



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**LUIZ FREDERICO MOTTA**

**PLANEJAMENTO RACIONAL NO DESENVOLVIMENTO DE  
NOVOS DERIVADOS DE CHALCONA COMO AGENTES ANTI-  
*CANDIDA ALBICANS***

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.**

**ORIENTADOR: PROFA. DRA. WANDA PEREIRA ALMEIDA**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
POR LUIZ FREDERICO MOTTA, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. WANDA PEREIRA ALMEIDA.**

---

**Assinatura do Orientador**

**Campinas, 2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

|       |  |
|-------|--|
| M858p | <p>Motta, Luiz Frederico (1971-).<br/>Planejamento racional no desenvolvimento de novos derivados de chalcona como agentes anti-<i>Candida albicans</i> / Luiz Frederico Motta. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Wanda Pereira Almeida.<br/>Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p>1. Chalconas. 2. <i>Candida albicans</i>. 3. QSAR.<br/>4. Condensação de <i>Claisen-Schmidt</i>. 5. Glutathione.<br/>I. Almeida, Wanda Pereira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p> |
|-------|--|

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Rational planning in the development of new chalcone derivatives as anti-*Candida albicans*

**Palavras-chave em inglês:**

Chalcones  
*Candida albicans*  
QSAR  
*Claisen-Schmidt* condensation  
Glutathione

**Área de concentração:** Físico-Química

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:**

Wanda Pereira Almeida [Orientador]  
Marco Edilson Freire de Lima  
Sérgio Pinheiro  
Rodrigo Ramos Catharino  
Marcelo Lancellotti

**Data de defesa:** 27/01/2012

**Programa de pós-graduação:** Química



**Dedico este trabalho:**

**À MINHA AMADA  
ESPOSA, FABIANA  
MOTTA;  
E AOS MEUS  
MARAVILHOSOS FILHOS,  
FREDERICO E FERNANDO.**



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Wanda Pereira Almeida, pelo enorme apoio dado desde o início do trabalho, pelo carinho, pela compreensão e pela tolerância para com a minha pessoa. Posso afirmar que sem estes atributos, jamais teríamos prosseguido. E também é claro, pela orientação no desenvolvimento deste trabalho.

À minha amada e querida esposa, Fabiana Martins Batista Motta, a quem dedico esta tese de doutoramento, em função de tudo que já conquistamos até o presente momento e ainda conquistaremos, pela fidelidade, pelo amor, carinho e paciência durante esses dezoito anos de muita luta: “nada está perdido, sempre existe uma solução”.

Aos meus queridos filhos: Frederico Martins Motta e Fernando Martins Motta, que tanto se sacrificaram nos momentos de minha ausência. O pai promete, que a partir de agora teremos momentos maravilhosos.

Ao Prof. Dr. Fernando Coelho (UNICAMP-SP), que em 2008, época que passei por um momento muito delicado, utilizou-se da tolerância e com o dom de um excelente conselheiro soube-me “apaziguar”, além de indicar-me a orientadora adequada para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Márcia Miguel de Castro Ferreira (UNICAMP-SP) e ao Prof. Dr. Eduardo Borges de Melo (UNIOESTE-PR) pelo apoio, atenção e pelas valiosas contribuições na parte de QSAR-2D e nos processos de validação estatística. Certamente, o trabalho não iria à diante sem o auxílio prestado por estes dois docentes-pesquisadores.

Ao Prof. Dr. Anderson Coser Gaudio (UFES), que gentilmente cedeu-me o programa de sua autoria BuildQSAR versão 2.1 (2009), que foi de grande valia em minha pesquisa QSAR-2D.

A todos os membros do Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos (LAFAME), pelo apoio, companhia e amizade, e também pelos momentos de dedicação a este trabalho: Gisele, Paula, Edivânia, Gabriela, Renan e Renata, a todos vocês, muito obrigado.

Aos alunos de Iniciação Científica Leandro de Sá Bortolozzo, Amanda Franceschini e Flavio Luiz Pessanha, pela valiosa contribuição na realização e no auxílio da síntese orgânica de alguns derivados de chalcona.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial a Bel, secretária da CPG, que sempre estiveram prontos a atender às nossas necessidades. A pesquisa agradece!

Ao Instituto Federal do Triângulo Mineiro (IFTM) pelo apoio e pela liberação total remunerada, concedida nos anos de 2009 e 2010.

## CURRICULUM VITAE

### 1. Dados Pessoais

**Nome :** Luiz Frederico Motta. **Citação:** Motta, L. F.

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4756706U6>

**e-mail:** [motta@iftm.edu.br](mailto:motta@iftm.edu.br); [profmotta@gmail.com](mailto:profmotta@gmail.com)

### 2. Formação Acadêmica/Titulação

**2004: Mestrado em Química.**

Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.  
Título: Estudo Teórico das Relações Estrutura Química-Atividade Biológica de uma Série de Derivados de Chalcona (1,3-difenil-2-propen-1-ona) como Agentes Anti-*Plasmodium falciparum* (Agentes Antimaláricos). Orientador: Yuji Takahata.

**2002: Especialização:** Pós-graduação *Lato Sensu* em Química.

Faculdades Oswaldo Cruz, São Paulo - SP. Título: *Burnout*: uma epidemia na educação. Orientador: Maria Ambrosina da Costa

**2001: Graduação:** Licenciatura Plena em Química. Centro Universitário Fundação Instituto de Ensino de Osasco (UNIFIEO). Osasco - SP.

**1998: Graduação:** Ciências Farmacêuticas. Universidade São Francisco. Bragança Paulista – SP.

### 3. Atuação profissional: Docência e Pesquisa

Instituto Federal do Triângulo Mineiro (IFTM): Uberaba – MG (2008 – Atual)

### 4. Atividades Acadêmicas

## 4.1. Artigos publicados

**4.1.1** Motta, L. F., e Almeida, W.P. Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) of a Series of Ketone Derivatives as Anti-*Candida albicans*. **International Journal of Drug Discovery (IJDD): Bioinfo Publications**. 2011, 3, 100.

**4.1.2** Azevedo, L. C., Reis, M.M., Motta, L. F., Rocha, G.O., Silva, L.A., Andrade, J. B. Evaluation of the Formation and Stability of Hydroxyalkylsulfonic Acids in Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2007, 55, 8670.

**4.1.1** Motta, L. F., Gaudio, A. C.; Takahata, Y. Quantitative Structure-Activity Relationships of a Series of Chalcone derivatives (1,3-diphenyl-2-propen-1-one) as Anti-*Plasmodium falciparum* Agents (Anti malaria agents). **Internet Electronic Journal of Molecular Design**, 2006, 5, 555.

## 4.2 Trabalhos em Eventos

**4.2.1** Motta, L. F. e Almeida, W. P. Quantitative Structure-Activity Relationships of a Series of Ketone Derivatives as Anti-*Candida albicans*. In: **II International Symposium on Drug Discovery**, 2011, Araraquara – SP.

**4.2.2** Motta, L.F. e Almeida, W. P. Quantitative Structure-Activity Relationships of a Series of Chalcone Derivatives as Anti-*Candida albicans* In: **III Congresso Brasileiro de Biotecnologia**, 2010, Fortaleza - CE.

Outros trabalhos completos e resumos, consultar:

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4756706U6>

## 5. Orientações e supervisões concluídas de Iniciação Científica

**5.1.** Jucimar Gomes Venceslau, 2006.

**5.2.** Fabiana Martins Batista Motta, 2006.

**5.3.** Annielly Mayara Gomes Trindade, 2006

“Viver é enfrentar um problema atrás do outro. O modo como você o encara é que faz a diferença”.

Benjamim Franklin

"Aquilo que se faz por amor, parece ir sempre além dos limites do bem e do mal."

Friedrich Nietzsche

"O homem livre é senhor de sua vontade e somente escravo de sua própria consciência."

Aristóteles

**“Não é a consciência do homem que lhe determina o ser, mas, ao contrário, o seu ser social que lhe determina a consciência”.**

Karl Marx



O PRAZER DOS GRANDES HOMENS  
CONSISTE EM PODER TORNAR O  
PRÓXIMO MAIS FELIZ.



## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi identificar os principais descritores dos derivados análogos de chalcona com intuito de correlacionar com a atividade anti-*Candida albicans*. A incidência de infecções sistêmicas por *C. albicans* vem crescendo bastante nos últimos anos, particularmente nos casos de HIV e também em função do aumento da resistência ao arsenal terapêutico existente. Realizamos um estudo QSAR-2D, obtendo um modelo multidimensional pelo método PLS. O modelo obtido possui quatro descritores: refratividade molar, potencial de ionização, comprimento molecular e Verloop B4(A). Com apenas 3 variáveis latentes (PCs), foi capaz de acumular 96,14% da informação original, elucidando 85% da variância total e predizendo 78% da atividade biológica. O modelo proposto possui bom grau de ajuste e significância estatística ( $R^2 = 0,776$  e  $SEC = 0,229$ ). Os métodos LOO cross-validation, LNO cross-validation, Y-randomization e a validação externa indicaram que o modelo é significativo, robusto e possui elevada previsibilidade interna e externa. Levando em consideração o modelo QSAR-2D, propusemos a síntese de novos análogos de chalcona. Realizamos a síntese de 28 chalconas alvo derivadas de aldeídos aromáticos, empregando-se a condensação de Claisen-Schmidt, e avaliamos a atividade anti-*Candida albicans*. Os compostos foram caracterizados estruturalmente por métodos espectrométricos. Das 28 chalconas alvo, 18 são inéditas. Os rendimentos químicos variaram entre 53% e 98%. Com relação à avaliação da atividade antifúngica, foi realizado o teste de difusão em disco para todos os compostos, empregando o meio RPMI 1640 e seguiram-se os protocolos padrões publicados no documento M27-A2

(CLSI, 2002). As chalconas que apresentaram halo de inibição  $> 10$  mm foram consideradas ativas, e a CIM e CFM foram determinadas pelo método da microdiluição em caldo. O estudo QSAR-2D corroborou o resultado experimental observado. A chalcona mais ativa apresentou CIM =  $9 \mu\text{g/mL}$ , e no teste de citotoxicidade para células 3T3 não mostrou atividade, sugerindo toxicidade seletiva. A chalcona mais ativa apresentou um perfil *Drug Likeness* e *Drug Score* baixo em relação ao fluconazol, mas sobreviveu à Regra de Lipinski apresentando biodisponibilidade oral. O MEP,  $\text{MDE}_{\text{HOMO}}$  e  $\text{MDE}_{\text{LUMO}}$  da chalcona mais ativa revelou que o orbital HOMO é evidenciado na carbonila, que o carbono C4 possui orbital LUMO e potencial eletrostático positivo, indicando que a chalcona possui centro eletrofílico em C4 sujeito à ocorrência de ataques nucleófilos. O  $\text{MDE}_{\text{HOMO}}$  da glutathiona reduzida revelou que o orbital HOMO está no átomo de enxofre do grupo sulfidril do aminoácido cisteína. Em função da ocorrência do mecanismo de ressonância, as chalconas possuem uma estrutura química com centro eletrofílico no carbono C4, o que indica provável interação entre o orbital HOMO do átomo de enxofre da GSH e o orbital LUMO do carbono C4 da chalcona resultando em ligação covalente e na formação de conjugado glutathiona-chalcona. A diminuição na concentração de glutathiona reduzida no meio intracelular do fungo resulta em stress oxidativo celular e, portanto morte da *Candida albicans*.

## ABSTRACT

The objective of this study is to identify the main descriptors of the derivatives of chalcone analogues with the aim to correlate with the activity anti-*Candida albicans*. The incidence of systemic infection by *C. albicans* has increased greatly in recent years, particularly in cases of HIV and also due to increased resistance to existing therapeutic arsenal. We performed a study QSAR-2D, obtained a multidimensional model by PLS method. The obtained model has four descriptors: molar refractivity, ionization potential, molecular length and Verloop B4 (A). With only three latent variables (PCs), was able to earn 96.14% of the original data, explaining 85% of the total variance and predicting 78% of biological activity. The proposed model has a good degree of fit and statistical significance ( $R^2 = 0.776$  and  $SEC = 0.229$ ). The methods LOO cross-validation, LNO cross-validation, Y-randomization and external validation indicated that the model is significant, robust and has high internal and external predictability. Taking into account the model QSAR-2D, we proposed the synthesis of new analogues of chalcone. We performed the synthesis of 28 chalcones target derived from aromatic aldehydes, using the Claisen-Schmidt condensation, and evaluated the activity anti-*Candida albicans*. The compounds were characterized by spectrometric methods. Of the 28 chalcones target, 18 are new. The chemical yields ranged between 53% and 98%. Regarding the evaluation of antifungal activity, we performed the disk diffusion test for all compounds, using the RPMI 1640 and followed standard protocols published in document M27-A2 (CLSI, 2002). The chalcones that presented inhibition halo  $> 10$  mm were considered active, and

the CIM and CFM were determined by broth microdilution. The study QSAR-2D corroborated with the observed experimental result. The most active chalcone showed MIC = 9  $\mu\text{g/mL}$ , and the test of cytotoxicity to 3T3 cells had no activity, suggesting selective toxicity. The chalcone most active gave an overview *Drug Likeness* and *Drug Score* low in relation to fluconazole, but survived the Lipinski Rule of presenting oral bioavailability. The MEP,  $\text{MDE}_{\text{HOMO}}$  and  $\text{MDE}_{\text{LUMO}}$  of chalcone most active shown that the HOMO orbital is evidenced in the carbonyl, the carbon C4 has the LUMO orbital and a positive electrostatic potential, indicating that the chalcone has electrophilic center in C4 subject to the occurrence of nucleophilic attack. The  $\text{MDE}_{\text{HOMO}}$  of reduced glutathione revealed that the HOMO orbital on sulfur atom of the sulfhydryl group of the amino acid cysteine. Because the occurrence of the resonance mechanism, the chemical structure of chalcones have a carbon C4 electrophilic, indicating a probable interaction between the HOMO orbital of the sulfur atom of GSH and the LUMO orbital of the carbon C4 of chalcone resulting covalent bond and the formation of glutathione-chalcone conjugated. The decrease in the concentration of reduced glutathione in the intracellular environment of the fungus results in cellular oxidative stress and therefore the death of *Candida albicans*.

## SUMÁRIO

|   |               |
|---|---------------|
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS E CONVENÇÕES .....</b>                             | <b>xxviii</b> |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>  | <b>xxx</b>    |
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>  | <b>xxxii</b>  |
| <b>1. Introdução.....</b>   | <b>1</b>      |
| <b>1.1. Algumas características do reino Fungi.....</b>                     | <b>3</b>      |
| <b>1.2. Fungos leveduriformes e patógenos do gênero <i>Candida</i>.....</b> | <b>4</b>      |
| <b>1.3. Quimioterapia anti-<i>Candida albicans</i> .....</b>                | <b>8</b>      |
| <b>1.4. O desenvolvimento de fármacos e a indústria farmacêutica.....</b>   | <b>14</b>     |
| <b>1.5. A importância da química medicinal .....</b>                        | <b>18</b>     |
| <b>1.6. O planejamento racional de fármacos.....</b>                        | <b>20</b>     |
| <b>1.7. A relação estrutura química-atividade biológica.....</b>            | <b>23</b>     |
| <b>1.8. A química teórica computacional.....</b>                            | <b>27</b>     |
| <b>1.9. Os métodos computacionais em química biológica.....</b>             | <b>28</b>     |
| <b>2. Revisão da Literatura.....</b>  | <b>37</b>     |
| Chalconas como agentes antifúngicos.....                                    | 39            |
| <b>3. Objetivos.....</b>  | <b>45</b>     |
| <b>3.1. Geral.....</b>  | <b>47</b>     |
| <b>3.2. Específicos.....</b>  | <b>47</b>     |
| <br>  |               |
| <b>Parte A: Estudo QSAR clássico e Proposta de Síntese de Novas</b>         |               |
| <b>Chalconas.....</b>   | <b>51</b>     |
| <br>  |               |
| <b>1. Considerações gerais.....</b>   | <b>51</b>     |
| <b>2. Materiais e Métodos.....</b>  | <b>55</b>     |

|   |  |     |
|---|--|-----|
| 2.1.  | Otimização de geometria e análise conformacional.....      | 58  |
| 2.2.  | Cálculo de parâmetros físico-químicos.....                 | 65  |
| 2.2.1.  | Parâmetros hidrofóbicos.....                               | 66  |
| 2.2.2.  | Parâmetros eletrônicos.....                                | 70  |
| 2.2.3.  | Parâmetros estereoquímicos.....                            | 75  |
| 2.2.4.  | Parâmetros termodinâmicos.....                             | 79  |
| 2.2.5.  | Parâmetros dimensionais.....                               | 84  |
| 2.2.6.  | Parâmetros topológicos.....                                | 85  |
| 2.2.7.  | Parâmetros geométricos.....                                | 86  |
| 2.3.  | Análise estatística multivariada.....                      | 87  |
| 2.3.1.  | Procedimento da análise estatística multivariada.....      | 98  |
| 2.4.  | Validação estatística do modelo.....                       | 100 |
| 2.4.1.  | Procedimento da validação estatística do modelo.....       | 105 |
| 2.5.  | Proposta de síntese de derivados análogos por QSAR-2D..... | 108 |
| 3.  | <b>Resultados e Discussão</b> .....                        | 111 |
| 3.1.  | Análise química quântica QSAR.....                         | 112 |
| 3.2.  | Validação estatística do modelo QSAR-2D.....               | 126 |
| 4.  | <b>Proposta de novas chalconas</b> .....                   | 135 |
| 5.  | <b>Conclusões</b> .....                                    | 139 |
| 6.  | <b>Referências</b> .....                                   | 143 |
| <b>Parte B: Síntese das Chalconas Propostas e Ensaio Biológicos</b> ..... |  | 155 |
| 1.  | <b>Considerações Gerais</b> .....                          | 155 |
| 2.  | <b>Materiais e Métodos</b> .....                           | 161 |
| 2.1.  | Química.....   | 163 |
| 2.1.1.  | Reagentes e análises.....                                  | 163 |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 2.1.2.    | Tratamento de resíduos.....   | 164        |
| 2.2.      | Avaliação Microbiológica.....   | 162        |
| 2.2.1.    | Micro-organismos .....  | 165        |
| 2.2.2.    | Meio de cultura.....  | 165        |
| 2.2.3.    | Avaliação dos compostos.....  | 165        |
| 2.2.4.    | Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....  | 166        |
| <b>3.</b> | <b>Resultados e Discussão.....</b>  | <b>167</b> |
| 3.1.      | Síntese de Chalconas.....   | 169        |
| 3.1.1.    | A reação de Claisen-Schimdt .....   | 169        |
| 3.1.2.    | Obtenção das chalconas .....  | 172        |
| 3.1.3.    | Análise espectroscópica dos produtos.....   | 177        |
| 3.2.      | Avaliação Biológica.....  | 185        |
| 3.2.1.    | Atividade antifúngica.....  | 185        |
| 3.2.2.    | Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....  | 188        |
| <b>4.</b> | <b>Parte Experimental.....</b>  | <b>191</b> |
| 4.1.      | Procedimento geral para síntese de chalconas.....                                 | 193        |
| 4.1.1.    | Preparação da 3-(4-cloro-fenil)-1-fenil-propenona (1)....                         | 193        |
| 4.1.2.    | Preparação da 3-(4-cloro-fenil)-(3',4'-dimetoxi-fenil)-<br>propenona (2).....     | 194        |
| 4.1.3.    | Preparação da 3-(4-bromo-fenil)-(3',4'-dimetoxi-fenil)-<br>propenona (3).....     | 194        |
| 4.1.4.    | Preparação da 3-(4-nitro-fenil)-1-fenil-propenona (4)....                         | 195        |
| 4.1.5.    | Preparação da 3-(4-nitro-fenil)-(3,4-dimetoxi-fenil)-<br>propenona (5).....       | 196        |
| 4.1.6.    | Preparação da 3-(4-nitro-fenil)-(2,4,6-triisopropil-fenil)-<br>propenona (6)..... | 196        |
| 4.1.7.    | Preparação da 3-(2-fluoro-fenil)-(3',4'-dimetoxi-fenil)-                          |            |

|   |     |
|---|-----|
| propenona (7).....  | 197 |
| <b>4.1.8.</b> Preparação da 3-(2-fluoro-fenil)-(2',4',6'-trisopropil-fenil)-propenona (8).....          | 198 |
| <b>4.1.9.</b> Preparação da 3-(4-metiltio-fenil)-1-fenil-propenona (10).....                            | 198 |
| <b>4.1.10.</b> Preparação da 3-(4-metiltio-fenil)-(2',5'-dicloro-fenil)-propenona (11).....             | 199 |
| <b>4.1.11.</b> Preparação da 3-(4-metiltio-fenil)-(3',4'-dimetoxi-fenil)-propenona (12).....            | 200 |
| <b>4.1.12.</b> Preparação da 3-(3,4-metilenodioxi-fenil)-(2,4,dimetoxifenil)-propenona(13).....         | 200 |
| <b>4.1.13.</b> Preparação da 3-(3,4-metilenodioxi-fenil)-(2,4,6-triisopropil-fenil)-propenona (14)..... | 201 |
| <b>4.1.14.</b> Preparação da 3-(3,4-metilenodioxi-fenil)-(2,4-difluor-fenil)-propenona (15).....        | 202 |
| <b>4.1.15.</b> Preparação da 3-(3,4-metilenodioxi-fenil)-(2,5-dicloro-fenil)-propenona (16).....        | 202 |
| <b>4.1.16.</b> Preparação da 3-(2,3-dicloro-fenil)-(2,5-dicloro-fenil)-propenona (18).....              | 203 |
| <b>4.1.17.</b> Preparação da 3-(2,3-dicloro-fenil)-(2,4-difluor-fenil)-propenona (19).....              | 203 |
| <b>4.1.18.</b> Preparação da 3-(2,3-dicloro-fenil)-(3,4-dimetoxi-fenil)-propenona (20).....             | 204 |
| <b>4.1.19.</b> Preparação da 3-(quinolin-3-il)-1-(2,4-dicloro-fenil-2-propenona (21).....               | 205 |
| <b>4.1.20.</b> Preparação da 3-(quinolin-3-il)-1-(2,4-dimetoxi-fenil-2-propenona (22).....              | 206 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.1.21. Preparação da 3-(2-cloroquinolin-3-il)-1-fenil-propenona (23).....                | 206 |
| 4.1.22. Preparação da 3-(2-cloro-quinolin-3-il)-1-(2,difluorfenil)-propenona (24).....    | 207 |
| 4.1.23. Preparação da 3-(2-cloro-quinolin-3-il)-1-(3,4-dimetoxifenil)-propenona (25)..... | 208 |
| 4.1.24. Preparação 3-(2-cloro-quinolin-3-il)-1-(2,4-dimetoxifenil)-propenona (26).....    | 208 |
| 4.1.25. Preparação 3-(2-cloro-quinolin-3-il)-1-(2,4-dicloro-fenil)-propenona (27).....    | 209 |
| 4.1.26. Preparação da 3-(2,4-dimetoxi-fenil)-(3,4-dimetoxi-fenil)-propenona (28).....     | 210 |
| 4.2. Avaliação Microbiológica.....  | 210 |
| 4.2.1. Preparação da placa de diluição.....   | 210 |
| 4.2.2. Preparação da placa de microtitulação.....   | 211 |
| 4.2.3. Leitura dos testes de concentração inibitória mínima.....                          | 211 |
| 4.3. Avaliação da Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....                                    | 211 |
| 5. Conclusões.....  | 213 |
| 6. Referências Bibliográficas.....  | 217 |

**Parte C: Validação Externa, Avaliação *in silico* do Perfil ADME-Tox e Proposta para Mecanismo de Ação dos Compostos.....223**

|   |     |
|---|-----|
| 1. Considerações Gerais.....                                | 223 |
| 2. Materiais e Métodos.....                                 | 229 |
| 2.1. Validação externa dos compostos sintéticos ativos..... | 231 |

|   |  |            |
|---|--|------------|
| 2.2.  | Avaliação do perfil farmacocinético-toxicológico <i>in silico</i> .....                    | 234        |
| 2.3.  | Avaliação do perfil de biodisponibilidade oral.....  | 241        |
| 2.4.  | Determinação dos MEP, MDE <sub>HOMO</sub> e MDE <sub>LUMO</sub> .....                      | 244        |
| 2.5.  | Glutathione reduzida e proposta de mecanismo de ação dos compostos estudados.....          | 247        |
| <b>3.</b>   | <b>Resultados e Discussão.....</b>   | <b>251</b> |
| 3.1.  | Validação externa dos compostos sintéticos ativos .....                                    | 253        |
| 3.2.  | Avaliação do perfil farmacocinético-toxicológico <i>in silico</i> .....                    | 258        |
| 3.3.  | Avaliação do perfil de biodisponibilidade oral.....  | 263        |
| 3.4.  | Determinação dos MEP, MDE <sub>HOMO</sub> e MDE <sub>LUMO</sub> .....                      | 265        |
| 3.5.  | Glutathione reduzida e proposta de mecanismo de ação dos compostos estudados.....          | 265        |
| <b>4.</b>   | <b>Conclusões.....</b>   | <b>279</b> |
| <b>5.</b>   | <b>Referências Bibliográficas.....</b>   | <b>283</b> |
| <b>ANEXO: Espectros das Substâncias Sintetizadas.....</b> |  | <b>291</b> |
|   | Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>1</b> .....                                       | 293        |
|   | Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>1</b> .....   | 293        |
|   | Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 62,5 MHz) da Chalcona <b>1</b> ..... | 294        |
|   | Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>2</b> .....                                       | 295        |
|   | Espectro de Massas (EMAR-ESI) da Chalcona <b>2</b> .....                                   | 295        |
|   | Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>2</b> .....   | 296        |
|   | Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 62,5 MHz) da Chalcona <b>2</b> ..... | 296        |
|   | Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>3</b> .....                                       | 297        |
|   | Espectro de Massas (EMAR-ESI) da Chalcona <b>3</b> .....                                   | 297        |
|   | Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>3</b> .....   | 298        |

|   |     |
|---|-----|
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>4</b> .....  | 299 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>4</b> .....    | 299 |
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>5</b> .....  | 300 |
| Espectro de Massas (EMAR-ESI) da Chalcona <b>5</b> .....                                    | 300 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>5</b> .....    | 301 |
| Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 62,5 MHz) da Chalcona <b>5</b> .....  | 301 |
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>6</b> .....  | 302 |
| Espectro de Massas (EMAR-ESI) da Chalcona <b>6</b> .....                                    | 302 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H da Chalcona <b>6</b> .....                                  | 303 |
| Espectro de RMN- <sup>13</sup> C da Chalcona <b>6</b> .....                                 | 303 |
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>7</b> .....  | 304 |
| Espectro de Massas (EMAR-ESI) da Chalcona <b>7</b> .....                                    | 304 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>7</b> .....    | 305 |
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>8</b> .....  | 306 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>8</b> .....    | 306 |
| Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 62,5 MHz) da Chalcona <b>8</b> .....  | 307 |
| Espectro de RMN- <sup>13</sup> C –DEPT 90 da Chalcona <b>8</b> .....                        | 307 |
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>10</b> .....                                       | 308 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>10</b> .....   | 308 |
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>11</b> .....                                       | 309 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>11</b> .....   | 309 |
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>12</b> .....                                       | 310 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>12</b> .....   | 310 |
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>13</b> .....                                       | 311 |
| Espectro de Massas (EMAR-ESI) da Chalcona <b>13</b> .....                                   | 311 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>13</b> .....   | 312 |
| Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 62,5 MHz) da Chalcona <b>13</b> ..... | 312 |

|   |     |
|---|-----|
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>14</b> .....                                       | 313 |
| Espectro de Massas (EMAR-ESI) da Chalcona <b>14</b> .....                                   | 313 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>14</b> .....   | 314 |
| Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 62,5 MHz) da Chalcona <b>14</b> ..... | 314 |
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>15</b> .....                                       | 315 |
| Espectro de Massas da Chalcona (EMAR-ESI) <b>15</b> .....                                   | 315 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>15</b> .....   | 316 |
| Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 62,5 MHz) da Chalcona <b>15</b> ..... | 316 |
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>16</b> .....                                       | 317 |
| Espectro de Massas (EMAR-ESI) da Chalcona <b>16</b> .....                                   | 317 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>16</b> .....   | 318 |
| Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 62,5 MHz) da Chalcona <b>16</b> ..... | 318 |
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>18</b> .....                                       | 319 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>18</b> .....   | 319 |
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>19</b> .....                                       | 320 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>19</b> .....   | 320 |
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>20</b> .....                                       | 321 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>20</b> .....   | 321 |
| Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 62,5 MHz) da Chalcona <b>20</b> ..... | 322 |
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>21</b> .....                                       | 323 |
| Espectro de Massas (EMAR-ESI) da Chalcona <b>21</b> .....                                   | 323 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>21</b> .....   | 324 |
| Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 62,5 MHz) da Chalcona <b>21</b> ..... | 324 |
| Espectro de RMN- <sup>13</sup> C-DEPT 90 da Chalcona <b>21</b> .....                        | 325 |
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>22</b> .....                                       | 326 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>22</b> .....   | 326 |
| Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 62,5 MHz) da Chalcona <b>22</b> ..... | 327 |

|   |     |
|---|-----|
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>23</b> .....                                       | 328 |
| Espectro de Massas (EMAR-ESI) da Chalcona <b>23</b> .....                                   | 328 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>23</b> .....   | 329 |
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>24</b> .....                                       | 330 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>24</b> .....   | 330 |
| Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 62,5 MHz) da Chalcona <b>24</b> ..... | 331 |
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>25</b> .....                                       | 332 |
| Espectro de Massas (EMAR-ESI) da Chalcona <b>25</b> .....                                   | 332 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>25</b> .....   | 333 |
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>26</b> .....                                       | 334 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>26</b> .....   | 334 |
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>27</b> .....                                       | 335 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>27</b> .....   | 335 |
| Espectro no Infravermelho da Chalcona <b>28</b> .....                                       | 336 |
| Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 250 MHz) da Chalcona <b>28</b> .....   | 336 |
| Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 62,5 MHz) da Chalcona <b>28</b> ..... | 337 |

## Lista de Abreviaturas e Convenções

ADME: Absorção, distribuição, metabolismo e excreção

B3LYP: Beck, Lee, Yang e Parr

CADD: Planejamento de fármacos auxiliado por computador (Computer-assisted drug design)

CNDO: Negligência completa da diferencial de sobreposição Complete (Neglect Differential Overlap)

DFT: Teoria do funcional de densidade (Density functional theory)

EMAR-ESI: Espectrometria de massas de alta resolução-ionização por eletron spray

GSH: Glutathiona reduzida

GST: Glutathiona transferase

HOMO: Orbital molecular ocupado de maior energia (Highest occupied molecular orbital)

HTS: *Screening* de alta eficiência (High-throughput screening)

LBDD: Planejamento baseado na estrutura do ligante (Ligan-based drug design)

LNO: validação leave-N-out

LOO: validação leave-one-out

LUMO: Orbital molecular desocupado de menor energia (lowest unoccupied molecular orbital)

MDE: Mapa de densidade eletrônica

MIC: Menor concentração inibitória (minimum inhibitory concentration)

MM: Mecânica molecular

MMPP: Programa Molecular Modeling Pro Plus

MMQ: Método dos mínimos quadrados

MOPS: ácido morfilenopropanosulfônico

MQ: Mecânica quântica

NDDO: Negligência da diferencial de sobreposição atômica (Neglect of diatomic differential overlap)

PES: Energia potencial de superfície

PLS: Mínimos quadrados parciais

QSAR: Relação quantitativa entre a estrutura química e atividade biológica (Quantitative structure-activity relationships)

RMN: Ressonância magnética nuclear

ROS: Espécies reativas de oxigênio (Reactive oxygen species)

RPMI: meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

SAR: Relação entre a estrutura química e a atividade biológica (Structure-activity relationships)

SBDD: Planejamento baseado na estrutura do biorreceptor (Structure-based drug design)

SEC: Erro de calibração padrão (Standard error of calibration)

SEP: Erro padrão da predição externa (Standard error prediction)

## LISTA DE TABELAS

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 1:</b> Distribuição das espécies de <i>Candida</i> isolada do BSI.....  | 6   |
| <b>Tabela 2:</b> O crescimento das vendas de medicamentos em alguns países.....   | 17  |
| <b>Tabela 1A:</b> Série de treinamento utilizada no estudo QSAR <i>clássico</i> .....   | 58  |
| <b>Tabela 2A:</b> Propriedades moleculares calculadas.....  | 65  |
| <b>Tabela 3A:</b> Parâmetros estatísticos analisados.....   | 108 |
| <b>Tabela 4A:</b> Valores dos descritores utilizados na construção do modelo<br>QSAR clássico, validação cruzada <i>Leave-One-Out</i> e resíduos..... | 114 |
| <b>Tabela 5A:</b> Valores dos descritores das chalconas da série externa.....   | 131 |
| <b>Tabela 6A:</b> Valores preditos da atividade biológica para as chalconas da série<br>externa e parâmetros estatísticos.....                        | 131 |
| <b>Tabela 1B:</b> Rendimento químico das chalconas <b>1-28</b> obtidas.....   | 172 |
| <b>Tabela 2B:</b> Energia de LUMO e carga de Mülliken para aldeídos<br>quinolínicos.....  | 176 |
| <b>Tabela 3B:</b> Deslocamentos dos prótons H4 e H $\beta$ das chalconas<br>quinolínicas.....   | 183 |
| <b>Tabela 4B:</b> Atividade antifúngica das chalconas estudadas frente à <i>Candida<br/>albicans</i> .....  | 187 |
| <b>Tabela 5B:</b> Taxa de sobrevivência da linhagem 3T3 na presença da Chalcona<br><b>26</b> .....  | 188 |
| <b>Tabela 1C:</b> Fatores primários relacionados ao abandono de compostos em<br>desenvolvimento.....  | 235 |
| <b>Tabela 2C:</b> Valores dos descritores dos análogos sintetizados (série<br>externa).....   | 253 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 3C:</b> Valores preditos da atividade biológica para as chalconas<br>(série externa) e parâmetros estatísticos.....  | 254 |
| <b>Tabela 4C:</b> Valores dos descritores das chalconas selecionadas<br>(série externa).....   | 256 |
| <b>Tabela 5C:</b> Valores preditos da atividade biológica para chalconas<br>selecionadas (série externa) e parâmetros estatísticos.....                              | 257 |
| <b>Tabela 6C:</b> Valores dos perfis <i>Drug Likeness</i> e <i>Drug Score</i> para as chalconas<br>mais ativas, para a chalcona proposta e para o<br>fluconazol..... | 261 |
| <b>Tabela 7C:</b> Risco de toxicidade para as chalconas mais ativas, para a<br>chalcona proposta e para o fluconazol.....  | 262 |
| <b>Tabela 8C:</b> Aplicação da Regra de Lipinski às chalconas mais ativas, à<br>chalcona proposta e ao fluconazol.....   | 264 |

]

## LISTA DE FIGURAS

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 1:</b> Aspecto macroscópico de levedura e de fungo filamentosos.....  | 4   |
| <b>Figura 2:</b> Forma pseudo-hifal de <i>C. albicans</i> invadindo tecido profundo.....  | 7   |
| <b>Figura 3:</b> Principais locais de ação dos agentes anti - <i>Candida albicans</i> .....   | 9   |
| <b>Figura 4:</b> Estruturas do cetoconazol e do fluconazol.....   | 9   |
| <b>Figura 5:</b> Biossíntese do ergosterol e locais de ação de antifúngicos.....  | 10  |
| <b>Figura 6:</b> Estrutura química de um polieno: a anfotericina B.....   | 11  |
| <b>Figura 7:</b> Estrutura química de um antimetabólito: a 5- fluorocitosina.....   | 12  |
| <b>Figura 8:</b> Mecanismo de ação da 5-fluorocitosina.....   | 12  |
| <b>Figura 9:</b> Estrutura química de uma caspofungina: equinocandina.....  | 14  |
| <b>Figura 10:</b> Fases de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.....  | 16  |
| <b>Figura 11:</b> Etapas envolvidas no planejamento racional de fármacos.....   | 21  |
| <b>Figura 12:</b> Estrutura de um fármaco: farmacóforo e grupos vetores.....  | 24  |
| <b>Figura 13:</b> Esquema geral da condensação de Claisen-Schmidt.....  | 39  |
| <b>Figura 14:</b> Estrutura química da chalcona com maior atividade antifúngica<br>(LÓPEZ <i>et al</i> , 2001).....                 | 40  |
| <b>Figura 15:</b> Chalconas hidroxiladas com atividade antifúngica.....   | 41  |
| <b>Figura 1A:</b> Esqueleto básico de uma chalcona.....   | 57  |
| <b>Figura 2A:</b> Diagrama de energia potencial x variação conformacional.....  | 61  |
| <b>Figura 3A:</b> Efeitos da interação entre ligantes e bioreceptores.....  | 69  |
| <b>Figura 4A:</b> Interações ligante-bioreceptor e energias livres de Gibbs.....  | 72  |
| <b>Figura 5A:</b> Diferença entre agonista, agonista parcial e antagonista.....   | 74  |
| <b>Figura 6A:</b> Parâmetros estereoquímicos de Verloop.....  | 77  |
| <b>Figura 7A:</b> Seleção da conformação bioativa do ligante (A) e de indução da<br>mudança conformacional do biorreceptor (B)..... | 82  |
| <b>Figura 8A:</b> Chalconas da série externa e validação do estudo QSAR.....  | 107 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 9A:</b> Modelo de regressão para a série de treinamento.....   | 116 |
| <b>Figura 10A:</b> Diagrama de <i>Scores</i> (PC1 X PC2) para 20 chalconas.....  | 116 |
| <b>Figura 11A:</b> Diagrama PC1 x PC2 com os descritores utilizados no modelo<br>PLS para as chalconas ativas.....   | 117 |
| <b>Figura 12A:</b> Diagrama dos coeficientes de regressão dos descritores<br>utilizados no modelo PLS. ....  | 118 |
| <b>Figura 13A:</b> Diagrama do poder de relevância dos descritores utilizados no<br>modelo PLS (escala de 0 a 10).....   | 119 |
| <b>Figura 14A:</b> Mapas de potencial eletrostático das chalconas <b>1</b> e <b>13</b> .....   | 123 |
| <b>Figura 15A:</b> Mapa de densidade eletrônica do orbital HOMO das chalconas <b>1</b><br>e <b>13</b> .....  | 124 |
| <b>Figura 16A:</b> Mapa de densidade eletrônica do LUMO do composto <b>13</b> .....  | 125 |
| <b>Figura 17A:</b> Diagrama da análise LNO cross-validation.....   | 128 |
| <b>Figura 18A:</b> Diagrama do teste <i>Y-randomization</i> .....  | 129 |
| <b>Figura 19A:</b> Diagramas de regressão linear entre: a) valores observados x<br>valores preditos; b) valores preditos x observados para os compostos da<br>série externa..... | 132 |
| <b>Figura 20A:</b> Mapa de potencial eletrostático da chalcona <b>9B</b> .....   | 133 |
| <b>Figura 21A:</b> Mapa de densidade eletrônica de HOMO do composto <b>9B</b> .....  | 134 |
| <b>Figura 22A:</b> Mapa de densidade eletrônica de LUMO do composto <b>9B</b> .....  | 134 |
| <b>Figura 23A:</b> Chalconas propostas para síntese e avaliação.....   | 137 |
| <b>Figura 1B:</b> Núcleo da chalcona (1,3-difenil)-2-propen-1-ona).....  | 158 |
| <b>Figura 2B:</b> Chalconas-alvo deste estudo.....   | 159 |
| <b>Figura 3B:</b> Esquema geral da reação de Claisen-Schmidt.....  | 169 |
| <b>Figura 4B:</b> Aspecto típico de uma reação de preparação de chalconas.....   | 170 |
| <b>Figura 5B:</b> Mecanismos para a reação de Claisen-Schmidt.....   | 171 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 6B:</b> Espectro no IV do produto obtido na tentativa de preparação da chalcona <b>9</b> .....   | 175 |
| <b>Figura 7B:</b> Representação do procedimento de isolamento por filtração.....   | 175 |
| <b>Figura 8B:</b> Estruturas de ressonância do sistema conjugado.....  | 177 |
| <b>Figura 9B:</b> Espectro no IV com as absorções típicas de chalconas.....  | 179 |
| <b>Figura 10B:</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H da chalcona <b>13</b> .....   | 180 |
| <b>Figura 11B:</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H da chalcona <b>6</b> .....  | 182 |
| <b>Figura 12B:</b> Estrutura de chalconas quinolínicas.....  | 182 |
| <b>Figura 13B:</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C da chalcona <b>24</b> .....  | 186 |
| <b>Figura 14B:</b> Chalconas selecionadas para teste antimicrobiano.....   | 186 |
| <b>Figura 15B:</b> Sobrevivência das células 3T3 na presença da chalcona <b>26</b> .....   | 189 |
| <b>Figura 1C:</b> Estrutura das chalconas sintéticas ativas da série externa.....  | 234 |
| <b>Figura 2C:</b> Distribuição do perfil Drug-Likeness para os fármacos comerciais e substâncias do catálogo Fluka® .....  | 238 |
| <b>Figura 3C:</b> Plataforma do programa OSIRIS Property Explorer® e os parâmetros da chalcona <b>26</b> .....   | 239 |
| <b>Figura 4C:</b> Escala do perfil <i>Drug-Score</i> da chalcona <b>26</b> .....   | 240 |
| <b>Figura 5C:</b> Diagrama de regressão linear a) valores observados <i>x</i> preditos; b) valores preditos <i>x</i> observados para as chalconas de validação externas ( <b>4, 10, 11, 14, 24, 26 e 27</b> )..... | 255 |
| <b>Figura 6C:</b> Diagramas de regressão linear: a) valores observados <i>x</i> preditos; b) valores preditos <i>x</i> observados para as chalconas da validação externa ( <b>10, 11, 21, 26 e 27</b> ).....       | 258 |
| <b>Figura 7C:</b> Diagrama do perfil <i>Drug Likeness</i> e <i>Drug Score</i> da chalcona <b>26</b> .....  | 260 |
| <b>Figura 8C:</b> Representações bi e tridimensionais da chalcona proposta.....  | 260 |
| <b>Figura 9C:</b> Plataforma do programa Osiris Property Explorer® com os  |     |

|   |     |
|---|-----|
| parâmetros determinados para a chalcona proposta.....   | 262 |
| <b>Figura 10C:</b> Mapa de potencial eletrostático da chalcona <b>26</b> .....  | 266 |
| <b>Figura 11C:</b> Mapa de densidade eletrônica do HOMO da chalcona <b>26</b> .....   | 267 |
| <b>Figura 12C:</b> Mapa de densidade eletrônica do LUMO da chalcona <b>26</b> .....   | 267 |
| <b>Figura 13C:</b> Estrutura da chalcona <b>26</b> e seus sítios aceptores de H.....  | 268 |
| <b>Figura 14C:</b> Estrutura otimizada da GSH.....  | 269 |
| <b>Figura 15C:</b> Mapa de densidade eletrônica do orbital HOMO da GSH na<br>forma carregada.....   | 270 |
| <b>Figura 16C:</b> Mapa de Potencial Eletrostático da GSH (esquerda) e Mapa de<br>Densidade Eletrônica do HOMO somado a este (direita)..... | 271 |
| <b>Figura 17C:</b> Estrutura química do conjugado glutationa-chalcona.....  | 271 |
| <b>Figura 18C:</b> Estruturas de ressonância da chalcona e sua interação com um<br>nucleófilo.....  | 272 |
| <b>Figura 19C:</b> Estrutura otimizada do conjugado GSH-Chalcona <b>26</b> .....  | 275 |
| <b>Figura 20C:</b> Estrutura do conjugado GSH -Chalcona <b>26</b> e porções terminais<br>carregadas.....                                    | 275 |



# **1. Introdução**



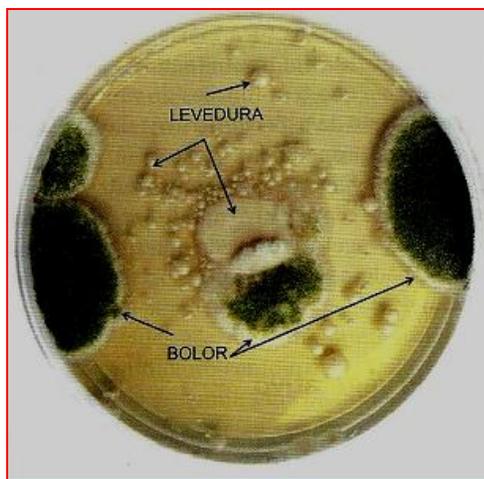
## 1.1 Algumas Características do Reino Fungi

Durante anos, os fungos foram considerados vegetais e somente em 1969, que Robert Whittaker criou o Reino Fungi, classificando os seres vivos em cinco Reinos: Monera, Fungi, Protista, Plantae e Animalia (ZAITZ *et al*, 2010) e (JORGE, 2010).

Os fungos foram classificados em um Reino a parte, pois diferem dos seres vivos dos demais Reinos em função de apresentarem características próprias. Em relação aos vegetais, não apresentam pigmento fotossintético, não possuem celulose na parede celular, não apresentam capacidade para armazenar amido e não formam tecidos verdadeiros. Em relação às bactérias, diferem quanto ao processo reprodutivo, apresentam características de crescimento sob a forma de brotamento e hifas, possuem atividade metabólica menos diversificada e apresentam composição e ultraestrutura da parede celular diferenciada. Em relação aos demais seres vivos, possuem estrutura somática representada por hifas e dicariofase prolongada (JORGE, 2010) e (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006). Diferentemente dos vegetais, obtém energia por intermédio da absorção de nutrientes (nutrição heterotrófica). Semelhantemente ao Reino Animalia, armazenam glicogênio e apresentam quitina na parede celular (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2004), (ZAITZ *et al*, 2010) e (JORGE, 2010).

Macroscopicamente, os fungos apresentam capacidade de formação de colônias em meios de cultivo [Figura 1]. Geralmente as colônias leveduriformes, possuem aspecto pastoso ou cremoso e com várias cores dependendo da espécie, enquanto as colônias filamentosas são aveludadas,

algodonosas, pulverulentas e com diversos tipos de pigmentação (ZAITZ *et al*, 2010).



**Figura 1:** Aspecto macroscópico de levedura e de fungo filamentosos.<sup>1</sup>

## 1.2 Fungos Leveduriformes e Patógenos do Gênero *Candida*

As leveduras são fungos unicelulares que reproduzem assexuadamente por brotamento unilateral podendo originar mais de 24 células por intermédio deste processo reprodutivo (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005). Apesar de existirem três tipos de doenças humanas relacionadas aos fungos, alérgicas, tóxicas e infecciosas, as doenças fúngicas mais encontradas no homem são as infecciosas. As micoses infecciosas são classificadas em função do tipo de tecido comprometido no hospedeiro (ZAITZ *et al*, 2010). Portanto, as micoses humanas podem ser classificadas em: superficiais, cutâneas, subcutâneas, sistêmicas e oportunistas.

As leveduras do gênero *Candida* são micro-organismos comensais comumente encontrados nas mucosas bucais, vaginais e do trato gastrointestinal, que podem se transformar da forma comensal em forma

---

<sup>1</sup>(ZAITZ *et al*, 2010)

patogênica, resultando a candidíase ou candidose (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006).

A espécie de maior relevância médica é a *Candida albicans*, seguida de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Outras espécies como, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. rugosa*, *C. Catenulata* e *C. Kefyr* também são isoladas (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006) e (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

*Candida albicans* é o patógeno isolado de maior frequência em material clínico e responde em geral, por 90%-100% dos isolados mucosos e por 50%-70% dos isolados sanguíneos (BSI, do inglês *blood stream infection*). Atualmente, o gênero *Candida* representa a quarta causa mais comum de infecções sanguíneas nosocomiais (adquiridas no hospital) (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006). Entre 1980 e 2003, a frequência de BSI por *Candida* aumentou consideravelmente nos hospitais em todas as faixas etárias [Tabela 1] (PFALLER e DIEKEMA, 2004). Aproximadamente 95% dos isolamentos de candidíases sanguíneas são causadas pelas quatro espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, sendo que a *C. albicans* é a espécie mais frequentemente isolada (PFALLER e DIEKEMA, 2004).

*C. albicans* é, dentre os fungos oportunistas, o de maior incidência. (ZAITZ *et al*, 2010). As infecções causadas por *C. albicans* emergiram como uma das principais causas de morte em pacientes com imunodeficiência (portadores da AIDS e indivíduos submetidos a algum tipo de quimioterapia). Pode ser perigoso para pacientes com saúde debilitante, como por exemplo, pacientes que estão em unidade de tratamento intensivo (UTI). Portanto, *C. albicans* tem despertado grande interesse das pesquisas na área de saúde (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

A patogenicidade de *C. albicans* não pode ser atribuída apenas a um fator isolado. Alguns fatores entre os quais: 1) Estrutura de sua superfície celular, parâmetro determinante para eficiente adesão celular e penetração quando em contato com as células do hospedeiro; 2) Alterações fenotípicas: transição entre a forma típica de levedura (branca e circular) à forma opaca com formato de pequenos bastões (pseudo-hifal); 3) Produção de enzimas extracelulares hidrolíticas. A combinação concomitante dos fatores mencionados faz com que o micro-organismo se transforme num tipo de célula adaptada à invasão dos tecidos de um hospedeiro imunocomprometido (JORGE, 2010).

**Tabela 1:** Distribuição das espécies de *Candida* isolada do BSI\*

| Espécie                  | % de isolados por ano (pacientes testados) |               |               |               |                |                |
|--------------------------|--|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
|                          | 1992<br>(235)                              | 1995<br>(332) | 1997<br>(413) | 1999<br>(320) | 2001<br>(2770) | 2003<br>(1715) |
| <i>C. albicans</i>       | 44,3                                       | 53,3          | 54,0          | 54,7          | 59,8           | 65,1           |
| <i>C. glabrata</i>       | 16,6                                       | 20,5          | 15,3          | 15,3          | 16,4           | 14,2           |
| <i>C. parapsilosis</i>   | 21,7                                       | 9,0           | 18,9          | 10,3          | 10,7           | 9,3            |
| <i>C. tropicalis</i>     | 11,9                                       | 11,4          | 7,0           | 11,9          | 7,9            | 6,9            |
| <i>C. krusei</i>         | 2,6  | 4,2           | 1,7           | 2,8           | 2,7            | 2,7            |
| <i>C. lusitaniae</i>     | 2,1  | 0,6           | 0,0           | 2,2           | 1,3            | 0,4            |
| <i>C. guilliermondii</i> | 0,4  | 0,4           | 1,9           | 0,9           | 0,6            | 0,3            |

\*adaptado de (PFALLER e DIEKEMA, 2004)

*C. albicans* resistente possui maior capacidade de multiplicação e na presença de líquidos (soro de mamíferos) que induzem à sua patogenicidade, expressa os seus fatores de virulência, tal como a formação de pseudo-hifas. Estas capacitam as células para exercerem força mecânica, ajudando-as no mecanismo de penetração nas superfícies epiteliais, e uma vez na corrente sanguínea possui ação danosa sobre o endotélio, o que permite a invasão de tecidos profundos do organismo hospedeiro (fígado, pulmão, baço, coração, cérebro e pâncreas) [Figura 2] (PÉMAN, CANTÓN e VALENTIN, 2008).



**Figura 2:** Forma pseudo-hifal de *Candida albicans* invadindo tecido profundo.

Pesquisas revelam que mais de 90% de indivíduos HIV+ sofrem de candidíase de mucosas ao menos uma vez ao decorrer da doença. A severidade e a cronicidade da candidíase oral em pacientes com AIDS são atribuídas principalmente à imunodeficiência de células T auxiliar e redução de linfócitos T CD4 (SIDRIM e MOREIRA, 1999) e (HOLMBERG e MEYER, 1986).

O mecanismo de adesão do fungo representa a etapa inicial da infecção. A adesão celular pode ocorrer em tecidos ou na superfície de materiais como as próteses (biofilmes). As espécies de *C. albicans* aderem a uma variedade de superfícies por intermédio de interações ligante-receptor específicas. Os organismos de *Candida albicans* resistentes invadem as superfícies teciduais com mais facilidade, resultando infecção sistêmica (GOLAN *et al*, 2009).

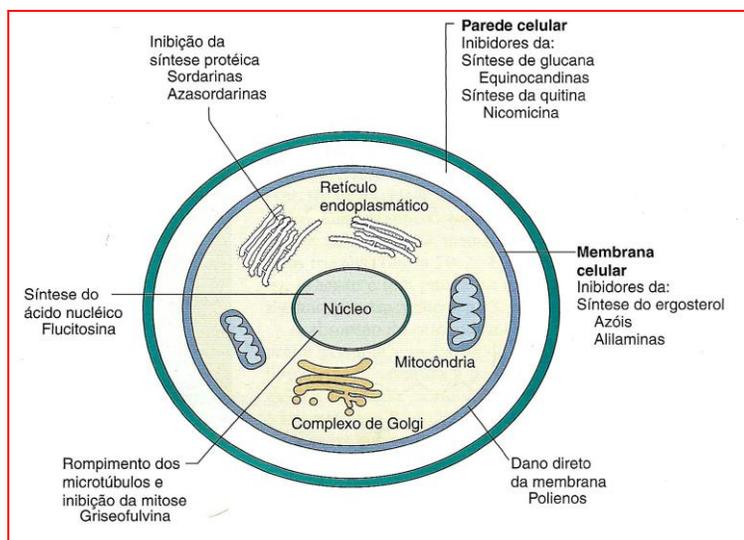
Alguns estudos demonstraram que *Candida albicans* secreta diversas enzimas extracelulares (proteínases, lipases e fosfolipases) (KOTHAVADE e PANTHAKI, 1998), (SHIMIZU, 1989), (RUCHEL, TEGELER e TROST, 1982), (CHAKRABARTI, NAVAK e TALWAR, 1991) e (BORG e RÜCHEL, 1988). Estas enzimas hidrolíticas provocam danos às células do hospedeiro, como exemplo, a fosfolipase é uma enzima que degrada fosfolipídios, freqüentemente associados às membranas celulares.

A candidíase ocorre em todas as partes do globo, com diversas variações clínicas. As manifestações clínicas variam de acordo com o local da infecção. Segundo Armstrong (1995), as candidíases são classificadas em duas categorias: candidíase não hematogênica (superficial e profunda) e candidíase hematogênica disseminada.

### **1.3 Quimioterapia anti-*Candida albicans***

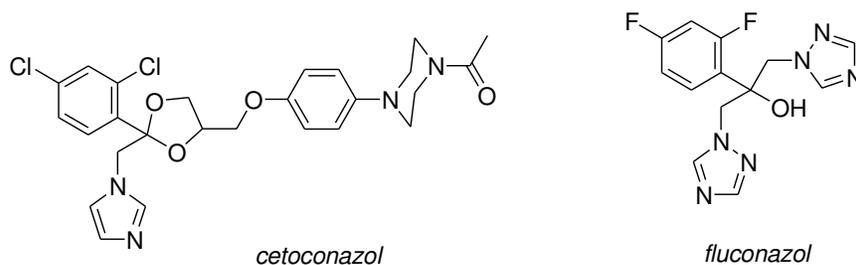
A terapia antifúngica está passando por profundas transformações nos últimos anos. No passado os agentes anfotericina B e 5-fluorocitosina, mesmo apresentando toxicidade, mantiveram domínio único por muitos anos. Atualmente, com o avanço na disponibilidade de novos agentes antifúngicos ativos e também a possibilidade de se ter novas formulações das drogas antigas, evidencia-se mudanças em prol de uma quimioterapia mais eficaz e com menor toxicidade. A quimioterapia anti-*Candida albicans* é classificada em função do local de ação do fármaco.

A [Figura 3] ilustra de forma esquemática os principais locais de ação dos antifúngicos que atuam contra *C. albicans*.



**Figura 3:** Principais locais de ação dos agentes anti - *C. albicans*<sup>2</sup>

As principais categorias de agentes antifúngicos contra *C. albicans* são: imidazóis, triazóis, alilaminas, polienos, antimetabólitos e equinocandinas. Os imidazóis, triazóis e alilaminas atuam como inibidores da síntese de ergosterol da membrana plasmática do fungo. A [Figura 4] representa as estruturas de dois agentes antifúngicos: um imidazol (cetoconazol) e de um triazol (fluconazol).

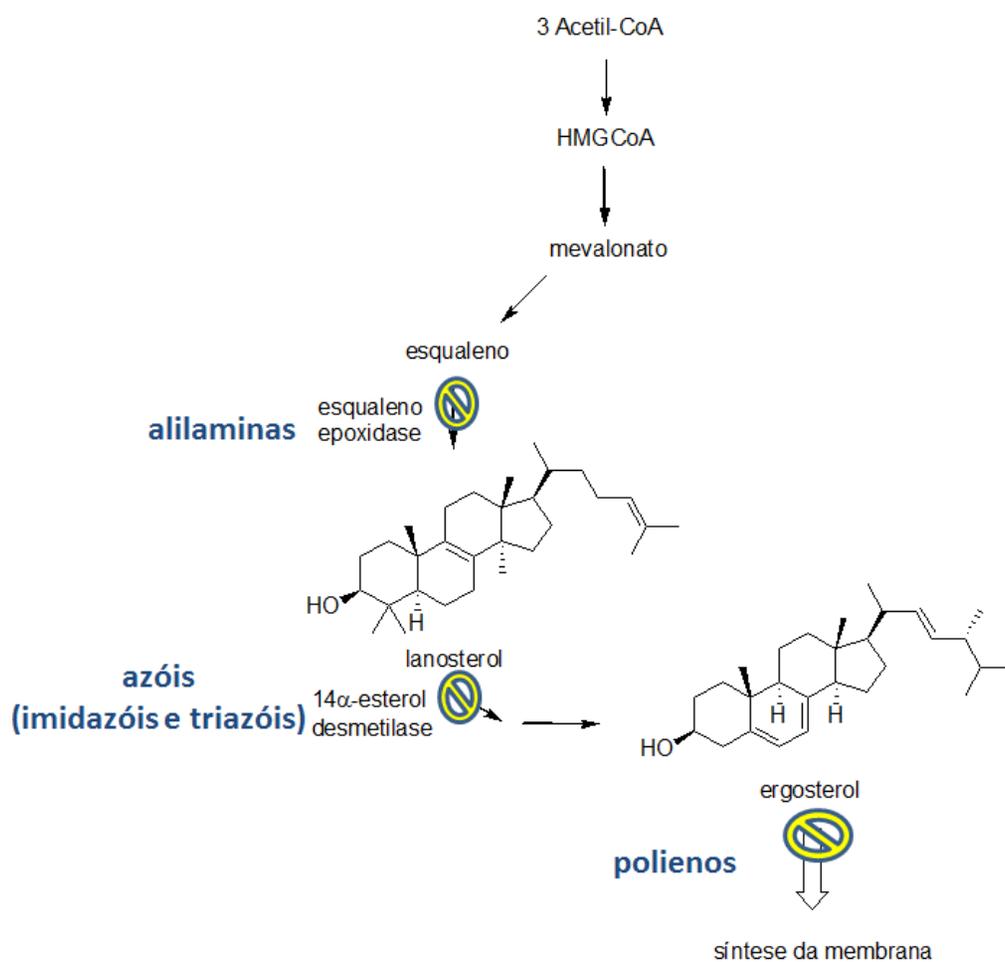


**Figura 4:** Estruturas do cetoconazol e do fluconazol

O fluconazol, como os demais triazóis, apresentam o mesmo mecanismo de ação dos imidazóis, porém a interação é mais específica com o alvo.

<sup>2</sup> (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006).

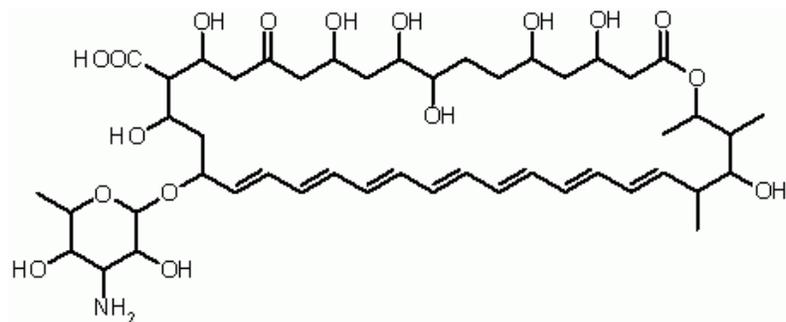
Geralmente, os imidazóis podem ser administrados por via oral ou uso tópico, enquanto os triazóis por via oral ou intravenosa (RANG *et al*, 2004), (KATZUNG, 2010), (GOLAN *et al*, 2009) e (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006). As alilaminas (terbinafina e naftifina) atuam inibindo a enzima esqualeno epoxidase e apresentam espectro amplo. Percebe-se que os imidazóis, os triazóis e as alilaminas apresentam mecanismo de ação na via metabólica da síntese de ergosterol do fungo [Figura 5].



**Figura 5:** Biossíntese do ergosterol e locais de ação de antifúngicos.

Os polienos, como a anfotericina B [Figura 6] e a nistatina, interagem diretamente com o ergosterol promovendo dano oxidativo direto na membrana do fungo. A anfotericina B também possui amplo espectro, sendo mais

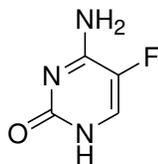
utilizada nas infecções invasivas, mas apresenta elevada nefrotoxicidade. Objetivando reduzir a nefrotoxicidade da anfotericina B costuma-se utilizar formulações lipossômicas do fármaco. A anfotericina B é administrada por via intravenosa ou tópica, mas a formulação lipossômica possui custo elevado (RANG *et al*, 2004), (KATZUNG, 2010), (GOLAN *et al*, 2009) e (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2006).



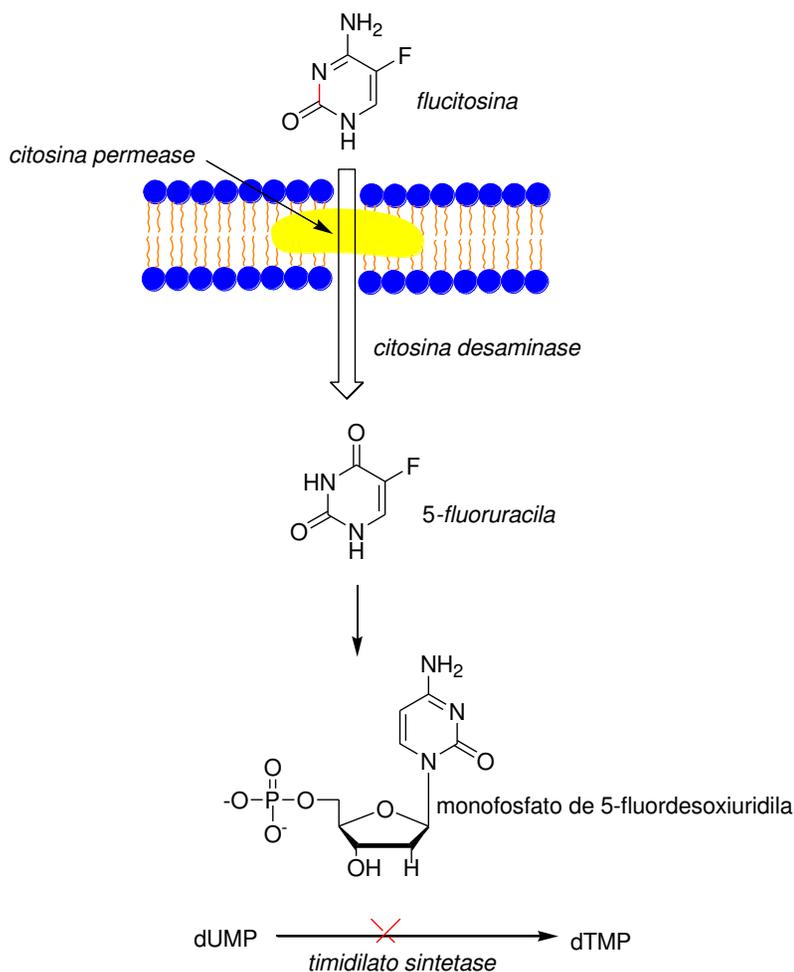
**Figura 6:** Estrutura química de um polieno: a anfotericina B<sup>3</sup>

A 5-fluorocitosina ou flucitosina [Figura 7], o antimetabólito antifúngico, penetra na célula fúngica via enzima transmembrana citosina permease. No interior da célula a citosina desaminase converte a 5-fluorocitosina em 5-fluoruracila (5-FU), que é subsequentemente convertido em ácido monofosfato 5-fluordesoxiuridilico (5-FdUMP). O composto 5-FdUMP inibe a enzima timidilato sintase e então bloqueia a síntese de DNA e produção de proteínas [Figura 8]. É administrado por via oral e geralmente em combinação com a anfotericina B ou fluconazol devido à ocorrência de resistência secundária. A 5-fluorocitosina possui hepatotoxicidade e intolerância gastrointestinal (RANG *et al*, 2004), (KATZUNG, 2010) e (GOLAN *et al*, 2009).

<sup>3</sup> <http://www.zct-berlin.de/struktur/>



**Figura 7:** Estrutura química de um antimetabólito: a 5-fluorocitosina



**Figura 8:** Mecanismo de ação da 5-fluorocitosina

As equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) correspondem a uma nova classe terapêutica altamente seletiva de lipopeptídeos semi-sintéticos, que inibem a síntese de glucanas, um importante constituinte da parede celular fúngica. A [Figura 9] ilustra a estrutura química da caspofungina, a primeira equinocandina a ser aprovada (KATZUNG, 2010) e (GOLAN *et al*, 2009). Já a nicomicina Z é capaz de

inibir a síntese da quitina da parede celular e ainda encontra-se em fase de avaliação clínica. Tanto as equinocandinas como a nicomicina Z são administradas por via intravenosa (GOLAN *et al*, 2009).

A anfotericina B continua sendo o antifúngico de maior espectro de ação e geralmente é associado a 5-fluorocitosina ou fluconazol.

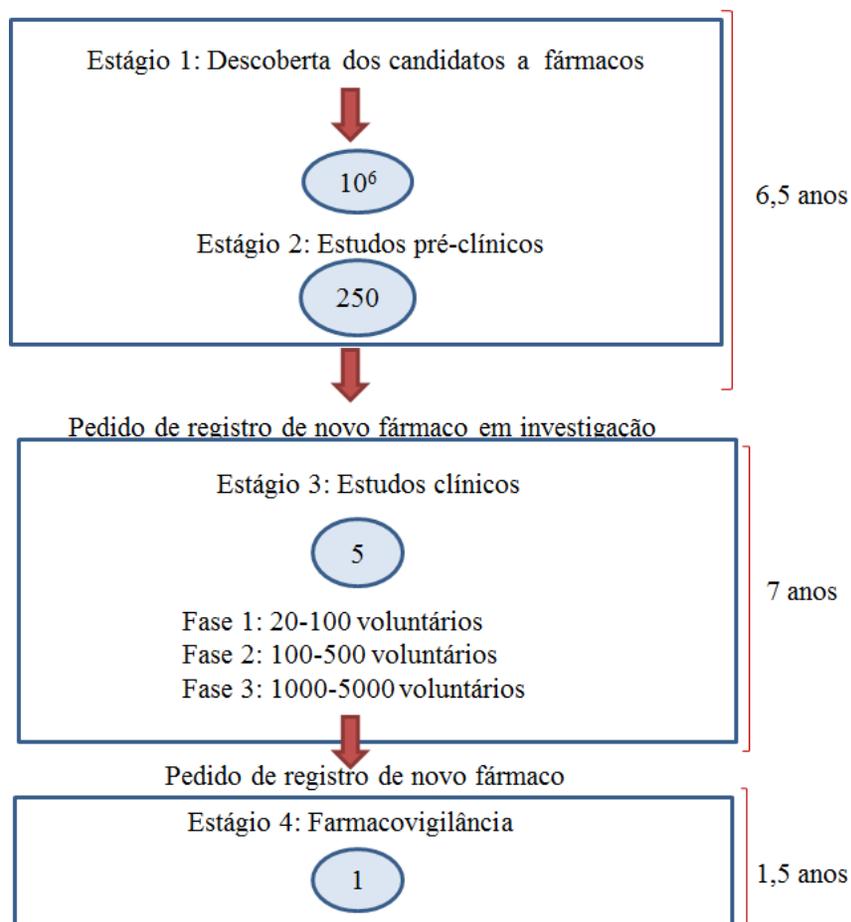
Nas duas últimas décadas, a incidência de infecções por *C. albicans* aumentou de forma considerável nos Estados Unidos. Isto ocorreu devido, a inexistência de fármacos seguros e eficazes, acarretando a reincidência das micoses (ELLIS, 2002). Outro fator relevante, é que a taxa de mortalidade é superior a 70% em pacientes com doenças hematológicas (RODDEN, ZAOUTIS e BUCHANAN, 2005).

Muito do que se sabe sobre os mecanismos de resistência aos antifúngicos se deve em função do gênero *Candida* como agente etiológico de micoses invasivas. Ao contrário dos mecanismos de resistência aos agentes antibacterianos, não há evidências de que os fungos sejam capazes de destruir ou alterar os agentes antifúngicos. Outro detalhe interessante reside no fato de que, os genes da resistência antifúngica não são transmissíveis de célula a célula, o mesmo não ocorre com muitos dos genes da resistência bacteriana. Sabe-se que alterações em bombas de efluxo multidroga, modificações no alvo da droga, alterações na assimilação do antifúngico, alterações no processamento intracelular do antifúngico e alterações nas enzimas da via de síntese de ergosterol são os mecanismos mais importantes da resistência aos agentes antifúngicos (ZAITZ *et al*, 2010).



com o mínimo de efeitos adversos, é longa, complexa e onerosa [Figura 10]. Desde a concepção do projeto até a introdução de um único fármaco no mercado farmacêutico, são investidos de 12 a 15 anos em P&D, com valores totais estimados, no biênio 2004-2006, da ordem de US\$ 500-880 milhões, podendo em alguns casos alcançar cifras superiores a US\$ 1 bilhão (GUIDO e ANDRICOPULO, 2008), (LOMBARDINO e LOWE, 2004) e (DIMASI, HANSEN e GRABOWSKI, 2003). Pouquíssimas moléculas que chegam à fase de desenvolvimento são finalmente aprovadas como fármacos: a cada 10.000 compostos considerados promissores nos ensaios iniciais, menos de 10 repetem a ação nos ensaios clínicos e apenas 1-2 são, por fim, aprovadas (GOLAN *et al*, 2009), (KATZUNG, 2010) e (GENNARO, 2004). Nos últimos vinte anos aproximadamente 90% dos fármacos lançados no mercado foram desenvolvidos em indústrias farmacêuticas (LIMA, 2007). Mesmo os custos associados à P&D de um novo fármaco podendo chegar à casa dos bilhões de dólares, as indústrias farmacêuticas ainda continuam investindo neste empreendimento arriscado, visto que os fármacos bem sucedidos são bastante lucrativos (LIMA, 2007) e (GUIDO e ANDRICOPULO, 2008).

Apesar do elevado custo para o desenvolvimento de um novo fármaco, a indústria farmacêutica tem se destacado como uma das mais inovadoras, com empresas multinacionais capazes de incorporar aos seus produtos os principais avanços das ciências biomédicas, biológicas e químicas. Neste aspecto, em termos econômicos tem se colocado entre as mais rentáveis em escala global. Segundo a *Intercontinental Medical Statistics*, IMS Health, o mercado mundial de varejo foi de 550 bilhões de dólares em 2004 e um aumento entre 7% a 8% para 2005, correspondendo à casa de 590 bilhões de dólares (BRESOLIN e CECHINEL-FILHO, 2010).



**Figura 10:** Fases de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos<sup>5</sup>

Segundo a *Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica*, Febrafarma, o mercado farmacêutico brasileiro ocupava a 11<sup>a</sup> posição no *ranking* do mercado farmacêutico mundial em 2003, ocupando em 2008 a 9<sup>a</sup> posição no *ranking* [Tabela 2] (BRESOLIN e CECHINEL-FILHO, 2010).

Este crescimento é um claro sinal do dinamismo do mercado exportador de fármacos no Brasil, o que vai de encontro com a expansão consistente do comércio internacional de produtos farmacêuticos (CECHINEL-FILHO e BRESOLIN, 2010). As perspectivas de crescimento da indústria farmacêutica são boas. Várias doenças já conhecidas poderão ser tratadas num futuro próximo e, conseqüentemente, haverá aumento na expectativa de vida do

<sup>5</sup> Adaptado de (GUIDO e ANDRICOPULO, 2008).

homem. Além disso, o aporte cada vez maior no que diz respeito aos investimentos financeiros e tecnológicos por parte das indústrias estimula a competitividade entre elas, promovendo lucros elevados. A descoberta de fármacos de enorme sucesso, que fazem parte da categoria dos *blockbusters*, termo inglês utilizado para designar os medicamentos com vendas anuais superiores a US\$ 1 bilhão, continua sendo o alicerce para o desenvolvimento da indústria farmacêutica mundial (ANDRICOPULO, 2008).

**Tabela 2:** O crescimento das vendas de medicamentos em alguns países \*

| Países        | Ano<br>(US\$ milhões) |         |         |         |
|---------------|-----------------------|---------|---------|---------|
|               | 2005                  | 2006    | 2007    | 2008    |
| USA           | 183.357               | 196.218 | 205.725 | 206.700 |
| Canadá        | 11.899                | 13.658  | 152.291 | 169.900 |
| Alemanha      | 27.001                | 27.463  | 31.319  | 34.800  |
| França        | 24.674                | 25.362  | 28.989  | 31.100  |
| Itália        | 15.196                | 15.533  | 15.850  | 16.900  |
| Reino Unido   | 14.581                | 14.896  | 17.456  | 17.000  |
| Espanha       | 10.930                | 11.504  | 13.588  | 15.100  |
| Japão         | 60.684                | 56.679  | 58.049  | 63.500  |
| México        | 6.950                 | 8.791   | 8.645   | 8.700   |
| Brasil        | 7.386                 | 8.087   | 10.112  | 11.900  |
| Argentina     | 2.018                 | 2.270   | 2.646   | 2.900   |
| Nova Zelândia | 5.694                 | 5.770   | 6.964   | 7.900   |

\* Adaptado de (BRESOLIN e CECHINEL-FILHO, 2010)

Neste cenário, a química medicinal vem contribuindo de modo decisivo na descoberta e no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, onde se nota nos últimos anos um enorme avanço nas tecnologias de desenvolvimento de fármacos. A química medicinal possui papel central nesse complexo paradigma de planejamento e otimização de novas moléculas com atividade biológica (LIMA, 2007), (GUIDO e ANDRICOPULO, 2008) e (GOLAN *et al*, 2009). Com as novas tecnologias, os modelos animais submetidos a “nocaute genético” e as informações do projeto genoma humano, prevê-se que

novas e importantes classes de fármacos serão descobertas nas próximas décadas (PANDIT, 2008).

## **1.5 A Importância da Química Medicinal**

A Química Medicinal engloba a invenção, a descoberta, o planejamento, a identificação e a preparação de substâncias biologicamente ativas. Estes aportes abrangem a interpretação de seu modo de ação no âmbito molecular, no estudo de seu metabolismo e no estabelecimento das relações estrutura-atividade, buscando o desenvolvimento de novos e eficientes fármacos (BRESOLIN e CECHINEL-FILHO, 2010). É uma área científica marcada pela trans-disciplinaridade e com nítido envolvimento de diversas áreas do conhecimento, sendo justificável pelo amplo espectro de fatores envolvidos e também por se tratar de sistemas biológicos (BARREIRO e FRAGA, 2008). Está intimamente associada à farmacologia molecular no sentido de compreender cada vez mais as razões moleculares das interações fármaco-receptor (THOMAS, 2007).

Um dos paradigmas da Química Medicinal moderna baseia-se no fato de que o mecanismo de ação farmacológico dos ligantes está associado às interações intermoleculares ou às reações químicas dessas substâncias com as estruturas macromoleculares presentes no sistema vivo (BARREIRO, 2009). Estas biomacromoléculas apresentam uma estrutura química tridimensional estéreo-específica para com os ligantes (fármacos) (LIMA, 2007) e (BARREIRO e FRAGA, 2008).

O entendimento das interações fármaco-receptor em sistemas biológicos é uma tarefa minuciosa e extremamente complexa, pois envolve uma diversidade de fatores que estão relacionados com a resposta terapêutica. Portanto, a resposta biológica em função da ação de um determinado fármaco

é resultado do reconhecimento molecular do fármaco pelo receptor biológico (PANDIT, 2008) e (THOMAS, 2007).

O estudo das interações fármaco-receptor, dos possíveis mecanismos de ação dos fármacos e de seus efeitos biológicos são alvos da farmacodinâmica. A química medicinal não se restringe apenas à farmacodinâmica, leva também em consideração outros fatores como a absorção, distribuição, biotransformação ou metabolização e a eliminação (ADME) dos fármacos, aspectos relacionados à farmacocinética. A biodisponibilidade e o perfil de toxicidade do fármaco também deverão ser pesquisados e fazem parte da Química Medicinal (PANDIT, 2008), (THOMAS, 2007), (BARREIRO e FRAGA, 2008), (GOLAN *et al*, 2009) e (GENNARO, 2004).

Na Química Medicinal utilizam-se diferentes abordagens metodológicas no planejamento racional de fármacos. No entanto o sucesso no planejamento racional de um novo fármaco requer conhecimento inter/multidisciplinar e interatividade contínua entre os pesquisadores em cooperações mútuas. Objetivando a interatividade contínua de pesquisadores, surgiu no Brasil, a Divisão de Estrutura Química e Atividade Biológica, precursora da Divisão de Química Medicinal, no âmbito da Sociedade Brasileira de Química (AMARAL e MONTANARI, 2002).

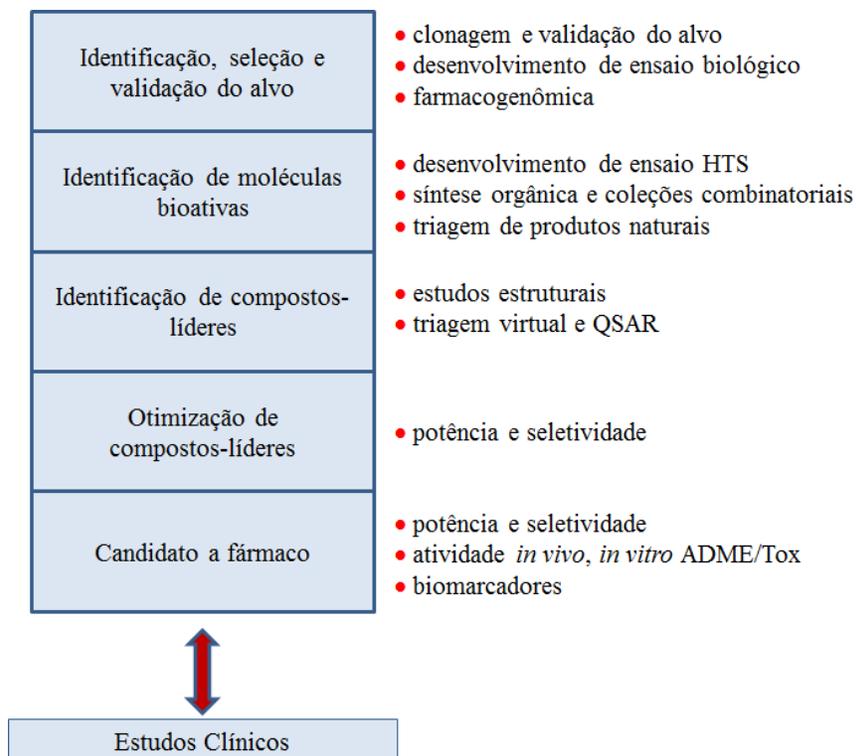
Por intermédio da Química Medicinal, moléculas candidatas à bioatividade podem ser correlacionadas estruturalmente objetivando planejar análogos com base no tipo de interação ligante-biomacromolécula. Através de pesquisas das relações entre estrutura química-atividade biológica (SAR e/ou QSAR), estruturas químicas poderão ser otimizadas, validadas e escolhidas para estudos *in vivo* e posteriormente selecionadas para ensaios pré-clínicos e clínicos. O planejamento adequado de variações na estrutura química de um composto bioativo pode resultar em derivados com maior interesse

terapêutico, seja por apresentar maior atividade biológica, menor toxicidade ou, ainda, por adquirir uma característica farmacotécnica mais adequada (MONTANARI e BOLZANI, 2001), (BARREIRO, 2002) e (TAVARES, 2004).

## **1.6 O Planejamento Racional de Fármacos**

As moléculas bioativas ou ligantes têm a sua origem a partir de produtos naturais ou através de síntese orgânica ou coleções combinatórias. Os ligantes podem ser identificados por intermédio de triagens reais ou virtuais, ou ainda através do planejamento racional, mas em todos os casos mencionados, as suas atividades biológicas devem ser determinadas experimentalmente. Na fase inicial, geralmente são identificadas moléculas com baixa afinidade, que necessitam ser otimizadas em relação a uma série de propriedades (como exemplo, potência, afinidade, seletividade, biodisponibilidade, toxicidade, etc). Os compostos bioativos com propriedades melhoradas são identificados como compostos-protótipos (do inglês, *lead compound*) para posterior otimização molecular [Figura 11].

Diversas estratégias na Química Medicinal podem ser empregadas no planejamento racional de compostos bioativos. As estratégias modernas no planejamento racional de um novo composto-protótipo (*lead compound*) levam em consideração a abordagem fisiopatológica. Nesta abordagem, o planejamento estrutural de uma nova molécula com potencial atividade biológica, fundamenta-se no alvo terapêutico eleito. Portanto, a eleição do alvo terapêutico representa a etapa crucial no processo de descoberta de novos fármacos (BARREIRO e FRAGA, 2008) e (MONTANARI, 2011).



**Figura 11:** Etapas envolvidas no planejamento racional de fármacos<sup>6</sup>

A compreensão das interações intermoleculares ligante-bioreceptor é fundamental na ação biológica e, de fato, a compreensão destas interações esclarece os prováveis mecanismos envolvidos na complementaridade estrutural entre a molécula do ligante e o bioreceptor (BARREIRO, 2009), (LIMA, 2007), (BARREIRO e FRAGA, 2008) e (MONTANARI, 2011). A complementaridade ligante-bioreceptor é justificada em função de interações específicas que contribuem na elucidação dos processos energéticos envolvidos (MONTANARI, 2011). É justamente neste estágio, que a metodologia computacional se apresenta de forma promissora, pois a partir dela pode-se ter uma descrição mais apurada da estrutura química 3D do bioreceptor, das interações intermoleculares envolvidas, e se for o caso, das

<sup>6</sup>Refere-se à etapa 1. Adaptado de (GUIDO e ANDRICOPULO, 2008)

reações químicas ocorridas entre o ligante e o bioreceptor (BARREIRO e FRAGA, 2008), (MONTANARI, 2011) e (SAN'TANA, 2009).

Levando em consideração à abordagem fisiopatológica, duas estratégias básicas podem ser exploradas no planejamento racional de compostos bioativos (MONTANARI, 2011), (SAN'TANA, 2009), (GUIDO e ANDRICOPULO, 2008) e (BARREIRO e FRAGA, 2008):

- ✚ Métodos independentes do bioreceptor/enzima ou conduta centrada nos compostos (planejamento indireto): *Ligand-Based Drug Design* (LBDD) – planejamento baseado na estrutura do ligante;
- ✚ Métodos dependentes do bioreceptor/enzima ou conduta centrada na biomacromolécula (planejamento direto): *Structure-Based Drug Design* (SBDD) – planejamento baseado na estrutura do bioreceptor.

Na primeira abordagem (LBDD), as interações com a biomacromolécula (bioreceptor ou enzima) são consideradas indiretamente, através da correlação entre a atividade biológica experimental de compostos conhecidos e as suas estruturas químicas. Isto ocorre por intermédio da seleção de parâmetros físico-químicos (descritores) que estão correlacionados a essas estruturas químicas. Estes métodos constituem uma importante área do planejamento racional de compostos bioativos, a das relações estrutura química-atividade biológica (SAR e QSAR) (BARREIRO e FRAGA, 2008), (SAN'TANA, 2009) e (GUIDO e ANDRICOPULO, 2008).

Na segunda abordagem (SBDD), as interações com a biomacromolécula são consideradas explicitamente no processo do planejamento. Neste caso, a estrutura da biomacromolécula é conhecida diretamente, através de dados experimentais (geralmente por cristalografia de raios-X ou Ressonância Magnética Nuclear - RMN) ou indiretamente, através de um procedimento de

modelagem molecular (geralmente modelagem por homologia) (BARREIRO e FRAGA, 2008), (SILVA e SILVA, 2007), (SANTOS FILHO e ALENCASTRO, 2003) e (GUIDO e ANDRICOPULO, 2008).

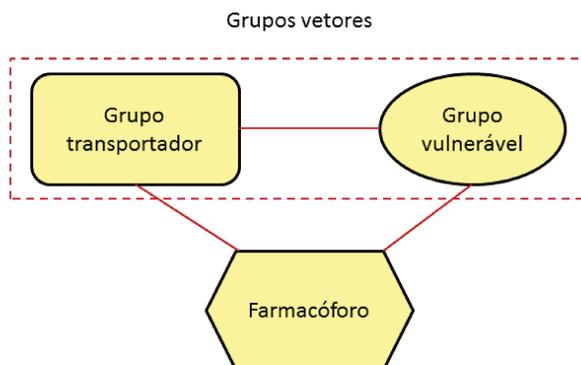
Está claro que, por intermédio da Química Medicinal, é possível explorar o imenso espaço químico delineando o trabalho investigativo na identificação, na seleção e na otimização de moléculas capazes de interagir com elevada afinidade e seletividade com o alvo molecular selecionado (GUIDO e ANDRICOPULO, 2008).

## **1.7 A Relação Estrutura Química-Atividade Biológica**

A maioria dos fármacos disponíveis no mercado não foi descoberta em sua forma final, e passaram por diversos processos de experimentação e modificação molecular a fim de torná-los agentes terapêuticos.

O ponto inicial na descoberta de um fármaco é a identificação de um *composto-protótipo*. O *composto-protótipo* serve como um modelo inicial que sofre modificações estruturais para manter ou melhorar a atividade biológica desejada e para eliminar ou minimizar propriedades indesejáveis (PANDIT, 2008). Um *composto-protótipo* é aquele que possui atividade farmacológica desejada, mas que pode apresentar outras propriedades desfavoráveis como elevada toxicidade, problemas de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME/Tox) ou algum problema no processo de produção em larga escala (ANDRICOPULO, 2008), (PANDIT, 2008) e (THOMAS, 2007). Desta forma, um *composto-protótipo* deve ser transformado em um fármaco por meio de alterações em sua estrutura química para resultar em propriedades de fármaco apropriadas, *drug-like properties*, tais como baixa toxicidade e habilidade em atingir o sítio de ação em concentrações apropriadas (PANDIT, 2008) e (GENNARO, 2004). Este processo pelo qual a estrutura química do

*composto-protótipo* é modificada com finalidade em resultar propriedades desejáveis é chamado de *otimização do protótipo*. De modo geral, a estrutura molecular de um fármaco pode ser subdividida em componentes [Figura 12]:



**Figura 12:** Estrutura de um fármaco: farmacóforo e grupos vetores<sup>7</sup>

✚ **Farmacóforo:** região da molécula que interage com o sítio alvo e, portanto é o responsável pela atividade biológica. A região farmacofórica da molécula e o sítio alvo devem possuir complementaridade estereoquímica ligante-bioreceptor. Uma vez satisfeita tal complementaridade, ocorrerá o reconhecimento do farmacóforo pelo bioreceptor/enzima, desencadeando a resposta biológica;

✚ **Grupos vetores:** região da molécula que desempenha papel fundamental nos processos farmacocinéticos e também auxilia minimizando efeitos de toxicidade. Podem ser classificados em:

**A) Grupos transportadores:** controlam os mecanismos de ionização e a lipofilicidade molecular e, conseqüentemente, influenciam nos processos de absorção, distribuição e excreção;

<sup>7</sup> Adaptado de (PANDIT, 2008).

