

ENTENDENDO O PROCESSO QUÍMICO DE BIOATIVAÇÃO DA SINVASTATINA POR MÉTODOS EXPERIMENTAIS E COMPUTACIONAIS: UMA AULA PRÁTICA**Maurício Temotheo Tavares^a, Marina Candido Primi^a, Camila Felix de Carvalho^a, Michelle Carneiro Polli^b e Roberto Parise-Filho^{a,*}**^aDepartamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, 05508-000 São Paulo – SP, Brasil^bDepartamento de Farmácia, Universidade São Francisco, Rua Waldemar César da Silveira, 105, 13057-500 Campinas – SP, Brasil

Recebido em 16/06/2015; aceito em 14/10/2015; publicado na web em 18/02/2016

UNDERSTANDING THE CHEMICAL PROCESS RELATED TO THE BIOACTIVATION OF SIMVASTATIN THROUGH EXPERIMENTAL AND *IN SILICO* METHODS: A PRACTICAL CLASS. Cholesterol is a lipid which in high concentration can be an important risk factor for coronary diseases and atherosclerotic lesions. This lipid presents an endogenous biosynthesis that involves several steps; one of them is modulated by the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase). HMG-CoA reductase is inhibited by statins, such as simvastatin, in order to reduce serum cholesterol. The structure of simvastatin has a lactone ring that undergoes enzymatic hydrolysis giving the 3,5-dihydroxy-heptanoate metabolite. This group is essential for simvastatin antilipemic activity, but significantly increases their water solubility. Make students understand the influence of chemical groups and organic functions on physicochemical properties and pharmacokinetic profiles of drugs, as simvastatin, is not an easy task. In this context, combine practical strategies and theoretical presentations of the concepts involved on drug biotransformation certainly could improve the teaching learning process. This manuscript correlates organic strategies and *in silico* techniques through simvastatin hydrolysis followed by comparative ClogP measurement. This approach intends to allow students to have contact with a cross-platform and multidisciplinary learning, making it ludic, easier and more interesting than theoretical classes.

Keywords: medicinal chemistry; simvastatin; prodrug; experimental class; antilipemics.

INTRODUÇÃO

As lipoproteínas são necessárias para o transporte de lipídeos pelo plasma, sendo que os lipídeos mais comumente encontrados na corrente sanguínea são: o colesterol e seus ésteres, os triglicerídeos e os fosfolipídios.¹ A concentração elevada de lipoproteínas complexadas a lipídeos no plasma constitui fator de risco importante para lesões ateroscleróticas e doenças coronarianas, sendo estas, o conjunto de doenças que mais geram vítimas fatais em todo o mundo.²

O colesterol consiste em um dos componentes de membranas celulares, além de ser um precursor essencial para a biossíntese de hormônios gonadotróficos (i.e. estradiol e testosterona), glicocorticóides (cortisol) e mineralocorticóides (aldosterona).^{3,4} Este pode ser obtido pelo indivíduo a partir de sua dieta, e também pode ser biossintetizado. A síntese endógena do colesterol é complexa e envolve diversas etapas, sendo uma das etapas iniciais, modulada pela enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase). Esta é fundamental à biossíntese do colesterol, originando o ácido mevalônico (Figura 1A), o qual dá prosseguimento à via catalítica, por redução da função tioéster do substrato endógeno (HMG-CoA). Dessa forma, ao inibir a HMG-CoA redutase, reduz-se a concentração de moléculas de colesterol sintetizadas pelo organismo.⁵

Os inibidores da HMG-CoA redutase, comumente conhecidos como estatinas, até o final da década de 2000 figuraram entre os medicamentos mais lucrativos utilizados na terapêutica, sendo prescritos com o intuito de reduzir os níveis séricos de colesterol.^{3,6} Estatinas são inibidoras competitivas da enzima HMG-CoA redutase, e podem ser divididas em dois grupos: naturais e sintéticas. Dentre as estatinas sintéticas pode ser citada a sinvastatina (Figura 1B), uma das primeiras representantes da classe empregada na terapêutica.⁷

