

HERRAMIENTAS PARA EL DISEÑO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y ANÁLISIS CUANTITATIVO DE RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA-BIORESPUESTA (Q.S.A.R.)

CURSO DE PROFUNDIZACIÓN PEDECIBA-QUÍMICA

NOVIEMBRE 2022

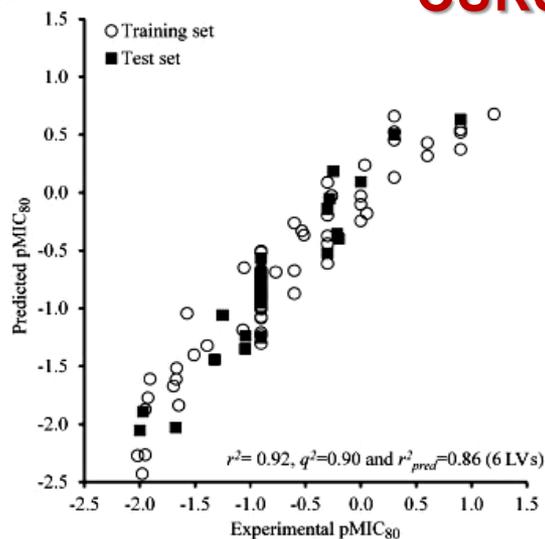
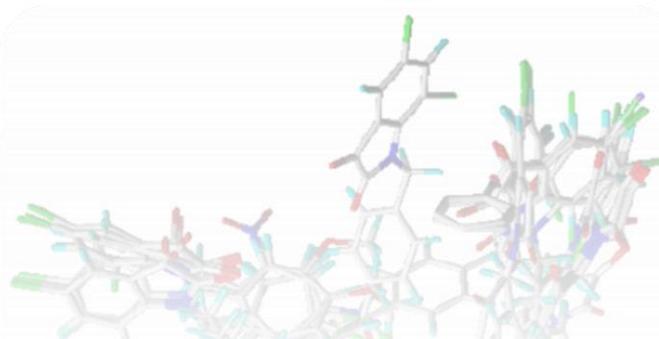
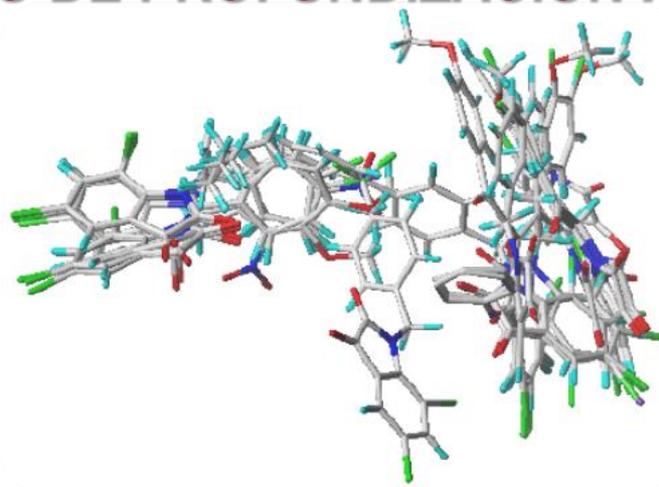
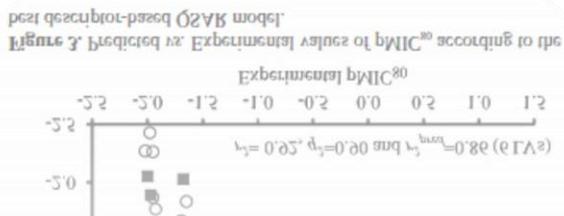


Figure 3. Predicted vs. Experimental values of pMIC₈₀ according to the best descriptor-based QSAR model.



Dr. Hugo Cerecetto
Dr. Marcos Couto

HERRAMIENTAS PARA EL DISEÑO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y ANÁLISIS CUANTITATIVO DE RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA-BIORESPUESTA (Q.S.A.R.)

PROGRAMA

1. HERRAMIENTAS PARA EL DISEÑO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS. Generalidades.

1.1. Propiedades tipo-fármaco.

1.2. Estrategias para integrar propiedades tipo-fármaco en el proceso de descubrimiento de agentes bioactivos.

1.3. Optimización química del líder: i) ¿Cómo mejorar la biodisponibilidad oral? ii) ¿Cómo controlar la estabilidad metabólica? iii) ¿Cómo controlar la estabilidad plasmática? iv) ¿Cómo mejorar la penetración de la barrera hematoencefálica? v) ¿Cómo evitar la inhibición/inducción de las CYPs? vi) ¿Cómo evitar la interacción con hERG? vii) ¿Cómo prevenir la toxicidad?

2. DISEÑO DE SERIES.

2.1. Métodos de optimización directa.

2.2. Métodos de exploración completa del campo estructural.

3. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA-BIORESPUESTA.

Antecedentes S.A.R. y Q.S.A.R. Trabajos de Ferguson, Hansch y Kubinyi.

3.1. Parámetros Biológicos. Respuesta biológica a dosis fija y a dosis variable.

3.2. Descriptores Fisicoquímicos.

3.2.1. Descriptores hidrofóbicos. Coeficiente de reparto, constante de Hansch (π).

Determinación experimental y teórica de la hidrofobicidad.

HERRAMIENTAS PARA EL DISEÑO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y ANÁLISIS CUANTITATIVO DE RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA-BIORESPUESTA (Q.S.A.R.)

PROGRAMA

1. HERRAMIENTAS PARA EL DISEÑO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS. Generalidades.

1.1. Propiedades tipo-fármaco.

1.2. Estrategias para integrar propiedades tipo-fármaco en el proceso de descubrimiento de agentes bioactivos.

1.3. Optimización química del líder: i) ¿Cómo mejorar la biodisponibilidad oral? ii) ¿Cómo controlar la estabilidad metabólica? iii) ¿Cómo controlar la estabilidad plasmática? iv) ¿Cómo mejorar la penetración de la barrera hematoencefálica? v) ¿Cómo evitar la inhibición/inducción de las CYPs? vi) ¿Cómo evitar la interacción con hERG? vii) ¿Cómo prevenir la toxicidad?

2. DISEÑO DE SERIES.

2.1. Métodos de optimización directa.

2.2. Métodos de exploración completa del campo estructural.

3. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE RELACIÓN ESTRUCTURA QUÍMICA-BIORESPUESTA.

Antecedentes S.A.R. y Q.S.A.R. Trabajos de Ferguson, Hansch y Kubinyi.

3.1. Parámetros Biológicos. Respuesta biológica a dosis fija y a dosis variable.

3.2. Descriptores Físicoquímicos.

3.2.1. Descriptores hidrofóbicos. Coeficiente de reparto, constante de Hansch (π).

Determinación experimental y teórica de la hidrofobicidad.

**AGENTE QUIMIOTERÁPICO
LÍDER**

**PROBLEMAS
ASOCIADOS**

**ACTIVIDAD
ASOCIADA**

SELECTIVIDAD

TOXICIDAD

BIODISPONIBILIDAD

**SOSLYAR
PROBLEMAS DE
PATENTE**

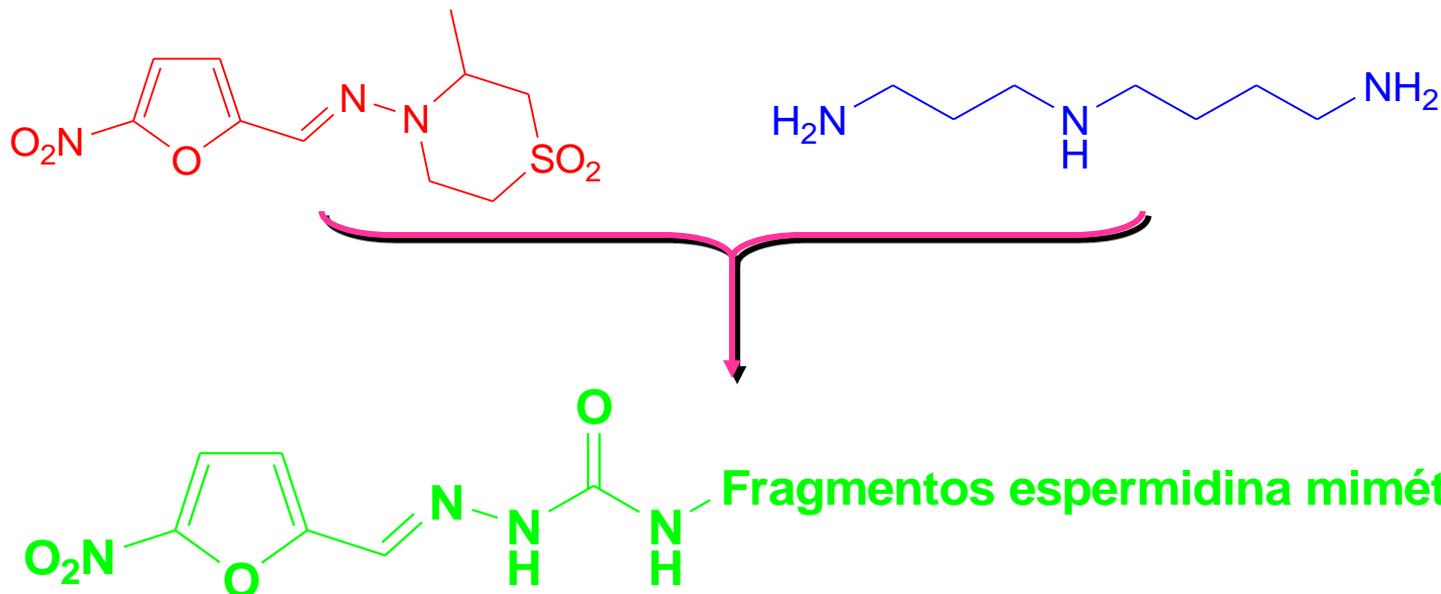
**MÉTODO
VARIACIONAL**

**SEGUNDA GENERACIÓN DE
COMPUESTOS**

**PRODUCCIÓN DE
SEGUNDA GENERACIÓN
DE QUIMIOTERÁPICOS**

**MÉTODO
RACIONAL**

Ej.



Il Farmaco

Volume 53, Issue 2, February 1998, Pages 89-94

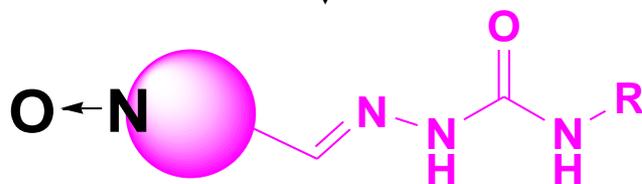
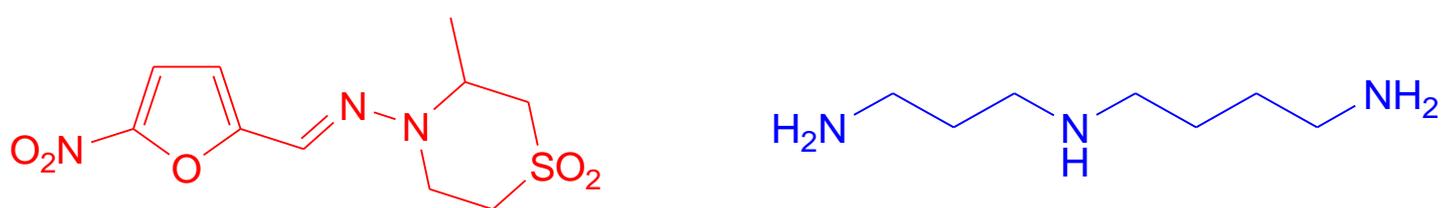


Regular paper

Synthesis and anti-trypanosomal activity of novel 5-nitro-2-furaldehyde and 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde semicarbazone derivatives

Hugo Cerecetto ^a, Rossanna Di Maio ^a, Gerardo Ibarruri ^a, Gustavo Seoane ^a✉, Ana Denicola ^b, Gonzalo Peluffo ^b, Celia Quijano ^b, Margot Paulino ^c

Ej.