**B) Grupos vulneráveis:** estão relacionados aos mecanismos de metabolização do fármaco e são susceptíveis à ação enzimática.

Várias abordagens biológicas estão disponíveis na identificação de um *composto-protótipo*. Geralmente, realizam-se testes laboratoriais que são caracterizados como *bioensaios* ou *screening*, o que determina se o composto possui a atividade biológica desejada. O *screening* pode ser realizado em células e/ou tecidos, em ensaios de ligação, em animais ou então *High-Throughput-Screening* (HTS). A técnica HTS é uma triagem rápida de alta demanda onde se utiliza tecnologia baseada em robótica miniaturizada para testes em grandes bibliotecas de compostos para ligação a um determinado alvo. O avanço em HTS vem permitindo aos pesquisadores testarem um número imenso de compostos em pequeno intervalo de tempo (GENNARO, 2004), (PANDIT, 2008) e (MONTANARI, 2011).

A disponibilidade de programas computacionais de química e os bancos de dados em rede são, atualmente, ferramentas fundamentais na descoberta e no planejamento de novos fármacos. Essas informações assim obtidas permitem uma análise rápida da atividade biológica e a comparação das propriedades físico-químicas (propriedades moleculares) de uma série de moléculas análogas.

Uma vez obtido o *composto-protótipo*, pode-se lançar mão de estratégias computacionais de modificação molecular para aperfeiçoar e prever a atividade biológica de compostos análogos. A correlação entre estrutura química-atividade biológica pode ser realizada quantitativamente, neste caso temos o *QSAR* (relação quantitativa entre estrutura química e atividade biológica) ou qualitativamente, denominada de *SAR* (relação qualitativa entre

estrutura química e atividade biológica) (CARVALHO *et al*, 2003), (RICHARDS, 1994) e (MONTANARI, 2011).

A utilização de QSAR-2D (QSAR *clássico*) nos permite correlacionar para uma série de compostos análogos, propriedades moleculares da estrutura química com as atividades biológicas experimentais. Por intermédio da Quimiometria, é possível obter modelos multiparâmetros no intuito de prever a atividade biológica experimental das chalconas pesquisadas. Desta forma, vários métodos estatísticos multivariados podem ser empregados para obtenção destes modelos multidimensionais (FERREIRA, MONATANARI e GAUDIO, 2002).

A obtenção de modelos matemáticos multidimensionais requer a elaboração de uma matriz de dados contendo a medida quantitativa experimental da atividade biológica (MIC, Log K, IC<sub>50</sub>) e os parâmetros físico-químicos calculados. Levando em consideração, o método de Hansch-Fujita conhecido como modelo Extra-termodinâmico, os valores de atividade biológica experimental são correlacionados aos valores calculados das variáveis independentes (propriedades moleculares) através de métodos de regressão (HANSCH e FUJITA, 1964). O modelo de Hansch-Fujita é uma combinação linear entre as variáveis independentes, capaz de explicar de forma aproximada os valores experimentais da atividade biológica de uma série de compostos análogos. Isto ocorre pelo fato que, o modelo extratermodinâmico, na abordagem QSAR *clássico*, é uma estimativa de modelo que tenta correlacionar às propriedades moleculares dos compostos pesquisados com a variação de energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) envolvida no processo de interação ligante-biorreceptor (KUBINYI, 1993).

## 1.8 A Química Teórica Computacional

Através da Química Teórica Computacional, utilizando métodos da Mecânica Molecular (MM) e da Mecânica Quântica (MQ) é possível prever os prováveis tipos de interações intermoleculares e os envolvimentos energéticos no processo de complexação ligante-bioreceptor. Levando em consideração a “*teoria da perturbação macromolecular*”, proposta por Belleau, onde a formação do complexo ligante-biomacromolécula é acompanhada de variações da energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ), pode-se então concluir que a complexação ocorrerá simultaneamente com alterações conformacionais no alvo biológico. Esta teoria oferece fundamento termodinâmico plausível para a explicação de processos físico-químicos que ocorrem na região ativa do biorreceptor (VERLI e BARREIRO, 2005), (LEACH, 2001) e (MONTANARI, 2011).

Na fase de descoberta do *composto protótipo*, estudos SAR e QSAR têm sido muito úteis na identificação de regiões farmacofóricas e grupos vetoriais. Este estágio é conhecido como planejamento de fármacos auxiliado por computador, CADD, do inglês *Computer-Assisted Drug Design* (THOMAS, 2007), (LEACH, 2001) e (PATRICK, 2002). O planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD) é o conjunto de técnicas computacionais, portanto da Química Teórica Computacional, utilizadas para descobrir, planejar e otimizar compostos biologicamente promissores. O universo em CADD amplia-se a cada momento por intervenção de uma crescente tecnologia computacional, pela utilização de novas metodologias aplicadas aos cálculos em Química Teórica Computacional e por intermédio dos princípios da Química Quântica.

A Química Teórica Computacional é extremamente útil no estudo das relações SAR e QSAR, pois utiliza métodos matemáticos para executar cálculos de propriedades moleculares simulando o comportamento molecular. Assim, a Química Teórica Computacional vai além dos limites tradicionais das ciências, permitindo explorar moléculas por intermédio de computadores e atua como um suplemento para a química experimental. “Quanto mais às ciências físicas progredirem, mais elas tendem a entrar no domínio da matemática, que é um tipo de centro para onde elas convergem. Nós podemos julgar o grau de perfeição que a ciência tem alcançado pela facilidade com que ela pode ser submetida a CÁLCULO” – (A. Quetelet) (MORGON, 2001).

Uma das inúmeras vantagens da Química Teórica Computacional é a de atuar como ferramenta de apoio na análise e interpretação de dados experimentais, através de informações que muitas vezes não são possíveis de serem obtidas diretamente dos experimentos.

## **1.9 Os Métodos Computacionais em Sistemas Biológicos**

Através da Química Teórica Computacional utiliza-se os métodos teóricos no sentido de avaliar e prever propriedades moleculares que são de suma importância no entendimento das correlações estrutura química-atividade biológica (SAR e/ou QSAR). Os métodos da Química Teórica aplicado a sistemas biológicos fundamentam-se nos conceitos da Mecânica Clássica/Molecular (MM) e da Mecânica Quântica (MQ) (MORGON, 2001) e (LEACH, 2001). Os métodos computacionais podem executar cálculo de energia potencial de superfície (PES) para uma estrutura molecular, que pode ser entendido como, a concretização das forças de interação entre os átomos em uma molécula com finalidade em obter informações estruturais desta molécula. O cálculo da energia potencial de superfície para um determinado

conjunto de coordenadas atômicas é denominado *Single Point Energy Calculation* (JENSEN, 2007), (MORGON e COUTINHO, 2007) e (LEACH, 2001).

Os métodos Mecânicos Moleculares [(mecânica dinâmica: determinística) e (monte Carlo: estocástico)], utilizam as leis da física clássica aos núcleos atômicos das moléculas sem considerar explicitamente os efeitos eletrônicos e confiam em um *campo de força* com parâmetros empíricos embutidos. São métodos que posam da vantagem de serem computacionalmente menos intensivos, rápidos e úteis em computadores com recursos limitados. Outra vantagem reside no fato de serem utilizados para macromoléculas e enzimas (sistemas de milhares de átomos). Estes métodos possuem desvantagens, tais como, o fato do campo de força ser aplicável a uma limitada classe de moléculas, o de não executar cálculos de propriedades eletrônicas, a necessidade de requerer dados experimentais para os parâmetros e pelo fato de serem utilizados para sistemas ou processos onde não ocorrem nenhuma ruptura ou formação de ligações químicas (LEACH, 2001), (JENSEN, 2007) e (ALCÁCER, 2007).

A mecânica molecular (MM), também conhecida como *método de campo de força*, trata as moléculas como uma coleção de massas interagindo entre si através de forças harmônicas, utilizando as leis clássicas da física para prever as estruturas e as propriedades das moléculas. A mecânica molecular utiliza uma expressão de energia potencial em função apenas das posições dos núcleos, negligenciando a movimentação dos elétrons (LEACH, 2001), (JENSEN, 2007). Um campo de força (*Force Field*) de mecânica molecular contém parâmetros referentes às interações ligantes (comprimento de ligação, ângulo de ligação e ângulo diedral) e não-ligantes (eletrostáticas e de van de Waals) que são utilizados para calcular a energia estérica e a geometria de

uma molécula (ALCÁCER, 2007). Desta forma, a energia total ( $E_T$ ) ou energia estérica de um sistema molecular representado de forma geral pela [Equação 1] e conhecida como *Equação de Westhemeir*, pode ser dividida em várias componentes denominados forças potenciais ou equações de energia potencial, que são calculados separadamente e somados para obter a  $E_T$  da molécula, como as energias relacionadas à deformação do comprimento de ligação ( $E_s$ ), à deformação do ângulo de ligação ( $E_a$ ), ao ângulo de torção ( $E_t$ ), às interações de van der Waals ( $E_{vdW}$ ) e finalmente as eletrostáticas ( $E_{ele}$ ) (LEACH, 2001), (JENSEN, 2007), (SANT'ANNA, 2009) e (MELO, 2009).

$$E_T = \Sigma E_s + \Sigma E_a + \Sigma E_t + \Sigma E_{vdW} + \Sigma E_{ele} \quad \text{Eq. 1}$$

A escolha do campo de força é fundamental, visto que a confiabilidade dos dados obtidos é dependente das funções de energia gerado por esses campos. Alguns campos de força são encontrados em programas computacionais, como o campo de força “MM1” (*Molecular Mechanics 1*) desenvolvido por Norman Allinger em 1976. Em 1977, Allinger, realiza algumas mudanças e introduz o “MM2” (*Molecular Mechanics 2*) que possibilitou a realização de maior acurácia nos cálculos. Diferentes campos de forças estão disponíveis nos programas computacionais, tais como: “MM3” (*Molecular Mechanics 3*) e “MM4” (*Molecular Mechanics 4*) contendo diversos termos desenvolvidos por Allinger e colaboradores. Outros campos de força utilizados, mas para simulação de macromoléculas (proteínas e enzimas) é o “AMBER” (*Assisted Model Building and Energy Refinement*) e o CHARMM (*Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics*) (LEACH, 2001), (JENSEN, 2007).

Os métodos Mecânicos Quânticos (*ab initio*, *semi-empírico* e *funcional de densidade*) confiam na equação de Schrödinger para a descrição de moléculas

levando em consideração o tratamento explícito da estrutura eletrônica. Diferente dos métodos de mecânica molecular, os métodos de mecânica quântica consideram os núcleos e os elétrons que compõe o sistema molecular. Então, os modelos quânticos são fundamentados nas soluções aproximadas para a equação de Schrödinger [Equação 2], sendo considerado o comportamento ondulatório dos elétrons no cálculo de energia do sistema.

$$\mathbf{H}\Psi = E\Psi \quad \text{Eq. 2}$$

Na [Equação 2],  $\mathbf{H}$  é o operador Hamiltoniano que representa a energia da molécula, incorporando a energia cinética ( $E_C$ ) dos elétrons e a energia potencial ( $E_p$ ) das interações elétron-elétron e elétron-núcleo e  $\Psi$  é a função de onda descrita em termos de coordenadas espaciais dos elétrons que constituem o sistema molecular em um determinado estado. A mecânica quântica é útil para o cálculo de valores de afinidade eletrônica, calor de formação, potencial de ionização e momento dipolar das moléculas. Também pode ser utilizado para o cálculo da “probabilidade relativa” de se encontrar elétrons (densidade eletrônica) numa estrutura molecular, justificando a determinação dos locais mais prováveis para reações com eletrófilos ou nucleófilos (THOMAS, 2007), (LEACH, 2001), (MAGALHÃES, 2009), (JENSEN, 2007) e (SANT’ANNA, 2009).

Os métodos *ab initio* são Métodos Quânticos utilizados para sistemas moleculares pequenos (dezenas de átomos) e não requerem nenhum parâmetro empírico. Estes métodos apresentam vantagens de serem utilizados para uma ampla gama de sistemas químicos e biológicos, não depender de dados experimentais, serem matematicamente rigorosos e capazes de determinar não só estados fundamentais como também estados de transição e estados excitados. A desvantagem dos métodos *ab initio* reside no fato de serem computacionalmente muito intensivos (MORGON e COUTINHO, 2007),

(ALCÁCER, 2007), (JENSEN, 2007), (TRSIC e SIQUEIRA-PINTO, 2009), (ATKINS, DE PAULA e FRIEDMAN, 2011), (ATKINS e DE PAULA, 2008) e (THOMAS, 2007).

O termo em latim *ab initio* significa “a partir do início” ou “a partir dos princípios fundamentais”, ou seja, são cálculos realizados a partir de constantes físicas fundamentais, usando equações exatas, que envolvem uma população eletrônica total da molécula sem o uso de parâmetros experimentais e sem aproximações adicionais. O primeiro método de cálculo da estrutura eletrônica foi o método de Hartree-Fock (HF), que emprega a equação de Schrödinger completa para tratar todos os elétrons de um sistema químico (ATKINS, DE PAULA e FRIEDMAN, 2011), (ATKINS e DE PAULA, 2008), (MAGALHÃES, 2009), (THOMAS, 2007) e (SANT’ANNA, 2009). Este método emprega conjuntos de funções de base (*basis set*) nos cálculos tais como as funções do tipo Slater (STO) e as funções Gaussianas (GTO: 3-21G, 6-31G). Essas bases mínimas apresentam diversas deficiências e para aprimorá-las faz-se a inclusão da função de polarização (i.e., orbitais p representado por \*) (LEACH, 2001), (MAGALHÃES, 2009), (ATKINS, DE PAULA e FRIEDMAN, 2011), (TRSIC e SIQUEIRA-PINTO, 2009) e (JENSEN, 2007). Assim, 6-31G\* refere-se ao conjunto de base 6-31G com função de polarização para átomos pesados (i.e., átomos diferentes de hidrogênio), 6-31G\*\* refere-se à inclusão da função de polarização para os átomos de hidrogênio e hélio. A base 6-31G\*\* é particularmente útil em sistemas com ligações hidrogênio (LEACH, 2001), (ATKINS, DE PAULA e FRIEDMAN, 2011), (TRSIC e SIQUEIRA-PINTO, 2009), (JENSEN, 2007) e (MAGALHÃES, 2009).

Os métodos *semi-empíricos* são métodos quânticos utilizados para sistemas moleculares de tamanho intermediário (centenas de átomos) e que requerem

parâmetros empíricos experimentalmente derivados. Possuem como vantagem o fato de serem computacionalmente menos exigente que os métodos *ab initio* e também são capazes de calcular estados de transição e estados excitados. Estes métodos posam de desvantagens como, o fato de exigirem dados experimentais para parâmetros e de serem menos rigorosos que os métodos *ab initio* (MORGON e COUTINHO, 2007), (ALCÁCER, 2007), (JENSEN, 2007), (TRSIC e SIQUEIRA-PINTO, 2009), (ATKINS, DE PAULA e FRIEDMAN, 2011), (ATKINS e DE PAULA, 2008) e (THOMAS, 2007).

Os métodos *semi-empíricos* utilizam o mesmo formalismo quanto-mecânico como se empregam conjuntos de base incluindo apenas os elétrons da camada de valência do sistema. O motivo desta aproximação é que os elétrons envolvidos numa reação química e em outros fenômenos intermoleculares são os elétrons da camada de valência (ATKINS, DE PAULA e FRIEDMAN, 2011), (ATKINS e DE PAULA, 2008), (THOMAS, 2007) e (MAGALHÃES, 2009). A equação de Schrödinger é uma equação diferencial e sua resolução envolve a resolução de um grande número de integrais. No caso de cálculos com métodos *ab initio*, o número de integrais cresce aproximadamente com a quarta potência do número de funções de base, chaegando a alguns milhões mesmo para moléculas pequenas. Nos métodos quânticos *semi-empíricos*, a negligência de um grande número dessas integrais foi a solução adotada para economizar tempo de máquina e também reduzir a quantidade de memória necessária nos cálculos (MORGON e COUTINHO, 2007), (ALCÁCER, 2007) e (SANT'ANNA, 2009). Após os trabalhos pioneiros de Pople e colaboradores, Dewar e colaboradores desenvolveram um série de programas com o objetivo de tornar acessíveis os cálculos *semi-empíricos* de orbitais moleculares (SANT'ANNA, 2009).

O primeiro método a utilizar essa aproximação é o CNDO (*Complete Neglect of Differential Overlap*) Negligência Completa da Diferencial de Sobreposição, no qual os orbitais atômicos são considerados esfericamente simétricos na avaliação das integrais de repulsão eletrônica. Outros métodos também utilizam essas aproximações tais como, INDO (*Intermediate Neglect of Differential Overlap*), Negligência Intermediária da Diferencial de Sobreposição e NDDO (*Neglect of Diatomic Differential Overlap*), Negligência da Diferencial de Sobreposição Diatômica (LEACH, 2001), (MORGON e COUTINHO, 2007), (ALCÁCER, 2007), (JENSEN, 2007) e (MAGALHÃES, 2009). Os métodos *semi-empíricos* mais comumente utilizados são AM1 (*Austin Model 1*) e PM3 (*Parametric Method 3*), e ambos os métodos incorporam aproximações muito semelhantes, mas diferem na parametrização. Recentemente, o método AM1 foi objeto de uma reparametrização para os átomos de H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br e I, resultando no método RM1 (*Recife Model 1*), com menores erros de cálculos do que os gerados pelos métodos AM1 e PM3 (MORGON e COUTINHO, 2007) e (MAGALHÃES, 2009). A parametrização para estes métodos foi desenvolvida para reproduzir uma série de dados experimentais, incluindo geometrias de equilíbrio, calores de formação, momentos de dipolo e energias de ionização (SANT'ANNA, 2009).

A Teoria do Funcional de Densidade (*Density Functional Theory – DFT*) é um formalismo muito bem sucedido, onde o principal objetivo é substituir a função de onda, usada para descrever os elétrons em métodos como o Hartree-Fock, pela densidade eletrônica. Os cálculos HF consideram uma densidade eletrônica média, já os cálculos DFT consideram as interações instantâneas de pares de elétrons com spins opostos (MORGON e COUTINHO, 2007), (JENSEN, 2007), (ATKINS, DE PAULA e FRIEDMAN, 2011). Trata-se de

uma aproximação baseada na teoria de Hohenberg e Kohn que afirma que todas as propriedades de um sistema são funções da *densidade de carga*. O teorema de Hohenberg-Kohn permite descrever a energia eletrônica total de um sistema químico como uma função da densidade eletrônica  $\rho$  [Equação 3]:

$$E(\rho) = E_{KE}(\rho) + E_C(\rho) + E_H(\rho) + E_{xc}(\rho) \quad \text{Eq.3}$$

onde,  $E_{KE}(\rho)$  é o termo de interação núcleo-elétron,  $E_C(\rho)$  é o termo da energia cinética,  $E_H(\rho)$  é o termo da energia de Coulombiana e  $E_{xc}(\rho)$  é o termo que contém as contribuições de troca e correlação. Assim, independente da forma como o método é apresentado, todas as propriedades são funcionais da densidade eletrônica  $\rho$ , e a energia do estado fundamental de um sistema multieletrônico sob um dado potencial externo é descrito de acordo com a [Equação 3].

Nos métodos DFT considera-se que a energia de um conjunto de elétrons sob influência de um campo externo é um funcional único da densidade eletrônica. Esta dependência aparece em dois termos da energia eletrônica, chamados funcional de troca e funcional de correlação (MORGON e COUTINHO, 2007), (JENSEN, 2007) e (SANT'ANNA, 2009). Outra vantagem dos métodos DFT é a incorporação de efeitos de correlação eletrônica no cálculo da energia. Os diferentes funcionais disponíveis usam diferentes formas de calcular a correlação. No esquema de Kohn-Sham, por exemplo, é definido um potencial de troca e correlação, que é derivada funcional da energia total de troca-correlação (MORGON e COUTINHO, 2007). Os melhores funcionais DFT podem fornecer resultados de qualidade similar aos métodos *ab initio* que consideram a correlação eletrônica, porém a um custo computacional muito menor (MELO, 2009) e (MORGON e COUTINHO, 2007). O método B3LYP (Becke, Lee, Yang e Parr) é um método híbrido amplamente aplicado, onde parte do funcional é obtido por

Mecânica Quântica (combina energia de troca HF com o termo de troca DFT) e parte é parametrizado (adiciona funcionais de correlação) (MAGALHÃES, 2009), (MELO, 2009), (JENSEN, 2007) e (MORGON e COUTINHO, 2007).

O importante é salientar que nem todos os tipos de cálculos são executados por todos os métodos e nenhum método é melhor o suficiente para todos os propósitos. Assim, cada método apresentará vantagens e desvantagens para uma determinada aplicação, e por fim, caberá ao pesquisador a escolha do método mais eficaz, levando em consideração uma série de critérios como a natureza da molécula, o tipo de informação obtida, recursos computacionais e a disponibilidade em usar determinados parâmetros que foram determinados experimentalmente (MORGON, 2001).

Atualmente, um novo cenário vem sendo traçado, fruto do “casamento” entre os métodos Mecânicos Moleculares (MM) e os métodos Mecânicos Quânticos (QM). Esta combinação deu origem aos métodos híbridos clássico-quântico, uma técnica mais satisfatória, conhecida por Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) (MORGON, 2001).

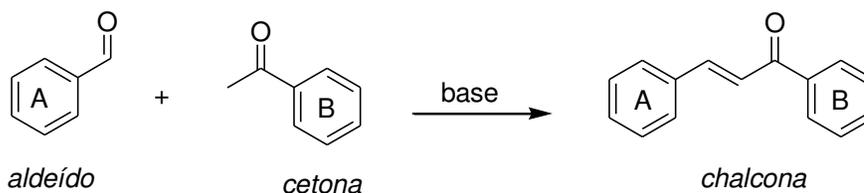
## **2. Revisão da Literatura**



## Chalconas como agentes antifúngicos

Atualmente, existem várias classes de compostos orgânicos sintetizados servindo como um *Lead Compound* na produção de novos fármacos: alcalóides, esteróides, terpenóides, flavonóides, entre outros, naturalmente presentes numa gama imensa de vegetais. Uma importante categoria de flavonóides destaca-se por apresentar moléculas com potencial farmacológico: as chalconas (SIMÕES *et al*, 2004).

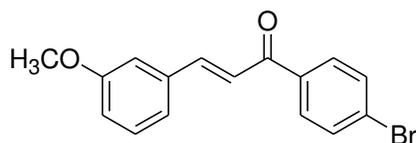
Derivados de chalcona são precursores biossintéticos de flavonóides e que apresentam o núcleo 1,3-difenil-2-propen-1-ona, ou seja, são cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas ou enonas (MOTTA, GAUDIO e TAKAHATA, 2006), (McMURRY, 2011) e (CAREY, 2011). São compostos químicos encontrados abundantemente em fontes naturais, em especial, plantas superiores, podendo ainda ser obtidos por síntese orgânica, pela reação entre cetonas e aldeídos aromáticos em meio alcalino, num processo conhecido como Condensação de Claisen-Schmidt [Figura 13].



**Figura 13:** Esquema geral da condensação de Claisen-Schmidt

A obtenção de novas chalconas, com diferentes grupos substituintes nos anéis aromáticos, tem sido explorada por pesquisadores com intuito de obter melhores resultados terapêuticos. Alguns autores sugerem que a atividade antimicrobiana, em especial a atividade antifúngica, seja atribuída à reatividade da carbonila do grupamento cetônico das chalconas.

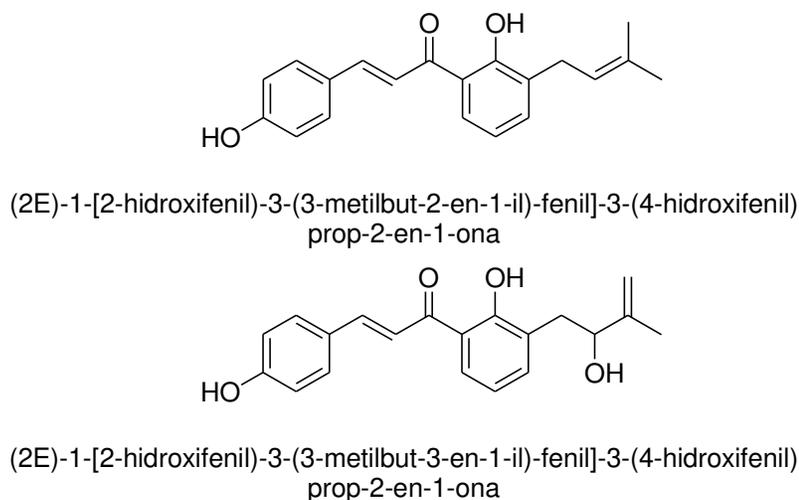
López e colaboradores avaliaram a atividade antifúngica de 41 chalconas em meio Sabouraud relatando que a unidade  $\alpha,\beta$ -insaturada dos compostos poderia estar atuando como aceptores da reação de Michael, ligando-se aos agrupamentos tiol de enzimas que participam na síntese da parede celular fúngica. As chalconas ativas foram testadas para  $\beta$ -1,3-glucan sintase e quitin-sintase, enzimas que catalizam a biossíntese dos polímeros ( $\beta$ -1,3-glucana e quitina) da parede celular. Os pesquisadores constataram que: a) grupos doadores de elétrons no anel A tendem a reduzir a atividade antifúngica; b) grupos retiradores de elétrons na posição-*para* no anel A tendem a aumentar a atividade biológica; c) grupos  $\text{NO}_2$  e  $\text{Cl}$  na posição-*para* no anel A diminuem a atividade antifúngica; d) efeitos estéricos no anel A são considerados relevantes e) substituintes *orto*-volumosos no anel A apresentam a planaridade afetada, o que justifica o impedimento estérico; e) substituintes na posição-*orto* no anel B representam a perda total da atividade biológica; f) surpreendentemente, o composto a seguir foi o que apresentou maior atividade antifúngica [Figura 14] (LÓPEZ *et al*, 2001).



(2E)-1-(4-bromofenil)-3-(3-metoxifenil)-  
prop-2-en-1-ona

**Figura 14:** Estrutura química da chalcona com maior atividade antifúngica (LÓPEZ *et al*, 2001).

De acordo com Nowakowska [NOWAKOWSKA, 2007], as chalconas preniladas na [Figura 15], isoladas das folhas de *Maclura tinctoria*, mostraram-se ativas contra os fungos *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*.



**Figura 15:** Chalconas hidroxiladas com atividade biológica

Okunade e colaboradores realizaram um *screening* biológico de derivados de dihidroxichalconas contra cepas de *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* em pacientes HIV demonstrando uma atividade antifúngica relativamente elevada (OKUNADE *et al*, 1997).

Uma série de 44 chalconas foi sintetizada e avaliada para a atividade contra *Candida albicans*. O estudo SAR realizado mostrou que a atividade antifúngica é extremamente dependente da substituição nos anéis e correlaciona em grande parte com a capacidade dos compostos em interagir com grupos sulfidríla. As mais ativas foram as chalconas hidroxiladas e a atividade antifúngica está relacionada com a localização do grupo hidroxila no anel aromático B, obedecendo à seguinte ordem: orto-OH > para-OH > 3,4-di-OH > meta-OH. Demonstraram que as chalconas mais ativas provavelmente interagem com componentes celulares tiol de *C. albicans*, mas os autores consideram que o mecanismo é complexo e necessita de maiores investigações (BATOVSKA *et al*, 2007).

Lahtchev e colaboradores sintetizaram e avaliaram a atividade antifúngica de uma série de 21 chalconas. No que diz respeito ao modo de ação antifúngica das chalconas foi demonstrado que o DNA não era o principal

alvo para as chalconas. O estudo revelou que a glutatona intracelular das leveduras e moléculas de cisteína desempenham um papel significativo como uma barreira na defesa contra a ação das chalconas. A pesquisa revelou também que: a) a localização favorável para grupo hidroxila é posição-*meta* no anel B; b) em contraste, estudos anteriores mostraram que posição-*orto* foi a mais favorável para atividade de chalconas hidroxiladas contra cepas de *C. albicans*; c) Efeitos eletrônicos de substituintes na posição-*para* em anel B das chalconas não são cruciais para exibição de atividade antifúngica (LAHTCHEV *et al*, 2008).

Recentemente, Sivakumar e colaboradores, sintetizaram, avaliaram a atividade contra quatro espécies de fungos e realizaram um estudo QSAR para 48 chalconas. O estudo QSAR indicou que a atividade antifúngica está correlacionada com descritores do tipo: ADME, eletrofilicidade, topológico e espacial. A importância de substituintes elétron-retiradores na estrutura química das chalconas está altamente correlacionada com a atividade antifúngica dos compostos mais ativos e com a presença de orbital LUMO (SIVAKUMAR, KUMAR e DOBLE, 2009).

Uma série de onze chalconas quinolínicas foi preparada e testada para atividade antifúngica *in vitro* contra 08 cepas de fungos patógenos em humanos. Seis derivados da série apresentaram elevada atividade antifúngica *in vitro*. A lipofilicidade dos derivados foi determinada por intermédio de HPLC e apresentou correlação com a atividade biológica *in vitro* dos compostos. Três derivados mostraram atividade antifúngica *in vitro* maiores que o padrão fluconazol. Notaram que a presença de grupo polar em anel fenil na posição-*orto* é muito importante para a atividade antifúngica (MUSIOL *et al*, 2006).

Onze novas chalconas sulfonamidas foram sintetizadas e a atividade antimicrobiana foi testada contra vários fungos patogênicos e algumas bactérias. Verificou-se que as chalconas apresentaram considerável atividade antifúngica e uma menor atividade antibacteriana (JAIN, CHOURASIA, RAO, 2004).

Recentemente, uma série de seis novas chalconas derivadas de 2-acetil piridina foi sintetizada e a atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica) destes compostos foi avaliada. Os resultados revelaram que quatro chalconas apresentaram boa atividade bacteriana e quatro apresentaram considerável atividade antifúngica (PRASAD *et al*, 2008).

Azad e colaboradores prepararam uma série de chalconas quinolínicas e avaliaram contra diferentes cepas de bactérias e fungos. Todos os compostos preparados mostraram significativa atividade biológica antifúngica (AZAD, MUNAWAR, SIDDIQUI, 2007).

Turkar e colaboradores sintetizaram 12 chalcona e avaliaram a atividade contra 06 espécies de bactérias e 03 espécies de fungos. Cinco compostos apresentaram atividade anti-*Candida albicans* com valores inferiores a 8µg/mL. Observou-se que as chalconas que apresentavam um grupo isobutila no anel derivado da cetona, e grupos heterocíclicos (2-piridinil, 3-tiofeno e 3-furano) derivados de aldeídos apresentaram boas atividades antifúngicas. Presenciaram também que grupos trimetóxi em posições 1, 2 e 3 no anel derivado do aldeído aumentam consideravelmente a atividade antifúngica (TURKAR *et al*, 2010).

Swamy e colaboradores sintetizaram 12 compostos de chalcona derivados de 3-hidroxi benzofurano e avaliaram a atividade contra 02 espécies de bactérias e 02 espécies de fungos, entre elas *Candida albicans*. Todos os

compostos sintetizados apresentaram excelente atividade antifúngica (SWAMY e AGASIMUNDIN, 2008).

Recentemente, foram sintetizados 08 chalconas derivadas do 3-acetil-2,5-dimetilfurano substituído aromático e aldeído heterocíclico. Os compostos foram avaliados contra 03 espécies de fungos e 05 espécies de bactérias. Todos os compostos sintetizados mostraram excelente atividade antifúngica com um halo de inibição maior que 13 mm em baixas concentrações dos compostos (SRIDHAR *et al*, 2011).

Com o objetivo de avaliar o potencial antifúngico, uma série de chalconas contendo enxofre foi sintetizada e testada quanto à sua atividade *in vitro*. Os compostos possuem como parte do anel heteroaromático o tiofeno ou como cadeia lateral o tiometil, onde alguns dos compostos mostraram atividade significativa contra a cepa resistente ao fluconazol (BAG, RAMAR e DEGANE, 2008). Utilizamos esta série de chalconas modificadas como parte deste trabalho de doutorado, para a realização de um estudo QSAR *clássico* (QSAR-2D), com intuito de prever a atividade biológica anti-*Candida albicans* para novas chalconas que serão sintetizados e posteriormente avaliados microbiologicamente.

### **3. OBJETIVOS**



### 3.1 Objetivo Geral

Através do estudo Quantitativo Estrutura Química - Atividade Biológica, *QSAR Clássico*, propor a síntese de novas chalconas. Sintetizar os novos compostos, caracterizar estruturalmente os compostos, avaliar a atividade microbiológica *in vitro* contra as cepas de *Candida albicans* das chalconas sintetizadas e posterior citotoxicidade *in vitro* para as chalconas sintéticas mais ativas. Finalmente, será analisado o perfil farmacocinético-toxicológico *in silico* dos compostos sintéticos mais ativos e faremos uma proposta para o mecanismo de ação dos compostos estudados.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Realizar estudo *QSAR clássico* para uma série de chalconas com atividade biológica contra cepas de *Candida albicans*, com intuito de obter modelos multidimensionais lineares segundo a abordagem de Hansch-Fujita, por intermédio do método quimiométrico: Regressão por Quadrados Mínimos Parciais (PLS);
- Propor a síntese de chalconas levando em consideração os modelos multidimensionais propostos;
- Sintetizar e caracterizar estruturalmente as chalconas propostas;
- Avaliar a atividade microbiológica *in vitro* dos derivados sintetizados contra as cepas de *Candida albicans*;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos derivados sintetizados mais ativos;
- Realizar a validação externa do modelo QSAR-2D proposto utilizando os compostos mais ativos sintetizados como série externa;

- Avaliar o perfil de toxicidade *in silico* (mutagenicidade, tumorigenicidade, irritabilidade e efeito no sistema reprodutor) dos compostos sintetizados mais ativos;
- Avaliar o perfil farmacocinético *in silico* *Drug-Likeness* e *Drug-Score* para os compostos sintetizados mais ativos;
- Aplicar a Regra de Lipinski para as chalconas mais ativas com intuito de prever a biodisponibilidade oral dos derivados;
- Propor um provável mecanismo de ação para as chalconas estudadas neste trabalho.

## SUBDIVISÃO DO TRABALHO

A primeira parte deste trabalho (**Parte A**) consistiu na realização do estudo QSAR clássico com intuito de propor a síntese orgânica de novos derivados análogos de chalcona.

A segunda parte deste trabalho (**Parte B**) consistiu na síntese de novas chalconas, caracterização estrutural dos compostos sintetizados, avaliação da atividade microbiológica *in vitro* contra as cepas de *Candida albicans*, avaliação da citotoxicidade *in vitro* para as chalconas mais ativas.

A terceira parte deste trabalho (**Parte C**) consistiu na realização da validação externa para os compostos mais ativos avaliados microbiologicamente, avaliação do perfil toxicológico *in silico*, avaliação do perfil farmacocinético *in silico* e proposta para o mecanismo de ação antifúngica de chalconas.



## **Parte A**

# **Estudo QSAR clássico e Proposta de Síntese de Novas Chalconas**

## **1. CONSIDERAÇÕES GERAIS**



O planejamento computacional de fármacos é uma área de rápido crescimento que atualmente é considerada como sendo uma componente fundamental na Química Medicinal. A possibilidade de projetar compostos com propriedades terapêuticas bem definidas evitando enormes custos na área de síntese orgânica é algo que motiva bastante os Químicos Teóricos Computacionais que atuam no estudo das relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade biológica (QSAR).

Basicamente, as técnicas utilizadas em QSAR consideram a existência de uma relação entre as propriedades moleculares de um dado composto com a sua atividade biológica experimental. As propriedades físico-químicas dos compostos bioativos são um reflexo de sua estrutura química e podem ser descritas matematicamente por intermédio de modelos multidimensionais, que na realidade correlacionam os descritores estruturais de uma série de compostos análogos com a atividade biológica observada. Assim, a Química Teórica Computacional é uma disciplina fundamental nos estudos QSAR, pois utiliza métodos matemáticos para o cálculo das propriedades moleculares e para a simulação molecular. Outra disciplina de extrema importância nos estudos QSAR é a Quimiometria, pois por intermédio dela se utiliza métodos estatísticos multivariados na análise de matrizes de dados químicos complexos, obtendo equações multiparâmetros por intermédio de métodos de regressão múltipla.

Pelo contexto mencionado, nos estudos QSAR nota-se uma multidisciplinaridade envolvendo as ciências exatas e biológicas com o objetivo de prever a atividade biológica de compostos análogos e assim possibilitar modificações moleculares nos compostos em estudo no sentido de planejar novos compostos químicos com maior atividade biológica, melhor

eficiência terapêutica, menor toxicidade e o estudo dos possíveis mecanismos de ação dos compostos. A análise QSAR consta de várias etapas, como: planejamento dos objetivos, a determinação da geometria molecular dos compostos, o cálculo de parâmetros físico-químicos, a análise estatística multivariada, o estabelecimento de modelos matemáticos, a validação dos modelos propostos e finalmente a interpretação da equação multiparâmetros estabelecida.

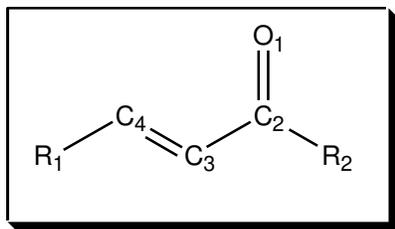
Neste trabalho levaremos em consideração que a atividade biológica de compostos está relacionada com a energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) envolvida na interação fármaco-receptor. Esta abordagem que envolve a correlação de descritores sob o ponto de vista termodinâmico é chamada de Abordagem Extratermodinâmica, e constitui a base da análise de Hansch-Fujita (HANSCH e FUJITA, 1964), considerada como QSAR *clássico* ou QSAR-2D.

A maior finalidade deste trabalho (Parte A) é investigar se a metodologia computacional QSAR-2D realmente auxilia no planejamento de novas chalconas mais ativas, que por intermédio da síntese orgânica destes derivados possamos avaliar a atividade biológica dos compostos sintetizados. Caso o planejamento seja concretizado, estaríamos constituindo uma tríade entre a Química Teórica Computacional, a Síntese Orgânica e a Farmacologia. Esta tríade é conhecida como, a tríade da Química Medicinal baseada na abordagem fisiológica, e também chamada de *Princípio de Price* (MONTANARI, 2011).

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

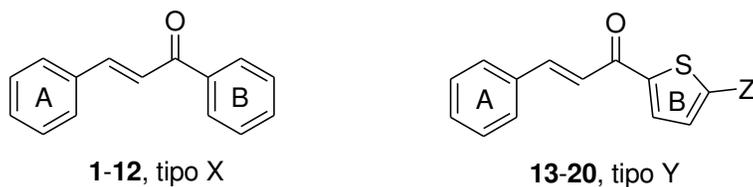


Objetivando o estudo das relações quantitativas entre estrutura química-atividade biológica, utilizamos os dados da literatura segundo o paper de Bag e colaboradores (BAG, RAMAR e DEGANÉ, 2008). A estrutura química das chalconas apresenta um esqueleto protótipo representada de acordo com a [Figura 1A]. Os dados de atividade microbiológica referem-se ao MIC: Concentração Inibitória Mínima em mol.L<sup>-1</sup> (molar), que indica a atividade biológica dos compostos determinados experimentalmente necessária para inibição das cepas resistentes de *Candida albicans* (NCIM 3446). Os dados foram convertidos em escala – log MIC que indica pMIC [Tabela 1A]. O antifúngico fluconazol foi usado como controle nos ensaios biológicos.



**Figura 1A:** Esqueleto básico de uma chalcona.

A proposta do presente trabalho é realizar um estudo Químico Quântico QSAR para as chalconas [Tabela 1A] com finalidade de investigar quais propriedades moleculares (descritores) são relevantes no intuito de descrever a atividade biológica experimental dos compostos e propor um possível modo de interação destes compostos análogos. Levamos em consideração a abordagem de Hansch-Fujita (HANSCH e FUJITA, 1964) na análise QSAR clássica para obter modelos multidimensionais lineares através do método quimiométrico PLS.

**Tabela 1A:** Série de treinamento utilizada no estudo QSAR *clássico*.

| Composto | Tipo | RA                   | RB                 | Z  | pMIC  |
|----------|------|----------------------|--------------------|----|-------|
| 01       | X    | 4-SCH <sub>3</sub>   | 4-F                | -  | 4,531 |
| 02       | X    | 4-SCH <sub>3</sub>   | 4-Cl               | -  | 4,159 |
| 03       | X    | 4-SCH <sub>3</sub>   | 4-Br               | -  | 3,522 |
| 04       | X    | 4-SCH <sub>3</sub>   | 2,4-Cl             | -  | 3,208 |
| 05       | X    | 4-SCH <sub>3</sub>   | 4-NO <sub>2</sub>  | -  | 3,477 |
| 06       | X    | 4-SCH <sub>3</sub>   | 4-OCH <sub>3</sub> | -  | 4,152 |
| 07       | X    | 4-SCH <sub>3</sub>   | H                  | -  | 3,804 |
| 08       | X    | 4-SCH <sub>3</sub>   | 4-OH               | -  | 3,829 |
| 09       | X    | 4-SCH <sub>3</sub>   | 2-OH               | -  | 4,130 |
| 10       | X    | 4-SCH <sub>3</sub>   | 3-OH               | -  | 3,829 |
| 11       | X    | 4-SCH <sub>3</sub>   | 4-fenil            | -  | 3,120 |
| 12       | X    | 2,3-OCH <sub>3</sub> | 4-OCH <sub>3</sub> | -  | 4,474 |
| 13       | Y    | 4-SCH <sub>3</sub>   | -                  | H  | 4,716 |
| 14       | Y    | 4-SCH <sub>3</sub>   | -                  | Br | 3,832 |
| 15       | Y    | 3,4-OCH <sub>3</sub> | -                  | H  | 4,136 |
| 16       | Y    | 3,4-OCH <sub>3</sub> | -                  | Br | 3,548 |
| 17       | Y    | 4-fenil              | -                  | H  | 3,064 |
| 18       | Y    | 4-fenil              | -                  | Br | 3,169 |
| 19       | Y    | 4-OCH <sub>3</sub>   | -                  | H  | 4,086 |
| 20       | Y    | 4-OCH <sub>3</sub>   | -                  | Br | 3,508 |

pMIC = - log MIC; \* MIC = Concentração Inibitória Mínima (molar); RA: substituintes em anel A para compostos do tipo X e Y; RB: substituintes em anel B para compostos do tipo Y; Z: substituintes em anel B para compostos tipo Y. Os autores não citam o valor de MIC do fluconazol, que foi o controle utilizado.

## 2.1 Otimização de Geometria e Análise Conformacional

A informação da estrutura química de uma molécula de cada composto análogo está relacionada ao arranjo tridimensional (3D), com as propriedades eletrônicas de regiões específicas da molécula, com suas propriedades

estereoquímicas, a topologia molecular e aos seus aspectos dimensionais. Sabe-se que a otimização da geometria molecular consiste na minimização da energia estérica de um modelo inicial resultando estruturas mais estáveis.

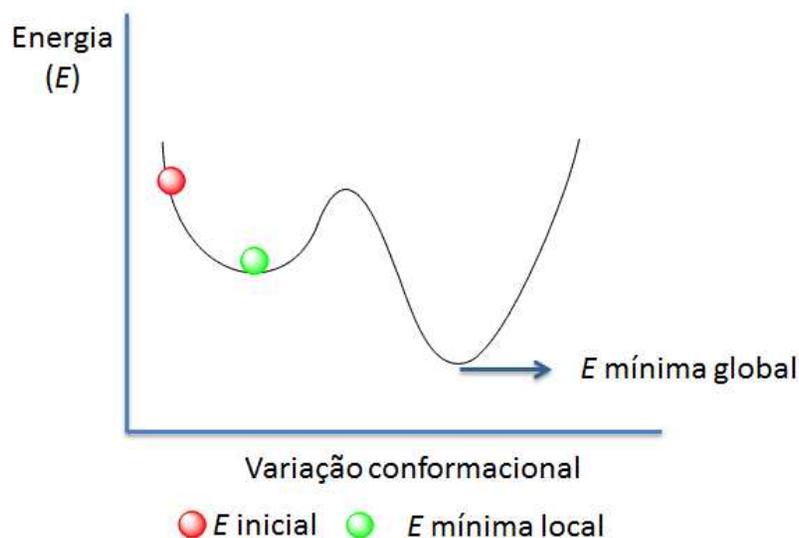
Seja qual for o programa utilizado no desenho 3D das estruturas químicas para cada derivado análogo, as moléculas inicialmente não estão na geometria molecular mais adequada, isto é, em sua conformação mais estável. Durante o processo de desenho da estrutura química, ocorrem distorções em ligações químicas, nos ângulos entre as ligações e nos ângulos diedrais. Além das distorções, ocorrerá também interação entre átomos não ligantes, competindo com a mesma região no espaço, justificando assim, as elevadas repulsões estéricas, aumentando o valor absoluto da componente função potencial  $E_{\text{non-bonded}}$ , seja por interação de van der Waals ou interação eletrostática Coulombiana (LEACH, 2001) e (CARVALHO *et al*, 2003). Portanto, a molécula desenhada em 3D não está numa conformação estável e muito menos na mais estável, necessitando de alterações em sua estrutura química inicial de forma a reduzir a energia potencial ( $E_{\text{total}}$ ) (CARVALHO *et al*, 2003).

Sabemos que mesmo realizando a minimização energética (otimização geométrica), obteremos necessariamente a estrutura química mais estável, pois ao executar o cálculo de minimização, o programa computacional pára ao encontrar mínimos de energia, mas não necessariamente será um mínimo correspondente à conformação mais estável. Os mínimos de energia encontrados representam conformações estáveis e são chamados de *mínimos locais* [Figura 2A]. Os mínimos locais fornecem informações a respeito do arranjo espacial de uma das muitas conformações encontradas (THOMAS, 2007) e (JENSEN, 2007).

A estabilidade molecular pode ser explicada em termos de energia potencial. Uma molécula pode apresentar várias conformações com baixa energia potencial. Se o programa encontrar o estágio molecular de menor energia potencial, então, ter-se-á a informação a respeito do arranjo espacial mais estável. Este estado energético da molécula é denominado de *mínimo global* [Figura 2A] sendo que a estrutura química de uma molécula só pode apresentar um estado assim. Quando dizemos que determinada molécula encontra-se em um mínimo global, isso significa que sua estrutura apresenta a menor energia em uma superfície potencial (TRSIC e SIQUEIRA-PINTO, 2009). Entre o estado de mínimo local e o de mínimo global existe uma barreira de energia potencial que conduz a um estágio molecular de mais alta energia potencial. Este estágio molecular é considerado estado de transição molecular e pode também ser chamado de *saddle point* [Figura 2A] (THOMAS, 2007), (PATRICK, 2002) e (JENSEN, 2007).

O maior dilema consiste em saber qual será a conformação biologicamente ativa. Por mais que façamos a minimização energética, a otimização geométrica e a análise conformacional para as estruturas químicas de cada derivado levando em consideração as ligações químicas com possibilidade de giro rotacional, nada garante que a estrutura química resultante seja a conformação biologicamente ativa (LEACH, 2001) e (JENSEN, 2007).

Não há como saber qual será a conformação bioativa sem estudos experimentais, pois isto geralmente utiliza-se a conformação de mais baixa energia. Teoricamente, esta será a conformação com maior probabilidade e em maior número durante o processo de interação com o receptor. Quanto maior for à presença de ligações químicas com possibilidade de giro rotacional, maior será a dificuldade em encontrar a estrutura química de menor energia para o composto em estudo (SADOWSKI, SCHWAB e GASTAIGER, 2004).



**Figura 2A:** Diagrama de energia potencial  $x$  variação conformacional.<sup>8</sup>

A minimização energética, a otimização da geometria e a análise conformacional da estrutura química inicial podem ser realizadas por métodos Mecânicos Moleculares (MM), Quânticos (MQ) ou pela combinação dos dois métodos (MM/MQ) (MORGON, 2001). Assim, durante o processo de obtenção da geometria molecular estável, ocorrerão ajustes nas coordenadas atômicas no sentido de obter uma conformação com menor energia potencial possível (THOMAS, 2007) e (LEACH, 2001).

A busca pela geometria molecular estável das estruturas químicas dos compostos pode ser realizada computacionalmente por intermédio de três procedimentos (MUNDIM, 2003):

1. **Cálculo das derivadas da função energia potencial:** determinação das estruturas estáveis pelo método dos gradientes;
2. **Mapeamento da hiper-superfície de energia:** determinação das estruturas estáveis através de métodos estocásticos;

<sup>8</sup> Adaptado de (CARVALHO *et al*, 2003).

### 3. **Evolução temporal do sistema molecular:** determinação das estruturas estáveis através de simulação Dinâmica Molecular (MD).

Neste trabalho, utilizaremos o procedimento de cálculo das derivadas da energia potencial através dos métodos gradientes que podem ser classificados em (MUNDIM, 2003):

- Método gradiente Steepest descents ou método do máximo declive;
- Método Newton-Raphson ou método gradiente conjugado;
- Método Fletcher-Powell;
- Método Simplex ou
- Combinação dos métodos mencionados anteriormente.

Um procedimento muito utilizado é a obtenção do desenho 3D de estruturas similares às chalconas a partir de raios-X, que podem ser obtido no PDB, ou em bancos específicos para moléculas menores, como a Cambridge Structural Database (<http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd>). A análise conformacional da estrutura química de uma molécula é realizada pela rotação (giro) da ligação covalente sigma, com mudança paralela dos ângulos torsionais ou diédricos das ligações, e cálculos correspondentes de energia estérica, decorrente da sobreposição espacial de átomos não ligados e barreiras torsionais de ligação (ANDRADE, TROSSINI e FERREIRA, 2010).

Preocupamos em utilizar uma metodologia consistente, no sentido em minimizar ao máximo a energia potencial das estruturas químicas para cada derivado de chalcona, pois o processo de minimização da energia potencial permite obter estruturas químicas mais estáveis e com uma maior probabilidade de aproximação da conformação bioativa.

Para a execução dos cálculos foi utilizado um computador pessoal Core-seven equipado com sistema operacional Windows® Seven. As estruturas

químicas das chalconas foram desenhadas e visualizadas em 3D utilizando o programa ACD/ChemSketch versão 12.0 (Advanced Chemistry Development, Inc., 2010). O primeiro passo para otimização da geometria molecular das chalconas [Tabela 1A] foi executada com a utilização do método semi-empírico Hamiltoniano PM3 (Parametric Method 3) através do programa Arguslab versão 4.0 (Thompson and Planaria Software LLC, Inc., 2004). As opções utilizadas para as chalconas de estudo no programa Arguslab via método semi-empírico PM3 foram:

|   |  |  |
|---|--|--|
| <b>Menu Setup:</b><br>Semi-empirical PM3      | <b>Charge and Spin:</b><br>Total charge = 0;<br>Spin multiplicity = 1;<br>Spin pairing = RHF | <b>SCF controls:</b><br>Accelerate convergence;<br>State: Lowest |
| <b>Menu compute:</b><br>Geometry optimization | <b>Algoritmo:</b><br>Steepest descentes  | <b>RMS gradiente:</b><br>0,1 Kcal/Å mol                          |

Após realizar este primeiro procedimento, a estabilidade molecular foi obtida utilizando a Teoria do Funcional de Densidade (Density Functional Theory - DFT) via método híbrido B3LYP (Becke, Lee, Yang e Parr) empregando a função de base 6-31G (B3LYP/6-31G) no programa ChemSitePro versão 9.0 (ChemSW, Inc., 2009). Posteriormente minimizamos a energia molecular das estruturas químicas pelo método Simplex utilizando constante dielétrica igual a  $\epsilon = 46,7$  para simular ambiente DMSO (dimetilsulfóxido), com potencial Lennard-Jones 6-12 e função ligação de hidrogênio (Hydrogen Bond Function). Esta minimização energética foi executada com auxílio do pacote computacional Molecular Modeling Pro Plus (MMPP) versão 6.3 (ChemSW, Inc., 2004), utilizando os seguintes parâmetros:

| <b>Menu Geometry:</b> | <b>Minimization:</b>                               | <b>Strain unbonded:</b>   |
|-----------------------|--|---|
| Minimize geometry     | <u>Método Simplex</u><br>Maximum iterations = 1000 | Potencial 6-12 Lennard-Jones<br>Constante dielétrica ( $\epsilon = 46,7$ )<br>Use H-bond function |

Finalmente, executamos a análise conformacional para todos os compostos com auxílio do pacote computacional MMPP versão 6.3. A análise conformacional foi realizada para cada estrutura química utilizando simultaneamente o giro em  $10^\circ$  das duas ligações simples (C2-R2 e C4-R1) [Figura 1A], fixando Root Mean Square Gradiente (RMS) em 0.1 Kcal/molÅ, potencial Lennard-Jones 6-12 e constante dielétrica igual a  $\epsilon = 46,7$ . Os confôrmeros de mais baixa energia obtidos foram utilizados na análise Química Quântica QSAR. Utilizamos o método de busca sistemática para a análise conformacional onde o número de conformações resultantes pode ser calculado pela [Equação 4].

$$\text{Número de conformações} = (360/m)^n \quad \text{Eq. 4}$$

onde, m = ângulo de incremento (graus); n = número de ligações rotacionáveis (KROGSGAARD-LARSEN *et al*, 1996) e (LEACH, 2001).

Devemos levar em consideração que os valores da energia total pós-otimização geométrica e análise conformacional das estruturas químicas das chalconas de estudo são bem diferentes quando em meios distintos, ou seja, utilizando diferentes constantes dielétricas [vácuo ( $\epsilon = 1$ ) ou em meio solvente DMSO ( $\epsilon = 46,7$ )]. Por este motivo utilizamos o método de minimização energética do tipo Simplex com constante dielétrica 46,7 (meio DMSO), visto que as chalconas estudadas são dissolvidos em dimetilsulfóxido antes de serem avaliados microbiologicamente *in vitro* contras as cepas resistentes de *Candida albicans*.

## 2.2 Cálculo de Parâmetros Físico-químicos

Em *QSAR clássico*, as propriedades moleculares calculadas são denominadas de parâmetros físico-químicos e, posteriormente, na próxima etapa do trabalho (análise estatística multivariada: PLS) serão chamadas de variáveis independentes ou descritores. A segunda etapa do *QSAR clássico* deu-se no cálculo das diversas propriedades moleculares utilizando a estrutura química dos conformeros de mais baixa energia.

Os parâmetros físico-químicos calculados [Tabela 2A] são de natureza: hidrofóbica, eletrônica, estereoquímica, termodinâmica, topológica, dimensional e geométrica. Todas as propriedades moleculares foram calculadas utilizando o pacote computacional MMPP versão 6.3 e o programa ChemSitePro versão 9.0. Os parâmetros eletrônicos calculados foram subdivididos em propriedades de natureza empírica e quântica. Para os parâmetros eletrônicos empíricos utilizamos o pacote computacional MMPP, enquanto para os parâmetros eletrônicos quânticos utilizamos o programa ChemSitePro. Todos os parâmetros eletrônicos quânticos, inclusive os Mapas de Potencial Eletrostático Molecular (MEP) e as energias dos orbitais de fronteira: Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia (HOMO) e Orbital Molecular Desocupado de Menor Energia (LUMO) foi determinado utilizando o método da Teoria do Funcional de Densidade (DFT-B3LYP/6-31G).

**Tabela 2A:** Propriedades moleculares calculadas

| NATUREZA DOS PARÂMETROS | PROPRIEDADES MOLECULARES  |
|-------------------------|---|
| HIDROFÓBICOS<br>(24)    | Log P Hansch; Log P Ghose; Log P Moriguchi; MR Ghose; Q Log P; V.M. Q Log P; HLB Volumétrico; P.S. Hansen 3D; Dispersão de Hansen 3D; Polaridade de Hansen 3D; Ligação de Hidrogênio de Hansen 3D; P.S. Krevelen 3D; Dispersão de Krevelen 3D; Polaridade de Krevelen 3D; Ligação de Hidrogênio de Krevelen 3D; V.M. Krevelen 3D; Energia de Coesão; Área |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
|                               | Superficial Hidrofílica; % Área Superficial Hidrofílica; Tensão Superficial; S.W. Klopman; Log S.W. Klopman; Log Molar S.W. Hansch; Log Molar S.W. Ghose.   |
| DIMENSIONAIS<br>(08)          | Volume de van der Waals <sup>i</sup> ; Área Superficial <sup>i</sup> ; Densidade <sup>i</sup> ; Volume Molecular <sup>i</sup> ; Comprimento Molecular; Largura Molecular; Profundidade Molecular; Número de Centros Atômicos.   |
| TOPOLÓGICOS<br>(06)           | Índice de Wiener 3D; Índice de Balaban Q; Índice de Balaban S; Índice de Balaban D; Índice de Balaban A; Índice de Balaban P.   |
| ELETRÔNICOS QUÂNTICOS<br>(29) | Calor de Formação; Energia Total; E <sub>HOMO</sub> ; E <sub>HOMO - 1</sub> ; E <sub>HOMO - 2</sub> ; E <sub>LUMO</sub> ; E <sub>LUMO + 1</sub> ; E <sub>LUMO + 2</sub> ; q (O1); q (C2); q (C3); q (C4); q (CA); q (CM); q (CP); q (CB); Momento de Dipolo Molecular; $\eta$ ; 1/ $\eta$ ; Eletronegatividade de Mülliken; Gap; Hydrogen Bond Donor; Hydrogen Bond Acceptor; DE (O1); DE (C2); DE (C3); DE (C4); DE (CA); DE (CB). |
| ELETRÔNICOS EMPÍRICOS<br>(04) | Hamett $\sigma^*$ (A); Hamett $\sigma$ -para (A); Hamett $\sigma$ -meta (A); Hamett $\sigma$ -induction (A).  |
| ESTEREOQUÍMICOS<br>(11)       | Refratividade Molar <sup>ii</sup> ; Verloop L1 (A); Verloop B1 (A); Verloop B2 (A); Verloop B3 (A); Verloop B4 (A); Verloop L1 (B); Verloop B1 (B); Verloop B2 (B); Verloop B3 (B); Verloop B4 (B).   |
| TERMODINÂMICOS<br>(04)        | Energia Livre de Gibbs; Potencial de Ionização <sup>iii</sup> ; Parachor; H.B.N.  |
| GEOMÉTRICOS<br>(08)           | $\alpha$ (O1C2CB); $\alpha$ (C2C3C4); $\alpha$ (C3C4CA); d (C2CB); d (O1C2); d (C2C3); d (C3C4); d (C4CA).  |

P: Coeficiente de Partição; MR: Refratividade Molar; V.M: Volume Molecular; HLB: Balanço Hidrofílico-Lipofílico; P.S.: Parâmetro de Solubilidade; S.W.: Solubilidade em H<sub>2</sub>O; q: Carga Parcial de Mülliken; E<sub>HOMO</sub>: Energia do Orbital Molecular Mais Alto Ocupado e E<sub>LUMO</sub>: Energia do Orbital Molecular Mais Baixo Desocupado; Gap: E<sub>HOMO</sub> - E<sub>LUMO</sub>;  $\eta$  (Hardness: dureza molecular) = (E<sub>LUMO</sub> - E<sub>HOMO</sub>)/2; (Softness: moleza molecular) = 1/ $\eta$ ;  $\sigma$ : Constante Substituinte Hammett; CM: Carbono-meta em substituinte A; CP: Carbono-para em substituinte A; DE: Densidade Eletrônica; H.B.N.: Número de Ligações de Hidrogênio;  $\alpha$ : Ângulo entre Ligações; d: Distância Interatômica; <sup>i</sup> Estas propriedades moleculares são consideradas em muitos trabalhos como parâmetros físico-químicos geométricos e alguns autores ainda as consideram como sendo estéricos; <sup>ii</sup> Alguns autores consideram a refratividade molar como sendo uma propriedade molecular de caráter misto estereo-hidrofóbico; <sup>iii</sup> O potencial de ionização para alguns autores pode ser considerado como um parâmetro eletrônico quântico.

### 2.2.1 Parâmetros Hidrofóbicos

São parâmetros relacionados à solubilidade e ao transporte do fármaco em meio biológico. As propriedades moleculares desta natureza constituem

medidas do caráter hidrofóbico e hidrofílico dos fármacos, e estão associados à passagem das substâncias químicas por membranas biológicas. A mudança nos substituintes de um protótipo pode alterar significativamente o caráter hidrofóbico ou hidrofílico e conseqüentemente a sua atividade biológica. Não devemos esquecer que, substâncias que apresentam elevado caráter hidrofóbico, atravessam as membranas biológicas com maior facilidade, interagem com maior intensidade com as proteínas plasmáticas e podem atravessar a barreira hematoencefálica, atingindo o Nervoso Central (SNC) (BARREIRO e FRAGA, 2008). Portanto, é importante termos uma previsibilidade quantitativa do caráter hidrofóbico e hidrofílico dos compostos pesquisados para que possamos correlacionar a sua estrutura química com a solubilidade. Um composto deve ter um balanço de propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas para ser um fármaco de sucesso. Desse modo, a sua estrutura química deve ser projetada para ser compatível tanto em fase aquosa e como lipídica.

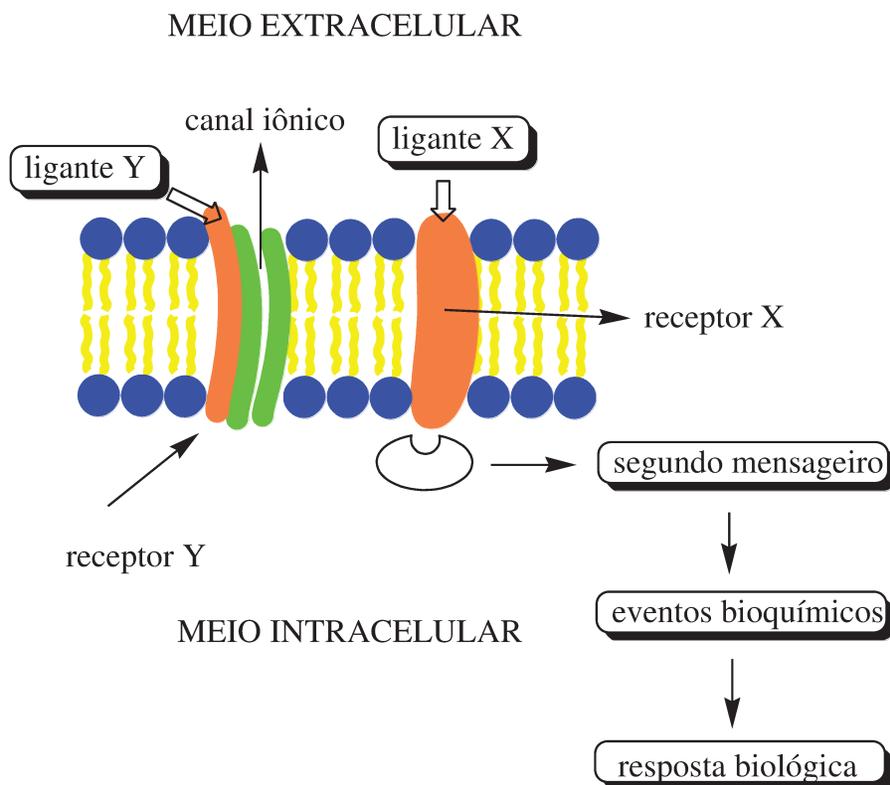
A hidrofobicidade também se relaciona a inúmeros fatores: interação do fármaco às proteínas plasmáticas, acúmulo de fármacos nos tecidos, reconhecimento do fármaco pelo receptor e afinidade fármaco-receptor. Para um fármaco exercer seu efeito biológico, deverá passar por um conjunto de processos farmacocinéticos: absorção, distribuição, biotransformação e excreção (ADME), além dos mecanismos farmacodinâmicos, ao interagir com seu sítio de ação (BRESOLIN e CECHINEL-FILHO, 2010) e (KATZUNG, 2010). Utilizaremos o termo ligante para a molécula do fármaco ou droga, e o termo receptor, bioreceptor ou biomacromolécula, para a estrutura biológica (proteína ou glicoproteína) presente na membrana ou no interior das células que apresenta o sítio alvo do ligante, e que, produz ou não uma resposta

biológica diante a interação ligante-receptor (KATZUNG, 2010), (GOLAN *et al*, 2009) e (RANG *et al*, 2004).

Os fármacos geralmente atravessam as barreiras celulares por difusão passiva ou mediada por transportadores. O principal fator que determina a taxa de transferência por difusão passiva pelas biomembranas é a lipossolubilidade da substância. A transferência do fármaco por transportadores envolve uma proteína transmembrana, que se liga à molécula ou íon em um dos lados da membrana, ocorrendo alteração conformacional na proteína e posterior liberação no outro lado da membrana (RANG *et al*, 2004).

De modo geral a interação entre o ligante e o bioreceptor resulta em dois mecanismos básicos:

- A) Interação do ligante na superfície extracelular do receptor promovendo a ativação de um segundo mensageiro, que posteriormente desencadeará uma cascata de eventos bioquímicos para gerar a resposta fisiopatológica;
- B) Interação do ligante com receptor resultando em abertura de canal iônico na membrana biológica (THOMAS, 2007) [Figura 3A].



**Figura 3A:** Efeitos da interação entre ligantes e bioreceptores<sup>9</sup>

Uma propriedade molecular hidrofóbica muito pesquisada é o coeficiente de partição (P) [Equação 5], usualmente estabelecida na escala logarítmica ( $\log P$ ). De modo geral, compostos que apresentam  $\log P < 0$  ( $P < 1$ ) são extremamente hidrofílicos para serem candidatos a fármacos, pois teriam dificuldade de permear membranas biológicas. Já compostos com  $\log P > 0$  ( $P > 1$ ) são extremamente hidrofóbicos, de forma que não se solubilizariam em meio aquoso. Portanto, se um determinado composto apresenta valor de  $\log P$  muito alto ou muito baixo, os pesquisadores tentam modificar a sua estrutura química por intermédio de substituintes a fim de alterar o coeficiente de partição de maneira previsível (PANDIT, 2008), (BRESOLIN e CECHINEL-FILHO, 2010) e (HANSCH e LEO, 1995).

$$P = [\text{orgânica}] / [\text{aquosa}] \quad \text{Eq. 5}$$

<sup>9</sup> Figura cedida por W. P. Almeida – Material de Apoio – FR 507

O coeficiente de partição é determinado pela medida da partição do composto entre uma fase lipídica (usualmente 1-octanol) e uma fase aquosa (tampão fosfato pH = 7,4), através do método *shake flash*. O sistema 1-octanol/H<sub>2</sub>O é utilizado como referência, pois 1-octanol simula com bastante eficiência as biomembranas. Após a realização da partição do composto, a quantificação da concentração da substância em cada uma das fases pode ser determinada por diferentes metodologias: titulação, potenciometria, espectroscopia de ultravioleta e até por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (BRESOLIN e CECHINEL-FILHO, 2010) e (PANDIT, 2008).

Outro detalhe interessante reside na circunstância do processo de comunicação celular ocorrer por meio de interação entre as moléculas ligantes e seus receptores. Então ligantes mais hidrofílicos interagem com os receptores na superfície celular, enquanto os ligantes mais hidrofóbicos podem interagir com receptores intracelulares após atravessarem membranas biológicas (BARREIRO e FRAGA, 2008).

### **2.2.2 Parâmetros Eletrônicos**

São parâmetros relacionados com a distribuição eletrônica na molécula, com a facilidade com que essa distribuição possa ser modificada e também estão associados às forças de interação fármaco-meio e fármaco-receptor.

As interações fármaco-meio e fármaco-receptor estão relacionadas, com uma série de mecanismos que dependem da distribuição eletrônica na molécula, que por sua vez estão relacionados à distribuição das cargas atômicas parciais na molécula. É importante lembrar que os alguns fármacos em meio aquoso estão sujeitos aos processos de ionização ou dissociação iônica, portanto a passagem dos fármacos por membranas biológicas

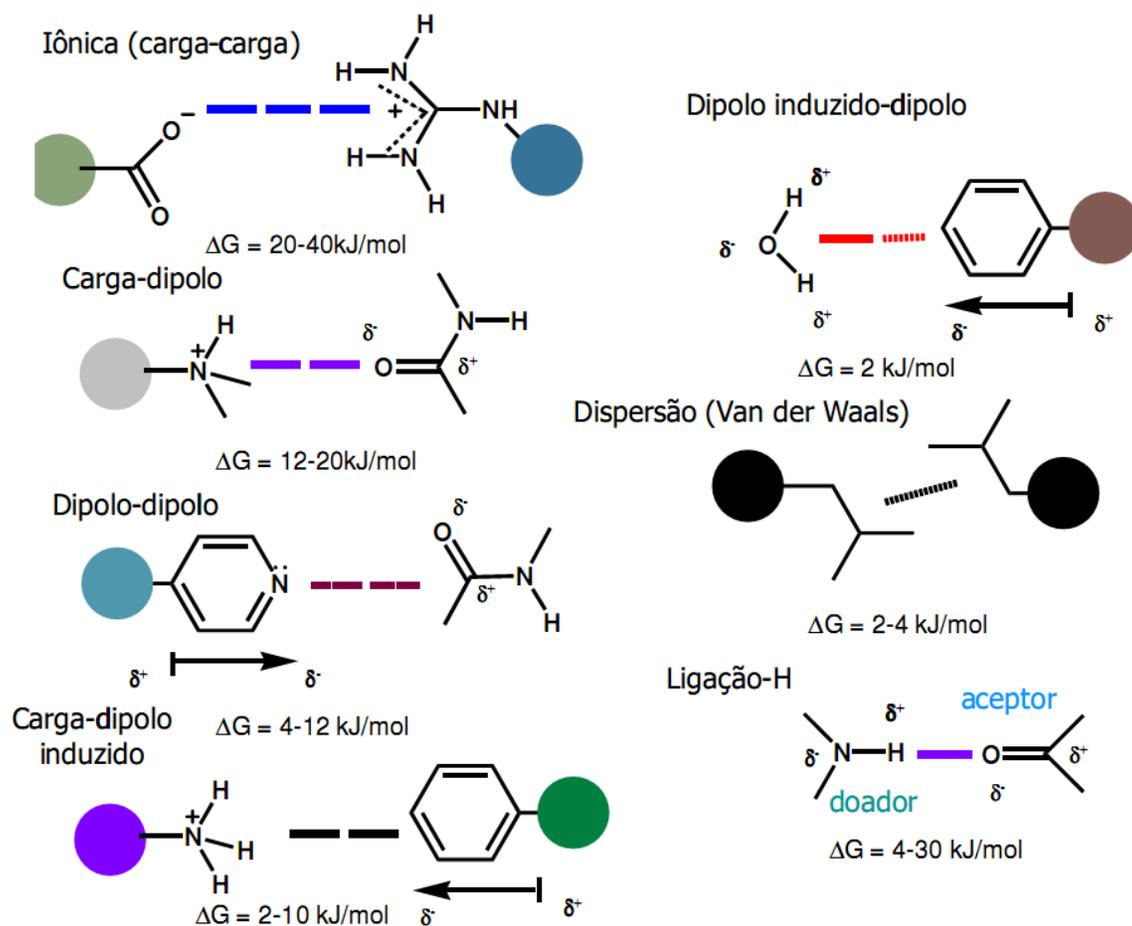
dependerá do pH do meio e do  $pK_i$  ( $-\log K_i$ ) das substâncias (FRAGA, 2001). Geralmente os fármacos são ácidos fracos e bases fracas e o seu  $pK_i$  ( $pK_a$  ou  $pK_b$ ) pode ser determinado pela equação de Henderson-Hasselbach (GENNARO, 2004) e (RANG *et al*, 2004).

O mecanismo de passagem dos fármacos pelas biomembranas está intimamente associado à constante de ionização ( $K_i$ ) destes, visto que, espécies químicas polares e apolares não ionizadas (moleculares) atravessam as membranas biológicas com maior facilidade por apresentarem neutralidade molecular. Substâncias químicas que sofrem ionização ou dissociação iônica em meio aquoso resultam partículas eletricamente carregadas, que normalmente encontram-se solvatadas por moléculas de água, o que dificulta o processo de difusão do fármaco pelas membranas (FLORENCE e ATTWOOD, 2003), (GOLAN *et al*, 2009) e (RANG *et al*, 2004).

O fármaco em presença do sítio-alvo biológico resultará em interações intermoleculares entre o ligante-receptor, portanto, a distribuição eletrônica em sua estrutura química é fundamental para a compreensão dos processos energéticos envolvidos, e na elucidação dos principais tipos de forças envolvidas no reconhecimento molecular ligante-sítio receptor, ou seja, correlaciona com a atividade biológica (THOMAS, 2007) e (BARREIRO e FRAGA, 2008).

Os fármacos estruturalmente específicos exercem seu efeito biológico pela interação seletiva (estereoseletividade) com um determinado receptor. Então, o reconhecimento molecular do fármaco pelo bioreceptor depende do arranjo espacial dos grupamentos funcionais da molécula ligante, que devem ser complementares ao sítio de ligação no receptor, ou seja, deve haver um mecanismo de complementaridade molecular (BARREIRO e FRAGA, 2008).

Do ponto de vista qualitativo, o grau de afinidade e a especificidade da interação ligante-sítio receptor são determinados por interações intermoleculares, que podem ser do tipo: forças eletrostáticas (iônicas), forças de dispersão, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio ou por ligações covalentes (FRAGA, 2001) e (BARREIRO e FRAGA, 2008) [Figura 4A]. Geralmente, a ocorrência de ligação covalente entre o ligante e o bioreceptor caracteriza uma interação química forte, com envolvimento de elevada energia (50-150 Kcal/mol), promovendo uma inibição enzimática irreversível (inibidores suicidas) ou inativação do sítio-receptor (THOMAS, 2007) e (KATZUNG, 2010).



**Figura 4A:** Principais interações ligante-bioreceptor e energias livres de Gibbs

Quantitativamente, os fármacos estruturalmente específicos apresentam duas etapas relevantes na interação ligante-bioreceptor:

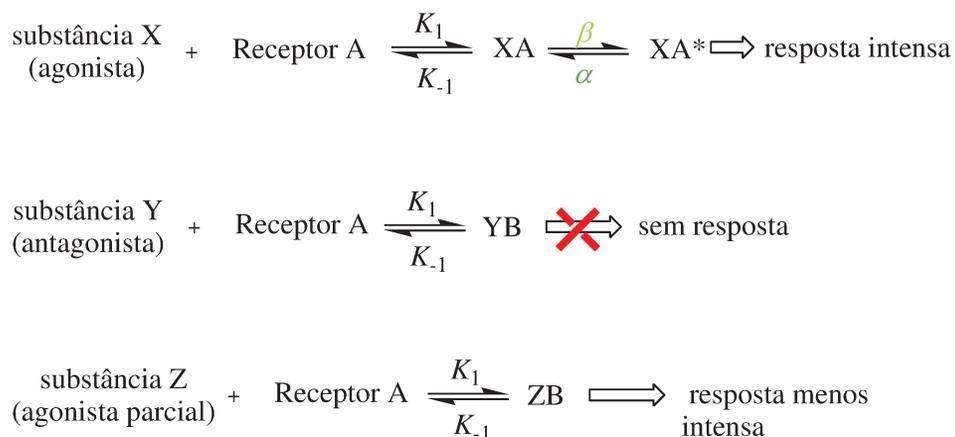
- A) Interação ligante-bioreceptor: Expressa pelo termo afinidade molecular e indica a capacidade do ligante em complexar com o sítio do receptor;
- B) Produção da resposta biológica: Expressa pelo termo atividade intrínseca e indica a capacidade do complexo ligante-receptor em desencadear uma determinada resposta biológica (WERMUTH, 1996), (FRAGA, 2001), (GOLAN *et al*, 2009), (BARREIRO e FRAGA, 2008) e (RANG *et al*, 2004) [Figura 5A].

A eficácia ou atividade intrínseca ( $\alpha$ ) de um fármaco depende da estabilidade do complexo fármaco-bioreceptor e do número de sítios ocupados pelo bioreceptor. Desta forma, a ocupação do sítio receptor está relacionada com a afinidade molecular do ligante pelo bioreceptor, enquanto a eficácia do ligante é determinada em função da capacidade deste em ativar o receptor, ou seja, capacidade em promover a resposta fisiopatológica. Levando em consideração o processo de ativação (eficácia) dos fármacos, podemos classificá-los em:

- A) Agonista total: possui afinidade molecular e produz resposta biológica (efeito) máxima ( $\alpha = 1$ );
- B) Agonista parcial: possui afinidade molecular e não produz resposta biológica máxima ( $0 < \alpha < 1$ );
- C) Antagonista: possui afinidade molecular e não produz resposta biológica ( $\alpha = 0$ ).

Portanto, a afinidade molecular de um ligante não traduz necessariamente, a capacidade do ligante em produzir uma determinada resposta biológica. Geralmente a afinidade do ligante é representada pelos valores de atividade

biológica como, por exemplo, o  $IC_{50}$ , enquanto a atividade intrínseca do ligante classifica-o em: agonista, agonista parcial e antagonista (FRAGA, 2001), (BARREIRO e FRAGA, 2008) e (WERMUTH, 1996).



**Figura 5A:** Diferença entre agonista, agonista parcial e antagonista.

Como mencionado anteriormente, os parâmetros eletrônicos calculados foram subdivididos em duas categorias:

- **Parâmetros eletrônicos clássicos ou empíricos:** São propriedades moleculares determinadas empiricamente e que caracterizam os efeitos provocados pelos substituintes na molécula. Neste trabalho, foram estimados os valores das constantes de Hammett ( $\sigma$ ) dos substituintes A (R1) para as chalconas de estudo. Os parâmetros eletrônicos empíricos correlacionam à habilidade do substituinte na molécula quanto ao poder em ceder ou atrair elétron. A distribuição dos elétrons na molécula dependerá da natureza dos grupos elétron-retirantes ( $\sigma > 0$ ) e elétron-doadores ( $\sigma < 0$ ), encontrados em uma determinada estrutura química (THOMAS, 2007) e (KUBINYI, 1993).
- **Parâmetros eletrônicos quânticos:** São propriedades moleculares calculadas por intermédio de métodos Mecânicos-Quânticos (MQ). As propriedades de natureza eletrônica quântica foram calculadas utilizando o método da Teoria

do Funcional de Densidade (DFT-B3LYP/6-31G). No programa ChemSitePro, ao executar o *Single Point Energy Calculation* utilizando DFT-B3LYP/6-31G, o programa acompanhará o cálculo da energia em função da densidade eletrônica da molécula no estado fundamental, daí o surge o termo onde uma função é dependente de outra função, portanto é denominada de Teoria do Funcional de Densidade DFT (*Density Functional Theory*) (TRSIC e SIQUEIRA-PINTO, 2009), (ALCÁCER, 2007) e (PARR e YANG, 1989).

### 2.2.3 Parâmetros Estereoquímicos

Para que a molécula de um fármaco possa interagir em um determinado sítio do bioreceptor, é fundamental compreender as suas propriedades estereoquímicas e quais delas são relevantes na complementaridade ligante-sítio receptor da biomacromolécula.

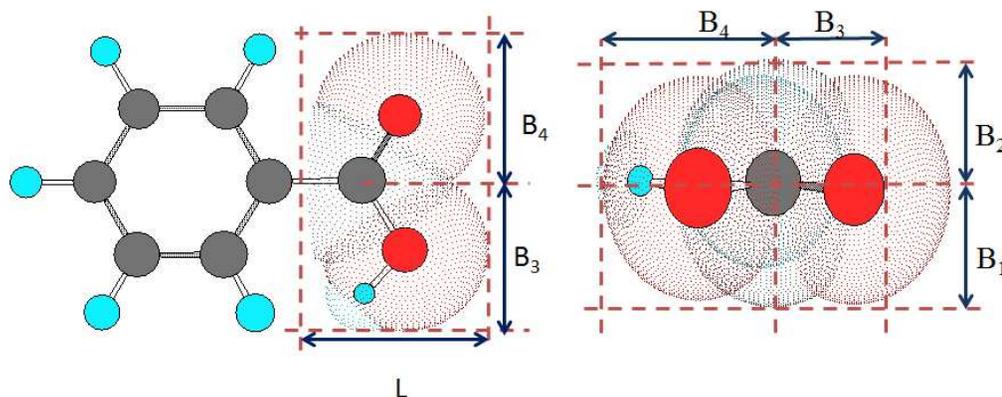
O reconhecimento molecular ligante-receptor envolve interações intermoleculares [Figura 4A] entre a micromolécula (ligante) e a biomacromolécula (receptor). Desta forma, as propriedades moleculares dos substituintes na molécula do ligante interferem no arranjo espacial da região ativa do receptor e são características estruturais do ligante de extrema importância na elucidação das energias envolvidas no reconhecimento ligante-bioreceptor (PATRICK, 2002) e (KROGSGAARD-LARSEN *et al*, 1996).

Grupos substituintes volumosos (elevado volume molecular: VM) podem dificultar a interação ligante-biomacromolécula pela ocorrência de impedimento estereo-espacial, como podem também provocar mudanças conformacionais na região ativa do receptor, facilitando o encaixe ligante-bioreceptor, intensificando assim a afinidade biológica e atividade intrínseca. Pode-se dizer que os parâmetros estereoquímicos estão intimamente

relacionados com as características configuracionais da molécula (KROGSGAARD-LARSEN *et al*, 1996) e (FRAGA, 2001).

De forma análoga, fármacos quirais que apresentam propriedades físico-químicas idênticas, diferenciando-se apenas pela atividade óptica, podem apresentar atividades intrínsecas diferentes. Estes fármacos são denominados de enantioméricos (isômeros R e S), e apresentam diferenciação na atividade intrínseca, em função da natureza quiral dos aminoácidos na região ativa das biomacromoléculas. Este processo refere-se ao fenômeno da quiralidade (estereoisomerismo) e relata a importância do formato espacial da molécula dos fármacos, de forma a permitir a complementaridade ligante-bioreceptor. Diferenças no arranjo espacial entre os estereoisômeros de um fármaco implicam na perda de complementaridade molecular e, conseqüentemente, em perda de afinidade molecular e atividade intrínseca (FRAGA, 2001) e (FOYE e WILLIAMS, 1995).

O comprimento molecular (L1) e os raios (Sterimol Verloop B1-B4) [Figura 6A] dos substituintes são propriedades estruturais estratégicas na compreensão do processo de complexação ligante-bioreceptor, visto que o mecanismo de ação dos fármacos leva em consideração o processo de complementaridade molecular 3D entre os grupos funcionais do ligante e os átomos do centro ativo do receptor (PATRICK, 2002), (KROGSGAARD-LARSEN *et al*, 1996) e (PANDIT, 2008). O cálculo dos parâmetros Sterimol Verloop é determinado em função dos ângulos entre as ligações químicas ( $\alpha$ ), raios de van der Waals (RdW) e comprimentos de ligações químicas (d) (PATRICK, 2002) e (VERLOOP *et al*, 1976).



**Figura 6A:** Parâmetros estereoquímicos de Verloop<sup>10</sup>

A estereo-especificidade (seletiva) entre as moléculas dos ligantes e os seus respectivos alvos biológicos é também explicada pelo envolvimento de interações químicas em locais específicos dos bioreceptores. Caso o bioreceptor seja uma enzima, costuma-se chamar estes locais específicos, de sítios ativos ou centros ativos. Então, é perfeitamente compreensível pesquisarmos as características estereoquímicas dos substituintes nas moléculas dos compostos estudados a fim de “compreendermos” a possível região farmacofórica da molécula e indicar quais propriedades estereoquímicas estão correlacionadas com a atividade biológica (BARREIRO e FRAGA, 2008), (THOMAS, 2007) e (PATRICK, 2001).

A refratividade molar (MR), expressa um parâmetro físico-químico de caráter misto constitutivo-aditivo, sendo, portanto, extremamente dependente da estrutura química do composto. A [Equação 6] indicada por Lorentz-Lorenz, representa a expressão matemática para cálculo da refratividade molar (TAVARES, 2004). Então, a refratividade molar é uma medida do volume molecular (VM) ajustado da estrutura química do composto que contém uma contribuição eletrônica e também de quanto ele se polariza com facilidade, que pode ser indicado pelo índice de refração ( $n$ ) do composto (THOMAS,

<sup>10</sup> Figura cedida por W. P. Almeida – Material de Apoio – FR 507

2007) e (KUBINYI, 1993). Na realidade a polarização molecular da substância é dada pela [Equação 7], pois quando a relação de Maxwell ( $n^2 = \epsilon$ ) é estabelecida, a refratividade molar (MR) iguala-se à polarização molecular ( $P_M$ ) (MONTANARI, MONTANARI e GAUDIO, 2002) e (KUBINYI, 1993).

$$MR = [(n^2 - 1) / (n^2 + 2) \cdot (MM / \rho)] \quad \text{Eq. 6}$$

onde,  $n$  = índice de refração do composto;  $\rho$  = densidade da substância e  $MM$  = Massa molecular do composto; então  $MM / \rho = VM$  (Volume molecular do composto).

$$PM = [(\epsilon - 1) / (\epsilon + 2) \cdot (MM / \rho)] \quad \text{Eq. 7}$$

onde,  $\epsilon$  = constante dielétrica do composto.

A refratividade molar é uma propriedade ambivalente. Ela pode representar a presença de forças dispersivas no centro ativo auxiliando na interação ligante-bioreceptor, onde neste caso, esperar-se-ia um coeficiente da MR é positivo. Como também, pode representar a capacidade do ligante distorcer a conformação do bioreceptor evitando o processo de interação intermolecular. Neste caso, ocorreria mudança conformacional no bioreceptor e o coeficiente da MR é negativo. Desta forma, coeficientes negativos para a MR representam impedimento estereoquímico (MONTANARI, MONTANARI e GUADIO, 2002).

Na fase farmacodinâmica, podemos considerar que a interação entre a molécula do ligante e a biomacromolécula ocasionará o deslocamento de algumas moléculas de água superficiais, sem garantir o acesso imediato do ligante ao centro ativo do bioreceptor, visto que às interações ligante-bioreceptor envolve múltiplas etapas de acomodação conformacional, de modo a produzir a interação mais favorável energeticamente, tanto em termos entálpico ( $\Delta H^\circ$ ) como entrópico ( $\Delta G^\circ$ ) (KROGSGAARD-LARSEN *et al*,

1996), (THOMAS, 2007), (KUBINYI, 1993) e (BARREIRO e FRAGA, 2008).

#### 2.2.4 Parâmetros Termodinâmicos

A aproximação entre moléculas em processos químicos desencadeia interações entre os orbitais destas moléculas que por consequência são acompanhadas pelas variações da energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ). Quando a variação de energia ocorre no sentido de diminuir a energia global do sistema em estudo (processo exotérmico:  $\Delta H^\circ < 0$ ), a estabilidade do sistema tende a aumentar e o processo químico é caracterizado como sendo favorável energeticamente. Em conjunto, se ocorrer aumento da desordem molecular (Termo Entrópico =  $T \cdot \Delta S^\circ > 0$ ), o processo químico apresentará uma sobra de energia útil, ocorrendo de forma espontânea, ou seja, apresentará variação da energia livre de Gibbs negativa (processo endergônico:  $\Delta G^\circ < 0$ ) (ATKINS, DE PAULA e FRIEDMAN, 2011). Convém lembrar que a variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) relaciona-se com a entalpia (H) como também com a entropia (S) por intermédio da [Equação 8].

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \cdot \Delta S^\circ \quad \text{Eq. 8}$$

Portanto, no processo de reconhecimento molecular, a energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) é determinada pela combinação das contribuições entálpicas e entrópicas. Este conceito é uma aproximação, uma vez que a componente entálpica ( $\Delta H^\circ$ ) é razoavelmente caracterizada e descrita, entretanto, as contribuições entrópicas ( $T \cdot \Delta S^\circ$ ) são difíceis de descrever, pois dependem de um número significativo de fatores, como, por exemplo, área superficial hidrofóbica, a liberação de moléculas de água associadas à cavidade de ligação (dessolvatação) e a imobilização das ligações rotacionáveis na molécula do ligante. Portanto, as funções nos programas de *Docagem*

*Molecular*, são funções simplificadas e aproximadas (SAMS-DODD, 2007) e (GUIDO e ANDRICÓPULO, 2008).