A sinvastatina foi desenvolvida a partir da lovastatina (Figura 1C), um produto natural isolado dos fungos *Monascus ruber* e *Aspergillus terreus*. Esta é estruturalmente semelhante ao seu protótipo, possuindo uma metila como grupo substituinte adicional no carbono alfa à carbonila da função éster da estrutura. A inserção desta metila reduziu o número de centros quirais da sinvastatina se comparada à lovastatina, simplificando a rota sintética e, além disso, tornou-a três vezes mais potente do que seu protótipo, apresentando valor de IC₅₀ igual a 11 nmol L⁻¹, frente aos 34 nmol L⁻¹ apresentados pela lovastatina.¹ Cabe ressaltar que tanto a sinvastatina quanto a lovastatina possuem o sistema bicíclico hexa-hidronaftalênico, requisito estrutural importante para o ancoramento do fármaco ao sítio ativo da enzima.⁸⁻¹⁰

Como pode ser observado na Figura 1B, a sinvastatina possui um anel lactônico em sua estrutura. O grupo lactona é um éster cíclico que sofre hidrólise enzimática *in vivo*, tornando a sinvastatina capaz de exercer sua ação. Dessa forma, a sinvastatina é classificada como uma estrutura latente (pró-fármaco), já que a lactona precisa ser clivada para que o metabólito originado (Figura 1D) seja capaz de inibir a HMG-CoA redutase.¹¹ O metabólito ativo da sinvastatina apresenta similaridade estrutural com o substrato da enzima, o que é evidenciado pelo grupo 3,5-di-hidroxi-heptacarboxílico (em azul) na Figura 1. Assim, este metabólito pode ser considerado um potente análogo do estado de transição do substrato da enzima e, dessa forma, é capaz de se ligar ao bolsão catalítico da enzima, impedindo a clivagem do substrato e sua conversão em ácido mevalônico.^{12,13}

A fase farmacocinética da ação de fármacos se refere aos eventos sofridos pelo fármaco desde sua entrada no organismo até a sua eliminação, salvo a fase farmacodinâmica (na qual o mesmo exerce sua ação biológica). Fazem parte da farmacocinética os eventos de absorção e metabolismo, os quais estão intimamente relacionados à biodisponibilidade do fármaco em questão.¹⁴ No caso da sinvastatina, a função ácido carboxílico mascarada na forma de lactona, confere à