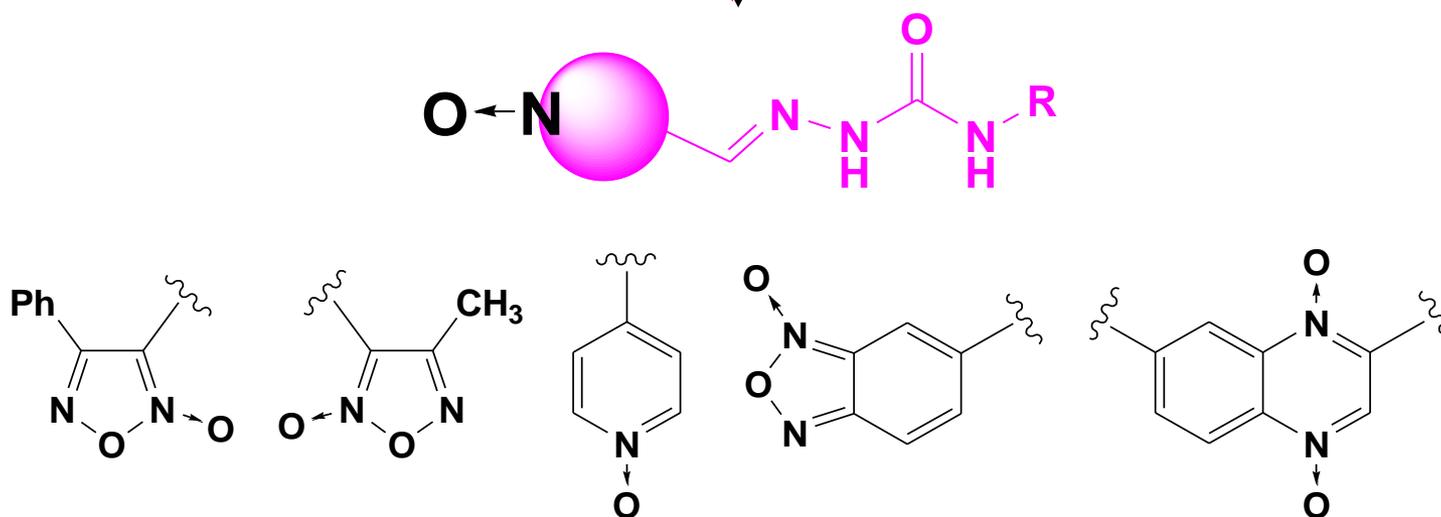


Journal of Medicinal Chemistry

Article

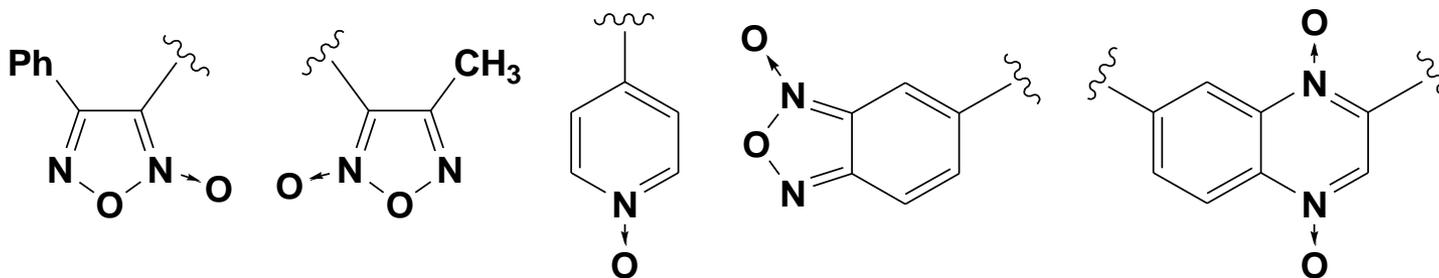
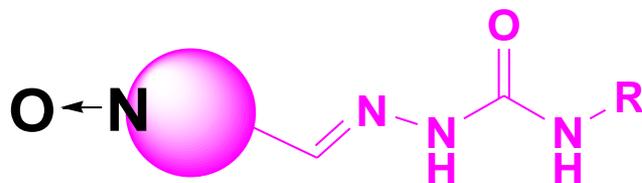
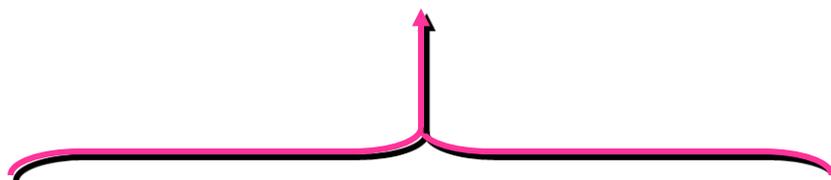
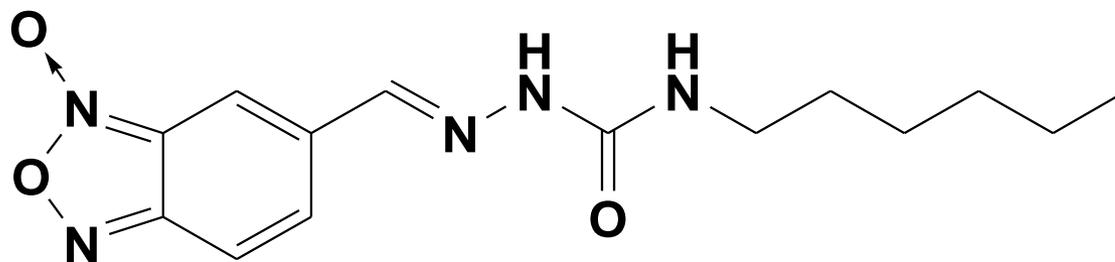
1,2,5-Oxadiazole *N*-Oxide Derivatives and Related Compounds as Potential Antitrypanosomal Drugs: Structure–Activity Relationships

Hugo Cerecetto^{*†}, Rossanna Di Maio[†], Mercedes González[†], Mariela Risso[†], Patricia Saenz[†], Gustavo Seoane^{*†}, Ana Denicola[†], Gonzalo Peluffo^{†‡}, Celia Quijano^{†‡}, and Claudio Olea-Azar[§]

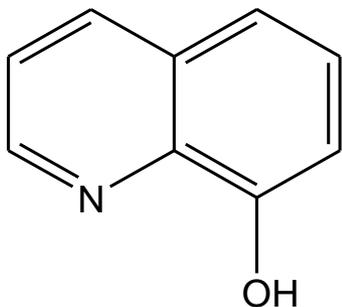


Ej.

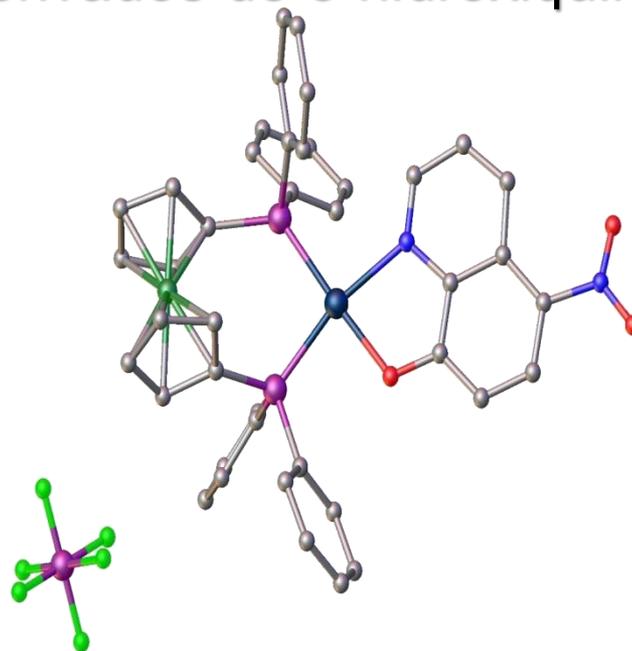
Y AHORA, ¿QUÉ SE HACE?



Ej. Compuestos heterobimetálicos derivados de 8-hidroxiquinoleína



8-hydroxyquinoline (8HQ) derivatives



Compound	J774 IC ₅₀ / μM	<i>T. brucei</i> IC ₅₀ / μM	SI ^a
8HQ	16.6	12.4	1
[Pd(8HQ-H)(dppf)](PF ₆)	8.5	0.9	9
[Pt(8HQ-H)(dppf)](PF ₆)	3.4	0.3	11
SI: IC ₅₀ J774 / IC ₅₀ <i>T. brucei</i>			



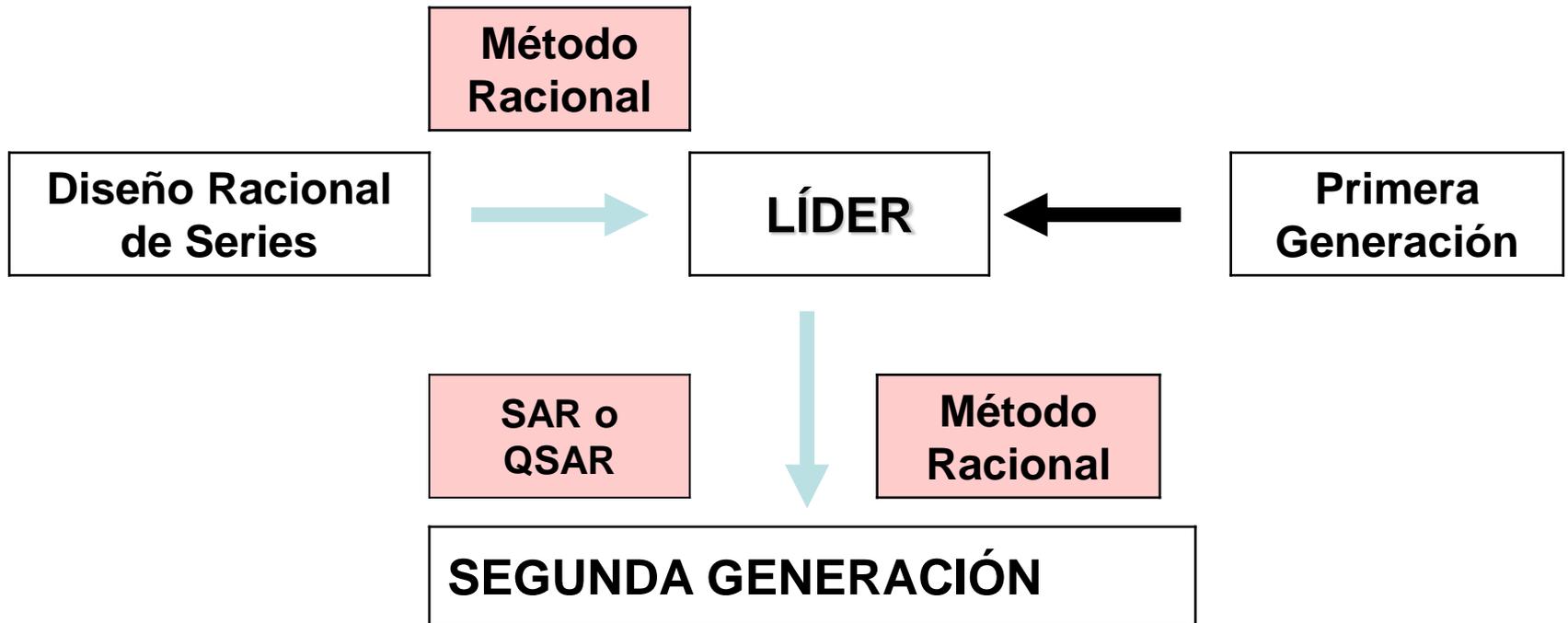
Y AHORA, ¿QUÉ SE HACE?

New heterobimetallic ferrocenyl derivatives: Evaluation of their potential as prospective agents against trypanosomatid parasites and *Mycobacterium tuberculosis*

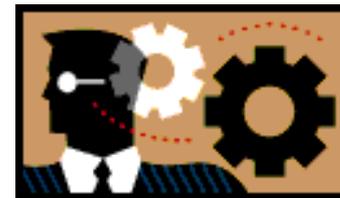
Ferriannys Rivas^a, Andrea Medeiros^{b,c}, Esteban Rodríguez Arce^a, Marcelo Comini^b, Camila M. Ribeiro^d, Fernando R. Pavan^d, Dinorah Gambino^{a,*}



2. DISEÑO DE SERIES

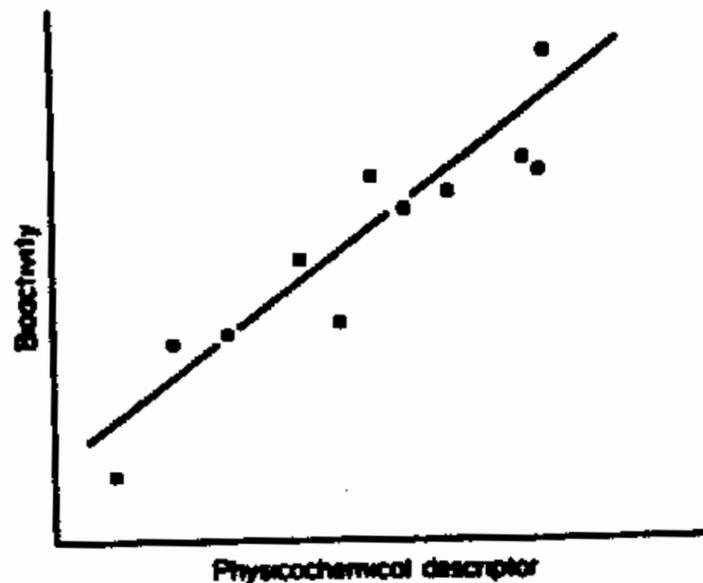
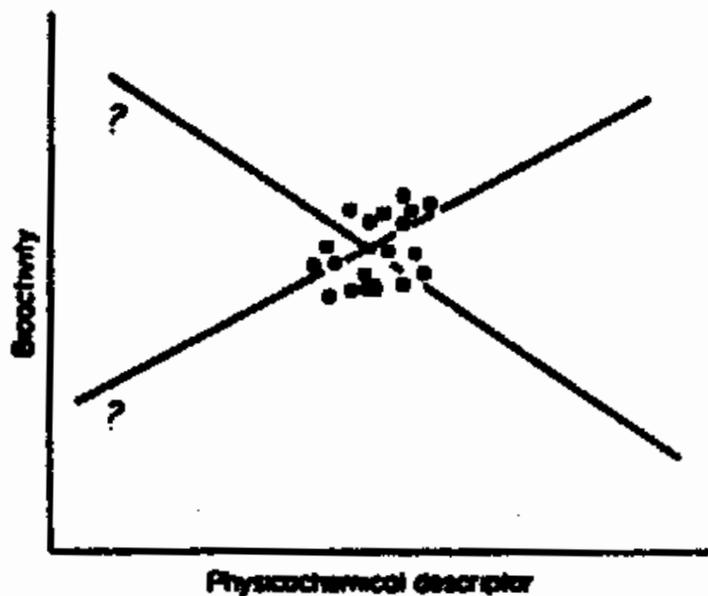


2. DISEÑO DE SERIES



“Un día perdido en el diseño de los compuestos permitirá ganar eficacia, minimizando la información obtenida y ahorrando tiempo”

Ej.



2. DISEÑO DE SERIES



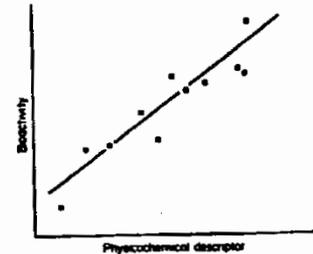
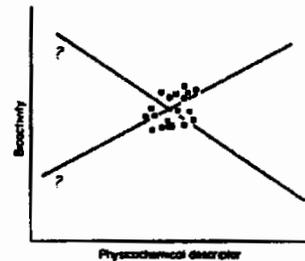
COMPITEN CON EL CONCEPTO DE DISEÑO DE SERIES TRADICIONAL:

- CUALQUIER TIPO DE INFORMACIÓN PREVIA:
- INFORMACIÓN DE INTERACCIONES FÁRMACO-BIORECEPTOR (DOCKING)
- IDENTIFICACIÓN DEL FARMACÓFORO
- REQUERIMIENTOS QUÍMICOS, BIOQUÍMICOS O FÍSICOQUÍMICOS DEL ESQUELETO BASE DEL FÁRMACO
- ACCESIBILIDAD SINTÉTICA

EN CASO CONTRARIO SIEMPRE ES BUENO APLICAR UN DISEÑO DE SERIES TRADICIONAL

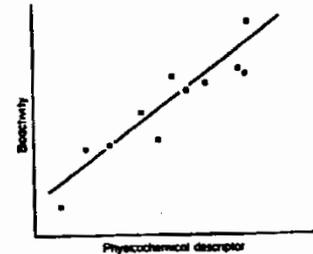
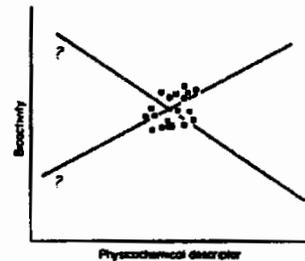
UNA SERIE BIEN DISEÑADA DEBE CUMPLIR QUE:

- Cada variable relevante debe poseer una varianza grande. O sea variar en un rango importante que permita generalizar los resultados en todo el rango de la variable.



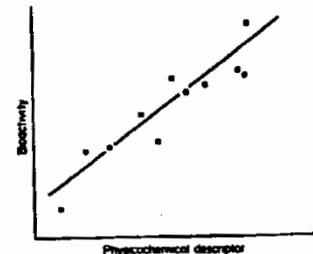
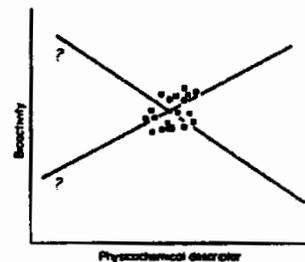
UNA SERIE BIEN DISEÑADA DEBE CUMPLIR QUE:

- Cada variable relevante debe poseer una varianza grande. O sea variar en un rango importante que permita generalizar los resultados en todo el rango de la variable.
- Cada variable debe variar en forma independiente de las otras, es decir la covarianza debe ser mínima (ortogonalidad).