De acordo com a *Teoria da Ocupação de Clark*, complementada por Ariens e Stephenson, na década de 1950, sabemos que a atividade biológica (potência) de um determinado fármaco é determinada pela sua afinidade molecular com o receptor, que é medida pela sua constante  $K_{eq}$ , representado pelo equilíbrio dinâmico:



onde,  $K_{eq}$  = constante de equilíbrio para formação do complexo e  $K_d = 1/ K_{eq}$  constante de dissociação do complexo ligante-bioreceptor.

Para  $K_d$  menor ou  $K_{eq}$  elevado, implica uma grande concentração do complexo fármaco-bioreceptor, portanto, uma maior afinidade do fármaco pelo bioreceptor [Equação 9]. Desta forma, Ariens e Stephenson caracterizaram a potência do fármaco pela sua afinidade molecular ao bioreceptor, enquanto a eficácia pela resposta fisiopatológica (THOMAS, 2007).

$$K_{eq} = [\text{complexo ligante-bioreceptor}] / [\text{fármaco}] \cdot [\text{bioreceptor}] \quad \text{Eq. 9}$$

A formação espontânea de uma ligação química entre os átomos resulta de uma diminuição da energia livre de Gibbs do sistema reacional, isto é,  $\Delta G^\circ$  é negativo (processo endergônico: espontâneo). A mudança na energia livre de Gibbs está relacionada com a constante de equilíbrio químico  $K_{eq}$ , conforme a [Equação 10]. Então, as alterações em  $\Delta G^\circ$  determinam alterações consideráveis na constante de equilíbrio químico  $K_{eq}$ .

$$\Delta G^\circ = - R \cdot T \cdot \ln K_{eq} \quad \text{Eq. 10}$$

A probabilidade de ligação da molécula do ligante em sua conformação bioativa está intimamente relacionada com a energia livre de Gibbs conformacional ( $\Delta G_{\text{conf}}$ ). Esta energia é definida como a diferença entre a energia livre de Gibbs da conformação bioativa e a energia livre de Gibbs de sua conformação atual. Isto é relevante, pois, indica que a conformação bioativa, não é, necessariamente a conformação de mais baixa energia. A energia livre requerida para o ligante assumir a conformação bioativa é indicada por  $\Delta G_{\text{conf}}$ , enquanto  $\Delta G_{\text{inter}}$  corresponde à energia livre relacionada aos processos de interação intermolecular no complexo da conformação bioativa-receptor. A energia livre de ligação  $\Delta G_{\text{bind}}$  pode ser determinada pela [Equação 11] (KROGSGAARD-LARSEN *et al*, 1996), (KUBINYI, 1993) e (LEACH, 2001):

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{inter}} - \Delta G_{\text{conf}} \quad \text{Eq. 11}$$

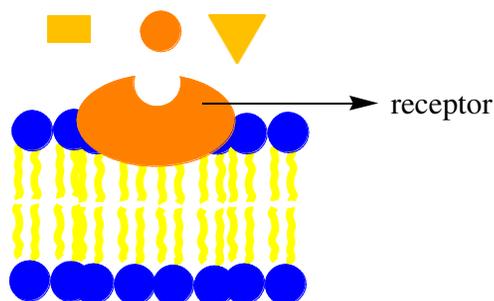
As interações intermoleculares entre a conformação bioativa do ligante com o bioreceptor, representada por  $\Delta G_{\text{inter}}$ , é devido à complementaridade entre os átomos da região farmacofórica do ligante e os átomos do sítio ativo do bioreceptor. O termo  $\Delta G_{\text{conf}}$  está relacionado com a probabilidade de Boltzmann ( $P_{\text{conf}}$ ). A  $\Delta G_{\text{conf}}$  pode ser determinada pela [Equação 12] (KROGSGAARD-LARSEN *et al*, 1996), (KUBINYI, 1993) e (LEACH, 2001):

$$\Delta G_{\text{conf}} = - R \cdot T \cdot \ln P_{\text{conf}} \quad \text{Eq. 12}$$

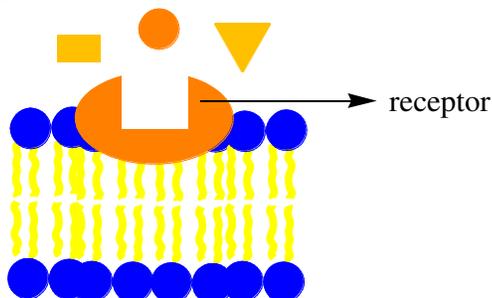
Até o presente momento, o reconhecimento molecular foi tratado via complementaridade ligante-sítio do bioreceptor de “forma estática”, ou seja, semelhante ao modelo “chave-fechadura”, onde se tem uma noção tradicional de uma complementaridade rígida entre o ligante e o receptor. Isto induz a uma conceituação errônea, pois, a flexibilidade ligante-bioreceptor (concepção dinâmica) é um fator essencial na compreensão da afinidade molecular e

atividade intrínseca do ligante, o que implica na ocorrência de mudanças conformacionais nos bioreceptores, induzida pelo ligante ou substrato (Teoria do Encaixe Induzido: *Induced Fit*) (VERLI e BARREIRO, 2005), (COHEN *et al.*, 1996), (THOMAS, 2007), (KROGSGAARD-LARSEN *et al.*, 1996), (KUBINYI, 1993), (GENNARO, 2004), (KOROLKOVAS e BURCKHALTER, 1988) e (LEACH, 2001) [Figura 7A].

(A) seleção de conformações do ligante



(B) modificação do ambiente molecular do sítio do receptor



**Figura 7A:** Seleção da conformação bioativa do ligante (A) e de indução da mudança conformacional do biorreceptor (B)<sup>11</sup>

A variabilidade conformacional dos ligantes é um fator complicador enfrentado rotineiramente nos estudos de Modelagem Molecular. Portanto, a análise conformacional dos compostos é uma etapa fundamental, pois, busca a conformação mais estável da molécula (VERLI e BARREIRO, 2005), ou seja, com maior probabilidade de se aproximar ao estado conformacional bioativo. As variações no arranjo espacial envolvendo a rotação de ligações covalentes

<sup>11</sup> Figura cedida por W. P. Almeida – Material de Apoio – FR 507

do tipo sigma, normalmente estão associadas a uma variação energética menor que  $10 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ , e são de extrema importância para o reconhecimento molecular dos ligantes (FRAGA, 2001).

Um detalhe fundamental em termos de propriedades termodinâmicas está na ocorrência de reações do tipo oxi-redução (REDOX), ou seja, reações com ocorrência de transferência eletrônica. A energia absorvida para remover um elétron de uma determinada molécula refere-se ao 1º potencial de ionização (PI), enquanto a energia liberada para que a molécula receba um elétron indica a sua eletroafinidade (EA). Os orbitais de fronteira HOMO e LUMO estão diretamente correlacionados com as propriedades PI e EA, respectivamente. A energia do HOMO mede a capacidade elétron-doadora molecular, enquanto a energia do LUMO mede a capacidade elétron-aceptora molecular (ARROIO *et al*, 2010).

Para que ocorra a transferência eletrônica em um dado processo químico, um elétron do orbital de fronteira HOMO de uma molécula (elétron-doadora) será removido para o orbital de fronteira LUMO de outra molécula (elétron-aceptora). Neste caso, a molécula elétron-doadora (orbital HOMO) funciona como uma base de Lewis (centro nucleofílico), enquanto a molécula elétron-aceptora (orbital LUMO) funciona como um ácido de Lewis (centro eletrofílico). (ATKINS e DE PAULA, 2008), (BRUICE, 2006), (CONSTANTINO, 2008) e (COSTA *et al*, 2003).

Os conceitos de dureza ( $\eta$ ), *hardness*, e a maciez molecular ( $1/\eta$ ), *softness*, são muito importantes em estudos QSAR. Para uma base “mole” (macia), o átomo pode ser facilmente oxidado, portanto, apresentará maior energia de orbital HOMO, o que facilita a transferência eletrônica para orbital LUMO de ácidos “macios”. Então, a interação química ocorre entre base “mole” com ácido “mole”, ou seja, menor é a variação energética ( $\Delta\epsilon$ ) entre os orbitais de

fronteira HOMO e LUMO. Este princípio enunciado por Pearson, em 1963, e também caracterizado como princípio HSAB (*Hard Soft Acids Bases Principle*) foi demonstrado por Parr e Yang (PARR e YANG, 1989) a partir do formalismo DFT (MORGON e COUTINHO, 2007) e (ARROIO *et al*, 2010). Interação química entre uma base “dura” e um ácido “duro” é a que possui maior diferença energética entre os orbitais de fronteira HOMO e LUMO, portanto, dificulta a transição eletrônica (ATKINS e DE PAULA, 2008), (ARROIO *et al*, 2010) e (CONSTANTINO, 2008).

### 2.2.5 Parâmetros Dimensionais

A partir de cada confôrmero, com auxílio do programa MMPP, calculamos as propriedades dimensionais de cada estrutura química. Para calcular as dimensões de cada molécula, o programa gira a molécula em incremento de 5 graus ao longo dos eixos Y e Z por 360 graus, encontrando as dimensões de máximo e mínimo, que logo são informadas. O programa oferece a opção de orientar as moléculas em dimensões de máximo ou mínimo ao longo dos eixos X, Y ou Z. Uma vez perguntado qual seria a opção dimensional (máximo ou mínimo), preferimos então escolher as opções de máximo dimensional ao longo dos eixos X, Y e Z. Este procedimento foi realizado para todas as chalconas de estudo, fixando suas estruturas químicas em um máximo comprimento molecular  $L_x$ , largura molecular ( $L_y$ ) e também profundidade molecular ( $L_z$ ).

O volume molecular (VM) permite avaliar não apenas a questão dimensional dos substituintes e da molécula bem como o efeito estereoquímico com a modificação dos substituintes na molécula, ou seja, o tamanho dos substituintes no composto está relacionado ao volume total da molécula (KROGSGAARD-LARSEN *et al*, 1996). Ao utilizarmos a estrutura

química com a sua geometria otimizada para o cálculo do VM, estamos levando em consideração uma estrutura química com a menor intensidade em termos de tensão energética no que diz respeito aos “overlaps atômicos”. Levando em consideração os raios de van der Waals (RdW) determina-se o volume das esferas que posteriormente é subtraído dos volumes relativos aos overlaps atômicos. O volume de van der Waals (VdW) está relacionado ao relevo de uma determinada estrutura química, ou seja, pode ser definido como o volume impenetrável por outra molécula, obedecendo à lei da ação das massas (TAVARES, 2004).

### **2.2.6 Parâmetros Topológicos**

Os índices topológicos representam a análise da estrutura química sob o ponto de vista da conectividade molecular, da forma molecular e dos valores de equivalência topológica. Os índices de conectividade molecular são atributos estruturais da molécula. Os valores de equivalência topológica caracterizam átomos e grupos de átomos no esqueleto molecular, e que são utilizados para determinar átomos quimicamente equivalentes “dentro” de uma molécula (TRINAJSTIÉ, 1992), (SILVA e FERREIRA, 2003) e (NEVES *et al*, 1998).

Os índices de conectividade molecular são interpretados pela adoção de uma representação apropriada para a estrutura química. Esta representação é baseada no esqueleto molecular, o qual contém a rede de ligações químicas, incluindo os átomos e as conexões entre eles. Tal representação da estrutura química é chamada de “gráfico molecular”. Este por sua vez é constituído de vértices, representados pelos átomos, e lados, representados pelas ligações químicas. A série de átomos e conexões no gráfico molecular que contém a

informação estrutural é transformada em um índice numérico que representa a estrutura molecular (NEVES *et al*, 1998).

De forma resumida, as propriedades moleculares topológicas são parâmetros desenvolvidos utilizando a *Teoria de Grafos* (TRINAJSTIĆ, 1992). Em termos gerais estas propriedades caracterizam a molécula por meio de um único número, e quantificam a estrutura molecular descrevendo características como disposição dos átomos na molécula, forma e ramificação das mesmas. Para representação de “grafos” das moléculas, os átomos são representados como vértices e as ligações químicas como traços (SILVA e FERREIRA, 2003).

Vários índices podem ser determinados computacionalmente, sempre no sentido de conter maior quantidade de informações estruturais da molécula. O cálculo de uma série de descritores topológicos para um conjunto de moléculas é, do ponto de vista matemático, consideravelmente simples. O emprego de metodologias computacionais é, portanto, recomendável não apenas pela redução no tempo necessário para tratar um determinado número de moléculas, mas principalmente, por evitar a chance de erro na obtenção dos descritores. Propriedades moleculares tais como calor de vaporização, calor de formação, ponto de ebulição, refratividade molar, solubilidade, densidade, coeficiente de partição, polaridade e tempo de retenção, têm sido correlacionadas com os índices topológicos, que por sua vez podem ser correlacionados com as atividades biológicas dos compostos (NEVES *et al*, 1998).

### **2.2.7 Parâmetros Geométricos**

Para todos os análogos de chalcona, após obtermos os confôrmeros de mais baixa energia, algumas propriedades moleculares relacionadas diretamente

com a estrutura química foram avaliadas. É importante ressaltar que as estruturas químicas dos diferentes análogos são similares, indicando de modo geral que os parâmetros geométricos determinados [distâncias interatômicas ( $d$ ) e ângulos entre as ligações químicas ( $\alpha$ )] não devem ser muito úteis para a discriminação dos compostos em ativos e inativos. As chalconas são cetonas  $\alpha,\beta$  insaturadas, ou seja, os confôrmeros dos compostos estudados apresentam um sistema de ligações químicas  $\pi$  conjugadas com a carbonila e insaturação olefínica, e um esqueleto protótipo com a presença marcante de ressonância, resultando em estruturas químicas híbridas dos compostos, que possuem uma certa “planaridade” em termos de geometria molecular 3D. Mesmo assim, preferimos inserir na matriz de dados utilizada nos métodos quimiométricos tais parâmetros físico-químicos ( $d$  e  $\alpha$ ), por intuitivamente “imaginarmos” que a região farmacofórica das substâncias pesquisadas esteja relacionada com a região do esqueleto protótipo, ou seja, talvez alguma propriedade descritora geométrica apareça no modelo QSAR-2D.

### 2.3 Análise Estatística Multivariada

Uma vez estabelecidas a geometria molecular e análise conformacional dos compostos, calculou-se as diversas propriedades moleculares dos compostos. O terceiro momento do estudo QSAR *clássico* refere-se à estatística multivariada, ou seja, correlacionar à estrutura química dos compostos pesquisados com os dados experimentais de atividade biológica. Esta relação ajuda a compreender e explicar um provável mecanismo de ação de fármacos em termos moleculares e ainda permite o planejamento e desenvolvimento de novos compostos que apresentem atividades biológicas desejáveis (KUBINYI, 1993).

Nesta seção, as diversas propriedades moleculares calculadas serão chamadas de variáveis independentes, descritores ou variáveis explicativas, enquanto a atividade biológica (MIC) é caracterizada como variável dependente. Desta forma, temos uma matriz de dados originais, onde as variáveis independentes (X) e a variável dependente (Y) correspondem às colunas da matriz de dados, e as amostras (compostos estudados) correspondem às linhas da matriz de dados. Nota-se que temos duas categorias de variáveis: independentes (parâmetros físico-químicos) e a dependente (atividade biológica).

Neste momento do estudo QSAR clássico, utilizaremos a abordagem de Hansch-Fujita (HANSCH e FUJITA, 1964), mais tarde complementada por Unger e Hansch (UNGER e HANSCH, 1973). Esta abordagem leva em consideração que a atividade biológica dos fármacos é dependente das variáveis independentes, e que estas são correlacionadas linearmente com a energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) no processo de interação ligante-bioreceptor, por isto a abordagem utilizada é caracterizada como extratermodinâmica (KUBINYI, 1993).

Nesta etapa do QSAR *clássico*, o objetivo fundamental é a construção de modelos matemáticos lineares (modelos multidimensionais) que relacionem a estrutura química dos compostos com a atividade biológica experimental (MIC). Feito isto, estamos selecionando as propriedades moleculares das substâncias que melhor explicam os valores observados de atividade biológica. Neste trabalho os derivados análogos são os compostos derivados de chalcona, que diferem entre si quanto aos substituintes nos anéis A e B.

Em 1973, Unger e Hansch, estabeleceram cinco regras gerais para a proposição de modelos matemáticos multidimensionais que correlacionem

estrutura química com a atividade biológica (UNGER e HANSCH, 1973) e (GAUDIO e ZANDONADE, 2001):

- **Seleção de variáveis independentes:** Um grande número de propriedades moleculares de natureza diversificada deve ser calculado a fim de selecionar as variáveis mais relevantes a participarem da “melhor” equação multidimensional proposta. As variáveis (descritores) que participarem da equação devem ser independentes;
- **Validação estatística das variáveis independentes:** As variáveis selecionadas por intermédio de parâmetros estatísticos, e que constituirão a equação multidimensional linear proposta, deverão ser avaliadas quanto à qualidade estatística e submetidas a processos de validação;
- **Princípio da Parcimônia (*Navalha de Occam*):** Quando houver dúvida na escolha do modelo multidimensional entre muitos que são equivalentes, deve-se escolher o mais simples;
- **Número de variáveis por modelo:** O mínimo de compostos (amostras) é cerca de 5 a 6 por variável independente incluída no modelo. Este critério tem como objetivo minimizar a ocorrência de “*correlação por coincidência*” (TOPLISS e COSTELLO, 1972) e (UNGER e HANSCH, 1973);
- **Modelo qualitativo para o mecanismo de ação dos compostos:** O modelo multidimensional linear proposto deve ser consistente com o mecanismo de ação biológica dos compostos em termos moleculares.

A finalidade de Unger e Hansch, ao estabelecer tais regras, foi a de esclarecer procedimentos para a proposição de modelos matemáticos, para a validação dos modelos propostos e facilitar a interpretação dos modelos matemáticos em termos de QSAR clássico. Na realidade ao falarmos em proposição de modelo matemático estamos nos referindo a uma “estimativa de

modelo”, pois não devemos descartar os erros aleatórios relativos à obtenção dos dados experimentais de atividade biológica (GAUDIO e ZANDONADE, 2001).

O método utilizado para obtenção de equações multidimensionais lineares é o Método dos Mínimos Quadrados (MMQ) (KUBINYI, 1993) e (FERREIRA, 2002). Por intermédio da Quimiometria é possível utilizar métodos estatísticos para extrair o máximo de informação química a partir dos dados originais multivariados (HAIR *et al*, 2006) e (WATERBEEND, 1995). Ao lançar mão do MMQ estamos propondo uma hipótese matemática através de regressão para estimar (predizer) os valores de atividade biológica experimental em função das propriedades moleculares calculadas. Obviamente esta hipótese deverá ser avaliada por métodos de validação estatística (FERREIRA, MONTANARI e GAUDIO, 2002), (GAUDIO e ZANDONADE, 2001) e (FERREIRA, 2002).

A equação clássica de Hansch-Fujita (combinação linear de variáveis independentes) para um determinado modelo multidimensional é descrita com o termo dependente (- Log IC<sub>50</sub> ou - Log MIC) em função das variáveis independentes de acordo com a [Equação 13]:

$$- \text{Log MIC} = a (X_{\text{hidrofóbico}}) + b (X_{\text{elettrônico}}) + c (X_{\text{estéreo}}) + d (X_{\text{polar}}) + \Omega \text{ Eq. 13}$$

onde, (- Log MIC) refere-se à atividade biológica prevista; (X) refere-se às variáveis independentes de natureza diferente; (a-d) refere-se aos coeficientes de ajuste da regressão e ( $\Omega$ ) indica o erro sistemático da regressão (GAUDIO e ZANDONADE, 2001).

Ao propormos um modelo QSAR *clássico*, devemos avaliar a qualidade da equação multidimensional. A qualidade da equação proposta é inicialmente realizada pela análise de parâmetros estatísticos que indicam o grau de ajuste e o grau de significância estatística do modelo (HAIR *et al*, 2005).

O grau de ajuste do modelo proposto é dado pelo coeficiente de correlação de Pearson ( $R$ ) ou coeficiente de determinação múltipla ( $R^2$ ), pelo erro padrão da calibração (SEC: *Standard Error of Calibration*) ou estimativa de variância (SEC)<sup>2</sup> e pelo diagrama da atividade observada ( $Y_{\text{obs}} = \text{MIC}_{\text{obs}}$ ) *versus* atividade prevista ( $Y_{\text{pred}} = \text{MIC}_{\text{pred}}$ ) ou atividade observada ( $Y_{\text{obs}}$ ) *versus* resíduos da regressão ( $Y_{\text{res}} = Y_{\text{obs}} - Y_{\text{pred}}$ ). Desta forma, podemos então afirmar que a variabilidade total da regressão ( $SS_{\text{tot}}$ )<sup>2</sup> corresponde à somatória entre a variabilidade explicada pelo modelo ( $SS_{\text{reg}}$ )<sup>2</sup> e variabilidade não explicada pelo modelo ( $SS_{\text{res}}$ )<sup>2</sup> [Equação 14]:

$$(SS_{\text{tot}})^2 = (SS_{\text{reg}})^2 + (SS_{\text{res}})^2 \quad \text{Eq. 14}$$

onde,  $(SS)^2$  = soma dos quadrados dos desvios;  $(SS_{\text{tot}})^2$  = variabilidade total da regressão;  $(SS_{\text{reg}})^2$  = variabilidade explicada pelo modelo de regressão e  $(SS_{\text{res}})^2$  = variabilidade não explicada pelo modelo (GAUDIO e ZANDONADE, 2001). Então, podemos melhorar a [Equação 14] convertendo-a na [Equação 15] (NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2002):

$$\sum(y - \bar{y})^2 = \sum(\hat{y} - \bar{y})^2 + \sum(y - \hat{y})^2 \quad \text{Eq. 15}$$

15

onde ( $Y_{\text{obs}} = y$ ); ( $Y_{\text{pred}} = \hat{y}$ ); ( $Y_{\text{med}} = \bar{y}$ ); portanto:

$$\sum(y - \bar{y})^2 = (SS_{\text{tot}})^2; \quad \text{Eq. 16}$$

$$\sum(\hat{y} - \bar{y})^2 = (SS_{\text{reg}})^2 \quad \text{Eq. 17}$$

$$\sum(y - \hat{y})^2 = (SS_{\text{res}})^2 \quad \text{Eq. 18}$$

O termo coeficiente de determinação múltipla ( $R^2 = SS_{\text{reg}} / SS_{\text{tot}}$ ), corresponde à fração da variabilidade total que é explicada pelo modelo de regressão, ou seja, um modelo QSAR *clássico* com  $R^2 = 0,80$  é capaz de explicar 80% da variabilidade dos valores observados de atividade biológica (GAUDIO e ZANDONADE, 2001). De acordo com a literatura, o coeficiente

de determinação múltipla ( $R^2$ ) deverá satisfazer a condição:  $R^2 > 0,60$  (GAUDIO e ZANDONADE, 2001) e (FERREIRA, MONTANARI e GUADIO, 2002). Quanto maior for coeficiente de determinação múltipla ( $R^2 \cong 1$ ) e menor for o erro padrão da calibração ( $SEC \cong 0$ ), maior será o grau de ajuste do modelo proposto.

Na análise visual do diagrama da atividade observada ( $Y_{obs} = MIC_{obs}$ ) *versus* atividade prevista ( $Y_{pred} = MIC_{pred}$ ) devemos verificar a distribuição dos pontos. Caso os pontos estejam dispostos aleatoriamente ao longo da reta, isto é um sinal da indicação que a regressão satisfaz quanto ao grau de ajuste (HAIR *et al*, 2006) e (GAUDIO e ZANDONADE, 2001).

Amostras (compostos) que apresentam elevado resíduo ( $Y_{res} = Y_{obs} - Y_{pred}$ ) num determinado modelo de regressão apresentam comportamento anômalo e são denominadas *outliers*. Estas amostras não acompanham a homogeneidade do conjunto amostral, pois não pertencem aos limites do intervalo de confiança (95%), acabam influenciando no grau de ajuste do modelo e geralmente são excluídas do modelo de regressão, visto que a sua exclusão melhora significativamente o ajuste da equação (FERREIRA, MONTANARI e GUADIO, 2002). Geralmente, quando o resíduo ( $Y_{res} = Y_{obs} - Y_{pred}$ ) da amostra for superior a duas vezes o desvio padrão do modelo proposto, provavelmente a amostra será considerada um *outlier* (GAUDIO e ZANDONADE, 2001) e (FERREIRA, MONTANARI e GUADIO, 2002). Mesmo que a remoção da amostra *outlier* melhore consideravelmente o grau de ajuste do modelo, deve-se evitar ao máximo a remoção do *outlier* (WATERBEEND, 1995), visto que a quantidade de amostras é pequeno neste estudo QSAR *clássico*.

O grau de significância estatística do modelo proposto pode ser verificado pelo teste de hipótese de Fischer (teste F). Isto é feito comparando o valor de F

da regressão ( $F_{\text{reg}}$ ) com o valor F referencial ( $F_{\text{tab}} = F_{\text{crítico}}$ ) que é encontrado em tabelas de estatística, de forma que  $F_{\text{reg}} > F_{\text{tab}} = F_{(k, n-k-1)}$ , onde  $k$  = número de variáveis latentes (PLS) ou variáveis descritoras no modelo (MLR) e  $n$  = número de compostos (amostras) (FERREIRA, 2002). O teste F pode ser determinado como a razão entre a variabilidade explicada pelo modelo pela variabilidade que permanece sem explicação ( $F = SS_{\text{reg}} / SS_{\text{res}}$ ). Quanto maior for o  $F_{\text{reg}}$  em relação ao  $F_{\text{crítico}}$ , maior será a significância estatística do modelo proposto (GAUDIO e ZANDONADE, 2001) e (WATERBEEND, 1995).

Um dado interessante é que no estudo QSAR clássico calcula-se diversas propriedades moleculares e geralmente a equação proposta de Hansch deverá conter um número de variáveis descritoras  $K \leq 6$ . A utilização de muitas variáveis descritoras ( $K$ ) no modelo proposto determina a presença de *overfitting*, ou seja, um mecanismo de “ajuste forçado”, que indica a “ilusão de ajuste” do modelo QSAR (FERREIRA, 2002). Para que não ocorra *overfitting*, é necessário estabelecer procedimentos de seleção de variáveis independentes. Existem diversos algoritmos disponíveis na literatura e utilizados para o processo seletivo de variáveis, entre os mais utilizados, têm-se (GAUDIO e ZANDONADE, 2001), (FERREIRA, MONTANARI e GUADIO, 2002), (FERREIRA, 2002), (WATERBEEND, 1995), (KUBINYI, 1995) e (HAIR *et al*, 2006):

- 1) Busca Sistemática;
- 2) Sistema Genético ou Algoritmo Evolucionário;
- 3) Redes Neurais;
- 4) Métodos Quimiométricos de Projeção.

Os métodos 1) e 2) são bastante utilizados em regressão linear múltipla (MLR), também chamada de regressão por quadrados mínimos inverso. A

MLR (*Multiple Linear Regression*) é uma técnica muito utilizada pela sua simplicidade, mas é sensível à multicolinearidade entre os descritores. Isto significa que, variáveis altamente correlacionadas, ou seja, que contribuem para mesmo tipo de informação quanto à natureza das propriedades, não podem estar na equação multivariada, pois gera um processo de instabilidade matemática na regressão (FERREIRA, 2002) e (ERIKSSON *et al*, 2003).

É fácil ocorrer multicolinearidade entre os descritores, pois o número de propriedades moleculares calculadas é muito maior que o número de compostos (amostras), sendo normal encontrar variáveis altamente correlacionadas entre si (FERREIRA, MONTANARI e GUADIO, 2002) e (FERREIRA, 2002). Então, a utilização da MLR requer que o número de descritores seja menor que o número de compostos (HAIR *et al*, 2006) e (FERREIRA, 2002). Assim, o quimiometrista deverá ter muita cautela para selecionar as variáveis independentes.

Uma forma de reduzir o número de propriedades moleculares é através da análise do coeficiente de correlação entre variáveis ( $R_{ij}$ ). Em QSAR, variáveis altamente correlacionadas são aquelas que apresentam  $R_{ij} > 0,60$  (FERREIRA, MONTANARI e GUADIO, 2002). Neste caso, verifica-se qual a propriedade que mais contribui para com a atividade biológica mantendo-a, e descarta-se a outra variável descritora. Para verificar se duas variáveis  $X_i$  e  $X_j$  são altamente correlacionadas, basta calcular o coeficiente de correlação entre variáveis ( $R_{ij}$ ) de acordo com a [Equação 19] (FERREIRA, MONTANARI e GUADIO, 2002):

$$R_{ij} = \frac{S_{ij}}{\sqrt{S_{ii} \cdot S_{jj}}} \quad \text{Eq. 19}$$

$$\text{onde, } S_{ij} = \sum X_i \cdot X_j - \frac{\sum X_i \cdot \sum X_j}{n} \quad \text{Eq. 20}$$

$$S_{ii} = \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2 / n \quad \text{Eq. 21}$$

$$S_{jj} = \sum X_j^2 - (\sum X_j)^2 / n \quad \text{Eq. 22}$$

Em termos práticos, podemos construir a matriz de correlação (M) entre as variáveis  $X_i$  e  $X_j$ , com intuito de facilitar a exclusão das variáveis que são muito correlacionadas entre si. A matriz de correlação (M) é quadrada e simétrica em relação à diagonal dos elementos  $r_{ij}$ , assim, se  $i = j$ , percebemos que o valor dos termos da diagonal principal será igual a 1 (FERREIRA, MONTANARI e GUADIO, 2002).

Outra forma de evitar a multicolinearidade entre as variáveis, pois necessariamente elas devem ser independentes, é a utilização de métodos quimiométricos de projeção multivariada (PCR = Regressão por Componentes Principais ou PLS = Regressão por Quadrados Mínimos Parciais) (KUBINYI, 1995), (FERREIRA, MONTANARI e GUADIO, 2002) e (ERIKSSON *et al*, 2003). Estes métodos baseiam-se nos princípios aplicados na chamada Análise de Componentes Principais (PCA: *Principal Component Analysis*). Os métodos PCR (*Principal Component Analysis*) e PLS (*Partial Least Squares*) projetam as variáveis originais em um espaço de dimensão menor, constituído por variáveis não colineares (ortogonais) (ERIKSSON *et al*, 2003), (FERREIRA, MONTANARI e GAUDIO, 2002), (GAUDIO e ZANDONADE, 2001) e (FERREIRA, 2002). Neste trabalho comentaremos apenas sobre o método de regressão PLS, visto que será a nossa ferramenta de pesquisa.

A regressão por quadrados mínimos parciais (PLS) é um método de compressão dos dados originais. É um método que se baseia na correlação entre as variáveis, obtendo-se novas variáveis, que são chamadas de *variáveis*

*latentes, fatores, autovetores* ou *componentes principais* (FERREIRA, 2002), (WATERBEEND, 1995) e (KUBINYI, 1995). Este método agrupa as variáveis altamente correlacionadas em Componentes Principais (PCs), que são ortogonais entre si e construídas em ordem decrescente da quantidade de variância nas PCs. Portanto, PLS é um método quimiométrico de projeção linear onde os dados originais multivariados são projetados num espaço de dimensionalidade menor contendo o máximo de informação sobre os dados originais. Desta forma, não se corre o risco de ter variáveis altamente correlacionadas na equação multidimensional de Hansch (ERIKSSON *et al*, 2003) e (FERREIRA, 2002).

Geralmente utiliza-se o número de PCs equivalente a uma variância acumulada de 95%. Este número de PCs é chamado de dimensionalidade intrínseca ou posto químico (II) e indica o número de variáveis latentes necessário para descrever o máximo de informação relevante que correlacione à atividade biológica ( $Y_{obs}$ ) com as variáveis independentes (X) (FERREIRA, 2002), (WATERBEEND, 1995) e (KUBINYI, 1995).

Matematicamente, a PLS decompõe a matriz de dados originais [X] em duas matrizes: matriz de *Scores* [S] e matriz de *Loadings* [L]. A matriz de *Scores* [S] expressa a relação entre as amostras, ou seja, a similaridade entre os compostos e o agrupamento entre eles. A matriz de *Loadings* [L] expressa a relação entre as variáveis independentes (descritores) (FERREIRA, 2002).

Em QSAR deve-se realizar um pré-processamento dos dados originais antes de executar a regressão, pois as propriedades moleculares na matriz de dados originais são de natureza diferente e apresentam unidades bem diferentes em termos de escala. O pré-processamento caracterizado como

universal em QSAR *clássico* é o autoescalamento, onde será fornecida a mesma escala numérica a todos os descritores. O autoescalamento consiste em, além de centrar os dados na média, dividir todos os elementos da coluna pelo desvio padrão da coluna (ERIKSSON *et al*, 2003) e (FERREIRA, 2002).

Na realidade o procedimento para o cálculo dos *Scores* [S] e *Loadings* [L] é realizado por um método chamado de Decomposição de Valores Singulares (SVD). Este método decompõe a matriz de dados originais [X] em três matrizes: [U], [B] e [L]. As matrizes [U] e [L] são quadradas e ortonormais, ou seja, as colunas de [U] e [L] são ortogonais entre si e normalizadas. A matriz [B] é retangular diagonal contendo os valores singulares na diagonal e todos os elementos fora da diagonal é igual a zero. A [Equação 23] esquematiza o procedimento SVD:

$$[X] = [U] \cdot [B] \cdot [L]^T \quad \text{Eq. 23}$$

onde, o produto [U].[B] representa a matriz de *Scores* [S] e  $[L]^T$  corresponde a matriz de *Loadings* [L]. Então,  $[U] \cdot [B] = [S]$  e  $[L]^T = [L]$  matemático (WATERBEEND, 1995), (FERREIRA, 2002) e (WOLD, SJÖSTRÖM e ERIKSSON, 2001).

No método de regressão PLS o vetor de *Scores* é relacionado com a atividade biológica ( $Y_{\text{obs}}$ ) otimizando a decomposição, pela maximização da correlação entre as variáveis independentes e a atividade biológica dos compostos (FERREIRA, 2002) e (WOLD, SJÖSTRÖM e ERIKSSON, 2001). O método PLS apresenta a vantagem em relação ao PCR porque apresenta resultados semelhantes, com menor número de variáveis latentes, visto que leva em consideração a informação existente na variável dependente (atividade biológica) na construção do modelo matemático (FERREIRA,

2002), (WATERBEEND, 1995) e (KUBINYI, 1995). O desenvolvimento matricial do algoritmo do método PLS utilizado neste trabalho está bem explicado de acordo com a literatura (JÖRGENSEN e GOEGEBEUR, 2007).

### 2.3.1 Procedimento da Análise Estatística Multivariada

Neste trabalho, ao propormos o modelo multidimensional linear de Hansch-Fujita, levamos em consideração o grau de ajuste ( $R$ ,  $R^2$  e SEC), o grau de significância estatística (teste F) e o grau de previsibilidade ( $Q^2_{\text{LOO}}$ ,  $Q^2_{\text{LNO}}$  e  $Q^2_{\text{pred}}$ ) do modelo proposto. Maiores detalhes sobre o grau de previsibilidade ainda será apresentado na seção sobre os métodos de validação estatística do modelo.

Inicialmente, realizamos a regressão linear simples para as 94 propriedades moleculares calculadas e a atividade biológica (MIC). Avaliamos os valores do coeficiente de correlação de Pearson ( $R$ ), do coeficiente de determinação múltipla ( $R^2$ ), do desvio padrão da regressão (SEC) e do teste de Fischer (F). O programa BuilQSAR® versão 2.1 (desenvolvido pelo Professor Dr. Anderson Coser Guadio da Universidade Federal do Espírito Santo, 2009) foi utilizado para a realização da regressão linear simples. As propriedades moleculares que apresentaram coeficiente de correlação de Pearson ( $|R| < 0,25$ ) foram excluídas da análise QSAR *clássica*. Geralmente, quando a correlação linear de Pearson ( $R$ ), entre um descritor e a atividade biológica em estudo é muito baixa, este não apresenta informação suficientemente relevante para ser utilizado no estudo QSAR *clássico*. Portanto, um procedimento bastante utilizado pelos pesquisadores é a eliminação dos descritores cujo  $|R|$  esteja abaixo de um valor pré-fixado pelo pesquisador. Isto auxilia na redução do tempo de trabalho, reduzindo de forma considerável o número de variáveis, visto que as variáveis restantes são as que apresentam maior relevância

estatística, apresentando uma maior probabilidade de auxiliar na obtenção de bons modelos (MELO, 2009). Com a realização deste procedimento, o número de variáveis foi reduzido de 94 para 54.

Posteriormente, os descritores foram autoescalados (pré-processamento) e utilizamos o algoritmo do método PLS para busca seletiva de variáveis (melhores combinações lineares). O algoritmo do método PLS reorganiza as colunas da matriz de dados de tal forma que as propriedades moleculares mais importantes são classificadas de acordo com o vetor de regressão (coeficiente de regressão), determinando a relevância do descritor (*descriptor relevance*) em relação à atividade biológica. As melhores combinações lineares de descritores foram classificadas em seqüência de prioridade, levando em consideração o grau de ajuste e o grau de significância estatística. No processo de seleção das melhores combinações entre as variáveis, indicamos o número de variáveis latentes (PC = 3), o número máximo de descritores (D = 4), o coeficiente de determinação múltipla ( $R^2 > 0,60$ ), menor SEC e maior F. As regressões PLS das melhores combinações entre as variáveis selecionadas foram realizadas com auxílio do programa Molegro Data Modeller® versão 2.5 (Molegro Computational Drug Discovery, 2010). Com a realização deste procedimento, o número de variáveis passou de 54 para 14.

Finalmente a série de 14 descritores foi refinada utilizando o método PLS do programa The Unscrambler® versão 7.6 (CAMO Software AS, 2005), removendo mais variáveis, até a obtenção de um modelo otimizado, satisfazendo então o grau de ajuste, o grau de significância estatística e o grau de previsibilidade ( $Q^2_{\text{LOO}} > 0,50$  e menor SEV). O programa The Unscrambler®, também permite a visualização e a correlação entre os diagramas de *Scores* e *Loadings*, plota a importância dos descritores, os

respectivos coeficientes de regressão das variáveis independentes no modelo e a % de variância acumulada na dimensionalidade intrínseca ( $\Pi$ ). Posteriormente, o modelo proposto no processo de regressão foi submetido aos métodos de validação estatística interna e externa.

## 2.4 Validação Estatística do Modelo

Após a obtenção de uma estimativa de modelo QSAR *clássico* que satisfizesse o grau de ajuste e o grau de significância estatística, o mesmo foi validado antes de sua interpretação em termos moleculares e aplicação físico-química no que se refere às atividades biológicas (WOLD e ERIKSSON, 1998). Portanto a proposta de modelo multidimensional linear foi avaliada quanto ao grau de previsibilidade. O grau de previsibilidade do modelo é realizado pela chamada validação cruzada (*cross-validation*) e posterior validação externa (GAUDIO e ZANDONADE, 2001) e (FERREIRA, 2002).

A *cross-validation* se refere à utilização de uma ou mais técnicas estatísticas para avaliar a predição interna do modelo, onde diferentes proporções de compostos químicos (amostras) são omitidas da série de treinamento (ERIKSSON *et al*, 2003) e (TROPISHA, GRAMÁTICA e GOMBAR, 2003). A qualidade do grau de previsibilidade interna do modelo é verificada pelos métodos: validação LOO (*Leave-One-Out*: “deixe um de fora”) e validação LNO (*Leave-N-Out*: “deixe alguns de fora”) (FERREIRA, 2002), (ERIKSSON *et al*, 2003) e (TROPISHA, GRAMÁTICA e GOMBAR, 2003).

Na validação cruzada LOO, uma das amostras (composto) é retirada da série de treinamento, o qual é reconstruído novamente o modelo e utilizado para prever o valor da atividade biológica da amostra excluída. O mesmo

procedimento é repetido para as demais amostras da série de treinamento. O resultado predito deverá apresentar o mínimo de desvio em relação ao valor experimental (observado) (GUADIO e ZANDONADE, 2001), (FERREIRA, 2002), (ERIKSSON *et al*, 2003) e (TROPISHA, GRAMÁTICA e GOMBAR, 2003). A validação cruzada LOO é avaliada em função dos parâmetros estatísticos: coeficiente de correlação da validação LOO ( $Q^2_{LOO}$ ) e pelo erro padrão de validação (SEV: *Standard Error of Validation*) (GAUDIO e ZANDONADE, 2001), (FERREIRA, 2002), (OECD, 2007) e (MELO, 2009).

Um parâmetro interessante na validação LOO a ser analisado é a quantidade de variabilidade predita: o modelo deverá ser capaz de prever pelo menos 50% da variabilidade, ou seja,  $Q^2_{LOO} > 0,50$  (ERIKSSON *et al*, 2003), (FERREIRA, MONTANARI e GUADIO, 2002), (GOLBRAIKH e TROPISHA, 2002), (GOLBRAIKH *et al*, 2003), (ZHANG *et al*, 2007), (MELO, 2009) e (TROPISHA, GRAMÁTICA e GOMBAR, 2003). Deve-se também verificar a diferença entre os valores  $R^2$  e  $R^2_{LOO}$ , sendo que diferenças maiores que 0,30 unidades podem constituir forte indício de *overfitting* (ajuste forçado) (FERREIRA e KIRALJ, 2009), (MELO, 2009) e (TROPISHA, GRAMÁTICA e GOMBAR, 2003).

A validação cruzada LNO, apresenta processo semelhante ao da validação LOO, com a seguinte diferença: retira-se um número de compostos da série de treinamento, que se refere ao “*N*”, o qual o modelo é reconstruído sem os mesmos, e o novo modelo é utilizado para prever a atividade biológica das amostras (FERREIRA e KIRALJ, 2009) e (TROPISHA, GRAMÁTICA e GOMBAR, 2003). Para que o teste seja realmente eficaz, o “*N*”, deve representar uma fração entre 20% a 30% das amostras da série de treinamento. Cada “*N*” deve ser realizado em triplicata, onde em cada replicata as linhas da

matriz de dados (X e Y) são aleatorizadas (FERREIRA e KIRALJ, 2009), (MELO, 2009), (TROPSHA, GRAMÁTICA e GOMBAR, 2003) e (MELAGRAKI *et al*, 2007).

Semelhantemente à validação LOO, a avaliação da validação cruzada LNO é realizada em função dos parâmetros estatísticos: coeficiente de correlação da validação LNO ( $Q^2_{LNO}$ ) e pelo erro padrão de validação (SEV: *Standard Error of Validation*). Alguns autores consideram a validação LNO como sendo uma técnica de verificação da robustez do modelo, ou seja, a capacidade do modelo em resistir a pequenas modificações em seus parâmetros (FERREIRA e KIRALJ, 2009) e (JORNADA e PIZZOLATO, 2007). Esta técnica de validação não apresenta limites para  $Q^2_{LNO}$  médio, mas é importante que  $Q^2_{LNO}$  médio seja elevado e preferencialmente próximo ao  $Q^2_{LOO}$  ( $Q^2_{LNO} \cong Q^2_{LOO}$ ) (TROPSHA, GRAMÁTICA e GOMBAR, 2003). Se, na validação LNO, um modelo QSAR clássico possuir elevada média  $Q^2_{LNO}$ , pode-se chegar à conclusão que o modelo é robusto e que possui boa predição interna. Para os procedimentos de validação interna, quanto maior for  $Q^2_{LOO}$  e  $Q^2_{LNO}$ ; e menor for a variação para cada SEV, maior será o grau de previsibilidade interna do modelo (MELO, 2009) e (TROPSHA, GRAMÁTICA e GOMBAR, 2003).

Outro procedimento realizado na validação estatística do modelo está relacionado à possibilidade deste apresentar *correlação ao acaso*. A técnica indicada para esta verificação é o teste de randomização de Y (*Y-randomization* ou *Y-scrambling*) (FERREIRA e KIRALJ, 2009) e (MELO, 2009). Nesta técnica, o valor das colunas referentes às propriedades moleculares na matriz de dados original permanece inalterado, enquanto os valores da coluna referente à atividade biológica são “misturados” aleatoriamente, e o processo é repetido várias vezes. Com a realização da

técnica, espera-se que os resultados obtidos sob estas condições sejam de péssima qualidade (baixo  $R^2$  e  $Q^2_{\text{LOO}}$ ), o que caracteriza forte indício de que as propriedades moleculares (descritores) que constituem o modelo de calibração não apresentam variabilidades explicadas e preditas ao acaso e provavelmente os descritores estejam correlacionados com a atividade biológica experimental (WOLD e ERIKSSON, 1998), (FERREIRA e KIRALJ, 2009), (ERIKSSON *et al*, 2003) e (TROPISHA, GRAMÁTICA e GOMBAR, 2003).

Com relação ao teste de randomização de  $Y$ , não existe consenso na literatura no que se refere aos limites para os parâmetros estatísticos. A proposta mais adequada é a de Eriksson e colaboradores (2003): de acordo com os autores, o procedimento leva em consideração a construção de um diagrama do  $Q^2_{\text{LOO}}$  em função de  $|R^2|$ , plotando no diagrama os pontos relativos a cada randomização realizada. O intercepto no diagrama ( $Q^2_{\text{LOO}}$  X  $|R^2|$ ) deverá obedecer à condição:  $|R^2| < 0,30$  e  $Q^2_{\text{LOO}} < 0,050$ . Caso isto aconteça, o modelo estará livre de *correlação ao acaso* (MELO, 2009), (ERIKSSON *et al*, 2003) e (FERREIRA e KIRALJ, 2009). Quanto ao número de randomizações realizadas também não há consenso na literatura, mas em trabalho recente de Ferreira e Kiralj (2009), os autores demonstraram que os resultados com dez e com mil randomizações são praticamente idênticos quando se utiliza o método proposto por Eriksson e colaboradores (2003) (MELO, 2009) e (FERREIRA e KIRALJ, 2009).

Um procedimento considerado fundamental no processo de validação estatística para a proposição de modelos QSAR é a utilização do modelo proposto para prever a atividade biológica de outros compostos análogos que não façam parte da série de treinamento. Estes compostos não podem ser utilizados na construção do modelo e o protocolo de ensaio farmacológico

deve ser o mesmo. Este procedimento é chamado de *validação estatística externa* e constitui o procedimento mais adequado para verificar a habilidade preditiva do modelo proposto quanto à atividade biológica de outros compostos que sejam da mesma série (mesmo domínio químico). Quanto menor for o desvio entre os valores de atividade biológica experimental e a predita pelo modelo que resistiu ao processo de validação interna, melhor será o grau de previsibilidade externa do modelo (FERREIRA e KIRALJ, 2009), (WOLD e ERIKSSON, 1998), (GOLBRAIK e TROPSHA, 2002), (APTULA *et al*, 2005) e (ERIKSSON *et al*, 2003).

De forma semelhante à validação interna, deve-se avaliar o coeficiente de correlação da validação externa ( $Q^2_{\text{pred}} = R^2_{\text{pred}}$ ) e o erro padrão de predição externa (SEP: *Standard Error of Prediction*).

Uma sugestão para análise dos parâmetros estatísticos quanto à validação externa é a proposta feita pelos autores Golbraikh e Tropsha (2002):  $Q^2_{\text{pred}}$  entre 0,50-0,60 (GOLBRAIKH e TROPSHA, 2002). Outras sugestões também foram propostas, como a de Melagraki e colaboradores (2007), onde  $Q^2_{\text{pred}} > 0,60$  (MELAGRAKI *et al*, 2007) e ainda a de Roy e Roy (2008a e 2008b), onde  $Q^2_{\text{pred}} > 0,50$  (ROY, LEONARD e ROY, 2008) e (ROY e ROY, 2008). Em alguns casos, pode até acontecer de  $Q^2_{\text{pred}} > Q^2_{\text{LOO}}$ . Este fenômeno é conhecido como *Paradoxo de Kubinyi* (DOWEYKO, 2008) e (TROPSHA, GRAMÁTICA e GOMBAR, 2003).

Golbraikh e Tropsha; Melagraki e colaboradores; Tropsha, Gramática e Gombar, ainda sugeriram a realização de dois testes confirmatórios para a verificação da qualidade preditiva externa (TROPSHA, GRAMÁTICA e

GOMBAR, 2003), (MELAGRAKI *et al*, 2007), (GOLBRAIKH e TROPSHA, 2002) e (GOLBRAIKH *et al*, 2003):

- 1) Avaliação das inclinações das retas obtidas pela regressão simples realizada entre os *valores observados* X *valores preditos* ( $k$ ) e entre os *valores preditos* X *valores observados* ( $k'$ ); a condição de existência é que:  $0,85 < k$  ou  $k' < 1,15$ .
- 2) Avaliação dos coeficientes de determinação ( $R^2_0$  e  $R'^2_0$ ) obtidos pela mesma regressão simples com a reta centrada arbitrariamente na origem; a condição de existência é:  $|R^2_0 \text{ e } R'^2_0| < 0,30$ .

#### **2.4.1 Procedimento da Validação Estatística do Modelo**

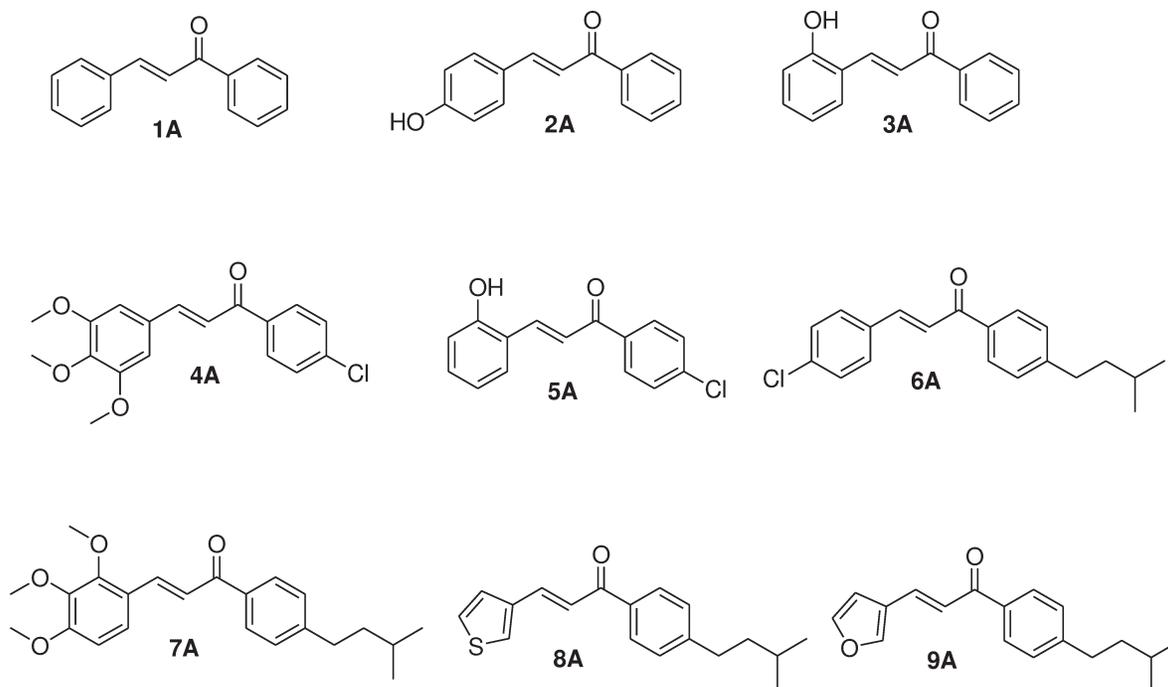
Após termos realizado a análise do grau de ajuste e do grau de significância estatística, seguimos para a etapa de validação estatística interna e externa do modelo proposto. Antes de verificarmos a capacidade preditiva interna e externa do modelo, convém lembrar que o modelo proposto selecionado apresentou: ( $R^2 > 0,60$ ), o (SEC) foi o menor possível e o valor do teste de Fischer apresentou ( $F_{reg}$ ) superior ao ( $F_{crítico}$ ) (tabelado). Para encontramos na tabela o F-valor tem-se que ( $F_{k,n-k-1}$ ), onde que  $k$  = número de variáveis latentes e  $n$  = número de compostos (amostras). Os parâmetros estatísticos listados na [Tabela 3A] foram utilizados para avaliar a qualidade do modelo QSAR proposto.

Para avaliar a qualidade preditiva interna utilizamos os limites recomendados na validação cruzada *Leave-One-Out*: ( $Q^2_{LOO} > 0,50$ ) e ( $R^2 - Q^2_{LOO} < 0,30$ ). A robustez do modelo foi examinada por intermédio da validação cruzada *Leave-N-Out* (LNO, “N” = 1, 2, 3,.....10). A média do valor de cada  $Q^2_{LNO}$  deverá ser próxima a de  $Q^2_{LOO}$  e o valor do SEV próximo de zero.

A possibilidade da ocorrência de *correlação ao acaso* foi testada pela análise *Y*-randomization, onde a coluna *Y* (atividade biológica) foi “misturada” 10 vezes aleatoriamente. Foi utilizada a abordagem sugerida por Eriksson e colaboradores (2003), onde se construiu o diagrama de  $Q^2_{\text{LOO}}$  em função de  $|R^2|$ , plotando no gráfico os pontos relativos a cada randomização concretizada. O intercepto no diagrama ( $Q^2_{\text{LOO}}$  X  $|R^2|$ ) deverá obedecer à condição: ( $|R^2| < 0,30$  e  $Q^2_{\text{LOO}} < 0,050$ ), e caso satisfaça a condição, o modelo estará livre de *correlação ao acaso*.

Após avaliação da qualidade preditiva interna e confirmação da robustez do modelo, realizamos o procedimento de validação externa para um conjunto de chalconas. Esta série de análogos escolhida (*test set*) apresenta uma escala de atividade biológica (pMIC) homogênea quando comparada à atividade biológica da série de treinamento.

Os dados de atividade biológica experimental da série externa foram obtidos do paper de Batovska e colaboradores [série A: cinco chalconas] (BATOVSKA *et al*, 2007) e também do paper de Turkar e colaboradores [série B: quatro chalconas] (TURKAR *et al*, 2010) [Figura 8A]. Estas chalconas que pertencem à série externa, e que apresentam variações estruturais em seus substituintes, foram utilizados para testar a capacidade preditiva externa do modelo proposto. A qualidade estatística do modelo gerado para os compostos externos não deve ser muito diferente da qualidade do modelo relativo à série de treinamento.



**Figura 8A:** Chalconas da série externa e validação do estudo QSAR

O parâmetro  $Q^2_{\text{pred}}$  foi utilizado para verificar a força preditiva externa do modelo QSAR clássico proposto. Neste trabalho, utilizamos o limite recomendado ( $Q^2_{\text{pred}} > 0,50$ ). Entretanto, este parâmetro ( $Q^2_{\text{pred}}$ ) ainda não é uma condição suficiente para garantir que o modelo QSAR proposto seja realmente preditivo externamente. Então, seguindo as recomendações da literatura, ainda analisamos:

- 1) As inclinações das retas obtidas pela regressão simples realizada entre os valores observados  $X$  valores preditos ( $k$ ) e entre os valores preditos  $X$  valores observados ( $k'$ ), onde a condição de existência seja:  $0,85 < k$  ou  $k' < 1,15$ .
- 2) Os coeficientes de determinação ( $R^2_0$  e  $R'^2_0$ ) obtidos pela mesma regressão simples com a reta centrada arbitrariamente na origem, onde a condição de existência seja:  $|R^2_0 \text{ e } R'^2_0| < 0,30$ .

**Tabela 3A:** Parâmetros estatísticos analisados

| Parâmetro Estatístico   | Símbolo e equação |
|---|-------------------|
| Coefficiente de determinação múltipla da calibração                               | $R^2$             |
| Erro padrão do modelo de calibração   | SEC               |
| Teste de Fischer (F) com intervalo de confiança (95%)                             | F                 |
| Coefficiente de determinação múltipla da validação cruzada: “Leave-One-Out (LOO)” | $Q^2_{LOO}$       |
| Erro padrão da validação cruzada  | SEV               |
| Coefficiente de determinação múltipla da validação cruzada: “Leave-N-Out (LNO)”   | $Q^2_{LNO}$       |
| Coefficiente de determinação múltipla da predição externa                         | $Q^2_{pred}$      |
| Erro padrão da predição externa   | SEP               |
| Inclinação das retas da regressão linear  | $K$ e $K'$        |

## 2.5 Proposta de Síntese das Chalconas propostas por QSAR 2D

O método QSAR-2D é alvo de crítica por parte de alguns pesquisadores, entretanto muitos outros, mundialmente conhecidos o utilizam como ferramenta no Planejamento Racional de Fármacos. Para realmente concluirmos que a metodologia QSAR-2D é uma ferramenta útil na proposta de modelos lineares segundo a abordagem de Hansch-Fujita, levamos em consideração que para uma equação multidimensional proposta seja promovida a um modelo QSAR-2D consistente, além da validação estatística interna e externa, é fundamental também que a equação proposta seja capaz de fazer previsões para compostos análogos fora da série de treinamento e da série externa. Este aspecto nem sempre acontece nos estudos teóricos de QSAR, pois implica na síntese orgânica de novos compostos e também nos ensaios biológicos *in vitro* e/ou *in vivo*, que geralmente requer um custo adicional, sem comentar na existência de uma relação harmoniosa entre químicos teóricos, químicos orgânicos sintéticos e farmacologistas, ou seja,

fazer pesquisa de qualidade requer estreitar laços de forma multilateral. Foi pensando em fazer pesquisa sob as condições em nosso alcance, que surgiu a idéia deste projeto, incorporando os conhecimentos da química teórica computacional (Laboratório de Química Teórica e Quimiometria do Instituto Federal do Triângulo Mineiro: IFTM), com a síntese orgânica e a espectroscopia (Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas: UNICAMP), dos ensaios microbiológicos *in vitro* (Laboratório de Investigação de Fungos da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas) e dos ensaios citotóxicos *in vitro* (Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas). Levando em consideração o modelo QSAR-2D proposto, após termos realizado os procedimentos de validação interna e externa, analisando os descritores selecionados e contando com a intuição dos químicos orgânicos sintéticos, propusemos a síntese de novos compostos orgânicos análogos de chalcona, para posterior verificação da atividade microbiológica *in vitro* (MIC) contra cepas de *Candida albicans*, avaliação citotóxica *in vitro* para os compostos mais ativos e finalmente avaliação farmacocinética-toxicológica *in silico* para estes.



### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**



Após termos realizado a otimização geométrica e a análise conformacional para as chalconas, cálculo das propriedades moleculares (parâmetros físico-químicos), selecionarmos uma estimativa de modelo multidimensional linear segundo abordagem de Hansch-Fujita e finalmente executarmos a validação interna e externa do modelo proposto, torna-se necessário a análise química quântica QSAR *clássica* e a interpretação dos descritores selecionados com intuito de prever a atividade biológica experimental das chalcona e finalmente propor a síntese de novos compostos.

### 3.1 Análise Química Quântica QSAR

O estudo QSAR clássico realizado neste trabalho incluiu 20 chalconas, conforme apresentados na [Tabela 1A]. Estas chalconas apresentam variações nos substituintes dos anéis A e B. A proposta para este estudo QSAR investigou modelos com apenas quatro descritores. A proposta de modelo multidimensional linear foi obtida utilizando a metodologia quimiométrica dos Quadrados Mínimos Parciais (PLS). Na análise multivariada PLS, os descritores da matriz de dados são decompostos em matrizes ortogonais com uma relação entre as variáveis dependente (propriedades moleculares) e independente (atividade biológica: MIC). Portanto, ao contrário de análise de regressão linear múltipla (MLR), o problema da multicolinearidade relativo aos descritores é omitido na análise PLS, e um número mínimo de variáveis latentes (PCs) foi utilizado para a modelagem por intermédio do PLS.

Ao final de todo o processo utilizando o método PLS, encontramos quatro combinações de 4 descritores, onde as propriedades moleculares, refratividade molar [MR], potencial de ionização [PI] e Verloop B4 para o substituinte no anel A [B4(A)], estavam presentes nas quatro combinações, diferenciando em apenas uma variável: d (C2CB), Hamett  $\sigma$ -meta (A), Hardness ( $\eta$ ) e

Comprimento Molecular (Lx). As três primeiras combinações que apresentavam os descritores [d (C2CB), Hamett  $\sigma$ -meta (A) e Hardness ( $\eta$ )] foram descartadas em função da quantidade de *outliers* (2, 3 e 3, respectivamente) encontrados nos modelos e também porque não foram aprovadas nos processos de validação interna e externa. Portanto, só nos restou uma combinação de 4 descritores, que refere-se ao modelo proposto.

Desta forma, o modelo proposto QSAR-2D, apresentou com apenas três variáveis latentes (PC1, PC1 e PC3) a capacidade de descrever 96,14% da informação original, de modo que: PC1 = 54,34%; PC2 = 26,88% e PC3 = 14,91%. Os descritores selecionados e que participam do modelo proposto foram: refratividade molar [MR], potencial de ionização [PI], comprimento molecular [Lx] e Verloop B4 para o substituinte no anel A [B4(A)]. Os valores dos descritores selecionados para constituição do modelo e os resultados da validação cruzada *Leave-One-Out* (LOO cross-validation) estão representados na [Tabela 4A].

**Tabela 4A:** Valores dos descritores utilizados na construção do modelo QSAR, validação cruzada *Leave-One-Out* e resíduos

| Compostos | [MR]   | [PI]    | [Lx]    | [B4 (A)] | pMIC <sub>obs</sub> | pMIC <sub>pred</sub> | Resíduos |
|-----------|--------|---------|---------|----------|---------------------|----------------------|----------|
| 1         | 77.983 | 8.66002 | 17.4220 | 2.50670  | 4.531               | 4.722                | -0.191   |
| 2         | 83.000 | 8.64373 | 16.5513 | 2.58952  | 4.159               | 4.104                | 0.055    |
| 3         | 85.898 | 8.65428 | 16.8184 | 2.42155  | 3.522               | 3.846                | -0.324   |
| 4         | 87.867 | 8.65601 | 16.2988 | 2.20084  | 3.208               | 3.347                | -0.139   |
| 5         | 87.761 | 8.79137 | 17.1150 | 2.51513  | 3.477               | 3.664                | -0.187   |
| 6         | 84.394 | 8.58195 | 17.3553 | 2.23950  | 4.152               | 4.072                | 0.080    |
| 7         | 78.133 | 8.60710 | 15.9419 | 2.12793  | 3.804               | 3.973                | -0.169   |
| 8         | 79.658 | 8.60860 | 15.8854 | 2.39803  | 3.829               | 4.029                | -0.200   |
| 9         | 79.658 | 8.68011 | 15.9428 | 2.24248  | 4.130               | 3.730                | 0.400    |
| 10        | 79.658 | 8.62572 | 16.6768 | 2.20566  | 3.829               | 4.116                | -0.287   |
| 11        | 102.24 | 8.59834 | 19.0341 | 2.17772  | 3.120               | 3.431                | -0.311   |
| 12        | 84.328 | 8.78265 | 17.8516 | 2.66742  | 4.474               | 4.074                | 0.400    |

|           |        |         |         |         |       |       |        |
|-----------|--------|---------|---------|---------|-------|-------|--------|
| <b>13</b> | 77.334 | 8.60593 | 15.9786 | 2.27782 | 4.716 | 4.012 | 0.704  |
| <b>14</b> | 85.099 | 8.66701 | 16.9147 | 2.26500 | 3.832 | 3.752 | 0.080  |
| <b>15</b> | 77.268 | 8.79500 | 15.8240 | 2.68451 | 4.136 | 4.077 | 0.059  |
| <b>16</b> | 85.033 | 8.83799 | 16.2757 | 2.68364 | 3.548 | 3.700 | -0.152 |
| <b>17</b> | 88.853 | 8.87031 | 18.0011 | 1.78522 | 3.064 | 3.084 | -0.020 |
| <b>18</b> | 96.618 | 8.94672 | 19.3098 | 1.84424 | 3.169 | 2.621 | 0.548  |
| <b>19</b> | 71.007 | 8.97866 | 15.7680 | 2.57941 | 4.086 | 4.114 | -0.028 |
| <b>20</b> | 78.772 | 9.06768 | 17.0855 | 2.50322 | 3.508 | 3.887 | -0.379 |

Analisando a [Tabela 4A], notamos que o modelo proposto possui pequenos resíduos ( $pMIC_{obs} - pMIC_{pred}$ ). As propriedades moleculares do modelo proposto [Equação 24] foram capazes de elucidar 85% da variância total e prever 78% da atividade biológica experimental. Somente com a primeira variável latente (PC1), o modelo possui capacidade para explicar aproximadamente 54% da variância dos dados originais e 50% da atividade biológica experimental.

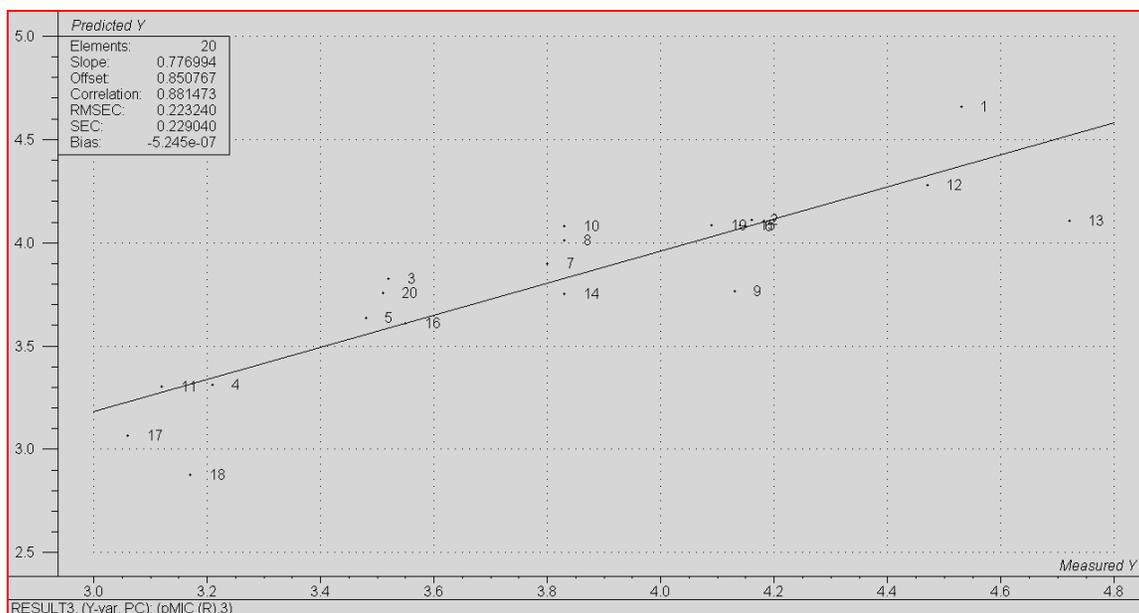
$$pMIC = +0,339 [Lx] - 1,783 [PI] - 0,0708 [MR] + 0,891 [B4 (A)] + 17,473 \quad \text{Eq.24}$$

$n = 20$ ; PCs = 3;

informação acumulada = 96.14% (PC1 = 54,34%; PC2 = 26,88% e PC3 = 14,91%);

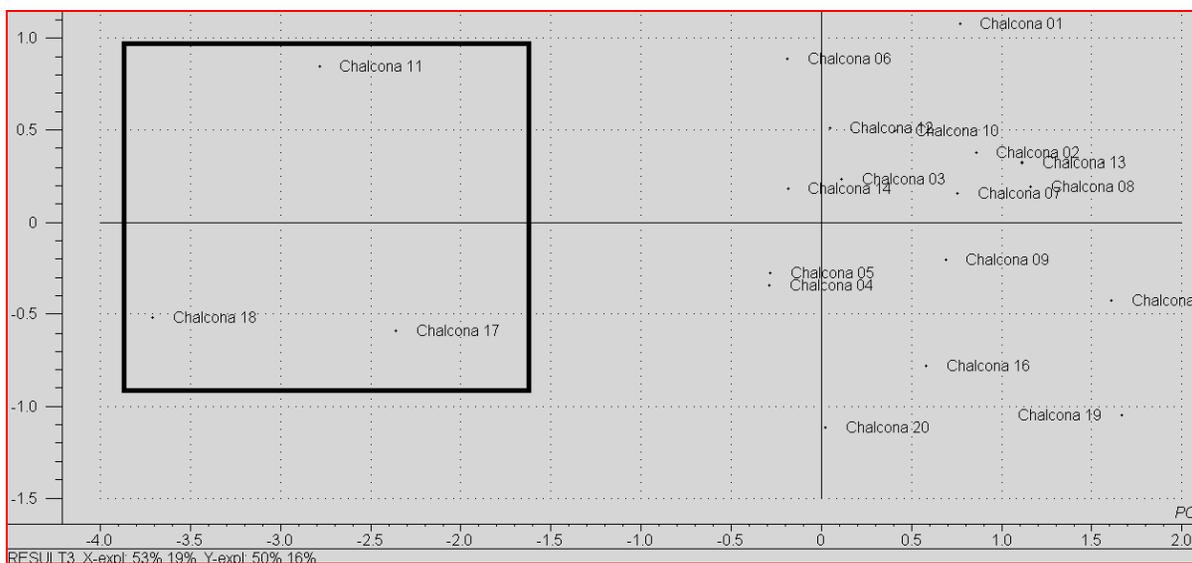
$R^2 = 0,776$ ;  $SEC = 0,229$ ;  $F_{(3,16)} = 14,172$  ( $F_c = 3,24$ ) ;  $Q^2_{LOO} = 0,609$ ;  $SEV = 0,295$ .

O diagrama representado pela [Figura 9A] mostra a atividade observada ( $pMIC_{obs}$ ) *versus* a atividade predita ( $pMIC_{pred}$ ) para a série em treinamento.



**Figura 9A:** Modelo de regressão para a série de treinamento

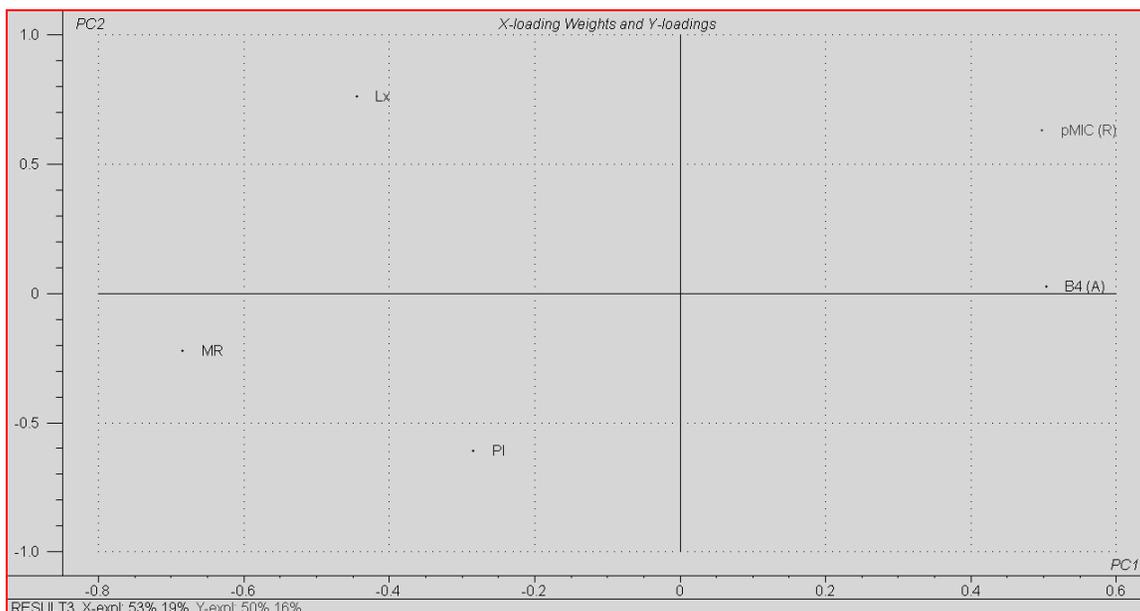
18, 17 e 11 foram agrupados separadamente dos demais compostos. Estes compostos são os que apresentam menor atividade biológica da série de treinamento dos análogos no estudo QSAR *clássico* [Figura 10A].



**Figura 10A:** Diagrama de *Scores* (PC1 x PC2) para 20 chalconas.

Para uma melhor interpretação do diagrama de *Scores* devemos analisar o diagrama de *Loadings* (PC1 x PC2) [Figura 11A], onde notamos que a

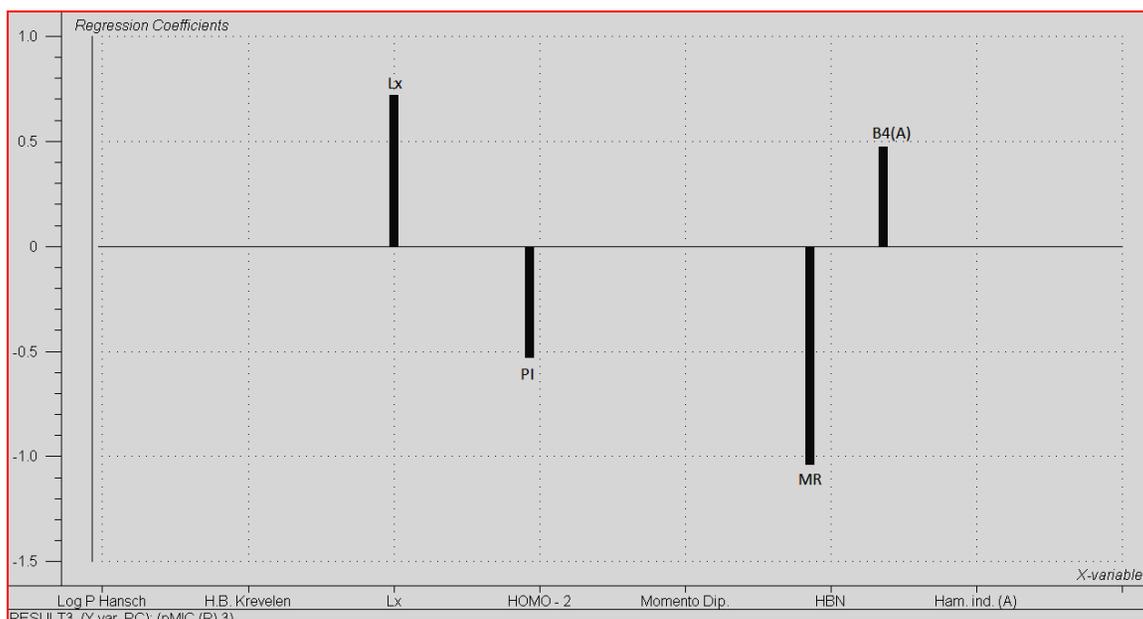
refratividade molar [MR] é um descritor que contribui para estas substâncias, ou seja, apresentam elevados valores de [MR] e de acordo com a [Equação 24] a atividade biológica dos derivados deverá ser maior quanto menor for o valor da [MR]. Isto também pode ser analisado através da [Tabela 4A], onde verificamos que tais compostos (menos ativos) são os que apresentam maiores valores de [MR] e os menores valores de atividade biológica. Apenas com duas variáveis latentes (PC1 x PC2), confrontando o diagrama de *Scores* com o de *Loadings* notamos uma boa discriminação entre os compostos mais ativos e os menos ativos (amostras **18**, **17** e **11**). A análise do diagrama revela que as propriedades moleculares, refratividade molar e o potencial de ionização, influenciam negativamente em relação à atividade biológica (pMIC).



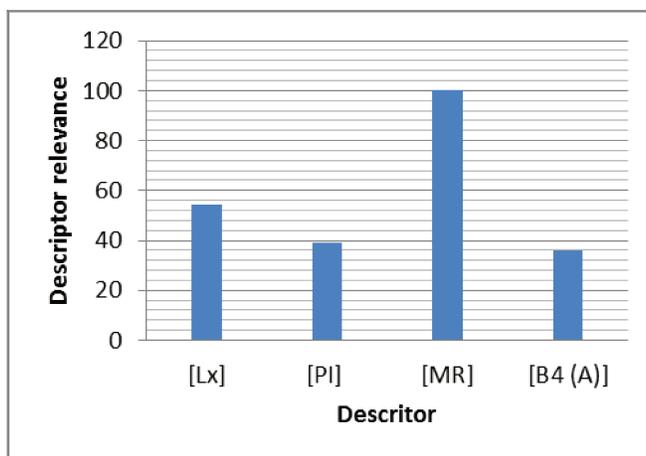
**Figura 11A:** Diagrama de *Loadings* (PC1 X PC2) com os descritores utilizados na construção modelo PLS

O modelo proposto na [Equação 24] indica que a atividade inibitória dos compostos contra as cepas resistentes de *Candida albicans* depende dos parâmetros de natureza termodinâmica, dimensional e estereoquímica. A [Figura 12A] indica os coeficientes de regressão dos descritores e a [Figura

13A] mostra a relevância de cada variável independente (*descriptor relevance*), ou seja, a relevância dos descritores utilizados no modelo proposto. A análise do diagrama de *Loadings* revela que os descritores [MR] e [PI] contribuem negativamente para PC1 e PC2, que o descritor [B4(A)] contribui positivamente para PC1 e que o descritor [Lx] contribui negativamente para PC1 e positivamente para PC2. Isto significa que os descritores que mais contribuem para PC1 são [MR], [PI] e [B4(A)], enquanto o descritor [Lx] é o que mais contribui para PC2.



**Figura 12A:** Diagrama dos coeficientes de regressão dos descritores utilizados no modelo PLS.



| Descriptor | Descriptor Relevance |
|------------|----------------------|
| [Lx]       | 54.502               |
| [PI]       | 39.231               |
| [MR]       | 100.0                |
| [B4 (A)]   | 36.059               |

**Figura 13A:** Diagrama do poder de relevância dos descritores utilizados no modelo PLS (escala de 0 a 10).

O sinal negativo do parâmetro misto estérico-hidrofóbico [MR] no modelo proposto, indica que a molécula do composto deverá possuir menor volume molecular [VM] para favorecer a atividade biológica (pMIC). Os compostos, 11, 17 e 18 apresentam grupo fenila como substituinte, o que aumenta consideravelmente o volume molecular de suas estruturas químicas, contribuindo para uma menor atividade biológica.

Partindo-se do princípio que existe certa possibilidade dos compostos estudados interagirem com algum bioreceptor do fungo, então, a região de atividade do bioreceptor deve possuir um centro ativo onde os ligantes com moléculas maiores apresentam dificuldade em complexar, não favorecendo as interações intermoleculares ligante-bioreceptor.

O sinal negativo da refratividade molar, provavelmente, mostra que o ligante tem a capacidade de “distorcer a conformação” do sítio ativo do bioreceptor por intermédio de impedimento estérico, ou seja, a refratividade molar está contribuindo como um descritor estérico dos substituintes (MONTANARI, MONTANARI e GUADIO, 2002). Um detalhe importante é o fato de que o grupo fenila encontra-se na posição-para tanto em substituinte no anel A ou em B. Assim, substituintes volumosos nesta posição no anel A ou em B reduzem a atividade biológica dos compostos estudados, o que indica a dificuldade para a complexação ligante-bioreceptor, de certa forma confirmando a presença do impedimento estérico.

Lembrando a equação de Lorentz-Lorenz (TAVARES, 2004), não devemos esquecer que, a refratividade molar é uma medida relacionada ao volume molecular de um composto e o quão facilmente ele é polarizado, ou seja, é uma propriedade molecular de caráter misto. Até poderíamos pensar que o sulco do bioreceptor que acomoda o anel B do composto deverá possuir certa hidrofobicidade. Isto vai de encontro com a análise do composto 13, que possui átomo de hidrogênio como substituinte no anel B, sendo o composto que apresenta maior atividade biológica da série de análogos em estudo. Mas ao analisarmos os compostos 01, 02 e 03, com os seus respectivos substituintes no anel B, percebemos que a polaridade diminui (hidrofobicidade aumenta) e a atividade biológica diminui. O que justificaria então este comportamento? Neste caso, não devemos esquecer que outro fator além da hidrofobicidade, estaria influenciando na atividade biológica dos compostos. Nota-se um aumento no raio atômico dos elementos substituintes ( $R_F < R_{Cl} < R_{Br}$ ), o que implica proporcionalmente num aumento do volume de van der Waals do substituinte em anel B, trazendo novamente à tona a questão do

impedimento estereoquímico. Devemos mencionar também, que o anel do composto **13**, apesar de apresentar o substituinte hidrogênio, ele não é o núcleo benzênico e sim o núcleo tiofênico.

O sinal negativo do parâmetro termodinâmico, [PI], indica que a estrutura química precisa de menor quantidade energética para que ocorra remoção de elétrons, favorecendo a sua atividade biológica. Portanto, se a molécula requer menos energia para remover elétrons, obviamente maior será a energia do orbital de fronteira HOMO. A energia de ionização é um descritor que se relaciona com a energia do orbital de fronteira HOMO, pois  $[PI] = -E_{\text{HOMO}}$ , ou seja, quanto menor [PI], maior será  $E_{\text{HOMO}}$ .

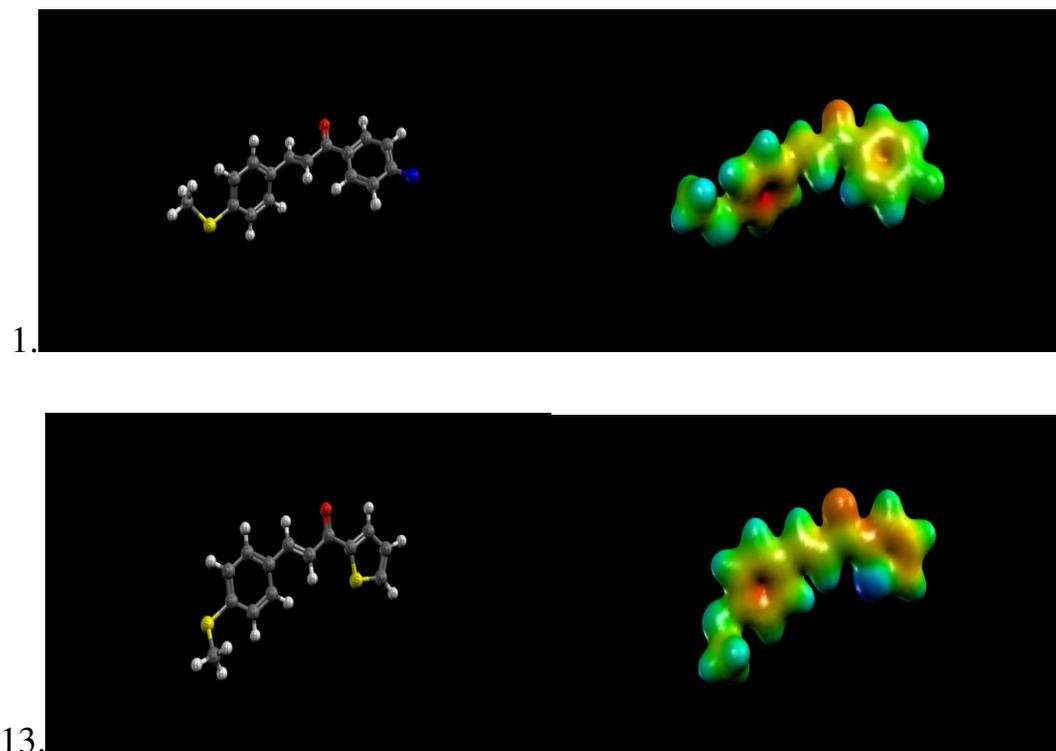
Chalconas são compostos que possuem um evidente orbital molecular HOMO na região da carbonila, favorecendo a sua capacidade doadora de elétrons, bem como esta região possui um notável caráter nucleofílico, funcionando como uma base de Lewis.

Levando em consideração o potencial de ionização, a interação ligante-bioreceptor pode estar ocorrendo por meio de interações fracas e que necessitam de uma menor quantidade de energia no processo de transferência de elétrons e no mecanismo de complexação. Assim, a interação ligante-bioreceptor possui grande probabilidade de não ser do tipo eletrostática, o que nos resta como opção para as chalconas, à ocorrência de interação covalente entre o ligante e o bioreceptor via adição nucleofílica em carbono C4. Devemos lembrar que as chalconas, são passíveis da ocorrência de adição nucleofílica tanto em C2 como em C4. A adição nucleofílica em C2 ocorre por intermédio de interação eletrostática e a adição nucleofílica em C4 ocorre por intermédio da interação covalente entre o orbital molecular de fronteira

LUMO em C4 da chalcona (ligante) com o orbital molecular de fronteira HOMO de algum aminoácido presente no sítio ativo da molécula bioreceptora.

É importante notarmos que existe insaturação olefínica entre os carbonos C3 e C4, ou seja, as chalconas são substâncias químicas que apresentam insaturações conjugadas, o que justifica o mecanismo de ressonância através da deslocalização da ligação  $\pi$  em função da presença da carbonila. Desta forma, as chalconas estão predispostas à ocorrência de uma reação química do tipo “adição de Michael”. Do ponto vista droga-receptor, caso a molécula bioreceptora seja uma enzima, poderá ocorrer ligação covalente ligante-enzima com inibição irreversível (inibição suicida), caso ocorra interação entre orbital LUMO de C4 da chalcona com o orbital HOMO de aminoácido da enzima. O aminoácido cisteína presente em várias enzimas é um alvo interessante para a ocorrência deste tipo de interação, pois apresenta agrupamento sulfidríla (-SH) com a disponibilidade de orbital molecular de fronteira HOMO.

Com intuito em obtermos uma melhor análise e interpretação em termos de propriedades eletrônicas, determinamos o Mapa de Potencial Eletrostático Molecular (MEP) de alguns compostos, pois este nos fornece a localização do potencial eletrostático em regiões de uma superfície molecular em termos de densidade eletrônica. Os compostos da série de treinamento 01 e 13 são os que apresentam maior atividade biológica, portanto, os MEP destes compostos estão esquematizados na [Figura 14A].

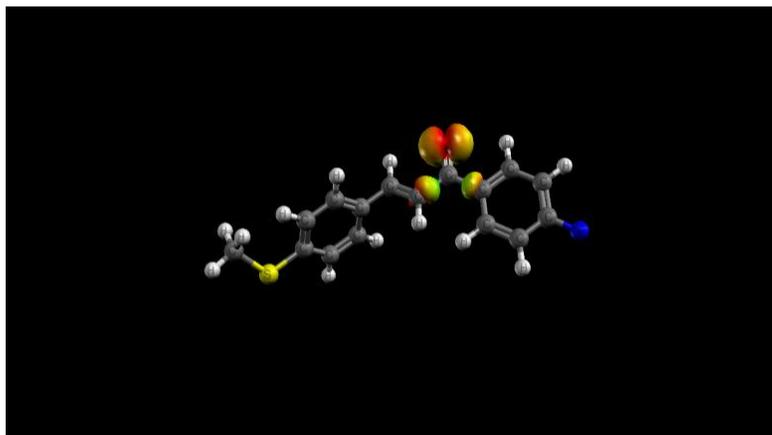


**Figura 14A:** Mapas de potencial eletrostático das chalconas **1** e **13**.<sup>12</sup>

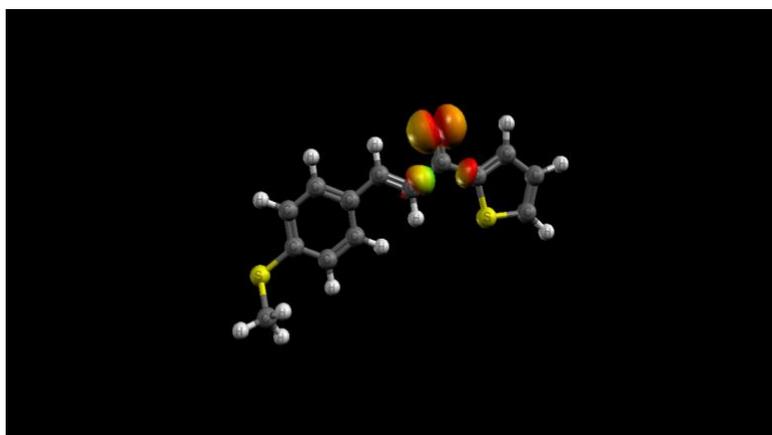
A análise dos MEP para os compostos mais ativos da série de treinamento nos revela de forma marcante que a carbonila é uma região que apresenta a maior densidade eletrônica na molécula. Da mesma forma que determinamos os MEP, para as chalconas **1** e **13**, também determinamos os Mapas de Densidade Eletrônica (MDE) do orbital de fronteira HOMO. A [Figura 15A] revela que o orbital molecular HOMO está localizado na região da carbonila dos compostos. O MDE nos fornece uma forma útil para a caracterização das interações doador-aceptor. A maioria das reações químicas ocorre na região de maior densidade eletrônica nos orbitais de fronteira, que são definidos de

<sup>12</sup> As regiões com potencial eletrostático negativo estão representadas em vermelho (elevada densidade eletrônica), enquanto as regiões com potencial eletrostático positivo estão em verde-azul (baixa densidade eletrônica)

acordo com o tipo de reação: numa reação eletrofílica, a densidade de HOMO é essencial para a transferência de elétrons, enquanto a densidade de LUMO representa as áreas mais susceptíveis a ataques nucleofílicos.