*e-mail: roberto.parise@usp.br

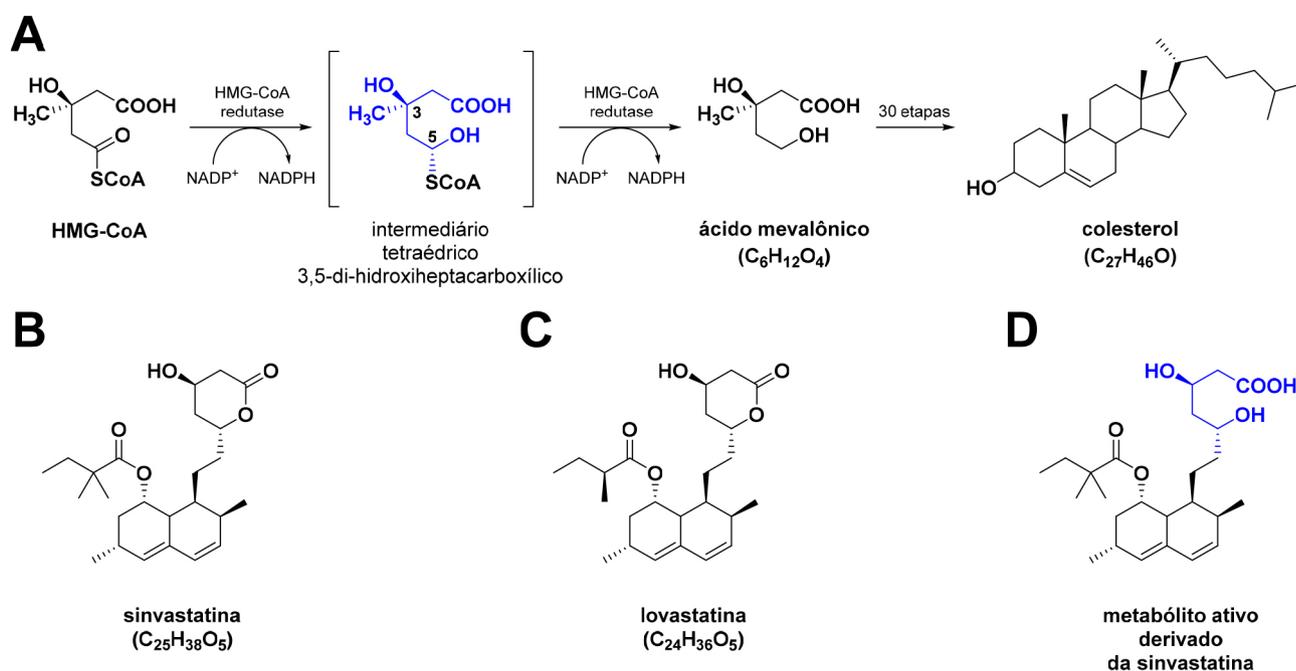


Figura 1. (A) Via catalítica simplificada da biosíntese do colesterol. (B) Fórmula estrutural da sinvastatina. (C) Fórmula estrutural da lovastatina. (D) Metabólito ativo da sinvastatina, obtido após reação de hidrólise *in vivo*. Em azul é indicada a similaridade estrutural existente entre o metabólito ativo da sinvastatina e o intermediário tetraédrico da HMG-CoA

mesma 80% de biodisponibilidade. Neste sentido, no que se refere à absorção de fármacos, a lipofilicidade é uma propriedade de grande importância, já que influencia diretamente a permeação do fármaco por meio das membranas biológicas e, caso o metabólito ativo da sinvastatina fosse administrado, a presença do grupo ácido aumentaria consideravelmente sua hidrossolubilidade, alterando assim o seu coeficiente de partição (LogP). Com isso, o perfil de absorção do metabólito seria prejudicado, o que enaltece as vantagens obtidas pela administração da forma latente.¹² Além disso, a presença do ácido carboxílico torna o metabólito suscetível à reações paralelas de metabolismo de primeira passagem, tais como reações de conjugação.¹⁴ Neste caso, essas reações metabólicas comprometeriam a integridade estrutural da molécula inicial, bem como sua capacidade em exercer ação biológica, resultando em baixos valores de biodisponibilidade e rápida eliminação.¹⁴

As características estruturais dos fármacos estão completamente relacionadas às suas propriedades físico-químicas que, consequentemente, acabam por influenciar seus perfis farmacocinéticos. Fazer com que os estudantes entendam a influência que determinados grupos químicos exercem nas propriedades físico-químicas de fármacos não é uma tarefa simples, principalmente quando estas propriedades são alteradas ou moduladas por eventos biológicos. Neste contexto, aliar estratégias práticas às apresentações teóricas dos conceitos farmacocinéticos e de bioativação de estruturas latentes, certamente, permite aos estudantes vivenciar de maneira muito singular todos os fundamentos abordados.

Face ao exposto, o objetivo deste trabalho é apresentar uma proposta de aula prática, que busca apresentar aos estudantes uma simulação dos eventos farmacêuticos e enzimáticos relativos ao metabolismo de fármacos, bem como as consequências destes eventos em relação às alterações de propriedades físico-químicas dos mesmos. Com isso, espera-se que os estudantes fixem de forma contundente os temas abordados, aprimorando assim, sua compreensão. Esta atividade prática foi planejada de forma a ser aplicada na disciplina de Química Farmacêutica e/ou na disciplina de Planejamento e Síntese de Fármacos, as quais compõem o currículo básico de disciplinas

dos diferentes cursos de graduação em Farmácia do país, devendo ser trabalhada em um encontro único de 4 horas/aula, ou em dois encontros de 2 horas/aula cada.

Os eventos desta atividade prática estão subdivididos em:

A – Extração da sinvastatina a partir de comprimidos de sinvastatina 40 mg;

B – Hidrólise química da sinvastatina e obtenção do seu metabólito;

C – Comparação de lipofilicidade por análise dos fatores de retenção (R_f) obtidos por cromatografia em camada delgada

D – Determinar o coeficiente de partição calculado (ClogP) da sinvastatina e do produto hidrolisado;

E – Interpretação dos resultados.

