade, as succinimidas deveriam ser inativas, mas não é o observado, pois as estudadas neste trabalho apresentam baixa potência, mas são ativas (compostos 7-10/Tabela 1. Neste caso, uma possibilidade é a interação através do carbono carbonílico. Semelhante mecanismo de ação já foi sugerido por Nunes para a atividade antimicrobiana de compostos imídicos (**Nunes**, 1986).

Outro exemplo de compostos ativos sem possibilidade de interação com a enzima através de C olefínico são as naftalimidas e as bisnaftalimidas (compostos 4-11, 13-16/Tabela 5. Estes compostos são muito potentes.

As sulfonamidas (24, 26, 27, 29, 33-37, 40-44) e o éster sulfônico (27) apresentaram atividade superior a seus correspondentes compostos “parentes” (compostos 11, 13-16). O composto 34 foi aproximadamente 13 vezes mais ativo do que a aspirina, sugerindo adicional interação não covalente entre os compostos imidobenzenosulfonil e os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da PGHS. Isto implica que a interação não covalente desempenha um importante papel na determinação da atividade de 24, 29, 33-37, 40-44 que sugere que o mecanismo de inibição da PGHS, envolvendo os compostos (24, 29, 33-37, 40-44), pode ocorrer sem a formação de interação covalente no C olefínico, já que a substituição das bases nitrogenadas e/ou átomos de cloro remanescentes não ocorrem, como foi discutido previamente.

Segundo o mecanismo já proposto para este tipo de substância, ocorrem duas interações, uma não covalente com a Arg protonada e uma covalente com a Tyr. Desta forma, a distância entre as regiões participantes da primeira e da segunda interação deve apresentar um valor ideal para o encaixe adequado ao sítio receptor.

Conforme foi visto na separação obtida através da análise de PCA do conjunto 3 (Fig. 15), uma bisnaftalimida (composto 5) foi agrupada aos compostos sulfonados. A colocação destes compostos num mesmo grupo, com base em propriedades estruturais deve indicar algo a respeito do mecanismo de ação.

A questão é: quais as características responsáveis pelo afastamento da bisnaftalimida das demais maleimidas e pela proximidade com os compostos sulfonados? A posição deste composto aliado ao fato dele ser o mais potente, torna esta questão no mínimo curiosa. As características estruturais responsáveis por essa separação devem fornecer alguma informação quanto a atividade biológica.

O fato das bisnaftalimidas serem os compostos mais potentes da série estudada sugere uma relação da atividade com a distância, pois é a maior imida da série, e com o ambiente eletrônico necessário para ocorrer a inibição da enzima, devido a possibilidade de deslocalização de elétrons.

A localização do composto 5 com as sulfonamidas também deve apresentar relação com as condições de interação, pois ao comparar o composto 5 com uma sulfonamida verifica-se que a distância entre o oxigênio das carbonilas de dois anéis imídicos, na bisnaftalimida, é muito semelhante à distância entre os oxigênios da carbonila do anel imídico e o oxigênio do grupo  $\text{SO}_2$ , no composto sulfonado (Figura 48). Além disto, a presença destes grupos em cada molécula deve proporcionar efeitos eletrostáticos parecidos, produzindo um ambiente eletrônico semelhantemente favorável.