**Chalcona 1**

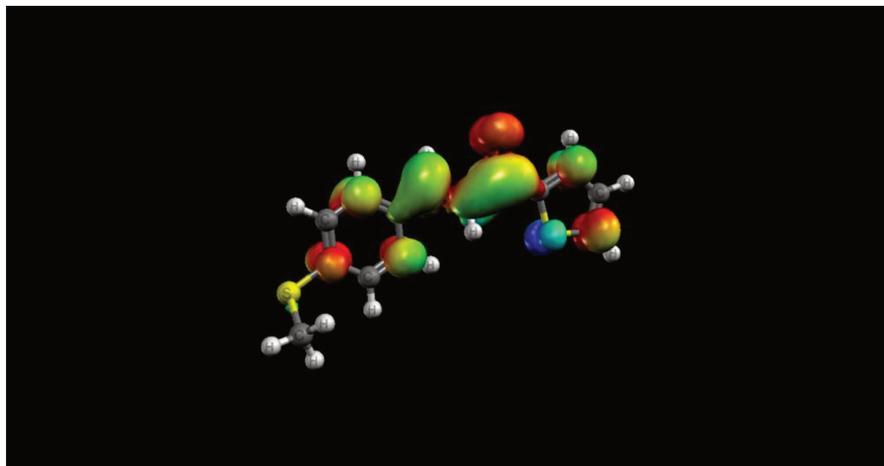


**Chalcona 13**

**Figura 15A:** Mapa de Densidade Eletrônica do Orbital HOMO das chalconas **1** e **13**

análise do Mapa de Densidade Eletrônica (MDE) do orbital molecular de fronteira LUMO para a chalcona mais ativa (composto **13**) poderá nos revelar a região do composto sujeita a um possível ataque nucleofílico [Figura 16A]. Notamos uma evidente caracterização do orbital LUMO em C4 (centro eletrofílico) e também a existência do mecanismo de ressonância devido à

deslocalização dos elétrons  $\pi$  (C4-C3) em direção à região da carbonila (C = O).



**Chalcona 13**

**Figura 16A:** Mapa de Densidade Eletrônica do Orbital LUMO do composto **13**

O sinal positivo do parâmetro dimensional, [Lx], indica que a estrutura molecular deve possuir maior comprimento molecular para favorecer a atividade biológica. Os compostos **11**, **17** e **18** e apresentam uma grande extensão molecular (elevado Lx), devido à presença do grupo fenila. Isto também pode ser evidenciado através do diagrama de *Scores e Loadings* [Figuras 11A e 12A]. Apesar das moléculas destes compostos possuírem maiores [Lx], apresentam elevada refratividade molar, justificando a baixa atividade biológica dos compostos. Portanto, percebemos que o descritor refratividade molar, [MR], apresenta uma maior contribuição (peso) quando comparado ao descritor comprimento molecular [Lx].

Uma possibilidade interessante seria a presença de substituintes na molécula com capacidade de fornecer par de elétrons (Base Lewis) e, simultaneamente possuir um maior comprimento molecular e menor volume molecular. Parece estranho, mas neste caso, a presença do substituinte

quinolinil no anel A é bem aceita, o que aumentaria o [Lx] sem aumentar de forma significativa o volume molecular, visto que este substituinte é planar. O substituinte cloro-quinolinil no anel A, também estaria contribuindo com aumento da capacidade doadora de elétrons. É muito estranho o grupo de López e colaboradores (LÓPEZ *et al*, 2001) terem constatado que as chalconas quinolínicas não apresentam atividade biológica. Isto pode estar relacionado ao tipo de ensaio biológico que os pesquisadores realizaram. Dependendo do tipo de ensaio biológico realizado, alguma interferência pode ter “mascarada” a atividade biológica dos compostos testados. Seria interessante propor uma nova síntese orgânica de chalconas contendo os substituintes quinolinil e cloro-quinolinil, a fim de verificar experimentalmente a atividade biológica como agentes antifúngicos.

O sinal positivo do parâmetro estereoquímico, [B4 (A)], indica que a estrutura molecular do composto deve ter maior raio em substituinte no anel A para favorecer a sua atividade biológica. Isto também contribui com a hipótese da presença de substituintes quinolinil e cloro-quinolinil no anel A. Notamos que os compostos 17 e 18 que são planares em anel A, apresentam pequeno valor de [B4 (A)], o que explica também a baixa atividade biológica destes compostos. Os substituintes tiometil (-SCH<sub>3</sub>) no anel A possuem elevado valor [B4 (A)] quando comparado aos substituintes metóxi (-OCH<sub>3</sub>), portanto possui uma maior atividade biológica, justificando assim a atividade biológica do composto 13. Analisando a estrutura química do composto 13, concluímos que o volume molecular no anel B para os compostos análogos, deve ser menor para favorecer a atividade biológica.

Uma reflexão mais aprofundada nos indica que a contribuição (peso) da refratividade molar é muito maior do que os demais descritores que participam

do modelo proposto. Esta conclusão também pode ser evidenciada analisando o diagrama da [Figura 13A], que classifica a MR numa escala de 0-100 como o descritor de maior relevância no modelo proposto.

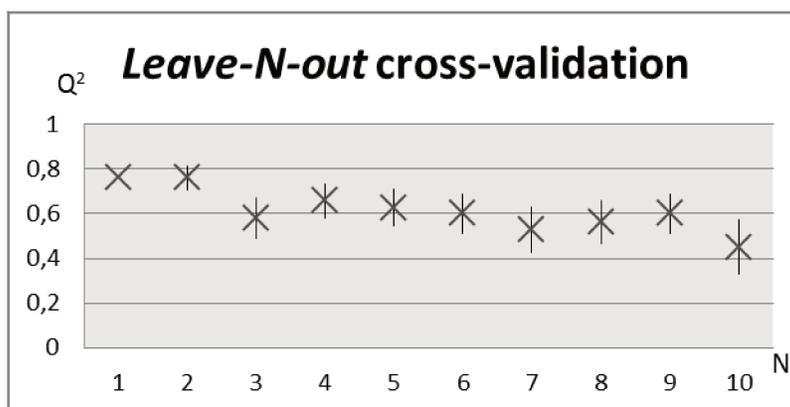
### 3.2 Validação Estatística do Modelo QSAR-2D

Para a verificação da força preditiva do modelo proposto executamos os métodos de validação interna e externa. Os métodos realizados foram: validação cruzada *Leave-One-Out* (LOO cross-validation), validação cruzada *Leave-N-Out* (LNO cross-validation), o teste de randomização de Y (Y-randomization) e a validação externa.

De acordo com a literatura, a análise LOO cross-validation revelou que  $R^2 - R^2_{\text{LOO}} < 0,30$  ( $0,776 - 0,625 = 0,151$ ) e  $Q^2_{\text{LOO}} > 0,50$  ( $0,609$ ), indicando respectivamente que não houve indício de *overfitting* (ajuste forçado) e foi capaz de predizer pelo menos 50% da variabilidade biológica (ERIKSSON *et al*, 2003), (GOLBRAIKH e TROPSHA, 2002), (GOLBRAIKH *et al*, 2003), (ZHANG *et al*, 2007) e (TROPSHA, GRAMÁTICA e GOMBAR, 2003) e (FERREIRA e KIRALJ, 2009). A análise LNO cross-validation foi representada por intermédio do diagrama  $Q^2_{\text{LNO}}$  médio *versus* N de acordo com a [Figura 17A]. Em cada teste LNO, os pontos referem-se à média dos valores do teste realizado em triplicata e cada coluna indica o desvio padronizado para cada LNO.

O modelo proposto possui elevada média de  $Q^2_{\text{LNO}} = 0,612$ , pequenas flutuações dos desvios-padrão para cada ponto LNO e pequenas variações em relação ao valor  $Q^2_{\text{LNO}}$ . LNO cross-validação emprega conjuntos menores do que o procedimento de treinamento LOO. Esta técnica de validação (validação *Leave-N-Out*) não apresenta limites para  $Q^2_{\text{LNO}}$  médio, mas é importante que

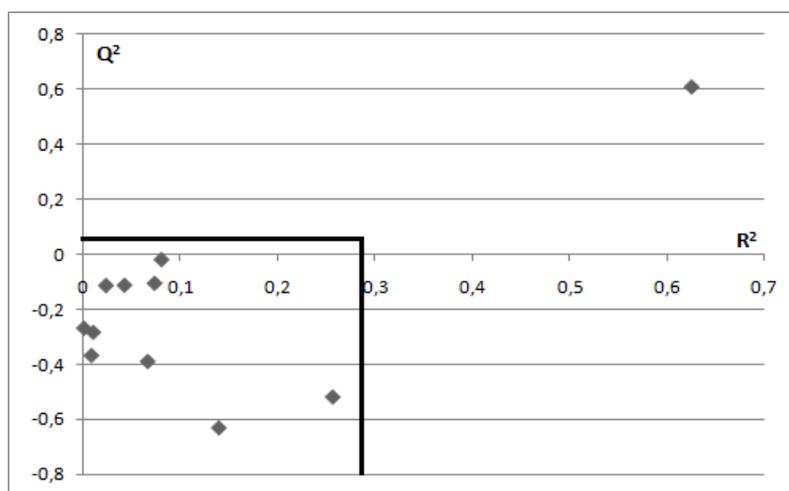
$Q^2_{LNO}$  médio seja elevado e preferencialmente próximo ao  $Q^2_{LOO}$  ( $Q^2_{LNO} \cong Q^2_{LOO}$ ) (TROPISHA, GRAMÁTICA e GOMBAR, 2003). Cada “N” foi realizado em triplicata, onde em cada replicata as linhas da matriz de dados (X e Y) foram aleatorizadas (FERREIRA e KIRALJ, 2009), (TROPISHA, GRAMÁTICA e GOMBAR, 2003) e (MELAGRAKI *et al*, 2007). Notamos que (N = 2, 3, 4.....9) os valores médios  $Q^2_{LNO}$  são elevados e com pequenas flutuações dos desvios-padrão. Para N = 10, o valor médio  $Q^2_{LNO}$  cai bastante e apresenta um grande desvio padrão. O modelo QSAR *clássico* foi considerado “robusto”, pois os valores médios  $Q^2_{LNO}$  são relativamente elevados e próximos ao valor de  $Q^2_{LOO}$ .



**Figura 17A:** Diagrama da análise LNO cross-validation.

O teste de randomização de Y (*Y-randomization*) é útil para verificar se existe possibilidade de *correlação ao acaso* quanto às variâncias explicadas e preditas pelo modelo proposto (FERREIRA e KIRALJ, 2009), (MELO e FERREIRA, 2009) e (MELO *et al*, 2010). O teste de *Y-randomization* pode ser analisado pela construção do diagrama de  $Q^2$  versus  $R^2$  dos modelos aleatórios [Figura 18A]. Cada ponto na região entre os interceptos indica os modelos randomizados: Todos os valores para  $R^2$  e  $Q^2$  estão abaixo de 0,256 e – 0,018, respectivamente.

Pode-se observar que os resultados obtidos para todos os modelos aleatórios são de péssima qualidade, quando comparado ao modelo real, e as intercepções estão dentro dos valores aceitáveis recomendados pela literatura. As intercepções estão abaixo dos limites ( $R^2 \leq 0,3$  e  $Q^2 \leq 0,05$ ) [Figura 18A]. A dispersão dos pontos é observada na região ao redor do intercepto, o que representa uma situação razoável para conjuntos de dados (ERIKSSON *et al*, 2003), (FERREIRA e KIRALJ, 2009), (MELO e FERREIRA, 2009) e (MELO *et al*, 2010).



**Figura 18A:** Diagrama do teste *Y-randomization*

Quanto ao número de randomizações realizadas não há consenso na literatura, mas em trabalho recente de Ferreira e Kiralj (2009), os autores demonstraram que os resultados com dez e com mil randomizações são praticamente idênticos quando se utiliza o método proposto por Eriksson e colaboradores (2003) (FERREIRA e KIRALJ, 2009). Portanto, levando em consideração o trabalho de Ferreira e Kiralj (2009), realizamos 10 randomizações para esta análise. De acordo com a OECD (2007), as técnicas LNO cross-validation e *Y-randomization*, são medidas da qualidade interna do modelo (MELO e FERREIRA, 2009) e (MELO *et al*, 2010).

Alguns autores argumentam que, após a validação interna, apenas os modelos validados externamente, podem ser considerados realistas e aplicáveis para o planejamento racional de fármacos (TROPSHA, GRAMÁTICA e GOMBAR, 2003) e (MELAGRAKI *et al*, 2007). Estudos relatados por Golbraik e Tropsha (2002) e Aptula e colaboradores (2005), apóiam esta proposta (GOLBRAIK e TROPSHA, 2002) e (APTULA *et al*, 2005).

Após avaliação da qualidade preditiva interna e a confirmação da robustez do modelo, realizamos o procedimento de validação externa para um conjunto de chalconas. A série de análogos escolhida (*test set*) apresenta uma escala de atividade biológica (pMIC) homogênea, quando comparada à atividade biológica da série de treinamento. Os dados de atividade biológica experimental da série externa foram obtidos do paper de Batovska e colaboradores [série A: 05 chalconas] (BATOVSKA *et al*, 2007) e também do paper de Turkar e colaboradores [série B: 04 chalconas] (TURKAR *et al*, 2010) [Figura 10A]. As 9 chalconas que pertencem à série externa, e que apresentam variações estruturais em seus substituintes, foram utilizados para testar a capacidade preditiva externa do modelo proposto. Os valores dos descritores das chalconas da série externa estão na [Tabela 5A]. Os resultados apresentados na [Tabela 6A], revelaram que o modelo proposto apresenta elevada capacidade preditiva externa, considerando os limites propostos na literatura. Um dos valores  $K$  ou  $K'$  e a relação  $|R^2_0 - R'^2_0|$  está dentro dos limites aceitáveis:  $(0,85 \leq K \text{ ou } K' \leq 1,15; \text{ e } |R^2_0 - R'^2_0| \leq 0,3)$ . O valor do SEP (erro padrão da predição externa), também é considerado baixo, sendo um indicativo de pequeno erro para um composto análogo sintetizado com base

neste modelo (TROPISHA, GRAMÁTICA e GOMBAR, 2003), (MELO e FERREIRA, 2009) e (MELO *et al*, 2010).

**Tabela 5A:** Valores dos descritores das chalconas da série externa.

| Compostos | [MR]    | [PI]    | [Lx]     | [B4 (A)] |
|-----------|---------|---------|----------|----------|
| 1A        | 65,545  | 9,38097 | 13,73539 | 1,788415 |
| 2A        | 67,070  | 9,00611 | 14,96120 | 1,800600 |
| 3A        | 67,070  | 9,07989 | 13,84510 | 1,780200 |
| 4A        | 84,459  | 8,83922 | 16,06729 | 2,893890 |
| 5A        | 71,937  | 9,29400 | 15,62119 | 1,781335 |
| 6B        | 93,502  | 9,20939 | 18,83810 | 1,787016 |
| 7B        | 107,418 | 9,17723 | 20,87549 | 2,887354 |
| 8B        | 87,836  | 9,27865 | 17,59090 | 1,810166 |
| 9B        | 81,509  | 9,30033 | 17,67840 | 1,824291 |

**Tabela 6A:** Valores preditos da atividade biológica para as chalconas da série externa e parâmetros estatísticos.

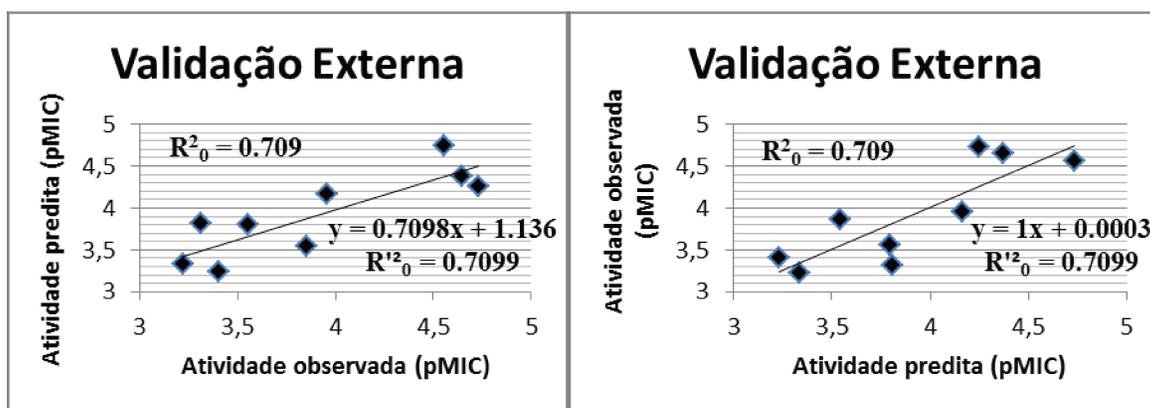
| Compostos   | pMIC <sub>Obs</sub> | pMIC <sub>pred</sub>    | Residues |
|---|---------------------|-------------------------|----------|
| 1A  | 3,221               | 3,336                   | -0,139   |
| 2A  | 3,555               | 3,797                   | -0,242   |
| 3A  | 3,856               | 3,545                   | 0,311    |
| 4A  | 3,406               | 3,232                   | 0,174    |
| 5A  | 3,316               | 3,811                   | -0,495   |
| 6B  | 4,555               | 4,737                   | -0,182   |
| 7B  | 3,960               | 4,165                   | -0,205   |
| 8B  | 4,649               | 4,372                   | 0,277    |
| 9B  | 4,732               | 4,251                   | 0,481    |
| R <sup>2</sup> <sub>pred</sub>                            |                     | 0,709                   |          |
| SEP   |                     | 0,091                   |          |
| K   |                     | 0,709                   |          |
| K'  |                     | 1,00                    |          |
| R <sup>2</sup> <sub>0</sub> - R <sup>2</sup> <sub>0</sub> |                     | 0,709 - 0,7099 = 0,0009 |          |

A capacidade preditiva do modelo QSAR *clássico* foi demonstrado por intermédio da validação externa, onde os parâmetros estatísticos abaixo

indicam que o modelo proposto possui boa capacidade preditiva interna e externa:

- $R^2 = 0.776 > 0.6$ ;  $R^2_{\text{pred}} = 0.709 > 0.5$
- $Q^2_{\text{pred}} = 0.709 > Q^2_{\text{LOO}} = 0.609$
- $K = 0.7098$  e  $K' = 1.000$ ; onde  $0.85 \leq K$  ou  $K' \leq 1.15$
- $|R^2_0 - R^2_0| = 0.0009 < 0.30$

A [Figura 19A] mostra a regressão linear entre valores observados *versus* valores previstos e valores previstos *versus* valores observados para as chalconas da série externa. Assim, os resultados das etapas de validações, mostraram que o modelo proposto pode ser classificado como um bom modelo, pois, de acordo com os critérios utilizados, possui uma qualidade preditiva interna boa, é robusto, não apresenta correlação ao acaso, e mostra uma elevada capacidade de previsão externa.

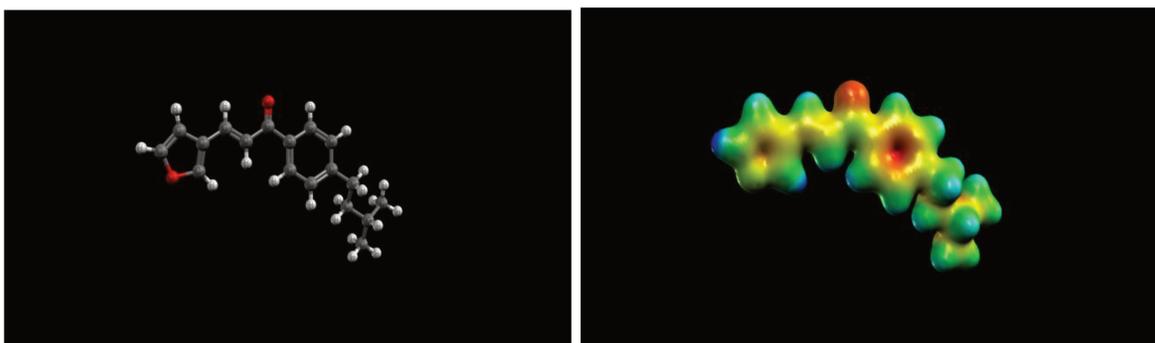


**Figura 19A:** Diagramas de regressão linear entre: a) valores observados x valores preditos; b) valores preditos x observados para os compostos da série externa.

.O MEP do composto **9B** (maior MIC) da série externa foi determinado, pois este nos fornece o potencial em regiões de uma superfície molecular em termos de densidade eletrônica. O MEP deste composto está esquematizado na [Figura 20A]. As regiões com potencial eletrostático negativo estão

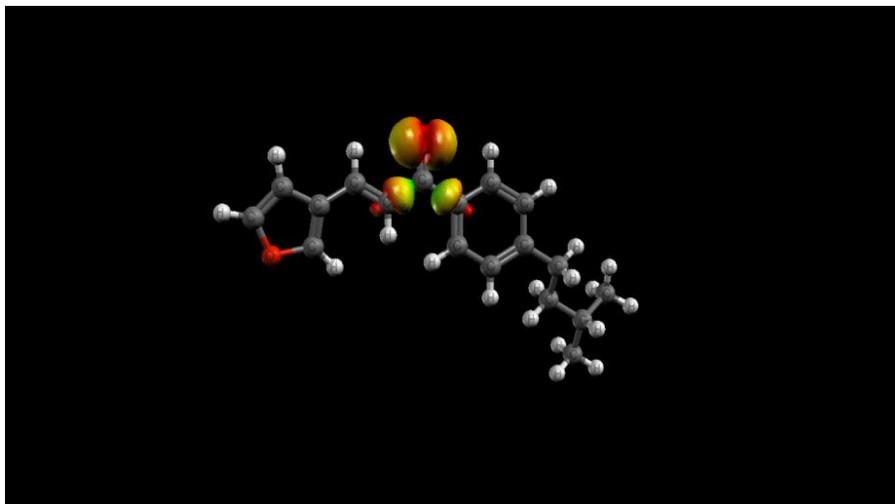
representadas em vermelho (elevada densidade eletrônica), enquanto as regiões com potencial eletrostático positivo estão em verde-azul (baixa densidade eletrônica).

Notamos a elevada densidade eletrônica na região da carbonila conforme presenciamos nos compostos mais ativos da série de treinamento.

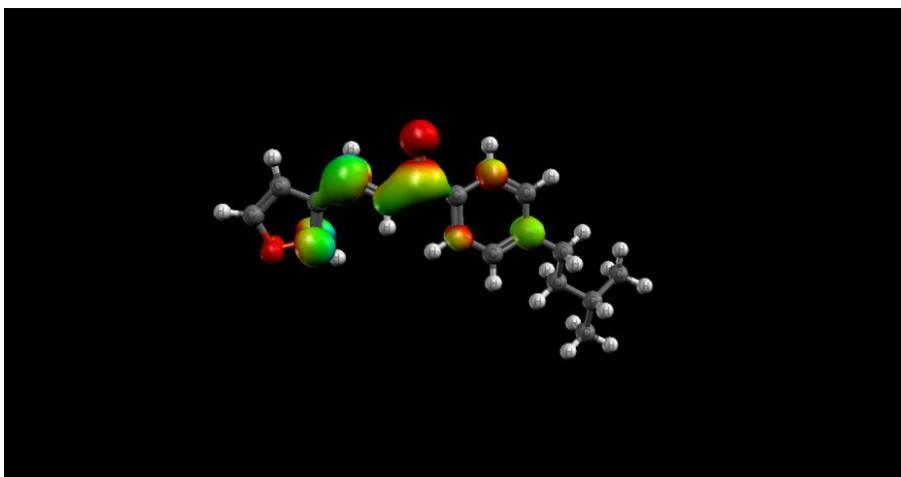


**Figura 20A:** Mapa de Potencial Eletrostático da chalcona **9B**.

Da mesma forma que determinamos o MEP, para a chalcona 9B da série externa, também determinamos o seu MDE do orbital de fronteira HOMO. A [Figura 21A] revela que o orbital molecular HOMO está localizado na região da carbonila. E finalmente, a análise do MDE do orbital molecular de fronteira LUMO para a chalcona mais ativa da série externa (composto 9B) nos revela a região do composto sujeita a um possível ataque nucleofílico [Figura 22A]. Conforme evidenciado nos compostos da série de treinamento, também notamos uma evidente caracterização do orbital LUMO em C4 (centro eletrofílico) e a existência do mecanismo de ressonância devido à deslocalização dos elétrons  $\pi$  (C4-C3) em direção à região da carbonila (C = O).



**Figura 21A:** Mapa de Densidade Eletrônica do Orbital HOMO do composto **9B**.

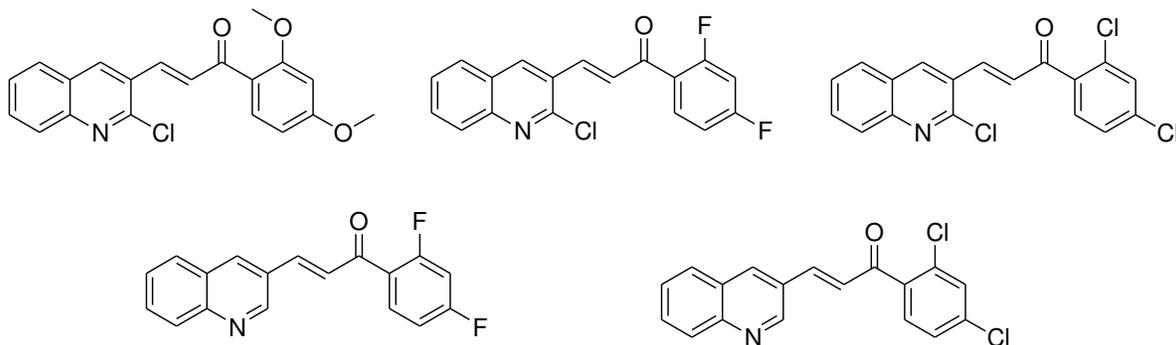


**Figura 22A:** Mapa de Densidade Eletrônica (MDE) do Orbital LUMO do composto **9B**.

#### **4. PROPOSTA DE NOVAS CHALCONAS**



Após termos realizado a validação estatística interna e externa do modelo QSAR-2D, percebemos que o modelo proposto possui boa capacidade preditiva. Para constatar o nível de acuracidade do modelo multidimensional proposto, analisamos as propriedades selecionadas e intuitivamente propusemos a síntese de novas chalconas que estão representados na [Figura 23A]. Em nosso estudo QSAR clássico, notamos que a condição de derivados quinolínicos e cloroquinolínicos em anel A da chalcona com variações dos substituintes no anel B é bem aceita. Então uma proposta interessante seria a síntese dos compostos abaixo com posterior avaliação da atividade anti-*Candida albicans*, para confrontarmos os resultados com o trabalho de López e colaboradores (LÓPEZ *et al*, 2001).



**Figura 23A:** Chalconas propostas para síntese e avaliação.



## **5. CONCLUSÕES**



Este estudo possibilitou obter um modelo multivariado QSAR-2D para uma série de chalconas substituídas com capacidade de inibir as cepas *in vitro* de *Candida albicans*. Os métodos LOO cross-validation e LNO cross-validation, a técnica Y-randomization e a validação externa indicaram que o modelo proposto é significativo estatisticamente, robusto e possui boa previsibilidade interna e externa. A atividade inibitória dos compostos investigados foi descrita baseada nas propriedades moleculares: refratividade molar, potencial de ionização, comprimento molecular e Verloop B4(A), ou seja, a atividade inibitória é explicada em função dos parâmetros de natureza termodinâmica, estereoquímica e dimensional. O modelo proposto descreve 96,14% da informação original com apenas três variáveis latentes. Com apenas a PC1, o modelo é capaz de explicar 54% da variância dos dados originais e 50% da atividade biológica. Os resultados indicaram que a atividade contra as cepas de *Candida albicans* é favorecida por um menor volume molecular, maior comprimento molecular, pela capacidade elêtron-doadora, pelo maior raio em substituinte no anel A e pela presença de centros eletrofílicos no composto. O mecanismo de ação das chalconas está relacionado com aspectos dimensionais e eletrônicos, que pode ser explicado pelos descritores selecionados no modelo QSAR proposto. O estudo revelou que a presença dos substituintes quinolinil e cloro-quinolinil em anel A, pode favorecer a atividade biológica do composto. Portanto, é interessante a proposta de síntese orgânica de análogos de chalcona contendo estes substituintes para verificar a autenticidade dos fatos.



## **6. REFERÊNCIAS**



Advanced Chemistry Development® Inc. ChemSketch, Freeware version 12.0, 1994-2010.

Alcácer, L. **Introdução à Química Quântica Computacional**. IST Press: Lisboa, 2007.

Amaral, A. T.; Montanari, C. A. **Química medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos**. 2002. *Química Nova*, 25, 39-44.

Andrade, C. H.; Trossini, G. H. G.; Ferreira, E. I. **Modelagem Molecular no Ensino de Química Farmacêutica**. 2010. *Revista Eletrônica de Farmácia*, VII(1), 1-23.

Andricopulo, A. D. **Planejamento de Novos Fármacos: Inovação e Integração**. *Revista Processos Químicos*. 2008, 2 (3), 88-90. Disponível em: [http://www.senaigo.com.br/dados/File/arquivos/publicacoes/processos/processosquimicos%20\\_032008.pdf](http://www.senaigo.com.br/dados/File/arquivos/publicacoes/processos/processosquimicos%20_032008.pdf). Consultado em: 30/11/2011.

Aptula, A. O.; Jeliaskova, N. G.; Schultz, T. W.; Cronin, M. T. D. **The better predictive model: high  $q^2$  for the training set or low root mean square error of prediction for the test set?** *QSAR & Combinatorial Science*, 2005, 24, 385-396.

Arroio, A.; Honório, K. M.; Silva, A. B. F. **Propriedades Químico-Quânticas Empregadas em Estudos das Relações Estrutura-Atividade**. *Química Nova*, 2010, 33 (3), 694-699.

Atkins, P.; de Paula, J. **Físico-Química Biológica**. 1ª Ed; LTC, Rio de Janeiro, 2008.

Atkins, P.; De Paula, J. **Físico-Química: Fundamentos**. 5ª Ed, LTC: Rio de Janeiro, 2011.

Atkins, P.; De Paula, J.; Friedman, R. **Quanta, Matéria e Mudança: Uma abordagem molecular para a Físico-Química**. V. 1, LTC: Rio de Janeiro, 2011.

Azad, M.; Munawar, M. A.; Siddiqui, H. L. **Antimicrobial Activity and Synthesis of Quinoline based Chalcones**. *Journal of Applied Sciences*, 2007, 7 (17), 2485-2489.

Bag, S.; Ramar, S.; Degani, M. S. **Synthesis and biological evaluation of  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone as potential antifungal agents**. *Medicinal Chemistry Research*, 2008, 18, 309-316.

Barreiro, E. J. **A Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo**. 2009, *Revista Virtual de Química*, 1 (1), 26-34.

Barreiro, E. J. **Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo**. 2002. *Química Nova*, 25, 1172-1180.

Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 2ª Ed; Artmed, Porto Alegre, 2008.

Batovska, D.; Parushev, S. P.; Slavova, A.; Bankova, V.; Tsvetkova, I.; Ninova, M.; Najdenski, H. **Study on the Substituents effects of a series of synthetic chalcones against the yeast *Candida albicans*.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2007**, 42, 87-92.

Borg, M.; Rùchel, R. **Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa.** **1988**, *Infection and Immunity*, 28, 626-631.

Bresolin, T. M. B.; Cechinel Filho, V. **Fármacos e Medicamentos: Uma abordagem Multidisciplinar.** Santos: São Paulo, **2010**.

Bruice, P. Y. **Química Orgânica.** V. 2, 4ª Ed, Pearson Prentice Hall: São Paulo, **2006**.

Carey, F. A. **Química Orgânica.** V.2. 7ª ed. McGrawHill. **2011**.

Carvalho, I.; Pupo, M. T.; Borges, A. D. L.; Bernardes, L. S. C. **Introdução a Modelagem Molecular de Fármacos no Curso Experimental de Química Farmacêutica.** *Química Nova*, **2003**, 26 (3), 428-438.

Chakrabarti, A.; Navak, N.; Talwar, P. ***In vitro* proteinases production by *Candida* species.** *Mycopathologia*, **1991**, 114, 163-168.

Cohen, N. C. **Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design.** Academic Press: San Diego, 1996.

Constantino, M. G. **Química Orgânica: Curso Básico Universitário.** V. 2, LTC: Rio de Janeiro, **2008**.

Costa, P.; Pilli, R.; Pinheiro, S.; Vasconcellos, M. **Substâncias Carboniladas e derivados.** Bookman: Porto Alegre, **2003**.

Dimasi, J. A.; Hansen, R. W.; Grabowski, H. G. J. **The price of innovation: new estimates of drug development costs.** *Journal of Health Economics*, **2003**, 22, 151-185.

Doweyko, A. M. **QSAR: dead or alive?** *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **2008**, 22, 81-89.

Ellis, M. **Invasive fungal infections: evolving challenges for diagnosis and therapeutics.** **2002.** *Molecular Immunology*, 38, 947-957.

Eriksson, L.; Jaworska, J.; Worth, A. P.; Cronin, M. T. D.; McDowell, R. M.; Gramática, P. **Methods for reliability and uncertainty assessment and for applicability evaluations of classification- and regression-based QSARs.** *Environmental Health Perspectives*, **2003**, 111, 1361-1374.

Ferreira, M. M. C.; Kiralj, R. **Basic Validation Procedures for Regression Models in QSAR and QSPR Studies: Theory and Applications.** *Journal of Brazilian Chemical Society*, **2009**, 20, 770-787.

Florence, A. T.; Attwood, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia.** EDUSP: São Paulo, **2003**.

Foye, W. O.; Lemke, T. L.; Williams, D. A. **Principles of Medicinal Chemistry.** Lea & Febiger: Baltimore, 1995.

Fraga, C. A. M. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola.** *Química Nova*, 2001, 03.

Gaudio, A. C.; Zandonade, E. **Proposição, Validação e Análise dos Modelos que Correlacionam Estrutura Química e Atividade Biológica.** *Química Nova*, **2001**, 24 (5), 658-671.

Gennaro, A. R. **Remington: A Ciência e a Prática da Farmácia.** 20ª Ed; Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, **2004**.

Golan, D. E.; Tashjian, A. H. J.; Armstrong, E. J.; Armstrong, A. W. **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia.** 2ª Ed; Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, **2009**.

Golbraikh, A.; Shen, M.; Xiao, Y.; Lee, K.; Tropsha, A. **Rational selection of training and test sets for the development of validated QSAR models.** *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **2003**, 17, 241-253.

Golbraikh, A.; Tropsha, A. **Beware of  $q^2$ !** *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **2002**, 20, 269-276.

Guido, R. V. C.; Andricopulo, A. D. **Modelagem Molecular de Fármacos.** *Revista Processos Químicos*. **2008**, 2 (4), 24-36. Disponível em: <http://www.senaigo.com.br/dados/File/arquivos/publicacoes/processos/processosquimicos%20042008.pdf>. Consultado em: 30/11/2011.

Hair, Jr., J. F.; Anderson, R. E.; Tatham, R. L.; Black, W. C. **Análise Multivariada de Dados.** 5ª Ed, Bookman: Porto Alegre, **2005**.

Hansch, C.; Fujita, T.  $\rho$ - $\sigma$ - $\pi$  Analysis. **A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure.** *Journal of the American Chemical Society*, **1964**, 86, 1616-1626.

Hansch, C.; Leo, A. **Exploring QSAR Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology.** Heller, S. R. ed; ACS: New York, **1995**.

Holmberg, K.; Meyer, R. D. **Fungal infections in patients with AIDS and AIDS-related complex.** *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **1986**, 18, 407.

Jain, M. R.; Chourasia, O. P.; Rao, J. T. **Synthetic and Antimicrobial Studies of some New Chalcones of 3-Bromo-4-(p-tolyl sulphonamidol) acetophenone.** *E-Journal of Chemistry*, **2004**, 01 (3), 178-183.

Jensen, F. **Introduction to Computational Chemistry.** 2<sup>a</sup> Ed; John Wiley & Sons Ltd, Chichester, **2007**.

Jorge, A. O. C. **Princípios de Microbiologia e Imunologia.** Santos Editora, Santos, **2010**.

Jørgensen, B.; Goegebeur, Y. **Course notes on partial least squares.** 2007. Disponível em: <http://statmaster.sdu.dk/courses/ST02/module07/index.html>. Acesso em 30/11/2011.

Jornada, D. H.; Pizzolato, M. **Sistemática para Avaliação da Robustez de Métodos de Ensaio Através de Projetos de Experimentos.** In: *ENQUALAB-2007 – Congresso da Qualidade em Metrologia Rede Metrológica do Estado de São Paulo – REMESP*. 11 a 14 de junho de **2007**, São Paulo, Brasil. Disponível em: <http://www.portalcertificar.com.br>. Acesso em 30/11/2011.

Katzung, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica.** 10<sup>a</sup> Ed; AMGH Editora Ltda, Porto Alegre, **2010**.

Korolkovas, A.; Burckhalter, J. H. **Química Farmacêutica.** Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, **1988**.

Kothavade, R. J.; Panthaki, M. H. **Evaluation of phospholipase activity of *Candida albicans* and its correlation with pathogenicity in mice.** *Journal of Medical Microbiology*, **1998**, 47 (2), 99-102.

Krogsgaard-Larsen, P.; Liljefors, T.; Madsen, U. **A Textbook of Drug Design and Development.** Harwood Academic Publishers: Amsterdam, **1996**.

Kubiny, H. **QSAR: Hansch analysis and related approaches.** VHC: Cambridge, **1993**.

Lahtchev, K. L.; Batovska, D. I.; Parushev, S. P.; Ubiyovk, V. M.; Sibirny, A. **Antifungal activity of chalcones: a mechanism study using various yeast strains.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, 43, 2220.

Leach, A. R. **Molecular Modelling: Principles and Applications.** 2<sup>a</sup> Ed; Pearson Education Limited, Harlow, **2001**.

Lima, L. M. **Química Medicinal Moderna: Desafios e Contribuição Brasileira.** *Química Nova*, **2007**, 30, 1456-1468.

Lombardino, J. G.; Lowe, J. A. **A guide to drug discovery: The role of the medicinal chemist in drug discovery - then and now.** *Nature Reviews Drug Discovery*, **2004**, 3, 853-862.

López, S. N.; Castelli, M. V.; Zacchino, S. A.; Dominguez, J. N.; Lobo, G.; Charris-Charris, J.; Cortés, J. C. G.; Ribas, J. C.; Devia, C.; Rodriguez, A. M.; Enriz, R. D. **In Vitro Antifungal Evaluation and Structure-Activity Relationships of a New Series of Chalcone Derivatives and Synthetic Analogues, with Inhibitory Properties Against Polymers of the Fungal Cell Wall.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2001**, 9, 1999-2013.

Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. **Microbiologia de Brock.** 10<sup>a</sup> Ed; Prentice Hall, São Paulo, **2004**.

Magalhães, U. O. **Modelagem Molecular e Avaliação da Relação Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos Físico-Químicos, Farmacocinéticos e Toxicológicos In Silico de Derivados Heterocíclicos com Atividade Leishmanicida.** 2009. 86 f.. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ.

Mark Thompson and Planaria Software® LLC. Arguslab, Freeware version 4.0, 1997-2004.

Melagraki, G.; Afantitis, A.; Sarimveis, H.; Koutentis, P. A.; Markopolus, J.; Igglessi-Markopoulou, O. **Optimization of biaryl piperidine and 4-amino-2-biarylurea MCH1 receptor antagonists using QSAR modeling, classification techniques and virtual screening.** *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **2007**, 21, 251-267.

McMurry, John. **Química Orgânica.** 7<sup>a</sup> ed. Cengage Learning, São Paulo, **2011**.

Melo, E. B. **Estudos Teóricos (Modelagem molecular e QSAR) de inibidores de HIV-1 integrase.** 2009. 220 f. Tese de Doutorado em Química – Instituto de Química, Departamento de Físico-química, Unicamp, Campinas – SP.

Melo, E. B.; Ferreira, M. M. C. **Multivariate QSAR study of 4,5-dihydropyrimidine carboxamides as HIV-1 integrase inhibitors.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**, 44, 3577-3583.

Melo, E. B.; Martins, J. P. A.; Jorge, T. C. M.; Friozi, M. C.; Ferreira, M. M. C. **Multivariate QSAR study on the mutagenic activity of flavonoids against 3-NFA on Salmonella typhimurium TA98.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2010**, 45, 4562-4569.

Montanari, C. A. **Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos.** 1<sup>a</sup> Ed, Edusp: São Paulo, 2011.

Montanari, C. A.; Bolzani, V. S. **Planejamento racional de fármacos baseado em Produtos Naturais.** 2001. *Química Nova*, 24, 105-111.

Montanari, M. L. C.; Montanari, C. A.; Gaudio, A. C. **Validação Lateral em Relações Quantitativas entre Estrutura e Atividade Farmacológica, QSAR.** *Química Nova*, 2002, 25 (2), 231-240.

Morgon, N. H. **Computação em química teórica: informações técnicas.** *Química Nova*, 2001, 24 (5), 676-682.

Morgon, N. H.; Coutinho, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular.** Livraria da Física Editora: São Paulo, 2007.

Motta, L. F.; Gaudio, A. C.; Takahata, Y. **Quantitative Structure-Activity Relationships of a series of chalcone derivatives (1,3-diphenyl-2-propen-2-one) as anti-Plasmodium falciparum agents (antimalaria agents).** *Internet Electronic Journal of Molecular Design*, 5, 555-569.

Mundin, K. C. **Modelagem Molecular aplicada a sólidos e biomoléculas.** In: Anais – IV Escola do CBPF, Ao Livro Técnico, Rio de Janeiro, 2003.

Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Pfaller, M. A. **Microbiologia Médica.** 5ª Ed; Elsevier, Rio de Janeiro, 2006.

Musiol, R.; Jampilek, J.; Buchta, V.; Silva, L.; Niedbala, H.; Podeszwa, B.; Palka, A.; Majerz-Maniecka, K.; Oleksyn, B.; Polanski, J. **Antifungal properties of new series of quinoline derivatives.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2006, 14, 3592-3598.

Neto, B. B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** 2ª Ed, Unicamp: Campinas, 2002.

Neves, P. J.; Costa, J. B. N.; Ndiyaie, P. M. **TOP: um programa de cálculo de descritores topológicos para uso em correlações entre estrutura e atividade.** *Química Nova*, 1998, 21 (6), 709-713.

Norgwyn Montgomery Software: Chem SW® Inc. Molecular Modeling Pro Plus, version 6.3.3, Quinn, J. A. 1992-2004.

Nowakowska, Z. **A Review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2007, 42, 125-137.

OECD - Organization for Economic Co-Operation and Development. **Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models.** Paris: OECD. 2007. Disponível em: <http://www.oecd.org/ehs>.

Okunade, A. L.; Hufford, D. C.; Clark, A. L. Lentz, D. **Antimicrobial properties of the constituents of Piper aduncum.** *Phytotherapy Research*, 1997, 11, 142-144.

- Pandit, N. K. **Introdução às Ciências Farmacêuticas**. Artmed, Porto Alegre, **2008**.
- Parr, R. G.; Yang, W. **Density-functional theory of atoms and molecules**. Oxford University Press: Oxford, **1989**.
- Patrick, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 2ª Ed, Oxford: New York, **2002**.
- Péman, J.; Cantón, E.; Valentín, A. **Activity of anidulafungin against Candida biofilms**. *Revist Iberoamerican Micology*, **2008**, 25, 124.
- Pfaller, M. A.; Diekema, D. J. **International Fungal Surveillance Participant Group**. *Clinical Microbiology Infectology*, **2004**, 10 (Suppl. 1), 11.
- Prasad, Y. R.; Kumar, P. P.; Kumar, P. R.; Rao, A. S. **Synthesis and Antimicrobial Activity of Some New Chalcones of 2-Acetyl Pyridine**. *E-Journal of Chemistry*, **2008**, 5 (1), 144-148.
- Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K. **Farmacologia**. 5ª Ed; Elsevier, Rio de Janeiro, **2004**.
- Richards, W. G. **Computer-aided drug design**. *Pure and Applied Chemistry*, **1994**, 6(8), 1589-1596.
- Rodden, M. M.; Zaoutis, T. E.; Buchanan, W. L. **Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases**. *Clinical Infectious Diseases*, **2005**, 41, 634-653.
- Roy, P. P.; Leonard, J. T.; Roy, K. **Exploring the impact of size of training sets for the development of predictive QSAR models**. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **2008**, 90, 31-42.
- Roy, P. P.; Roy, K. **On some aspects of variable selection for partial least squares regression models**. *QSAR & Combinatorial Science*, **2008**, 27, 302-313.
- Ruchel, R.; Tegeler, R.; Trost, M. **Comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans***. *Saboraudia*, **1982**, 20 (7), 233-244.
- Sadowski, J.; Schwab, C. H.; Gastaiger, J. **3D Structure Generation and Conformational Searching**. Em: *Computational Medicinal Chemistry for Drug Discovery*, Marcel Dekker: New York, 2004.
- Sams-Dodd, F. **Research & market strategy: how choice of drug discovery approach can affect market position**. *Drug Discovery Today*, **2007**, 12, 314-318.
- Sant'Anna, C. M. R. **Métodos de Modelagem Molecular para Estudo e Planejamento de Compostos Bioativos: uma Introdução**. *Revista Virtual de Química*, **2009**, 1, 49-57.

Santos Filho, O. A.; Alencastro, R. B. **Modelagem de Proteínas por Homologia.** *Química Nova*, **2003**, 26, 253-259.

Shimizu, M. T. **Fosfolipase em espécies de *Candida*.** *Revista de Microbiologia*, **1989**, 20, 338.

Sidrim, J. J. C.; Moreira, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais de micologia médica.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, **1999**.

Silva, L. R.; Ferreira, M. M. C. **Estudo do Coeficiente de Partição Octanol-Água de Bifenilas Policloradas (PCBs) Utilizando Parâmetros Topológicos.** *Química Nova*, **2003**, 26 (3), 312-318.

Silva, V. B.; Silva, C. H. T. P. **Modelagem Molecular de Proteínas Alvo por Homologia Estrutural.** *Revista Eletrônica de Farmácia*, **2007**, 4, 15-26.

Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5ª Ed, Editora da UFRGS/ Editora da UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, 2004.

Sivakumar, P. M.; Kumar, T. M.; Doble, M. **Antifungal activity, mechanism and QSAR studies on chalcones.** *Chemical Biology & Drug Design*, **2009**, 74(1), 68-79.

Swamy, P. M. G.; Agasimundin, Y. S. **Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Chalcones Containing 3-Hydroxy Benzofuran.** *Acta Pharmaceutica Scientia*, **2008**, 50, 197-202.

Tavares, L. C. **QSAR: A abordagem de Hansch.** *Química Nova*, **2004**, 27, 631-639.

Thomas, G. **Medicinal Chemistry: An Introduction.** 2ª Ed; John Wiley & Sons Ltd, Chichester, **2007**.

Topliss, J. G.; Costello, R. J. **Chance Correlations in Structure- Activity Studies using Multiple Regression Analysis.** *Journal of Medicinal Chemistry*, **1972**, 15, 1066-1068.

Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. **Microbiologia.** 8ª Ed, Artmed, Porto Alegre, **2005**.

Trabulsi, L. R.; Alterthum, F. **Microbiologia.** 4ª Ed; Atheneu, São Paulo, **2005**.

Trinajstić, N.; **Chemical Graph Theory.** CRC: Boca Raton, **1992**.

Tropsha, A.; Gramatica, P.; Gombar, V. K. **The importance of being earnest: validation is the absolute essential for successful application and interpretation of QSPR models.** *QSAR & Combinatorial Science*, **2003**, 22, 69-77.

Trsic, M.; Siqueira-Pinto, M. F. **Química Quântica: Fundamentos e Aplicações**. Manole Editora: Barueri, **2009**.

Turkar, S. S.; Rodge, A. H.; Hatnapure, G. D.; Keche, A. P.; Gaikwad, G. S. **Synthesis and anti-bacterial, anti-fungal activity of some novel chalcone derivatives**. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **2010**, 2 (5), 348-355.

Unger, S. H.; Hansch, C. **On Model Building in Structure-activity Relationships. A reexamination of adrenergic blocking activity of  $\beta$ -halo- $\beta$ -aralkylamines**. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1973**, 16, (7), 745-749.

Unscrambler 7.6, CAMO Software AS, 2005.

Verli, H.; Barreiro, E. J. **Um Paradigma da Química Medicinal: A Flexibilidade dos Ligantes Receptores**. *Química Nova*, **2005**, 28 (1), 95-102.

Verloop, A.; Hoogenstraaten, W.; Tipker, J. *Drug Design*. J. Ariens: New York, **1976**.

Waterbeemd, H. **Chemometric Methods in Molecular Design** v. 2, VCH: New York, **1995**.

Wermuth, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**. Academic Press: London, 1996.

Wold, S.; Eriksson, L. **Statistical Validation of QSAR results**. In: H. van de Waterbeemd (Org.) *Chemometric Methods in Molecular Design*. VHC: Weinheim, **1998**.

Wold, S.; Sjöström, M.; Eriksson, L. **PLS-regression: a basic tool of chemometrics**. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **2001**, 58, 109-130.

Zaitz, C.; Campbell, I.; Marques, S. A.; Ruiz, L. R. B.; Framil, V. M. S. **Compêndio de Micologia Médica**. 2ª Ed; Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro, **2010**.

Zhang, S.; Wei, L.; Bastow, K.; Zheng, W.; Brossi, A.; Lee, K.; Tropsha, A. **Antitumor agents 252. Application of validated QSAR models to database mining: discovery of novel tylophorine derivatives as potential anticancer agents**. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **2007**, 21, 97-112.



## **Parte B**

### **Síntese das Chalconas Propostas e Ensaio Biológicos**

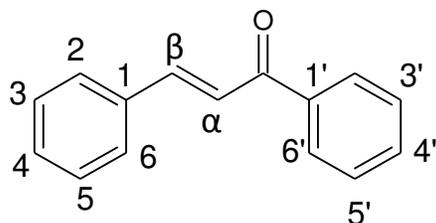
#### **1. CONSIDERAÇÕES GERAIS**



Nesta parte da tese, abordaremos a síntese das chalconas-alvo de nosso estudo, sua caracterização e avaliação da atividade antifúngica. Assim como na parte A, teceremos algumas considerações gerais e depois detalharemos os métodos empregados em cada uma destas fases (síntese, caracterização, avaliação da atividade antifúngica e avaliação citotóxica). Sem seguida, os resultados obtidos e a parte experimental do trabalho, encerrando com algumas conclusões. Os espectros utilizados na caracterização dos compostos se encontram no Anexo.

As chalconas são precursores da biossíntese de flavonóides e apresentam papel relevante em sistemas ecológicos em função das cores que são encontradas nos vegetais, implicadas no processo de polinização como atraentes de insetos e/ou pássaros. A maioria das chalconas apresenta uma pigmentação amarelada e em meio alcalino tendem ao vermelho (SIMÕES *et al*, 2004) e (MOTTA, GAUDIO e TAKAHATA, 2006).

Quimicamente, as chalconas são cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas, onde tanto a carbonila quanto a porção olefínica se encontram ligadas a anéis aromáticos (DHAR, 1981) e (CAREY, 2011). O núcleo fundamental de uma chalcona é a 1,3-difenil-2-propen-1-ona [Figura 1B], apresentando os isômeros (*Z* e *E*), sendo que a configuração do isômero-*E* da chalcona é considerada como sendo a estrutura química termodinamicamente mais estável (McMURRY, 2011) e (MOTTA, GAUDIO e TAKAHATA, 2006).

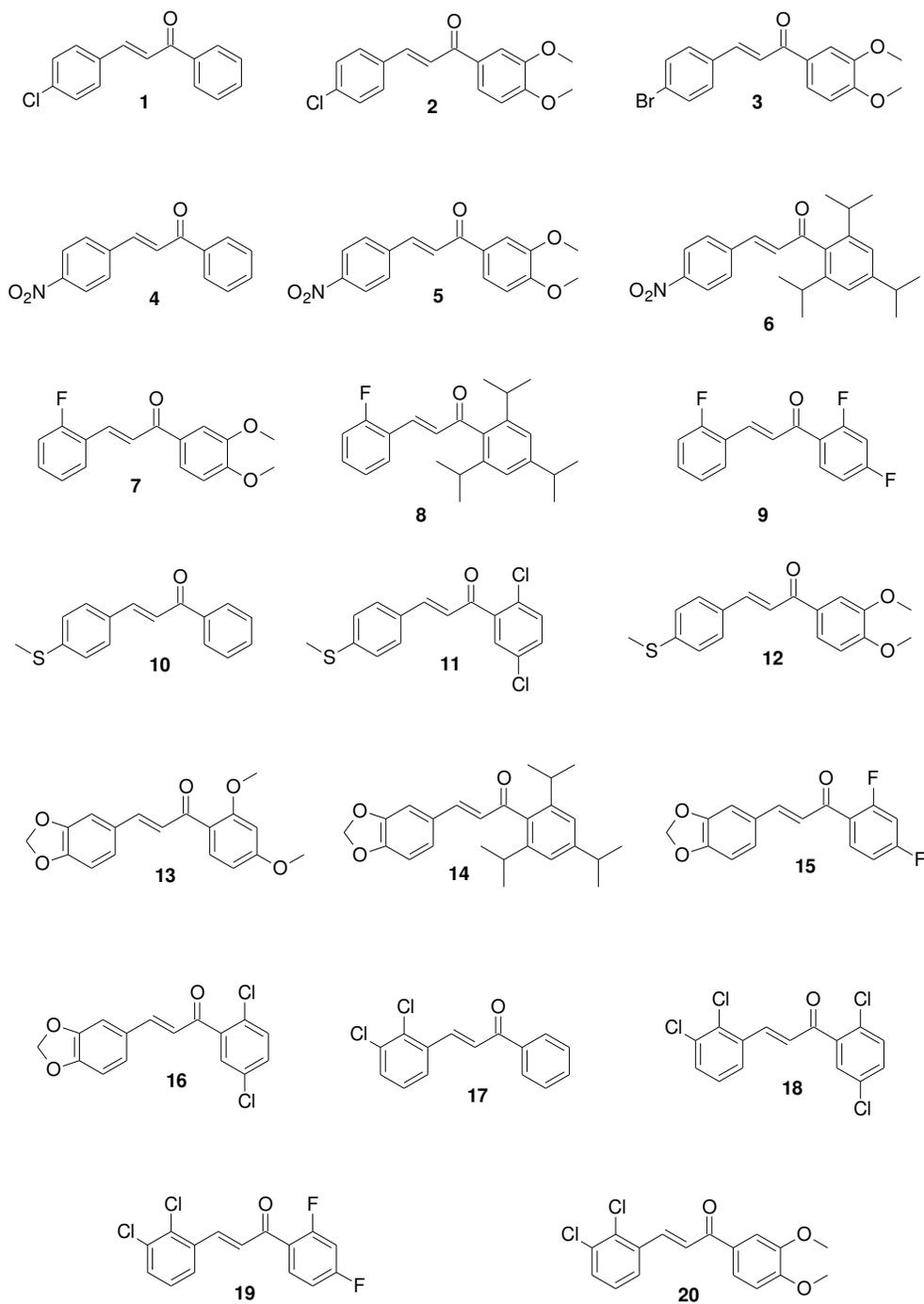


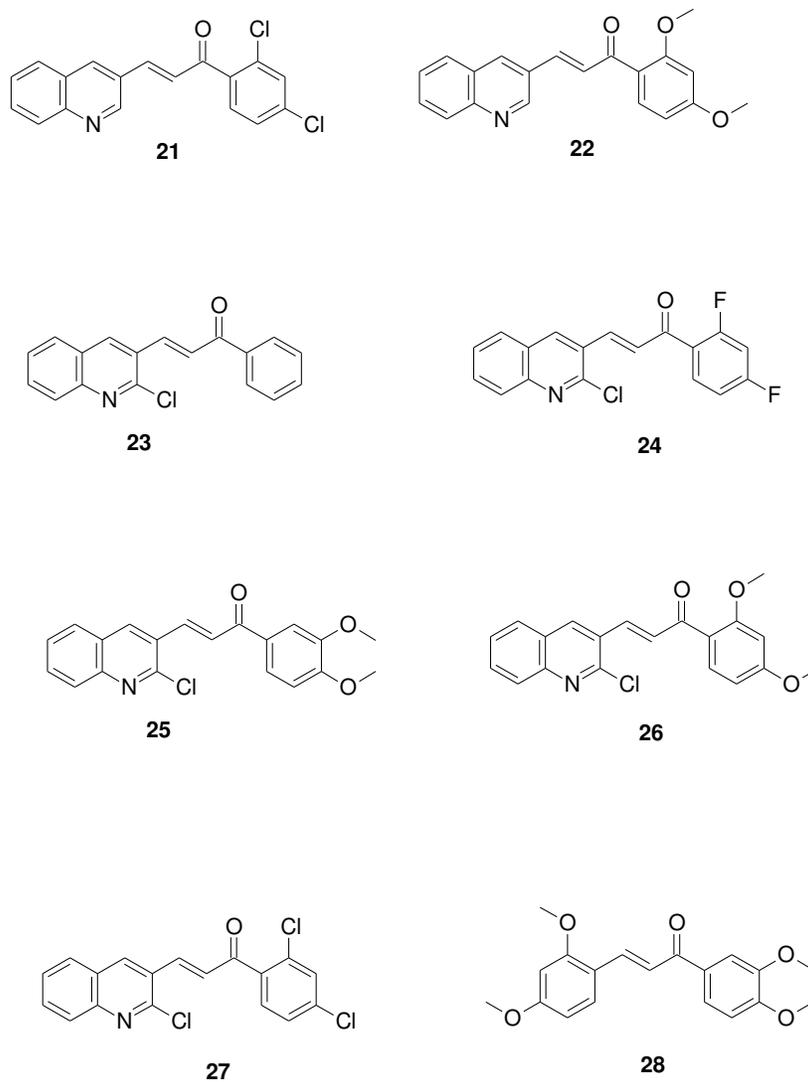
**Figura 1B:** Núcleo da chalcona (1,3-difenil-2-propen-1-ona).

O estudo teórico descrito na Parte A, apontou algumas chalconas quinolínicas como potenciais agentes antifúngicos e iniciamos o trabalho de síntese destas substâncias<sup>13</sup>. Entretanto, no Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, já vínhamos trabalhando com algumas chalconas não quinolínicas para estudo de seu perfil antimicrobiano. Desta forma, optamos por incluir estas últimas em nosso trabalho de avaliação da atividade antifúngica, pois assim teríamos um conjunto de moléculas com variações estruturais decorrentes do padrão de substituição de aldeídos e cetonas, fatores estéreo-eletrônicos, e, evidentemente, considerando a disponibilidade de nosso almoxarifado.

O grupo de chalconas-alvo de nosso estudo é formado por 28 compostos, com suas estruturas apresentadas na [Figura 2B]. Dentre estas, as chalconas **1-2** (BATOVSKA *et al*, 2007), **4** (LÓPEZ *et al*, 2001), **10** (BAG, RAMAR e DEGANI, 2009), **20-21**<sup>1</sup>, **23-25** (AZZAD, MUNAWAR e SIDDIQUI, 2007) e **26** (LI *et al*, 1995), já foram descritas na literatura, sendo que as demais são inéditas.

<sup>13</sup> Iniciação Científica de Leandro de Sá Bortolozzo (Proc. Fapesp 2009/00996-3).

**Figura 2B:** Chalconas-alvo deste estudo



**Figura 2B (continuação):** Chalconas-alvo deste estudo

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**



## 2.1 Química

### 2.1.1. Reagentes e Análises

As chalconas foram sintetizadas utilizando-se a reação de Claisen-Schmidt, discutida em detalhe no Capítulo 4 (Resultados e Discussão).

Neste trabalho, os reagentes e os solventes utilizados foram adquiridos Sigma-Aldrich®, Acros-Organics®, Merck®, Fluka® e Vetec®.

Todas as reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de alumínio com sílica gel 60 GF 254 da Merck, utilizando em luz ultravioleta ( $\lambda = 254$  nm) e anisaldeído sulfúrico como revelador.

Quando necessário, os compostos foram purificados por cromatografia em coluna (CC), utilizando-se sílica gel Aldrich (70 - 230 mesh ou 230 - 400 mesh). O diâmetro e a altura das colunas variaram de acordo com a quantidade de material, e a eluição foi feita com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade. As frações foram monitoradas por CCD, conforme descrito acima.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  (250 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (250 MHz) foram realizados em equipamento BRUKER 250 MHz, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS) ou clorofórmio. Para todas as amostras analisadas utilizou-se clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como solvente. Para indicar a multiplicidade dos sinais seguimos as seguintes convenções: singlete (s), dubleto (d), duplo dubleto (dd), ddd (duplo duplo dubleto), quarteto (q), ht (hepteto) e multipletto (m). A multiplicidade dos carbonos foi determinada por DEPT-90 e DEPT-135.

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram obtidos através de um espectrofotômetro de FIT-IR Nicolet, modelo impact 410 com transformada de Fourier, utilizando pastilha de KBr quando na forma de sólido ou filme quando amostra líquida, sendo as frequências expressas em  $\text{cm}^{-1}$ .

Os reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram das marcas comerciais: Aldrich, Merck, Acros-organics e Sigma com grau de pureza acima de 95%.

Os novos compostos tiveram sua pureza determinada por Análise Elementar ou Espectrometria de Massas de Alta Resolução. No primeiro caso, a análise foi realizada utilizando-se um analisador Perkin Elmer CHNS 2400, e no segundo, um Xevo Q-Tof da Waters, com fonte ESI (Electrospray Ionization). A nomenclatura dos compostos foi fornecida pelo programa Chem Draw e não corresponde obrigatoriamente à nomenclatura oficial IUPAC.

### **2.1.2. Tratamento dos resíduos**

Durante o desenvolvimento da pesquisa foi priorizada a utilização de reagentes e solventes de baixa periculosidade, e fácil recuperação. Os solventes foram separados (compostos não clorados e compostos organoclorados) para encaminhamento à Diretoria de Segurança do Trabalho e Ética Ambiental do Instituto de Química (IQ) da UNICAMP, para incineração. A sílica, após utilização, foi lavada com metanol e encaminhada ao referido Setor.

## **2.2. Avaliação Microbiológica**

### **2.2.1 Micro-organismos**

Foram utilizadas cepas de *Candida albicans* ATCC 10231. As cepas são preservadas em frascos tipo penicilina, com tampa de borracha e lacre, contendo água destilada estéril, à temperatura ambiente.

### **2.2.2 Meio de cultura**

Foi utilizado o meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) com L-glutamina sem bicarbonato de sódio (Sigma Chemical), suplementado com glicose (2%) tamponado com 0,165M de ácido morfilenopropanosulfônico (MOPS), da Sigma.

### **2.2.3 Avaliação dos Compostos**

Foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo, para quatro concentrações diferentes (testes em triplicata), de acordo com a metodologia descrita no documento do NCCLS (Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada - Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]),<sup>14</sup> que permite a determinação da Concentração Inibitória Mínima e concentração fungicida Mínima para as substâncias em estudo. A avaliação é realizada em placas de microtitulação, esterilizadas e com fundo chato. Anfotericina-B foi empregada como controle positivo.

---

<sup>14</sup>Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. NCCLS, Villanova, Pennsylvania, 2002.

#### **2.2.4 Citotoxicidade *in vitro***

A avaliação citotóxica *in vitro* foi realizada no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas sob a supervisão do Professor Dr. Marcelo Lancelotti. A citotoxicidade do composto mais ativo foi avaliada frente à linhagem celular 3T3 que é formada por fibroblastos de camundongo albino suíço [SAOTOME *et al*, 1989], cultivadas em meio RPMI 1640. O composto foi diluído em DMSO, em quatro concentrações diferentes.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

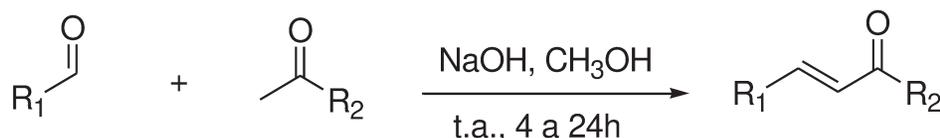


### 3.1 Síntese de Chalconas

#### 3.1.1 A Reação de Claisen-Schmidt

Há vários métodos descritos na literatura (BOHM, 1998), (YANG, 2001), (DASKIEWICZ, 1999), (SEBTI, 2001 e 2003), (REDDY, 2001), (EDDARIR, 2003) e (ZHANG, 2003) para a obtenção de chalconas, mas optamos pela condensação de Claisen-Schmidt. A reação de Claisen-Schmidt foi descoberta de maneira independente por Claisen e Schmidt (CLAISEN e LAPAREDE, 1881) e (SCHMIDT, 1881), é uma reação de condensação aldólica entre um aldeído e uma cetona, seguida de uma desidratação espontânea, fornecendo então uma cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada. O catalisador clássico desta reação é o hidróxido de sódio que atua como base, e, posteriormente, muitas outras bases foram utilizadas, destacando-se o hidróxido de potássio.

A reação global está representada na [Figura 3B].



**Figura 3B:** Esquema geral da reação de Claisen-Schmidt.

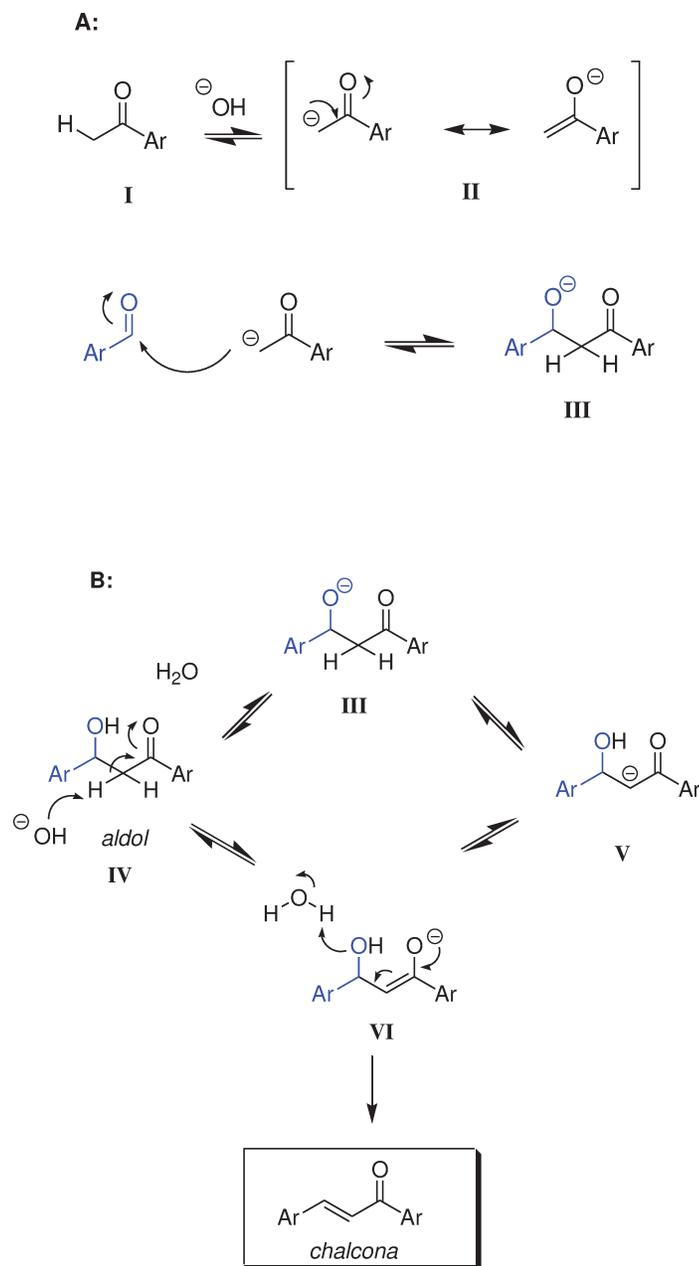
Este método destaca-se pela sua praticidade experimental e custo. O procedimento, detalhado na parte experimental, consiste em misturar o aldeído, a cetona e o metanol, e adicionar o hidróxido de sódio em pastilhas, à temperatura ambiente. Uma vez que o produto apresenta um sistema altamente conjugado, a sua formação é perceptível, pois na maioria dos casos, observamos a mudança de coloração do meio reacional, de incolor para levemente amarelado, e esta tonalidade, vai se intensificando, à medida que a concentração do produto vai aumentando. Na grande maioria dos casos, a chalcona resultante é insolúvel em metanol e precipita no meio reacional, como é o exemplo apresentado na [Figura 4B]. Este fato facilita bastante o processo de isolamento do produto por filtração e quando a purificação se faz necessária, a recristalização é geralmente eficiente. Face ao exposto, justifica-se a escolha da condensação de Claisen-Schmidt como método de primeira escolha para a síntese destes compostos.



**Figura 4B:** Aspecto típico de uma reação de preparação de chalconas

O mecanismo da reação inicia-se [Figura 5B: A] com a desprotonação do  $H_{\alpha}$  (ácido) do carbono metílico da cetona (**I**) em presença catalítica da base forte (NaOH) levando à formação do enolato correspondente, estabilizado por ressonância (**II**). Em seguida, o íon enolato ataca o carbono eletrofílico ( $\delta^+$ ) da

carbonila do aldeído, resultando no intermediário **III**, que é um composto  $\beta$ alcóxi-carbonílico (McMURRY, 2011) e (CAREY, 2011).



**Figura 5B:** Mecanismos para a reação de Claisen-Schmidt

O intermediário **III** pode ser protonado para gerar um aldol (**IV**), ou gerar **V**, por uma transferência de próton intramolecular [Figura 5B]. O aldol **IV** e/ou o enolato **V** levam ao  $\beta$ -hidroxi-enolato **VI**, precursor da chalcona.

### 3.1.2 Obtenção das Chalconas<sup>15</sup>

As chalconas foram preparadas a partir dos correspondentes aldeído e cetona, empregando-se metanol como solvente e hidróxido de sódio em pastilhas como base. O esquema reacional está representado a seguir e a [Tabela 1B] apresenta os rendimentos químicos para cada uma das preparações. O mesmo procedimento foi adotado para os dois grupos de aldeídos: benzaldeídos substituídos e aldeídos quinolínicos.

**Tabela 1B:** Rendimentos químicos das chalconas 1-28 Obtidas.

$$\begin{array}{c}
 \text{R}_1\text{-CHO} + \text{CH}_3\text{-CO-R}_2 \xrightarrow[\text{t.a., 4 a 24h}]{\text{NaOH, CH}_3\text{OH}} \text{R}_1\text{-CH=CH-CO-R}_2
 \end{array}$$

| No. | R <sub>1</sub>         | R <sub>2</sub>             | Rend.<br>(%)     |
|-----|------------------------|----------------------------|------------------|
| 1   | 4-clorofenil           | fenil                      | 95               |
| 2   | 4-clorofenil           | 3',4'-dimetoxifenil        | 98               |
| 3   | 4-bromofenil           | 3',4'-dimetoxifenil        | 91               |
| 4   | 4-nitrofenil           | fenil                      | 68               |
| 5   | 4-nitrofenil           | 3',4'-dimetoxifenil        | 69               |
| 6   | 4-nitrofenil           | 2',4',6'-triisopropilfenil | 80               |
| 7   | 2-fluorofenil          | 3',4'-dimetoxifenil        | 58               |
| 8   | 2-fluorofenil          | 2',4',6'-triisopropilfenil | 85               |
| 9   | 2-fluorofenil          | 2',4'-difluorfenil         | (-) <sup>a</sup> |
| 10  | 4-metiltiofenil        | fenil                      | 55               |
| 11  | 4-metiltiofenil        | 2',5'-diclorofenil         | 68               |
| 12  | 4-metiltiofenil        | 3',4'-dimetoxifenil        | 65               |
| 13  | 3,4-metilenodioxifenil | 2',4'-dimetoxifenil        | 53               |

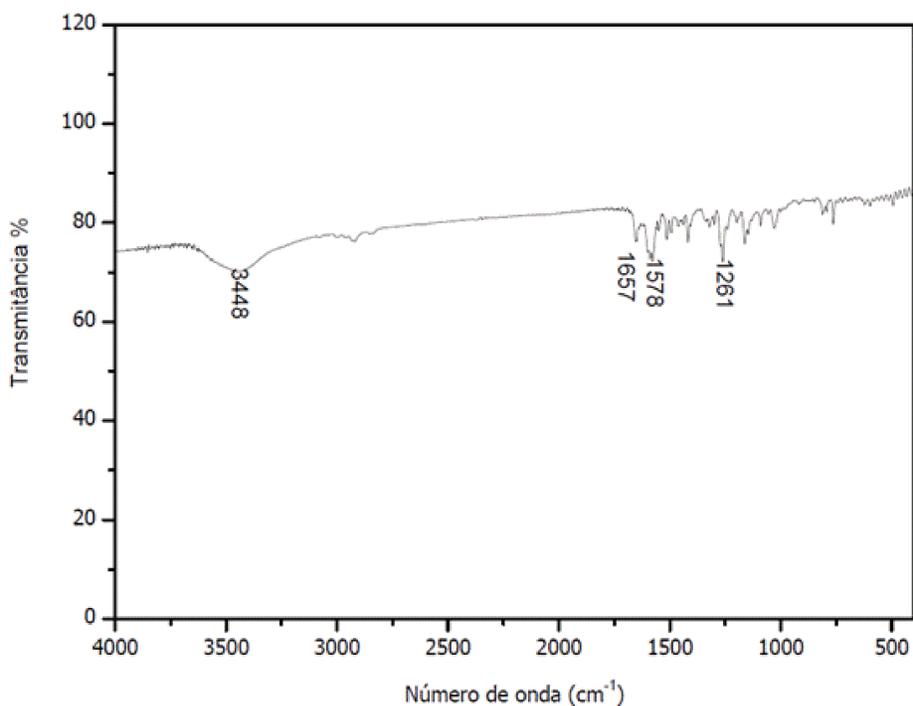
<sup>15</sup>Esta parte do trabalho contou com a participação dos alunos de Iniciação Científica: Leandro de Sá Bortolozzo, Amanda Franceschini e Flavio Luiz Pessanha, sob a orientação da Profa. Dra. Wanda P. Almeida.

|           |                        |                            |                  |
|-----------|------------------------|----------------------------|------------------|
| <b>14</b> | 3,4-metilenodioxifenil | 2',4',6'-triisopropilfenil | 73               |
| <b>15</b> | 3,4-metilenodioxifenil | 2', 4'-difluorofenil       | 95               |
| <b>16</b> | 3,4-metilenodioxifenil | 2', 5'-diclorofenil        | 84               |
| <b>17</b> | 2,3-diclorofenil       | fenil                      | (-) <sup>a</sup> |
| <b>18</b> | 2,3-diclorofenil       | 2', 5'-diclorofenil        | 68               |
| <b>19</b> | 2,3-diclorofenil       | 2', 4'-difluorofenil       | 86               |
| <b>20</b> | 2,3-diclorofenil       | 3',4'-dimetoxifenil        | 88               |
| <b>21</b> | 3-quinolinil           | 2',4'-diclorofenil         | 70               |
| <b>22</b> | 3-quinolinil           | 2', 4'-dimetoxifenil       | 60               |
| <b>23</b> | 2-cloro-3-quinolinil   | fenil                      | 81               |
| <b>24</b> | 2-cloro-3-quinolinil   | 2', 4'-difluorofenil       | 63               |
| <b>25</b> | 2-cloro-3-quinolinil   | 3',4'-dimetoxifenil        | 98               |
| <b>26</b> | 2-cloro-3-quinolinil   | 2',4'-dimetoxifenil        | 96               |
| <b>27</b> | 2-cloro-3-quinolinil   | 2',4'-diclorofenil         | 58               |
| <b>28</b> | 2,4-dimethoxyphenyl    | 3',4'-dimethoxyphenyl      | 77               |

<sup>a</sup> Não foi obtida na forma totalmente pura.

Conforme pode ser observado pela [Tabela 1B], sendo que os rendimentos variaram entre 53 a 98%.

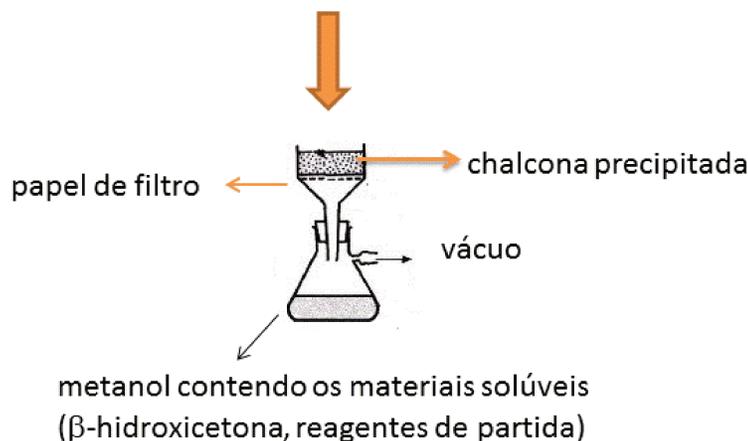
Em relação à chalcona **9** formou-se uma mistura de produtos e mesmo após as tentativas de purificação, não foi possível obter uma amostra pura. A análise de seu espectro no Infravermelho [Figura 6B] não indica a presença de deformações axiais correspondentes às carbonilas dos materiais de partida, mas sim, de uma carbonila ( $1657\text{ cm}^{-1}$ ) e de uma dupla conjugadas ( $1578\text{ cm}^{-1}$ ). Entretanto, o espectro de RMN- $^1\text{H}$ , apresenta impurezas que não puderam ser eliminadas e nem mesmo caracterizadas. Esta dificuldade é particularmente grande devida à complexidade do espectro do produto que apresenta acoplamentos com o flúor.



**Figura 6B:** Espectro no IV do produto obtido na tentativa de preparação da chalcona **9**.

Os menores rendimentos foram observados na preparação das chalconas **7**, **10**, **13**, **22** e **27** todas com rendimento  $\leq 60\%$ . Atribuímos os rendimentos mais baixos à dificuldade encontrada na purificação. Entretanto não poderíamos deixar de considerar a possibilidade de não termos obtido uma boa conversão, mas a cromatografia em cada delgada, que foi utilizada para monitorar a reação, não mais revelava a presença dos materiais de partida (aldeídos e cetonas correspondentes). No caso das chalconas **22** e **27**, apareceu uma mancha minoritária na placa, que pensamos se tratar do intermediário  $\beta$ -hidrocarbonilado, sugerindo que a etapa de eliminação não é favorecida nestes casos. Se isso acontecesse, a  $\beta$ -hidroxicetona intermediária seria “perdida” na etapa de isolamento por filtração, pois este intermediário seria solúvel em metanol e o filtrado vinha sendo sistematicamente descartado, e, o precipitado, recolhido no processo [Figura 7B].

mistura reacional  
( metanol + chalcona sólida + materiais de partida + intermediário)



**Figura 7B:** Representação do procedimento de isolamento por filtração.

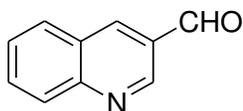
Para descartar ou confirmar esta possibilidade, o filtrado foi recolhido, e o solvente removido. O resíduo foi seco a vácuo e em seguida analisado por RMN. O espectro de  $^{13}\text{C}$  – DEPT 135 não revelou sinal de grupo metileno, não corroborando para a hipótese do intermediário não sofrer eliminação. Apenas no caso da chalcona **22** foi detectada a presença do intermediário  $\beta$ -hidroxiketona. Assim, o filtrado foi acidificado na tentativa de promover a reação de eliminação, mas formou-se uma mistura complexa que não pode ser resolvida pelas técnicas usuais de purificação.

Os fatores estérico-eletrônicos podem afetar o curso de uma reação. A dificuldade de formação do enolato, mesmo em equilíbrio, poderia ser apontada como um fator que contribui para o rendimento não muito elevado. Em relação aos fatores estéricos, as cetonas que levam aos compostos **22** e **26** apresentam substituintes na posição *orto* ao grupo carbonila da cetona de partida, pois é a mesma. Entretanto, outras também apresentam e permitem a obtenção dos produtos em bons rendimentos, destacando-se inclusive, as cetonas *orto*-dissubstituídas por grupos isopropila, enquadrando-se nesta

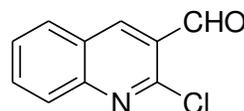
situação os compostos **8**, **6** e **14**. A diferença então residiria então em fatores eletrônicos ou mesmo experimentais.

Ainda considerando as chalconas **22** e **26**, a diferença residiria na reatividade do aldeído: o precursor da chalcona **22** é o 3-quinolinilcarboxaldeído, enquanto o da chalcona **26** é o 2-cloro-3-quinolinilcarboxaldeído. Buscando racionalizar os resultados observados, foram calculadas as energias de LUMO destes aldeídos e a carga de Mülliken (qMC) [Tabela 2B].

**Tabela 2B:** Energia de orbital LUMO e Carga de Mülliken para os aldeídos quinolínicos.



*3-quinolinil-carboxaldeído*



*2-cloro-3-quinolinil-carboxaldeído*

| Aldeído                                  | $E_{\text{LUMO}}$ (eV) | (qMC)   |
|--|------------------------|---------|
| <b>3-quinolinil-carboxaldeído</b>        | - 6,415                | + 0,209 |
| <b>2-cloro-3-quinolinilcarboxaldeído</b> | - 6,405                | + 0,211 |

As diferenças observadas não são muito grandes, embora apontem para uma maior reatividade do aldeído clorado. Assim, acreditamos que o rendimento químico mais baixo para a chalcona **22**, deva ser decorrente de uma combinação de fatores.

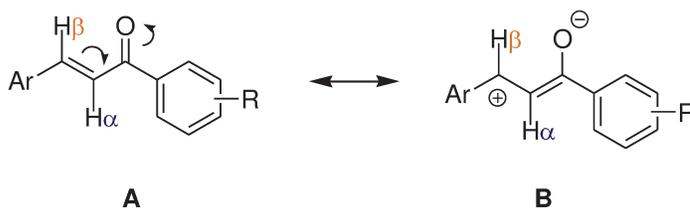
Embora os rendimentos químicos dos produtos obtidos sejam compatíveis com alguns descritos na literatura para a síntese de chalconas, buscamos otimizá-los utilizando algumas estratégias, tais como troca da base (NaOH), por hidróxido de potássio, mas não obtivemos uma melhora significativa no rendimento da reação. O uso de refluxo levou a uma mistura de produtos que não puderam ser identificados.

A estrutura do produto formado na reação de Claisen-Schmidt foi confirmada por métodos espectroscópicos, i.e., espectroscopia no Infravermelho, de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . A espectrometria de massas de alta resolução e/ou análise elementar foi restrita aos compostos inéditos. Nos subitens seguintes discutiremos as principais características espectroscópicas dos grupos de chalconas sintetizadas. Os espectros dos compostos encontram-se no Anexo.

### 3.1.3 Análise espectroscópica dos produtos

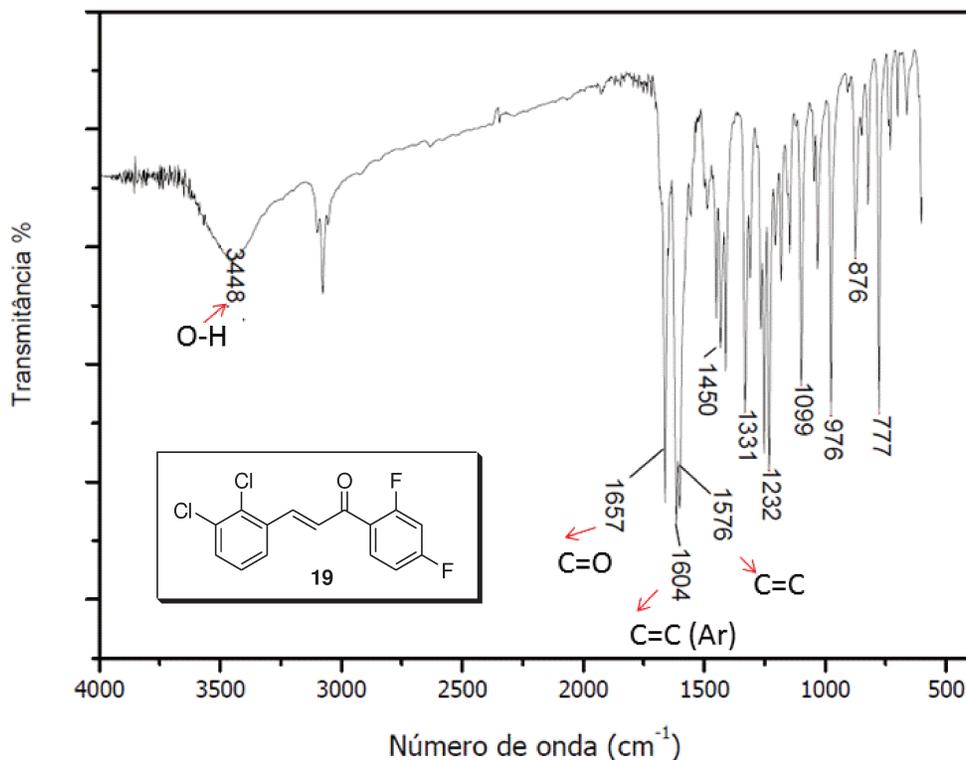
Como características gerais, destacamos:

a) No *Espectro de Infravermelho*, não há absorções correspondentes à deformação axial de ligações C-H de aldeídos (duas bandas fracas em 2850 e 2750  $\text{cm}^{-1}$ ), e nem das carbonilas correspondentes aos reagentes (aldeídos aromáticos e acetofenonas). Em contrapartida, observamos a absorção correspondente à ligação dupla e a absorção correspondente à deformação axial da ligação C=O do sistema altamente conjugado, em torno de 1580 e 1650, respectivamente. Estes valores sofrem alterações de até 10  $\text{cm}^{-1}$ , para mais ou para menos, dependendo dos substituintes do anel aromático. Tanto a ligação dupla, quanto a carbonila, são fortemente deslocadas em função da conjugação [Figura 8B]. Além disso, a intensidade da absorção da ligação dupla é consideravelmente mais alta do que as de duplas não conjugadas (PAVIA *et al*, 2010).