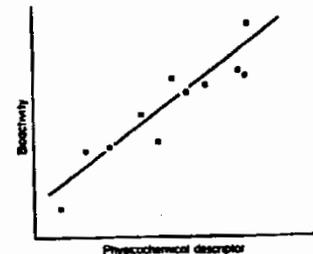
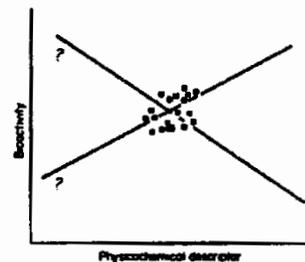
UNA SERIE BIEN DISEÑADA DEBE CUMPLIR QUE:

- Cada variable relevante debe poseer una varianza grande. O sea variar en un rango importante que permita generalizar los resultados en todo el rango de la variable.
- Cada variable debe variar en forma independiente de las otras, es decir la covarianza debe ser mínima (ortogonalidad).
- El número de compuestos de la serie debe permitir analizar todas las variables relevantes (4 a 5 compuestos por cada variable).



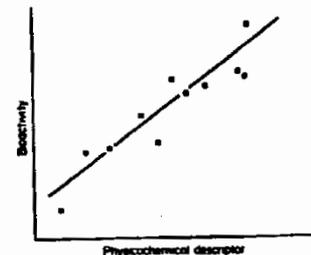
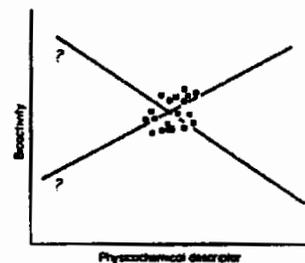
UNA SERIE BIEN DISEÑADA DEBE CUMPLIR QUE:

- Cada variable relevante debe poseer una varianza grande. O sea variar en un rango importante que permita generalizar los resultados en todo el rango de la variable.
- Cada variable debe variar en forma independiente de las otras, es decir la covarianza debe ser mínima (ortogonalidad).
- El número de compuestos de la serie debe permitir analizar todas las variables relevantes (4 a 5 compuestos por cada variable).
- Los compuestos propuestos deben ser accesibles desde el punto de vista sintético.



UNA SERIE BIEN DISEÑADA DEBE CUMPLIR QUE:

- Cada variable relevante debe poseer una varianza grande. O sea variar en un rango importante que permita generalizar los resultados en todo el rango de la variable.
- Cada variable debe variar en forma independiente de las otras, es decir la covarianza debe ser mínima (ortogonalidad).
- El número de compuestos de la serie debe permitir analizar todas las variables relevantes (4 a 5 compuestos por cada variable).
- Los compuestos propuestos deben ser accesibles desde el punto de vista sintético.
- Los compuestos deberán ser razonablemente estables desde el punto de vista químico y metabólico.



UNA SERIE BIEN DISEÑADA DEBE CUMPLIR QUE:

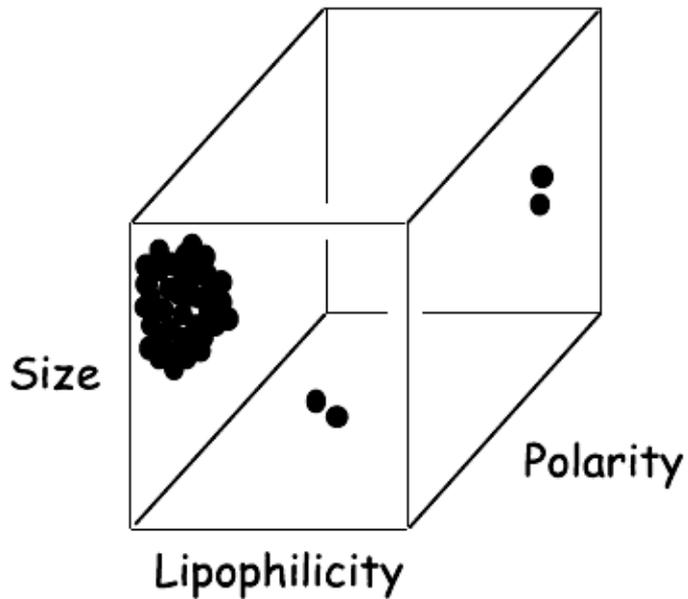
- Cada variable relevante debe poseer una varianza grande. O sea variar en un rango importante que permita generalizar los resultados en todo el rango de la variable.
- Cada variable debe variar en forma independiente de las otras, es decir la covarianza debe ser mínima (ortogonalidad).
- El número de compuestos de la serie debe permitir analizar todas las variables relevantes (4 a 5 compuestos por cada variable).
- Los compuestos propuestos deben ser accesibles desde el punto de vista sintético.
- Los compuestos deberán ser razonablemente estables desde el punto de vista químico y metabólico.

EJEMPLO DE UN MAL DISEÑO, UNA SERIE ALQUÍLICA MUY GRANDE CON EL FIN DE AUMENTAR LA VARIANZA, SIN EMBARGO LA COVARIANZA TAMBIEN SERÁ ALTA DADO QUE TAMAÑO E HIDROFOBICIDAD SERÁN COLINEALES.

UNA SERIE BIEN DISEÑADA DEBE CUMPLIR QUE:

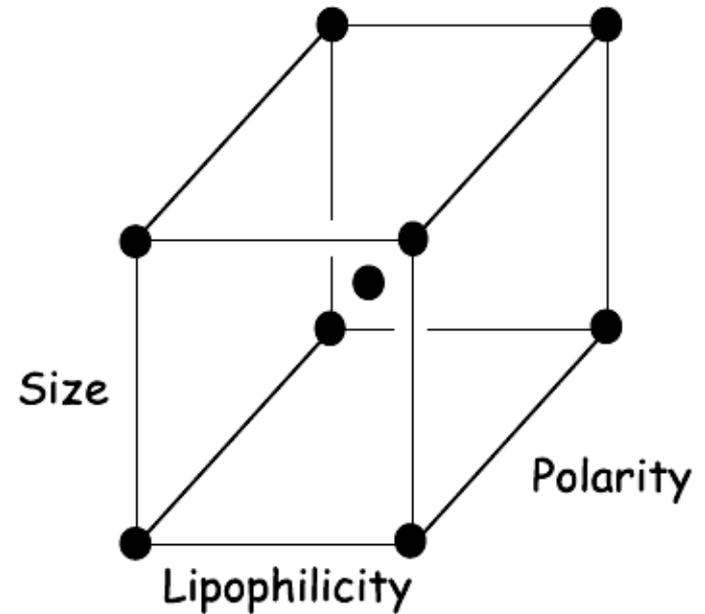
No Design

inefficient



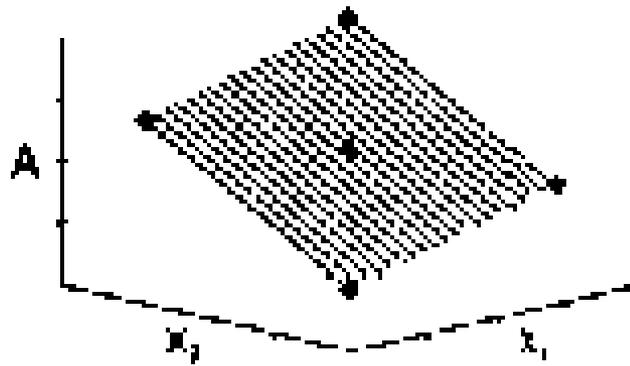
Full Factorial Design

efficient

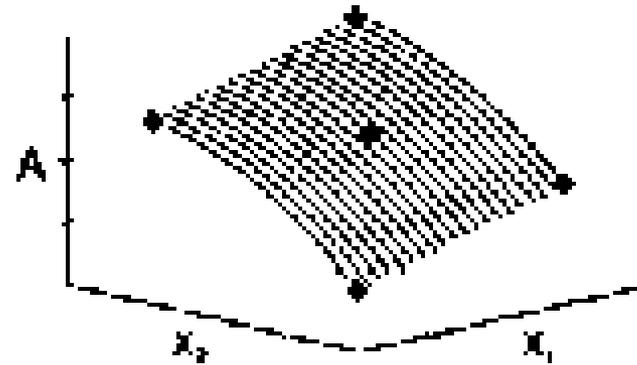


Experimental Design

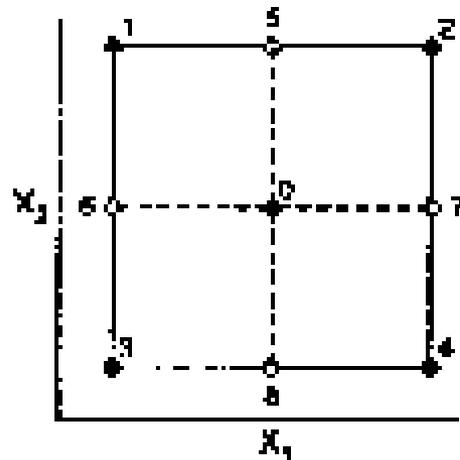
El espacio multidimensional de las variables que participan en la actividad biológica debe ser profundamente estudiado en el diseño de una serie de exploración de una bio-respuesta determinada:



(a)



(b)



MÉTODOS DE DISEÑO:

TODOS SE BASAN EN SUPONER QUE LAS VARIABLES ANALIZADAS SON RELEVANTES PARA LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA, SIN EMBARGO ESTAS VARIABLES NO SUELEN CONOCERSE HASTA LA FASE FINAL, O SEA HASTA TENER UN Q.S.A.R.

POR LO QUE SE CORRE EL PELIGRO DE DEJAR ALGUNA VARIABLE FUERA

PARA EVITAR ESTO SE ELIGE AL MENOS UNA VARIABLE DENTRO DE LOS DESCRIPTORES GENERALES (HIDROFÓBICO, ESTÉRICO Y ELECTRÓNICO)

MÉTODOS DE DISEÑO:

MÉTODOS DE OPTIMIZACIÓN DIRECTA

MÉTODOS DE EXPLORACIÓN COMPLETA DEL CAMPO ESTRUCTURAL

MÉTODOS DE OPTIMIZACIÓN DIRECTA

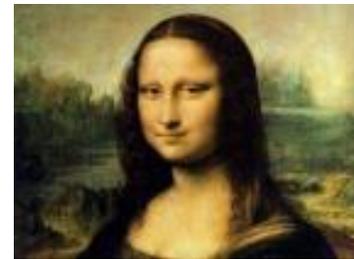
SE BASAN EN LA OPTIMIZACIÓN DE LA SERIE, ORIENTANDO LA SÍNTESIS SEGÚN LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA (PUEDE SER VISTO COMO UN PROCEDIMIENTO MATEMÁTICO DE ITERACIÓN Y TIENE UNA CIERTA SIMILARIDAD AL MÉTODO VARIACIONAL)

1. Método de Fibonacci

2. Método Simplex

3. Diagramas de Topliss

1. Método de Fibonacci

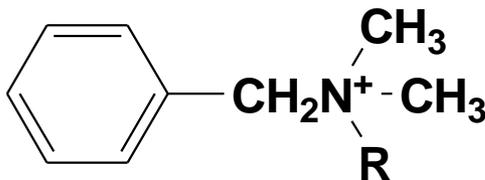


El matemático italiano Fibonacci describió que la serie de números,

1, 2, 3, 5, 8, 13, 21,

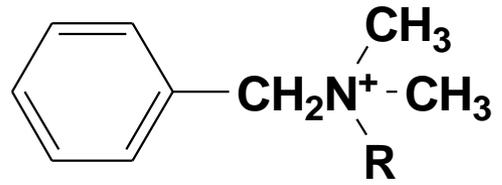
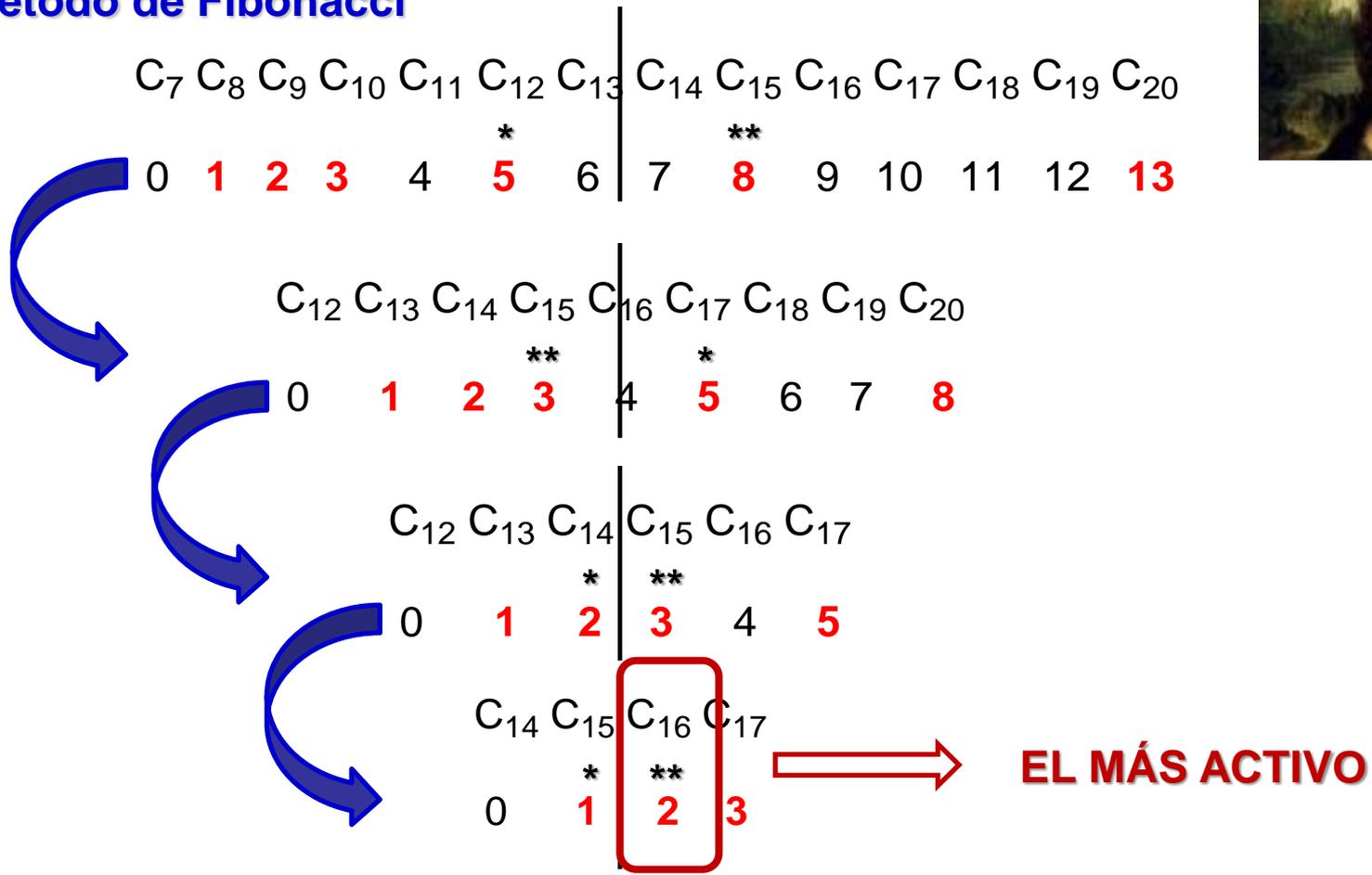
puede ser la base de un método de investigación eficiente para optimizar el valor de una determinada propiedad.

Bustard, aplicó el concepto sobre alquilamonios de estructura:



R: C₇ – C₂₀

1. Método de Fibonacci



R: C₇ – C₂₀

a) T.M. Bustard. *J. Med. Chem.*, 1974, 17, 777. b) N. Santora, K. Auyang. *J. Med. Chem.*, 1975, 18, 959.