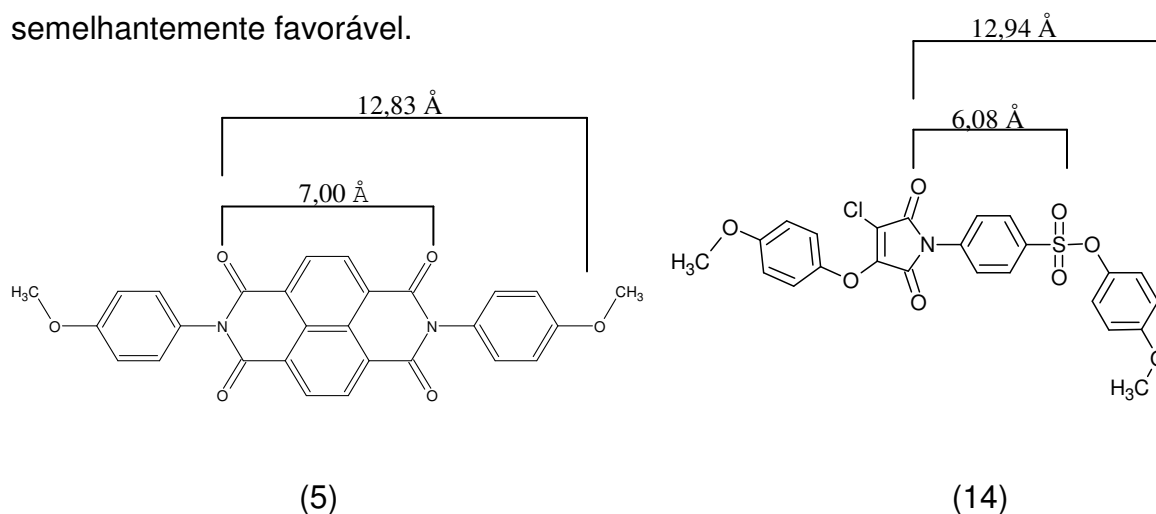


Figura 48 – Compostos (5) e (14), Tabela 1.

No estudo de QSAR-3D (Figura 29) foi visto que a atividade antinociceptiva é favorecida por substituintes que proporcionem uma densidade de carga positiva no anel imídico (a esquerda da Figura 29) e uma densidade de carga negativa na região do substituinte do anel benzênico, no lado direito da Figura 29. O mapa de contorno eletrostático indica as densidades de carga opostas a correspondente região da enzima. Portanto, é possível relacionar este mapa de contorno eletrostático com uma interação de um fragmento negativo da enzima e o anel imídico, e uma interação com um fragmento positivo da enzima e o substituinte do anel benzênico.

É interessante observar na Figura 29 que a região azul (potencial eletrostático positivo) se posiciona sobre o anel imídico e não exclusivamente sobre o C olefínico. Caso a interação ocorresse exclusivamente no carbono da dupla ligação não haveria razão do mapa de contorno eletrostático possuir uma região azul sobre todo o anel imídico. No banco de dados existem moléculas que apresentam a possibilidade de ataque nucleofílico em C olefínico e moléculas que não apresentam esta característica. As moléculas mais potentes não apresentam esta possibilidade. Portanto, na construção do modelo em questão, todas estas características foram avaliadas e evidenciadas no mapa de contorno (Figura 27 e Figura 29).

Desta forma, uma extremidade da molécula deve participar da interação não covalente e a carbonila do anel imídico do outro lado deve então participar da interação covalente.

Semelhante observação é feita ao analisar a Figura 35 gerada pela *Leapfrog*, com base no mapa de contorno do modelo 3. Nesta figura vê-se pontos azuis (região favorável para ligantes positivos) no anel imídico próximos ao anel naftálico e, na extremidade oposta (lado esquerdo) têm-se somente pontos vermelhos (região favorável para ligantes negativos).

Estas diferentes regiões favoráveis a interação foram também verificadas na Figura 36, onde o programa *Leapfrog* colore a molécula segundo regiões favoráveis ou não a interação com a enzima. Nesta figura, o composto L3, planejado segundo

o modelo 3, apresenta regiões favoráveis (cor violeta) no anel imídico à direita, assim como no anel benzênico ligado a ele. Nota-se também uma região favorável a interação no substituinte do anel benzênico à esquerda. Ou seja, nesta figura verifica-se que, apesar da molécula analisada ser simétrica, ela não é colorida igualmente, mostrando que as regiões de interação não são simétricas.

Desta forma, os compostos imídicos devem interagir com a enzima pelo ataque nucleofílico desta ao C olefínico quando possível, ou através de ataque nucleofílico a carbonila. A ligação dupla é importante para a atividade antinociceptiva, mas não é fundamental.

O mecanismo de ação já proposto sugere também uma interação não covalente com um resíduo de Arginina protonado e, segundo discussão já apresentada, esta interação desempenha um papel importante na determinação da atividade de alguns compostos, onde verificou-se o aumento da potência devido ao acréscimo do grupo  $\text{SO}_2\text{NR}$  ou  $\text{SO}_2\text{OR}$  nas moléculas.

Esta segunda interação também contribuiria para explicar a diferença de potência dos compostos 3 e 5 (Tabela 1), por exemplo. Portanto, estas moléculas maiores (naftalimidás e compostos sulfonados) devem agir através de uma primeira interação não covalente entre a Arginina protonada e o grupo  $\text{SO}_2\text{NR}$  (ou  $\text{SO}_2\text{OR}$ ) ou entre o substituinte do anel benzênico na bisnaftalimida (região marcada com um retângulo na Figura 49). Após esta interação não covalente, que deve posicionar adequadamente a molécula no sítio receptor, deve ocorrer uma interação covalente entre o resíduo de Tirosina e o anel imídico (marcado com um círculo na figura), através de ataque nucleofílico na carbonila, como no composto exemplo da Figura 50, ou no C olefínico.