**Figura 8B:** Estruturas de ressonância do sistema conjugado.

Um detalhe que foi motivo de grande discussão foi à presença de uma absorção em torno de  $3440\text{ cm}^{-1}$ . Esta absorção é geralmente associada à deformação axial de ligações O-H de álcoois. Nas primeiras reações utilizadas, atribuímos esta absorção à contaminação de solvente, pois as reações eram feitas em metanol. Entretanto, após mantermos bastante tempo o material em bomba de alto vácuo, a análise ainda revelava a presença desta banda. Levantamos também a possibilidade de ser resultante de umidade no KBr utilizado na preparação de pastilhas, mas esta hipótese foi descartada pois mesmo após troca do KBr e tratamento para secagem do mesmo, a banda persistia, sempre na mesma região. Embora existam na literatura vários artigos falando sobre a síntese de chalconas com diferentes propósitos, em geral na parte experimental só descrevem as absorções da carbonila e da dupla conjugada. Apenas em uma referência (BORCHHARDT, 2010), na qual se descreve a síntese de várias chalconas, está descrita a presença desta absorção, porém sem atribuição. Um espectro de infravermelho típico de uma chalcona (**19**) está apresentado na [Figura 9B].

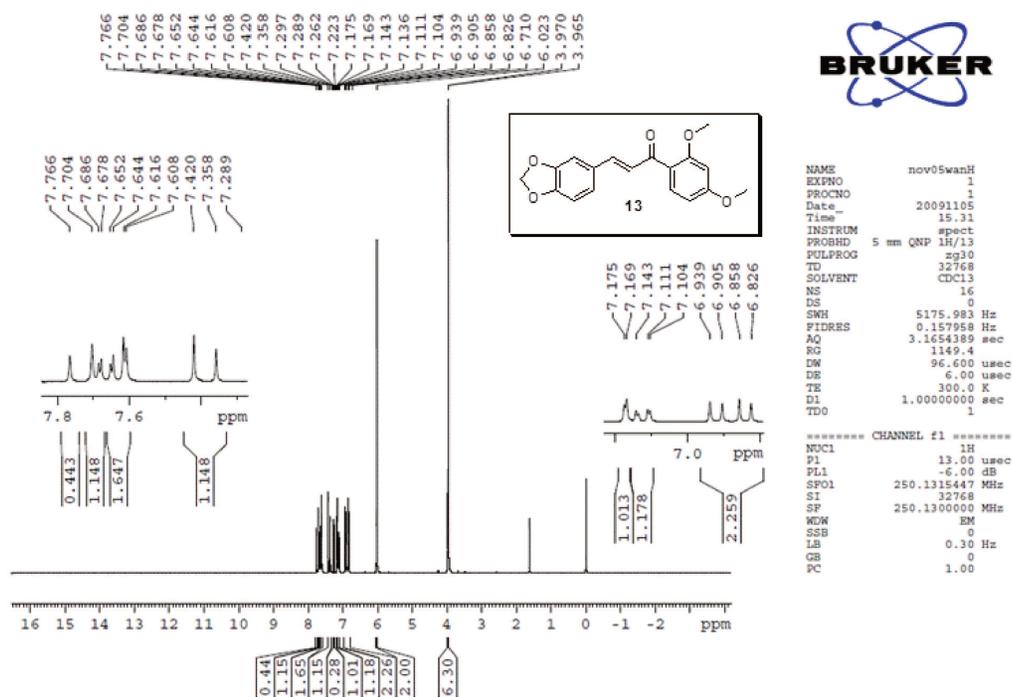


**Figura 9B:** Espectro no Infravermelho com as absorções típicas de chalconas

b) No espectro de  $RMN-^1H$ , a presença de um dubleto em campo baixo, integrando para 1H, com constante de acoplamento variando de 15 a 17 Hz confirma a formação de uma ligação dupla com a configuração *E*. Este dubleto é atribuído ao hidrogênio vínico, da posição  $\beta$  ao grupo carbonila, e o seu deslocamento em campo baixo pode ser explicado pela contribuição da estrutura de ressonância *B*. A constante de acoplamento é característica destes sistemas com a configuração da ligação dupla sendo *E*. Além disso, não há nos espectros sinais correspondentes ao H aldeídico e nem da metila ligada à carbonilacetônica. De acordo com Cesarin-Sobrinho, Netto-Ferreira E Braz-Filho (CESARIN-SOBRINHO, NETTO-FERREIRA e BRAZ-FILHO, 2001), em seus estudos de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1H$  e  $^{13}C$ , realizados com a chalconas fluoradas nos anéis A e B, os deslocamentos químicos dos

hidrogênios olefínicos  $H\alpha$  e  $H\beta$ , dependem principalmente do ambiente químico gerado pelos anéis aromáticos e seus substituintes. Para os carbonos, os espectros de RMN  $^{13}C$  (HBBD - totalmente desacoplado e DEPT) das chalconas mostraram que o  $C\beta$  absorve em campo mais baixo do que o  $C\alpha$ , como previsto pelo efeito de ressonância exercido pela carbonila. Os efeitos gerados pela presença de substituintes polares no anel aromático (anel A) são transmitidos por efeito de ressonância para  $H\beta$  e  $C\beta$  e por indução para  $H\alpha$  e  $C\alpha$ . Por outro lado, substituintes do anel aromático ligado ao carbono carbonílico exercem efeito indutivo maior (DANTAS *et al*, 1984) em  $H\beta$  e  $C\beta$  do que em  $H\alpha$  e  $C\alpha$ .

Na [Figura 10B], apresentamos o espectro de RMN- $^1H$  da chalcona **13**, com destaque para as absorções correspondentes aos prótons vinílicos  $H\beta$  e  $H\alpha$ , onde podemos ter uma idéia da grandeza da constante de acoplamento.

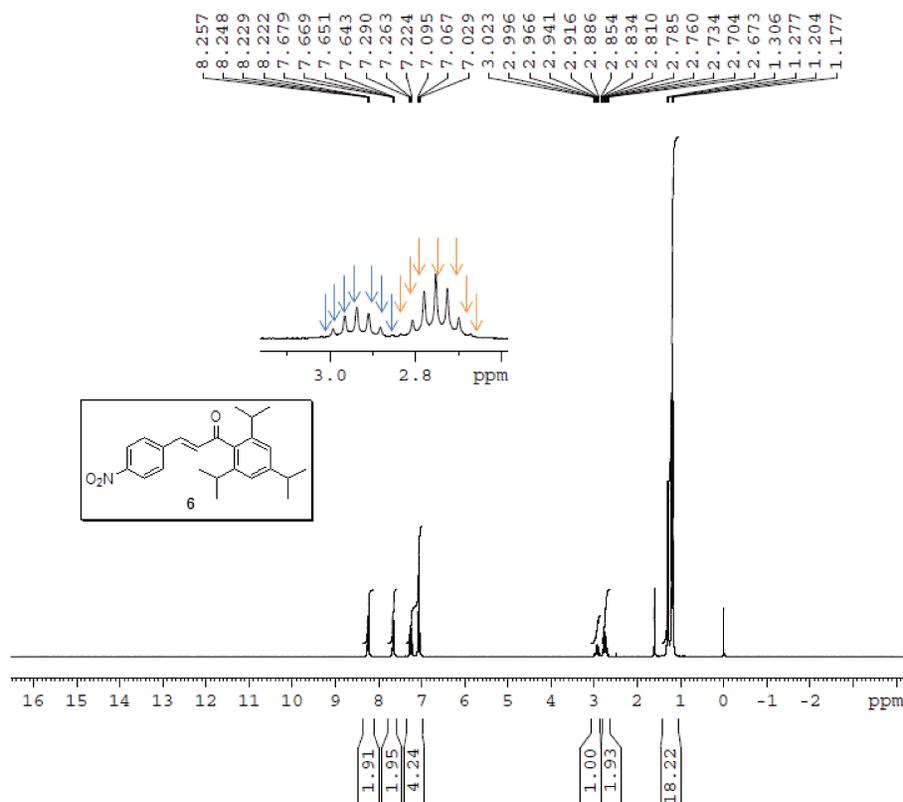


**Figura 10B:** Espectro de RMN- $^1H$  da chalcona **13**

Além dos prótons vinílicos com seus acoplamentos característicos, algumas chalconas apresentam grupos funcionais que resultam em absorções características no espectro de RMN-<sup>1</sup>H. Como são vários compostos, com padrões estruturais diferentes, selecionamos alguns exemplos para ilustrar os espectros de RMN-<sup>1</sup>H.

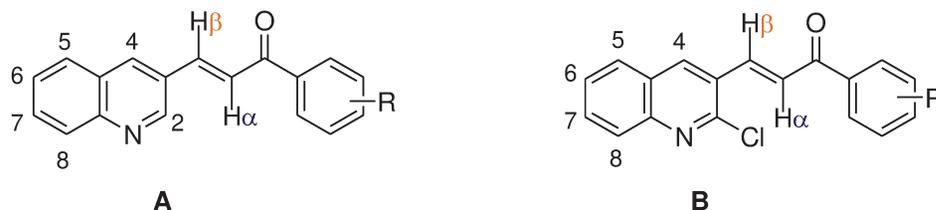
b.1) chalconas **13-16** contendo o grupo metileno dioxi: apresentam em seu espectro de RMN-<sup>1</sup>H um singlete em torno de  $\delta$  6,0 ppm, integrando para 2 hidrogênios. Neste caso, este sinal é escolhido para calibrar a integral. O espectro apresentado na figura 5 também é útil para ilustrar esta absorção.

b.2) chalconas **6,8** e **14** contendo grupos isopropilas: apresentam as absorções características das metilas e do CH, cada uma delas organizadas em duas regiões, conforme ilustrado na [Figura 11B]. A primeira (em azul) é um hepteto centrado em  $\delta$  2,92, integrando para 1H; a segunda (em vermelho) é um hepteto centrado em  $\delta$  2,76, integrando para 2H. Estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios metínicos do grupo isopropila *para* ao grupo carbonila e aos mesmos hidrogênios dos grupos nas duas posições *orto*, respectivamente. Neste espectro ilustrativo, também é possível observar o padrão de acoplamento dos hidrogênios do anel aromático 1,4-dissubstituído, que se destacam dos demais hidrogênios.



**Figura 11B:** Espectro de RMN-1H da chalcona **6**

b.3) chalconas **21-27**, contendo núcleos quinolínicos: um grupo não clorado (A), e outro clorado (B), [Figura 12B].



**Figura 12B:** Estruturas de chalconas quinolínicas.

A [Tabela 3B] apresenta os deslocamentos mais característicos desta série de chalconas, que são os dos prótons H4 e H $\beta$ . Observamos que nestes casos, seja o anel quinolínico clorado ou não, o H4 é o mais desprotegido, apresentando-se em campo mais baixo, ao contrário da maioria das chalconas não quinolínicas, cujos hidrogênios vinílicos (H $\beta$ ) são os prótons mais desprotegidos de todos.

**Tabela 3B:** Deslocamentos dos prótons H4 e H $\beta$  das chalconas quinolínicas.

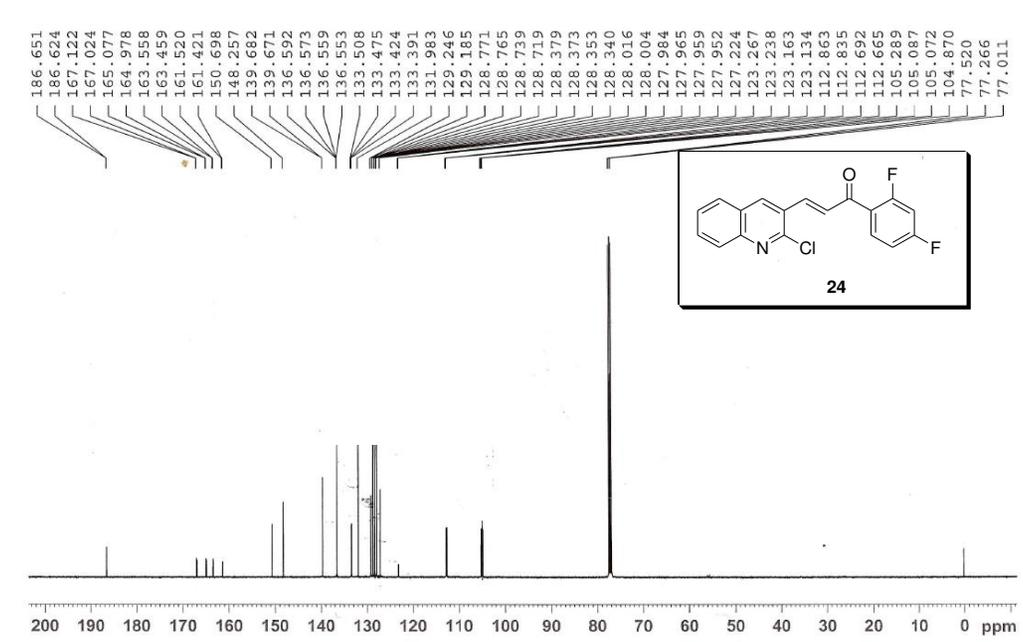
| Chalconas | H4 ( $\delta$ ppm) | H $\beta$ ( $\delta$ ppm) |
|-----------|--------------------|---------------------------|
| 21        | 8,31               | 7,67                      |
| 22        | 9,20               | 7,85                      |
| 23        | 8,25               | 7,74                      |
| 24        | 8,48               | 8,22                      |
| 25        | 8,49               | 8,18                      |
| 26        | 8,41               | 8,06                      |
| 27        | 8,46               | 7,95                      |

Embora tenha sido possível interpretar satisfatoriamente os espectros de EMN das chalconas sintetizadas, em alguns casos houve problemas relacionados à integração de alguns sinais na região dos prótons aromáticos. A integração foi difícil em muitos casos, pois o sinal do solvente clorofórmio cai exatamente na região onde muitos prótons dos dois anéis aromáticos da chalcona absorvem. Nos casos em que tínhamos pouca quantidade de amostra e a solução era diluída, a contribuição do próton do clorofórmio era muito alta. Esta é uma situação que pode ocorrer na análise de compostos orgânicos e que normalmente se resolve mudando o solvente utilizado para análise. Entretanto, as chalconas não são solúveis nos solventes mais rotineiros. Outra questão difícil de ser resolvida é o caso das chalconas fluoradas. Uma vez que o flúor ( $^{19}\text{F}$ ) apresenta a mesma razão giromagnética ( $\gamma = 1/2$ ) do próton ( $^1\text{H}$ ), os acoplamentos são estendidos e a região, particularmente dos aromáticos é muito difícil de analisar. Os acoplamentos com fluor ocorrem até mesmo a cinco ligações.

Os compostos fluorados sintetizados nesta tese foram selecionados para estudo detalhado, empregando-se técnicas bidimensionais e utilizando ressonância de flúor. Este estudo faz parte de um projeto de colaboração com

o Prof. Dr. Claudio Francisco Tormena (IQ-UNICAMP) e será desenvolvido por outro estudante, fugindo ao escopo deste trabalho.

c) No espectro de  $^{13}\text{C}$ , observamos a absorção do grupo carbonila entre 202 (a mais deslocada) e 186ppm (a mais protegida). Assim como nos espectros de RMN-1H, as atribuições são bastante difíceis necessitando de técnicas bidimensionais. Os espectros das chalconas contendo o grupo isopropila também apresentam os grupos CH diferenciados, mas não as metilas. Um espectro que nos chamou bastante atenção foi o da chalcona **24**, pelo desdobramento dos sinais devido ao acoplamento F-C [Figura 13B], principalmente na região entre 170-160 ppm, sugerindo serem estes os singletos C2' e C4'.



**Figura 13B:** Espectro de  $^{13}\text{C}$  da chalcona **24**.

d) Espectrometria de massas de alta resolução. Esta técnica foi empregada para determinação da pureza dos compostos inéditos, nos casos em que não havia massa suficiente para realização da Análise Elemental. As chalconas cloradas e a bromada apresentaram os padrões isotópicos típicos destes

elementos. As análises realizadas foram satisfatórias, isto é, indicaram pureza dentro da faixa considerada aceitável ( $< 0,4\%$ ). Entretanto nos espectros das chalconas **2**, **5** e **21**, aparecem picos adicionais em 279,1734 e 288,3040; 279,1713 e 288,3027; 279,1736 e 288,3049, respectivamente. As chalconas **2** e **5** são derivadas de um reagente comum, o *p*-nitrobenzaldeído, e levantamos a hipótese destes contaminantes serem derivados deste, mas as massas dos picos observados são bastante superiores, e, além disso, a chalcona **21** tem uma origem completamente diferente, e apresenta o pico na mesma região, não corroborando para esta primeira hipótese. Optamos por repetir a reação e juntar material para análise elementar, e esta deu resultado compatível com a pureza esperada. Assim, sugerimos que deva ter havido algum tipo de contaminação na fonte do equipamento.

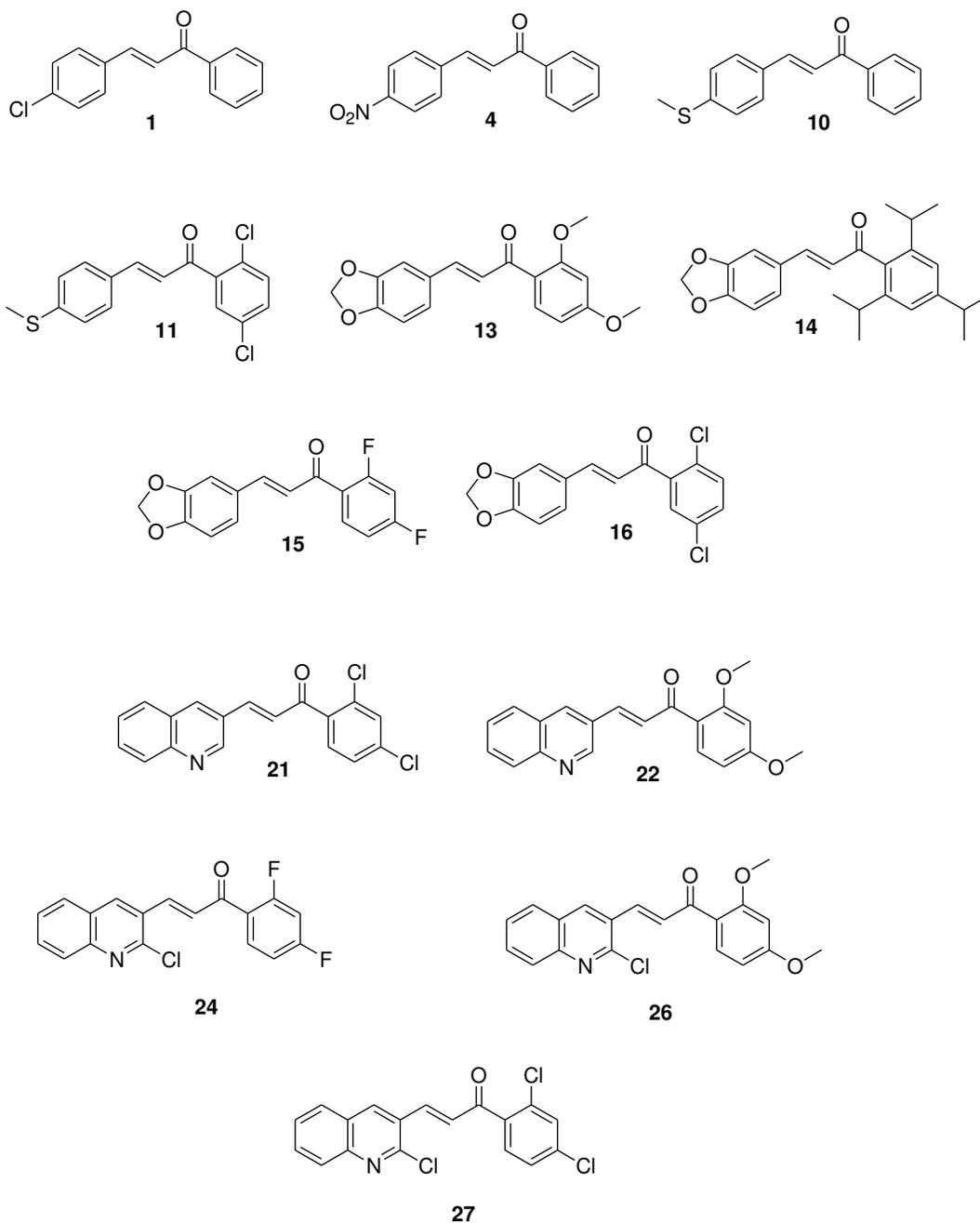
## **3.2 Avaliação Biológica**

Os testes biológicos foram realizados no laboratório dos Profs. Drs. Angélica Zanineli (FCM-UNICAMP) e Marcelo Lancellotti (IB-UNICAMP).

### **3.2.1 Atividade antifúngica**

As amostras foram testadas quanto à sua atividade inibitória do crescimento de cepa padrão de *Candida albicans*. Inicialmente, foi realizado o teste de difusão em disco das amostras selecionadas previamente. Conforme comentado na parte de metodologia, apenas as amostras que foram obtidas em alto grau de pureza foram enviadas para análise. É importante destacar que muitas vezes conseguimos obter uma amostra analítica para caracterização estrutural, mas quando se aumenta a escala no processo de isolamento e purificação pode haver comprometimento da eficácia da metodologia. Dentre os princípios básicos do desenvolvimento de fármacos está a reprodutibilidade dos resultados de síntese, incluindo a etapa de purificação. Assim, foram

selecionadas as chalconas que preenchiam o máximo possível estes requisitos. A [Figura 14B] apresenta as chalconas que foram selecionadas para esta avaliação. A chalcona **22** foi incluída pela forte relação estrutural com as outras, mesmo sem atender completamente estes requisitos.



**Figura 14B:** Chalconas selecionadas para teste antimicrobiano.

Aquelas substâncias que apresentaram halo de inibição superior a 10 mm foram submetidas ao teste de microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os resultados da avaliação antimicrobiana se encontram na [Tabela 4B].

**Tabela 4B:** Atividade antifúngica das chalconas estudadas frente à *C. albicans*.

| Chalcona              | CIM<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|-----------------------|-----------------------------|
| <b>4</b>              | 250                         |
| <b>10</b>             | 125                         |
| <b>11</b>             | 100                         |
| <b>14</b>             | 250                         |
| <b>21</b>             | 72,5                        |
| <b>24</b>             | 175                         |
| <b>26</b>             | 9,0                         |
| <b>27</b>             | 36,5                        |
| <b>Anfotericina B</b> | 12                          |

Estes valores são superiores áqueles relatados na literatura [LÓPEZ et.al., 2001]. Na verdade, não é possível fazer uma comparação direta, uma vez que o meio de cultivo que utilizamos é diferente do utilizado por estes autores.

Conforme pode ser observado pelos dados apresentados na tabela, apenas oito chalconas apresentaram halo de inibição superior a 10 mm. Dos 8 compostos sintetizados com a MIC determinada, 4 compostos (chalconas **21**, **24**, **26** e **27**) foram propostos no estudo QSAR-2D. Portanto, dentre os 5 compostos propostos para síntese, 4 apresentaram atividade biológica. Podemos afirmar que apenas um composto (chalcona **26**) apresentou uma atividade biológica considerável.

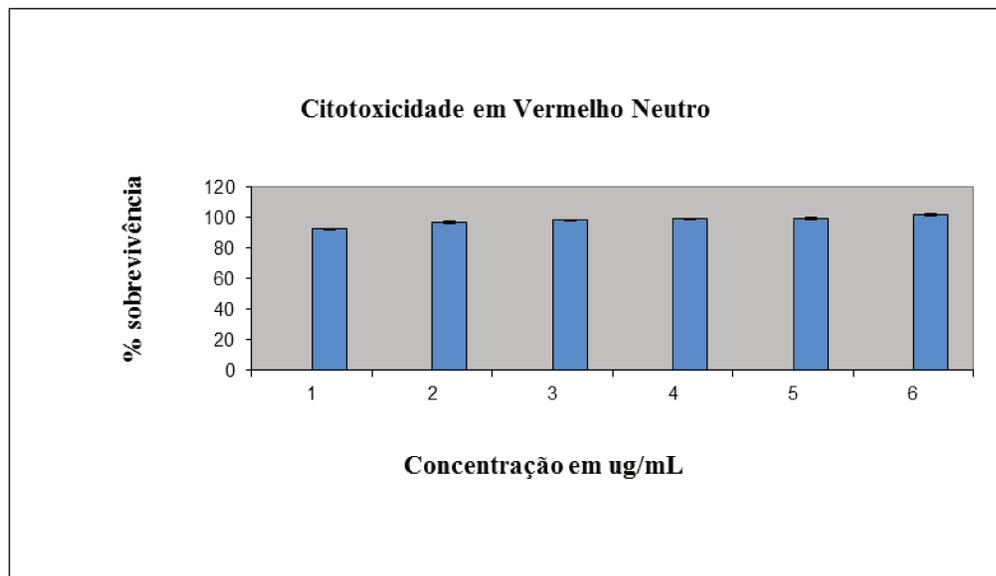
### 3.2.2 Citotoxicidade *in vitro*

A substância mais ativa foi avaliada quanto à sua citotoxicidade *in vitro*, empregando-se células 3T3 que é uma linhagem de fibroblastos de camundongo albino suíço. A substância foi diluída em DMSO nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,12 µg/mL e adicionadas ao meio. O método escolhido para a determinação do percentual de células sobreviventes foi o de recaptação de vermelho neutro, fazendo-se a leitura da absorbância em 540 nm, conforme detalhado no procedimento experimental. Os dados obtidos se encontram na [Tabela 5B].

**Tabela 5B:** Taxa de sobrevivência da linhagem 3T3 na presença da chalcona **26**

| Concentração | % de sobrevivência | desvio padrão |
|--------------|--------------------|---------------|
| 100 ug/mL    | 92,6               | 0,45          |
| 50 ug/mL     | 96,7               | 0,9           |
| 25 ug/mL     | 98,5               | 0,3           |
| 12,5 ug/mL   | 99,4               | 0,5           |
| 6,12 ug/mL   | 99,4               | 0,8           |
| 0            | 101,8              | 0,7           |

Conforme pode ser observado, a chalcona **26** não apresentou toxicidade para a linhagem celular estudada, sendo bastante elevado o percentual de sobrevivência. Este resultado é bastante importante, pois sugere que a toxicidade da chalcona é seletiva para *Candida albicans*. A [Figura 15B] apresenta o gráfico correspondente à [Tabela 5B]. A primeira barra da direita (entrada 6) corresponde ao controle negativo, representado pelas células na ausência da substância-teste. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.



**Figura 15B:** Sobrevivência das células 3T3 na presença da chalcona **26**



## **4. PARTE EXPERIMENTAL**



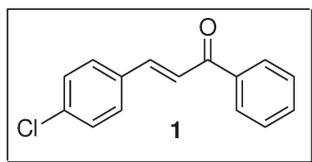
#### 4. 1 Procedimento Geral para Síntese de Chalconas

Em um balão de 25 ml foram adicionados 3mmol do aldeído, 3 mmol da cetona e em seguida, 10 mL de metanol. À solução resultante, sob agitação magnética e à temperatura ambiente, foram adicionados aos poucos 12 mmol de NaOH. A mistura resultante permaneceu sob agitação magnética e à temperatura ambiente, e a reação foi monitorada por cromatografia em camada fina. Ao final da reação, a mistura reacional foi filtrada em funil de Büchner, e o sólido, lavado com metanol gelado. Após ter sido coletado, o material foi seco inicialmente à temperatura e pressão ambientes e, posteriormente a vácuo.

Devido à precipitação de pouca quantidade de material, as chalconas **10**, **11**, **17-19** e **26** foram isoladas de modo alternativo, como se segue. Quando não mais se observou progresso da reação por CCD, o metanol foi evaporado e o resíduo particionado entre AcOEt e solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi separada, seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e o solvente evaporado sob pressão reduzida, fornecendo o produto bruto.

Quando necessário, as chalconas foram purificadas por cromatografia em coluna (CC), utilizando-se sílica gel Aldrich (70 - 230 mesh ou 230 - 400 mesh), ou recristalizadas, de acordo com a indicação específica de cada caso.

##### 4.1.1 Preparação da 3-(4-cloro-fenil)-1-fenil-propenona (1)



Obtida como um sólido amarelo palha, sem purificação adicional.

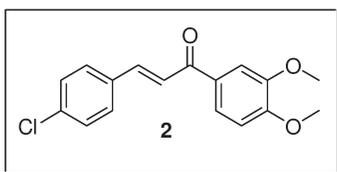
**Ponto de fusão:** 114 - 116 °C. **Rendimento:** 95 %.

**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3448, 1663, 1605, 1593, 1576, 1333, 1219, 1018 cm<sup>-1</sup>;

**RMN-  $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  8,01 (dd,  $J = 6,9$  e  $2$  Hz, 1H,  $\text{H}_2'$ ), 7,77 (d,  $J = 15,3$  Hz, 1H,  $\text{H}\beta$ ); 7,60-7,49 (m, 5H, aromáticos), 7,45 (d,  $J = 15,3$  Hz, 1H,  $\text{H}\alpha$ ), 7,39 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H,  $\text{H}_3$ ).

**RMN-  $^{13}\text{C}$  (62,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  190,33 (C), 146,69 (CH), 143,67 (C), 138,32 (CH), 136,55 (C), 133,49 (CH), 132,84 (CH), 129,59 (2 x CH), 129,26 (C), 128,69 (2 x CH), 128,51 (2 x CH), 122,46 (CH).

#### 4.1.2 Preparação da 3-(4-cloro-fenil)-(3',4'-dimetoxi-fenil)-propenona (2).



Obtida como um sólido amarelo, sem purificação adicional.

**Ponto de fusão:** 104-106°C. **Rendimento:** 98%

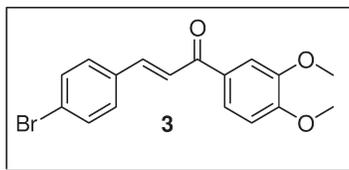
**IV (KBr,  $\nu_{\text{max}}$ ):** 3439, 2932, 1649, 1603, 1575, 1418  $\text{cm}^{-1}$

**RMN-  $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  7,76 (d,  $J = 15,6$  Hz, 1H,  $\text{H}\beta$ ); 7,68 (dd,  $J = 8,4$  e  $2$  Hz, 2H, aromáticos), 7,63-7,57 (m, 4H, aromáticos), 7,53 (d,  $J = 15,6$  Hz, 1H,  $\text{H}\alpha$ ), 6,94 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H,  $\text{H}_5'$ ), 3,98 (s, 6H, 2 x  $\text{OCH}_3$ ).

**RMN-  $^{13}\text{C}$  (62,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  183,34 (C), 153,52 (C), 149,45 (C), 142,53 (CH), 136,42 (C), 133,77 (C), 131,13 (C), 129,53 (2 x CH), 129,21 (2 x CH), 123,19 (CH), 122,17 (CH), 110,77 (CH), 109,75 (CH), 56,40 (2 x  $\text{CH}_3$ ).

**EMAR (ESI TOF).** Calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{ClO}_3$ : 303,0788; encontrado ( $\text{M}^+$ ): 303,0840.

#### 4.1.3 Preparação da 3-(4-bromo-fenil)-(3',4'-dimetoxi-fenil)-propenona (3).



Obtida como um sólido amarelo, após coluna cromatográfica (AcOEt-Hex 10%).

**Ponto de fusão:** 134–135 °C. **Rendimento:** 91%.

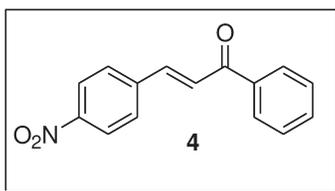
**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3003, 2939, 1657, 1599, 1580, 1418  $\text{cm}^{-1}$ ;

**RMN- $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  7,71 (d,  $J = 15,6$  Hz, 1H,  $\text{H}\beta$ ), 7,68 (dd,  $J = 8,3$  e  $2,1$  Hz, 1H, 2H,  $\text{H}_2, \text{H}_6$ ), 7,64 (dd,  $J = 8,5$  e  $2,1$  Hz, 2H,  $\text{H}_3\text{-H}_6$ ), 7,55–7,49 (m, 3H, aromáticos), 7,54 (d,  $J = 15,6$  Hz, 1H,  $\text{H}\alpha$ ), 3,95 (s, 6H, 2 x  $\text{OCH}_3$ ).

**RMN- $^{13}\text{C}$  (62,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  188,26 (C), 153,40 (C), 149,30 (C), 142,52 (CH), 133,98 (C), 132,16 (2 x CH), 131,11 (C), 129,72 (2 x CH), 124,56 (C), 123,06 (CH), 122,13 (CH), 110,70 (CH), 109,90 (CH), 56,12 ( $\text{CH}_3$ ), 56,06 ( $\text{CH}_3$ ).

**EMAR (ESI TOF).** Calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{BrO}_3$ : 347,0283; encontrado: 347,0251(M+)

#### 4.1.4 Preparação da 3-(4-nitro-fenil)-1-fenil-propenona (4).



Obtida como um sólido amarelo, após purificação por coluna cromatográfica (AcOEt-Hex 10  $\rightarrow$  20%).

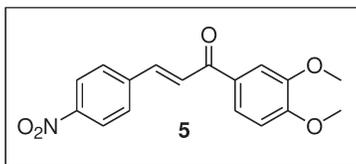
**Ponto de fusão:** 165-166 °C. Lit. (LÓPEZ *et al*, 2001): 164-165 °C

**Rendimento:** 68%.

**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3448, 1657, 1576, 1516, 1337  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN-  $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8,04 (d,  $J = 8,5\text{Hz}$ , 2H, aromáticos), 8,29 (d,  $J = 8,7\text{Hz}$ , 2H, aromáticos), 7,83 (d,  $J = 15,7\text{ Hz}$ , 1H,  $\text{H}\beta$ ), 7,65 (d,  $J = 15,8\text{ Hz}$ , 1H,  $\text{H}\alpha$ ), 7,57 – 7,51 (m, 5H, aromáticos).

#### 4.1.5 Preparação da 3-(4-nitro-fenil)-(3,4-dimetoxi-fenil)-propenona (5).



Obtida como um sólido amarelo intenso, após cromatografia em coluna (AcOEt-Hex 20%)

**Ponto de fusão:** 193–195 °C. **Rendimento:** 69%.

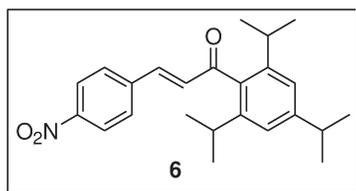
**IV (KBr,  $\nu_{\text{max}}$ ):** 3475, 1654, 1605, 1599, 1577, 1516, 1261  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN-  $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8,23 (d,  $J = 8,8\text{ Hz}$ , 2H, aromáticos); 7,80 (d,  $J = 15,8\text{ Hz}$ , 1H,  $\text{H}\beta$ ), 7,79-7,62 (m, 4H, aromáticos), 7,74 (d,  $J = 15,6\text{ Hz}$ , 1H,  $\text{H}\alpha$ ), 6,96 (d,  $J = 8,5\text{ Hz}$ , 1H, aromático), 3,97 (s, 6H, 2 x  $\text{OCH}_3$ ).

**RMN-  $^{13}\text{C}$  (62,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  187,62 (C), 153,79 (C), 149,46 (C), 148,41 (C), 141,27 (C), 140,67 (CH), 128,83 (2 x CH), 125,40 (CH), 124,17 (2 x CH), 123,32 (CH), 110,71 (CH), 110,01 (CH), 56,14 ( $\text{CH}_3$ ), 56,08 ( $\text{CH}_3$ ).

**EMAR (ESI TOF).** Calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{NO}_5$ : 314,1028; encontrado: 314,1092 ( $\text{M}^+$ )

#### 4.1.6 Preparação da 3-(4-nitro-fenil)-(2,4,6-triisopropil-fenil)-propenona (6).



Obtida como um sólido amarelo.

**Ponto de fusão:** 162–163 °C. **Rendimento:** 80%.

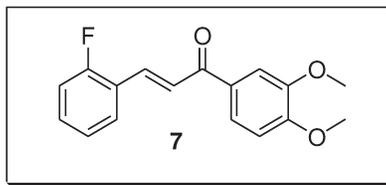
**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3446, 2964, 1651, 1576, 1485, 1458 $\text{cm}^{-1}$ ;

**RMN-  $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  8,24 (dd,  $J = 7,0$  e 2 Hz, 2H, aromáticos), 7,66 (dd,  $J = 7,0$  e 2Hz, 2H, aromáticos), 7,26 (d,  $J = 16,3$  Hz, 1H,  $\text{H}\beta$ ), 7,07 (s, 2H, aromáticos), 7,06 (d,  $J = 16,4$  Hz, 1H,  $\text{H}\alpha$ ), 2,92 (hp,  $J = 6$  Hz, 1H, CH-isopropila), 2,76 (hp,  $J = 6$  Hz, 2H, 2 x CH-isopropila), 1,29 (d,  $J = 7,1$  Hz, 6H,  $\text{CH}_3$ -isopropila), 1,19 (d,  $J = 6,9$  Hz, 12 H,  $\text{CH}_3$ -isopropila).

**EMAR (ESI TOF).** Calculado para  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{NO}_3$ : 380,2226; encontrado: 380,2316 (M+)

**Análise Elementar.** Calcd para  $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{NO}_3$ (%): C, 75,96; H, 7,70; N, 3,69. Encontrado: C, 75,84; H, 7,78; N, 3,61

#### 4.1.7 Preparação da 3-(2-fluoro-fenil)-(3',4'-dimetoxi-fenil)-propenona (7).



Obtida como um sólido amarelo, após cromatografia em coluna (AcOEt-Hex 15%).

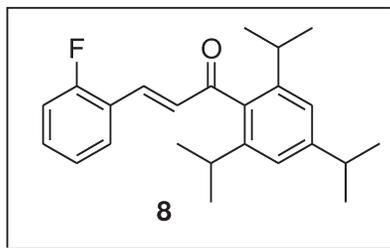
**Ponto de fusão:** 92–93 °C. **Rendimento:** 58%.

**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3072, 2935, 1651, 1593, 1576, 1511, 1421 $\text{cm}^{-1}$ ;

**RMN-  $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  7,89 (d,  $J = 16,1$  Hz, 1H,  $\text{H}\beta$ ), 7,71-7,33 (m, 4H, aromáticos e  $\text{H}\alpha$ ); 7,23-7,10 (m, 2H, aromáticos), 6,94(d,  $J = 8\text{Hz}$ , 1H, aromáticos), 3,97 (s, 6H, 2 x  $\text{OCH}_3$ );

**EMAR (ESI TOF).** Calculado para  $C_{17}H_{16}O_3F$ : 287,1083; encontrado: 287,1097 (M+)

#### 4.1.8 Preparação da 3-(2-fluoro-fenil)-(2',4',6'-trisopropil-fenil)-propenona (8).



Obtida como um sólido amarelo palha, após purificação por cromatografia em coluna.

**Ponto de fusão:** 104–106 °C. **Rendimento:** 85%.

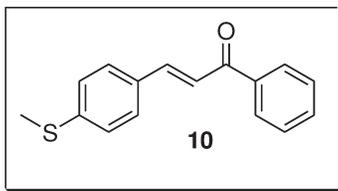
**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3448, 2975, 2918, 2874, 1651, 1578, 1458  $\text{cm}^{-1}$ ;

**RMN- $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  7,56 (ddd,  $J = 7,6, 7,4$  e  $1,6$  Hz, 1H, H $\alpha$ ), 7,41-7,33 (m, 1H, aromático), 7,39 (d,  $J = 16,6$  Hz, 1H, H $\beta$ ), 7,19-7,05 (m, 4H, aromáticos), 7,06 (d,  $J = 16,2$  Hz, 1H, H $\alpha$ ); 2,93 (hp,  $J = 6,8$  Hz, 1H, CH-isopropila); 2,82 (hp,  $J = 6,8$  Hz, 2 x CH-isopropila), 1,29 (d,  $J = 6,7$  Hz, 6H 2 x  $\text{CH}_3$ -isopropila), 1,19 (d,  $J = 6,7$  Hz, 12H, 4 x  $\text{CH}_3$  – isopropila);

**RMN- $^{13}\text{C}$  (62,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  202,20 (C), 162,49 (C), 160,59 (C), 150,26 (C), 145,18 (CH), 139,14 (CH), 132,39 (C), 132,32 (CH), 132,12 (C), 132,07 (CH), 129,30 (CH), 124,69 (CH), 123,10 (C), 121,35 (CH), 116,43 (CH), 34,39 (CH), 31,01 (2 x CH), 24,02 (6 x  $\text{CH}_3$ ).

**Análise Elementar:** Calcd para  $C_{24}H_{29}FO$ (%): C, 81,78; H, 8,29; Encontrado: C, 81,92; H, 8,33.

#### 4.1.9 Preparação da 3-(4-metiltio-fenil)-1-fenil-propenona (10).



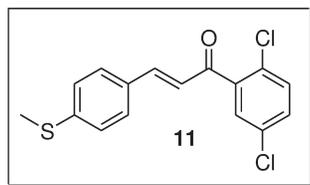
Obtida como um sólido amarelo palha, purificado inicialmente por recristalização (MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), mas a coluna cromatográfica com gradiente de eluição se mostrou mais eficaz.

**Ponto de fusão:** 132-133 °C. Lit. 132-133 °C (BAG, 2009). **Rendimento:** 55%.

**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3448, 1652, 1658, 1593, 1589, 1219, 1018, 820 cm<sup>-1</sup>;

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 250MHz)  $\delta$**  8,01 – 7,99 (m, 2H, aromáticos); 7,77 (d,  $J = 15,7$  Hz, 1H, H $\beta$ ); 7,58 – 7,45 (m, 5H, aromáticos); 7,50 (d,  $J = 16$  Hz, 1H, H $\alpha$ ); 7,26 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H, aromáticos); 2,51 (s, 3H, CH<sub>3</sub>SAr).

#### 4.1.10 Preparação da 3-(4-metiltio-fenil)-(2',5'-dicloro-fenil)-propenona (11).



Obtida como um sólido amarelo palha, purificada por cromatografia em coluna (AcOEt-Hex 10%).

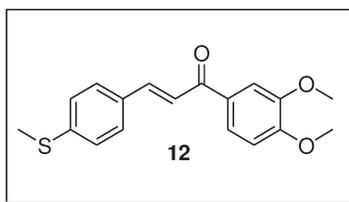
**Ponto de fusão:** 162-164 °C. **Rendimento:** 68%.

**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3439, 1655, 1585, 1337, 1022, 805 cm<sup>-1</sup>

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 250MHz)  $\delta$**  7,49 – 7,32 (m, 5H, aromáticos e 1H, H $\beta$ ); CH<sub>3</sub>SAr).

**Análise Elementar.** Calcd para C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>OS(%): C, 59,45; H, 3,72; Encontrado: C, 59,15; H, 3,83.

#### 4.1.11 Preparação da 3-(4-metiltio-fenil)-(3',4'-dimetoxi-fenil)-propenona (12).



Obtida como um sólido amarelo ouro, sem purificação adicional.

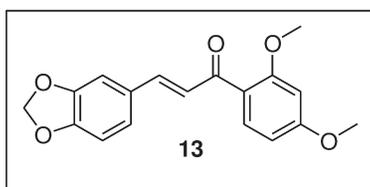
**Ponto de fusão:** 118-119 °C. **Rendimento:** 65%.

**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3476, 3076, 1658, 1610, 1588, 1421, 1288, 1122  $\text{cm}^{-1}$ ;

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 250MHz)  $\delta$**  7,76 (d,  $J = 16$  Hz, 1H, H $\beta$ ), 7,65-7,57 (m, 4H, aromáticos), 7,50 (d,  $J = 16,3$  Hz, 1H, H $\alpha$ ), 7,25 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H, aromáticos), 6,92 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H, aromático), 3,96 (s, 6H, 2 x OCH<sub>3</sub>), 2,51 (s, 3H, CH<sub>3</sub>SAr).

**Análise Elementar.** Calcd para C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>OS(%): C, 59,45; H, 3,72; Encontrado: C, 59,15; H, 3,83.

#### 4.1.12 Preparação da 3-(3,4-metilenodioxi-fenil)-(2,4-dimetoxifenil)-propenona(13).



Obtida como um sólido amarelo palha, após purificação por coluna cromatográfica (AcOEt-Hex 15%).

**Ponto de fusão:** 125-127 °C. **Rendimento:** 53%

**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 2938, 2845, 1654, 1598, 1577, 1460  $\text{cm}^{-1}$ ;

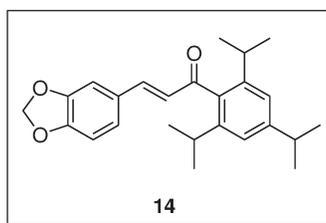
**RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$**  7,75 (d,  $J = 15,6$  Hz, 1H, H $\beta$ ); 7,68 (dd,  $J = 8,4$  e 2,0 Hz, 1H, aromático); 7,63 (d,  $J = 1,95$  Hz, 1H, aromático), 7,40 (d,  $J =$

15,5 Hz, 1H, H $\alpha$ ), 7,19 (d,  $J$  = 1,7 Hz, 1H, aromático); 7,14 (dd,  $J$  = 8,1 e 1,7 Hz, 1H, aromático), 6,94 (d,  $J$  = 8,1 Hz, 1H), 6,86 (d,  $J$  = 8 Hz, 1H), 6,04 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-dioxi), 3,99 e 3,98 (2s, 2 x OCH<sub>3</sub>).

**RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  188,69 (C), 153,41 (C), 149,99 (C), 149,48 (C), 148,62 (C), 147,20 (CH), 131,74 (C), 129,80 (C), 125,28 (CH), 123,09 (CH), 119,95 (CH), 110,03 (CH), 110,22 (CH), 108,90 (CH), 106,87 (CH), 101,85 (CH<sub>2</sub>), 56,34 (CH<sub>3</sub>), 53,30 (CH<sub>3</sub>).

**EMAR (ESI TOF).** Calculado para C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>O<sub>5</sub>: 313,1076; encontrado: 313,1052 (M<sup>+</sup>)

#### 4.1.13 Preparação da 3-(3,4-metilenodioxifenil)-(2,4,6-triisopropilfenil)propenona (14).



Obtida como um sólido branco levemente amarelado, sem purificação adicional.

**Ponto de fusão:** 126–128 °C. **Rendimento:** 73%.

**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 2964, 2826, 2867, 1650, 1606, 1515, 1492, 1459, 1440 cm<sup>-1</sup>;

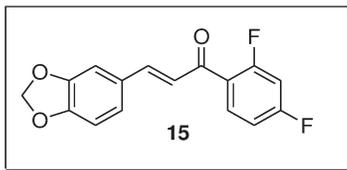
**RMN-<sup>1</sup>H (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  7,13(d,  $J$  = 15,8 Hz, 1H, H $\beta$ ), 7,04-6,94 (m, 4H, aromáticos), 6,82 (d,  $J$  = 16,3 Hz, 1H, H $\alpha$ ), 6,79 (d,  $J$  = 8Hz, 1H, aromático), 7,64 (d,  $J$  = 2Hz, 1H, aromático), 6,00 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-dioxi), 2,98-2,70 (m, 3H, CH-isopropila), 1,29 (d,  $J$  = 6,8 Hz, 12H, 4 x CH<sub>3</sub>-isopropila), 1,18 (d,  $J$  = 6,5 Hz, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>-isopropila).

**RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  202,00 (C), 150,29 (C), 149,79 (C), 148,73 (C), 146,69 (C), 145,09 (2 x CH), 135,77 (C), 129,12 (C), 128,12 (C), 125,27

(CH), 121,24 (2 x CH), 108,88 (CH), 107,02 (CH), 101,90 (CH<sub>2</sub>), 34,59 (CH), 31,22 (2 x CH), 24,25 (CH<sub>3</sub>).

**EMAR (ESI TOF).** Calculado para C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>O<sub>3</sub>: 379,2273; encontrado: 379,2272 (M+)

#### 4.1.14 Preparação da 3-(3,4-metilenodioxi-fenil)-(2,4-difluór-fenil)-propenona (15).



Obtida como um sólido amarelo, sem purificação adicional.

**Ponto de fusão:** 137–139 °C. **Rendimento:** 95%.

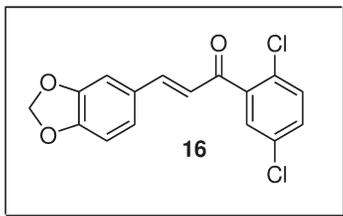
**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3448, 1659, 1612,

1593, 1456, 1255 cm<sup>-1</sup>;

**RMN- <sup>1</sup>H (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ 7,45-7,35 (m, 3H aromáticos e 1H, H $\beta$ ); 7,09-7,03 (m, 2H, aromáticos), 6,92 (d, *J* = 16 Hz, 1H, H $\alpha$ ), 6,83 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, aromático), 6,03 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-dioxo).

**EMAR (ESI TOF).** Calculado para C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>F<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 289,0676; encontrado: 289,0683(M+)

#### 4.1.15 Preparação da 3-(3,4-metilenodioxi-fenil)-(2,5-dicloro-fenil)-propenona (16)



Obtida como um sólido amarelo.

**Ponto de fusão:** 112–114 °C. **Rendimento:** 84%.

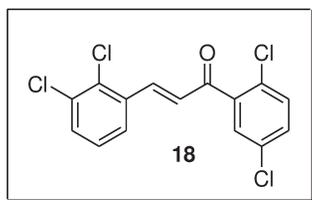
**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3447, 1657, 1610, 1593, 1452, 1267 cm<sup>-1</sup>;

**RMN-  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  7,45 (d,  $J = 1,5$  Hz, 1H, aromático), 7,43 (d,  $J = 15,5$  Hz, 1H,  $\text{H}\beta$ ), 7,39 (m, 2H, aromáticos), 7,11 (d,  $J = 2$  Hz, 1H, aromático), 7,06 (dd,  $J = 8$  e 2 Hz, 1H, aromático), 6,93 (d,  $J = 15,6$  Hz, 1H,  $\text{H}\alpha$ ), 6,85 (d,  $J = 8$  Hz, 1H, aromático), 6,05 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ dioxi).

**RMN-  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  192,34 (C), 150,73 (C), 48,79 (C), 147,10 (C), 140,79 (CH), 133,26 (C), 131,69 (CH), 131,43 (CH), 129,75 (CH), 129,37 (C), 128,89 (CH), 126,01 (C), 124,03 (CH), 108,97 (CH), 107,02 (CH), 102,01 ( $\text{CH}_2$ ).

**EMAR (ESI TOF).** Calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{O}_3$ : 321,0085; encontrado: 321,0078 (M+)

#### 4.1.16 Preparação da 3-(2,3-dicloro-fenil)-(2,5-dicloro-fenil)-propenona (18)



Obtida como um sólido amarelo. Purificação por cromatografia em coluna (AcOEt-Hex 10  $\rightarrow$  15%).

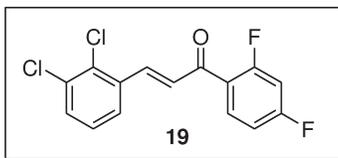
**Ponto de fusão:** 116–118°C. **Rendimento:** 68%.

**IV (KBr,  $\nu_{\text{max}}$ ):** 3445,1668, 1589, 1578, 1414  $\text{cm}^{-1}$ ;

**RMN-  $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  7,92 (d,  $J = 16$  Hz, 1H,  $\text{H}\beta$ ), 7,58-7,41 9m, 5H, aromáticos), 7,27 (m, 1H, aromático), 7,07 (d,  $J = 15,6$  Hz, 1H,  $\text{H}\alpha$ ).

**Análise Elementar.** Calcd para  $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{Cl}_4\text{O}$ (%): C, 52,06; H, 2,33; Encontrado: C, 52,15; H, 2,53.

#### 4.1.17 Preparação da 3-(2,3-dicloro-fenil)-(2,4-difluor-fenil)-propenona (19).



Obtida como um sólido amarelo, purificada por cromatografia em coluna (AcOEt-Hex 10 a 13%).

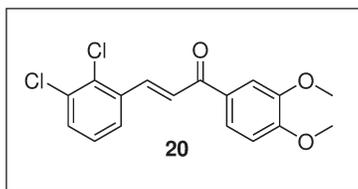
**Ponto de fusão:** 112-114°C. **Rendimento:** 86%.

**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3448, 1657, 1604, 1576, 1450, 1331  $\text{cm}^{-1}$

**RMN-  $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  8,16 (m, 1H aromático e  $\text{H}\beta$ ), aromáticos), 7,97-7,88 (m, 6H, aromáticos e  $\text{H}\alpha$ ).

**Análise Elementar.** Calcd para  $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{F}_2\text{O}$ (%): C, 57,54; H, 2,58; Encontrado: C, 57,24; H, 2,79.

#### 4.1.18 Preparação da 3-(2,3-dicloro-fenil)-(3,4-dimetoxi-fenil)-propenona (20)



Obtida como um sólido amarelo palha, sem purificação adicional.

**Ponto de fusão:** 128-129 °C. **Rendimento:** 88%.

**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3452, 3056, 2957, 1657, 1606, 1579, 1520, 1267  $\text{cm}^{-1}$ .

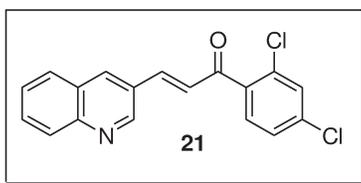
**RMN-  $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  8,14 (d,  $J = 15,8$  Hz, 1H,  $\text{H}\beta$ ), 7,69-7,62 (m, 4H, aromáticos), 7,46 (d,  $J = 15,6$  Hz, 1H,  $\text{H}\alpha$ ), 7,24 (dd,  $J = 9$  e 1,3 Hz, 1H, aromático), 6,93 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H aromático), 3,98 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ );

**RMN- $^{13}\text{C}$  (62,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  188,31 (C), 153,51 (C), 149,31 (C), 139,68 (CH), 135,88 (C), 134,04 (C), 133,35 (C), 131,43 (CH), 130,80 (C), 127,35

(CH), 125,88 (CH), 125,69 (CH), 123,29 (CH), 110,80 (CH), 109,96 (CH), 56,12 (CH<sub>3</sub>), 56,05 (CH<sub>3</sub>).

**Análise Elementar.** Calcd para C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(%): C, 60,55; H, 4,18; Encontrado: C, 60,15; H, 4,33.

#### 4.1.19 Preparação da 3-(quinolin-3-il)-1-(2,4-dicloro-fenil-2-propenona (21).



Obtida como um sólido amarelo palha, após purificação por cromatografia em coluna (AcOEt-Hex 10→15%)

**Ponto de fusão:** 155-157°C. **Rendimento:** 70%.

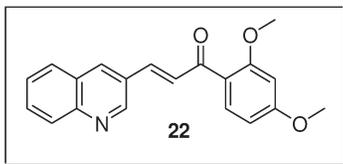
**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3448, 3042, 1668, 1570, 1383 cm<sup>-1</sup>;

**RMN-<sup>1</sup>H (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$**  9,12 (d,  $J = 2,3$  Hz, 1H, H $\alpha$ -N), 8,31 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H, H4), 8,12 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H, H8); 7,86 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H, H5), 7,78 (ddd,  $J = 8,5, 6,95, 1,5$  Hz, 1H, H7), 7,67 (d,  $J = 16,2$  Hz, 1H, H $\beta$ ), 7,60 (ddd,  $J = 8,1, 6,97$  e  $1,6$  Hz, 1H, H6), 7,52 (d,  $J = 2$  Hz, 1H, H3'), 7,50 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H, H6'), 7,38 (dd,  $J = 8,2$  e  $2$  Hz, 1H, H5'), 7,31 (d,  $J = 16,2$  Hz, 1H, H $\alpha$ ).

**RMN-<sup>13</sup>C (62,5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$**  191,85 (C), 149,37 (CH), 148,85 (C), 142,59 (CH), 137,44 (C), 137,18 (C), 136,37 (CH), 132,50 (C), 131,05 (CH), 130,62 (CH), 130,40 (CH), 129,50 (CH), 128,51 (CH), 127,61 (CH), 127,48 (CH), 127,29 (CH), 127,15 (C).

**EMAR (ESI TOF).** Calculado para C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>NO: 328,0296; encontrado: 328,0387 (M<sup>+</sup>)

#### 4.1.20 Preparação da 3-(quinolin-3-il)-1-(2,4-dimetoxi-fenil-2-propenona (22).



Obtida como um sólido amarelo claro, após cromatografia em coluna (AcOEt-Hex 10 a 15%).

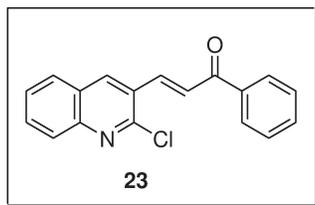
**Ponto de fusão:** 147–149°C. **Rendimento:** 60%.

**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3458, 3064, 2978, 1657, 1587, 1425  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN- $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  9,20 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H,  $\text{H}\alpha\text{-N}$ ), 8,23 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H,  $\text{H}_4$ ), 8,11 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H,  $\text{H}_8$ ); 7,88-7,81 (m, 3H, aromáticos e  $\text{H}\alpha$ ), 7,85 (d,  $J = 15,8$  Hz, 1H,  $\text{H}\beta$ ), (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H,  $\text{H}_5$ ), 7,78 (ddd,  $J = 8,5$ , 6,95, 1,5 Hz, 1H,  $\text{H}_7$ ), 7,67 (d,  $J = 16,2$  Hz, 1H, ,  $\text{H}\beta$ ), 7,55 (m, 1H, aromático), 7,58 (m, 1H, aromático), 6,60 (dd,  $J = 8,7$  e 2,3 Hz, 1H,  $\text{H}_5'$ ), 6,53 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H,  $\text{H}_5'$ ), 3,94 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,89 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ );

**RMN- $^{13}\text{C}$  (62,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$**  189,55 (C), 164, 59 (C), 160,66 (C), 149,41 (CH), 148,38 (C), 138,11 (CH), 135,82 (CH), 133,18 (C), 130,32 (CH), 129,38 (CH), 128,82 (CH), 128,55 (C), 128,29 (CH), 127,81 (C), 127,30 (CH), 121,76 (C), 105,44 (CH), 98,60 (C), 55,77 ( $\text{CH}_3$ ), 55,59 ( $\text{CH}_3$ ).

#### 4.1.21 Preparação da 3-(2-cloroquinolin-3-il)-1-fenil-propenona (23).



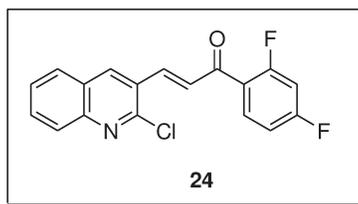
Obtida como um sólido amarelo ouro, após purificação por coluna cromatográfica em sílica gel (AcOEt-Hex 30%).

**Ponto de fusão:** 180-181 °C. Lit. 180-181 °C (AZAD, MUNAWAR e SIDDIQUI, 2007). **Rendimento:** 81%.

**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3439, 3056, 1651, 1576, 1259  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN-  $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  8,31 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H, H5), 8,25 (s, 1H, H4), 8,11 (d,  $J = 8,4$ Hz, 1H, H8); 7,98 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H, H2',H6'), 7,75 (d,  $J = 15,8$  Hz, 1H, H $\beta$ ), 7,63-7,53 (m, 5H, aromáticos).

#### 4.1.22 Preparação da 3-(2-cloro-quinolin-3-il)-1-(2,4-difluor-fenil)-propenona (24)



Obtida como um sólido amarelo, após purificação por coluna cromatográfica (AcOEt-Hex 10  $\rightarrow$ 20%).

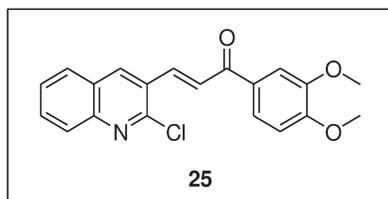
**Ponto de fusão:** 133–135°C. **Rendimento:** 63%.

**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 3447, 3078, 1657, 1608, 1580, 1431  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN-  $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  8,48 (s, 1H, H4), 8,22 (d,  $J = 15,8$  Hz, 1H, H $\beta$ ), 8,02 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H, H6'), 7,99 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H, H8); 7,95 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H, H5), 7,90 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H, H7), 7,78 (ddd,  $J = 8,5, 7,0$  e  $1,5$  Hz, H6), 7,52 (d,  $J = 15,7$  Hz, 1H, H $\alpha$ ), 6,97 (dd,  $J = 8,6$  e  $2,4$  Hz, 1H, H5'), 6,91 (d,  $J = 2,5$  Hz, 1H, H3').

**Análise Elementar.** Calcd para  $\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{ClF}_2\text{NO}_3$ (%): C, 65,57; H, 3,06; N, 4,25. Encontrado: C, 65,45; H, 3,33; N, 4,03.

#### 4.1.23 Preparação da 3-(2-cloro-quinolin-3-il)-1-(3,4-dimetoxi-fenil)-propenona (25)



Obtida como um sólido amarelo, sem purificação adicional.

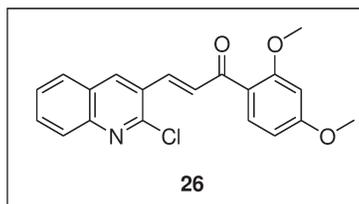
**Ponto de fusão:** 150-151 °C. **Rendimento:** 98%.

**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 1657, 1578, 1446, 1421, 1269, 1142  $\text{cm}^{-1}$ ;

**RMN- $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  8,49 (s, 1H, H4), 8,18 (d,  $J = 15,5$  Hz, 1H, H $\beta$ ), 8,04 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H, H8), 7,90 (dd,  $J = 8,0$  e 1,5 Hz, 1H, H5); 7,62 (d,  $J = 15,6$  Hz, 1H, H $\alpha$ ), 6,96 (d,  $J = 8,1$ Hz, 1H, H5'), 3,99 (s, 6H, 2 x  $\text{OCH}_3$ );

**RMN- $^{13}\text{C}$  (62,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  188,04 (C), 154,41 (C), 153,63 (C), 150,39 (C), 149,39 (C), 147,81 (C), 138,58 (CH), 136,17 (CH), 131,52 (CH), 130,70 (C), 128,47 (CH), 128,31 (C), 127,96 (CH), 127,69 (CH), 127,02 (C), 126,28 (CH), 123,40 (CH), 110,85 (CH), 109,99 (CH), 56,15 ( $\text{CH}_3$ ), 56,09 ( $\text{CH}_3$ ).

#### 4.1.24 Preparação 3-(2-cloro-quinolin-3-il)-1-(2,4-dimetoxi-fenil)-propenona (26)



Obtida como um sólido amarelo, após purificação por cromatografia em coluna (AcOEt-Hex, 10  $\rightarrow$ 20%).

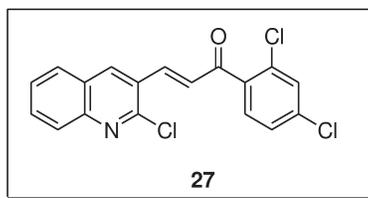
**Ponto de fusão:** 163-165 °C. Lit. 163-165 °C (LI *et al*, 1995). **Rendimento:** 96%.

**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 2975, 2942, 2839, 1643, 1605, 1590, 1487  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN-  $^1\text{H}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  8,41 (s, 1H, aromático), 8,06 (d,  $J = 15,8$  Hz, 1H,  $\text{H}\beta$ ), 8,02 (d,  $J = 8$  Hz, 1H,  $\text{H}_8$ ), 7,88-7,72 (m, 3H, aromáticos), 7,61 (d,  $J = 15,8$  Hz, 1H,  $\text{H}\alpha$ ), 7,58 (ddd,  $J = 8,1, 7,0$  e  $1,3$  Hz, 1H,  $\text{H}_6$ ), 6,59 (dd,  $J = 8,8$  e  $2,3$  Hz, 1H,  $\text{H}_5'$ ), 6,51 (d,  $J = 8,8$  Hz,  $\text{H}_3'$ ), 3,94 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,89 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

**RMN-  $^{13}\text{C}$  (62,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  189,82 (C), 164,86 (C), 160,85 (C), 150,83 (C), 147,94 (C), 136,65 (CH), 136,23 (CH), 133,46 (CH), 131,64 (CH), 131,49 (C), 128,99 (CH), 128,69 (CH), 128,19 (CH), 127,76 (CH), 127,36 (C), 121,86 (C), 125,69 (CH), 98,90 (CH), 56,07 ( $\text{CH}_3$ ), 55,85 ( $\text{CH}_3$ ).

#### 4.1.25 Preparação 3-(2-cloro-quinolin-3-il)-1-(2,4-dicloro-fenil)-propenona (27)



Obtida como um sólido amarelo palha, após cromatografia em coluna (AcOEt-Hex 15%).

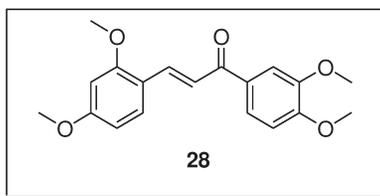
**Ponto de fusão:** 163–165°C. **Rendimento:** 58%.

**IV (KBr,  $\nu_{\text{max}}$ ):** 3450, 3078, 1656, 1605, 1576, 1234 $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN-  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  7,75 (d,  $J = 15$  Hz, 1H,  $\text{H}\beta$ ), 7,68 (dd,  $J = 9,0$  e  $2$  Hz, 1 H, aromático), 7,63 (d,  $J = 1,9$  Hz, 1H, aromático), 7,41 (d,  $J = 15,5$  Hz, 1H,  $\text{H}\alpha$ ), 7,19 (d,  $J = 1,7$  Hz, 1H, aromático), 6,94 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H, aromático), 6,86 (d,  $J = 8$  Hz, 1H, aromático); 6,04 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ -metilenodioxi), 3,99 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 3,98 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ).

**Análise Elementar.** Calcd para  $\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{Cl}_3\text{NO}$ (%): C, 59,62; H, 2,78; N, 3,86. Encontrado: C, 60,05; H, 2,93; N, 3,90.

#### 4.1.26 Preparação da 3-(2,4-dimetoxi-fenil)-(3,4-dimetoxi-fenil)-propenona (28).



Obtida como um sólido amarelo palha, após purificação por coluna cromatográfica (AcOEt-Hex 20%)

**Ponto de fusão:** 112–114 °C. **Rendimento:** 77%.

**IV (KBr,  $\nu_{\max}$ ):** 2999, 1651, 1612, 1585, 1556, 1257, 1163  $\text{cm}^{-1}$ .

**RMN- $^1\text{H}$ (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  8,04 (d,  $J = 15,5$  Hz, 1H,  $\text{H}\beta$ ), 7,67 (dd,  $J = 8,0$  e 2 Hz, 1H,  $\text{H}6'$ ); 7,62 (d,  $J = 2$  Hz, 1H,  $\text{H}2'$ ), 7,58 (d,  $J = 8,5$  Hz,  $\text{H}6$ ), 7,56 (d,  $J = 15,9$  Hz, 1H,  $\text{H}\alpha$ ), 6,92 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H,  $\text{H}5'$ ), 6,54 (dd,  $J = 8,5$  e 2Hz, 1H,  $\text{H}5$ ), 6,48 (d,  $J = 2\text{Hz}$ , 1H,  $\text{H}3$ ), 3,97 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,96 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,90 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,85 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

**RMN- $^{13}\text{C}$  (62,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$**  189,36 (C), 162,84 (CH), 160,29 (C), 152,81 (C), 149,04 (C), 139,69 (CH), 131,89 (C), 130,84 (CH), 122,76 (CH), 120,11 (CH), 117,28 (C), 110,85 (CH), 109,91 (CH), 105,33 (CH), 98,43 (CH), 56,04 ( $\text{CH}_3$ ), 56,00 ( $\text{CH}_3$ ), 55,54 ( $\text{CH}_3$ ), 55,48 ( $\text{CH}_3$ ).

**EMAR (ESI TOF).** Calculado para  $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{O}_5$ : 329,1389 (M+1); encontrado (M+1): 329,1414.

## 4.2 Avaliação Microbiológica

### 4.2.1 Preparação da placa de diluição

Para esta etapa, foram adicionados 100 $\mu\text{L}$  de DMSO em todos os tubos com exceção dos tubos 11 e 12, que são os controles, positivo (anfotericina B)

e negativo, respectivamente. Em seguida, 100 $\mu$ L da solução mãe foram adicionados ao 1<sup>o</sup> tubo de diluição. Para diluição ao dobro, 100 $\mu$ L do 1<sup>o</sup> tubo foram transferidos para o 2<sup>o</sup>, do 2<sup>o</sup> para o 3<sup>o</sup> e assim por diante até o 10<sup>o</sup> tubo e então desprezado. O volume foi completado com 900 $\mu$ L de água em todos os tubos.

#### **4.2.2 Preparação da placa de microtitulação**

Foram adicionados 20 $\mu$ L das substâncias-teste preparada a placa de diluição, aos respectivos pocinhos com exceção dos de número 11 e 12 (Controles), seguidos de 160 $\mu$ L de meio RPMI, em todos os poços, e 20 $\mu$ L do inóculo, exceto no poço 11 (controle negativo).

#### **4.2.3 Leitura dos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

As placas inoculadas foram incubadas a 35<sup>o</sup>C por 48 horas, e então realizada a leitura. A leitura da CIM foi realizada considerando-se a menor concentração da substância-teste capaz de inibir qualquer crescimento visível do fungo (100%).

### **4.3 Avaliação da Citotoxicidade *in vitro***

A linhagem celular 3T3 (fibroblasto de camundongo albino suíço) foi mantida em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio foi trocado a cada 48 h, até as células adquirirem confluência. Após a contagem, as células foram diluídas até a sua densidade de inoculação e transferidas para uma microplaca contendo 96 poços, em um volume fixo de 100  $\mu$ mol/L por poço. A densidade de inoculação das células 3T3 foi 1 x 10<sup>5</sup> céls/mL (SAOTOME *et al*, 1989). Esta concentração inicial de células foi determinada a partir de curvas de crescimento, assegurando-se que elas estariam em crescimento logarítmico ao

longo do experimento. A microplaca contendo as células foram pré-incubadas a 37 °C por 72 h com 5% de CO<sub>2</sub> para permitir estabilização, antes da adição dos compostos-teste. O composto foi então solubilizado em DMSO, nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,12 µg/mL, e adicionado ao meio. Após 3h de incubação no meio livre de soro contendo 50 µg/mL de vermelho neutro, as células foram lavadas rapidamente com PBS e em seguida, 0,1 mL de uma solução de etanol/ácido acético<sup>16</sup> (50% vv) e etanol para retirar o corante. Após agitação por 10 min, a absorbância foi lida em 540 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

---

<sup>16</sup>Ácido acético previamente diluído em água (1%, vv).

## **5. CONCLUSÕES**



Após a síntese, a caracterização e avaliação quanto à atividade antifúngica, concluiu-se que dentre as 28 chalconas alvo, 26 foram sintetizadas, 18 são inéditas e os rendimentos químicos variaram entre 53% e 98%. Das 26 sintetizadas, 8 passaram no teste de difusão em disco, portanto 8 compostos tiveram a MIC determinada pelo método da microdiluição em caldo. Destes oito derivados análogos sintetizados, quatro compostos (chalconas **21**, **24**, **26** e **27**) foram propostos no estudo QSAR-2D na Parte A deste trabalho corroborando com a proposta do estudo teórico computacional. Portanto, dentre os 5 compostos propostos, 4 apresentaram atividade biológica. De modo geral, podemos afirmar que apenas 1 composto (chalcona **26**) apresentou uma atividade biológica excepcional (9µg/mL). No teste de citotoxicidade *in vitro*, frente à linhagem 3T3, a chalcona mais ativa não mostrou atividade, sugerindo toxicidade seletiva.



## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



Azzad, M.; Munawar, A. M.; Siddiqui, H. L. **Antimicrobial Activity and Synthesis of Quinoline-based chalcones.** *Journal of Applied Sciences*, **2007**, 7, 2485-2489.

Bag, S.; Ramar, S.; Degani, M. S. **Synthesis and biological evaluation of  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated ketone as potential antifungal agents.** *Medicinal Chemistry Research*, **2009**, 18, 309–316.

Batovska, D.; Parushev, St.; Slavova, A.; Bankova, V.; Tsvetkova, I.; Ninova, M.; Najdenski, H. **Study on the substituents effects of a series of synthetic chalcones against the yeast *Candida albicans*.** *European Journal Medicinal Chemistry*, **2007**, 42, 87-92.

Bohm, B.A. **In Introduction to Flavonoids.** Harwood Academic, Amsterdam, **1998**.

Borchhardt, D. M. ; Mascarello, A. ; Chiaradia, L. D. ; Nunes, R. J. ; Oliva, G. ; Yunes, R. A.; Andricópulo, A. D. **Biochemical Evaluation of a Series of Synthetic Chalcone and Hydrazone Derivatives as Novel Inhibitors of Cruzain from *Trypanosoma cruzi*.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2010**, 21, 142-150.

Borenfreund, E.; Puerner, J. A. **A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90).** *Methods in Cell Science*, **1985**, 9, 7-9.

Carey, F. A. **Química Orgânica.** V.2. 7<sup>a</sup> ed. McGrawHill. **2011**.

Cesarin-Sobrinho, D.; Netto-Ferreira, J. C.; Braz-Filho, R. **Efeito da substituição por átomos de flúor no equilíbrio conformacional de chalcona.** *Química Nova*, 2001, 24, 5, 604-611.

Claisen, L.; Laparede, A. **Condensationen von Ketonen mit Aldehyden.** *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **1881**, 14, 2460-2468.

Dantas, T. N. C.; Machado, M. I. L.; Braz-Filho, R.; Craveiro, A. A. **Contribution To The Study of NMR Spectroscopy of Chalcones.** *Revista Latinoamericana Química*. **1984**, 15, 25-27.

Daskiewicz, J.B.; Comte, G.; Barron, D.; Di Pietro, A.; Thomasson, F. **Organolithium mediated synthesis of prenylchalcones as potential inhibitors of chemoresistance** *Tetrahedron Letters*, **1999**, 40, 7095-7098.

Dhar, D. N. **The Chemistry of Chalcones and Related Compounds.** John Wiley and Sons. New York, **1981**.

Eddarir, S.; Cotellet, N.; Bakkour, Y.; Rolando, C. **An efficient synthesis of chalcones based on the Suzuki reaction.** *Tetrahedron Letters*, **2003**, 44, 5359-5363.

Li, R.; Kenyon, G. L.; Cohen, F. E.; Chen, X.; Gong, B.; Dominguez, J. N.; Davidson, E.; Kurzban, G.; Miller, R. E.; Nuzum, E. O.; Rosenthal, P. J.; McKerrow, J., H. **In Vitro**

**Antimalarial Activity of Chalcones and Their Derivatives.** *Journal Medicinal Chemistry*, **1995**, 38, 5031-5037.

López, S. N.; Castelli, M. V.; Zacchino, S. A.; Domínguez, J. N.; Ribas, J. C.; Lobo, G.; Charris-Charris, J.; Cortés, J. C.G.; Devia, C.; Rodríguez, A. M.; Enriz, R. D. **In Vitro Antifungal Evaluation and Structure–Activity Relationships of a New Series of Chalcone Derivatives and Synthetic Analogues, with Inhibitory Properties Against Polymers of the Fungal Cell Wall.** *Bioorganic Medicinal Chemistry*, **2001**, 9, 1999–2013.

McMurry, John. **Química Orgânica.** 7ª ed. Cengage Learning, São Paulo, **2011**.

Motta, L. F.; Gaudio, A. C.; Takahata, Y. **Quantitative Structure-Activity Relationships of a series of chalcone derivatives (1,3-diphenyl-2-propen-2-one) as anti-Plasmodium falciparum agents (antimalaria agents).** *Internet Electronic Journal of Molecular Design*, 5, 555-569.

Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R. **Introdução à Espectroscopia.** Cengage Learning, São Paulo, **2010**.

Reddy, G.V.; Maitraie, D.; Narsaiah, B.; Rambabu, Y.; Rao, P.S. **Microwave assisted knoevenagel condensation: A facile method for the synthesis of chalcones.** *Synthetic Communication*, **2001**, 31, 2881-2884.

Saotome, K.; Morita, H.; Umeda, M. **Cytotoxicity Test With Simplified Crystal Violet Staining Method Using Microtitre Plates and its Application to Injection-Drugs.** *Toxicology in vitro*, **1989**, 3, 317-321.

Schmidt, J. G., **Ueber die Einwirkung von Aceton auf Furfurol und auf Bittermandelöl in Gegenwart von Alkalilauge.** *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft*, **1881**, 14, 1459-1461.

Sebti, S.; Solhy, A.; Tahir, R.; Boulaajaj, S.; Mayoral, J.A.; Fraile, J.M.; Kossir, A.; Oumimoun, H. **Calcined sodium nitrate/natural phosphate: an extremely active catalyst for the easy synthesis of chalcones in heterogeneous media.** *Tetrahedron Letters*, **2001**, 42, 7953-7955.

Sebti, S.; Solhy, A.; Tahir, R.; Abdelatif, S.; Boulaajaj, S.; Mayoral, J.A.; Garcia, J.I.; Fraile, J.M.; Kossir, A.; Oumimoun, H. **FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O catalysed condensation of aldehydes and ketones in ionic liquid: a novel green synthesis of chalcones.** *Journal of Catalysis*, **2003**, 213, 1-6.

Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5ª Ed, Editora da UFRGS/ Editora da UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, 2004.

Sharma, N. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2010**, 31, 6025.

Zhang, X.Y.; Niu, H.Y.; Wang, J. J. **FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O catalysed condensation of aldehydes and ketones in ionic liquid: a novel green synthesis of chalcones.** *Journal Chemistry Research*, **2003**, 33-35.

Yang, E.B.; Guo, Y.J.; Zhang, K.; Chen, Y.Z.; Mack, P. **Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by chalcone derivatives.** *Biochimica et Biophysica Acta*, **2001**, 1550, 144-152.



## **Parte C**

# **Validação Externa, Avaliação *in silico* do Perfil ADME-Tox e Proposta para Mecanismo de Ação dos Compostos**

## **1. CONSIDERAÇÕES GERAIS**



Um projeto visando o Planejamento Racional na Química Medicinal de um novo composto promissor, compreende as etapas de descoberta, otimização e desenvolvimento do composto-protótipo (WERMUTH, 2003). Como mencionado anteriormente na Introdução deste trabalho, entende-se por descoberta a etapa destinada à eleição do alvo terapêutico, útil para o tratamento de uma determinada fisiopatologia, a aplicação de estratégias de planejamento molecular para desenho de ligantes do alvo selecionado, utilizando estratégias de modificação molecular clássicas da Química Medicinal (bioisosterismo, homologação, simplificação e hibridação molecular), ou então pelo emprego de técnicas computacionais como a Modelagem Molecular e o estudo QSAR. A determinação das atividades farmacológicas do ligante (“preferencialmente” por via oral), que uma vez ativo, caracteriza-o como protótipo (WERMUTH, 2003) e (LIMA, 2007).

A etapa de otimização compreende o melhoramento da estrutura química do protótipo, por intermédio de modificações planejadas, visando aumentar a potência, seletividade, diminuição da toxicidade, adequação ao perfil farmacocinético-toxicológico (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade: ADME/Tox) e estabelecimento do estudo SAR, a partir da síntese de análogos do protótipo e a respectiva avaliação farmacológica *in vitro* e/ou *in vivo* destas substâncias (THOMAS, 2007) e (LIMA, 2007).

A etapa de desenvolvimento do protótipo objetiva a otimização de suas propriedades ADME/Tox e das formas farmacêuticas, de modo a viabilizar o seu uso clínico, através de preparações farmacêuticas adequadas (THOMAS, 2007) e (LIMA, 2007).

A descoberta de fármacos, pela indústria farmacêutica, é considerada por especialistas uma atividade complexa, multifatorial, cara, demorada, envolvendo a aplicação de técnicas e metodologias modernas, e cuja produtividade é questionada com base em dados que demonstram uma relação inversamente proporcional entre os investimentos em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) e a descoberta de NCEs (“*New Chemical Entities*”) (MILNE, 2003). A identificação de NCEs seguras e eficazes para um determinado alvo terapêutico constitui o principal foco das indústrias farmacêuticas. Os requisitos básicos para uma NCE de “uso oral” incluem boa biodisponibilidade, potência intrínseca, ausência de toxicidade e vantagens comparativas em relação à terapia usual, para o tratamento de uma determinada doença alvo (LIMA, 2007). Em termos organizacionais, uma NCE é identificada no estágio de desenvolvimento pré-clínico dos programas de desenvolvimento de fármacos. O sucesso nesta etapa, incluindo avaliação favorável das propriedades farmacocinéticas (ADME/Tox), levará à solicitação para investigação de novos fármacos (“*Investigational New Drug Application*, IND”), permitindo a completude da fase de desenvolvimento. Assim, estima-se que 1 em cada 25 NCEs, que adquirem o status de IND, se tornará um fármaco comercializado, indicando um processo de baixo índice de sucesso (CADWELL, 2001) e (DIMASI, 200).

Estratégias para a diminuição da taxa de atrito na transformação do protótipo ao candidato a fármaco incluem a realização de ensaios farmacocinético-toxicológicos, nos estágios iniciais da descoberta de fármacos. A determinação do perfil farmacocinético-toxicológico *in silico*, para prever propriedades ADME e do perfil de risco toxicológico *in silico*, são alternativas muito utilizadas pelas indústrias farmacêuticas no sentido de

contribuir com a seleção do protótipo de melhor perfil farmacoterapêutico. Nesta etapa, os derivados promissores são submetidos à avaliação *in silico* de forma que, o estudo serve como um “filtro” na avaliação do perfil farmacoterapêutico (GUIDO e ANDRICÓPULO, 2008) e (LIMA, 2007).

Após termos realizado a avaliação microbiológica *in vitro* dos compostos ativos contra as cepas de *Candida albicans* e a avaliação citotóxica *in vitro* para o composto mais ativo, encaminhamos para uma nova etapa do trabalho. Nesta etapa do trabalho, realizamos a validação externa para os compostos sintetizados ativos contra as cepas de *Candida albicans* utilizando modelo proposto no estudo QSAR-2D, afim de verificar a consistência estatística e o grau de previsibilidade deste modelo para os nossos compostos sintetizados e avaliados microbiologicamente. Não só realizamos a validação externa como também executamos um estudo farmacocinético-toxicológico *in silico* para as chalconas ativas, comparando ao fármaco fluconazol. Finalmente, cálculos do MEP, MDE do orbital de fronteira HOMO e MDE do orbital de fronteira LUMO para o composto mais ativo e também para a glutathiona reduzida (GSH) foram realizados com intuito de propormos um provável mecanismo de ação para os compostos estudados.



## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**



## 2.1 Validação externa dos compostos sintéticos ativos

Convém lembrar que, após termos realizado a análise do grau de ajuste e do grau de significância estatística do modelo proposto no estudo QSAR-2D (Parte A), seguimos para a etapa de validação estatística interna e externa. Para avaliar a qualidade preditiva interna do modelo QSAR-2D utilizamos os limites recomendados na validação cruzada *Leave-One-Out*: ( $Q^2_{\text{LOO}} > 0,50$ ) e ( $R^2 - Q^2_{\text{LOO}} < 0,30$ ). A robustez do modelo foi examinada por intermédio da validação cruzada *Leave-N-Out* (LNO, “N” = 1, 2, 3,.....10). A média do valor de cada  $Q^2_{\text{LNO}}$  foi próxima a de  $Q^2_{\text{LOO}}$  e o valor do SEV próximo de zero. A possibilidade da ocorrência de *correlação ao acaso* foi testada pela análise *Y-randomization*, onde o intercepto no diagrama ( $Q^2_{\text{LOO}}$  X  $|R^2|$ ) deverá obedecer à condição: ( $|R^2| < 0,30$  e  $Q^2_{\text{LOO}} < 0,050$ ), e como satisfez tal condição, o modelo está livre de *correlação ao acaso*. Após a avaliação da qualidade preditiva interna e a confirmação da robustez do modelo, realizamos o procedimento de validação externa para um conjunto de chalconas substituídas, e que não fizeram parte da série de treinamento. Foram utilizadas nove chalconas pertencentes à série externa com dados de atividade biológica obtidos de dois papers (BATOVSKA *et al*, 2007) e (TURKAR *et al*, 2010). Este procedimento serviu para testar a capacidade preditiva externa do modelo proposto. Os parâmetros estatísticos listados na [Tabela 3A] foram utilizados para avaliar a qualidade do modelo QSAR-2D proposto.

Ainda não estávamos satisfeitos, mesmo realizando todos os procedimentos necessários relativos à validação estatística interna e externa do modelo proposto QSAR-2D, e o modelo tendo sobrevivido à todas as técnicas. Não só sobreviveu aos procedimentos, como serviu de proposta para a síntese

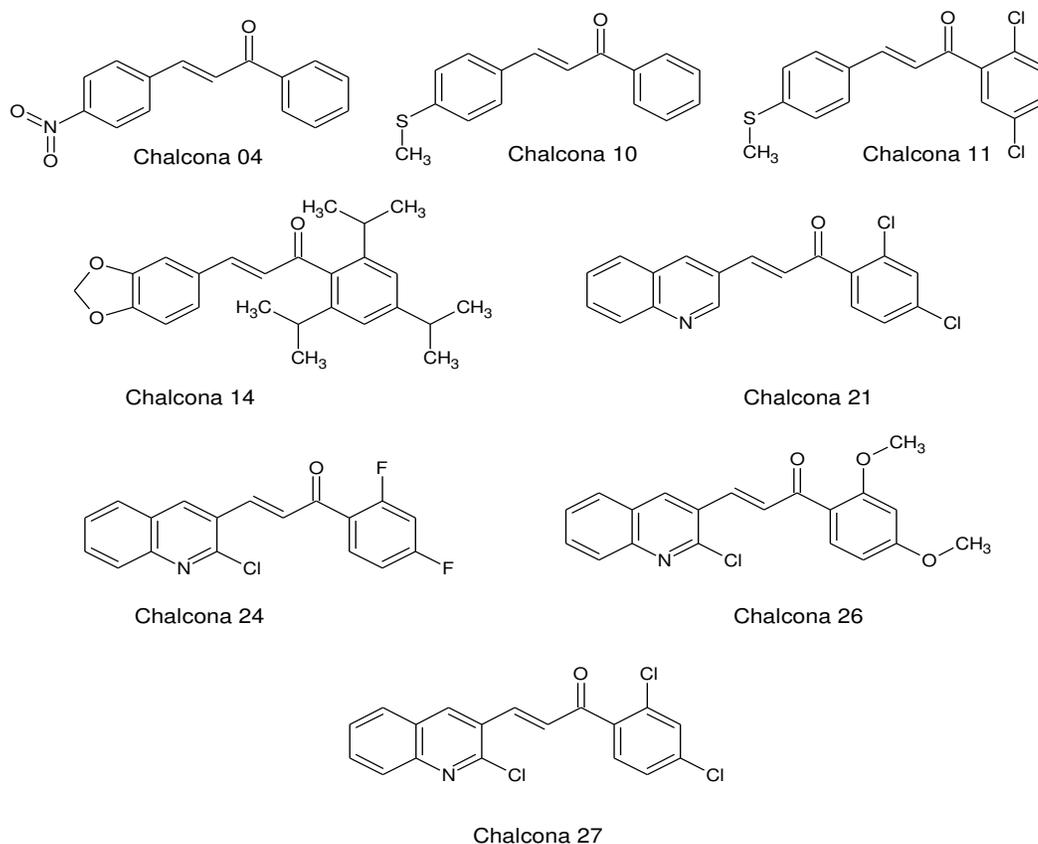
de novos compostos, que foram avaliados microbiologicamente contra as cepas de *Candida albicans*, e os compostos propostos pelo estudo QSAR *clássico* foram ativos e ainda conseguimos determinar a MIC para tais compostos. Dos 05 compostos propostos para síntese orgânica e posterior avaliação microbiológica, conseguimos obter a concentração inibitória mínima de quatro compostos. Das 28 chalconas-alvo, 26 foram sintetizadas e 8 passaram no teste de difusão em disco, portanto 08 compostos apresentaram 8 chalconas a CIM foi determinada pelo método da microdiluição em caldo. Destas análogos sintetizados [Figura 1C], pode-se afirmar que apenas um composto (chalcona **26**) apresentou uma atividade biológica considerável. Mesmo apresentando um composto mais ativo, pelo fato de termos a MIC dos 08 derivados análogos, podemos então utilizá-los para a realização de uma nova validação externa, só que agora para os derivados sintetizados e avaliados microbiologicamente (Parte B). O nosso intuito é verificar se o modelo QSAR-2D proposto (Parte A) sobreviverá a esta nova validação externa. Então, os 08 derivados análogos de chalcona tiveram sua geometria molecular e o cálculo de descritores realizados, utilizando o mesmo procedimento que foi executado na Parte A do trabalho, para posteriormente efetivarmos a metodologia da validação externa.