1. Método de Fibonacci



EL MÉTODO ES APLICABLE A ESTRUCTURAS QUE SE PUEDAN ORDENAR SEGÚN LOS VALORES ASCENDENTES DE UNA DETERMINADA PROPIEDAD

PARTICULARMENTE ES ÚTIL CUANDO SE UTILIZA EN EL ANÁLISIS RETROSPECTIVO DE UNA SERIE DONDE YA SE HA DETERMINADO POR OTROS MÉTODOS QUE LA ACTIVIDAD ESTÁ DOMINADA POR UNA PROPIEDAD FISICOQUÍMICA

IGUALMENTE ES ÚTIL PARA EL MANEJO DE DATOS BIOLÓGICOS CUALITATIVOS

SE HA PROPUESTO EL MÉTODO DE FIBONACCI CONSIDERANDO VARIAS PROPIEDADES A LA VEZ, PERO EN GENERAL NO ES RECOMENDABLE PARA LA MAYORÍA DE LOS CASOS QUE SE DAN EN QSAR

2. Método Simplex

Un *Simplex* es una figura geométrica definida por un número de puntos igual a $(n+1)$, donde “n” es el número de dimensiones o variables analizadas en el hiperespacio que define el campo estructural

En el diseño sobre dos variables el *simplex* es un triángulo, para tres variables será un tetraedro, etc.

Para dos variables se puede proceder manualmente, para más variables es necesario “programas”

2. Método Simplex

- EL MÉTODO COMIENZA CON LA SELECCIÓN DE $(n+1)$ COMPUESTOS DEL GRUPO BÁSICO.

SI TENEMOS LAS VARIABLES π (LIPOFILIA) Y σ (CARACTERÍSTICA ELECTRÓNICA) COMENZAREMOS CON TRES COMPUESTOS.

- EL COMPUESTO MENOS ACTIVO DE LOS SELECCIONADOS SERÁ EL CENTRO DE GRAVEDAD DE LOS RESTANTES.

LA “IMAGEN ESPECULAR”, EN EL HIPERESPACIO, DEL MENOS ACTIVO SERÁ EL NUEVO COMPUESTO A SINTETIZAR.

EL NUEVO COMPUESTO DESARROLLADO SUSTITUIRÁ AL MENOS ACTIVO EN EL ANÁLISIS.

- CON LOS NUEVOS COMPUESTOS SE REPITE EL PROCESO.

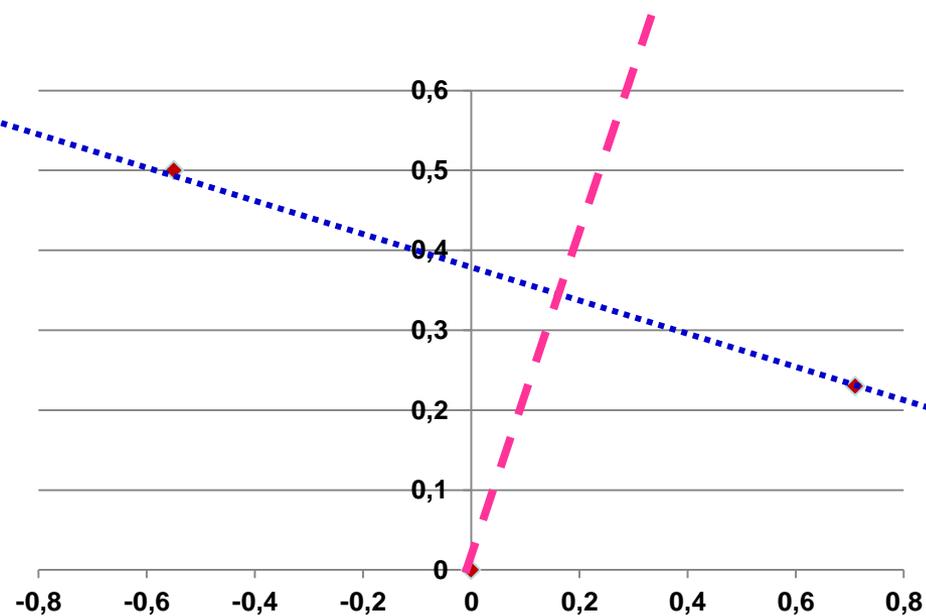
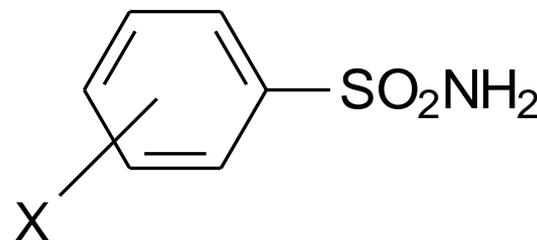
EL MÉTODO SE REPITE HASTA ENCONTRAR EL COMPUESTO DE MÁXIMA ACTIVIDAD DENTRO DEL GRUPO BÁSICO EN ESTUDIO.

2. Método Simplex

Ej.
Sulfonamidas natriuréticas

El método comienza seleccionando (n+1) compuestos del grupo básico

X	π	σ	RB
H	0.00	0.00	0.155
4-Cl	0.71	0.23	0.301
4-Ac	-0.55	0.50	0.462



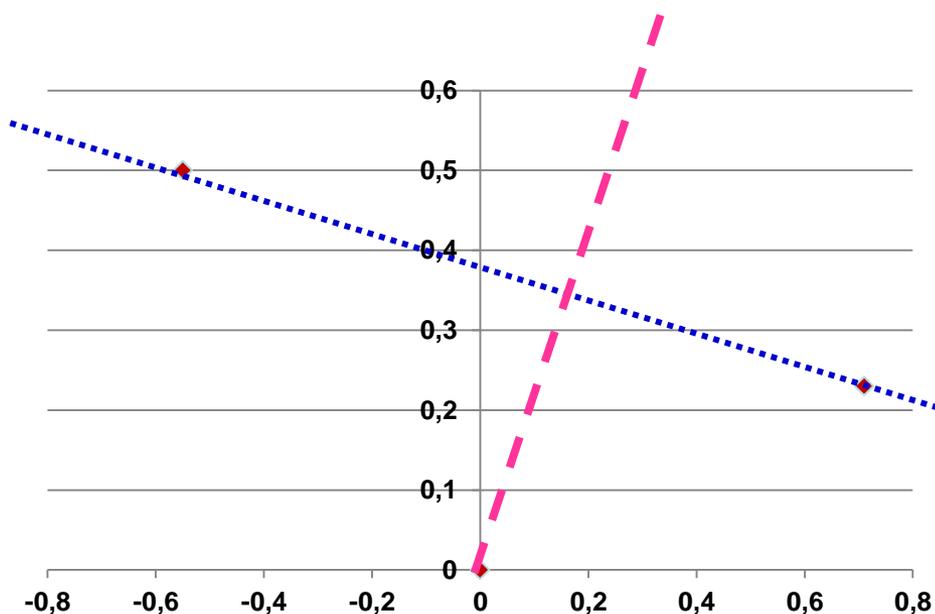
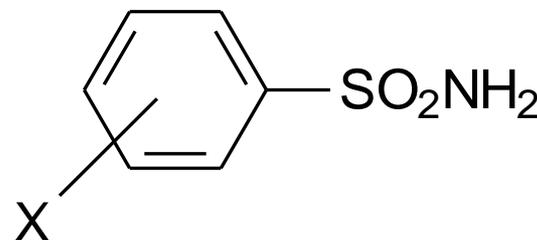
2. Método Simplex

Ej.
Sulfonamidas natriuréticas

El método comienza seleccionando (n+1) compuestos del grupo básico

X	π	σ	RB
H	0.00	0.00	0.155
4-Cl	0.71	0.23	0.301
4-Ac	-0.55	0.50	0.462

X	π	σ	RB
4-NO ₂	0.01	0.78	0.845



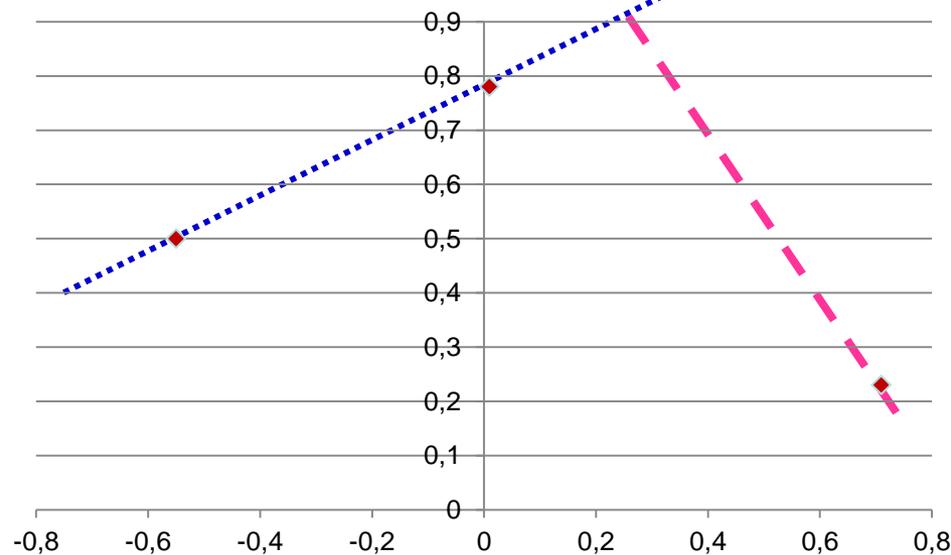
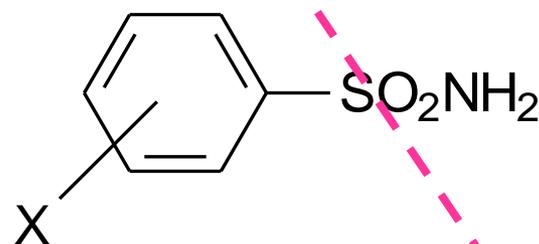
2. Método Simplex

Ej.
Sulfonamidas natriuréticas

El método comienza seleccionando (n+1) compuestos del grupo básico

X	π	σ	RB
H	0.00	0.00	0.155
4-Cl	0.71	0.23	0.301
4-Ac	-0.55	0.50	0.462

X	π	σ	RB
4-NO ₂	0.01	0.78	0.845



2. Método Simplex

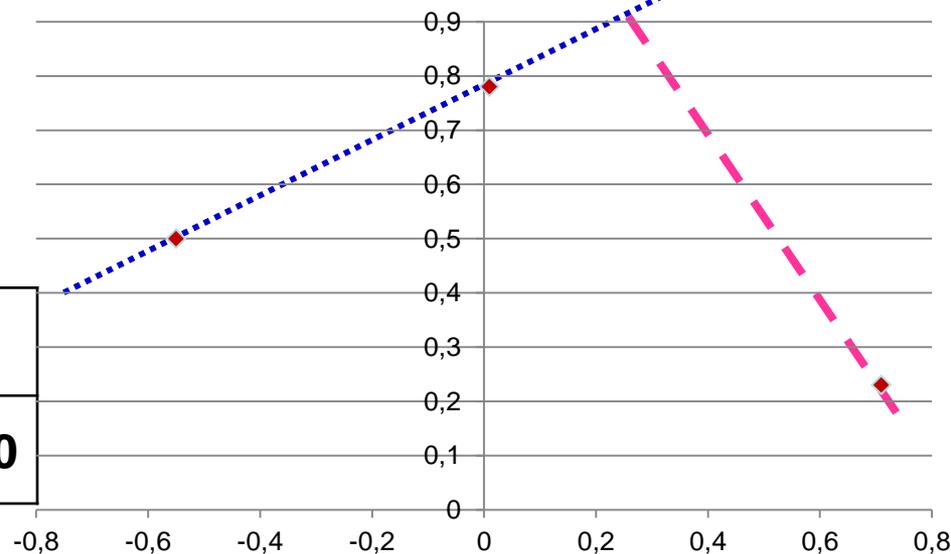
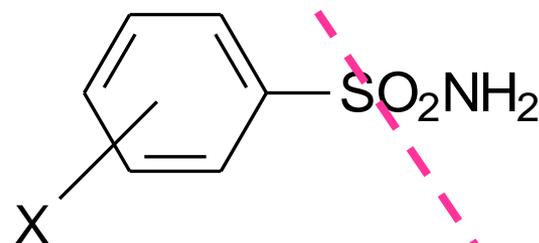
Ej.
Sulfonamidas natriuréticas

El método comienza seleccionando (n+1) compuestos del grupo básico

X	π	σ	RB
H	0.00	0.00	0.155
4-Cl	0.71	0.23	0.301
4-Ac	-0.55	0.50	0.462

X	π	σ	RB
4-NO ₂	0.01	0.78	0.845

X	π	σ	RB
4-CN	-0.57	0.71	1.020

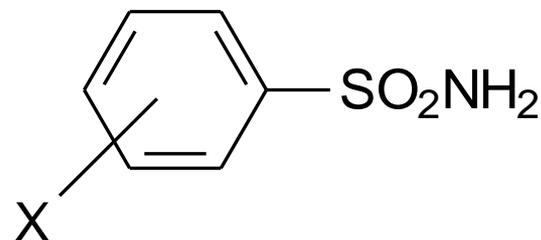


2. Método Simplex

Ej.
Sulfonamidas natriuréticas

El método comienza seleccionando (n+1) compuestos del grupo básico

X	π	σ	RB
H	0.00	0.00	0.155
4-Cl	0.71	0.23	0.301
4-Ac	-0.55	0.50	0.462



X	π	σ	RB
4-NO ₂	0.01	0.78	0.845

X	π	σ	RB
4-CN	-0.57	0.71	1.020

X	π	σ	RB
3-NO ₂	-0.28	0.71	0.690
3-Cl	0.71	0.37	0.318
4-OMe	-0.02	-0.27	0.238
4-Me	0.56	-0.17	0.182
3-Me	0.56	-0.07	0.176

2. Método Simplex

- DESVENTAJA:

ESTA TÉCNICA, COMO OTROS MÉTODOS DE OPTIMIZACIÓN, NO GARANTIZA QUE EL INVESTIGADOR ENCUENTRE EL MÁXIMO GLOBAL YA QUE EL VALOR ÓPTIMO HALLADO PUEDE TRATARSE SÓLO DE UN MÁXIMO LOCAL.

- VENTAJA:

PUEDE APLICARSE A DATOS BIOLÓGICOS CUALITATIVOS.