PARTE EXPERIMENTAL

A sinvastatina utilizada no procedimento sintético desta aula prática foi extraída de comprimidos de sinvastatina 40 mg. Utilizou-se o fármaco genérico, comercializado em drogarias, a fim de reduzir o custo agregado da aula prática. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em aparelho Bruker, modelo Advanced DPX-300, nas frequências 300 MHz e 75 MHz, com tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interno e CDCl₃ como solvente. As constantes de acoplamento (RMN ¹H) foram expressas como: s, singleto; sl, singleto largo; d, dubleto; dd, duplo dubleto; t, tripleto; dt, duplo tripleto; m, multipeto. Para análise de massas do produto hidrolisado (HRMS), foi utilizado o aparelho Bruker, modelo MicroTof Daltonics, com aquisição negativa (*m/z* - H⁺). O espectro de infravermelho (IV) do produto hidrolisado foi obtido em espectrofotômetro Shimadzu, modelo FT-IRAffinity-1, em discos de KBr entre 4000-400 cm⁻¹. Foram utilizadas placas cromatográficas de sílica gel fluorescentes (GF₂₅₄), as quais foram reveladas em câmara de ultravioleta (UV) em 254 nm. As vidrarias envolvidas neste procedimento prático são de uso comum a laboratórios, tais como béqueres, balão de fundo redondo e funil de separação. Para a reação de hidrólise básica, foi utilizado CHCl₃ como solvente e solução

aquosa de NaOH 2 mol L⁻¹. A determinação teórica de ClogP não requer grandes recursos de performance computacional, podendo ser realizada em computadores comuns a laboratórios de informática, ou nos computadores pessoais dos alunos, quando possível.

Extração e hidrólise da sinvastatina

Extração da sinvastatina a partir de comprimidos

Primeiramente, os alunos são orientados a triturar em gral 10 comprimidos de sinvastatina 40 mg (aproximadamente 0,96 mmol) e então transferir o pó resultante para um béquer de 50 mL. Adicionar 10 mL de CHCl₃ ao béquer e manter em agitação por 5 minutos.

Em seguida, filtrar (em algodão ou gaze) o conteúdo para um balão de fundo redondo de 50 mL, lavando o resíduo retido com 10 mL de CHCl₃. O filtrado presente no interior do balão conterá a sinvastatina extraída dos comprimidos.

Reação de hidrólise básica da sinvastatina

A reação de hidrólise apresentada neste trabalho foi proposta a partir de adaptações às condições descritas por Fazio e Schneider.¹⁵ Tais adaptações buscaram adequar solventes e reagentes, para aqueles comuns à rotina dos laboratórios de ensino, particularmente da área química, das diversas universidades do país.

Adicionar ao balão reacional 6 mL de NaOH 2 mol L⁻¹ (6 eq.) e manter sob agitação constante, por 30 minutos, em temperatura ambiente. Durante a reação, alterações de coloração no meio poderão ser observadas. Estas alterações estão relacionadas aos diferentes excipientes utilizados na produção do medicamento, que variam de acordo com o fabricante, porém, é válido ressaltar que tais excipientes não afetam o resultado final deste procedimento. Com o término da reação, orientar os estudantes a transferir o meio reacional bruto para um funil de separação de 100 mL. Adicionar 20 mL de CHCl₃ e 20 mL de HCl 5% e proceder a extração. Coletar a fase orgânica em um béquer de 50 mL, secar com Na₂SO₄ anidro e filtrar o sistema. A fase orgânica resultante, de coloração branca, conterá o produto hidrolisado da sinvastatina, a ser utilizado na etapa de comparação por cromatografia em camada delgada.

Caracterização do produto hidrolisado da sinvastatina

Ácido (3*R*,5*S*)-7-((1*S*,2*S*,6*R*,8*S*)-8-((2,2-dimetilbutanoil)oxi)-2,6-dimetil-1,2,6,7,8,8a-hexahidronaftalen-1-il)-3,5-di-hidroxiheptanóico: sólido branco, obtido em 95% de rendimento. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 5.99 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 5.80-5.75 (t, 1H), 5.50 (s, 1H), 5.38 (s, 1H), 4.63 (sl, 1H), 4.36 (sl, 1H), 4.12 (dd, *J* = 14.3, 7.1 Hz, 1H) 3.82 (s, 1H), 2.73-2.60 (m, 1H), 2.40 (dd, *J* = 13.9, 7.4 Hz, 2H), 2.26 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 2.04-1.83 (m, 4H), 1.71-1.42 (m, 6H), 1.29 (dt, *J* = 14.2, 6.3 Hz, 3H), 1.10 (dd, *J* = 12.5, 4.6 Hz, 9H), 0.90-0.81 (m, 6H). RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): δ 178.12, 170.73, 132.88, 131.49, 129.66, 128.36, 126.35, 68.12, 62.51, 43.02, 38.55, 37.53, 36.62, 36.10, 32.96, 30.62, 28.98, 27.24, 24.73, 24.26, 23.03, 13.84, 9.27. HRMS *m/z* calculado para C₂₅H₄₀O₆ - H⁺: 435,2752. Encontrado: 435,2753. IV (cm⁻¹): 3414, 2966, 2359, 1713, 1576.