Para a realização deste procedimento (validação externa) utilizamos primeiro as oito chalconas sintetizadas [Figura 1C]. Utilizando todos os compostos, temos uma parcela de 40% ao ser comparado aos 20 derivados iniciais no estudo QSAR *clássico*. Depois, realizamos uma seleção de cinco compostos sintetizados para a concretização do procedimento, visto que com cinco chalconas estaríamos utilizando uma parcela de 25% dos compostos ao ser comparado aos 20 derivados iniciais. Os cinco compostos foram

selecionados, levando em consideração o critério de maior homogeneidade com relação aos valores de atividade biológica.

O parâmetro  $Q^2_{\text{pred}}$  foi utilizado para verificar a força preditiva externa do modelo QSAR-2D proposto. Neste trabalho, utilizamos o limite recomendado ( $Q^2_{\text{pred}} > 0,50$ ) na literatura (ROY, LEONARD e ROY, 2008) e (ROY e ROY, 2008). Entretanto, este parâmetro ( $Q^2_{\text{pred}}$ ) ainda não é uma condição suficiente para garantir que o modelo QSAR proposto seja realmente preditivo externamente. Então, seguindo as recomendações da literatura (TROPISHA, GRAMÁTICA e GOMBAR, 2003), (MELAGRAKI *et al.*, 2007), (GOLBRAIKH e TROPISHA, 2002) e (GOLBRAIKH *et al.*, 2003), ainda analisamos:

- 1) As inclinações das retas obtidas pela regressão simples realizada entre os valores observados  $X$  valores preditos ( $k$ ) e entre os valores preditos  $X$  valores observados ( $k'$ ), onde a condição de existência seja:  $0,85 < k$  ou  $k' < 1,15$ .
- 2) Os coeficientes de determinação ( $R^2_0$  e  $R'^2_0$ ) obtidos pela mesma regressão simples com a reta centrada arbitrariamente na origem, onde a condição de existência seja:  $|R^2_0 \text{ e } R'^2_0| < 0,30$ .



**Figura 1C:** Estrutura das chalconas sintéticas ativas da série externa

## 2.2. Avaliação do perfil farmacocinético-toxicológico *in silico*

A farmacocinética teórica *in silico* e o risco de toxicidade *in silico* são abordagens bastante utilizadas pelas indústrias farmacêuticas para análise inicial do perfil farmacocinético e toxicológico (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção, Toxicidade: ADME/Tox). Estas abordagens têm como objetivo, diminuir gastos desnecessários com ensaios biológicos de compostos com elevada probabilidade futura em apresentar problemas farmacocinéticos e de toxicidade, ou seja, economia de tempo e investimento (KADAN, 2007) e (MAGALHÃES, 2009). Desta forma, estudos ADME/Tox *in silico* computacional vêm sendo aplicados em etapas anteriores no

desenvolvimento de fármacos a fim de delinear o estudo de compostos promissores. Outro detalhe interessante reside no fato que durante o processo de P&D de um fármaco, o estudo ADME/Tox *in silico* servirá de parâmetro para obtenção de derivados promissores que não sejam descartados na fase clínica (DAVIS e RILEY, 2004).

A principal razão para o fracasso de fármacos na fase de desenvolvimento refere-se às propriedades farmacocinéticas e o risco de toxicidade. A [Tabela 1C] mostra uma análise das razões pelos quais futuros fármacos apresentaram seu desenvolvimento descontinuado, sendo que as propriedades farmacocinéticas e o risco à toxicidade representa o equivalente a 50% dos motivos para a sua exclusão (VAN DE WATERBEEMD e GIFFORD, 2003), (LIPINSKI, 2004), (KADAN, 2007), (KHAN, 2007), (HOU *et al*, 2007), (RAWLINS, 2004), (HODGSON, 2001), (MAGALHÃES, 2009) e (AFONSO, 2009).

**Tabela 1C:** Fatores primários relacionados ao abandono de compostos em desenvolvimento\*

| Fatores           | %  |
|-------------------|----|
| Farmacocinética   | 39 |
| Perda de eficácia | 30 |
| Toxicidade animal | 11 |
| Efeitos adversos  | 10 |
| Razões comerciais | 5  |
| Outros            | 5  |

\*Adaptado de: VAN DE WATERBEEMD e GIFFORD, 2003.

Percebe-se que cerca de 40% dos candidatos a fármacos que entraram em ensaios clínicos foram finalmente descartados devido às propriedades farmacocinéticas ADME e 11% quanto à toxicidade (CECHINEL-FILHO e BRESOLIN, 2010). Estas observações direcionaram os Químicos Medicinais

para a necessidade de avaliar não só os parâmetros físico-químicos durante a otimização de um composto líder, sendo necessário a criação de ferramentas que avaliassem também as propriedades farmacocinéticas. Portanto, foi necessária a implantação de um filtro confiável para análise do perfil farmacocinético-toxicológico para selecionar bons candidatos a novos fármacos, logo nos estágios iniciais de desenvolvimento (EKINS *et al*, 2007).

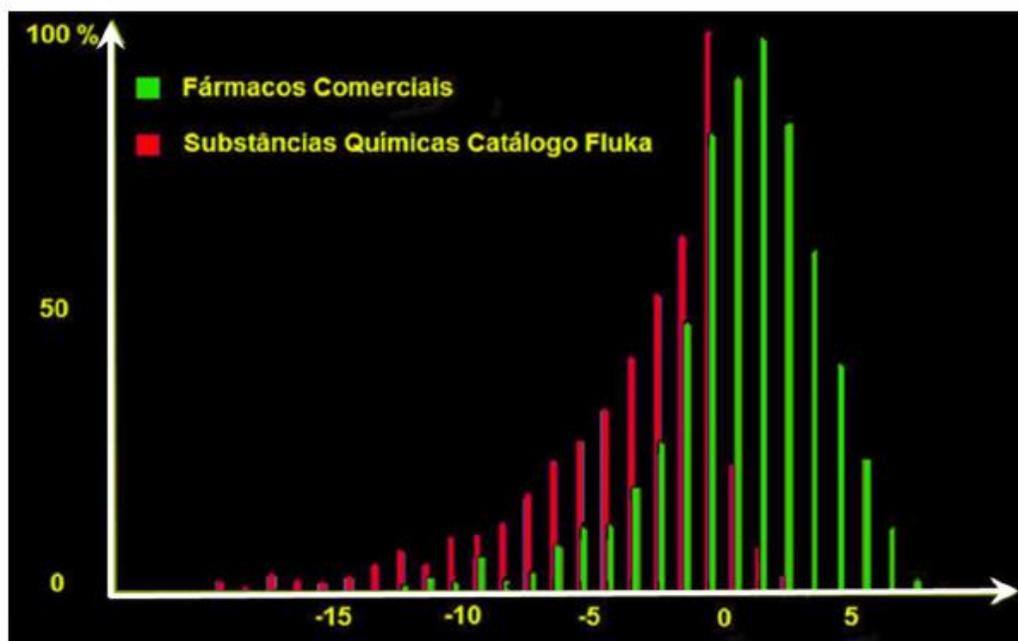
A expectativa de confiabilidade nos modelos teóricos *in silico* é dependente da quantidade de informações dos bancos de dados proprietários e que estão sendo gradualmente liberados pelas indústrias farmacêuticas. Estes modelos *in silico* também são submetidos a testes de desafio, onde o objetivo é a determinação do grau de confiança no mesmo (STOUCH *et al*, 2003), TETKO *et al*, 2006), (WANG *et al*, 2007), (MAGALHÃES, 2009) e (AFONSO, 2009).

Sabendo-se que os efeitos adversos e toxicológicos estão relacionados com a estrutura química do composto, os dados de *screening in vitro* (ADME/Tox) durante anos foram realizados e lançados em modelos computacionais. Assim, um enorme número de observações experimentais acabou sendo racionalizadas, com a possibilidade de realização do chamado *screening virtual*, correlacionando a estrutura química do composto candidato com as suas propriedades ADME/Tox. Desta forma, vários programas computacionais preditivos de parâmetros ADME/Tox foram desenvolvidos para avaliar as características estruturais moleculares de moléculas potencialmente ativas (VAN DE WATERBEEMD e GIFFORD, 2003), (EKINS *et al*, 2007) e (CECHINEL-FILHO e BRESOLIN, 2010).

Dentre os diversos programas que predizem parâmetros teóricos farmacocinéticos-toxicológicos *in silico*, o programa OSIRIS Property Explorer®, disponibilizado na internet pela empresa farmacêutica Actelion Pharmaceuticals Ltd, é um programa que permite desenhar as estruturas químicas em 2D, e estimar com um considerável grau de confiabilidade algumas propriedades moleculares (COSTA *et al*, 2006), (KAPETANOVIC, 2008) e (PASSAMINI, 2009). Com relação às propriedades moleculares calculadas, obtêm-se dados relacionados ao risco de toxicidade (mutagenicidade, tumorigenicidade, irritabilidade e efeitos no sistema reprodutor). Pode ser obtido também o perfil *drug-likeness*, ou seja, o perfil de semelhança do composto avaliado a fármacos e o perfil *drug-score*, que indica o índice de aproximação do composto avaliado em se tornar um potencial candidato a fármaco (PASSAMINI, 2009), (AFONSO, 2009) e (BELLO, 2010).

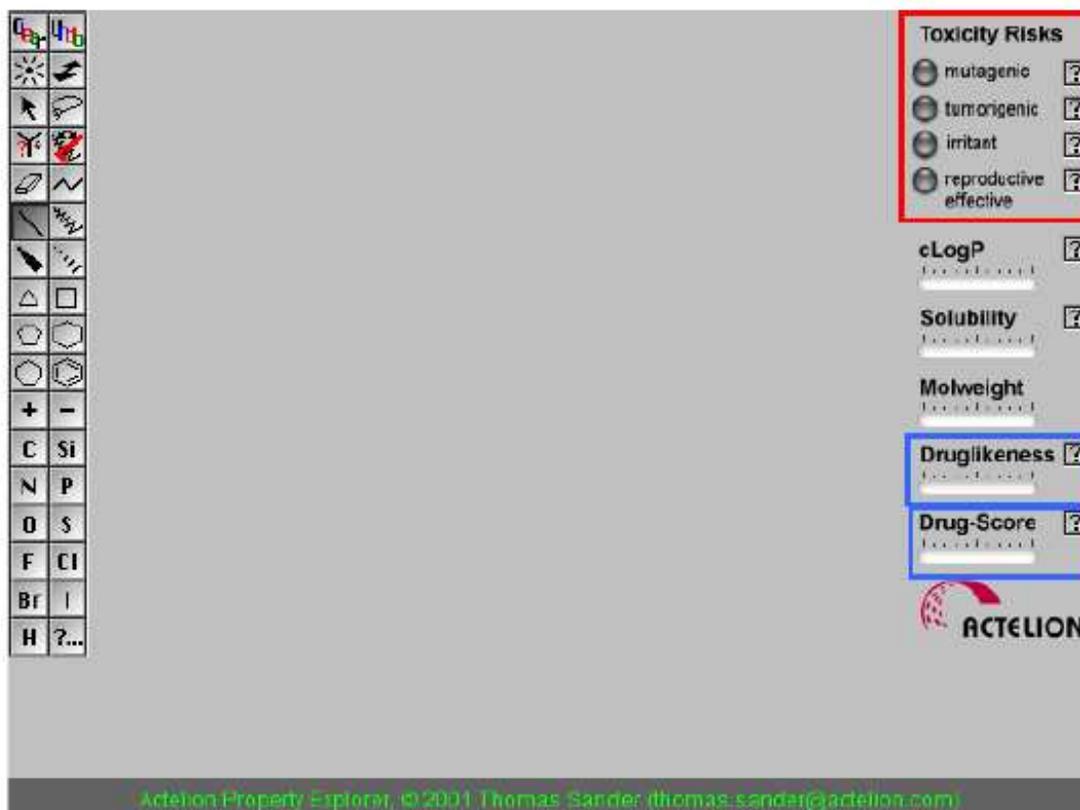
O perfil *Drug-Likeness* pode ser entendido, como sendo um parâmetro calculado para as substâncias, que apresentam estruturas químicas com grupos funcionais e/ou propriedades físico-químicas similares à maioria dos fármacos conhecidos no mercado. Estas propriedades moleculares são: lipofilicidade, características relacionadas com a ligação de hidrogênio, tamanho molecular, flexibilidade molecular e características farmacofóricas (AFONSO, 2009). O perfil *Drug-Likeness* baseia-se também em descritores topológicos, propriedades estruturais, propriedades como cLogP (coeficiente de partição) e a Massa Molecular (TETKO, 2007) e (PASSAMINI, 2009). O algoritmo de avaliação do perfil *Drug-Likeness* foi desenvolvido pela *Actelion Pharmaceuticals Ltd*, e leva em consideração a frequência de ocorrência de cada fragmento. A lista de fragmentos foi criada a partir de um banco de dados

de 3.300 fármacos comerciais (fragmentos “*druglike*”), e outro com 15.000 substâncias químicas comercialmente disponíveis no catálogo Fluka® (fragmentos não “*druglike*”), formando uma lista completa com todos os fragmentos disponíveis. O valor do perfil *Drug-Likeness* é determinado em função dos valores dos fragmentos constituintes da molécula. A geração dos fragmentos ocorre a partir da ruptura das ligações simples das moléculas, que está associada a uma classificação de similaridade a fármacos conhecidos (WALTERS e MURCKO, 1999), ou então, similares a compostos que possuem propriedades ADME suficientemente aceitáveis para resistir à fase II dos ensaios clínicos (LIPINSKI, 2001). As análises revelam que 80% dos fármacos disponíveis no mercado apresentam um valor de perfil *Drug-Likeness* positivo, enquanto a maioria dos compostos do catálogo Fluka® apresenta valor negativo [Figura 2C] (PASSAMINI, 2009).



**Figura 2C:** Distribuição do perfil Drug-Likeness para os fármacos comerciais e substâncias do catálogo Fluka®

Para o cálculo do perfil *Drug-Likeness*, inicialmente desenhamos a estrutura química do composto em 2D na plataforma do programa OSIRIS Property Explorer®. O programa também calcula propriedades físico-químicas, o perfil de toxicidade e finalmente o perfil *Drug-Score* [Figura 3C] (MAGALHÃES, 2009).



**Figura 3C:** Plataforma do programa OSIRIS Property Explorer® e os parâmetros da chalcona **26**

O perfil *Drug-Score* é utilizado para inferir o potencial de um determinado composto em se tornar um fármaco. Este perfil combina os valores obtidos do perfil *Drug-Likeness*, cLogP (lipofilicidade), Log S (solubilidade em água), massa molecular e risco de toxicidade, em um único valor, de modo a avaliar se o composto apresenta potencial para se tornar um fármaco. Uma escala entre 0-1 é utilizada para caracterizar o perfil *Drug-Score* [Figura 4C]

(MAGALHÃES, 2009). O perfil de toxicidade abordado no programa OSIRIS Property Explorer®, são baseados em bancos de dados de substâncias químicas que apresentam efeitos tóxicos comprovados (*Registry of Toxic Effects of Chemical Substances*: RTECS) e validados com um banco de dados contendo fármacos comercialmente disponíveis (AFONSO, 2009) e (PASSAMINI, 2009). O estudo do perfil farmacocinético-toxicológico *in silico* foi realizado para os oito compostos sintetizados ativos em comparação com o fármaco fluconazol.



**Figura 4C:** Escala do perfil *Drug-Score* da chalcona 26

A toxicidade de uma determinada substância candidata a fármaco é um parâmetro extremamente relevante, visto que, um número significativo (11%) de compostos é reprovado nos ensaios clínicos em função de seus efeitos tóxicos.

Os efeitos tóxicos dos fármacos podem estar relacionados à sua ação farmacológica principal ou em função dos metabólitos gerados pelo processo de biotransformação (GENNARO, 2004). Geralmente, os mecanismos de lesão são ocasionados pelos metabólitos reativos gerados, onde ocorre o envolvimento de interações covalentes e/ou não covalentes com determinadas

moléculas, podendo ocorrer necrose (toxicidade aguda) ou apoptose (toxicidade crônica) (RANG *et al*, 2004) e (KATZUNG, 2010).

São vários os mecanismos envolvidos nos processos de toxicidade, entre os quais, pode-se citar a peroxidação lipídica, a geração de radicais citotóxicos de oxigênio, a depleção de glutathiona resultando stress oxidativo e modificações estruturais enzimáticas (THOMAS, 2007). As ligações covalentes com as biomacromoléculas geralmente são irreversíveis, podendo ocorrer com proteínas ou DNA, não esquecendo que interações covalentes com o DNA podem resultar em mutagênese, carcinogênese ou teratogênese (RANG *et al*, 2004) e (KATZUNG, 2010). A mutagênese é um mecanismo que envolve alteração do genótipo de uma célula por modificação do DNA, enquanto a carcinogênese envolve alteração dos genes supressores de tumor (GENNARO, 2004) e (RANG *et al*, 2004). Convém lembrar que a maioria dos carcinogênicos químicos atua por interação com as bases nitrogenadas do DNA, particularmente via ligação covalente com a guanina (RANG *et al*, 2004).

### **2.3. Avaliação do perfil de biodisponibilidade oral**

O perfil de biodisponibilidade oral dos compostos foi avaliado pela aplicação da regra de Lipinski. Esta regra, também denominada como a Regra-dos-Cinco (*Rule of Five*), foi assim caracterizada em função de que os quatro parâmetros analisados são múltiplos de cinco (CECHINEL-FILHO e BRESOLIN, 2010).

Christopher Lipinski, um pesquisador da indústria de medicamentos Pfizer, desenvolveu a Regra-dos-Cinco, levando em consideração a hipótese de que as mais pobres propriedades físico-químicas predominam em muitos

compostos que entram para os estágios pré-clínicos e na avaliação de segurança em fase I, mas no final acabam sendo descartados (LIPINSKI *et al*, 2001) e (JARVIS, 2007).

Esta regra prediz de uma maneira bastante simples se uma molécula tem ou não características ideais a um fármaco. Para o seu desenvolvimento foi necessária a identificação de uma biblioteca de compostos com propriedades físico-químicas favoráveis, considerando para isso os compostos que entraram na avaliação de fase II das maiores companhias farmacêuticas, utilizando o *United States Adopted Name* (USAN) e a *International Non-proprietary Name* (INN) para identificar compostos. A base de dados pesquisada foi a World Drug Index: Índice de Fármacos Mundial (WDI), uma base computadorizada imensa, com aproximadamente 50 mil fármacos. O processo utilizado selecionou um subgrupo de 2.245 compostos dessa base de dados que teriam propriedades físico-químicas superiores (LIPINSKI *et al*, 2001) e (CECHINEL-FILHO e BRESOLIN, 2010).

O objetivo principal da Regra-dos-Cinco foi a de estimar a solubilidade e a permeabilidade dos fármacos administrados por via oral (biodisponibilidade oral), predizendo a influência da estrutura química na absorção de um dado composto, uma vez que a previsão dos processos farmacocinéticos, logo nos estágios iniciais da pesquisa, é de extrema importância para o desenvolvimento de um candidato a fármaco. Os critérios analisados são:

- 1) Massa Molar (MM): não pode exceder  $500 \text{ g.mol}^{-1} = 500 \text{ Da}$ ;
- 2) Log P: deve possuir valor limite igual a 5;
- 3) Grupos doadores de ligação de H (DLH) - (NH + OH): somatória não pode ultrapassar o valor 5;

- 4) Grupos aceptores de ligação de H (ALH) - (N + O): somatória não pode ultrapassar o valor 10 (CECHINEL-FILHO e BRESOLIN, 2010).

Então, se uma molécula apresentar:  $MM > 500$  Da;  $\text{Log } P > 5,0$ ;  $DLH > 5,0$  e  $ADH > 10,0$ ; podemos afirmar que, a molécula é pobre em absorção e permeabilidade. Estes parâmetros estão associados a 90% dos fármacos orais que se encontram em nível de desenvolvimento clínico de fase II (LIPINSKI *et al*, 2001) e (LIPINSKI, 2004). A extensão de outros parâmetros aumenta ainda mais a propriedade de seleção na regra de Lipinski. Estes parâmetros são: número de ligações rotacionáveis ( $NLR \leq 10,0$ ) e área superficial polar ( $PSA \leq 140 \text{ \AA}$ ) (LIPINSKI, 2004), (KELLER *et al*, 2006) e (VERBER *et al*, 2002).

O  $\text{Log } P$  é calculado pelo somatório das contribuições baseadas nos fragmentos e fatores de correção. A área superficial polar (PSA: *Polar Surface Area*) é calculada pelo somatório dos fragmentos. Esta propriedade é um bom descritor para caracterizar a absorção de fármacos, incluindo absorção intestinal, biodisponibilidade, permeabilidade Caco e penetração na barreira hematoencefálica (ERTL *et al*, 2000) e (CLARK e PICKETT, 2000). Uma  $PSA < 90 \text{ \AA}$  é referenciada como o limite aproximado para que a molécula ultrapasse a barreira hemato-encefálica (WERMUTH, 2003). O número de ligações rotacionáveis (NLR) é um parâmetro topológico simples, medido pela flexibilidade da molécula. Ligações rotacionáveis são definidas como ligações simples acíclicas, ligadas a um átomo pesado não terminal (CECHINEL-FILHO e BRESOLIN, 2010).

Para a determinação do perfil de biodisponibilidade oral para os compostos sintetizados ativos foi utilizado o programa Molinspiration® disponibilizado

(<http://www.molinspiration.com>) pela empresa farmacêutica Novartis. No programa Molinspiration®,  $miLogP = \text{Log } P$ ;  $TPSA = PSA$ ;  $nOHNH = DLH$ ;  $nON = ALH$ ;  $nrotb = NLR$  e ainda apresenta o número de violações à Regra de Lipinski.

#### **2.4. Determinação dos MEP, $MDE_{HOMO}$ e $MDE_{LUMO}$**

Para o estabelecimento das relações estrutura química-atividade biológica (SAR), utilizando-se metodologias computacionais, é necessário encontrar representações mais adequadas para a estrutura molecular dos compostos estudados. A Modelagem Molecular permite-nos identificar e compreender as propriedades moleculares físico-químicas, estruturais e estereo-eletrônicas, que são “impressões digitais”, e que nos informa o grau de diversidade estrutural numa série de compostos análogos. Sabendo que as moléculas bioativas (ligantes) formam complexos com os receptores/enzimas (bioreceptores) por intermédio do reconhecimento molecular ligado à estrutura química das moléculas bioativas (COHEN *et al.*, 1990), BARREIRO e FRAGA, 2008) e (THOMAS, 2007), a obtenção dos parâmetros físico-químicos correlacionados à atividade biológica é de suma importância na compreensão das interações intermoleculares ligante-bioreceptor, nos envolvimentos energéticos relacionados com a formação dos complexos e nos estudos SAR e QSAR.

Os descritores eletrônicos correspondem a uma categoria de propriedades moleculares que governam a interação ligante-bioreceptor, portanto, o Mapa de Potencial Eletrostático Molecular (MEP) pode ser uma abordagem alternativa no intuito de compreender a contribuição eletrostática dos compostos estudados. O MEP é um parâmetro muito utilizado e revela o tamanho molecular “aparente” e a localização dos potenciais eletrostáticos na

molécula. As superfícies 3D dos MEPs são geradas após a sobreposição na molécula de uma partícula carregada positivamente que sob a superfície de contato de van der Waals da molécula revela uma região de repulsão, representando o potencial positivo, de coloração branco-azulada e a região na molécula de potencial negativo, representado pela coloração vermelha. Para a construção do MEP são necessárias três etapas: a construção da superfície de densidade eletrônica da molécula, a construção da superfície de potencial eletrostático e a aplicação de cores à superfície obtida para designar os valores de potencial (THOMAS, 2007), (PATRICK, 2002) e (LEACH, 2001).

As energias do Orbital Molecular de Maior Energia Ocupado (HOMO) e do Orbital Molecular de Menor Energia Desocupado (LUMO) são descritores químico-quânticos bastante utilizados que revelam um papel importante nas reações químicas e na formação dos complexos de transferência de cargas. A energia do HOMO ( $E_{\text{HOMO}}$ ) está diretamente relacionada ao potencial de ionização (PI) do composto e caracteriza a capacidade da molécula sofrer ataques por eletrófilos. A energia do LUMO ( $E_{\text{LUMO}}$ ) está diretamente relacionada à afinidade eletrônica (AE), caracterizada pela susceptibilidade do composto em relação a ataques por nucleófilos (GRANT, 1996), (ATKINS e DE PAULA, 2008), (BRUICE, 2006), (CONSTANTINO, 2008) e (COSTA *et al.*, 2003).

A diferença energética LUMO-HOMO identificada como  $\text{Gap} = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$  é um parâmetro indicador da estabilidade molecular. Moléculas com baixo valor de Gap são mais reativas, enquanto moléculas com alto valor de Gap apresentam elevada estabilidade molecular, e possui pequena reatividade em processos químicos (ZHANG, 2007), (ATKINS e DE PAULA, 2008), (BRUICE, 2006) e (CONSTANTINO, 2008).

A densidade eletrônica dos orbitais de fronteira nos átomos da molécula indica uma forma útil para uma caracterização mais detalhada nas interações doador-aceptor. A maioria das reações químicas ocorre na região de maior densidade eletrônica nos orbitais de fronteira, que são definidos de acordo com o tipo de reação: numa reação eletrofílica, a densidade eletrônica do HOMO é essencial para a transferência de elétrons, enquanto a densidade eletrônica do LUMO representa as áreas mais suscetíveis a ataques nucleofílicos (GRANT, 1996), (ATKINS e DE PAULA, 2008), (BRUCE, 2006) e (CONSTANTINO, 2008).

Para a determinação de MEP,  $MDE_{HOMO}$  e  $MDE_{LUMO}$ , para o composto mais ativo (chalcona 26) foi utilizado um computador pessoal Core-seven equipado com sistema operacional Windows® Seven. A estrutura química da molécula do composto foi desenhada e visualizada em 3D utilizando o programa ACD/ChemSketch versão 12.0 (Advanced Chemistry Development, Inc., 2010). O primeiro passo foi a otimização da geometria molecular com a utilização do método *semi-empírico* Hamiltoniano PM3 (*Parametric Method 3*) através do programa Arguslab versão 4.0 (Thompson and Planaria Software LLC, Inc., 2004). Após realizar este primeiro procedimento, a estabilidade molecular foi obtida utilizando a Teoria do Funcional de Densidade (Density Functional Theory - DFT) via método híbrido B3LYP (Becke, Lee, Yang e Parr) empregando a função de base 6-31G (B3LYP/6-31G) no programa ChemSitePro versão 9.0 (ChemSW, Inc., 2009). Posteriormente, minimizamos a energia molecular da estrutura química pelo método Simplex utilizando constante dielétrica igual a  $\epsilon = 46,7$  para simular ambiente DMSO (dimetilsulfóxido), com potencial Lennard-Jones 6-12 e função ligação de hidrogênio (Hydrogen Bond Function). Esta minimização energética foi executada com auxílio do pacote computacional Molecular Modeling Pro Plus

(MMPP) versão 6.3 (ChemSW, Inc., 2004). Finalmente, realizamos a análise conformacional sistemática para o composto com auxílio do pacote computacional MMPP versão 6.3. A análise conformacional foi realizada utilizando simultaneamente o giro em  $10^\circ$  das duas ligações simples (C2-R2 e C4-R1), fixando Root Mean Square Gradiente (RMS) em 0.1 Kcal/molÅ, potencial Lennard-Jones 6-12 e constante dielétrica igual a  $\epsilon = 46,7$ . O confômero de menor energia foi submetido a um “*single point calculation*” pelo método híbrido DFT-B3LYP, utilizando a base 6-31G. A seguir foram obtidos o Mapa de Potencial Eletrostático Molecular (MEP), o Mapa de Densidade Eletrônica (MDE) do HOMO e o Mapa de Densidade Eletrônica (MDE) do LUMO para a chalcona 26 utilizando os programas Arguslab versão 4.0 e ChemSitePro versão 9.0.

## **2.5. A glutationa reduzida e proposta de mecanismo de ação dos compostos estudados**

A glutationa em *Candida albicans* possui muitas funções incluindo a prevenção do estresse oxidativo celular por intermédio da complexação com as espécies químicas reativas de oxigênio (ROS) (HUBER e ALMEIDA, 2008). Os mecanismos de dano provocado pelas ROS a alvos celulares estão relacionados ao ataque direto da espécie química reativa às proteínas da célula fúngica (SHEENAN *et al*, 2001). Os ácidos graxos e as lipoproteínas de membrana são alvos fáceis ao ataque das ROS. As ROS também podem interagir com o átomo de nitrogênio da base nitrogenada do DNA evitando a replicação e a divisão celular (SHEENAN *et al*, 2001) e (YADAV *et al*, 2011). Atualmente, o entendimento dos mecanismos envolvidos no stress oxidativo em fungos representam uma linha interessante

no processo de eliminação destes micro-organismos patogênicos e, portanto no desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos. A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo (ácido glutâmico-cisteína-glicina) que apresenta o grupo sulfidril (-SH) no aminoácido cisteína, altamente polarizável, tornando-o um bom nucleófilo para reações químicas com compostos que apresentam centro eletrofílico. Esta capacidade de fornecer elétrons a outros compostos faz da GSH um bom redutor. É importante lembrar que a enzima glutathiona transferase (GST), conhecida como glutathiona S-transferase, catalisa a glutathiona reduzida (GSH) na presença de compostos com centros eletrofílicos resultando conjugados de glutathiona (HUBER e ALMEIDA, 2008). Então, a presença de compostos com centros eletrofílicos ocasionará a diminuição da concentração intracelular de GSH da *Candida albicans* resultando em stress oxidativo na célula fúngica.

As chalconas são cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas com notável mecanismo de ressonância e que apresentam a possibilidade de adição nucleofílica em carbono C2 ou em C4. A adição nucleofílica em carbono C2 ocorre em presença de nucleófilo duro, com carga negativa concentrada em átomo pequeno e altamente eletronegativo. Desta forma, a adição nucleofílica em carbono C2 das chalconas não seria possível ocorrer na presença da GSH, pois o átomo de enxofre do grupo sulfidril da GSH não se enquadra a tais condições. Portanto, a adição nucleofílica em carbono C4 da chalcona na presença da GSH é o mais provável de acontecer e, neste caso ocorrerá a formação de ligação covalente pela interação entre o orbital de fronteira HOMO do grupo -SH da GSH com o orbital de fronteira LUMO do átomo de carbono C4 da chalcona. Caso isto aconteça, ocorrerá a formação de um conjugado glutathiona-chalcona. O evidente mecanismo de ressonância nas chalconas proporciona a formação de uma estrutura química capaz de aceitar o

agente nucleofílico neste átomo de carbono (C4). Partindo deste princípio, é fundamental a determinação do Mapa de Densidade Eletrônica (MDE) do orbital de fronteira HOMO da GSH para que possamos propor um provável mecanismo de ação para os compostos estudados.



### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**



### 3.1. Validação externa dos compostos sintéticos ativos

Inicialmente as oito chalconas sintetizadas ativas que representam a série externa, e apresentam variações estruturais em seus substituintes, foram utilizados para testar a capacidade preditiva externa do modelo QSAR-2D proposto. Os valores dos descritores dos compostos da série externa estão na [Tabela 2C].

**Tabela 2C:** Valores dos descritores dos análogos sintetizados (série externa).

| Compostos          | [MR]   | [PI]     | [Lx]        | [B4 (A)] |
|--------------------|--------|----------|-------------|----------|
| <b>Chalcona 04</b> | 75,173 | 10,15275 | 15,68906784 | 1,793436 |
| <b>Chalcona 10</b> | 78,133 | 8,59996  | 15,294300   | 2,252131 |
| <b>Chalcona 11</b> | 87,867 | 8,63552  | 15,304300   | 2,283168 |
| <b>Chalcona 14</b> | 115,68 | 8,98617  | 17,961799   | 2,316714 |
| <b>Chalcona 21</b> | 89,939 | 9,25977  | 17,255100   | 1,84631  |
| <b>Chalcona 24</b> | 84,772 | 9,25796  | 15,489799   | 1,821841 |
| <b>Chalcona 26</b> | 97,594 | 9,14063  | 17,424600   | 1,926588 |
| <b>Chalcona 27</b> | 94,806 | 9,39536  | 15,903999   | 1,798149 |

Os resultados apresentados na [Tabela 3C], revelaram que o modelo proposto apresenta boa capacidade preditiva externa, considerando os limites propostos na literatura. Um dos valores  $K$  ou  $K'$  e a relação  $|R^2_0 - R'^2_0|$  está dentro dos limites aceitáveis: ( $0,85 \leq K$  ou  $K' \leq 1,15$ ; e  $|R^2_0 - R'^2_0| \leq 0,3$ ). O valor do SEP (erro padrão da predição externa), também é considerado baixo, sendo um indicativo de pequeno erro para um composto análogo sintetizado com base neste modelo (TROPSHA, GRAMÁTICA e GOMBAR, 2003), (MELO e FERREIRA, 2009) e (MELO *et al*, 2010).

**Tabela 3C:** Valores preditos da atividade biológica para as chalconas (série externa) e parâmetros estatísticos

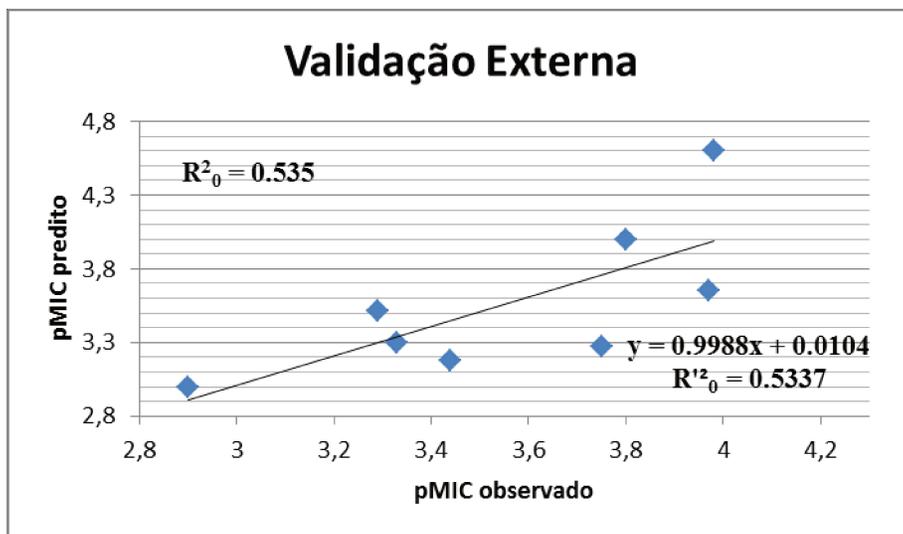
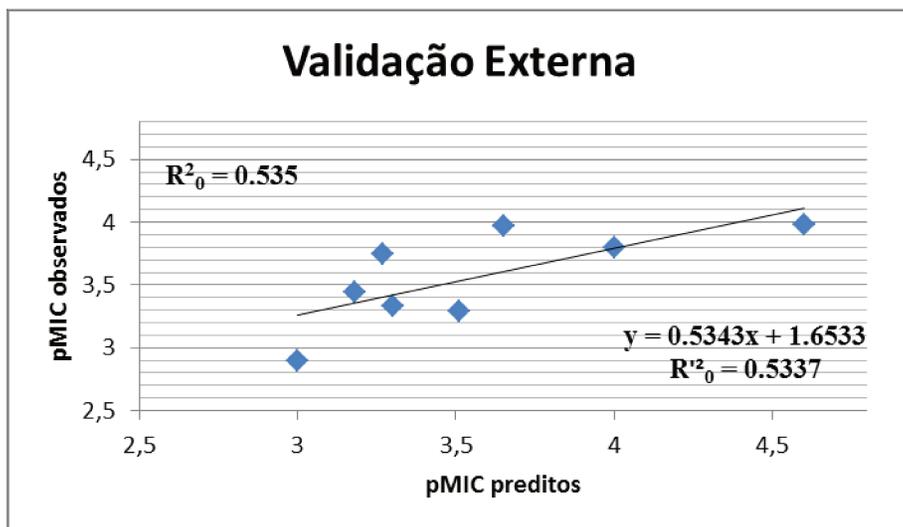
| Compostos  | pMIC <sub>Obs</sub> | pMIC <sub>pred</sub>  | Residues |
|--|---------------------|-----------------------|----------|
| Chalcona 4   | 3,00                | 2,90                  | -0,10    |
| Chalcona 10  | 3,30                | 3,33                  | 0,03     |
| Chalcona 11  | 3,51                | 3,29                  | -0,22    |
| Chalcona 14  | 3,18                | 3,44                  | 0,26     |
| Chalcona 21*   | 3,65                | 3,97                  | 0,32     |
| Chalcona 24*   | 3,27                | 3,75                  | 0,48     |
| Chalcona 26*   | 4,60                | 3,98                  | -0,62    |
| Chalcona 27*   | 4,00                | 3,80                  | -0,20    |
| R <sup>2</sup> <sub>pred</sub>                             |                     | 0,535                 |          |
| SEP  |                     | 0,110                 |          |
| K  |                     | 0,530                 |          |
| K'   |                     | 0,990                 |          |
| R <sup>2</sup> <sub>0</sub> - R' <sup>2</sup> <sub>0</sub> |                     | 0,535 - 0,537 = 0,002 |          |

\*Chalconas propostas para síntese orgânica na Parte A do trabalho, ou seja, após ter realizado estudo QSAR-2D.

A boa capacidade preditiva do modelo QSAR-2D foi demonstrada por intermédio da validação externa utilizando as chalconas sintetizadas, onde os parâmetros estatísticos abaixo indicam que o modelo proposto possui uma boa capacidade preditiva interna e externa:

- $R^2 = 0.776 > 0.6$ ;  $R^2_{\text{pred}} = 0.535 > 0.5$
- $Q^2_{\text{pred}} = 0.535 \approx Q^2_{\text{LOO}} = 0.609$
- $K = 0.53$  e  $K' = 0,99$ ; onde  $0.85 \leq K$  ou  $K' \leq 1.15$
- $|R^2_0 - R'^2_0| = 0.002 < 0.30$

A [Figura 5C] mostra a regressão linear entre valores observados *versus* valores previstos e valores previstos *versus* valores observados para as chalconas sintetizadas ativas utilizados na validação externa.



**Figura 5C:** Diagrama da regressão linear entre: a) valores observados x previstos; b) valores previstos x observados para as chalconas da validação externa (4, 10, 11, 14, 21, 24, 26 e 27)

Posteriormente observamos cuidadosamente os valores de atividade biológica das oito chalconas e realizamos a exclusão de três compostos da série, selecionando apenas cinco compostos sintetizados para a realização do

mesmo procedimento de validação externa. Estas cinco chalconas selecionadas representam uma parcela de 25% de compostos ao ser comparado aos 20 derivados iniciais no estudo QSAR-2D. Os 05 derivados foram selecionados, levando em consideração a maior homogeneidade com relação aos valores de atividade biológica.

Os valores dos descritores dos derivados da série externa (05 compostos selecionados) estão na [Tabela 4C].

**Tabela 4C:** Valores dos descritores das chalconas selecionadas (série externa).

| Compostos          | [MR]   | [PI]    | [Lx]      | [B4 (A)] |
|--------------------|--------|---------|-----------|----------|
| <b>Chalcona 10</b> | 78,133 | 8,59996 | 15,294300 | 2,252131 |
| <b>Chalcona 11</b> | 87,867 | 8,63552 | 15,304300 | 2,283168 |
| <b>Chalcona 21</b> | 89,939 | 9,25977 | 17,255100 | 1,84631  |
| <b>Chalcona 26</b> | 97,594 | 9,14063 | 17,424600 | 1,926588 |
| <b>Chalcona 27</b> | 94,806 | 9,39536 | 15,903999 | 1,798149 |

Os resultados apresentados na [Tabela 5C], revelaram que o modelo proposto apresenta excelente capacidade preditiva externa, considerando os limites propostos na literatura. Um dos valores  $K$  ou  $K'$  e a relação  $|R^2_0 - R'^2_0|$  está dentro dos limites aceitáveis: ( $0,85 \leq K$  ou  $K' \leq 1,15$ ; e  $|R^2_0 - R'^2_0| \leq 0,3$ ). O valor do SEP (erro padrão da predição externa), também é considerado baixo, sendo um indicativo de pequeno erro para um composto análogo sintetizado com base neste modelo (TROP SHA, GRAMÁTICA e GOMBAR, 2003), (MELO e FERREIRA, 2009) e (MELO *et al*, 2010).

**Tabela 5C:** Valores preditos da atividade biológica para as chalconas selecionadas (série externa) e parâmetros estatísticos.

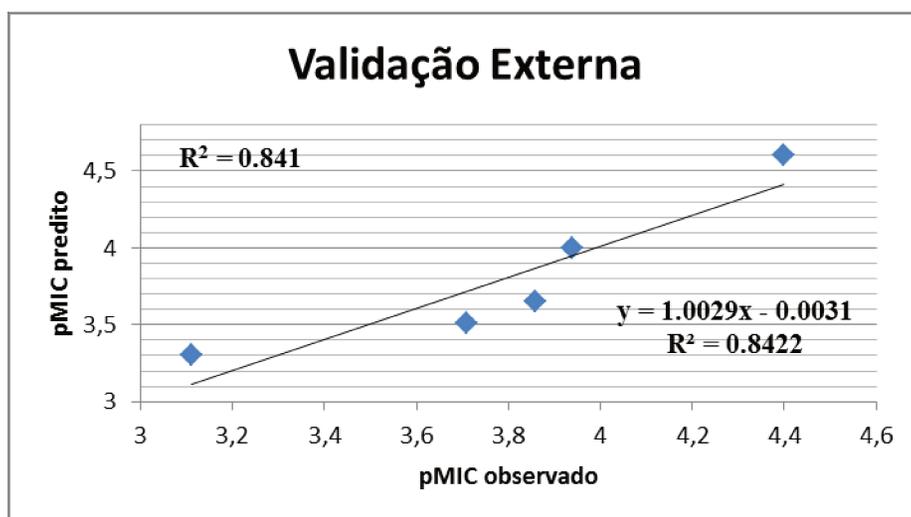
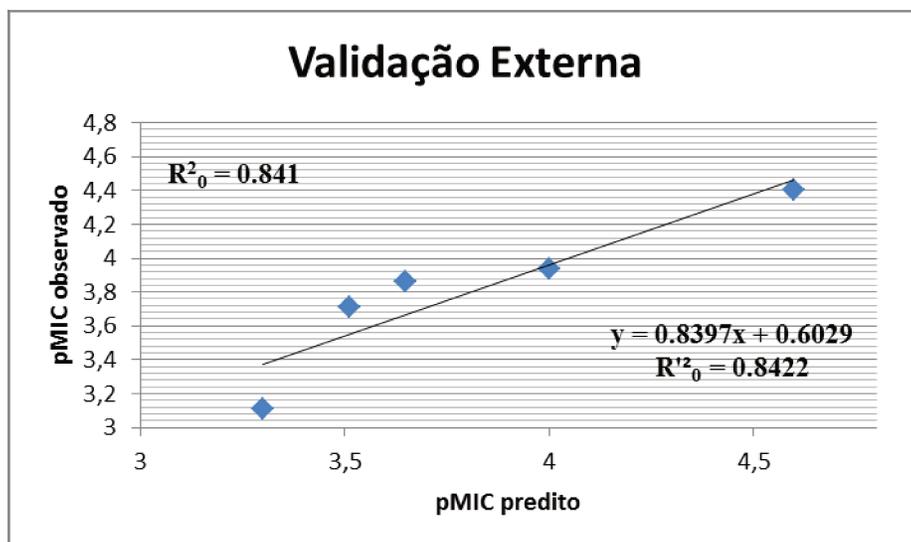
| Compostos  | pMIC <sub>Obs</sub> | pMIC <sub>pred</sub>  | Residues |
|--|---------------------|-----------------------|----------|
| Chalcona 10  | 3,30                | 3.11                  | -0,19    |
| Chalcona 11  | 3,51                | 3.71                  | 0,20     |
| Chalcona 21*   | 3,65                | 3.86                  | 0,21     |
| Chalcona 26*   | 4,60                | 4.40                  | -0,20    |
| Chalcona 27*   | 4,00                | 3.94                  | -0,06    |
| R <sup>2</sup> <sub>pred</sub>                             |                     | 0,841                 |          |
| SEP  |                     | 0,030                 |          |
| K  |                     | 0,839                 |          |
| K'   |                     | 1,000                 |          |
| R <sup>2</sup> <sub>0</sub> - R' <sup>2</sup> <sub>0</sub> |                     | 0,841 - 0,842 = 0,001 |          |

\* Chalconas que foram propostas para síntese orgânica na Parte A do trabalho, ou seja, após ter realizado estudo QSAR-2D.

A excelente capacidade preditiva do modelo QSAR-2D foi demonstrada por intermédio da validação externa utilizando os derivados sintetizados selecionados, onde os parâmetros estatísticos abaixo indicam que o modelo proposto possui uma boa capacidade preditiva interna e externa:

- $R^2 = 0.776 > 0.6$ ;  $R^2_{\text{pred}} = 0.841 > 0.5$
- $Q^2_{\text{pred}} = 0.841 > Q^2_{\text{LOO}} = 0.609$  (*Paradoxo de Kubinyi*)
- $K = 0.839$  e  $K' = 1,000$ ; onde  $0.85 \leq K$  ou  $K' \leq 1.15$
- $|R^2_0 - R'^2_0| = 0.001 < 0.30$

A [Figura 6C] mostra a regressão linear entre valores observados *versus* valores previstos e valores previstos *versus* valores observados para as chalconas selecionados utilizados na validação externa.



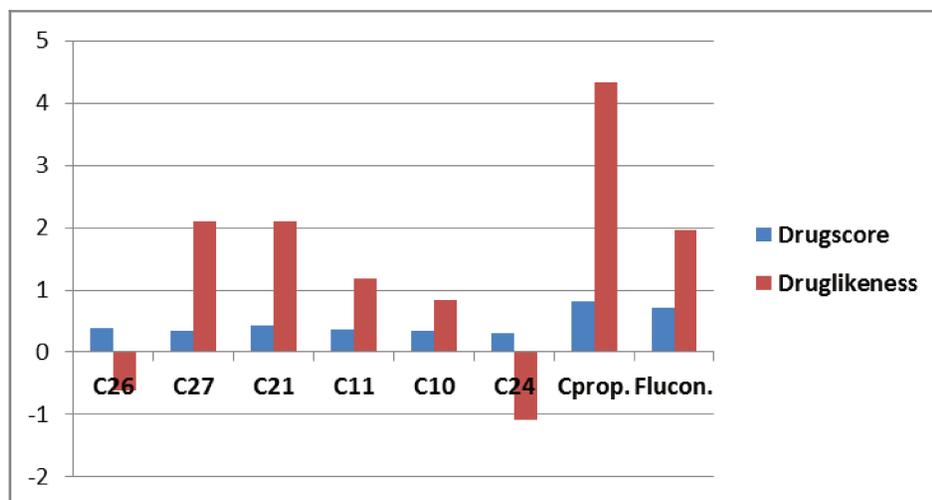
**Figura 6C:** Diagramas de regressão linear: a) valores observados  $x$  preditos; b) valores preditos  $x$  observados para as chalconas da validação externa (10, 11, 21, 26 e 27)

### 3.2. Avaliação do perfil farmacocinético-toxicológico *in silico*

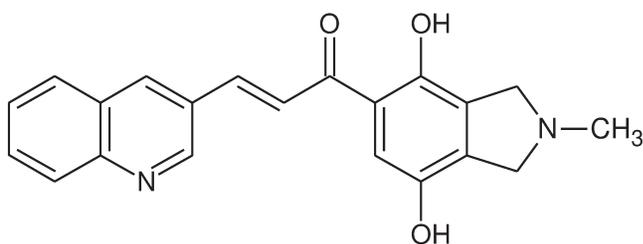
A fim de determinamos alguns parâmetros toxicológicos *in silico* importantes para a avaliação de um candidato a fármaco utilizamos o programa Osiris Property Explorer®<sup>17</sup> da empresa farmacêutica Actelion Pharmaceuticals Ltd disponibilizado na internet. Este programa também foi

<sup>17</sup> <http://www.organic-chemistry.org>

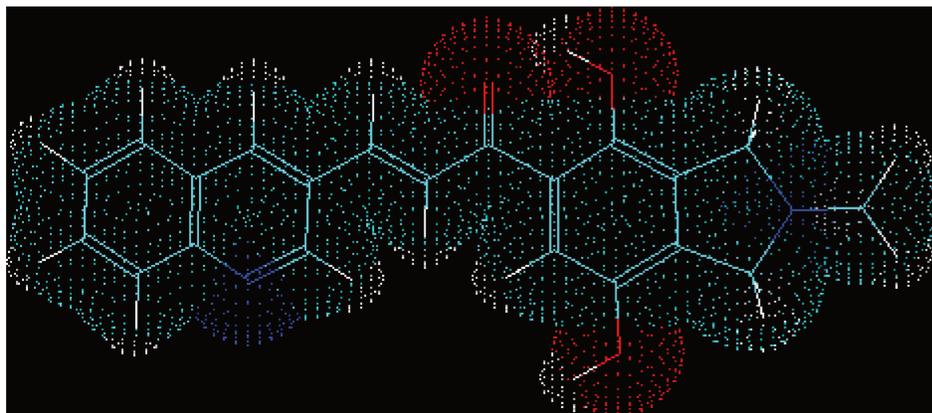
utilizado para realização dos cálculos de *Drug-Likeness* e *Drug-Score* para os seis compostos sintetizados mais ativos da série de 13 chalconas avaliadas na determinação da MIC [Figura 7C]. O diagrama revela que as chalconas **27** e **21** apresentam um índice para o perfil *Drug Likeness* superior ao fármaco (fluconazol), utilizado atualmente no tratamento de *Candida albicans*. Infelizmente o composto mais ativo (chalcona **26**) da série sintetizada apresenta um perfil *Drug Likeness* muito baixo quando comparado ao fármaco fluconazol. Quanto ao perfil *Drug Score*, podemos afirmar que todas as chalconas possuem score aproximado e relativamente inferior ao do fluconazol. Numa análise mais apurada utilizando o programa Osiris Property Explorer®, um suposto derivado análogo de chalcona ( $C_{prop.}$ ) foi avaliado e apresentou índices para perfil *Drug-Likeness* e *Drug-Score* muito superior ao fármaco fluconazol [Figura 8C], indicando uma possível proposta para a síntese orgânica do derivado em questão. Isto não quer dizer que o suposto derivado apresente boa atividade biológica contra as cepas de *Candida albicans*. O composto mencionado possui a estrutura química esquematizada em 2D e 3D na [Figura 8C]. A análise do diagrama do perfil *Drug-Likeness* e *Drug-Score* revela a enorme diferença nos índices deste composto quando comparado ao fármaco utilizado no mercado.



**Figura 7C:** Diagrama do perfil *Drug Likeness* e *Drug Score* para as chalconas mais ativas.



(2E)-1-(4,7-dihydroxy-2-methyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-5-yl)-3-(quinolin-3-yl)prop-2-en-1-one



**Figura 8C:** Representações bi e tridimensionais da chalcona proposta

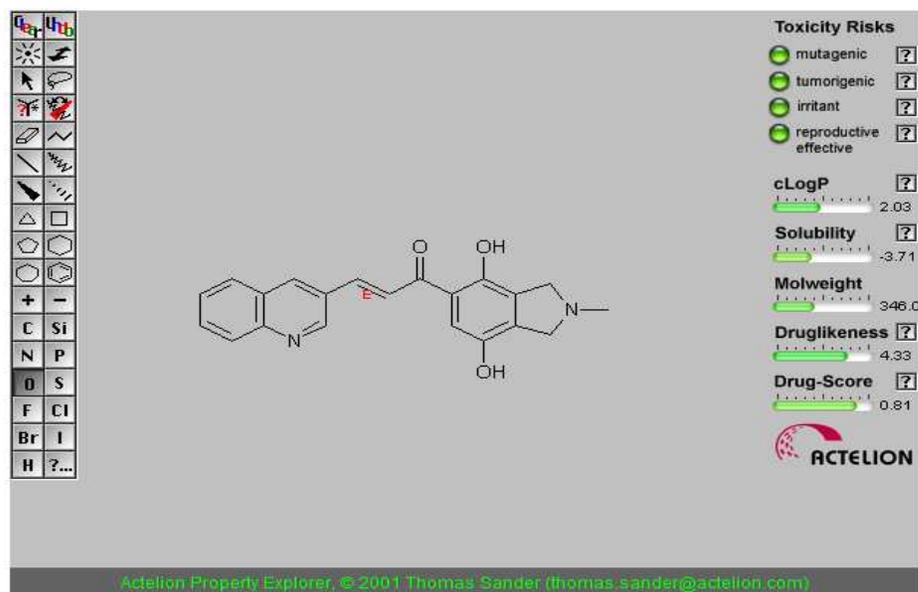
A [Tabela 6C] indica os índices dos referidos compostos para o perfil *Drug-Likeness* e *Drug-Score*.

**Tabela 6C:** Valores dos perfis *Drug Likeness* e *Drug Score* para as chalconas mais ativas, para a chalcona proposta e para o fluconazol.

| Composto                 | Perfil <i>Drug Likeness</i> | Perfil <i>Drug Score</i> |
|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| <b>Chalcona 26*</b>      | -0,61                       | 0,39                     |
| <b>Chalcona 27</b>       | 2,11                        | 0,34                     |
| <b>Chalcona 21</b>       | 2,11                        | 0,42                     |
| <b>Chalcona 11</b>       | 1,19                        | 0,37                     |
| <b>Chalcona 10</b>       | 0,84                        | 0,34                     |
| <b>Chalcona 24</b>       | -1,08                       | 0,31                     |
| <b>Chalcona Proposta</b> | 4,33                        | 0,81                     |
| <b>Fluconazol</b>        | 1,96                        | 0,72                     |

(\*) chalcona mais ativa

A [Figura 9C] indica o risco de toxicidade, alguns parâmetros físico-químicos e o perfil *Drug Likeness* e *Drug Score* para a chalcona esquematizada na [Figura 7C], determinados no programa Osiris Property Explorer®.



**Figura 9C:** Plataforma do programa Osiris Property Explorer® com os parâmetros determinados para a chalcona proposta.

O risco de toxicidade dos 06 compostos mais ativos, da chalcona proposta e do fluconazol estão representados na [Tabela 7C]. Vale ressaltar que os compostos foram avaliados quanto ao perfil de toxicidade para: mutagenicidade, tumorigenicidade, efeito irritante e efeito em sistema reprodutor.

**Tabela 7C:** Risco de toxicidade para as chalconas mais ativas, para a chalcona proposta e para o fluconazol.

| Compostos   | Mutagenicidade | Tumorigenicidade | Efeito Irritante | Efeito Sist. Reprodutor |
|-------------|----------------|------------------|------------------|-------------------------|
| Chalcona 26 | -              | -                | -                | -                       |
| Chalcona 27 | -              | -                | -                | -                       |
| Chalcona 21 | -              | -                | -                | -                       |
| Chalcona 11 | -              | -                | -                | -                       |

|                          |   |   |   |   |
|--------------------------|---|---|---|---|
| <b>Chalcona 10</b>       | + | - | - | - |
| <b>Chalcona 24</b>       | - | - | - | - |
| <b>Chalcona Proposta</b> | - | - | - | - |
| <b>Fluconazol</b>        | - | - | - | + |

(+) representa risco tóxico, enquanto (-) não representa risco tóxico.

### 3.3. Avaliação do perfil de biodisponibilidade oral

Com o objetivo de reforçar o estudo *in silico* do perfil físico-químico para os compostos mais ativos da série sintetizada, foram realizados cálculos de parâmetros relacionados com o perfil de biodisponibilidade oral da substância pela aplicação da regra de Lipinski (Regra-dos-Cinco). Esta regra prediz de uma maneira bastante simples se uma molécula possui ou não características ideais a um fármaco. A meta principal da Regra-dos-Cinco é a de estimar a solubilidade e a permeabilidade dos fármacos administrados por via oral, predizendo a influência da estrutura química na absorção de um dado composto.

Os parâmetros da regra de Lipinski analisados foram: Massa Molar (MM), Log P, grupos doadores de ligação de H (DLH) = (NH + OH) e grupos aceptores de ligação de H (ALH) = (N + O). Estes parâmetros estão associados a 90% dos fármacos orais que se encontram em nível de desenvolvimento clínico de fase II. Uma extensão dos parâmetros na regra de Lipinski foi realizada com intuito de aumentar o processo seletivo quanto à

biodisponibilidade oral do composto. Estes parâmetros adicionados foram: número de ligações rotacionáveis = NLR e área superficial polar = PSA.

Para a determinação do perfil de biodisponibilidade oral para as chalconas sintetizadas ativos utilizamos o programa Molinspiration® disponibilizado (<http://www.molinspiration.com>) pela empresa farmacêutica Novartis. No programa Molinspiration®,  $miLogP = \text{Log P}$ ,  $TPSA = \text{PSA}$ ,  $nOHNH = \text{DLH}$ ,  $nON = \text{ALH}$ ,  $nrotb = \text{NLR}$ ,  $MW = \text{MM}$ , além de apresentar o número de violações à Regra de Lipinski. A [Tabela 8C] representa os parâmetros calculados de acordo com a regra de Lipinski para os compostos sintetizados mais ativos, para o fluconazol e para a chalcona proposta no item 3.2. A análise da [Tabela 8C] revela que dentre os 08 compostos sintetizados mais ativos, 03 compostos (chalconas **11**, **14** e **27**) violam a Regra de Lipinski, ou seja, estas chalconas não apresentam perfil adequado para biodisponibilidade oral. Já a chalcona mais ativa (chalcona **26**) apresenta perfil para biodisponibilidade oral, pois não viola a Regra-dos-Cinco em nenhum critério. A chalcona proposta no item 3.2 também sobreviveu à Regra-dos-Cinco, apresentando então perfil para biodisponibilidade oral.

**Tabela 8C:** Aplicação da Regra de Lipinski às chalconas mais ativas, à chalcona proposta e ao fluconazol.

| Compostos          | MM      | Log P          | PSA    | DLH | ALH | NLR | N° Violações |
|--------------------|---------|----------------|--------|-----|-----|-----|--------------|
| <b>Chalcona 04</b> | 253,257 | 3,770          | 62,895 | 0   | 4   | 4   | 0            |
| <b>Chalcona 10</b> | 254,354 | 4,245          | 17,071 | 0   | 1   | 4   | 0            |
| <b>Chalcona 11</b> | 323,244 | <b>5,529**</b> | 17,071 | 0   | 1   | 4   | 1            |
| <b>Chalcona 14</b> | 378,512 | <b>7,148**</b> | 35,539 | 0   | 3   | 6   | 1            |
| <b>Chalcona 21</b> | 328,198 | 4,901          | 29,963 | 0   | 2   | 3   | 0            |

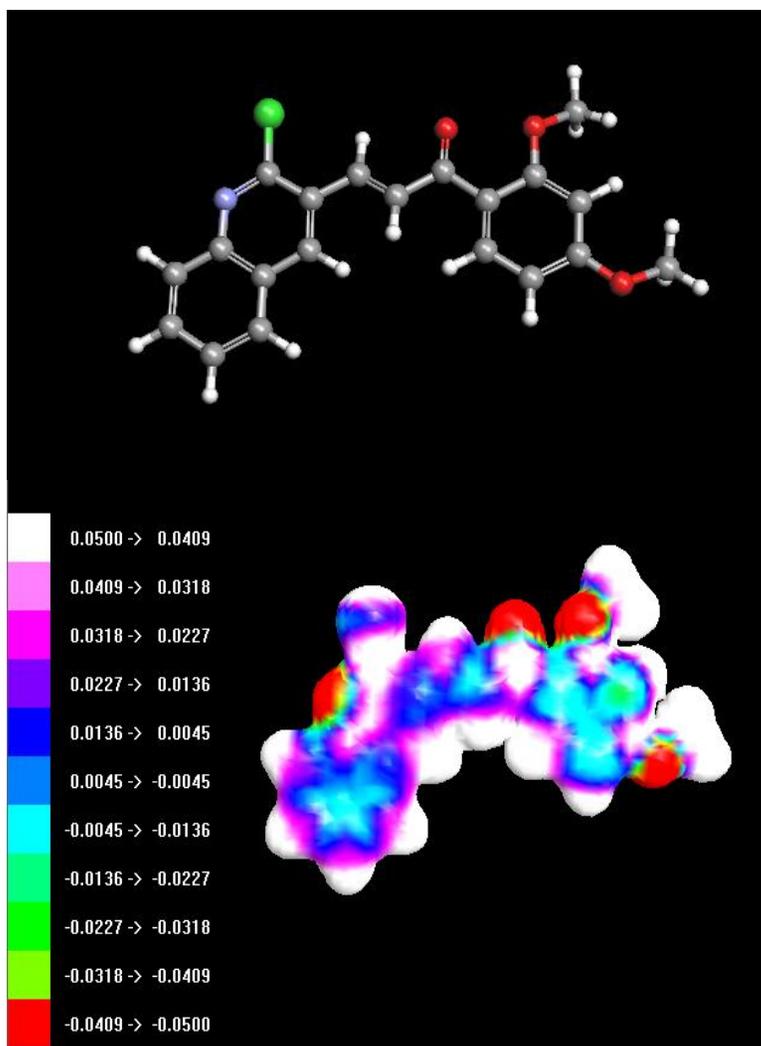
|                          |         |                |        |   |   |   |   |
|--------------------------|---------|----------------|--------|---|---|---|---|
| <b>Chalcona 24</b>       | 329,733 | 4,840          | 29,963 | 0 | 2 | 3 | 0 |
| <b>Chalcona 26*</b>      | 353,805 | 4,626          | 48,431 | 0 | 4 | 5 | 0 |
| <b>Chalcona 27</b>       | 362,643 | <b>5,868**</b> | 29,963 | 0 | 2 | 3 | 1 |
| <b>Chalcona Proposta</b> | 346,386 | 2,609          | 73,657 | 2 | 5 | 3 | 0 |
| <b>Fluconazol</b>        | 306,276 | 0,118          | 81,664 | 1 | 7 | 5 | 0 |

\* Chalcona mais ativa da série; \*\* Valores do parâmetro (Log P) que violam a Regra de Lipinski.

### 3.4. Determinação dos MEP, $MDE_{HOMO}$ e $MDE_{LUMO}$

O Mapa de Potencial Eletrostático Molecular (MEP) da chalcona 26 (maior pMIC) da série externa sintética foi determinado, pois este nos fornece o potencial em termos de densidade eletrônica nas regiões de uma superfície molecular. O MEP do composto está esquematizado na [Figura 10C].

Notamos a elevada densidade eletrônica na região da carbonila conforme presenciamos nos compostos mais ativos da série de treinamento e da série externa no estudo QSAR-2D realizado na parte A deste trabalho. O composto também apresenta elevada densidade eletrônica na região do nitrogênio do anel quinolínico (anel A). A chalcona 26 possui grupos metóxi nas posições orto e para do anel B, oferecendo elevada densidade eletrônica na região em presença do oxigênio do grupo – OCH<sub>3</sub>. Notamos de forma evidente que o carbono C4 da região olefínica possui baixa densidade eletrônica caracterizando-o com potencial eletrostático positivo.



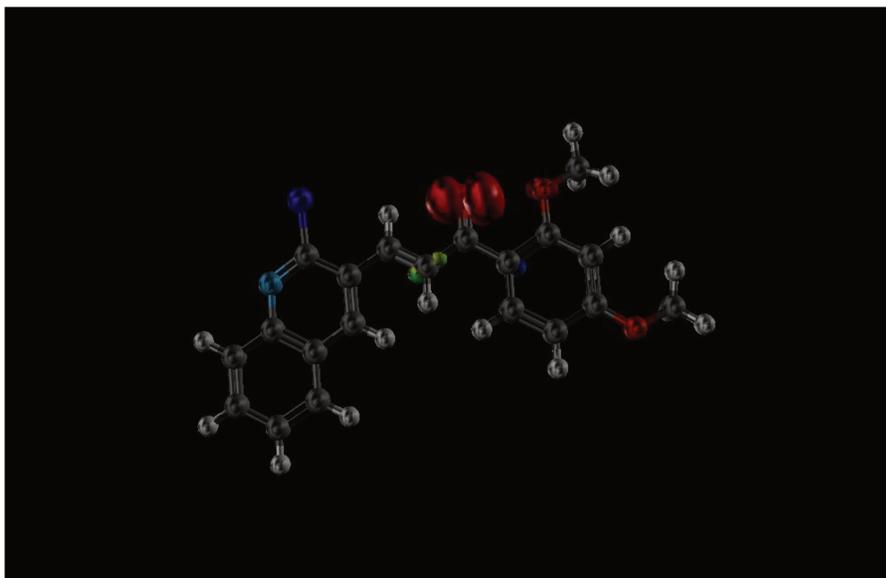
**Figura 10C:** Mapa de Potencial Eletrostático da chalcona **26**.<sup>18</sup>

Da mesma forma que determinamos o MEP para a chalcona **26**, também determinamos o Mapa de Densidade Eletrônica (MDE) do orbital de fronteira HOMO. A [Figura 11C] revela que o orbital molecular HOMO está localizado na região da carbonila do composto.

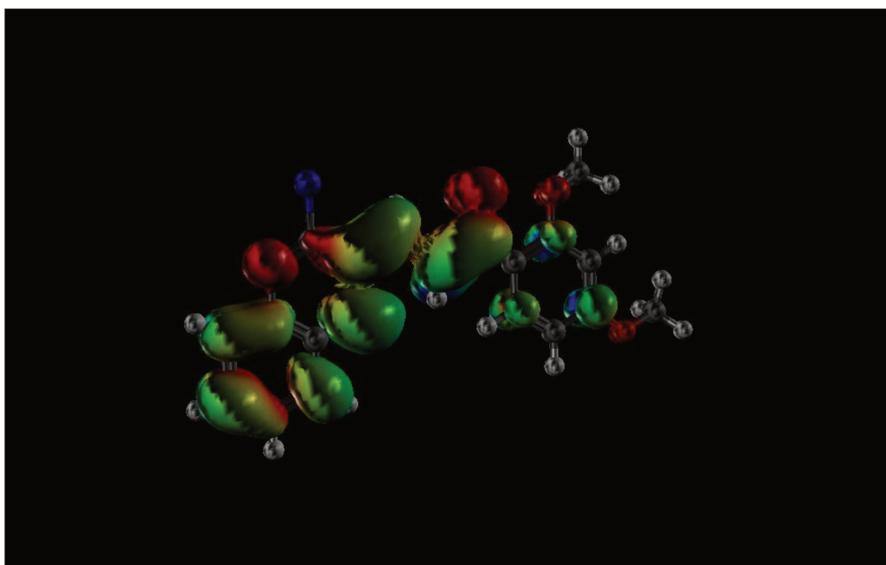
A análise do Mapa de Densidade Eletrônica (MDE) do orbital molecular de fronteira LUMO para a chalcona mais ativa (composto **26**) poderá nos revelar

<sup>18</sup> As regiões com potencial eletrostático negativo estão representadas em vermelho (elevada densidade eletrônica), enquanto as regiões com potencial eletrostático positivo estão em azul-branco (baixa densidade eletrônica).

a região do composto sujeita a um possível ataque nucleofílico [Figura 13C]. Notamos uma evidente caracterização do orbital LUMO em C4 (centro eletrofílico) e também a existência do mecanismo de ressonância devido à deslocalização dos elétrons  $\pi$  (C4-C3) em direção à região da carbonila (C = O).

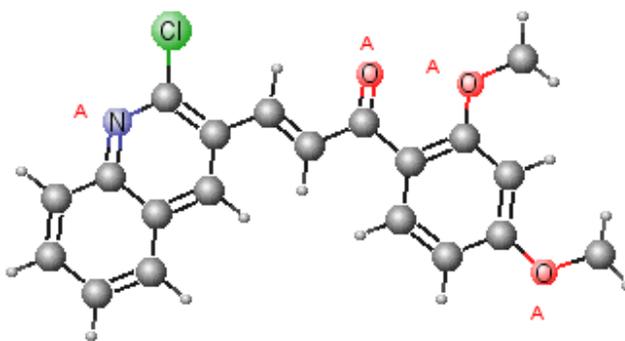


**Figura 11C:** Mapa de Densidade Eletrônica do Orbital HOMO da chalcona **26**



**Figura 12C:** Mapa de Densidade Eletrônica Orbital LUMO da chalcona **26**

Em pH = 7.4 (fisiológico), calculamos a forma estrutural predominante da chalcona **26** e notamos que o composto nestas condições apresenta 4 sítios aceptores de hidrogênio e nenhum sítio doador. Os parâmetros *H Bond Donor* e *H Bond Acceptor* foi calculado através do programa MarvinSketch versão 5.7 da ChemAxon Ltd ([www.chemaxon.com](http://www.chemaxon.com)). A [Figura 13C] ilustra a estrutura química predominante da chalcona **26** em pH fisiológico, com os seus respectivos sítios aceptores de hidrogênio. Não devemos nos esquecer de mencionar que em meio ácido o átomo de nitrogênio do anel quinolínico sofre protonação resultando a estrutura química protonada da chalcona.

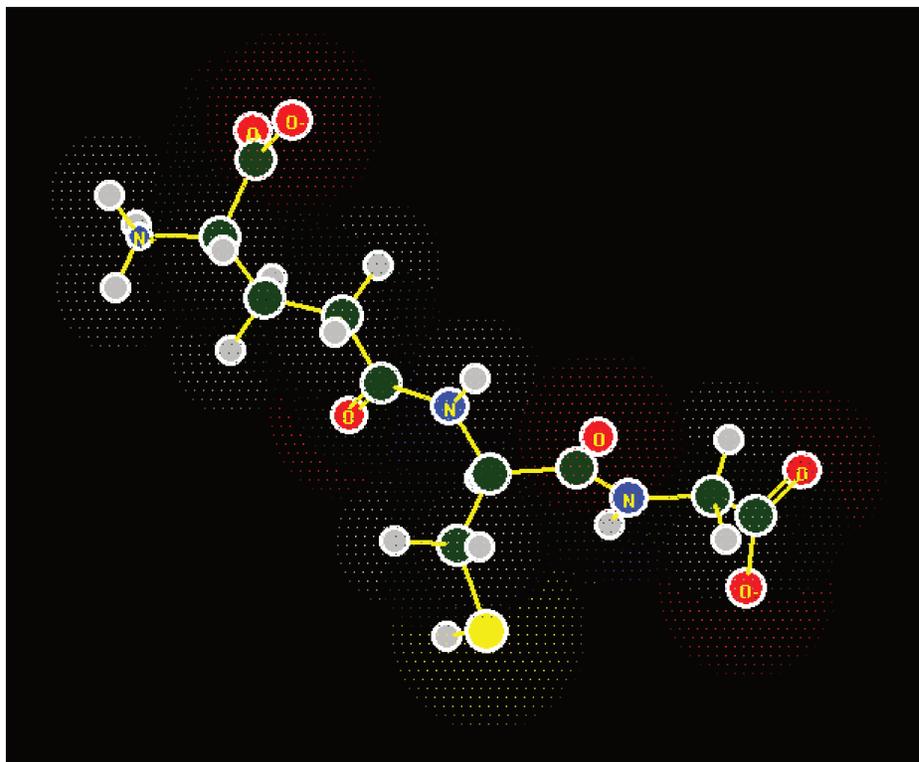


**Figura 13C:** Estrutura da chalcona **26** e seus sítios aceptores de H.

### 3.5 A glutathiona reduzida e a proposta de mecanismo de ação dos compostos estudados

Para a determinação do  $MDE_{HOMO}$  da glutathiona reduzida (GSH), foi necessário otimizar a geometria molecular deste tripeptídeo ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina). Para a execução de tal procedimento, a sua estrutura química foi desenhada e visualizada em 3D utilizando o programa ACD/ChemSketch versão 12.0 (Advanced Chemistry Development, Inc., 2010). O primeiro passo foi a otimização da geometria molecular com a utilização do método *semi-empírico* Hamiltoniano PM3 (*Parametric Method 3*) através do programa Arguslab versão 4.0 (Thompson and Planaria Software LLC, Inc., 2004).

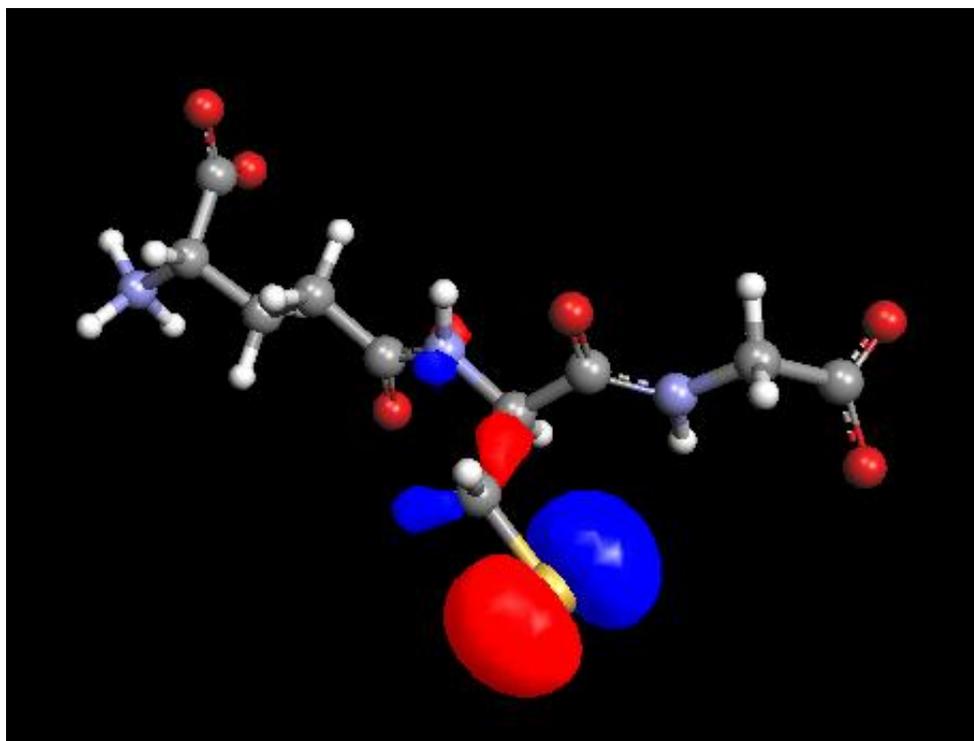
Após realizar este primeiro procedimento, a estabilidade molecular foi obtida utilizando Teoria do Funcional de Densidade (Density Functional Theory - DFT) via método híbrido B3LYP (Becke, Lee, Yang e Parr) empregando a função de base 6-31G (B3LYP/6-31G) no programa ChemSitePro versão 9.0 (ChemSW, Inc., 2009). Posteriormente, minimizamos a energia molecular da estrutura química pelo método Simplex utilizando constante dielétrica igual a  $\epsilon = 78$  para simular ambiente aquoso, utilizando potencial Lennard-Jones 6-12 e função ligação de hidrogênio (Hydrogen Bond Function). Esta minimização energética foi executada com auxílio do pacote computacional Molecular Modeling Pro Plus (MMPP) versão 6.3 (ChemSW, Inc., 2004) [Figura 14C].



**Figura 14C:** Estrutura otimizada da glutathiona reduzida (GSH)

Não devemos esquecer que este tripeptídeo (GSH) apresenta-se sob a forma carregada em pH fisiológico (carboxilas terminais carregado negativamente e grupo amino do resíduo glutamato sob a forma protonada). A

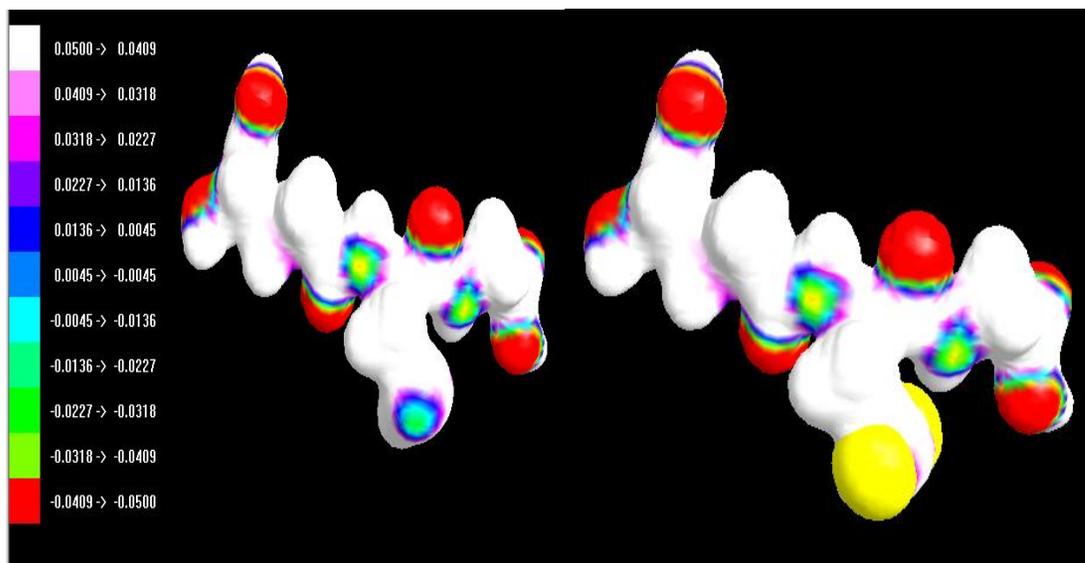
estrutura química de menor energia foi submetida a um “*single point calculation*” pelo método híbrido DFT-B3LYP, utilizando a base 6-31G. A seguir é mostrado o Mapa de Densidade Eletrônica (MDE) do orbital de fronteira HOMO utilizando o programa Arguslab versão 4.0 [Figura 15C]. Notamos de forma evidente a presença do orbital de fronteira HOMO no átomo de enxofre do grupo sulfidríla do resíduo de aminoácido cisteína. Para uma melhor compreensão do mapa de potencial eletrostático da GSH, determinamos o MEP de sua estrutura química e executamos a sobreposição do seu MEP com o MDE do orbital HOMO.



**Figura 15C:** Mapa de densidade eletrônica do orbital HOMO da GSH na forma carregada.

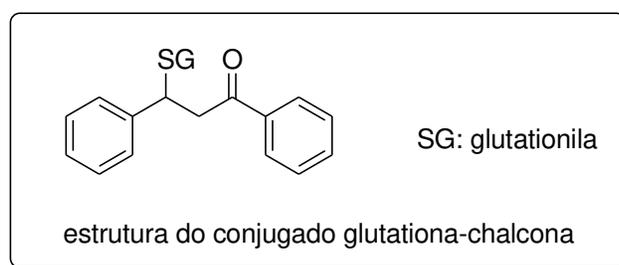
A sobreposição do MEP com o MDE do orbital HOMO representado na [Figura 16C], mostra claramente que o orbital de fronteira HOMO da molécula de GSH é representado pelo átomo de enxofre do grupo sulfidríla do resíduo de aminoácido cisteína. Então, o orbital HOMO do átomo de

enxofre presente na GSH pode estar provavelmente interagindo com o orbital LUMO do átomo de carbono C4 das chalconas mais ativas.



**Figura 16C:** Mapa de Potencial Eletrostático da GSH (esquerda) e Mapa de Densidade Eletrônica do HOMO somado a este (direita).<sup>19</sup>

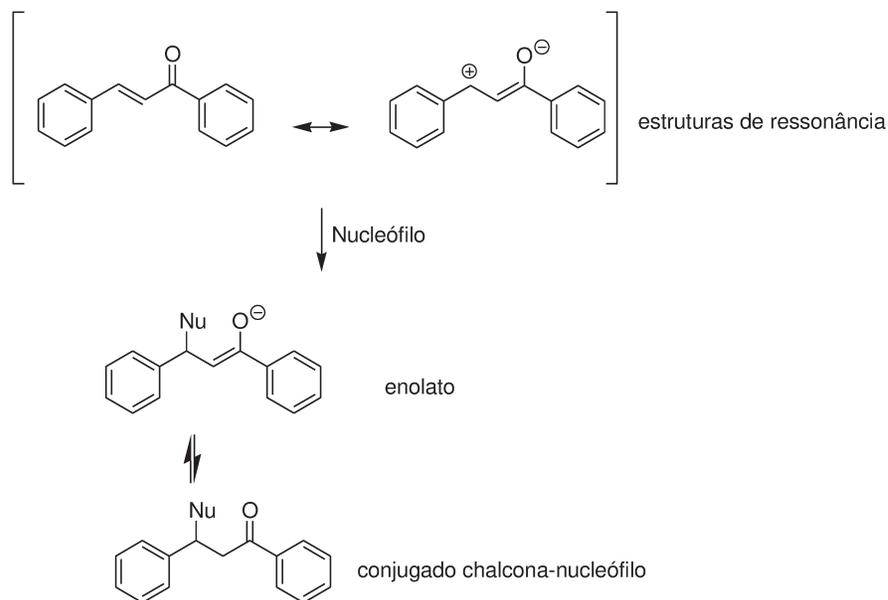
Esta interação promove a formação de uma ligação química covalente irreversível resultando numa estrutura química chamada de conjugado glutationa-chalcona [Figura 17C].



**Figura 17C:** Estrutura química do conjugado glutationa-chalcona.

<sup>19</sup> As regiões com potencial eletrostático negativo estão representadas em vermelho (elevada densidade eletrônica), enquanto que as regiões com potencial eletrostático positivo estão em branco (baixa densidade eletrônica) e as regiões em branco representam regiões de densidade eletrônica intermediária; O orbital de fronteira HOMO da GSH encontra-se em amarelo, representando o átomo de enxofre do grupo SH da cisteína do tripeptídeo

Caso isto ocorra, a concentração intracelular dos níveis de glutathiona reduzida intracelular na *Candida albicans* estará sendo reduzido em função da presença de um centro eletrofílico (Carbono C4) da chalcona, ocorrendo então à formação do conjugado glutathiona-chalcona. Uma redução nos níveis de glutathiona reduzida representa elevado stress oxidativo na célula fúngica em presença das espécies reativas oxigenadas (ROS) que não serão mais removidas pela GSH, resultando enormes danos à estrutura celular e conseqüente morte celular. Uma representação esquemática a respeito da formação do conjugado glutathiona-chalcona está esquematizada na [Figura 18C].



**Figura 18C:** Estruturas de ressonância da chalcona e sua interação com um nucleófilo

O fenômeno de ressonância que ocorre com as chalconas promove a deslocalização da ligação  $\pi$  (C4-C3) em direção ao oxigênio eletronegativo do grupo carbonila (C=O) resultando em uma espécie que corresponde a um enolato de chalcona. Esta espécie apresenta um centro eletrofílico em carbono C4, portanto possui o evidente orbital de fronteira LUMO e potencial eletrostático positivo em carbono C4. Esta região está sujeita a ataque

nucleofílico, como por exemplo, o ataque do grupo SH da GSH. Na realidade seria nada mais que a interação do orbital HOMO da GSH com orbital LUMO do carbono C4 da chalcona. O resultado seria a formação do conjugado glutationa-chalcona [Figura 17C]

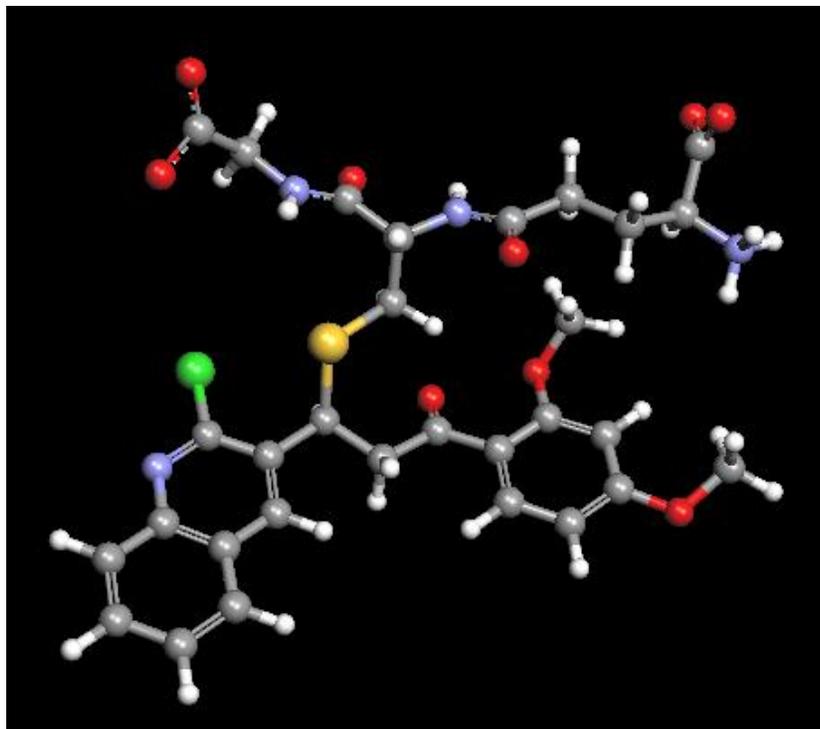
A GST apresenta dois sítios ativos cujas atividades são independentes uma da outra. Cada sítio ativo consiste no mínimo de duas regiões de interação, uma para a glutationa reduzida que é muito específica para este tripeptídeo, e outra com menor especificidade para o “acolhimento” do composto eletrófilo (HUBER e ALMEIDA, 2008). Miyamoto e colaboradores relataram na literatura que a enzima GST sofre inibição na presença de 4-cloro-fenil-chalcona (MIYAMOTO e YAMAMOTO, 1994). Então fica um questionamento: As chalconas interagem com a glutationa reduzida (GSH) formando um conjugado glutationa-chalcona ou atuam inibindo a enzima glutationa S-transferase (GST)?

Se a enzima possui duas regiões específicas, uma para a concretização das interações com o substrato que é a GSH e outra região para o “acolhimento” do composto eletrófilo (chalcona), então seria muito improvável que os chalconas tenham ação inibitória sobre a enzima GST. Portanto, uma provável proposta para o mecanismo de ação da chalconas seria a interação orbitalar com a glutationa reduzida (GSH) formando conjugado glutationa-chalcona em presença da enzima GST, ocasionando morte da *Candida albicans* por stress oxidativo.