3. Diagramas de Topliss

Topliss desarrolló este tipo de diagramas tanto para sistemas aromáticos como alifáticos

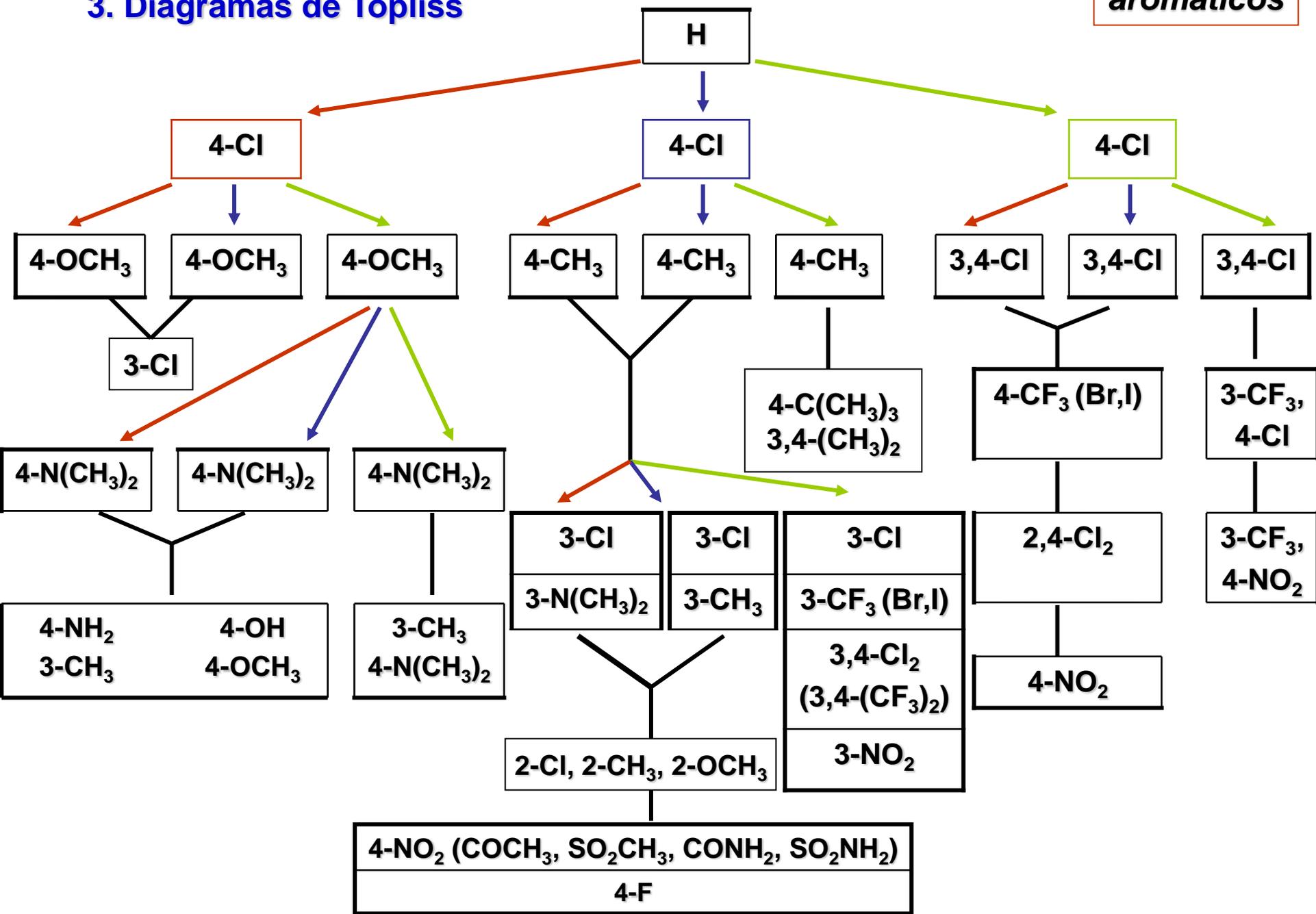
En este diagrama los sustituyentes son dispuestos gráficamente

Se escogen nuevos sustituyentes, para producir nuevas generaciones de compuestos, de acuerdo a un árbol de decisión

Para la construcción del diagrama, Topliss seleccionó contribuciones hidrofóbicas, electrónicas y estéricas (π y σ)

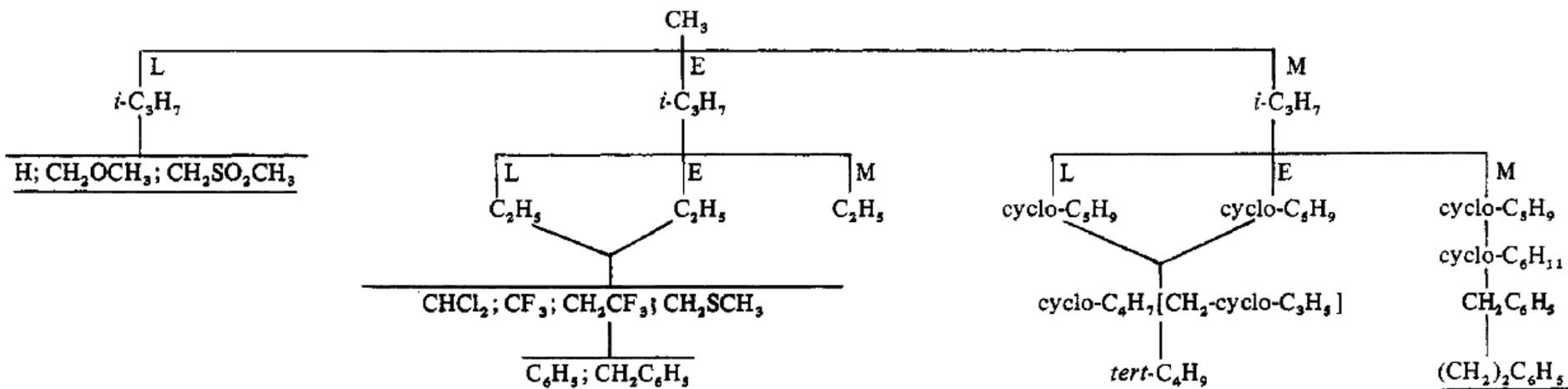
3. Diagramas de Topliss

aromáticos



3. Diagramas de Topliss

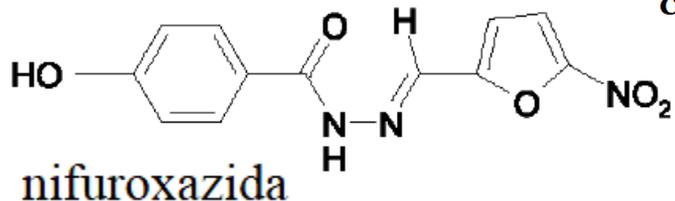
Scheme II. Operational Scheme. Side Chain



M = More active, E = equiactive, L = less active. Descending lines indicate sequence. Square brackets indicate alternates.

3. Diagramas de Topliss

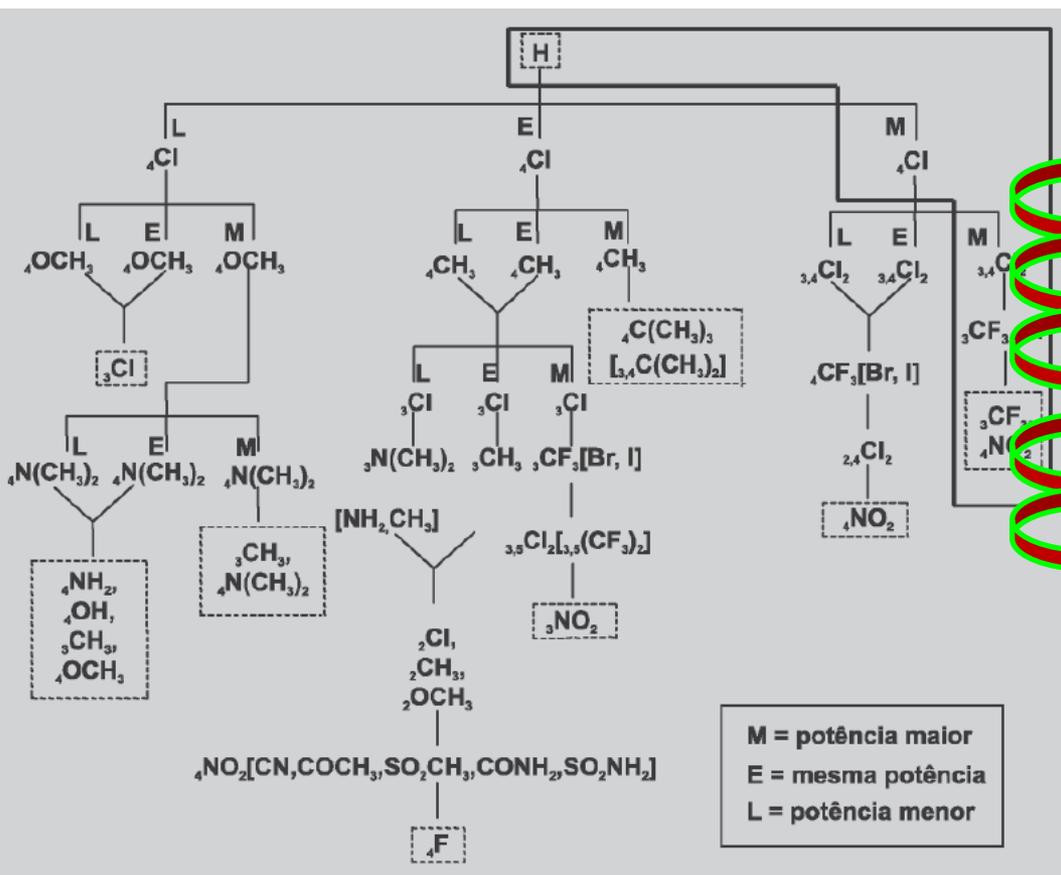
Aplicação de estudos de QSAR-2D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* multi-resistente (MRSA)



Andrea Masunari, Leoberto Costa Tavares*

TABELA I - Potência antimicrobiana das 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazidas substituídas

R ₁	R ₂	MIC(mM)	Potência Log 1/MIC
H	H	16,67	4,78
Cl	H	5,52	5,26
Cl	Cl	2,21	5,66
I	H	14,01	4,85
Br	H	2,12	5,67
NO ₂	H	5,06	5,29
COCH ₃	H	0,44	6,36
CN	H	7,02	5,15
SO ₂ NH ₂	H	31,75	4,50



MÉTODOS DE EXPLORACIÓN COMPLETA DEL CAMPO ESTRUCTURAL

A DIFERENCIA DE LOS MÉTODOS DE EXPLORACIÓN DIRECTA EN ESTOS MÉTODOS LA SÍNTESIS NO ESTÁ ORIENTADA POR LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA (LA SÍNTESIS DE TODOS LOS COMPUESTOS DEBERÍAN SER HECHAS COMO PRIMER ETAPA EN TODO EL PROCESO DE IDENTIFICACIÓN DE LÍDERES)

SE BASAN EN LA EXPLORACIÓN DEL ESPACIO k -DIMENSIONAL FORMADO POR LAS “ k ” VARIABLES FISICOQUÍMICAS EN ESTUDIO Y SELECCIONAN UN CONJUNTO DE SUSTITUYENTES QUE ESTÉN DISTRIBUIDOS HOMOGÉNEAMENTE EN DICHO ESPACIO

1. Diagramas 2-D de Craig
2. Diseño 2^n -Factorial
3. Análisis de Clusters o Conglomerados

1. Diagramas 2-D de Craig

SE REPRESENTA EN LOS EJES CARTESIANOS DOS VARIABLES A ANALIZAR. DEL PLANO RESULTANTE SE ELIGEN LOS COMPUESTOS QUE CUBREN LOS CUATRO CUADRANTES CON EL FIN DE ASEGURARSE LA MÁXIMA VARIABILIDAD Y LA FALTA DE COLINEARIDAD

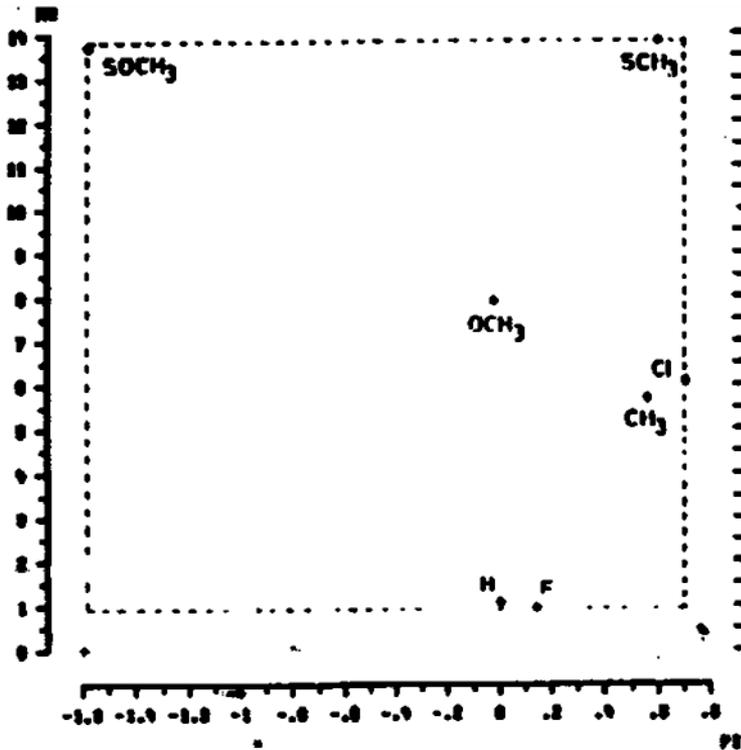
EXISTEN LISTAS DE SUSTITUYENTES BASADAS EN DIAGRAMAS electrónico-lipofílico, lipofílico-estérico, etc.

INCONVENIENTE:

LAS VARIABLES ELEGIDAS PUEDEN NO SER LAS VERDADERAMENTE RELEVANTES PARA LA ACTIVIDAD

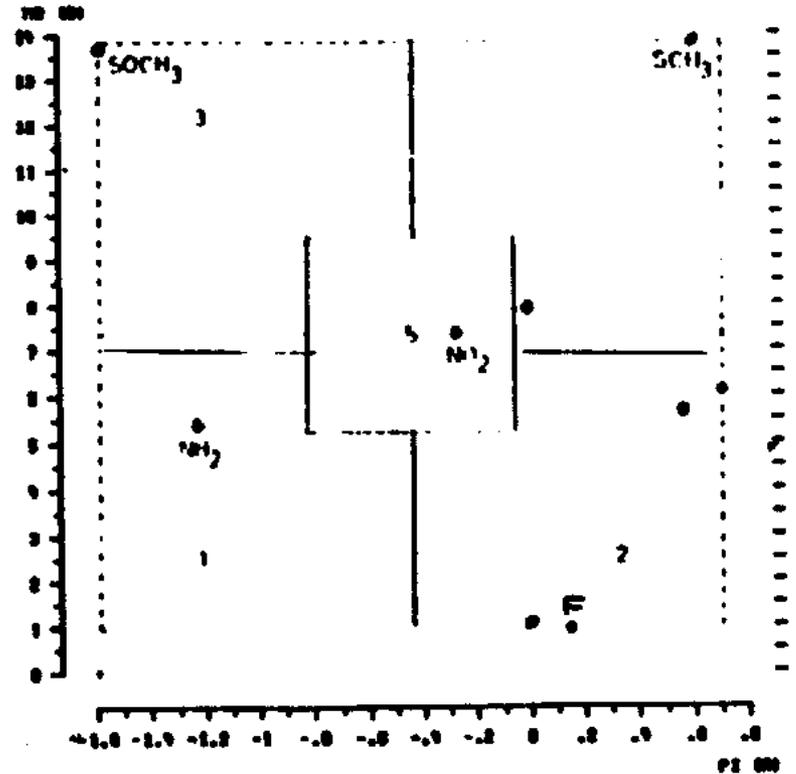
1. Diagramas 2-D de Craig

Ej.



Diagrams showing a set of substituents from Table III enclosed by the broken lines) in ν MR space. Reprinted with permission from Ref. 35.