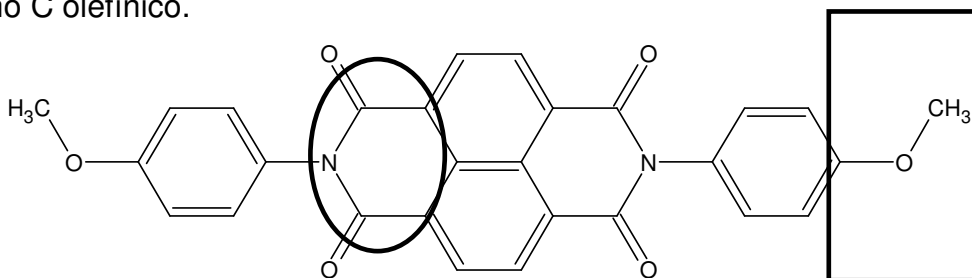


Figura 49 - Composto 5 (Tabela 1).

Porém, para obter maiores informações a respeito das interações e poder afirmar estas propostas de mecanismo de ação faz-se necessário:

- um estudo de cinética da abertura do anel imídico para avaliar a possibilidade de ataque a carbonila;
- um estudo de *docking* destes compostos no sítio receptor para verificar quais interações ocorrem entre o composto e o receptor e quais grupos constituintes da molécula participam desta interação.

## **4- Conclusão**

Neste trabalho foram sintetizados 48 imidas cíclicas e os compostos sulfonados, sendo 37 compostos inéditos. Estes compostos derivados são de fácil obtenção e purificação. Estas características da síntese são de interesse da Química Medicinal.

Todos os compostos testados quanto a atividade antinociceptiva apresentaram atividade superior ao composto controle, a Aspirina. De posse destes compostos com atividade biológica conhecida, juntamente com compostos da literatura foi possível obter um banco de dados específico de compostos imídicos para realizar um planejamento racional da síntese de futuros compostos desta classe biologicamente ativos.

As técnicas de planejamento racional não só auxiliam na obtenção de novos compostos, através de estudos de quimiometria e QSAR, como também apresentam indícios sobre o mecanismo de ação destas substâncias.

Através do modelo 3/QSAR-3D/CoMFA foi possível planejar o composto L3, Tabela 15, que apresentou  $pDI_{50}$  previsto na ordem de  $10^{-9} \mu\text{M/Kg}$ . Ele deverá ser sintetizado na continuação deste trabalho.

As imidas cíclicas e os compostos sulfonados estudados, com atividade antinociceptiva, devem interagir com a enzima PGHS, através de ataque nucleofílico ao C olefínico ou a carbonila do anel imídico. A ligação dupla é importante para a atividade analgésica, mas não é fundamental.

Uma primeira interação não covalente, segundo mecanismo já proposto por Kalgutkar e colaboradores, ocorre com a Arginina protonada. Esta interação desempenha um papel importante na determinação da atividade de compostos sulfonados, já que estes apresentam  $pDI_{50}$  superior aos compostos “parentes”.

Uma segunda interação covalente ocorre entre a Tyr e o anel imídico, no C olefínico ou na carbonila.

São necessários estudos de cinética da abertura do anel imídico e um estudo de *docking* para obter mais informações sobre a interação entre o fármaco e o receptor e poder afirmar estas propostas de mecanismo de ação.

## **5- Referências Bibliográficas**



Achari, A.; Somers, D. O.; Champness, J. N.; Bryant, P. K.; Rosemond, J.; Stammers, D. K.; *Nature Structural Biology* **1997**, V. 4, 6, 490-497.

Anand, Nitya; *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 527- 566, **1996**, Vol. 2, John Wiley & Sons, Inc.

Andricopulo, A. D.; Filho, A. W.; Corrêa, R.; Santos, A., R. S.; Nunes R. J.; Yunes, R. A.; Cechinel Filho, V., *Pharmazie* **1998**, 53, 493.

Asbury, R. F., Blessing, J. A., Soper, J. T., *Am. J. Clin. Oncol.*, **1994**, 17, 125.

Blommers, M. J. J.; Lucasius, C. B.; Kateman, G.; Kaptein, R.; *Biopolymers* **1992**, 32, 45-52.