Os espectros de RMN e demais dados de caracterização estão disponíveis no material suplementar.

Comparação de lipofilicidade por análise dos R_f obtidos por cromatografia em camada delgada

Na aula prática, os alunos são orientados a aplicar o produto hidrolisado e a sinvastatina, em cromatofolhas de alumínio fluorescente (GF₂₅₄), de 4 cm de altura e distância de eluição igual a 3 cm. As placas são eluídas em hexano/acetato de etila (1:2), com 2,0% de ácido acético. O caráter mais polar do produto hidrolisado é refletido

na sua maior retenção na placa, em comparação à sinvastatina. Assim, com revelação em luz ultravioleta a 254 nm, é possível observar a mudança do perfil físico-químico obtido pela hidrólise da lactona da sinvastatina, correlacionando tal alteração com as possíveis implicações da administração oral deste “metabólito”, no lugar da estrutura latente. Orientar os estudantes a calcularem os R_f de cada substância. Neste trabalho, os valores qualitativos de R_f encontrados para a sinvastatina e para o produto hidrolisado foram iguais a 0,47 e 0,33, respectivamente.

A adição de ácido acético ao sistema eluente tem o intuito de evitar a ionização do produto hidrolisado, o que poderia causar seu arraste (cauda) pela placa cromatográfica. Assim, a fase móvel acidificada garante a perfeita eluição de ambas as espécies.

Determinação do coeficiente de partição calculado (ClogP) da sinvastatina e do produto hidrolisado

Ao finalizar a execução do experimento químico-laboratorial, os alunos são conduzidos ao laboratório de informática e orientados a acessar via internet (*on line*) o site do programa gratuito MarvinSketch¹⁶ (www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php) para calcular o ClogP da sinvastatina e do produto hidrolisado. Esta etapa da aula também pode ser realizada em *tablets*, *smartphones* ou *laptops*, o que facilita sua aplicação. O método detalhado para a realização do cálculo de ClogP pelo programa MarvinSketch encontra-se amplamente descrito no material suplementar deste manuscrito.

Os estudantes, após realizarem os cálculos de ClogP no programa MarvinSketch, observam a janela de resultados (Figura 2) e são orientados a anotá-los, sendo os valores 4,46 e 3,79, para a sinvastatina e para o produto hidrolisado (na forma não-ionizada), respectivamente. Posteriormente, esses valores serão utilizados para análise e comparação dos resultados. Faz-se necessário ressaltar que o coeficiente de partição calculado (ClogP) consiste em um descritor físico-químico capaz de avaliar a lipofilicidade relativa de compostos orgânicos porém, não é capaz de prever sua partição hidro/lipofílica considerando as influências exercidas pelo pH do meio em que se encontra. Portanto, ainda que este descritor seja totalmente correlacionável com os resultados obtidos durante esta aula prática, o mesmo deve ser encarado com prudência, uma vez que não traduz os eventos fisiológicos associados ao produto hidrolisado da sinvastatina que, por ser uma espécie ácida, em pH = 7,4 encontra-se totalmente ionizado, fato que altera significativamente sua partição hidro/lipofílica.

O material suplementar deste manuscrito apresenta o método de determinação do ClogP pelo programa MarvinSketch, porém, é possível realizar este cálculo em outros programas gratuitos disponíveis *on line*, como o Molinspiration (www.molinspiration.com) e o OSIRIS Property Explorer (www.organic-chemistry.org/prog/peol/). Com isso, o docente que aplicar esta metodologia, poderá empregar o programa computacional de sua preferência.