O nosso trabalho vai de encontro com o trabalho de Guzy e colaboradores, que investigaram o efeito de chalconas hidroxiladas e metoxiladas em mitocôndrias de fígado de rato. Os pesquisadores concluíram que os

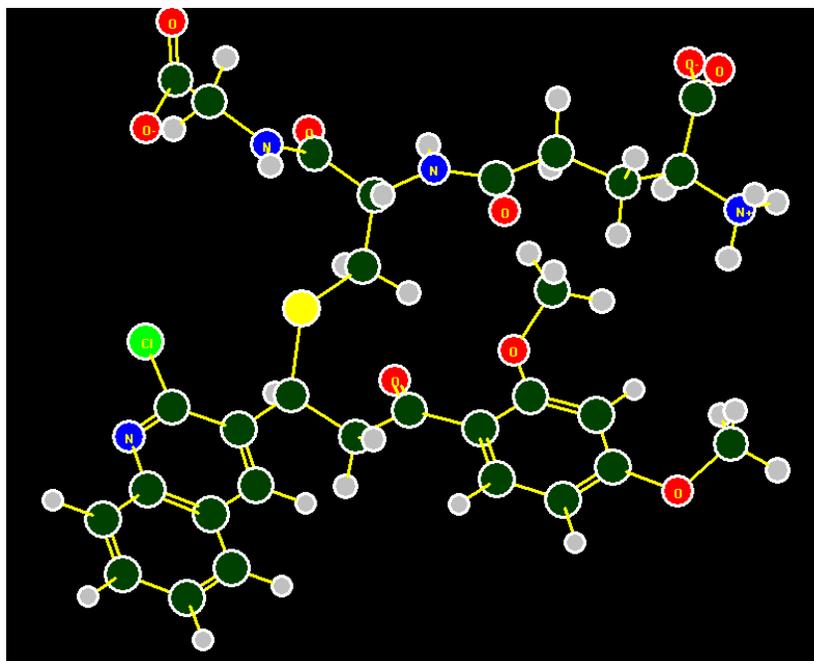
compostos reduziram os níveis de glutathiona reduzida, romperam o transporte eletrônico na cadeia respiratória e aumentaram-se os níveis das Espécies Químicas Oxigenadas (EROs), o que induz ao stress oxidativo (GUZY *et al*, 2010). O trabalho de Perjési e Rozmer realizado com chalconas cíclicas em células Jurkat T indicou que os compostos induziram à apoptose e modificação nos níveis de tiol no meio intracelular (PERJÉSI e ROZMER, 2010).

Levando em consideração a proposta do mecanismo de ação para as chalconas estudadas em presença de GSH, os descritores moleculares [MR, Lx e B4(A)] do modelo proposto QSAR-2D na Parte A deste trabalho, estão intimamente relacionados com estereoespecificidade entre as chalconas e a região do sítio ativo da GST que “acolhe” o composto eletrófilo (chalcona). Já o descritor PI que está relacionado à  $E_{\text{HOMO}}$  das chalconas, pode ser caracterizado pelo evidente MDE do orbital de fronteira HOMO na carbonila do composto. Presenciamos que a estrutura química do conjugado está bem acomodada não havendo a presença de impedimento estereoquímico. Isto sugere uma possível aproximação nos valores do descritor [Lx] da GSH e da chalcona **26**. A representação da estrutura química do Conjugado Glutathiona-Chalcona **26** GSH otimizada está indicada na [Figura 19C]. A presença de dois grupos carboxila terminais carregados negativamente é um indicativo da presença de interação eletrostática entre as extremidades do conjugado e aminoácidos carregados positivamente na região do sítio da enzima GST.



**Figura 19C:** Estrutura otimizada do conjugado GSH-Chalcona **26**.

O mesmo acontece com o grupo amino protonado que também se encontra na extremidade do conjugado [Figura 20C].



**Figura 20C:** Estrutura do conjugado GSH-Chalcona **26** e porções terminais carregadas.

Um dado interessante reside no cálculo das energias livres de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) para a GSH, chalcona **26** e para o conjugado glutationa-chalcona. Este procedimento foi realizado utilizando o programa Molecular Modeling Pro Plus (MMPP) versão 6.3 (ChemSW, Inc., 2004). O processo de formação do conjugado pode ser representado pela [Equação 25]:



De modo geral, a famosa [Equação 26] para o cálculo da variação da energia livre de Gibbs de um determinado processo bioquímico é expressa matematicamente por:

$$\Delta G_r^\circ (\text{reação}) = \sum \Delta G_f^\circ (\text{produtos}) - \sum \Delta G_f^\circ (\text{reagentes}) \quad \text{Eq. 26}$$

$$\sum \Delta G_f^\circ (\text{produtos}) = \sum \Delta G_f^\circ (\text{conjugado}) = - 529.08 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

$$\sum \Delta G_f^\circ (\text{reagentes}) = \sum \Delta G_f^\circ (\text{GSH}) + \sum \Delta G_f^\circ (\text{chalcona } \mathbf{26}) \Rightarrow$$

$$\sum \Delta G_f^\circ (\text{reagentes}) = (- 546.08 \text{ kJ.mol}^{-1}) + (226.8899 \text{ kJ.mol}^{-1}) = - 319.19 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

Então utilizando a [Equação 26] temos:

$$\Delta G_r^\circ (\text{reação}) = \sum \Delta G_f^\circ (\text{produtos}) - \sum \Delta G_f^\circ (\text{reagentes}) \Rightarrow$$

$$\Delta G_r^\circ (\text{reação}) = - 529.08 - (- 319.19) = - 529.08 + 319.19 \Rightarrow$$

$$\Delta G_r^\circ (\text{reação}) = - 209.89 \text{ kJ/mol}$$

É sabido que todo processo bioquímico que apresenta  $\Delta G_r^\circ (\text{reação}) < 0$  é considerado processo exergônico, ou seja, é um processo espontâneo. Assim,

também por intermédio de cálculos de descritores das estruturas químicas, pudemos também concluir que a formação do conjugado a partir dos reagentes iniciais é um processo espontâneo.



## **4. CONCLUSÕES**



Após realizarmos a validação externa para os 05 compostos sintetizados selecionados, utilizando o modelo proposto QSAR-2D na Parte A deste trabalho evidenciamos que o modelo proposto apresenta excelente capacidade preditiva externa, considerando os limites propostos na literatura. Apesar do composto mais ativo (chalcona 26) apresentar um perfil *Drug Likeness* e *Drug Score* baixo em relação ao fluconazol, ele foi capaz de sobreviver à Regra de Lipinski, ou seja, ele possui perfil para biodisponibilidade oral. O MEP,  $MDE_{HOMO}$  e  $MDE_{LUMO}$  da chalcona 26 revelaram que o orbital de fronteira HOMO está bem evidenciado na carbonila, que o carbono C4 possui evidente orbital de fronteira LUMO e potencial eletrostático positivo, indicando que a chalcona possui centro eletrofílico em C4, sujeito à ocorrência de ataques nucleófilos. O  $MDE_{HOMO}$  da glutatona reduzida revelou que o orbital de fronteira HOMO está concentrado no átomo de enxofre do grupo sulfidrila do aminoácido cisteína. Em função da ocorrência do mecanismo de ressonância, as chalconas possuem uma estrutura química com centro eletrofílico no carbono C4, o que indica provável interação orbitalar entre o orbital HOMO do átomo de enxofre da GSH e o orbital LUMO do carbono C4 da chalcona resultando em ligação covalente e na formação de conjugado glutatona-chalcona. A diminuição nos níveis da concentração de glutatona reduzida no meio intracelular do fungo em função da formação da conjugação resulta em stress oxidativo celular e conseqüente morte da *Candida albicans*.



## **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



Afonso, I. F. **Modelagem Molecular e Avaliação da Relação Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos Farmacocinéticos e Toxicológicos in silico de Derivados Heterocíclicos com Atividade Antimicrobiana. 2008.** 136 f.. Dissertação (Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ.

Atkins, P.; de Paula, J. **Físico-Química Biológica.** 1ª Ed; LTC, Rio de Janeiro, **2008.**

Batovska, D.; Parushev, S. P.; Slavova, A.; Bankova, V.; Tsvetkova, I.; Ninova, M.; Najdenski, H. **Study on the Substituents effects of a series of synthetic chalcones against the yeast *Candida albicans*.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2007**, 42, 87-92.

Bello, M. L. **Derivados Sintéticos da Chalcona Inibidores do Crescimento de *Leishmania braziliensis*: modelagem molecular para o Estudo da Relação Estrutura-Atividade (SAR) e Avaliação Teórica do Perfil Físico-Químico e Toxicológico (In Silico).** **2010.** 90 f.. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ.

Bresolin, T. M. B.; Cechinel Filho, V. **Fármacos e Medicamentos: Uma abordagem Multidisciplinar.** Santos: São Paulo, **2010.**

Bruice, P. Y. **Química Orgânica.** V. 2, 4ª Ed, Pearson Prentice Hall: São Paulo, **2006.**

Cadwell, G. W.; Ritchie, D. M.; Masucci, J. A.; Hageman, W.; Yan, Z. **The new pre-clinical paradigm: compound optimization in early and late phase drug discovery.** *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2001**, 1 (5), 353-366.

Clark, D. E.; Pickett, S. P. **Computational methods for the prediction of drug-likeness.** *DDT*, **2000**, 5 (2).

Constantino, M. G. **Química Orgânica: Curso Básico Universitário.** V. 2, LTC: Rio de Janeiro, **2008.**

Costa, M. S.; Boechat, N.; Rangel, E. A.; Silva, F. C.; Souza, A. M. T.; Rodrigues, C. R.; Castro, H. C.; Junior, I. N.; Lourenço, M. C. S.; Wardell, S. M. S. V.; Ferreira, V. F. **Synthesis, Tuberculosis Inhibitory Activity, and SAR Study of N-Substituted-phenyl-1,2,3-Triazole Derivatives.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2006**, 14, 8644-8653.

Costa, P.; Pilli, R.; Pinheiro, S.; Vasconcellos, M. **Substâncias Carboniladas e derivados.** Bookman: Porto Alegre, **2003.**

Davis, A. M.; Riley, R. J. **Predictive ADMET studies, the challenges and the opportunities.** *Current Opinion in Chemical Biology*, **2004**, 8 (4), 378-386.

Dimasi, J. A. **New drug innovation and pharmaceutical industry structure: trends in the output of pharmaceutical firms.** *Drug Information Journal*, **2000**, 34, 1169-1194.

Ekins, S.; Mestres, J.; Testa, B. **In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling.** *British Journal of Pharmacology*, **2007**, 152 (1), 9-20.

Ertl, P.; Rohde, B.; Selzer, P. **Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties.** *Journal of Medicinal Chemistry*, **2000**, 43, 3714-3717.

Gennaro, A. R. **Remington: A Ciência e a Prática da Farmácia.** 20ª Ed; Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, **2004**.

Golbraikh, A.; Shen, M.; Xiao, Y.; Lee, K.; Tropsha, A. **Rational selection of training and test sets for the development of validated QSAR models.** *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **2003**, 17, 241-253.

Golbraikh, A.; Tropsha, A. **Beware of  $q^2$ !** *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **2002**, 20, 269-276.

Grant, G. H.; Richards, W. G.; **Computational Chemistry.** Oxford Science Publications. **1996**.

Guido, R. V. C.; Andricopulo, A. D. **Modelagem Molecular de Fármacos.** *Revista Processos Químicos*, **2008**, 2 (4), 24-36. Disponível em: <http://www.senaigo.com.br/dados/File/arquivos/publicacoes/processos/processosquimicos%20042008.pdf>. Consultado em: 30/11/2011.

Guzy, J.; Vaskova-Kubalkova, J.; Rosmer, Zs.; Fodor, K.; Marekova, M.; Poskrobova, M.; Perjesi, P. **Activation of oxidative stress response by hydroxyl substituted chalcones and cyclic chalcone analogues in mitochondria.** *FEBS Letters*, **2010**, 584, 567-570.

Hodgson, J. **ADMET – turning chemicals into drugs.** *Nature Biotechnology*, **2001**, 19, 722-726.

Hou, T.; Wang, J.; Zhang, W.; Xu, X. **ADME Evaluation in Drug Discovery. 7. Prediction of Oral Absorption by Correlation and Classification.** *Journal of Chemical Information and Modeling*, **2007**, 47, 208-218.

Huber, P. C.; Almeida, W. P. **Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos.** *Química Nova*, **2008**, 31 (05), 1170-1179.

Jarvis, L. **Indian Venture Aptuit and Laurus create a drug service provider.** *Chemical & Engineering News*, **2007**, 85 (25), 14-18.

Kadan, R. U.; Roy, N. **Recent Trends in Drug Likeness Prediction: A Comprehensive Review of *In Silico* Methods.** *Indian Journal of Pharmaceutical Science*, **2007**, 69, 5, 609-615.

Katzung, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica.** 10<sup>a</sup> Ed; AMGH Editora Ltda, Porto Alegre, **2010**.

Keller, T. H.; Pichota, A.; Yin, Z. **A Practical View of Druggability.** *Current Opinion in Structural Biology*, **2006**, 10, 357-361.

Khan, M. T. H.; Sylt, I. **Predictive QSAR Modeling for Successful Predictions of the ADMET Properties of Candidate Drug Molecules.** *Current Drug Discovery Technologies*, **2007**, 4, 141-149.

Leach, A. R. **Molecular Modelling: Principles and Applications.** 2<sup>a</sup> Ed; Pearson Education Limited, Harlow, **2001**.

Lima, L. M. **Química Medicinal Moderna: Desafios e Contribuição Brasileira.** *Química Nova*, **2007**, 30, 1456-1468.

Lipinski, C. A. **Lead and Dru-like Compounds: the Rule-of-five Revolution.** *Drug Discovery Today: Technologies*, **2004**, 1, 337-341.

Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. **Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2001**, 46 (1-3), 3-26.

Magalhães, U. O. **Modelagem Molecular e Avaliação da Relação Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos Físico-Químicos, Farmacocinéticos e Toxicológicos In Silico de Derivados Heterocíclicos com Atividade Leishmanicida.** **2009.** 86 f.. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ.

Melagraki, G.; Afantitis, A.; Sarimveis, H.; Koutentis, P. A.; Markopolus, J.; Igglessi-Markopoulou, O. **Optimization of biaryl piperidine and 4-amino-2-biarylurea MCH1 receptor antagonists using QSAR modeling, classification techniques and virtual screening.** *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **2007**, 21, 251-267.

Melo, E. B.; Ferreira, M. M. C. **Multivariate QSAR study of 4,5-dihydroxypyrimidine carboxamides as HIV-1 integrase inhibitors.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**, 44, 3577-3583.

Milne, G. M. **Pharmaceutical productivity – The imperative for new paradigms.** *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, **2003**, 38, 383-396

Miyamoto T.; Yamamoto I. **Glutathione Conjugates as the Activated Form of Chalcones for Glutathione S-Transferase Inhibition.** *Journal Pesticide Science*, **1994**, 19, 53-58.

Passamani, F. **Modelagem Molecular e Avaliação da Relação Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos Físico-químico e Toxicológicos In Silico de Derivados Heterocíclicos com Atividade Antiviral.** **2009**. 104 f.. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ.

Patrick, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry.** 2<sup>a</sup> Ed, Oxford: New York, 2002.

Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K. **Farmacologia.** 5<sup>a</sup> Ed; Elsevier, Rio de Janeiro, **2004**.

Rawlins, M. D. **Cutting the Cost of Drug Development?.** *National Publishing Group*, **2004**, 3, 360-364.

Roy, P. P.; Leonard, J. T.; Roy, K. **Exploring the impact of size of training sets for the development of predictive QSAR models.** *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **2008**, 90, 31-42.

Roy, P. P.; Roy, K. **On some aspects of variable selection for partial least squares regression models.** *QSAR & Combinatorial Science*, **2008**, 27, 302-313.

Sheenan, D.; Meade, G.; Foley, V. M.; Dowd, C. A. **Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily.** *Biochemistry Journal*, 2001, 360, 1-16.

Stouch, T. R.; Kenyon, J. R.; Johnson, S. R.; Chen, X. Q., Doweiko, A., Li, Y. **In Silico ADME/Tox: Why Models Fail.** *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **2003**, 17, 83-92.

Tetko, I. V.; Bruneau, P.; Mewes, H.; Rohrer, D. C.; Poda, G. I. **Can We Estimate the Accuracy of ADMET Predictions?** *Drug Discovery Today*, **2006**, 11, 700-707.

Thomas, G. **Medicinal Chemistry: An Introduction.** 2<sup>a</sup> Ed; John Wiley & Sons Ltd, Chichester, **2007**.

Tropsha, A.; Gramatica, P.; Gombar, V. K. **The importance of being earnest: validation is the absolute essential for successful application and interpretation of QSPR models.** *QSAR & Combinatorial Science*, **2003**, 22, 69-77.

Turkar, S. S.; Rodge, A. H.; Hatnapure, G. D.; Keche, A. P.; Gaikwad, G. S. **Synthesis and anti-bacterial, anti-fungal activity of some novel chalcone derivatives.** *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **2010**, 2 (5), 348-355.

Van de Waterbeemd, H.; Gifford, E. **ADMET *in silico* Modeling: Towards Prediction Paradise?** *Nature Reviews Drug Discovery*, **2003**, 2 (3), 192-204.

Veber, D. F.; Johnson, R.S.; Cheng, H. Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. **Molecular Properties that influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates.** *Journal of Medicinal Chemistry*, **2002**, v. 45, 2615-2623.

Walters, W.P.; Murcko, M.A. **Prediction of drug-likeness.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2002**, 4 (3), 255–271.

Wang, J.; Krudy, G.; Hou, T.; Holland, G.; Xu, X. **Development of Reliable Aqueous Solubility Models and Their Application in Drug-Like Analysis.** *Journal of Chemical Information and Modeling*, **2007**, 47, 1395-1404.

Wermuth, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry.** 2<sup>a</sup> Ed., Academic Press: London, **2003**.

Zhang, S.; Wei, L.; Bastow, K.; Zheng, W.; Brossi, A.; Lee, K.; Tropsha, A. **Antitumor agents 252. Application of validated QSAR models to database mining: discovery of novel tylophorine derivatives as potential anticancer agents.** *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **2007**, 21, 97-112.

Yadav, A. K.; Desai, P. R.; Rai, M. N.; Kaur, R.; Ganesan, K.; Bachhawat, A. K. **Glutathione biosynthesis in the yeast pathogens *Candida glabrata* and *Candida albicans*: essential in *C. glabrata* and essential for virulence in *C. albicans*.** *Microbiology*, **2011**, 157, 484-495.

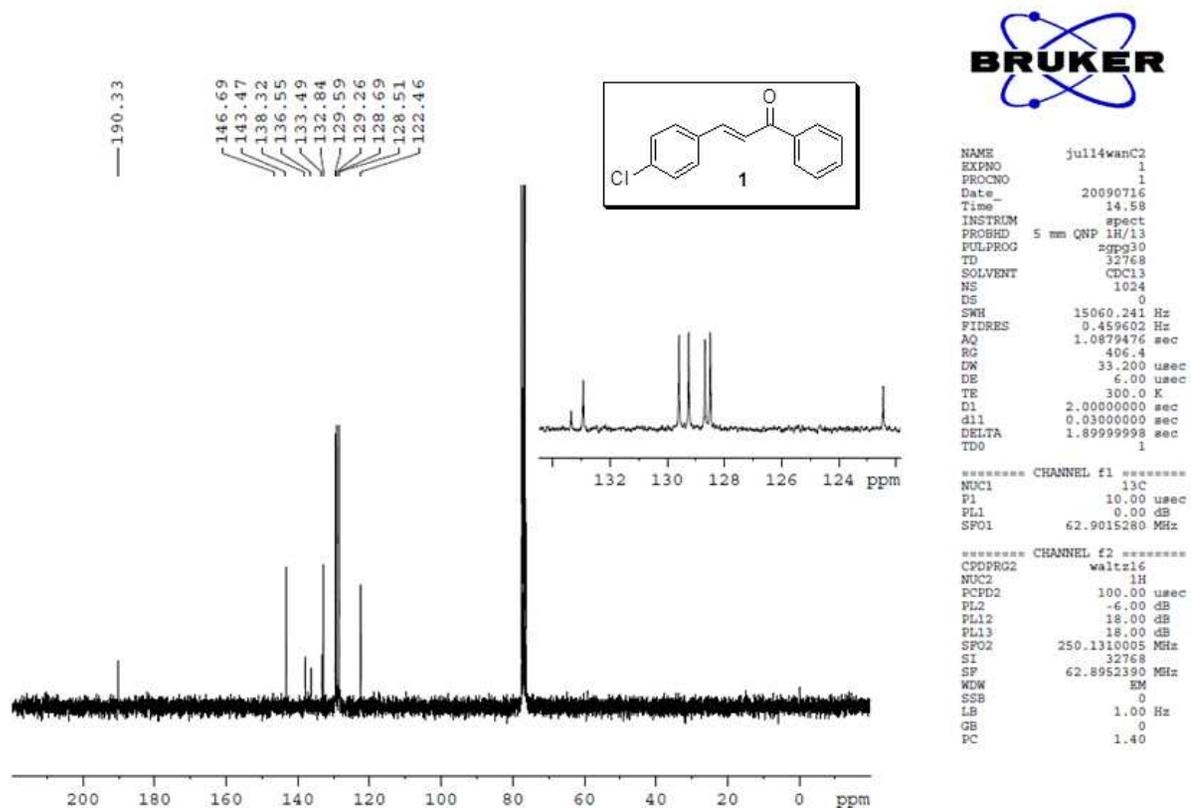


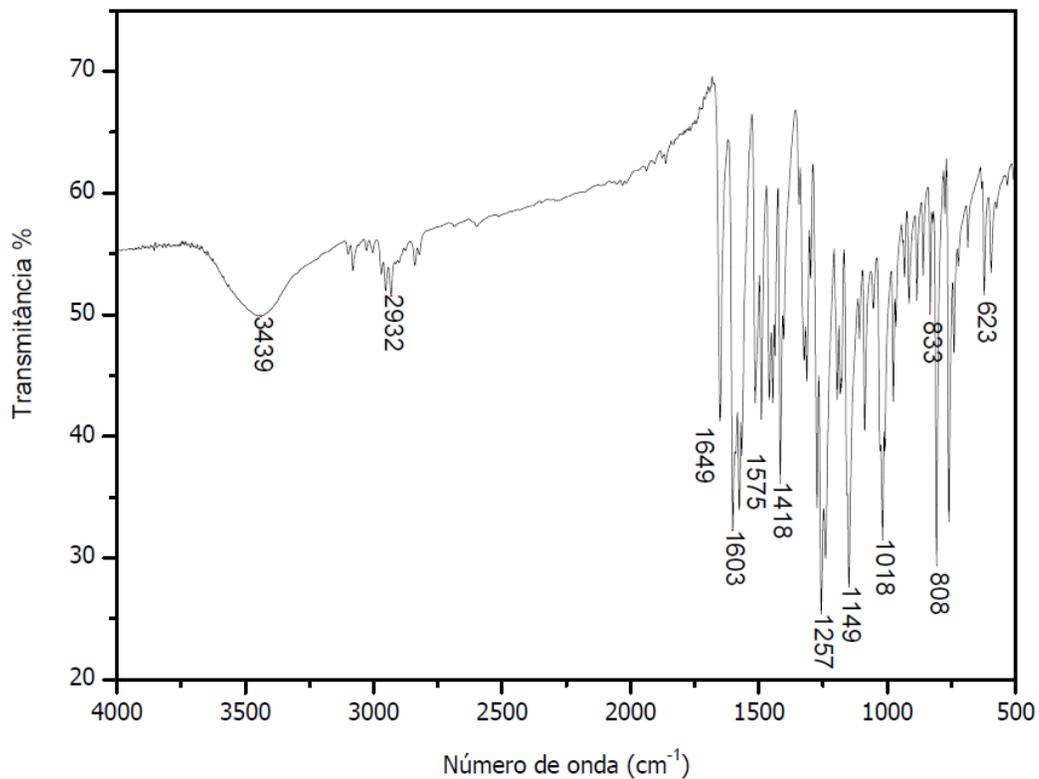
# **ANEXO**

## **Espectros das Substâncias Sintetizadas**

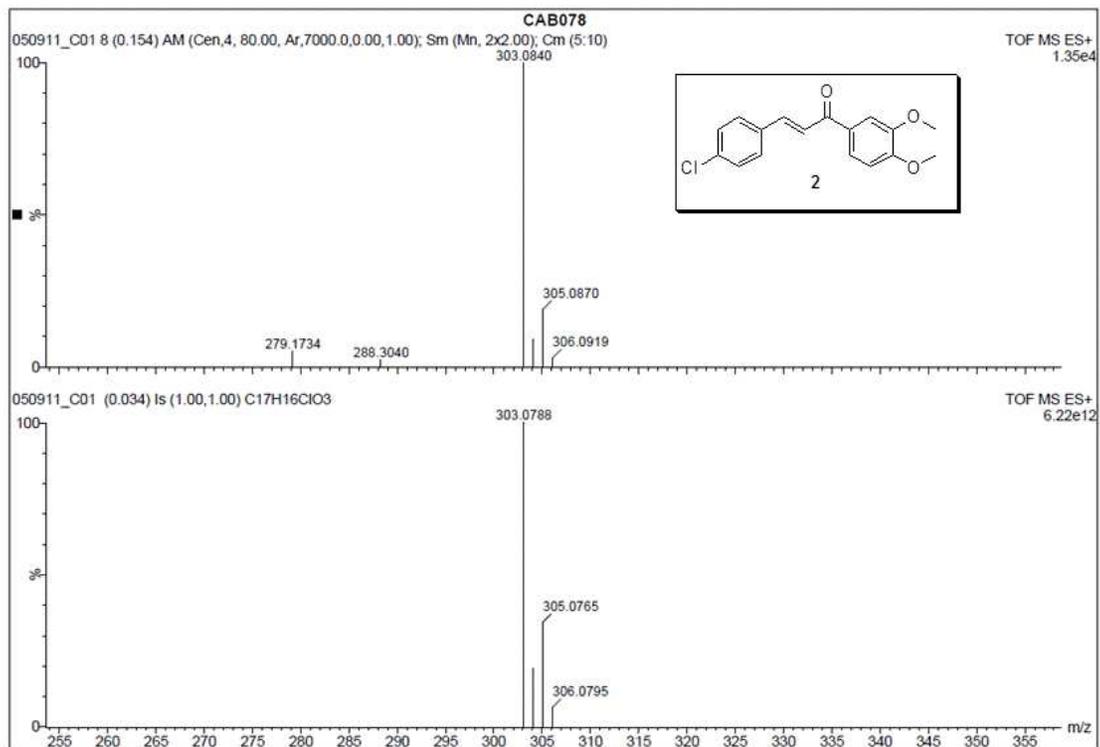




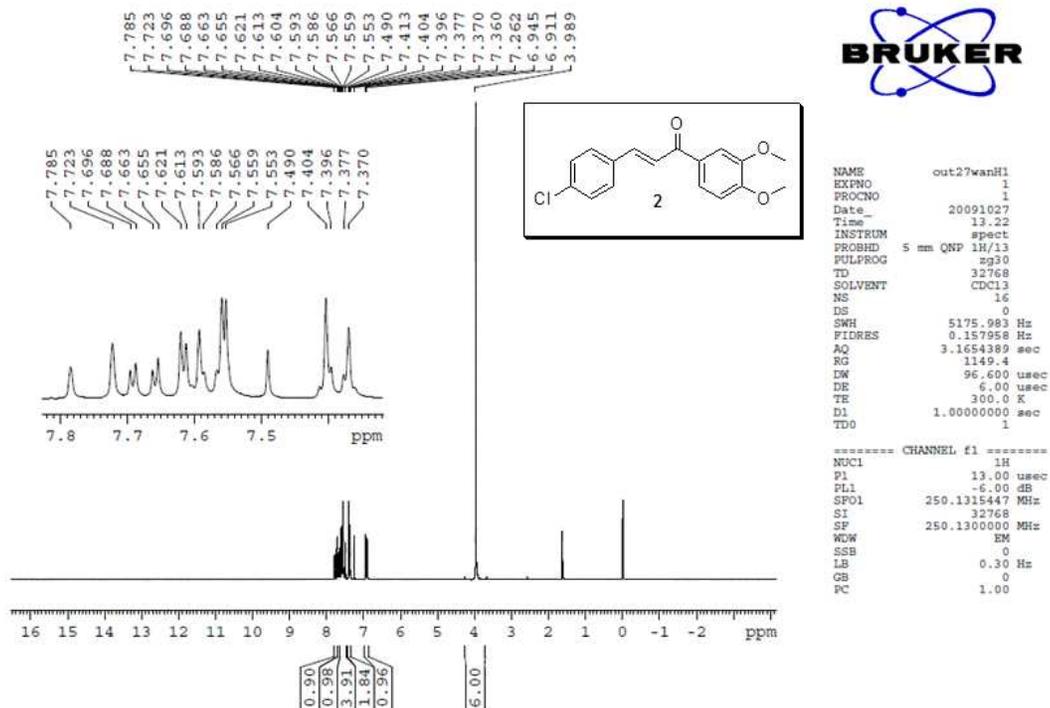
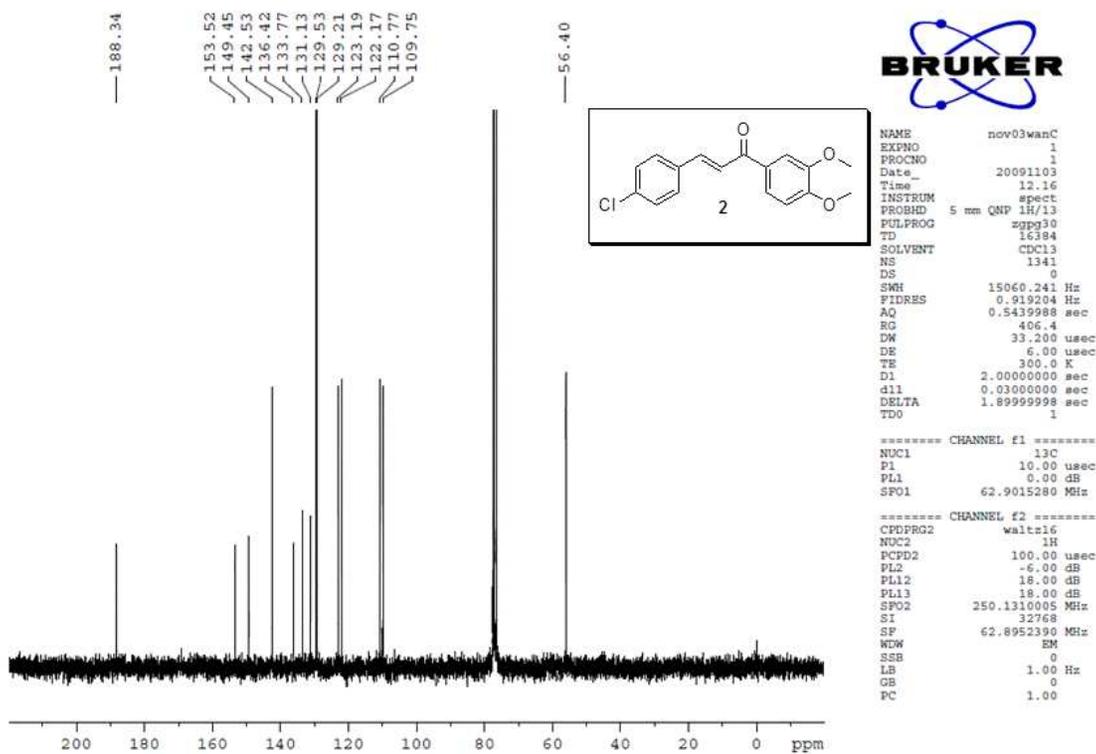
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 62,5 MHz) da Substância 1

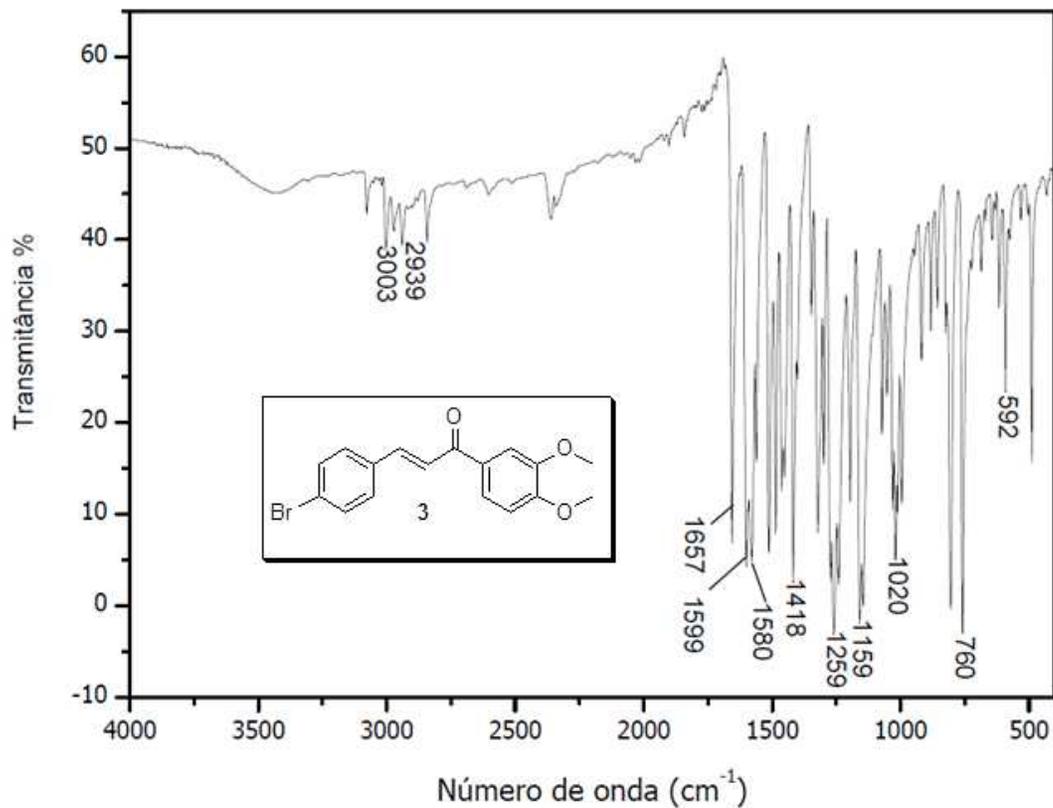
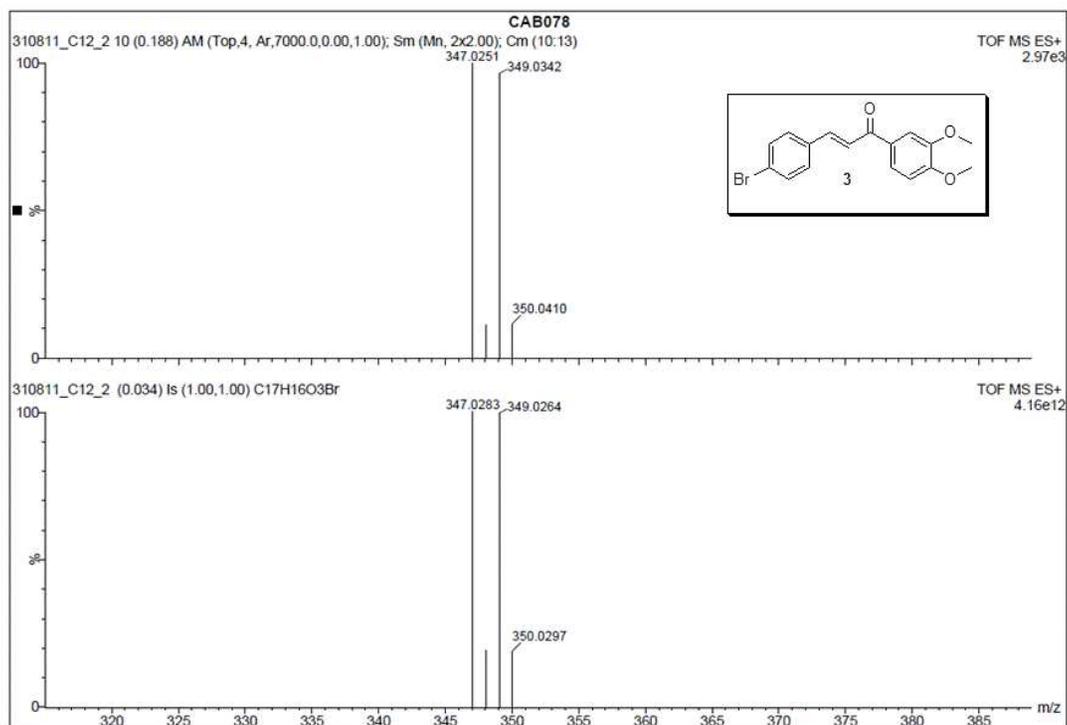


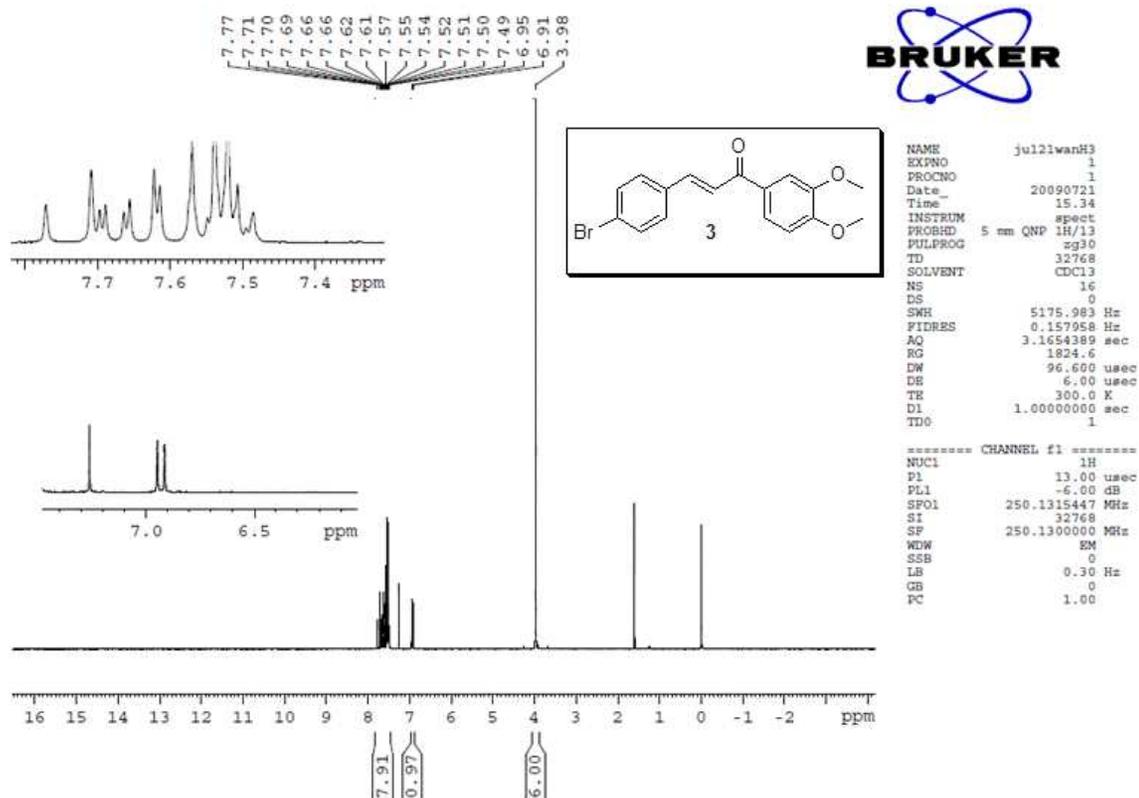
Espectro no Infravermelho da Substância 2

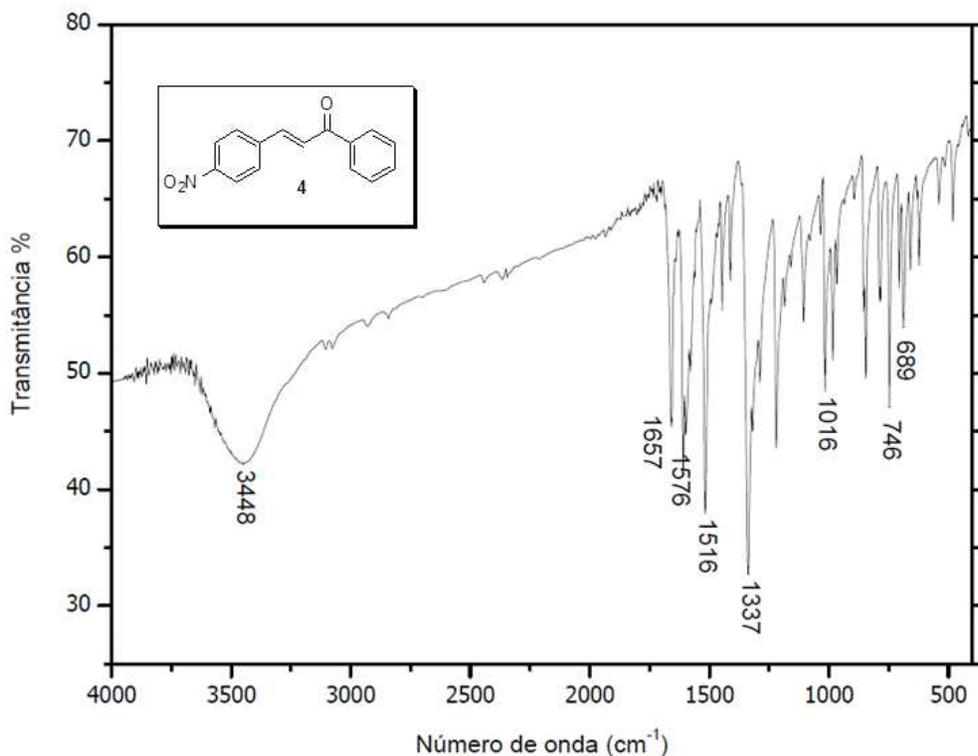


EMAR (ESI) da Substância 2

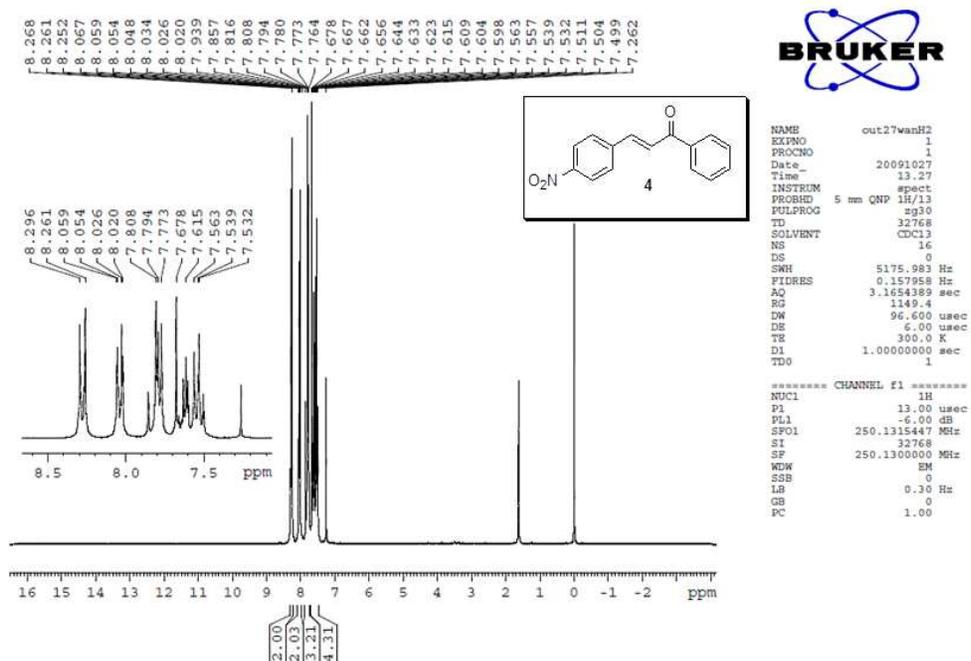
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 250MHz) da Substância 2Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 62,5 MHz) da Substância 2

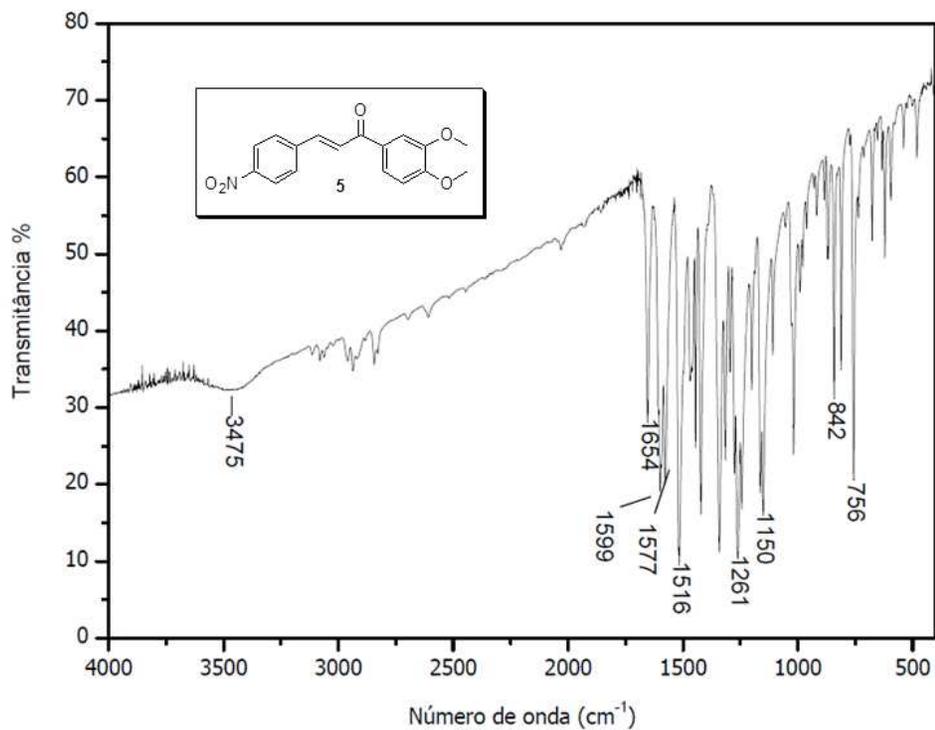
Espectro no Infravermelho da Substância **3**EMAR (ESI) da Substância **3**

Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 250MHz) da Substância **3**

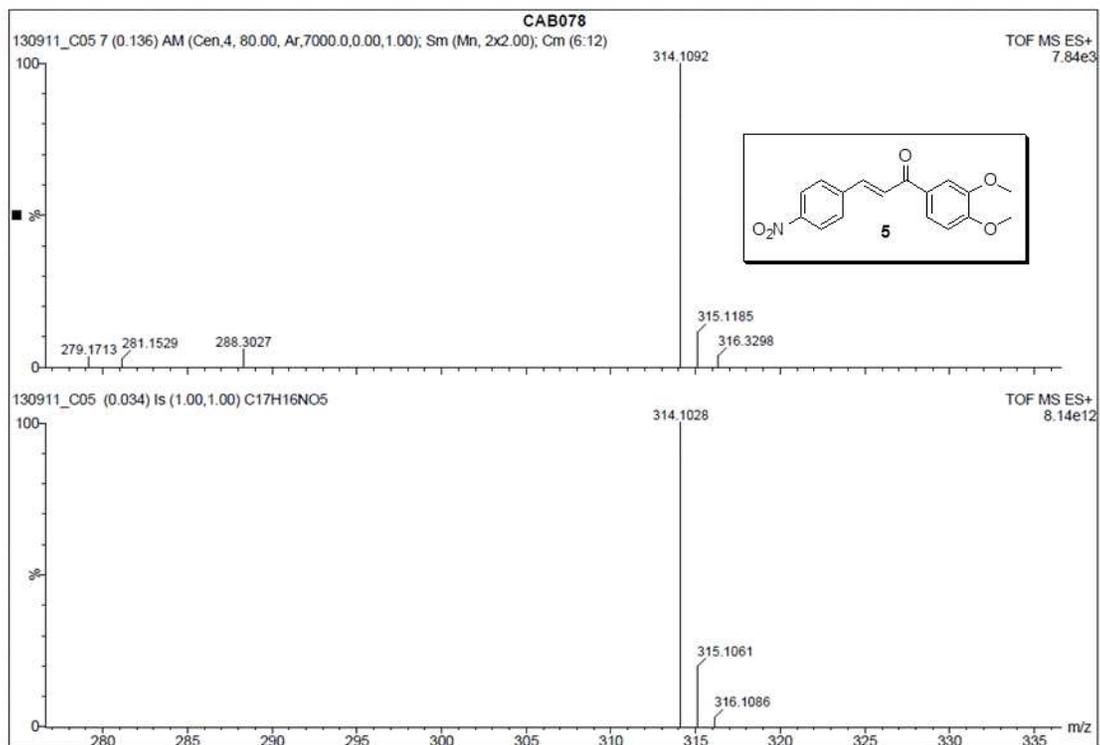


Espectro no Infravermelho da Substância 4

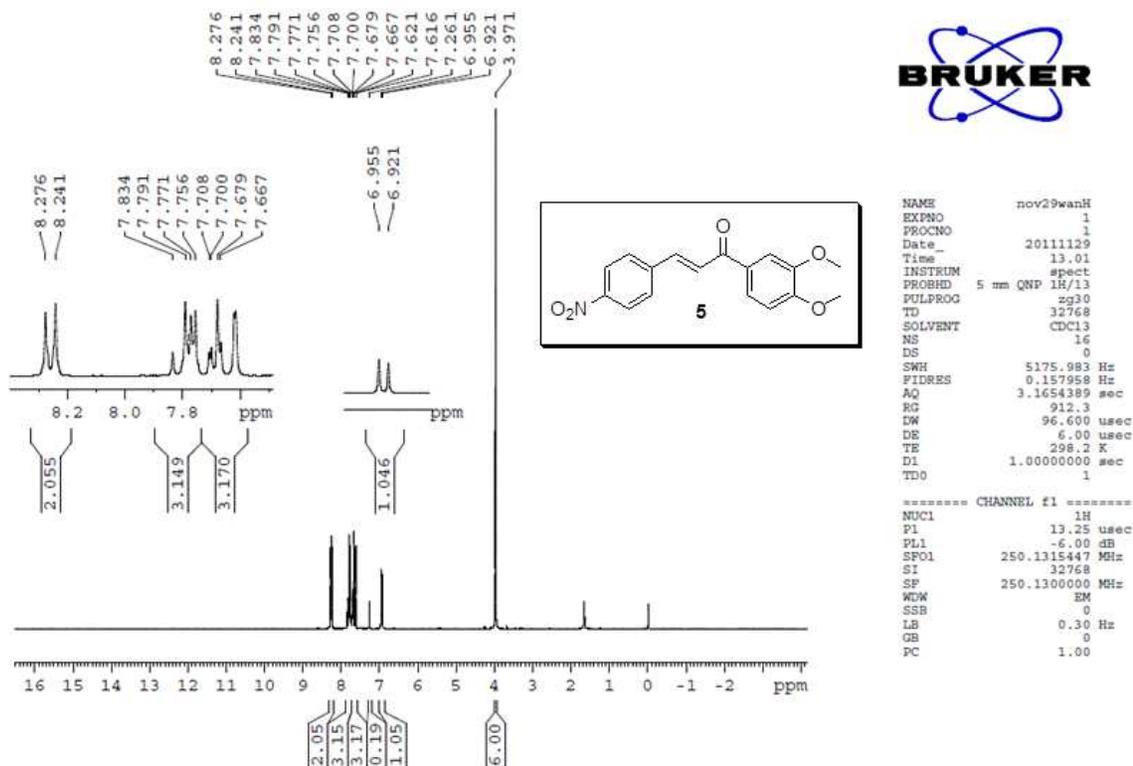
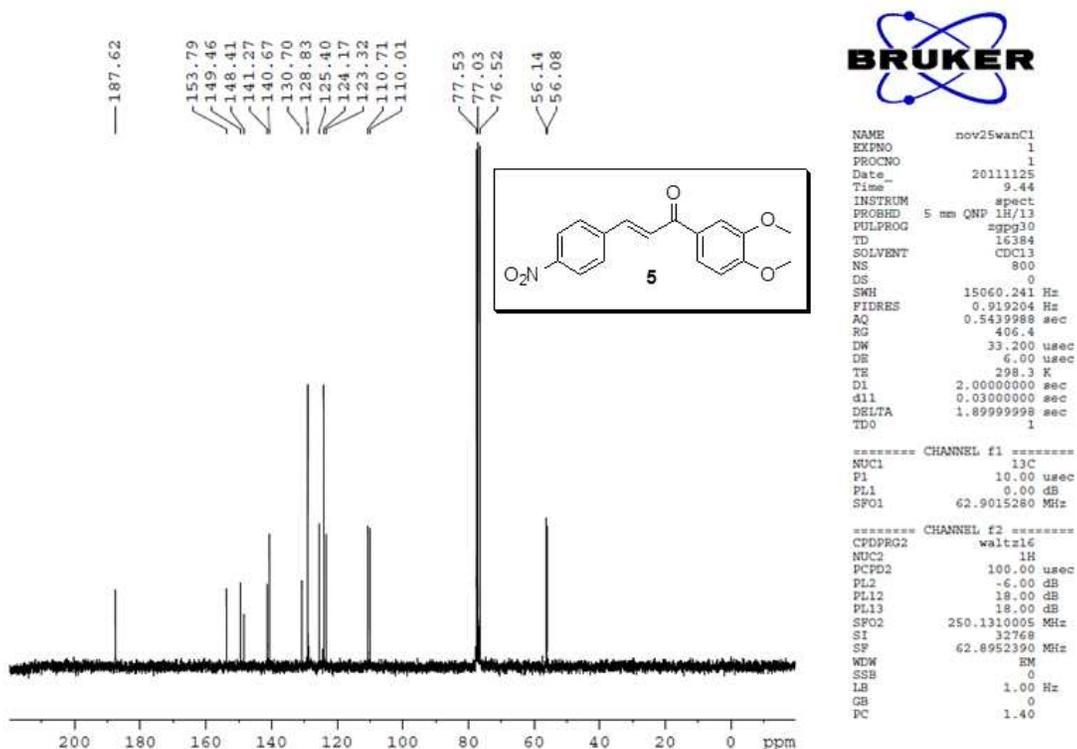


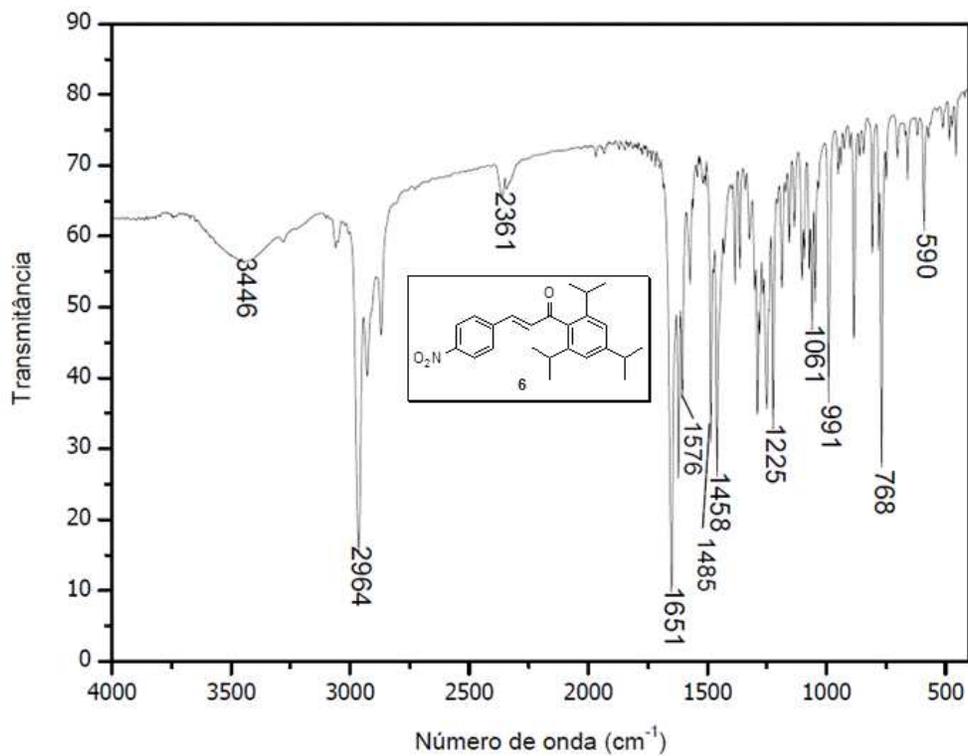


Espectro no Infravermelho da Substância 5

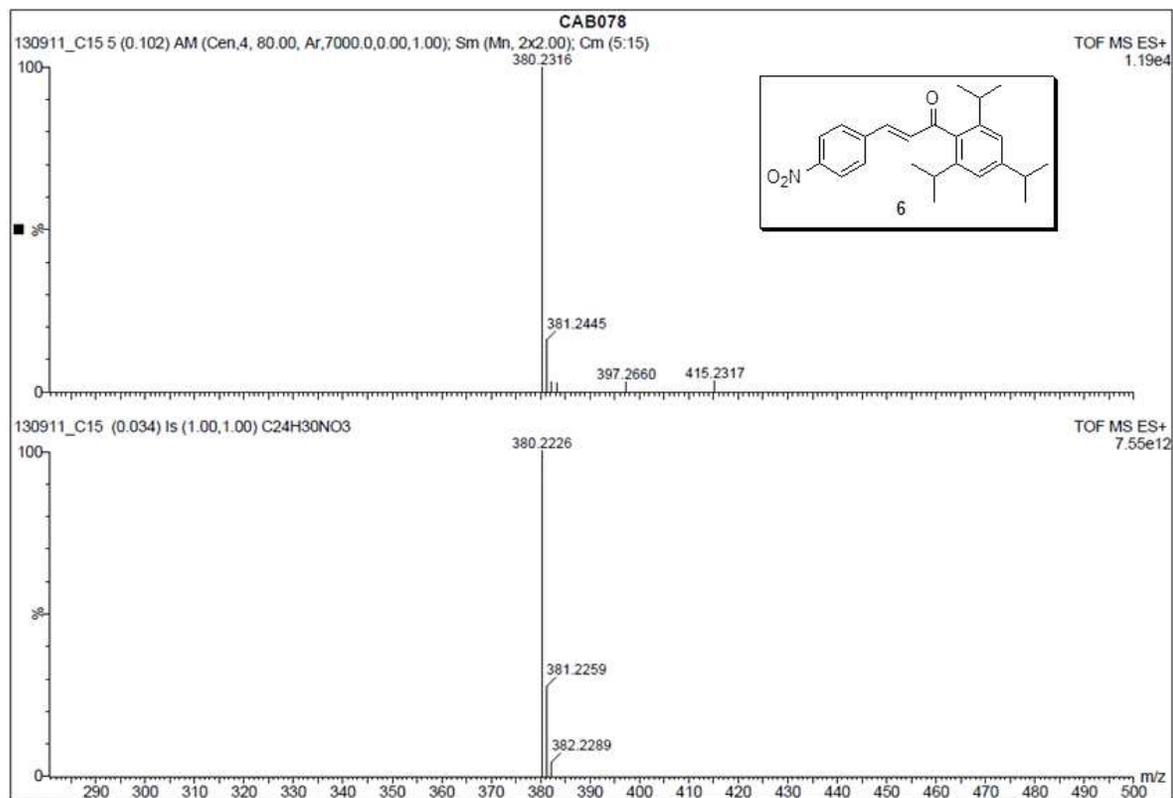


EMAR (ESI) da Substância 5

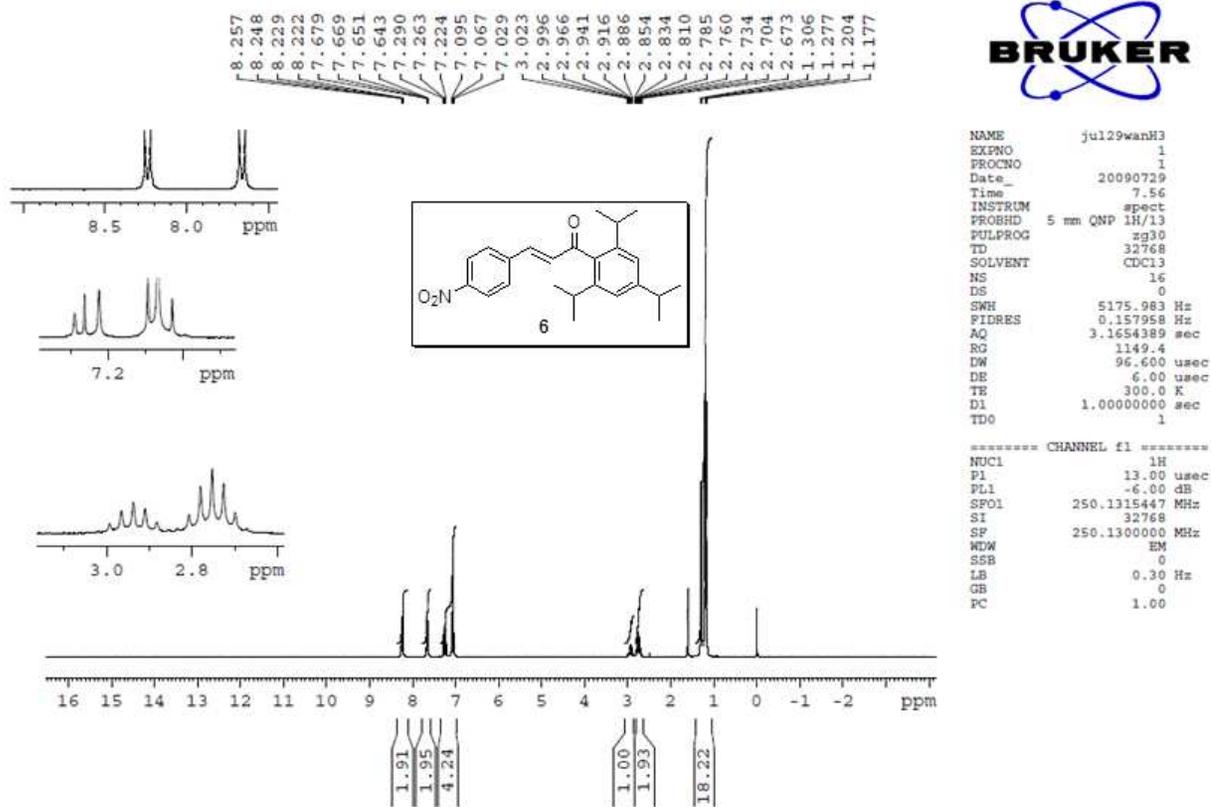
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 250MHz) da Substância 5Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 62,5 MHz) da Substância 5

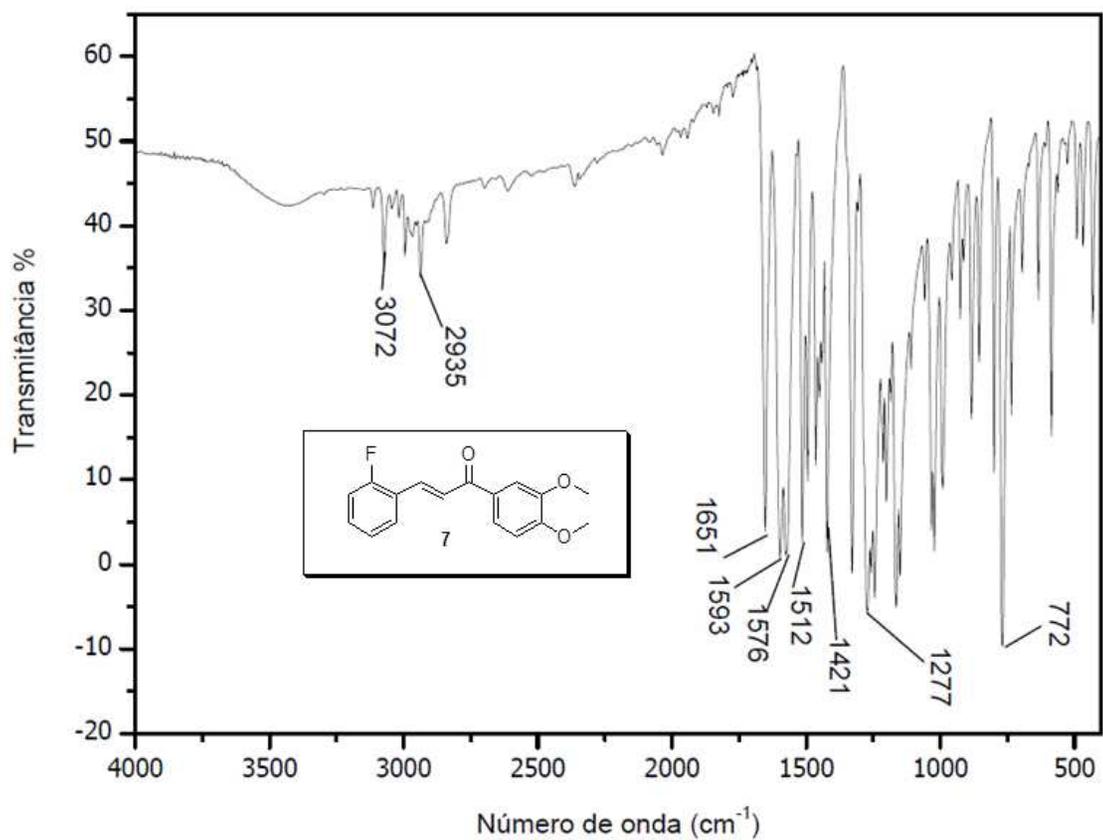


Espectro no Infravermelho da Substância 6

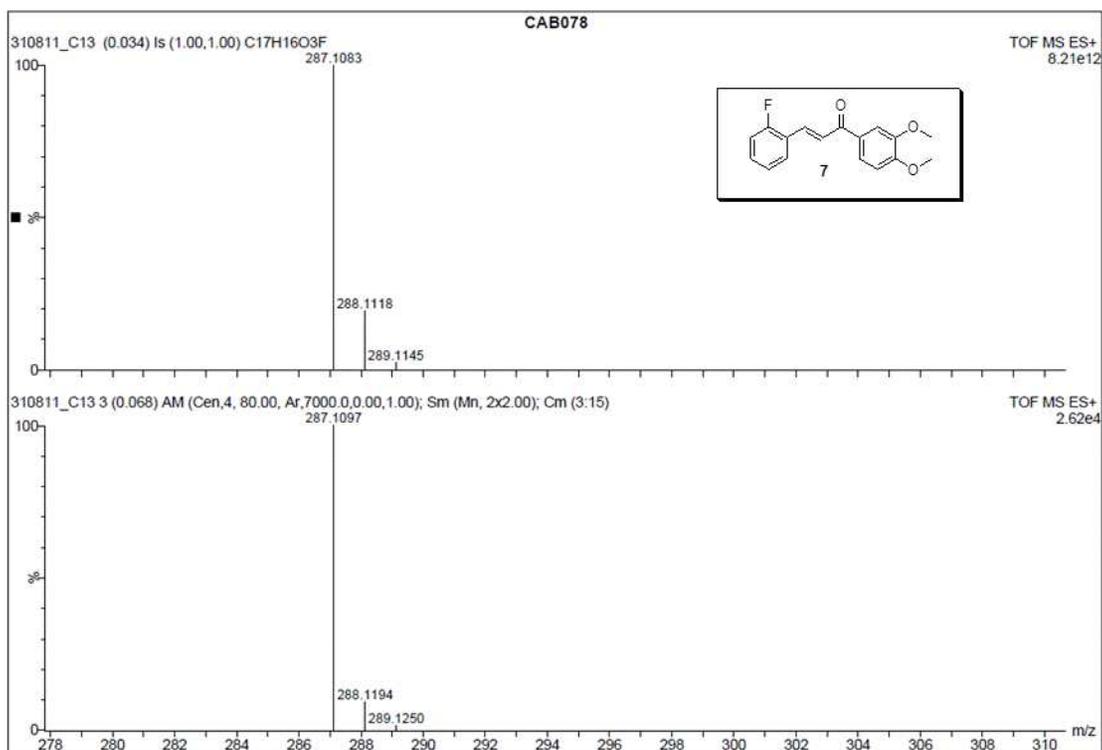


EMAR (ESI) da Substância 6

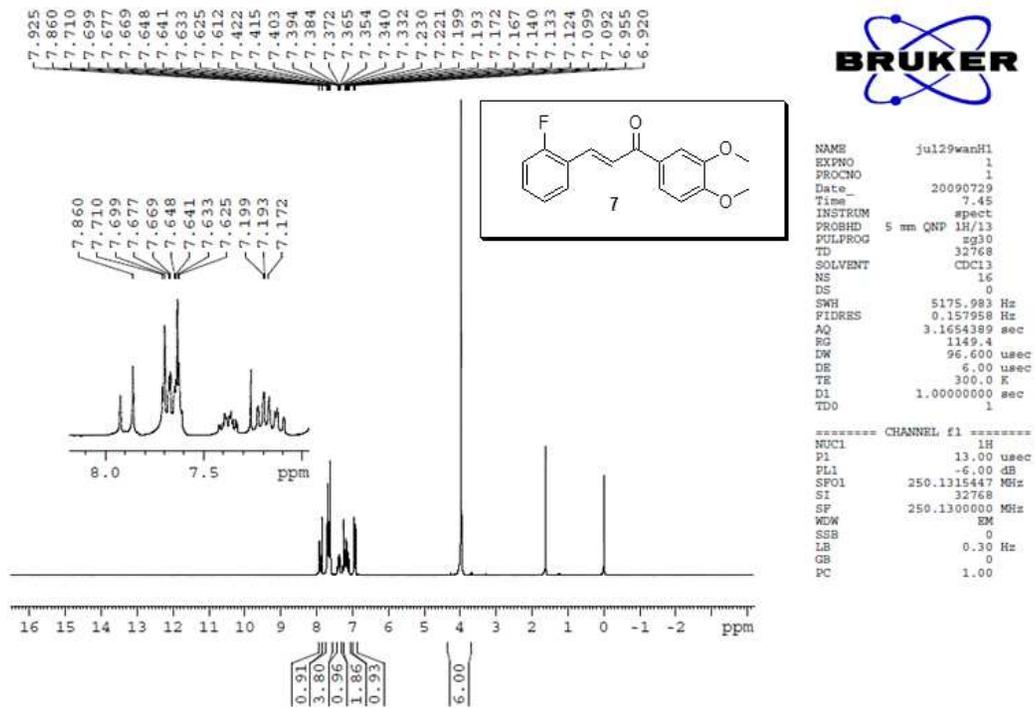
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 250MHz) da Substância 6

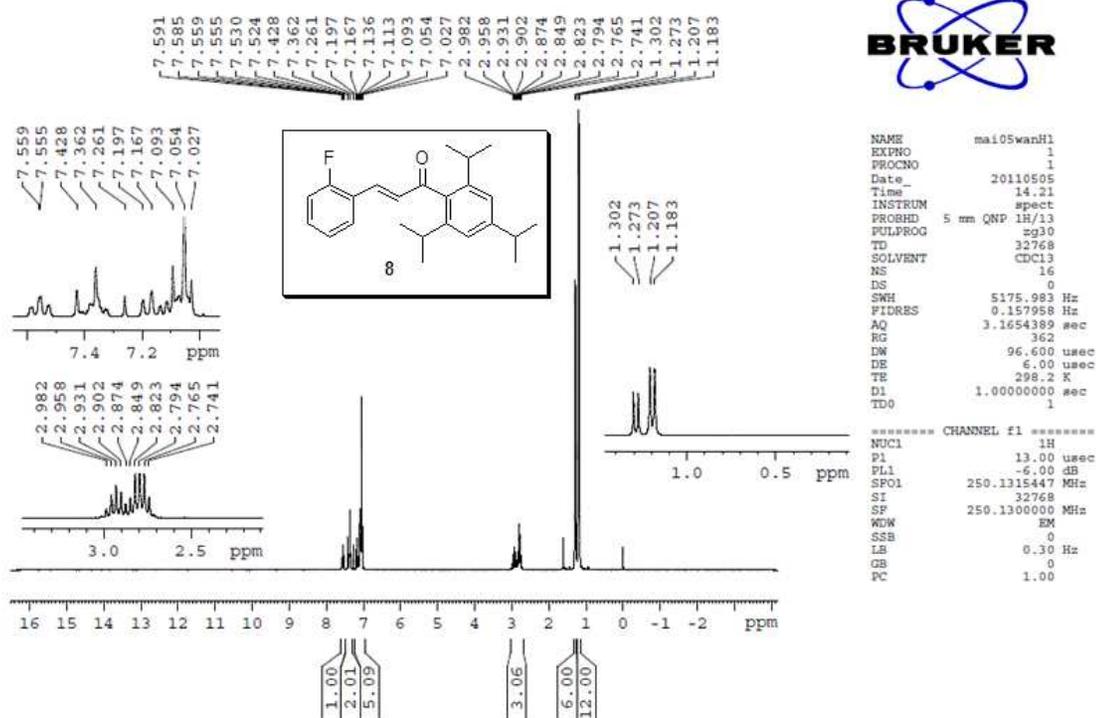
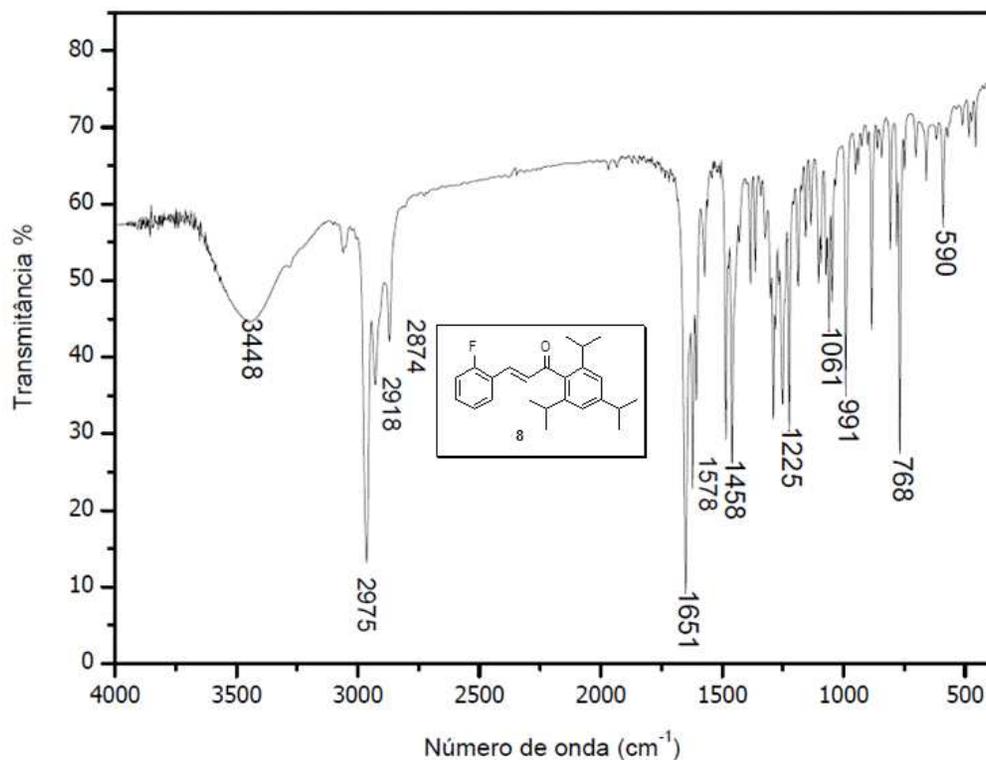


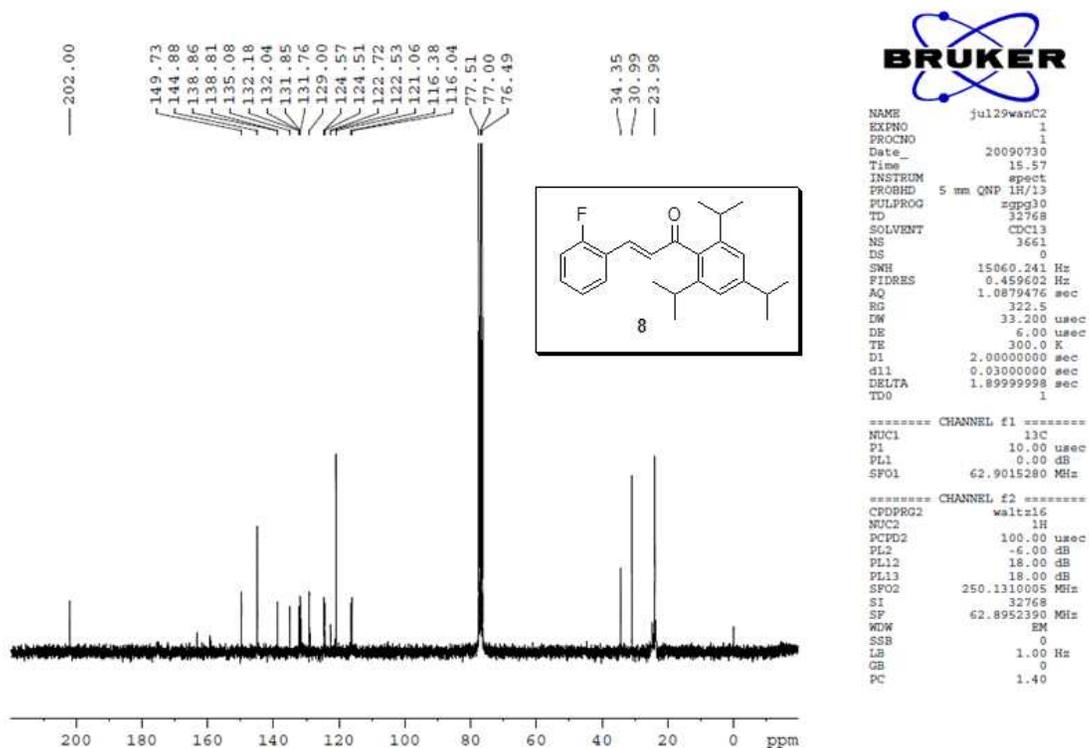
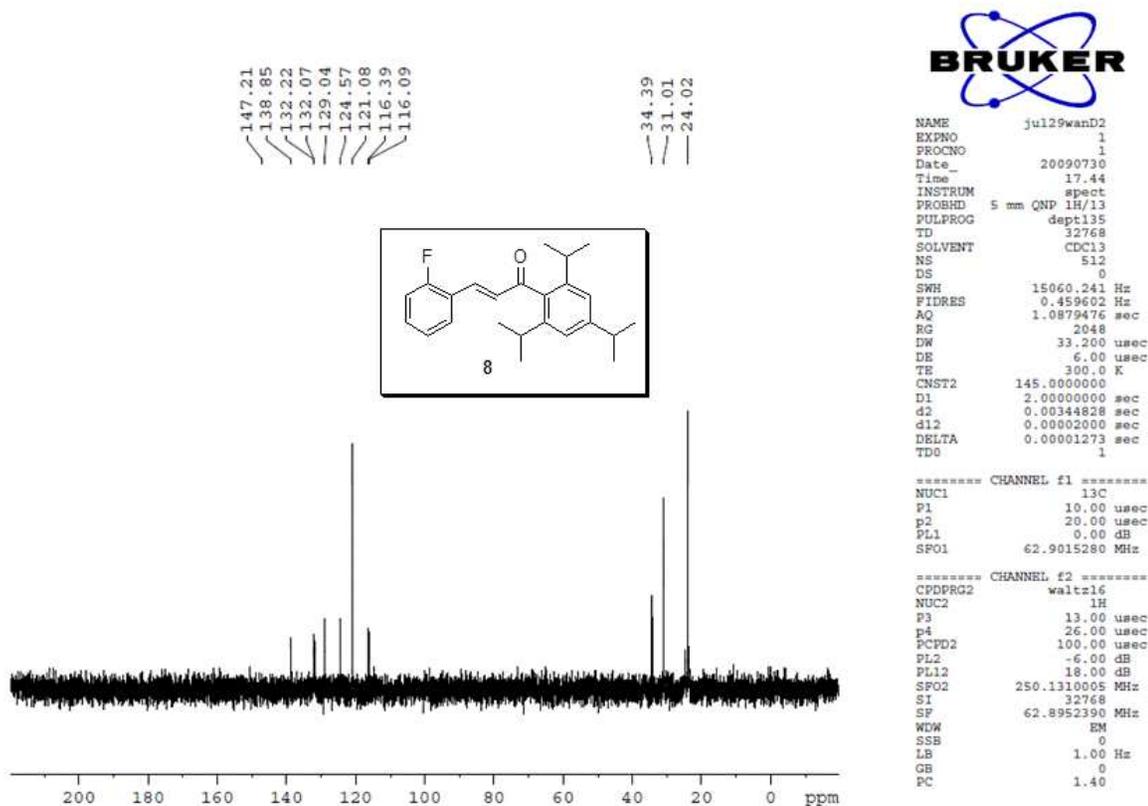
Espectro no Infravermelho da Substância 7



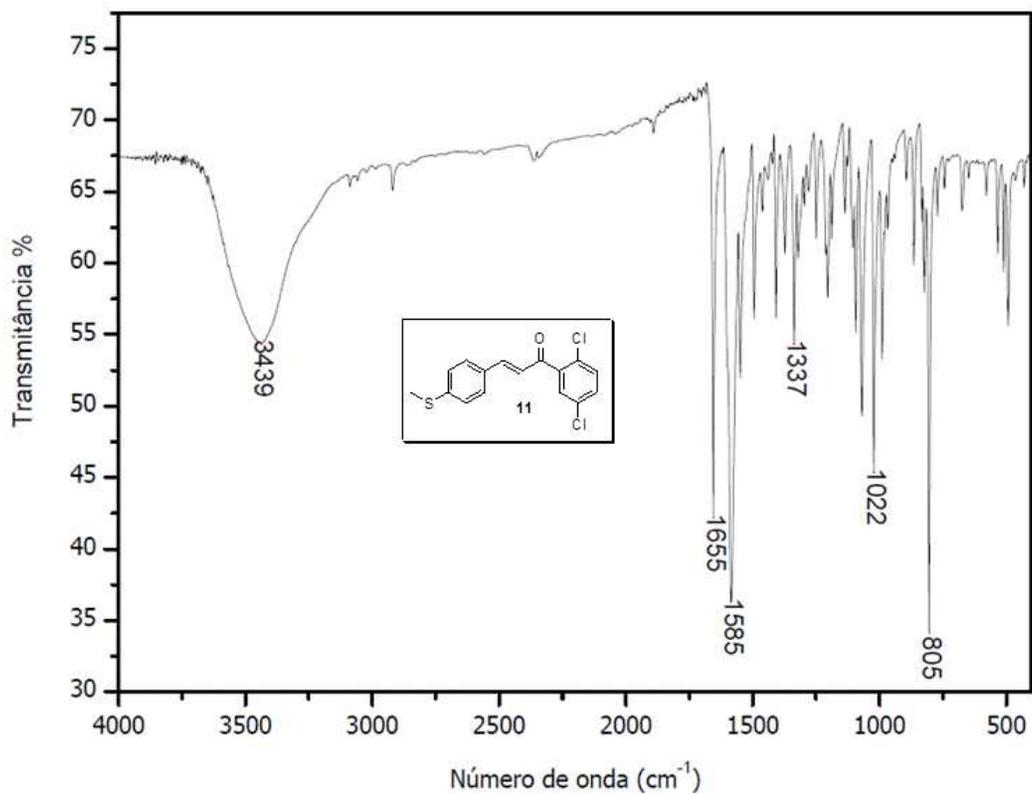
EMAR (ESI) da Substância 7

Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 250MHz) da Substância 7

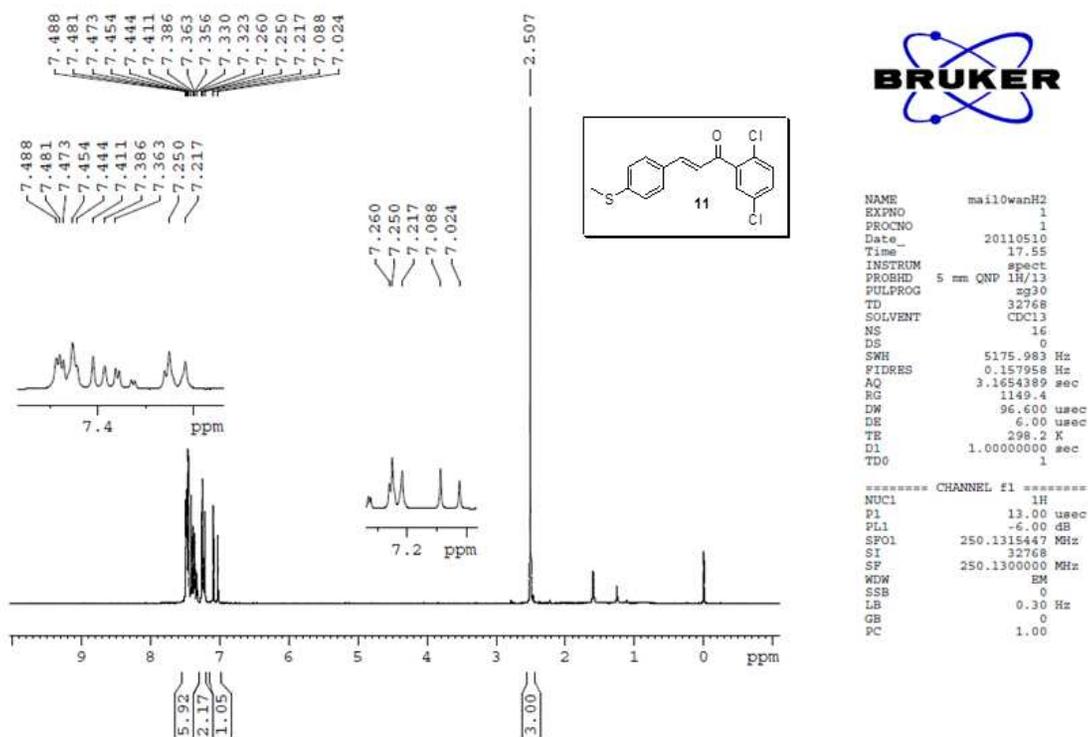


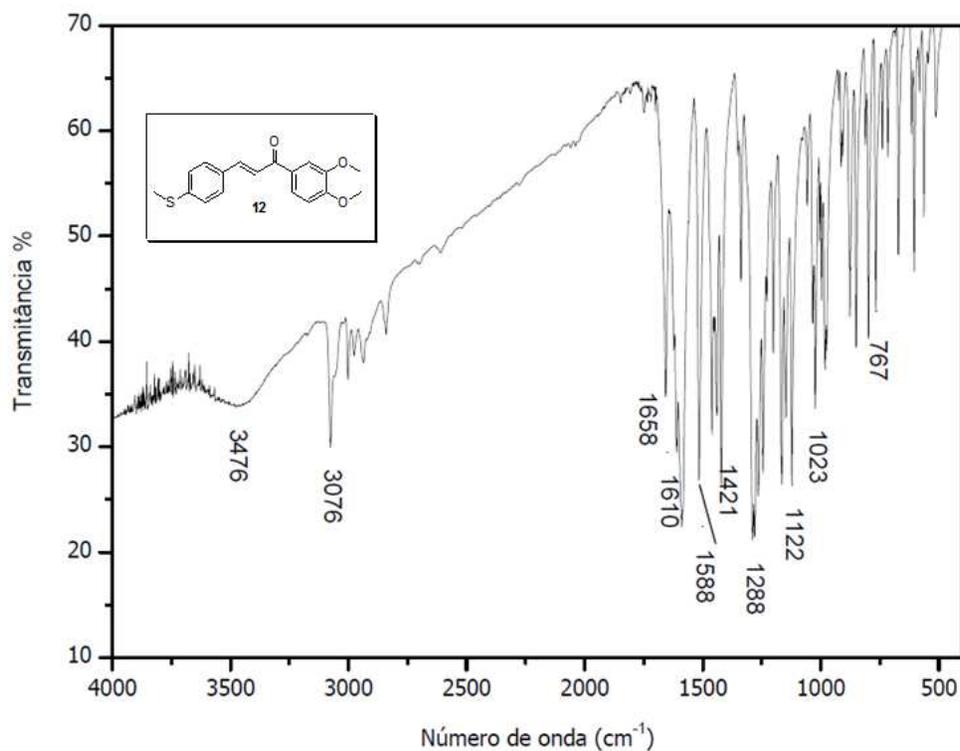
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 62,5 MHz) da Substância 8Espectro de RMN-<sup>13</sup>C – DEPT 90 (CDCl<sub>3</sub>, 62,5 MHz) da Substância 8