Bock, L.; Miller, G. H.; Schaper, K.-J.; and Seydel, J. K. *J. Med. Chem* **1974**, 17, 23.

Broto, P., Moreau, G., Vandicke, *Eur. Molecular Structure:perception, autocorrelation descriptor and SAR studies*, *J. Med. Chem.*, **1984**, 19, 66-70.

Campos, F. de; Correa, R.; Souza, M. de; Yunes, R. A.; Nunes, R. J.; Cechinel-Filho, V.; *Drug Res.* **2002**, 52, 6, 455-461.

Carbo, R.; Leyda, L.; Arnau, M.; *J. Quantum Chem.* **1980**, 17, 1185.

Cava, M. P. , Deana, A. A., Muth, K., and Mitchell, M. J., *Organic Syntheses*, **1961**, 41, 93.

Cechinel Filho, V., Campos, R., Yunes, R. A., Nunes, R. J., *Química Nova*, **2003**, Vol. 25, 2,230-241.

Cechinel Filho, V.; Pinheiro, T.; Nunes, R. J.; Yunes, R. A.; Queiroz, E.; Lima, E. O.; *Química Nova* **1996-a**, 19, 590.

Cechinel Filho, V.; Vaz, Z.; Nunes, R. J.; Calixto, J. B.; Yunes, R. A.; *Pharmacol. Sci.* **1996-b**, 2, 1-3.

Cechinel Filho, V.; Vaz, Z. R.; Zunino, L.; Calixto, J. B.; Yunes, R. A.; *Arzneim. Forsch./Drug Res.* **2000**, 50, 281-285.

Collier, H. O. T.; Dinnen, L. C.; Johnson, C. A.; Schneider, C.; *Br J. Pharmacol.* **1968**, 32, 295-310

Corrêa, R.; Cechinel Filho, V.; Schlemper, V.; Rosa, P. W.; Pereira, C. I.; Nunes, R. J.; *Pharm. Sci.*; **1997**, 3, 1.

Cramer, R. D.; Pattreson; D. E.; Bunce, J. D.; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 5959-5967.

Cupon, J.– PCs para Químicos - Ed. Elsevier, Amsterdam, Vol 5, **1990**.

Dixon, S.; Blamey, J.; Weininger, D.; Present at the Third York Meeting – Characterizing and Satisfying the Steric and Chemical Restraints of Binding Sites, March **1993**, 29-30.

Dray, A.; *Br. J. Anesth.* **1995**; 75, 125-31.

Dray, A.; Bevan, S.; *Trends Pharmacol. Sci.* **1993**, 14, 287-90.

Faul, M. M.; Winnneroski, L. L.; Krumrich, C. A.; *Tet. Lett.* **1999**, 40, 1109.

Ferreira, M. M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, Vol. 13, 6, 742-753.

Foye, W. O.; Lemke, T. L.; Williams, D. A.; Principles of Medicinal Chemistry, Ed. Williams & Wilkins **1995**.

Free, S. M.; Wilson, J. W.; *J. Med. Chem.* **1964**, 7, 395.

Gilbert, E. E., Sulfonation and Related Reactions, Robert E. Kruger Publishing Co., New York, **1977**.

Good, A. C.; So, S-S; Richards, W. G, *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 433-438.

Goodsell, D. S.; Olson, A. J.; *Proteins* **1993**, 7, 195-202.

Hampele, I. C.; D'Arcy, A.; Dale, G. E.; Kostrewa, D.; Nielse, J.; Oefner, C.; Page, M. G. P.; Schonfeld, H.; Stuber, D.; and Then, R.L.; *J. Mol. Biol.* **1997**, 268, 21-30.

Hall, L. H.; and Kier, L. B.; *Reviews in Computational Chemistry*, ed. Lipkowitz, K. B. and Boyd, D. B., Chpt 9, 367, **1992**.

Hansch, C.; Fujita, T.; *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 1616.

Hansch, C.; Leo, A.; Exploring QSAR- Fundamentals and Application in Chemistry and Biology; ACS Professional reference Book, Washigton **1995**.

Hargreaves, M. K.; Pritchard, J. G.; Dave, H. R.; *Chem. Ver.* **1970**, 70, 439.

Holland, J. H.; Adaption in Natural and Artificial Systems, University of Michigan Press, Ann Arbor, MI **1975**.

Hopfinger, A. J.; Wang, S.; Tokarski, J. S.; Jin, B.; Albuquerque, M.; Madhav, P. J.; Duraiswami, C. - *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 10509-10524.