Análise e comparação dos resultados

Uma vez que a fase farmacêutica de ação de fármacos consiste na desintegração da forma farmacêutica (quando sólida), seguida da solubilização do princípio ativo, e que a absorção é a primeira etapa da fase farmacocinética, é possível traçar um paralelo desses eventos biológicos com cada etapa realizada em aula.

O fato dos estudantes triturarem os comprimidos, solubilizarem em solvente adequado e realizarem extração orgânica alterando o pH (de básico para ácido), simula, de forma didática, a mesma sequência de eventos que ocorre no organismo. A trituração dos comprimidos pode ser comparada à desintegração da forma farmacêutica. A solubilização em solvente, mimetiza a dissolução do fármaco no fluido

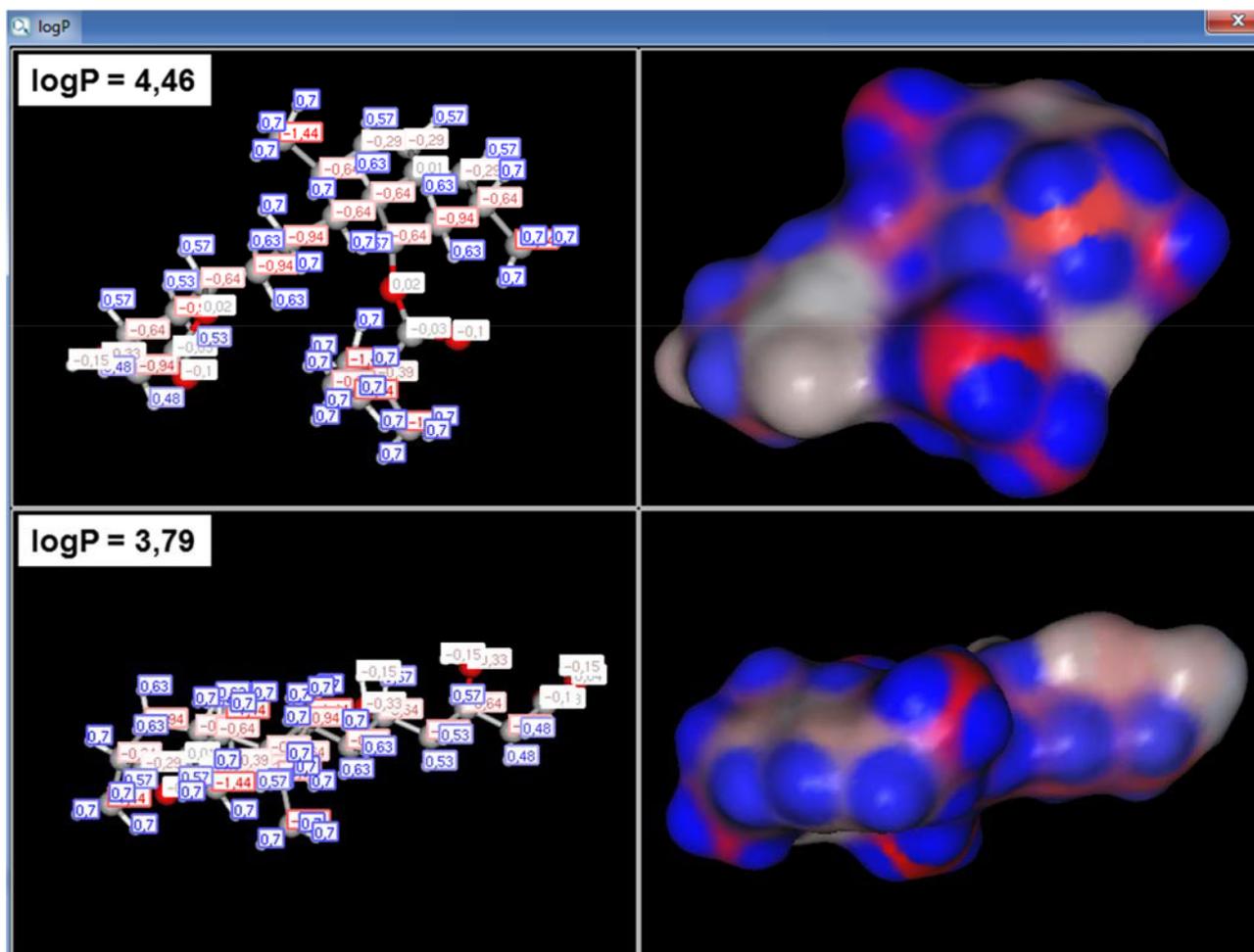


Figura 2. Janela de resultados do cálculo de ClogP. Indicados no interior dos retângulos brancos (canto esquerdo superior) estão os valores de ClogP da sinvastatina e do hidrolisado. A direita é representado o mapa de hidrofobicidade de cada estrutura. A esquerda estão apresentados os valores calculados das constantes de hidrofobicidade (π) de cada átomo que compõe cada uma das moléculas

gastrointestinal e sua separação dos excipientes da formulação.