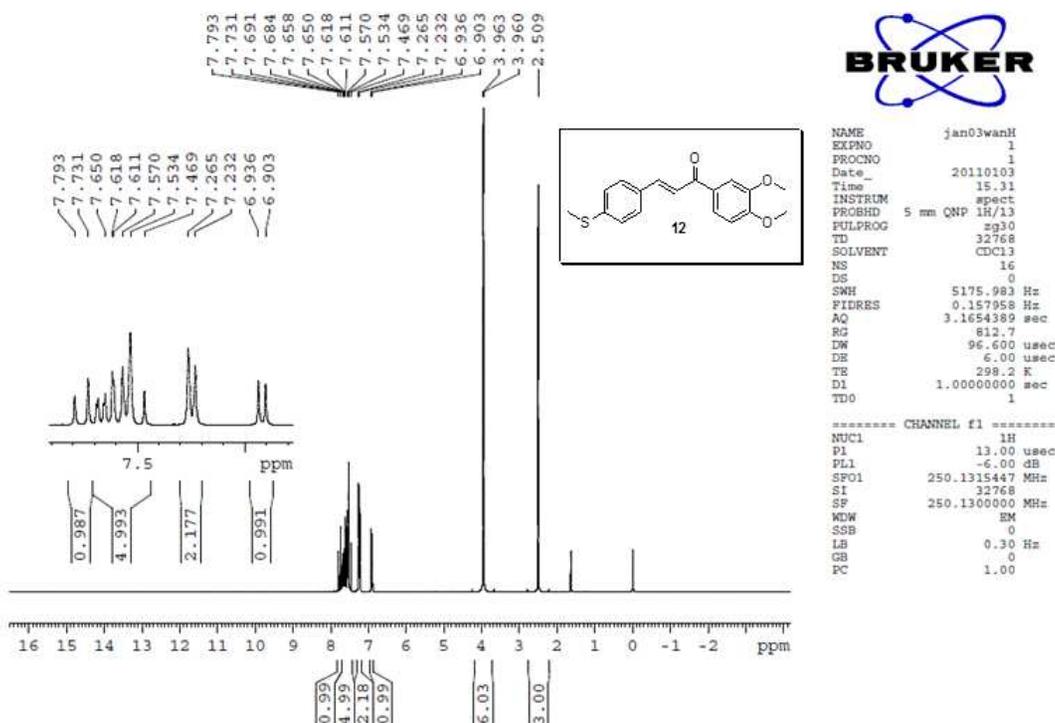


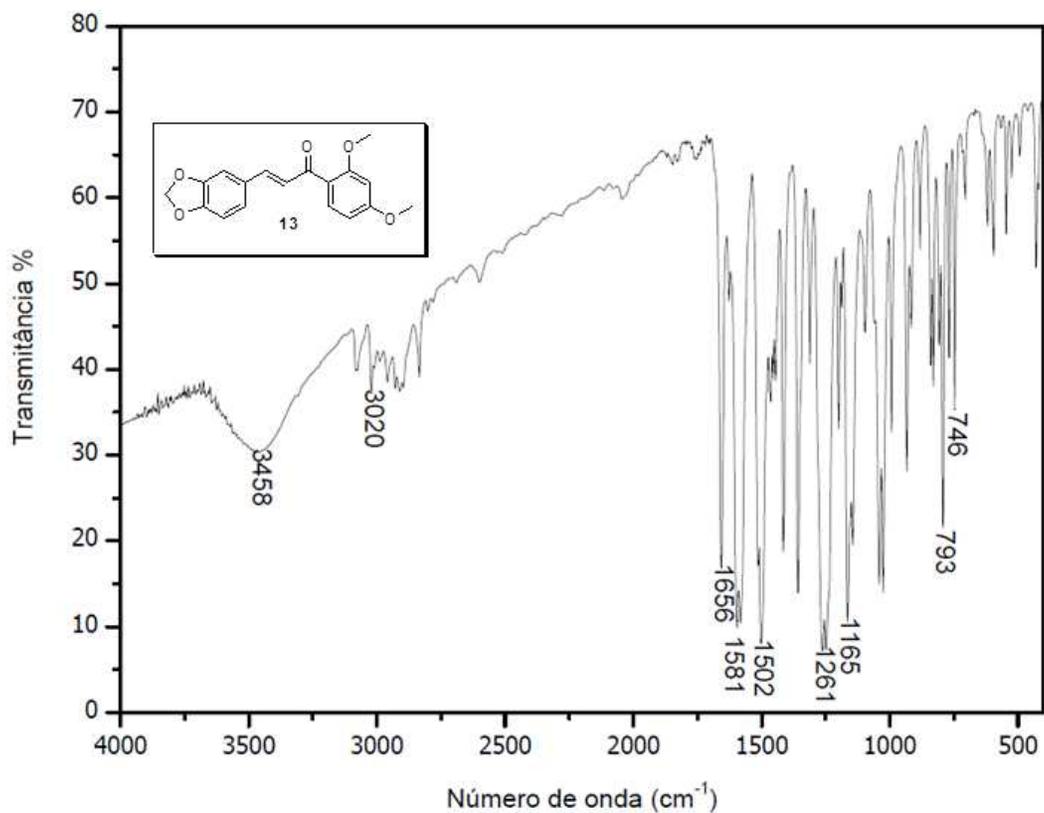
Espectro no Infravermelho da Substância 11

Espectro de RMN-<sup>1</sup>H ( $\text{CDCl}_3$ , 250MHz) da Substância 11

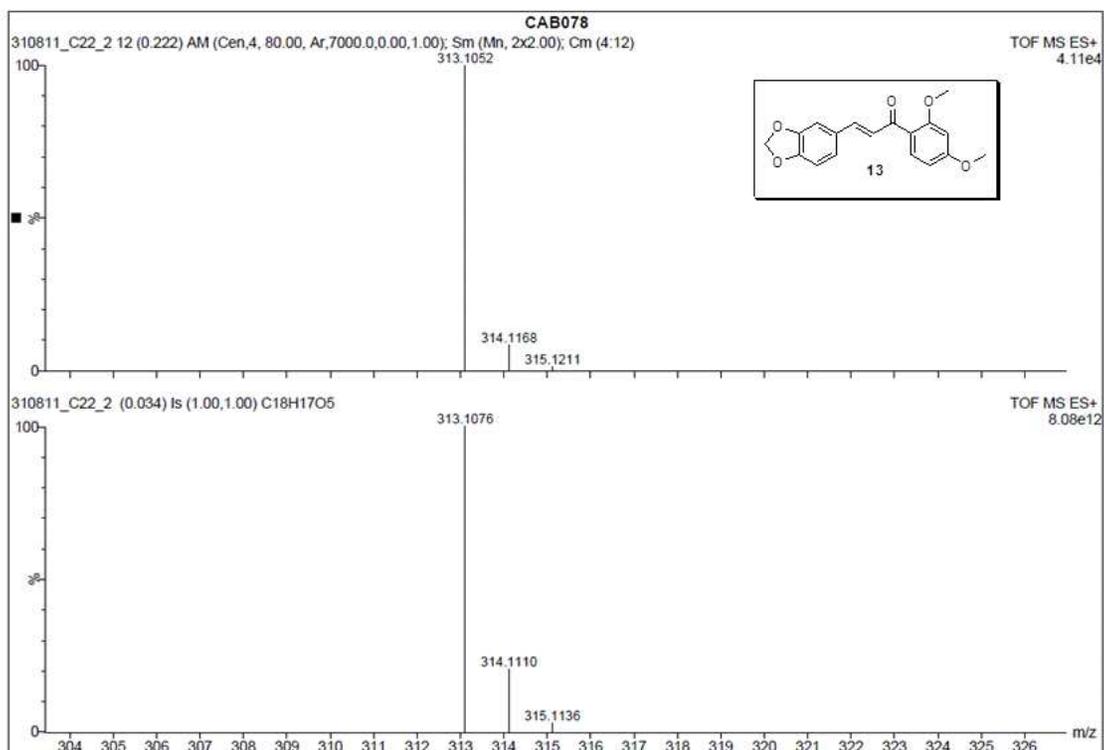


Espectro no Infravermelho da Substância 12

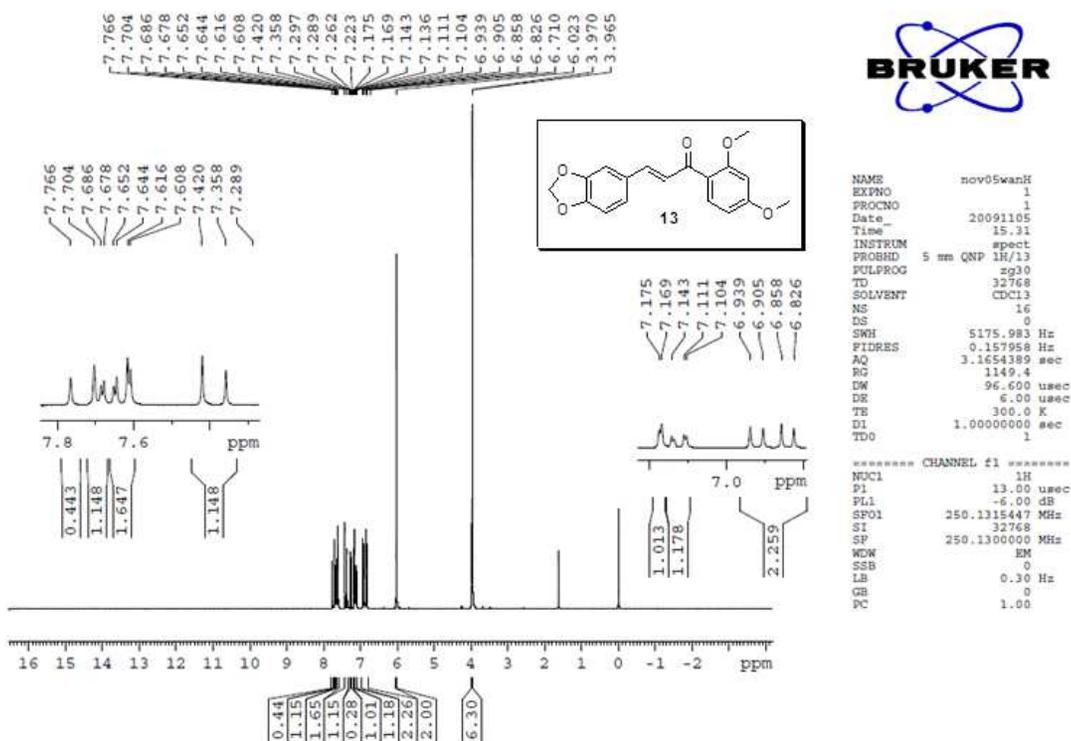
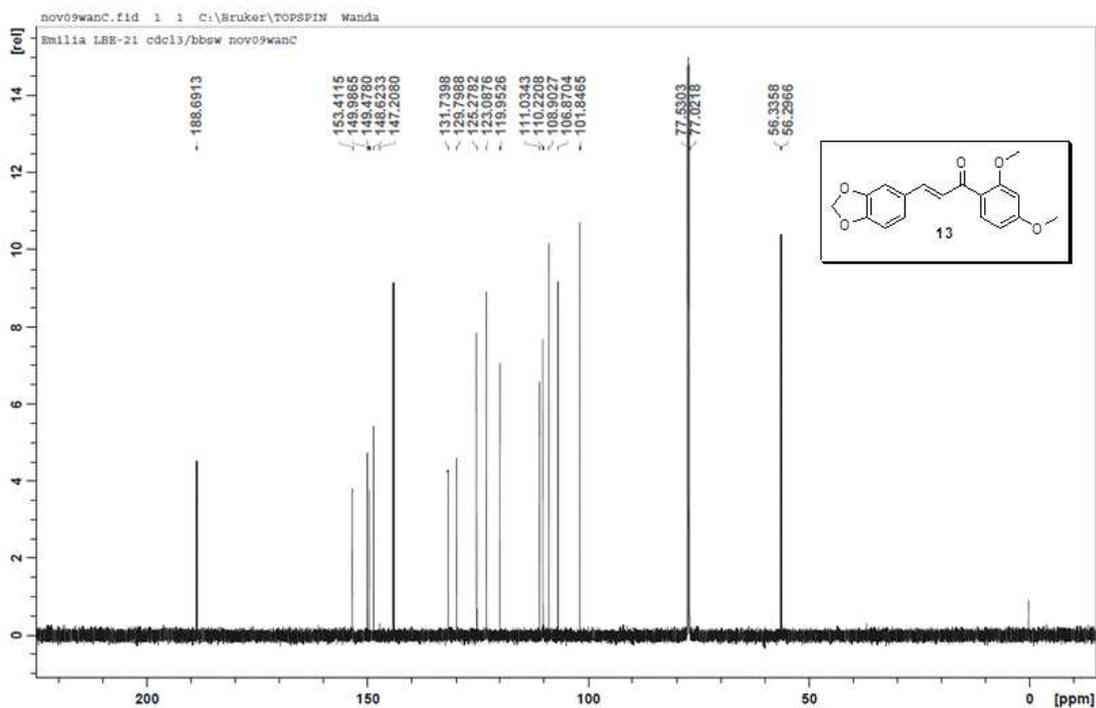
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 250MHz) da Substância 12

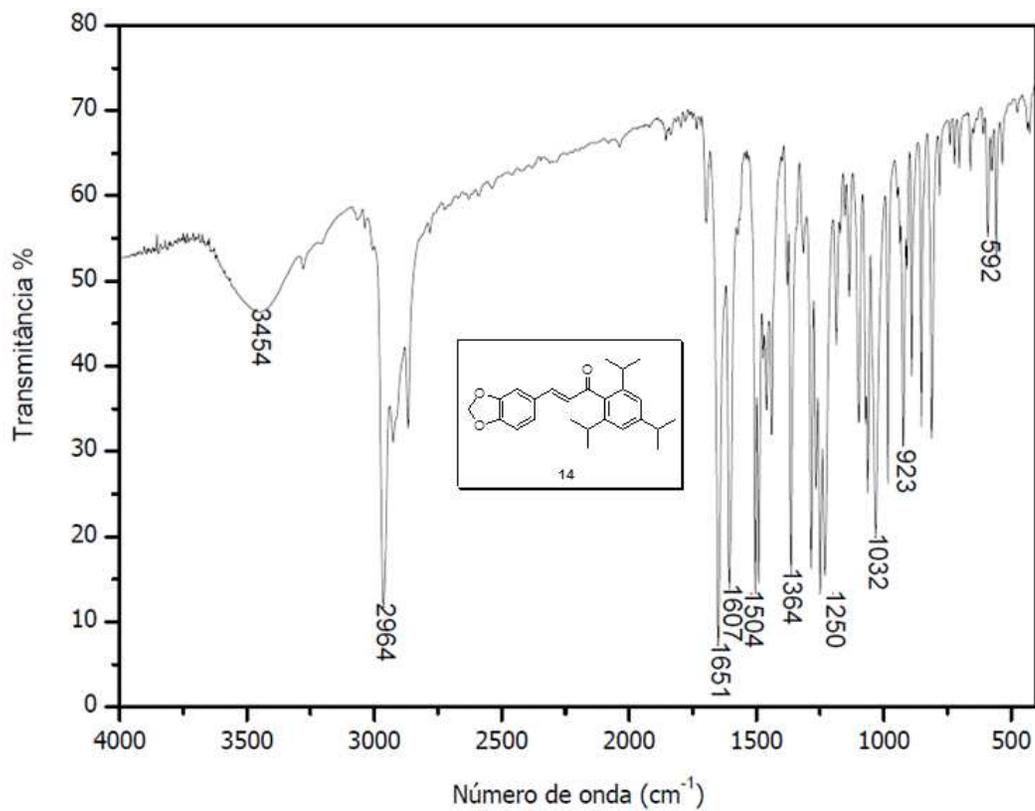


Espectro no Infravermelho da Substância 13

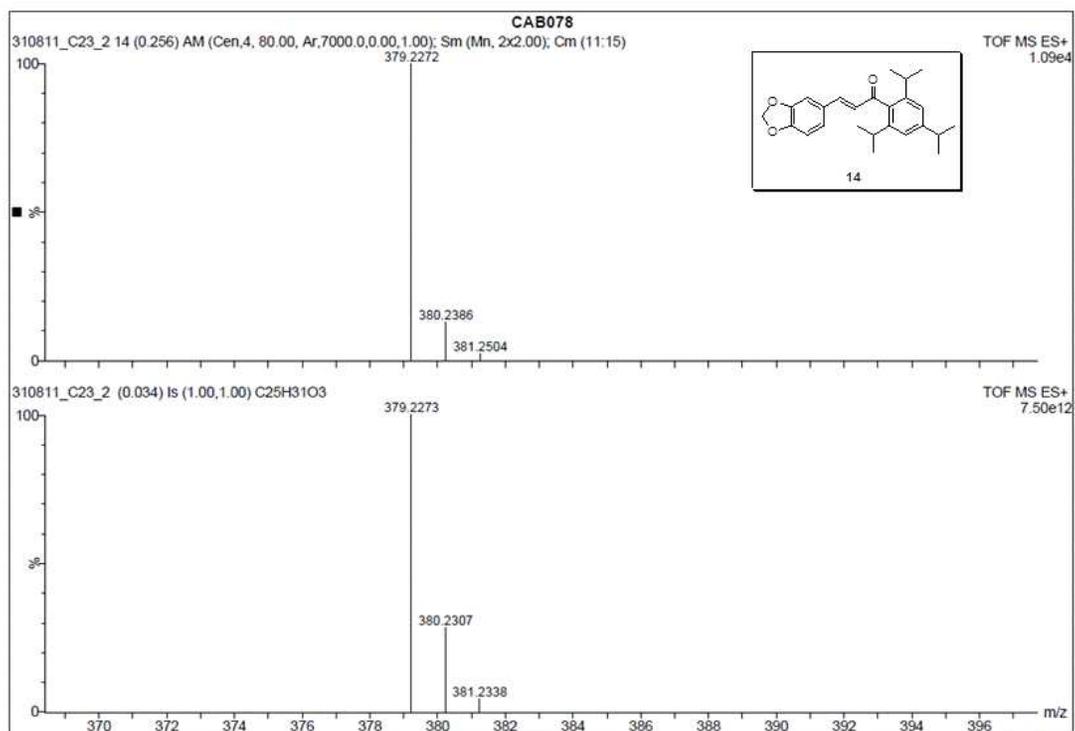


EMAR (ESI) da Substância 13

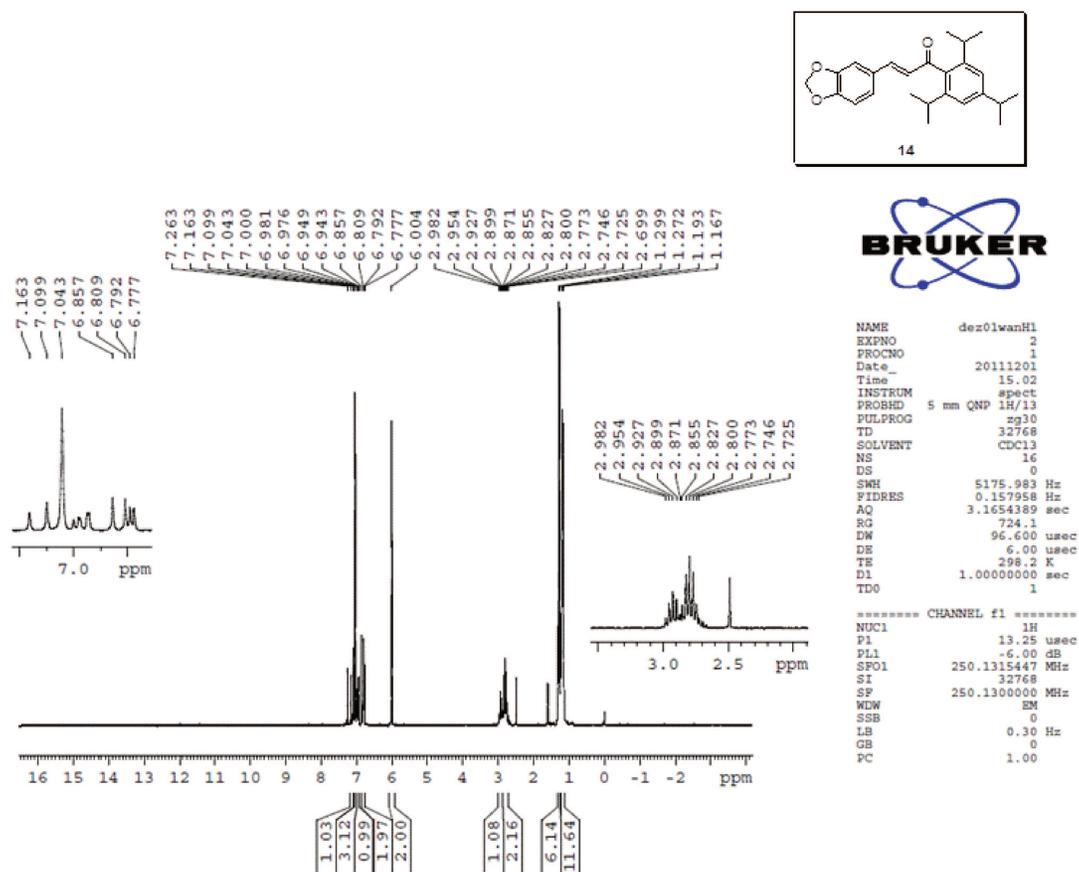
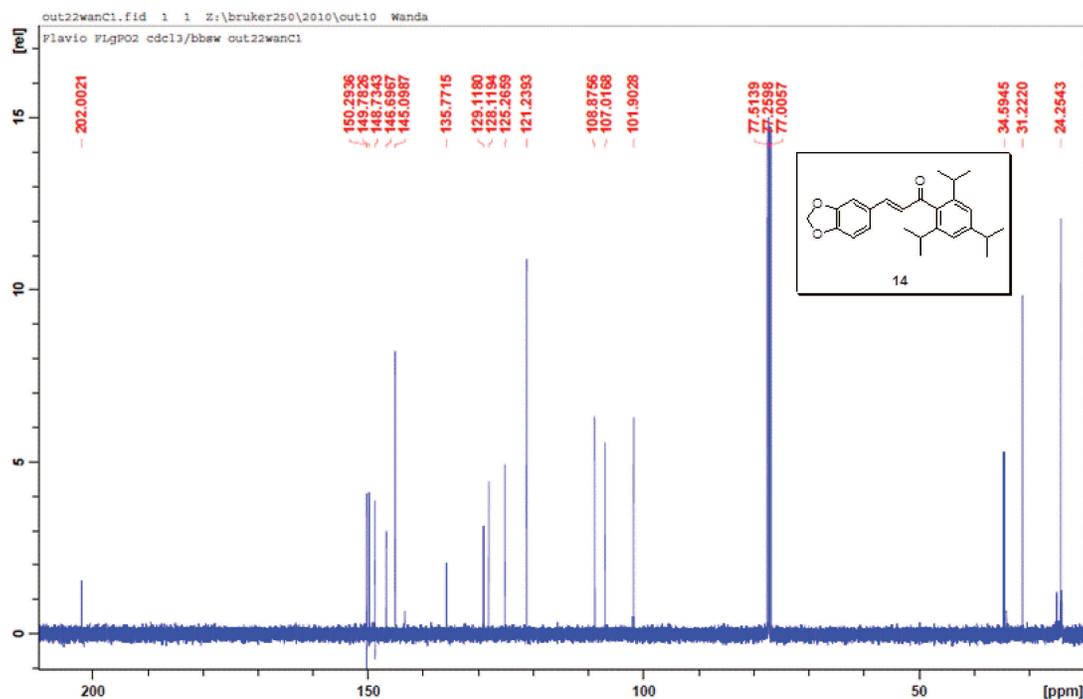
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 250MHz) da Substância **13**Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 62,5 MHz) da Substância **13**

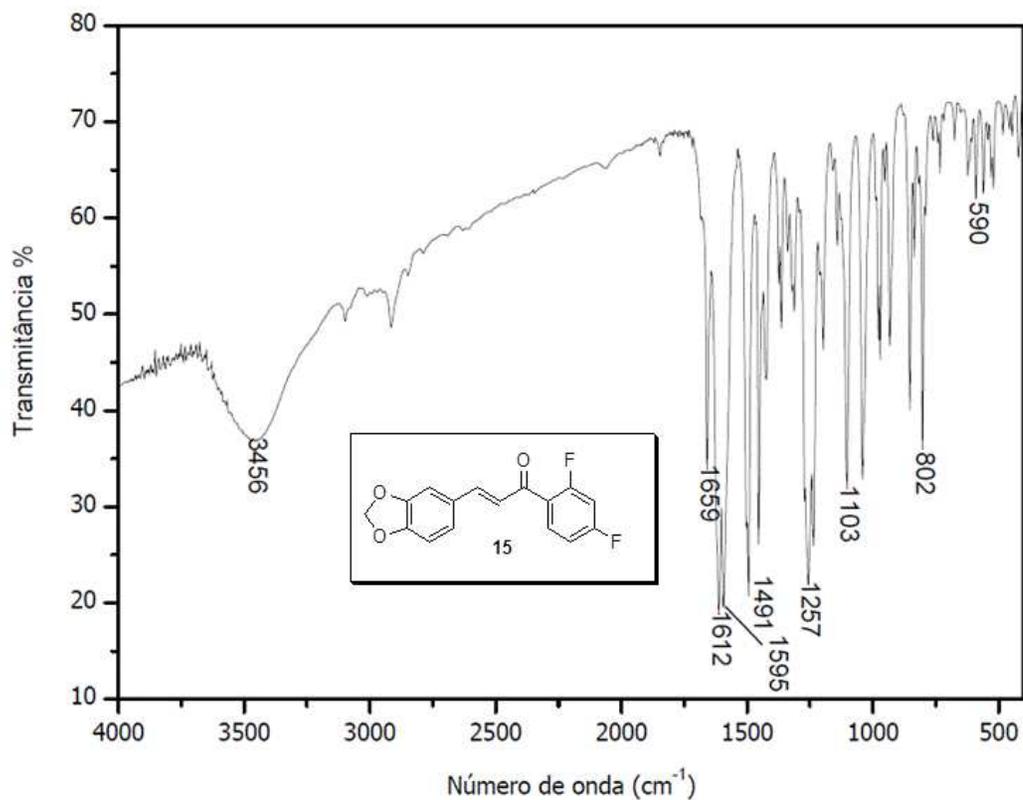
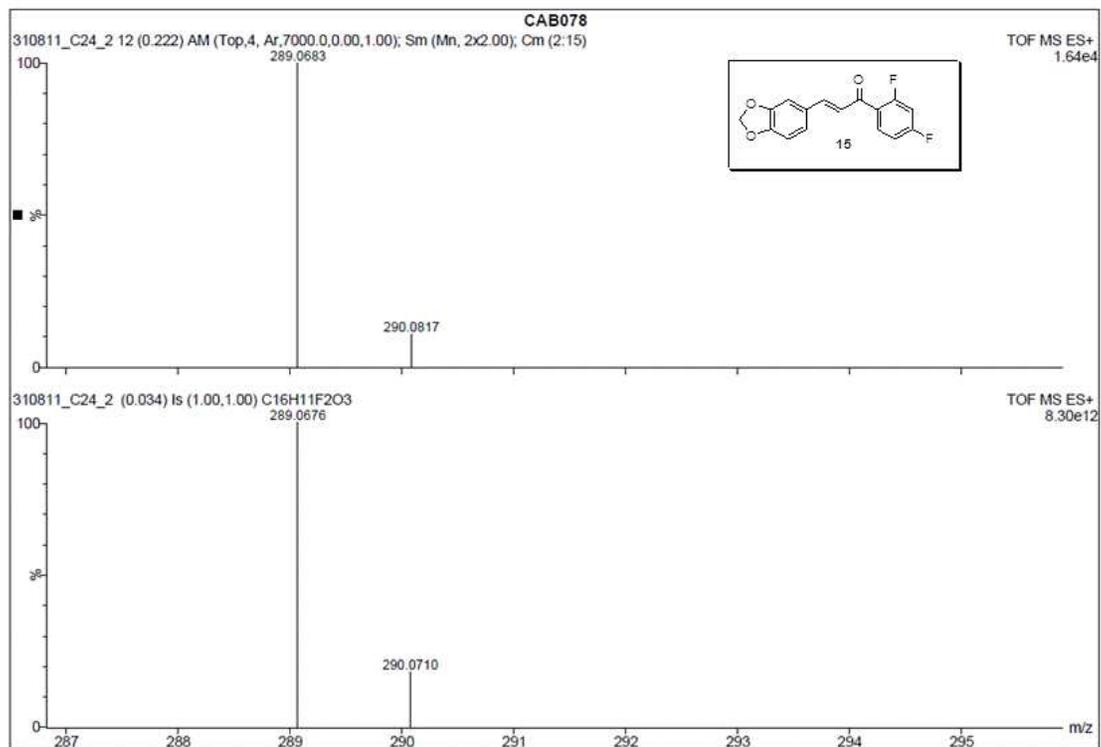


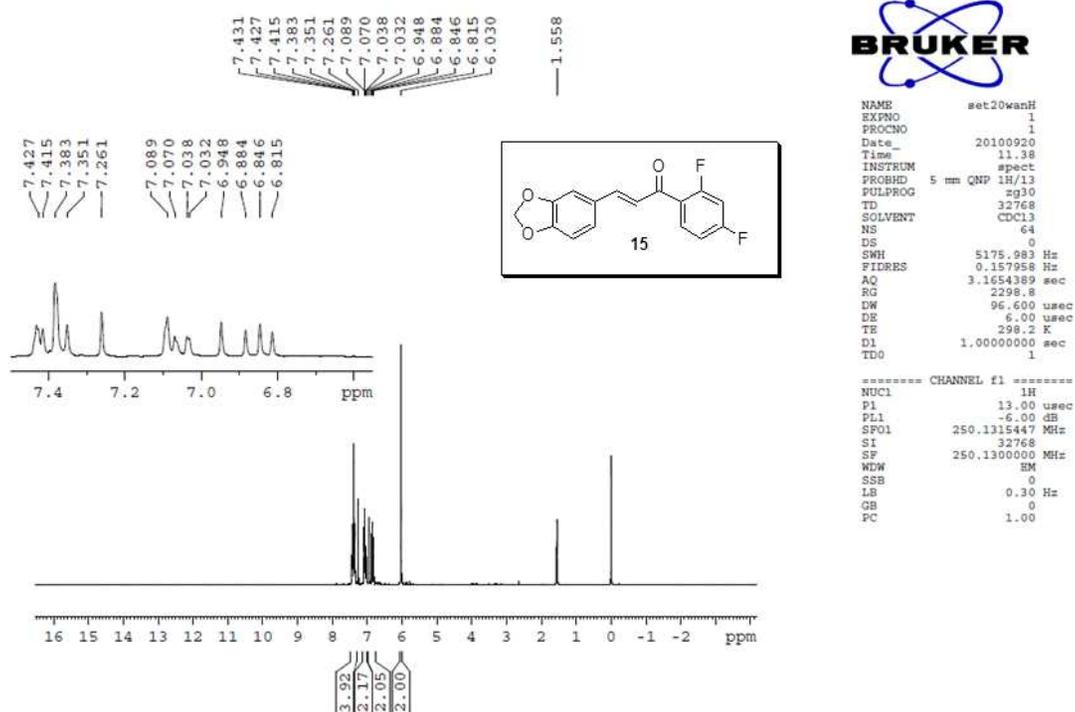
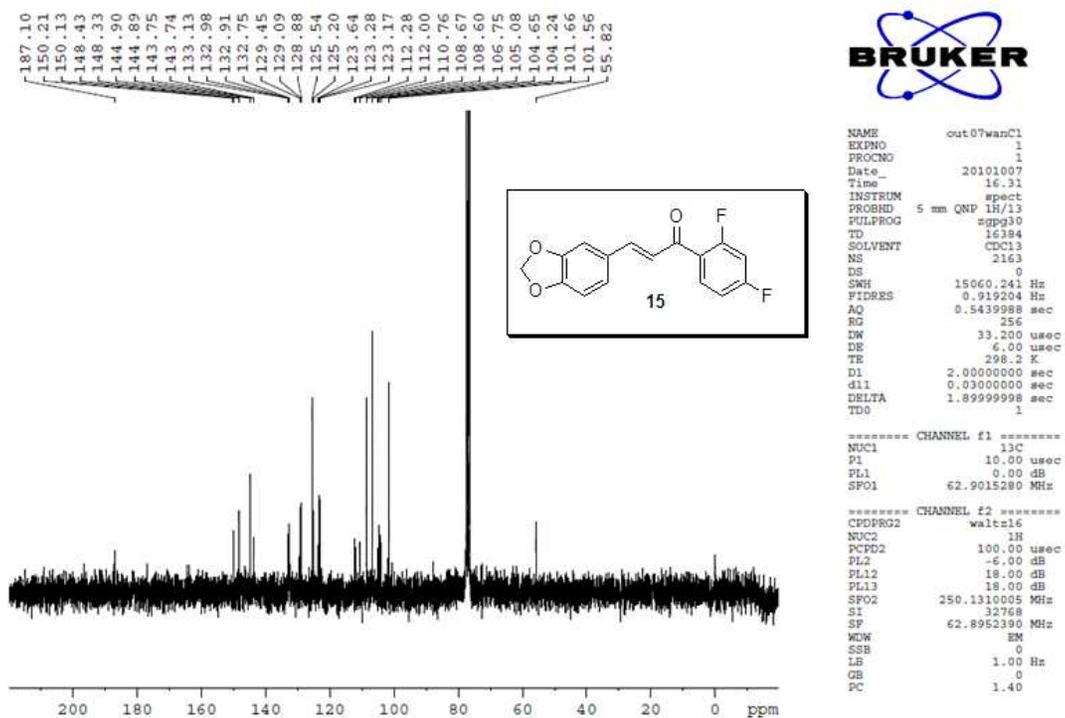
Espectro no Infravermelho da Substância 14

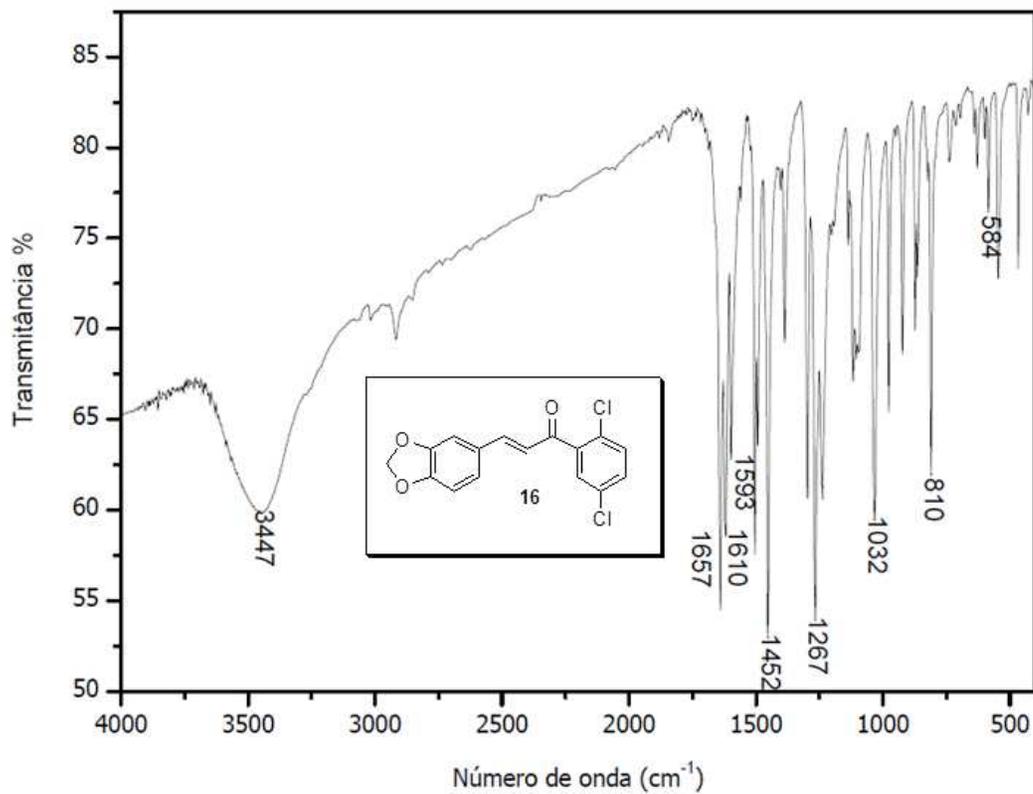


EMAR (ESI) da Substância 14

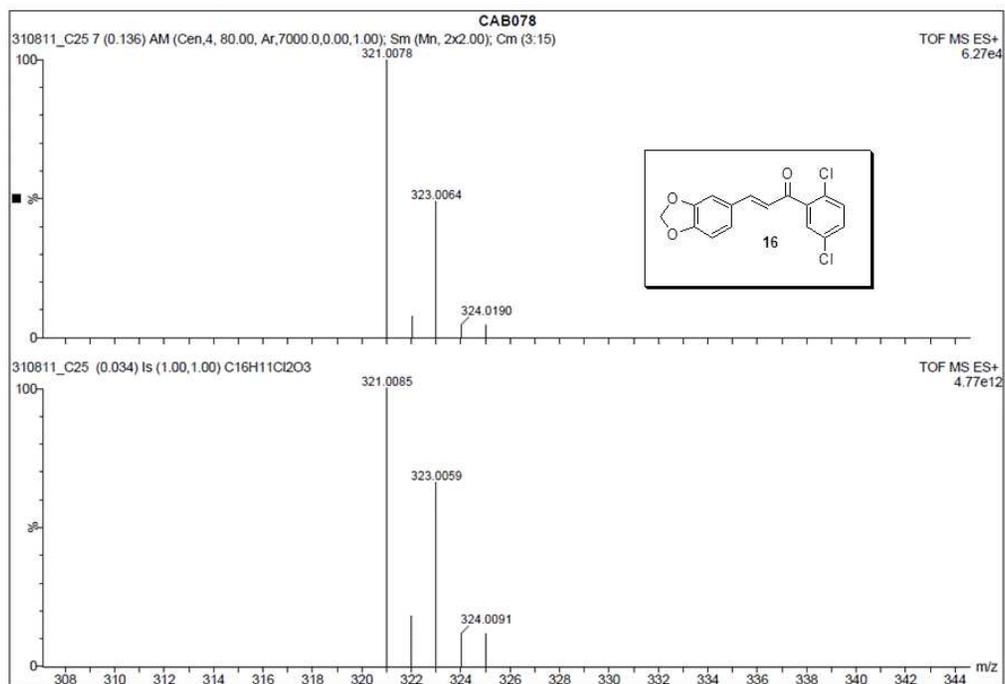
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 250MHz) da Substância 14Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) da Substância 14

Espectro no Infravermelho da Substância **15**EMAR (ESI) da Substância **15**

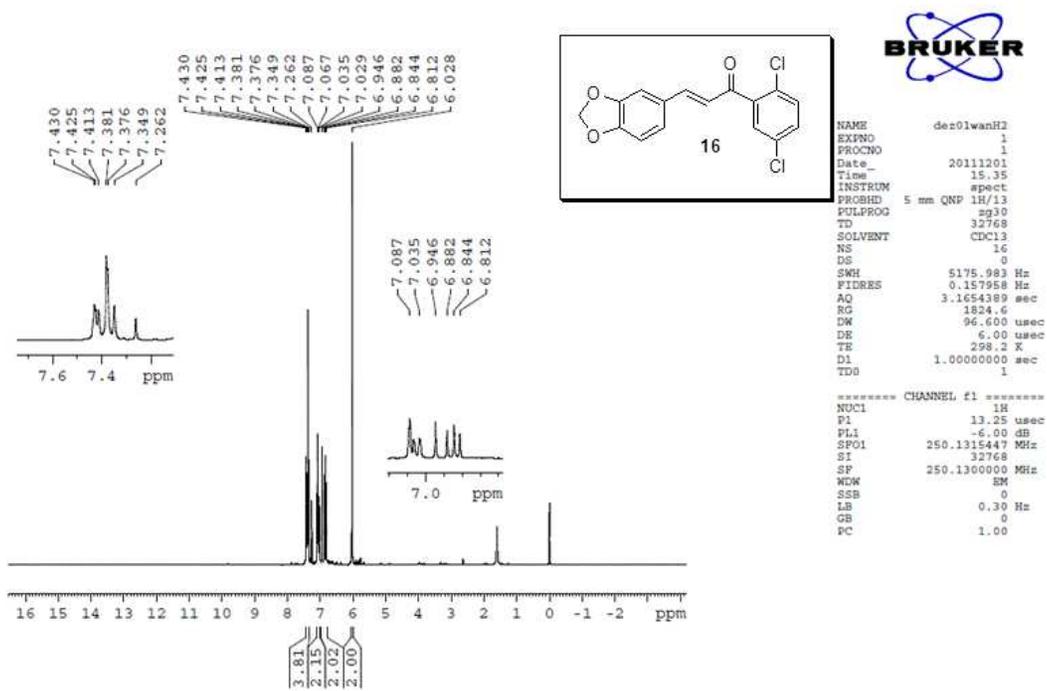
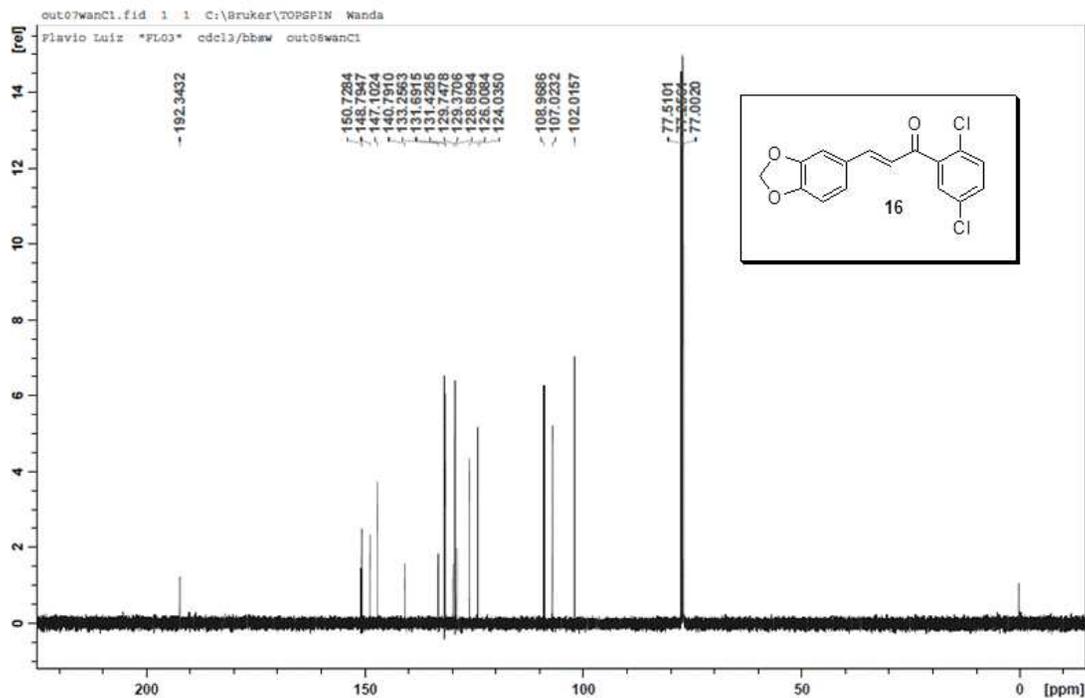
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 250MHz) da Substância 15Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 62,5 MHz) da Substância 15



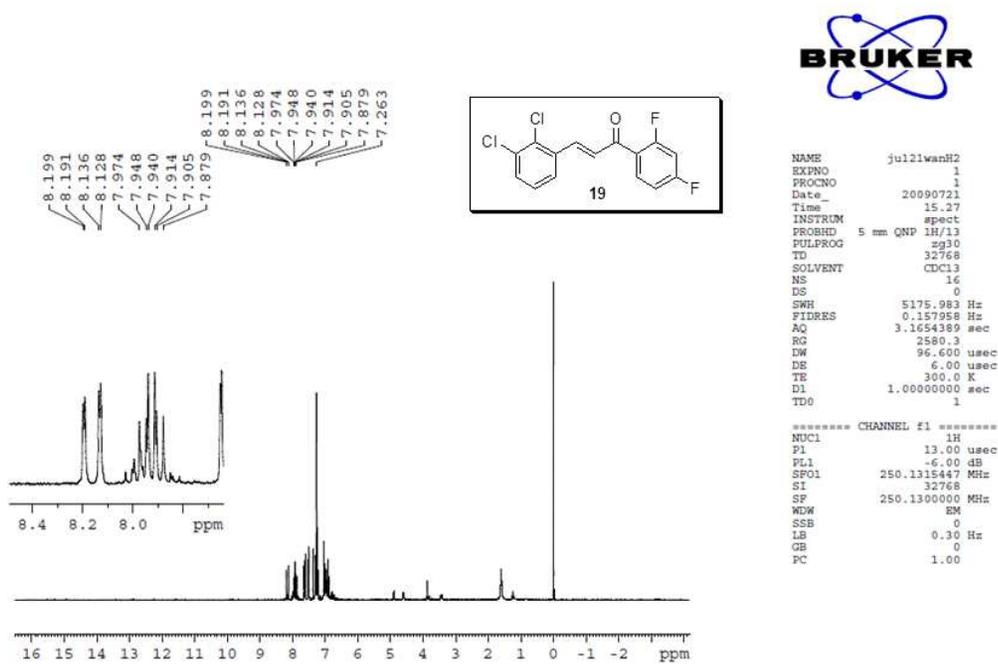
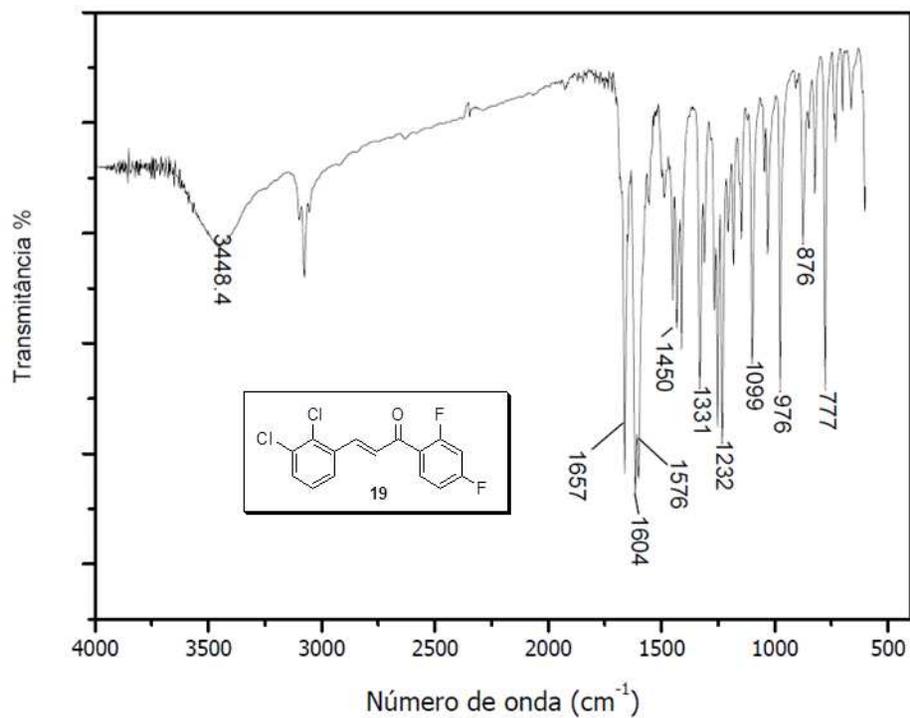
Espectro no Infravermelho da Substância 16



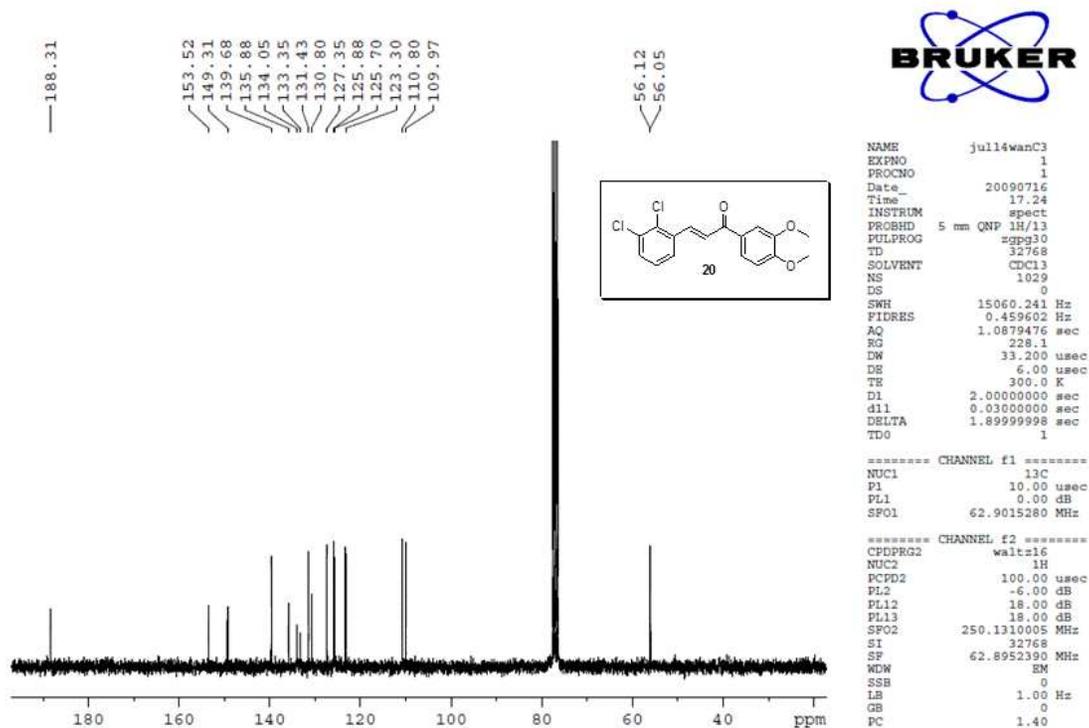
EMAR (ESI) da Substância 16

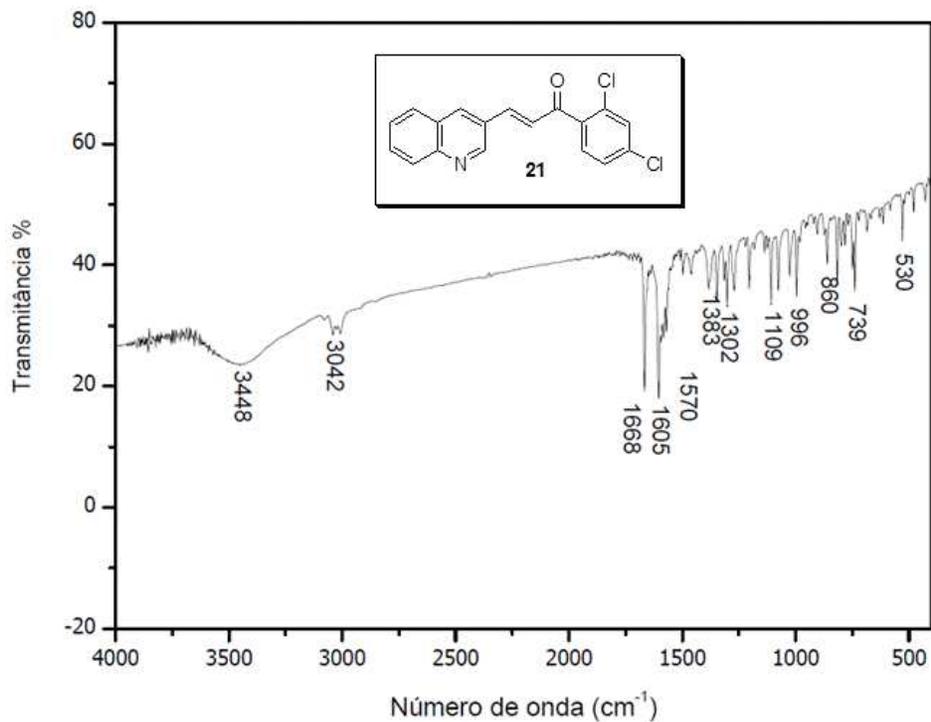
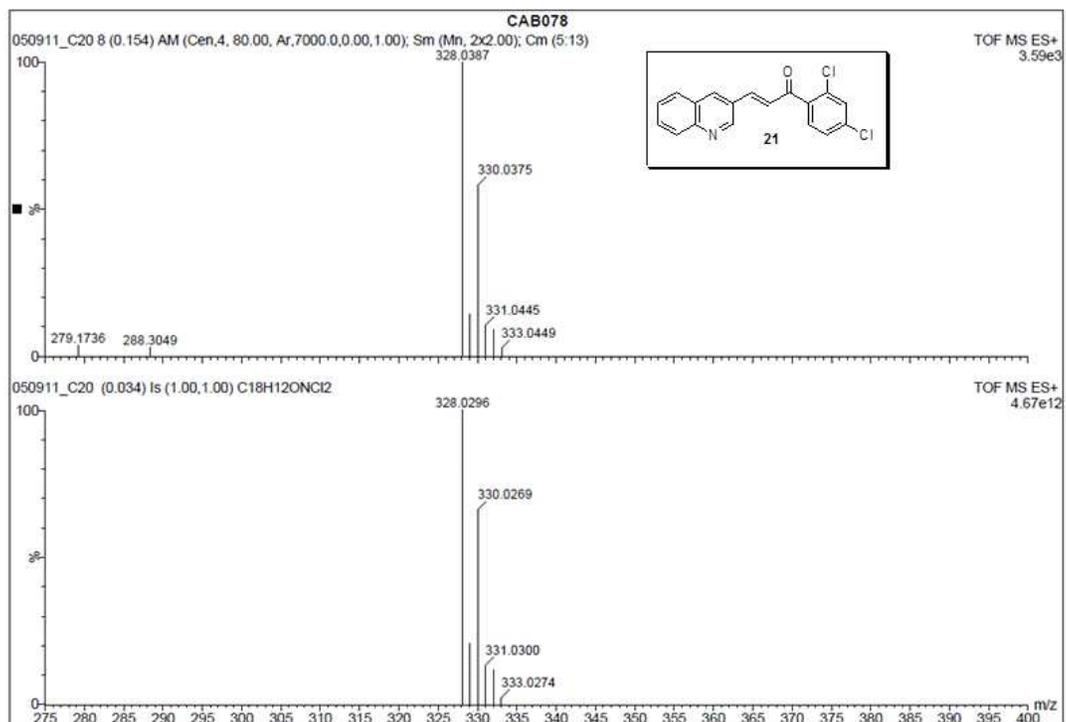
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 250MHz) da Substância **16**Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 62,5 MHz) da Substância **16**

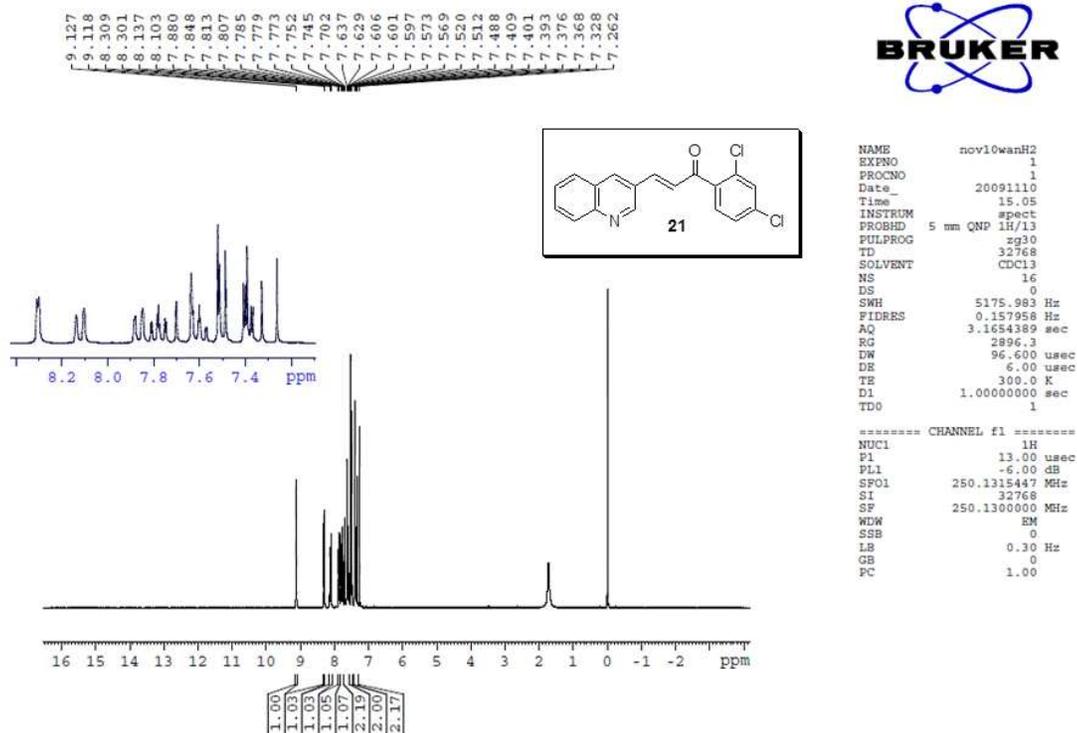
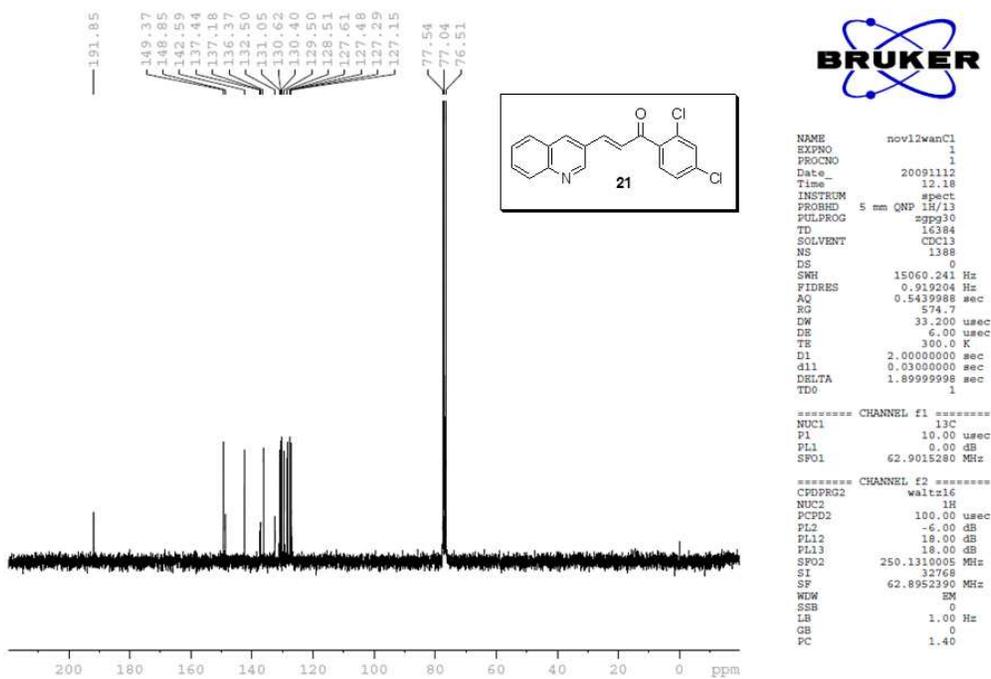


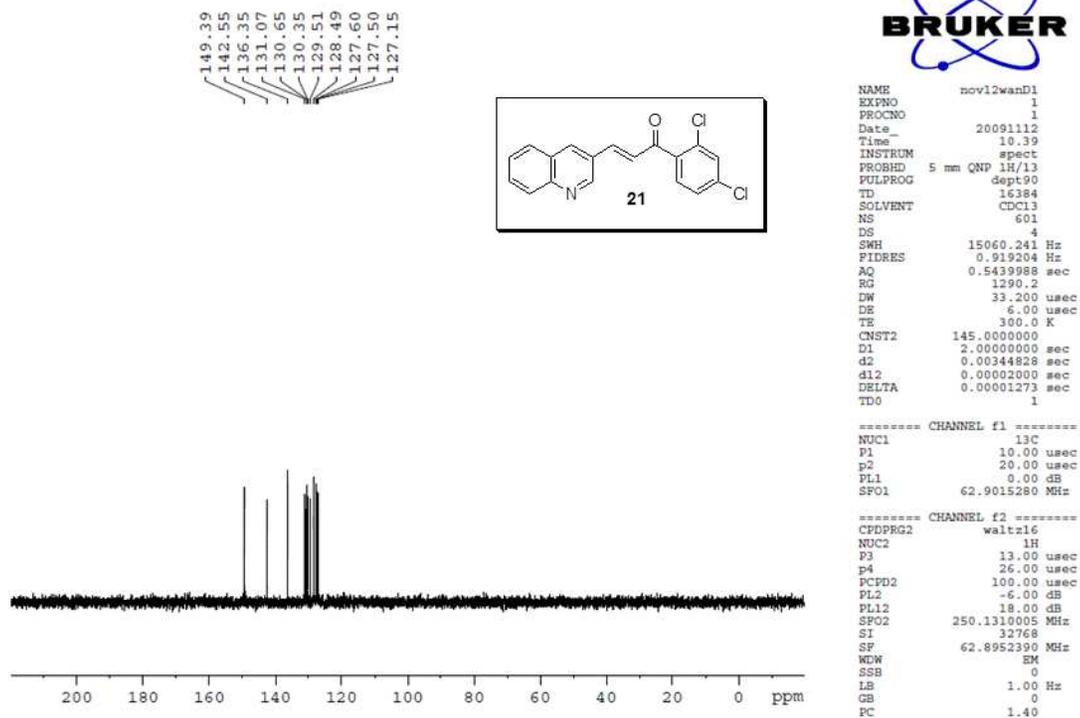


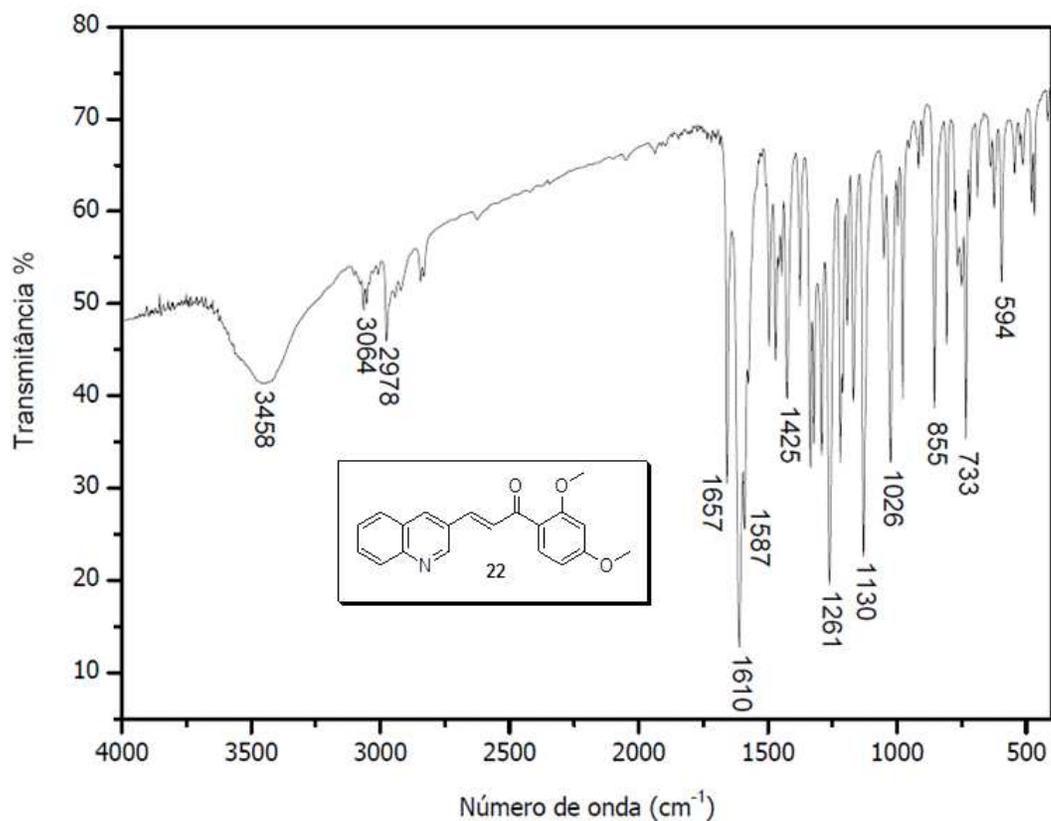


Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 62,5 MHz) da Substância **20**

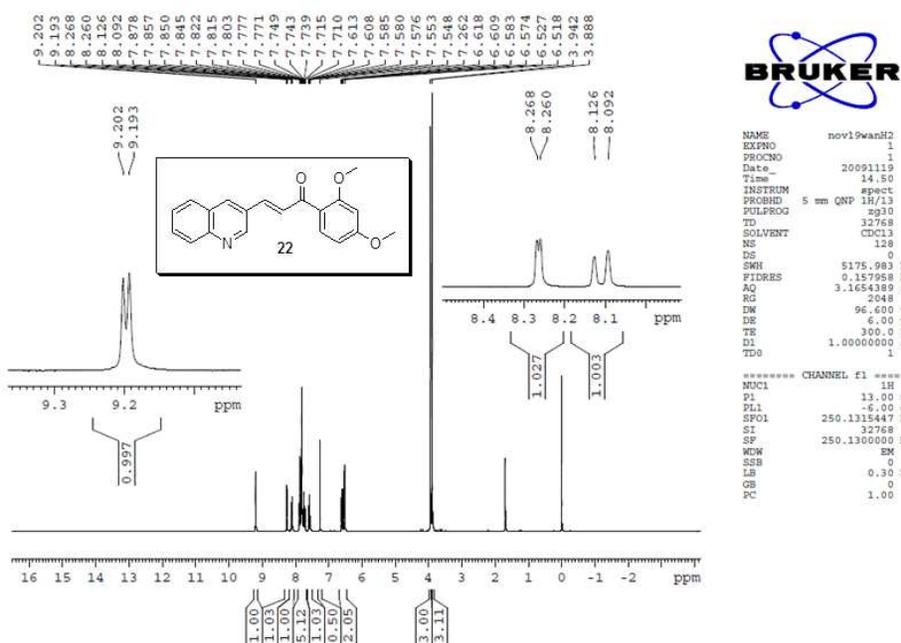
Espectro no Infravermelho da Substância **21**EMAR (ESI) da Substância **21**

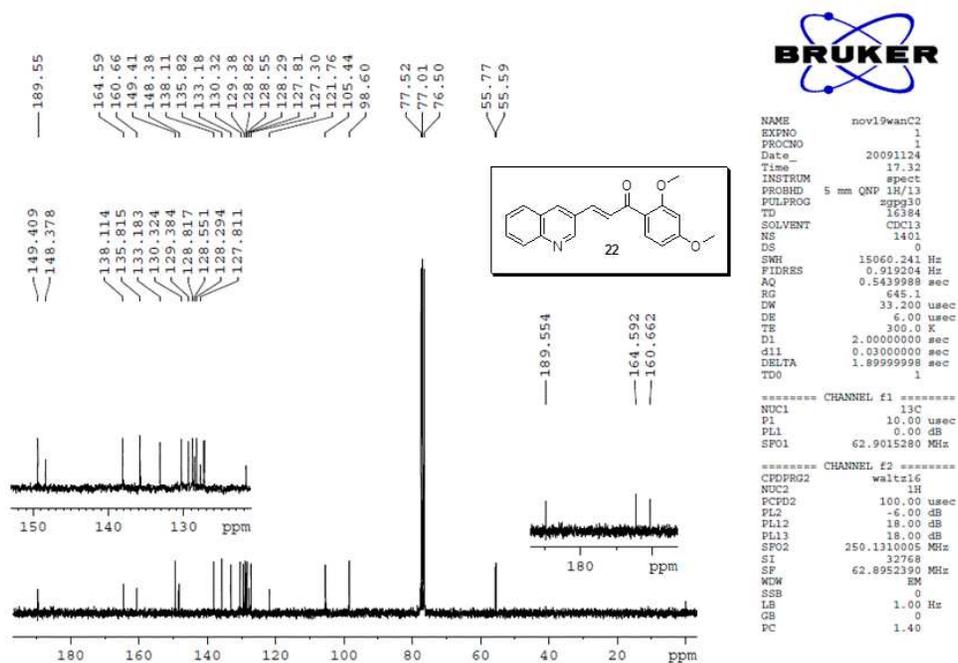
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 250MHz) da Substância 21Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 62,5 MHz) da Substância 21

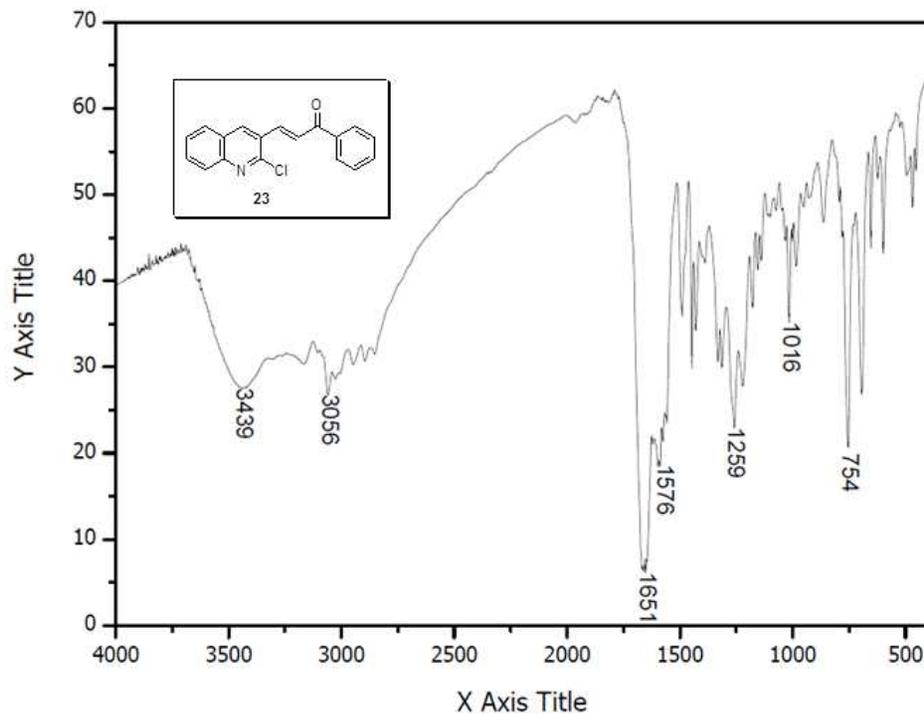
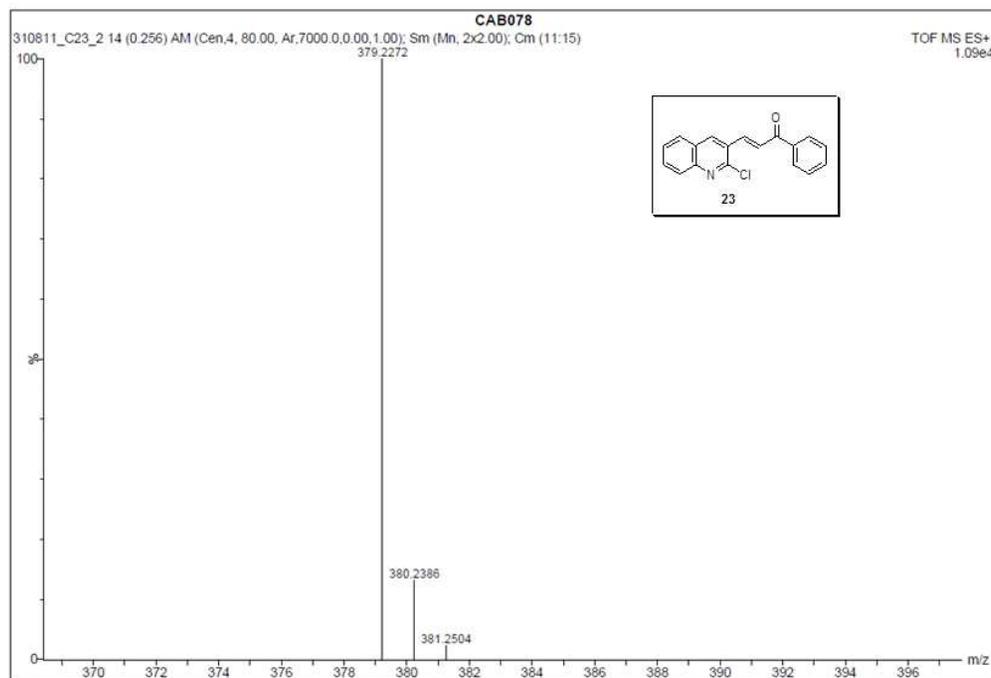
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C-DEPT (CDCl<sub>3</sub>, 62,5 MHz) da Substância **21**

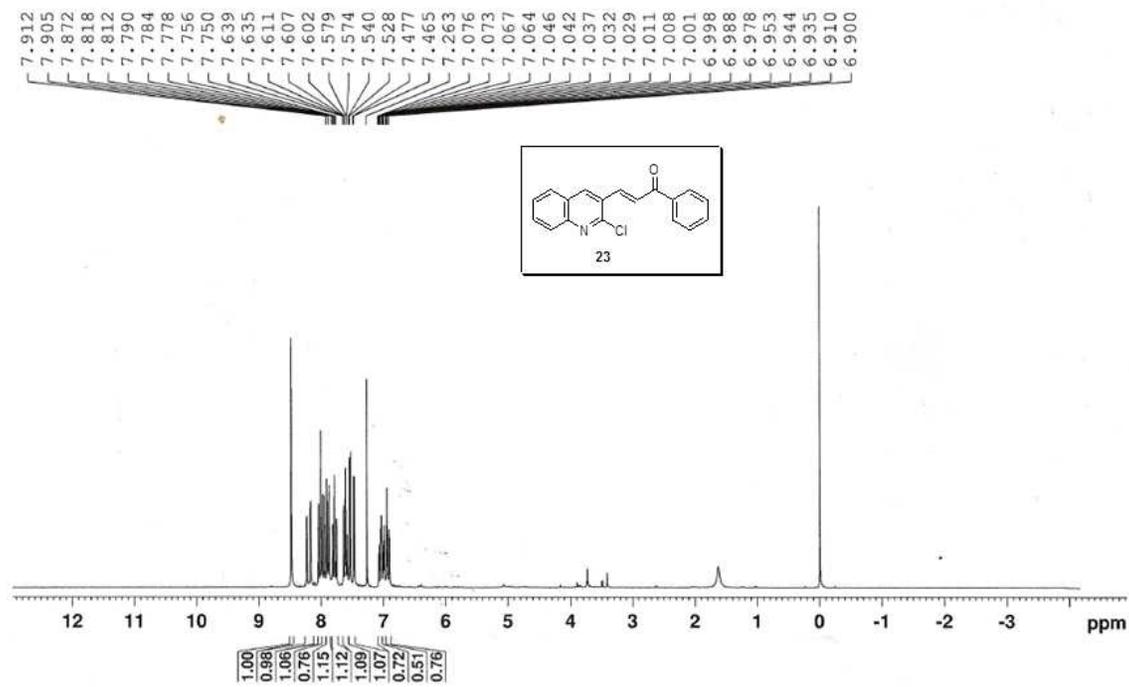


Espectro no Infravermelho da Substância 22

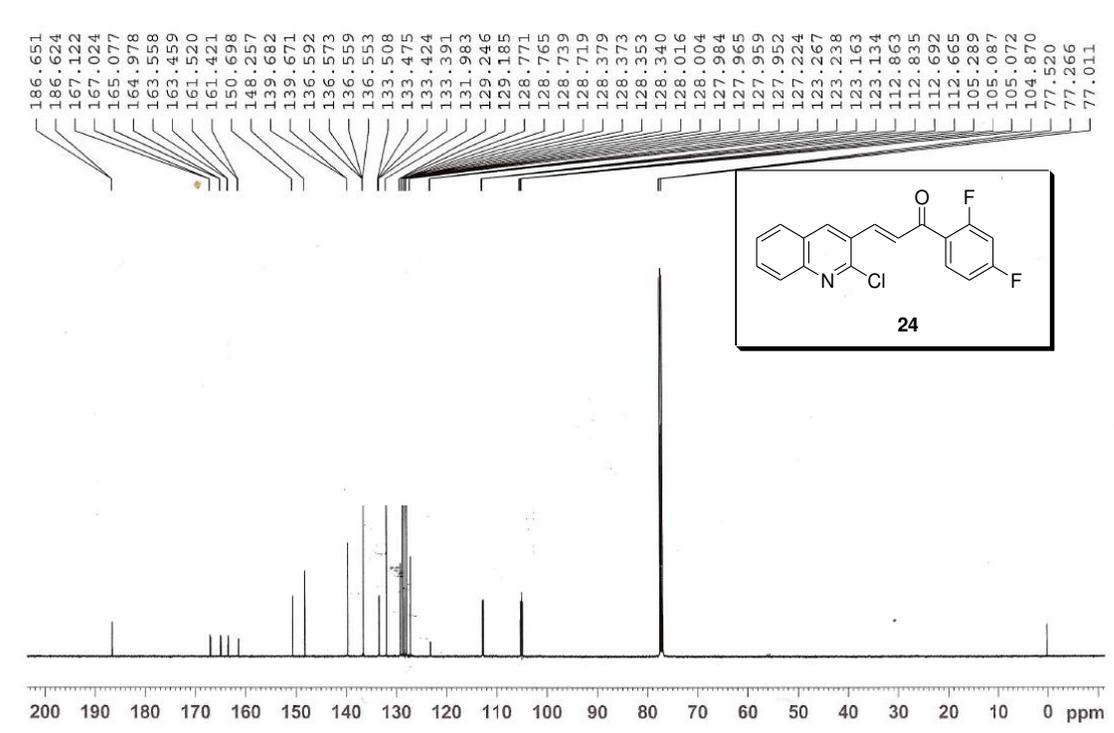
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 250MHz) da Substância 22

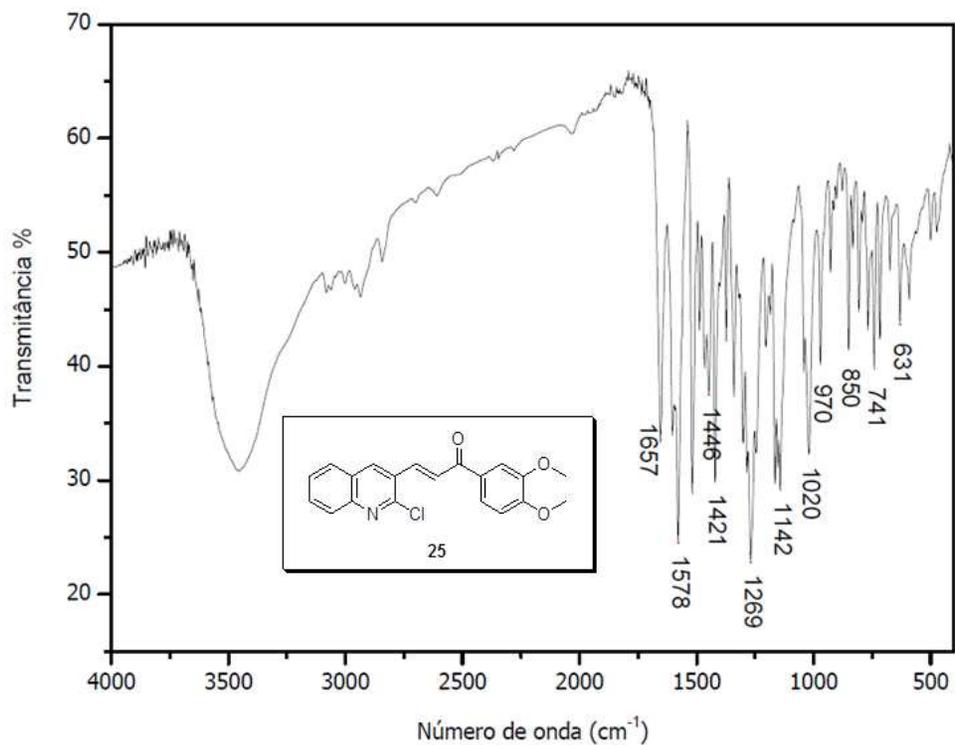
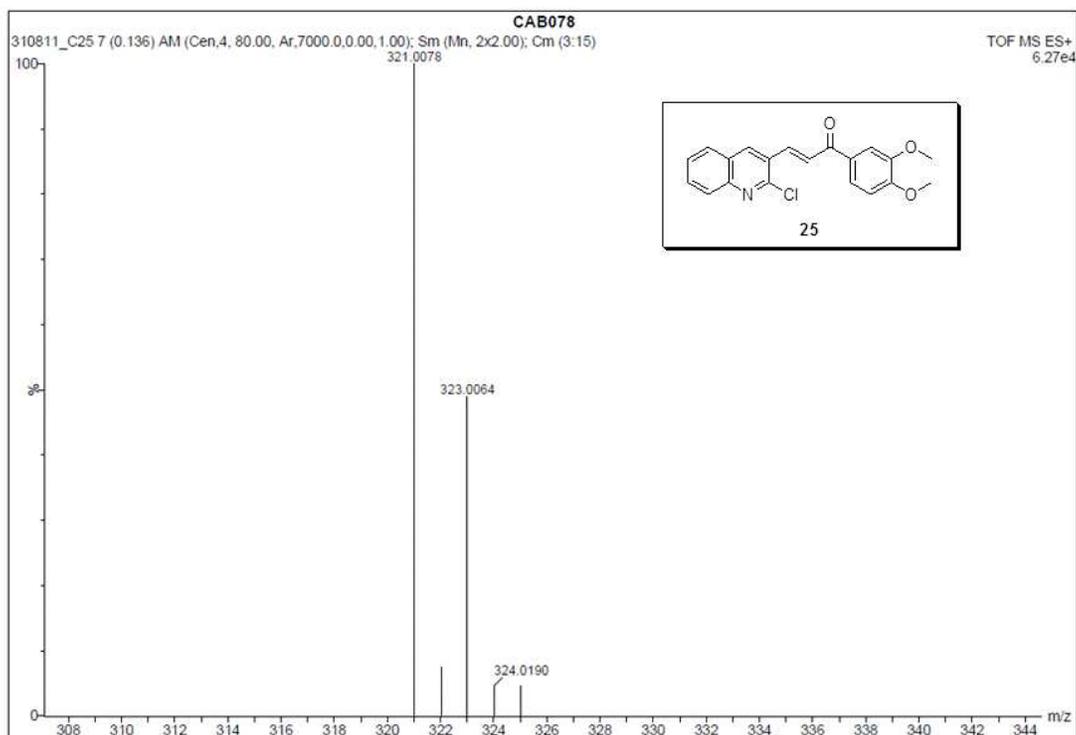
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 62,5 MHz) da Substância 22

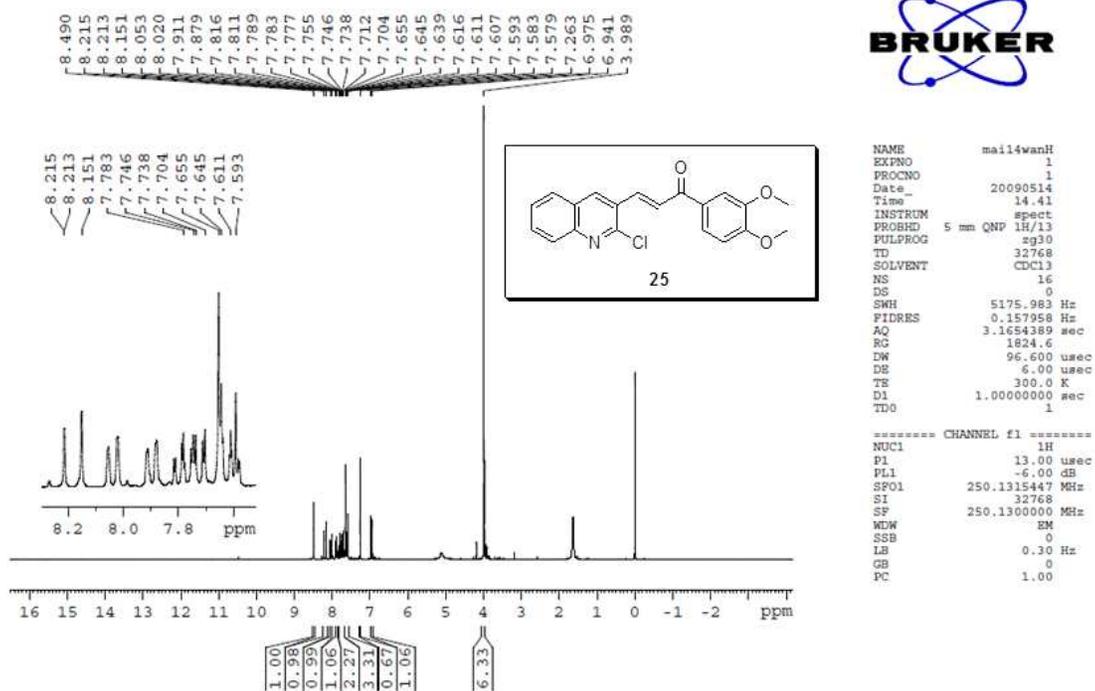
Espectro no Infravermelho da Substância **23**EMAR (ESI) da Substância **23**

Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) da Substância **23**



Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) da Substância **24**

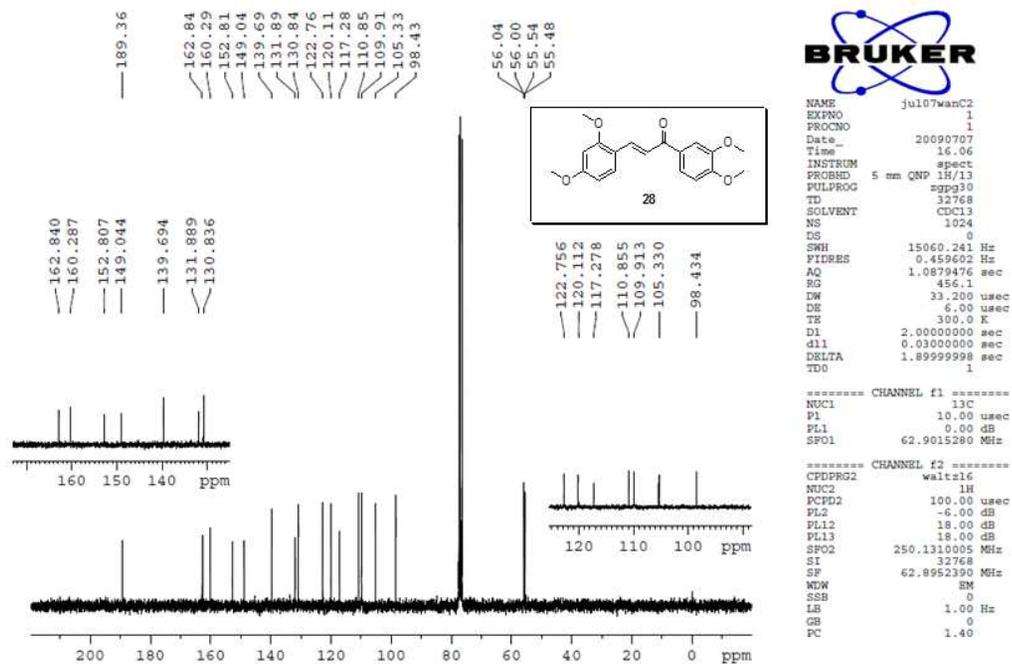
Espectro no Infravermelho da Substância **25**EMAR (ESI) da Substância **25**

Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 250MHz) da Substância **25**







Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 62,5 MHz) da Substância **28**