Itai, A.; Tomioka, N.; Yamada, M.; Inoue, A.; Kato, Y.; 3D-QSAR in Drug Design-Theory, Methods and Applications (Molecular Superposition for Rational Drug Design), Leiden:Escom III **1993**.

Jensen, F.; Introduction to Computational Chemistry, John Wiley & Sons, England **1999**.

Kalgutkar, A. S.; Crews, B. C.; Marnett, L. J.; *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1692-1703.

Klebe, G.; Abraham, U.; *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 70-80.

Kromer, R. T.; Hesht, P.; Liedl, K. R.; *J. Comp. Chem.* **1996**, 11, 1296-1308.

Kubinyi, H. - Methods and Principles in Medicinal Chemistry, Vol 1 (QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches) ; VCH **1993**.

Levingston, D.; Data Analysis for Chemistry(Applications to QSAR and Chemical Product Design), Oxford University Press, New York **1995**.

MacroModel v5.5, Interactive Molecular Modeling System – Department of Chemistry, Columbia University – NY/NY, 1997.

Martin, E. L.; Dickson, C. L. J.; *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 2032.

Matsuo, T., *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **1964**, 37, 1844.  
(*Chem. Abstr.*, **1965**, 62, 9940h)

Meyer, A. Y.; Richards, W. G.; *Journal of Computer Aided Molecular Design* **1991**, 5, 427-439.

Miller, A. K.; *Proc. Soc. Exp. Pathol. Med.* **1944**, 57, 151.

Moran, P. A. P.; *Biometrika* **1950**, 37, 17-23.

Nimmo-Smith, R. H.; Lascelles, J.; Woods, D. D.; *Br. J. Exp. Pathol.* **1948**, 29, 264.

Norinder, U.; Recent Progress in Comfa, Methodology and Related Techniques/3d-QSAR in Drug Design, Edited by Hugo Kubinyi, **1998**, Kluwer Academic Publishers (Great Britain).

Nunes, R. J.; *Tese de Doutorado*, The Hatfield Polytechnic, England **1986**.

Pattabiraman, N.; Levitt, M.; Ferrin, T. E.; Langridg, R., *J. Comp. Chem.* **1985**, 6, 432-436.

Payne, A. W. R.; Glen, R. C.; *J. Mol. Graph* **1993**, 11, 74.

Richey, D. P.; Brown, G. M.; *J. Biol. Chem.* **1969**, 244, 1582.

Schmidt, M. W.; Baldridge, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. J.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S.; Windus, T. L.; Duprius, M.; Montgomery, J. A.; *J. Comp. Chem.* **1993**, 14, 1347-1363.

Schuur, J.; Gasteiger, J.; *Anal. Chem.* **1997**, 83, 2398-2405.

Silverman, R. B.; Academic Press, Inc. **1993**, California.

Souza, M. M.; Kern, P.; Floriani, A. E. O.; Cechinel Filho, V.; *Phytotherapy research*; **1998**, 12(4), 279-281.

SYBYL 6.7ed, SYBYL molecular modeling software, Tripos Associates Ltd.: St Louis, **2000**.

Tand, K. R.; Hecht, P.; *J. Comput. Aided Mol. Design* **1995**, 9, 205-212.

Todeschini, R.; Gramatica, P.; *Quant. Struct.-Act. Realt.*, **1997**, 16, 113-119

Todeschini, R. and Consonni, V; *Journal of Chemical Information and Chemical Inofrmation and Computer Science* **2000**.

Topliss, J. G.; *J. Med. Chem.* **1977**, 20, 463.

Torres Suarez, A. I., Camacho, M. A., *Arzneim-Forsch*, **1994**, 44, 81.

Tsar Oxford Molecular Group, 1997.

van de Waterbeemd, Han; Advanced Computer Assisted Techniques in Drugs Discovery – Weinheim, New York; Basel, Cambridge, Tokyo: VCH **1994** (Methods and principles in medicinal chemistry, Vol3).

Vedani, A.; Briem, H.; Dobler, M.; Dolliger, H.; McMaster, D. R., *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 4416-4427.

Walter, M. E.; Mora C.; Uieara, M. ; Nunes, R. J., *22<sup>a</sup> Reunião Anual da SBQ* **1999**, Vol. 1, MD – 038.

Weisman, R. A.; Brown, G. M.; *J. Biol. Chem.* **1964**, 239, 326.

Wermuth, C. G.; The Practice of Medicinal Chemistry, Academic Press, France **1996**.