Posteriormente, na etapa de extração do produto hidrolisado (de natureza ácida), o composto encontra-se ionizado no meio (devido à presença de NaOH no meio reacional), o que mostra aos estudantes que compostos ionizados possuem elevada afinidade por água e baixa afinidade pela fase orgânica, não sendo capazes de permear membranas biológicas. Esta situação ilustra o fato de que fármacos, para possuírem boa permeação em membranas biológicas, necessitam estar em suas formas moleculares, as quais possuem maior afinidade pela natureza lipofílica das membranas.

Neste sentido, a posterior acidificação da fase aquosa (com HCl 5%) promove a restituição da forma molecular do fármaco, que possui alta afinidade pela fase orgânica utilizada no procedimento (CHCl_3). Este fato pode ser correlacionado à afinidade da forma molecular de fármacos por membranas biológicas, e assim, à passagem do compartimento gastrointestinal para a circulação pré-sistêmica, fenômeno conhecido como absorção. É válido ressaltar que conduzir os estudantes à elaboração deste raciocínio durante o período de aula contribui significativamente para o maior entendimento de tópicos correlatos aos abordados nesta prática.

O processo de bioativação da sinvastatina é extremamente relevante para sua ação farmacológica e, dessa forma, esta substância pode ser classificada como um pró-fármaco, ou seja, substância que necessita de ativação endógena para exercer seus efeitos terapêuticos. É sabido que para ser bioativada, a sinvastatina deve sofrer hidrólise enzimática, provocando assim, a abertura de seu anel lactônico, expondo o grupo

3,5-di-hidroxi-heptacarboxílico, farmacóforo da classe.

Nesta proposta de aula prática, a hidrólise química foi utilizada para mimetizar o processo de biotransformação (hidrólise enzimática) que ocorre *in vivo* e que gera metabólito com propriedade físico-química diferenciada do pró-fármaco precursor. Forma bastante prática de se caracterizar a substância obtida é correlacionar suas propriedades físico-químicas através da realização da cromatografia em camada delgada comparativa com as propriedades apresentadas por seu antecessor, a sinvastatina.

A utilização de um solvente de média polaridade para a fase móvel permite a eluição de ambas as substâncias. Porém, a substância de maior polaridade fica mais retida na fase estacionária, que também possui características polares. Dessa forma, como a sinvastatina apresentou um R_f superior ao do seu metabólito (0,47 e 0,33, respectivamente), isto expressa maior lipofilicidade para o pró-fármaco. Este fato é relevante, pois para ser absorvido de maneira satisfatória, o fármaco necessitaria de certo grau de lipofilicidade. Ao realizar os cálculos computacionais para determinação do coeficiente de partição (ClogP), o estudante é capaz de observar que os resultados demonstram e corroboram àqueles obtidos pela cromatografia experimental. Utilizando o programa MarvinSketch 5.3.8, foram obtidos os valores de ClogP de 4,46 para o pró-fármaco e de 3,79 para o metabólito ativo. Estes resultados mostram aos alunos que a sinvastatina é mais lipofílica que o seu metabólito ativo e que alterações de propriedades hidro/lipofílicas ocorrem em reações de metabolismo (Figura 3).