MAL DISEÑO



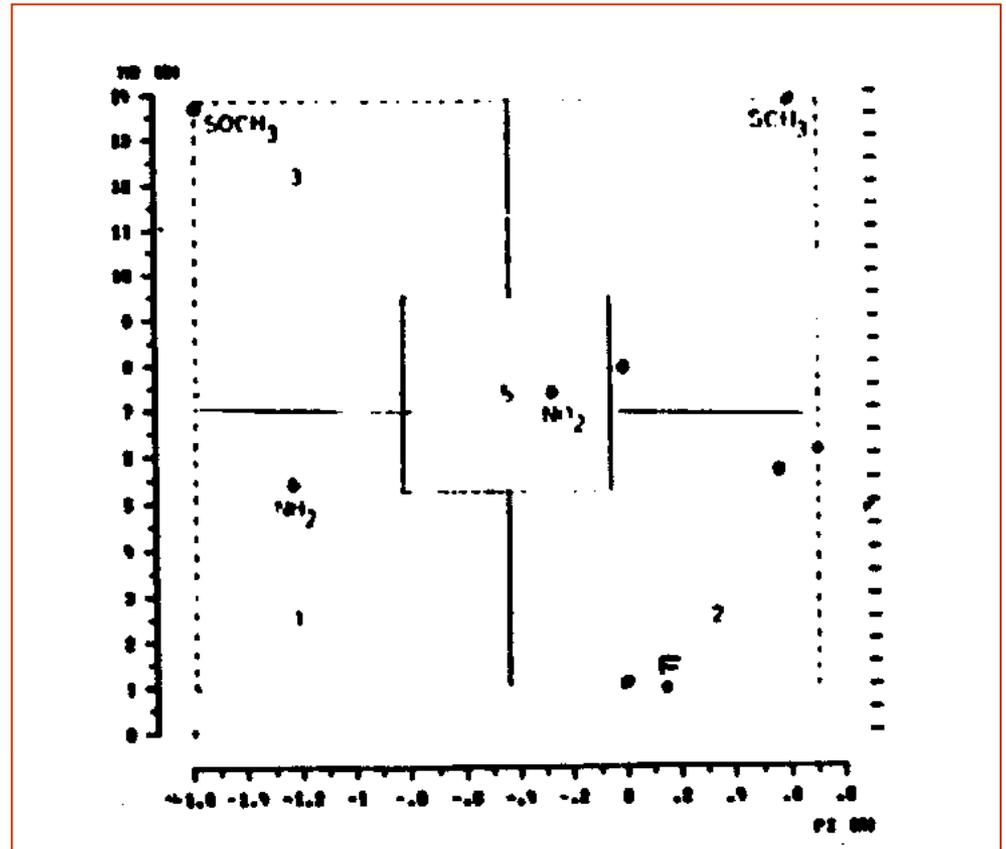
Diagrams showing a set of substituents from Table III after completion by ν MR and ν CR. Reprinted with permission from Ref. 35.

BUEN DISEÑO

2. Diseño 2ⁿ-Factorial

2ⁿ-Factorial design schemes for two (left) and three (right) parameters

Submes no.	A	B
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+
5	0	0



2. Diseño 2ⁿ-Factorial

2ⁿ-Factorial design schemes for two (left) and three (right) parameters

Subrun no.	A	B	Subrun no.	A	B	C
1	-	-	1	-	-	-
2	+	-	2	+	-	-
3	-	+	3	-	+	-
4	+	+	4	+	+	-
5	0	0	5	-	-	+
			6	+	-	+
			7	-	+	+
			8	+	+	+
			9	0	0	0

EL MANEJO DE ESQUEMAS 2ⁿ-FACTORIAL SE HACE TEDIOSO CUANDO SE MANEJAN MÁS DE 4 VARIABLES

Análisis multivariado

➤ **Regresión multivariada**

➤ **Análisis de cluster: HCA, kNN**

➤ **Análisis discriminante: LDA**

➤ **Análisis de componentes principales (PCA)**

3. Análisis de Cluster o Conglomerados

EL ANÁLISIS DE CLUSTER O CONGLOMERADOS FORMA GRUPOS DE SUSTITUYENTES CUYOS VALORES DE PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS EN ESTUDIO ES “PARECIDO”

LA AGRUPACIÓN DE LOS SUSTITUYENTES EN EL ESPACIO MULTIDIMENSIONAL SE FUNDAMENTA EN SU **DISTANCIA EUCLÍDEA**

EL ALGORITMO MÁS FRECUENTEMENTE USADO ES EL DEL **CENTROIDE**

UNA VEZ ELEGIDO EL MODELO DE CLUSTER A UTILIZAR (SEGÚN LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS ELEGIDAS):

- SE ELIGE UNO O MÁS SUSTITUYENTE DE CADA CLUSTER (EL O LOS MÁS FÁCIL DE SINTETIZAR). ESTOS SUSTITUYENTES FORMARÁN EL **GRUPO DE PRUEBA**
- SE SINTETIZAN Y EVALÚAN BIOLÓGICAMENTE LOS DERIVADOS
- UNA VEZ QUE SE IDENTIFICA EL CLUSTER RESPONSABLE DE ACTIVIDAD SE PROFUNDIZA EN EL MISMO (SÍNTESIS DE NUEVOS DERIVADOS CON SUSTITUYENTES PERTENECIENTES A DICHO CLUSTER Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA)

3. Análisis de Cluster o Conglomerados

EL ANÁLISIS CLUSTER FORMA GRUPOS DE SUSTITUYENTES CUYO VALOR DE PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS ES SIMILAR

Hansch-Leo	π , F , R , M_R , D_H , A_H
PARA AROMÁTICOS	
	-H, -Br, -CN, -OH, -SO₂NH₂, -OCF₃, -OC₆H₅, -NHCOC₆H₅, -OCH₃, n-C₄H₈

3. Análisis de Cluster o Conglomerados

EL ANÁLISIS CLUSTER FORMA GRUPOS DE SUSTITUYENTES CUYO VALOR DE PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS ES SIMILAR

Hansch-Leo	$\pi, F, \mathcal{R}_M, D_H, A_H$
PARA AROMÁTICOS	
-H, -Br, -CN, -OH, -SO₂NH₂, -OCF₃, -OC₆H₅, -NHCOC₆H₅, -OCH₃, n-C₄H₈	
Unger (criterio estadístico de D-óptimo, determinante de la matriz varianza-covarianza)	$\pi^2, \pi, F, \mathcal{R}_M, D_H, A_H$
PARA AROMÁTICOS	
-H, -F, -SO₂NH₂, -SO₂CH₃, -CF₃, n-OC₅H₁₁, -OC₆H₅, -NH₂, -N(CH₃)₂, -NO₂, n-C₄H₈, t-C₄H₈	

3. Análisis de Cluster o Conglomerados

Franke (Trazado de mapas bidimensionales de las matrices de correlación interclases)	π, F, R, MR
PARA AROMÁTICOS	
-H, -C₆H₅, -CH₃, -OH, i-OC₃H₇, -N(CH₃)₂, -SO₂NH₂, -COCH₃, -Cl, -I	

3. Análisis de Cluster o Conglomerados

Franke (Trazado de mapas bidimensionales de las matrices de correlación interclases)	π, F, \mathcal{R}, MR
PARA AROMÁTICOS	
-H, -C₆H₅, -CH₃, -OH, i-OC₃H₇, -N(CH₃)₂, -SO₂NH₂, -COCH₃, -Cl, -I	
Wootton (Trazado de mapas multidimensionales en función de la distancia y el determinante)	π, F, \mathcal{R}, MR
PARA AROMÁTICOS	
-H, -C₂H₅, -NO₂, -NH₂, i-OC₃H₇, -COOCH₃, -SO₂NH₂, -NHCOCH₃, -F, -I	

3. Análisis de Cluster o Conglomerados

Strategy in Drug Design

Selection of Substituents

Aromatic Constants—Five Cluster Sets

1 26 members = Br	Cl
SH	SF ₅
H	CH ₃
C≡CH	CH ₂ CH ₃
N=CCl ₂	SCH ₃
Se(C ₂ H ₅)*	
2 65 members = SO ₂ F	NO ₂
SO ₂ CH ₃	5-Cl-1-Tf
CH=C(CN) ₂	PO(OCH ₃) ₂
OSO ₂ CH ₃	OCOCH ₃
CH=NOCH ₃	OCOC ₂ H ₅
COC ₂ H ₅ *	CHO
COC ₃ H ₇ *	SCOC ₂ H ₅
CH ₂ OC ₃ H ₇ *	CH ₂ OC ₄ H ₉
NCS	Pyrryl
CH=NOC ₄ H ₉ *	2,5-di-Me
CH=CHCO ₂ C ₂ H ₅	CH=CH
SCOC ₃ H ₇ *	COC ₆ H ₅
2-Benzthiazolyl	PO(OC ₂ H ₅) ₂
3 16 members = OH	NH ₂
NHC ₃ H ₇ *	NHC ₄ H ₉
OCH(CH ₃) ₂ *	OC ₃ H ₇
N=CHC ₆ H ₅	
4 39 members = B(OH) ₂	CH ₂ OH
NHCONH ₂	NHCN
NHSO ₂ CH ₃	NHCOC
CONHC ₂ H ₅ *	CO ₂ H
CH=NNHC=S(NH ₂)	CONHC
NHC=S(CH ₃)	NHSO ₂ C
NHCO ₂ C ₃ H ₇ *	NHC=S
NHC=S(C ₂ H ₅)*	NHSO ₂ C
5 20 members = CH ₂ I	2-Thienyl
N=NC ₆ H ₅	C≡CC ₆ H ₅
Cyclohexyl	CH ₂ Si(C ₂ H ₅) ₂
P(CH ₃) ₂	

Aromatic Constants—Ten Cluster Sets

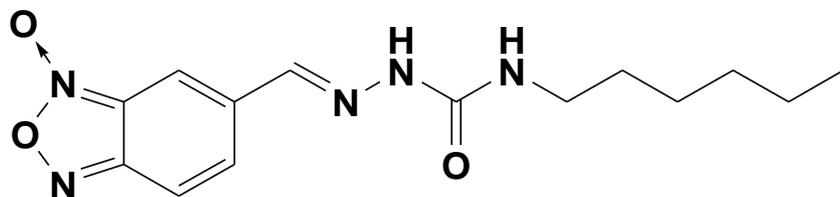
1 26 members = Br	Cl	I	NNN	F
SH	SF ₅	CF ₃	SCF ₃	CF ₂ CF ₃
H	CH ₃	CH ₂ Br	CH=CH ₂	CH ₂ Cl
C≡CH	CH ₂ CH ₃	Cyclopropyl	CH(CH ₃) ₂	C ₃ H ₇
N=CCl ₂	SCH ₃	Se(CH ₃)	S(C ₂ H ₅)	SC ₂ H ₇ *
Se(C ₂ H ₅)*				

2 65 members = SO ₂ F	NO ₂	SO ₂ CH ₃	CH=CO	OSO ₂ C
3 17 members = SO ₂ F	NO ₂	SO ₂ CH ₃	CH=CO	OSO ₂ C
4 8 members = OH	SO ₂ CH ₃	CH=C(CN) ₂	OSO ₂ C	
5 18 members = B(OH) ₂	CH=C(CN) ₂	OSO ₂ CH ₃		

Aromatic Constants—Twenty Cluster Sets

1 10 members = Br	Cl	I	NNN	F
SH	SF ₅	CF ₃	SCF ₃	CF ₂ CF ₃
2 17 members = SO ₂ F	NO ₂	SO ₂ (CF ₃)	NO	CN
SO ₂ CH ₃	5-Cl-1-tetrazolyl	SOC ₂ H ₅ *	SO ₂ C ₂ H ₅ *	SO ₂ C ₃ H ₇ *
CH=C(CN) ₂	PO(OCH ₃) ₂	1-Tetrazolyl	SOC ₂ H ₅ *	SOCH ₃
3 16 members = H	OCOCH ₃			
C≡CH	CH ₃	CH ₂ Br	CH=CH ₂	CH ₂ Cl
N=CCl ₂	CH ₂ CH ₃	Cyclopropyl	HC(CH ₃) ₂	C ₃ H ₇
Se(C ₂ H ₅)*	SCH ₃	Se(CH ₃)	S(C ₂ H ₅)	SC ₃ H ₇ *
4 3 members = OH	NH ₂	NHNH ₂		
5 4 members = B(OH) ₂	CH ₂ OH	EtCO ₂ H	(CH ₂) ₃ CO ₂ H*	
6 8 members = NH(OH)	NHCONH ₂	NHCN	CH=NOH	NHCOCF ₃
NHCHO	NHSO ₂ CH ₃	NHCOCH ₃		
7 5 members = SO ₂ (NH ₂)	CONH ₂	C=O(NHCH ₃)	CONHC ₂ H ₅ *	CO ₂ H
8 16 members = OCF ₃	CH ₂ CN	CH=CHNO ₂ (tr)	CH=NOCH ₃	OCOC ₂ H ₅ *
CH=CHCN	CO ₂ CH ₃	CO ₂ CH ₃	COC ₂ H ₅ *	CHO
CO ₂ CH ₃	CO ₂ C ₃ H ₇ *	SCOCH ₃	COC ₃ H ₇ *	SCOC ₂ H ₅ *
9 15 members = NCS	Pyrryl	CH=NOC ₂ H ₅ *	OCOC ₃ H ₇ *	CH=NOC ₃ H ₇ *
CH=NOC ₄ H ₉ *	2,5-di-Me-Pyrryl*	CH=CHCOCH ₃	CH=CHCO ₂ CH ₃ *	CH=CHCOC ₂ H ₅ *
CH=CHCO ₂ C ₂ H ₅	CH=CHCOC ₃ H ₇ *	CH=CHCO ₂ C ₃ H ₇ *	OCOC ₆ H ₅	OC ₆ H ₅
10 15 members = CH ₂ I	2-Thienyl	Se(C ₂ H ₅)*	3-Thienyl	C ₆ H ₅
N=NC ₆ H ₅	C≡CC ₆ H ₅	CH=CHC ₆ H ₅ (tr)	Si(CH ₃) ₃	C ₃ H ₁₁ *
Cyclohexyl	CH ₂ Si(CH ₃) ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	C ₄ H ₉	C(CH ₃) ₃
11 21 members = NHC=S(NH ₂)	CH=NNHCONH ₂	CH=NNHC=S(NH ₂)	CONHC ₃ H ₇ *	NHC=S(NHC ₂ H ₅)
NHC=O(CH ₂ Cl)	NHCOC ₂ H ₅ *	NHC=S(CH ₃)	NHSO ₂ C ₂ H ₅ *	NHCO ₂ CH ₃ *
NHCO ₂ C ₂ H ₅	NHC=OCH(CH ₃) ₂	NHCO ₂ C ₃ H ₇ *	NHC=S(C ₂ H ₅)*	NHSO ₂ C ₃ H ₇ *
NHCOC ₃ H ₇ *	Ɛ(OH)(CF ₃) ₂	NHC=S(C ₃ H ₇)*	NHSO ₂ C ₆ H ₅	NHCOC ₆ H ₅
CH=NNHCOC ₆ H ₅				
12 8 members = OCH ₃	OCH ₂ CH ₃	OCH(CH ₃) ₂ *	OC ₃ H ₇	OC ₄ H ₉ *
N(CH ₃) ₂	N(C ₂ H ₅) ₂	N=CHC ₆ H ₅		
13 5 members = NHCH ₃	NH(C ₂ H ₅)	NHC ₃ H ₇ *	NHC ₄ H ₉ *	NHC ₆ H ₅
14 5 members = CH ₂ OCH ₃	CH ₂ OC ₂ H ₅ *	CH ₂ OC ₃ H ₇ *	CH ₂ OC ₄ H ₉ *	CH ₂ OC ₆ H ₅
15 2 members = P(CH ₃) ₂	P(C ₂ H ₅) ₂ *			
16 10 members = SCOC ₃ H ₇ *	COC ₆ H ₅	CO ₂ C ₆ H ₅	OSO ₂ C ₆ H ₅	CH=CHCOC ₆ H ₅
2-Benzthiazolyl	PO(OC ₂ H ₅) ₂ *	CH=NC ₆ H ₅	SO ₂ C ₆ H ₅	P=O(C ₆ H ₅) ₂
17 3 members = CH ₂ Si(C ₂ H ₅) ₃ *	Ferrocenyl	N(C ₆ H ₅) ₂		
18 3 single-				
19 1 member = IO ₂	CO ₂ ⁻	N(CH ₃) ⁺		
20 groups				

Ej. **Y AHORA, ¿QUÉ SE HACE?**



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Bioorganic &
Medicinal
Chemistry

Bioorganic & Medicinal Chemistry 13 (2005) 6324–6335

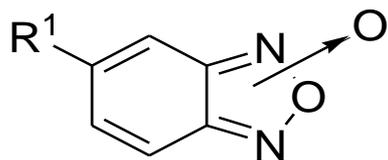
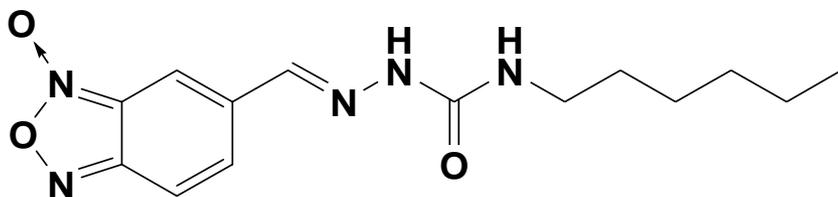
Benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazole *N*-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. Part 3: **Substituents-clustering methodology in the search for new active compounds**

Gabriela Aguirre,^a Lucía Boiani,^a Hugo Cerecetto,^{a,*}† Rossanna Di Maio,^{a,*}
Mercedes González,^a Williams Porcal,^a Ana Denicola,^b Matías Möller,^b
Leonor Thomson^b and Verónica Tórtora^b

^aDepartamento de Química Orgánica, Facultad de Química-Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^bLaboratorio de Físicoquímica Biológica y Enzimología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República,
11400 Montevideo, Uruguay

Ej. Y AHORA, ¿QUÉ SE HACE?



CLUSTER

SUSTITUYENTE R¹ (Derivado)

I -NO₂ (4), -CHO (5), -CN (8), -CH=C(CN)₂ (10),
-E-CH=CHNO₂ (11)

II -CO₂H (6), -CH=NOH (7), -CH₂OH (9)

III -H (14), -CH₃ (15), -Cl (16), -Br (17), -CH₂Cl (18)

IV -CH₂I (20), -E-CH=CHPh (21), -Ph (22)

V -OCH₃ (25), -N(CH₃)₂ (26)

Table 1. In vitro activity of benzofuroxan derivatives and Nfx on *T. cruzi* (Tulahuen strain) at 25 μM

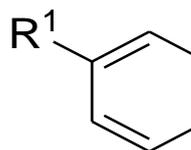
Compound	Percentage of growth inhibition (%) ^{a,b}
Nfx	100.0
2	90.0
<i>Cluster I</i>	
4	89.0
5	67.0
8	9.0
10	66.0
11	92.0
<i>Cluster II</i>	
6	1.0
7	38.0
9	21.0
<i>Cluster III</i>	
14	35.0
15	22.0
16	2.0
17	5.0
18	97.0
<i>Cluster IV</i>	
20	93.0
E-21	93.0
Z-21	100.0
E-21:Z-21 (50:50)	97.0
22	31.0
<i>Cluster V</i>	
25	10.0
26	26.0

^a Inhibition of epimastigotes growth, concentration = 25 μM.

^b The results are the means of three different experiments with SD less than 10% in all cases.

Ej.

Y AHORA



CLUSTER

S

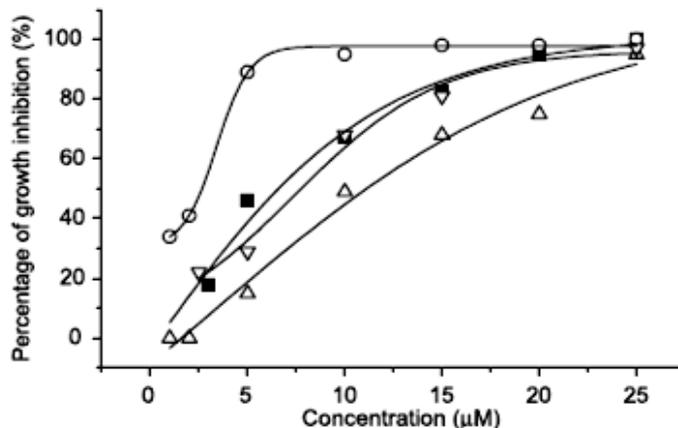
I **-NO₂ (4), -CHO (5), -CN (8), -CH=C(CN)₂ (10),
-E-CH=CHNO₂ (11)**

II -CO₂H (6), -CH=NOH (7), -CH₂OH (9)

III -H (14), -CH₃ (15), -Cl (16), -Br (17), **-CH₂Cl (18)**

IV **-CH₂I (20), -E-CH=CHPh (21)**, -Ph (22)

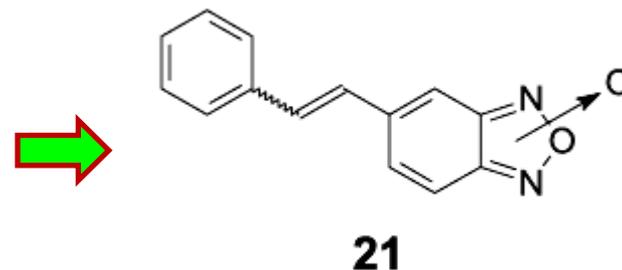
V -OCH₃ (25), -N(CH₃)₂ (26)



Compd.	IC ₅₀ (μM) ^c
Nfx	6.7
2	10.0 ^a
4	22.5
5	20.0
11	2.5
18	2.4
20	10.9
E-21	10.8
Z-21	7.0
E-21:Z-21 (50:50)	7.7

^a Taken from literature [10a]

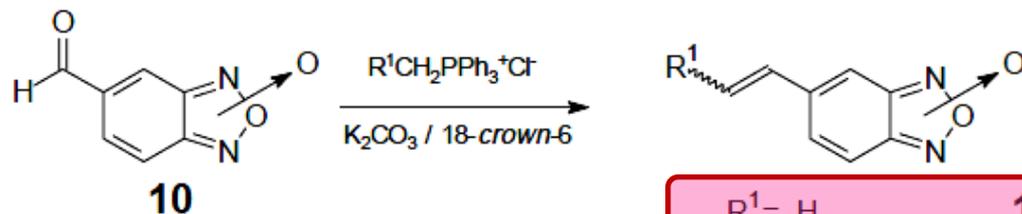
Figure 3. Dose-response curves as anti-*T. cruzi* for selected benzo-furoxan derivatives, 11 (○), E-21 (△), E-21:Z-21 (50:50) (▽), and Nfx (■).



ALGUNAS MODIFICACIONES ESTRUCTURALES MÁS

New potent 5-substituted benzofuroxans as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: Quantitative structure–activity relationship studies

Gabriela Aguirre,^a Lucía Boiani,^a Mariana Boiani,^a Hugo Cerecetto,^{a,*}
 Rossanna Di Maio,^a Mercedes González,^{a,*} Williams Porcal,^a
 Ana Denicola,^b Oscar E. Piro,^c Eduardo E. Castellano,^d
 Carlos Mauricio R. Sant'Anna^e and Eliezer J. Barreiro^f



$-R^1 = -H,$ **11**

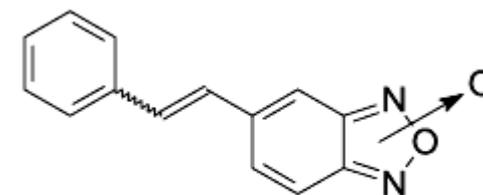
$= -Ph-p-Cl, E/Z,$ **12**

$= -Ph-p-CF_3, E/Z,$ **13**

$= -Ph-p-NO_2, Z,$ **14**

Table 2. In vitro activity of benzofuroxan derivatives and Nfx on *T. cruzi* (Tulahuen strain) at 25 μ M

Compound	Growth inhibition (%) ^{a,b}
Nfx	100.0
4	53.0
6	34.0
7	8.0
8	18.0
11	31.0
12	100.0
13	89.0
14	96.0
15	18.0



21

^a Growth inhibition of epimastigotes at day 5.

^b The results are means of three different experiments with a SD less than 10% in all cases.

Arylethenylbenzofuroxan Derivatives as Drugs for Chagas Disease: Multigram Batch Synthesis using a Wittig–Boden Process[‡]

Williams Porcal, Alicia Merlino, Mariana Boiani, Alejandra Gerpe, Mercedes González,* and Hugo Cerecetto*

Laboratorio de Química Orgánica, Facultad de Ciencias-Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

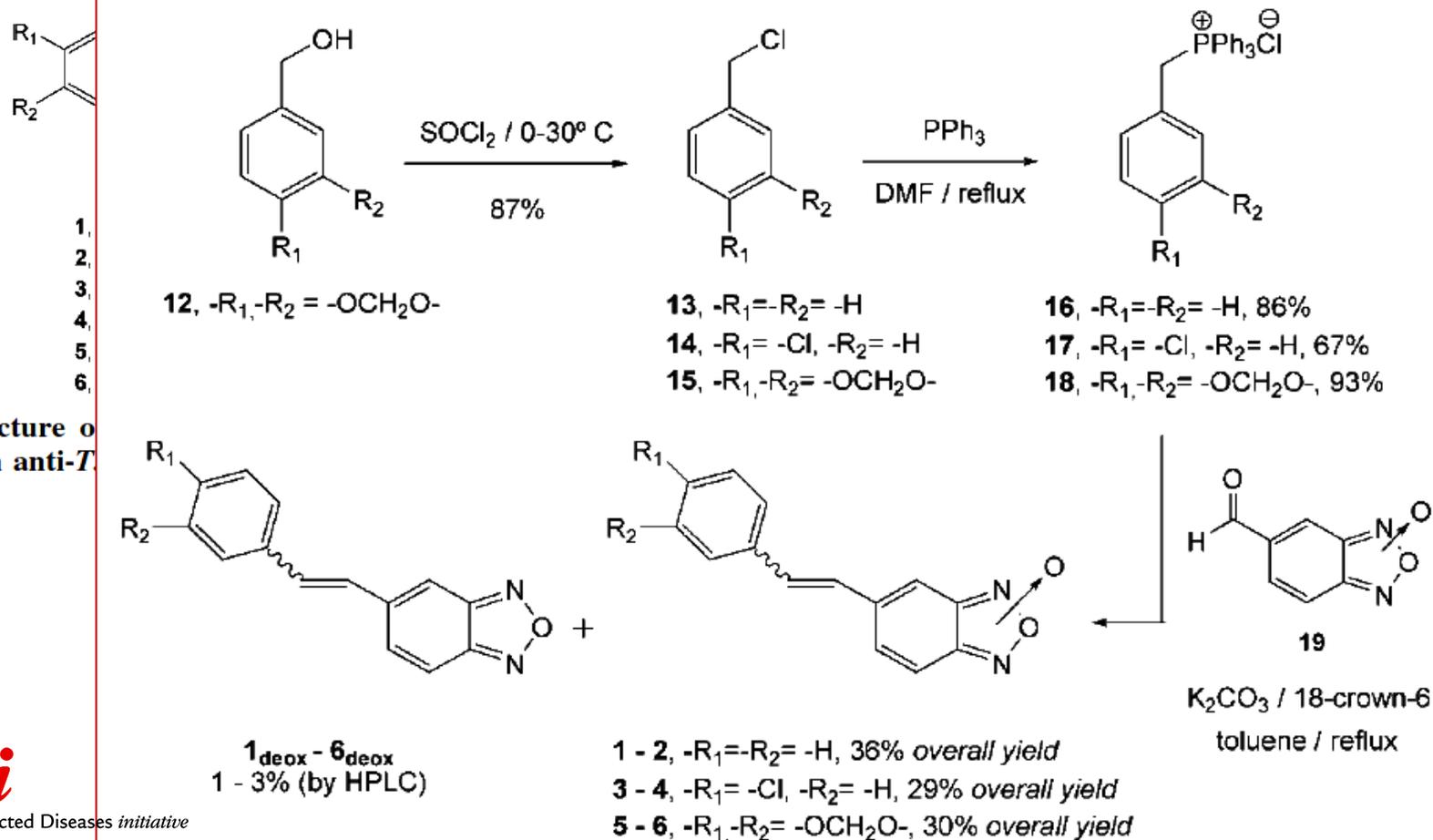
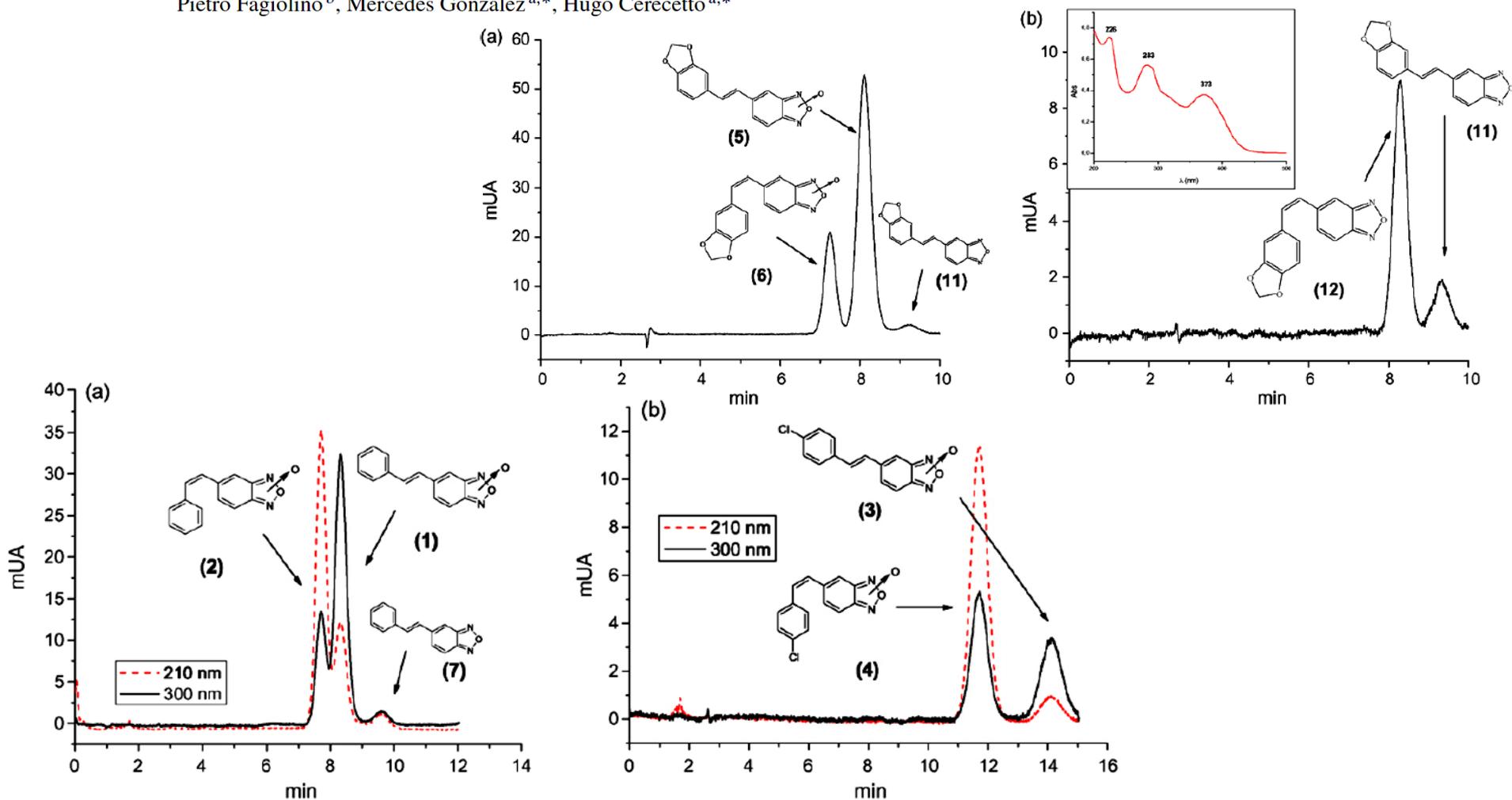