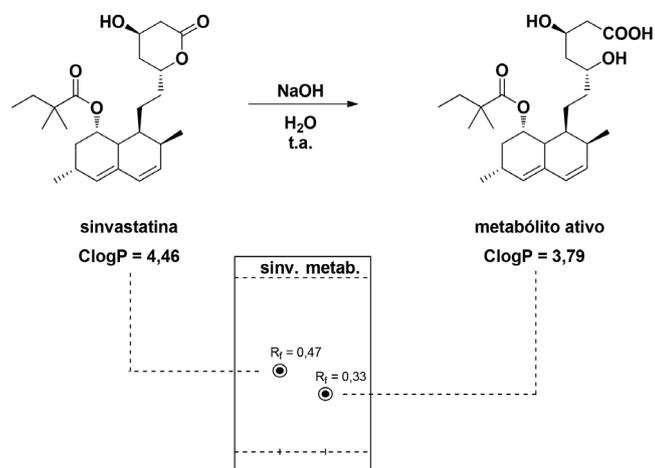


Figura 3. Interpretação dos resultados da aula prática. Correlação dos valores de ClogP da simvastatina e do produto hidrolisado, com os respectivos fatores de retenção. Nota-se a maior eluição da molécula mais lipofílica, neste caso, o pró-fármaco simvastatina

CONCLUSÕES

A aplicação desta atividade prática mostra-se uma estratégia capaz de atingir os estudantes de forma bastante eficiente no âmbito da compreensão dos eventos associados, especialmente, à biotransformação de fármacos. A possibilidade de correlacionar atividades práticas de química orgânica, com técnicas químico-computacionais, permite que os alunos vivenciem os conceitos teóricos de forma multidisciplinar. Neste sentido, este trabalho buscou associar o emprego de uma estratégia lúdica de ensino ao baixo valor agregado, para tornar viável sua aplicação nos mais variados cursos de Farmácia e áreas afins das universidades brasileiras.

MATERIAL SUPLEMENTAR

O passo-a-passo para o cálculo de logP pelo programa MarvinSketch, bem como os espectros de RMN ^1H , ^{13}C , IV, HRMS

e demais análises de caracterização do produto hidrolisado, estão disponíveis em <http://quimicanova.sbg.org.br>, na forma de arquivo PDF, e possuem acesso livre.

REFERÊNCIAS

- Lemke, T. L.; Williams, D. A.; Roche, V. F.; Zito, S. W.; *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, 7th ed., Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2008.
- World Health Organization - Cardiovascular diseases. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>, acessado em: Maio 2015.
- Istvan, E. S.; Deisenhofer, J.; *Science* **2001**, 292, 1160.
- Brunton, L. L.; Chabner, B. A.; Knollmann, B. C.; *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman*, 12th ed., McGraw-Hill: New York, 2012.
- Viegas-Júnior, C.; Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J.; *Quim. Nova* **2006**, 29, 326.
- Anderson, P. S.; *Annu. Rep. Med. Chem.* **2012**, 47, 3.
- Tobert, J. A.; *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, 2, 517.
- Stokker, G. E.; Hoffman, W. F.; Alberts, A. W.; Cragoe-Jr., E. J.; Deana, A. A.; Gilfillan, J. L.; Huff, J. W.; Novello, F. C.; Prugh, J. D.; Smith, R. L.; Willard, A. K.; *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 347.
- Hoffman, W. F.; Alberts, A. W.; Cragoe-Jr., E. J.; Deana, A. A.; Evans, B. E.; Gilfillan, J. L.; Gould, N. P.; Huff, J. W.; Novello, F. C.; Prugh, J. D.; Rittle, K. E.; Smith, R. L.; Stokker, G. E.; Willard, A. K.; *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 159.
- Stokker, G. E.; Alberts, A. W.; Anderson, P. S.; Cragoe-Jr., E. J.; Deana, A. A.; Gilfillan, J. L.; Hirshfield, J.; Holtz, W. J.; Hoffman, W. F.; Huff, J. W.; Lee, T. J.; Novello, F. C.; Prugh, J. D.; Rooney, C. S.; Smith, R. L.; Willard, A. K.; *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 170.
- Parise-Filho, R.; Polli, M. C.; Filho, S. B.; Garcia, M.; Ferreira, E. I.; *Braz. J. Pharm. Sci.* **2010**, 46, 393.
- Roche, V. F.; *Am. J. Pharm. Educ.* **2005**, 69, 546.
- Pereira, D. G.; *Quim. Nova* **2007**, 30, 171.
- Wermuth, C. G.; *The Practice of Medicinal Chemistry*, 3rd ed., Elsevier Academic Press: San Diego, 2008.
- Fazio, F.; Schneider, M. P.; *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 811.
- Marvin Beans 5.3.8 software – Calculator Plugins 2012. Chemaxon Ltd., Budapest, Hungary, 2012.