Figure 2. Structure of derivatives with anti-T

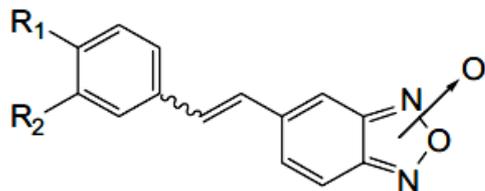
Development of a HPLC method for the determination of antichagasic phenylethenylbenzofuroxans and its major synthetic secondary products in the chemical production processes

Alejandra Gerpe^a, Alicia Merlino^a, Mariana Boiani^a, Williams Porcal^a,
 Pietro Fagiolino^b, Mercedes González^{a,*}, Hugo Cerecetto^{a,*}



Original article

***In vivo* studies of 5-arylethenylbenzofuroxans in murine models of Chagas' disease**

 Lucía Boiani ^a, Carolina Davies ^b, Carolina Arredondo ^b,
 Alejandra Gerpe ^a, Mariana Boiani ^a, José Pedro Paes ^a,
 Hugo Cerecetto ^{a,*}, Mercedes ...


	IC ₅₀ , Tul2	IC ₅₀ , Brener	IC ₅₀ , Y
1, <i>E</i> -isomer, -R ₁ =-R ₂ =-H	10.8	7.5	6.2
2, <i>Z</i> -isomer, -R ₁ =-R ₂ =-H	7.0	15.7	9.0

 1, *E*-isomer, -R₁=-R₂=-H

10.8 7.5 6.2

 2, *Z*-isomer, -R₁=-R₂=-H

7.0 15.7 9.0

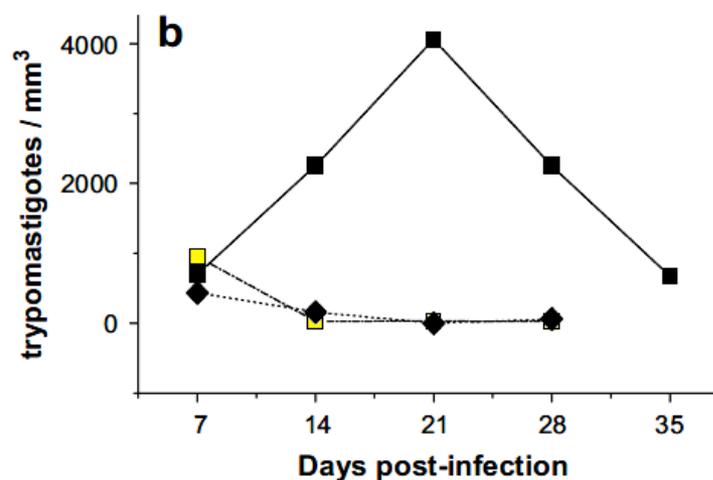
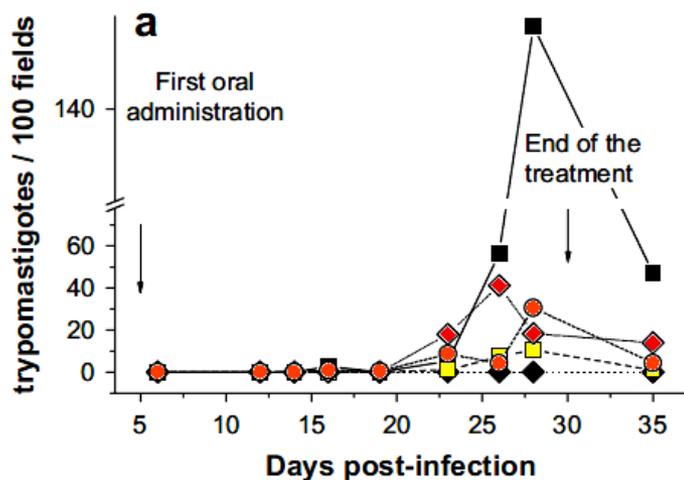
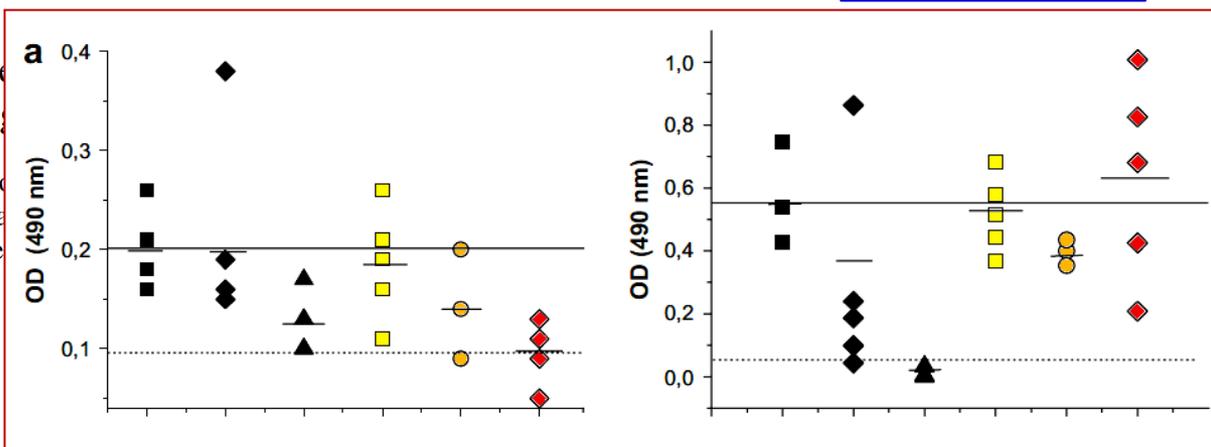
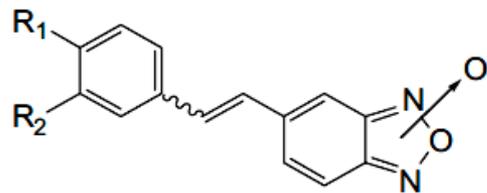


Fig. 7. Effects of studied benzofuroxans on parasitemia in the murine model of acute Chagas' disease: (a) with *T. cruzi* isolated from *D. marsupialis*; (b) with *T. cruzi* isolated from patients. Untreated animals (■) and those receiving Nfx (◆), 1 (□), 1:2 (50:50) (●) or 2 (◇).

Original article

In vivo studies of 5-arylethyl murine models of

Lucía Boiani ^a, Carolina Davies ^b, Carolina Arce ^c,
 Alejandra Gerpe ^a, Mariana Boiani ^a, José Peñalva ^d,
 Hugo Cerecetto ^{a,*}, María

1, *E*-isomer, -R₁=-R₂= -H2, *Z*-isomer, -R₁=-R₂= -H
 IC₅₀
 10
 7

		HEART	MUSCLE	LIVER
Treatment with 1 (120 mg/kg/day)	+++			
	++		◆◆◆◆	◆◆◆◆
	+		◆	◆
	-	◆◆◆◆◆	inflammatory Infiltrates	congestion
Treatment with 1:2 (120 mg/kg/day and 60 mg/kg/day since 15 th day)	+++		◆◆	
	++		◆	
	+		◆◆	◆◆◆
	-	◆◆◆◆◆	inflammatory Infiltrates	congestion
Treatment with Bnz (120 mg/kg/day)	+++			
	++			
	+		◆	◆
	-	◆◆◆◆◆	inflammatory Infiltrates	congestion
vehicle	+++		◆◆	
	++		◆◆	
	+	◆◆◆◆		◆◆◆
	-	inflammatory Infiltrates	inflammatory Infiltrates	congestion

Artigo

Understanding the Solid Forms of 5E-phenylethenylbenzofuroxan with Different *in vivo* anti-*T. cruzi* Activity

Honorato, S. B.; Porcal, W.; Merlino, A.; Ellena, J.; Cerecetto, H.; A. P., Ayala*, González, M.*

Rev. Virtual Quim., 2013, 5 (6), 1179-1190. Data de publicação na Web: 6 de novembro de 2013

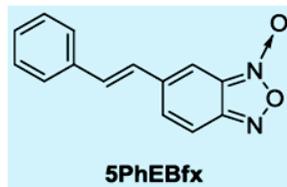


Figure 1. Structural formula of benzofuroxan with anti-*T. cruzi* activity

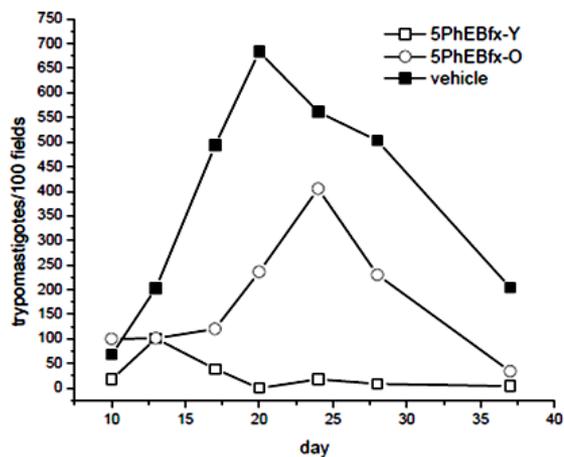
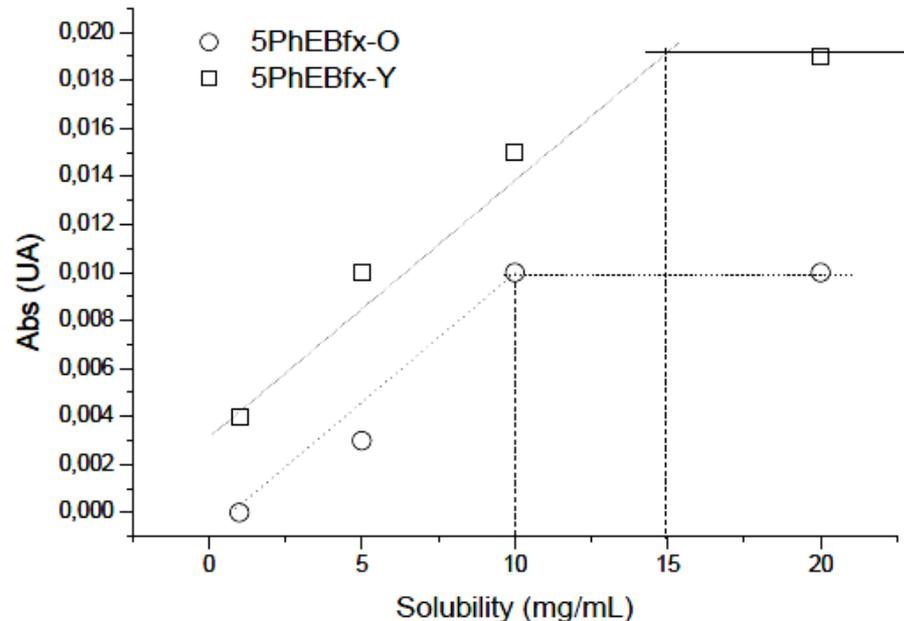


Figure 2. Effects of the different studied solid forms of 5PhEBfx on parasitemia in the murine model of acute Chagas disease following experimental conditions of ref. (3)



Figure 4. Photograph of 5PhEBfx: orange needles (left, 5PhEBfx-O) and yellow powder (right, 5PhEBfx-Y)



PROBLEMAS EN LA FORMA CRISTALINA

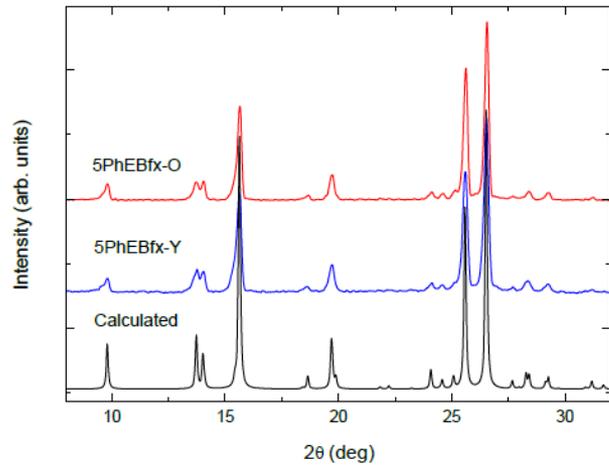


Figure 5. Comparison between the X-ray powder patterns simulated from the 5PhEBfx crystal structure (vertical bars) and experimental patterns of the 5PhEBfx-Y and 5PhEBfx-O at room

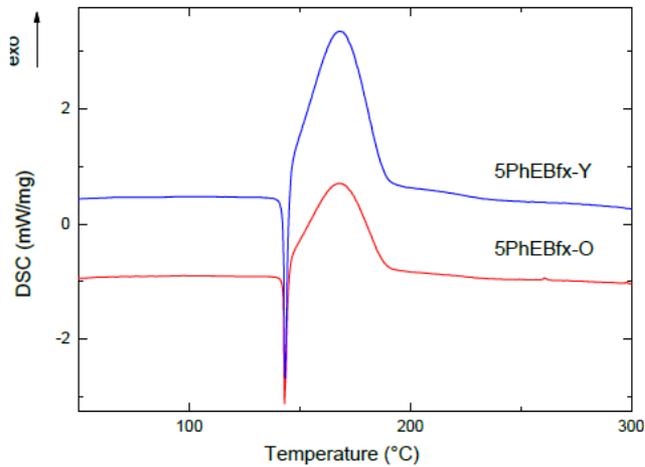


Figure 6. DSC curves for 5PhEBfx-O and 5PhEBfx-Y

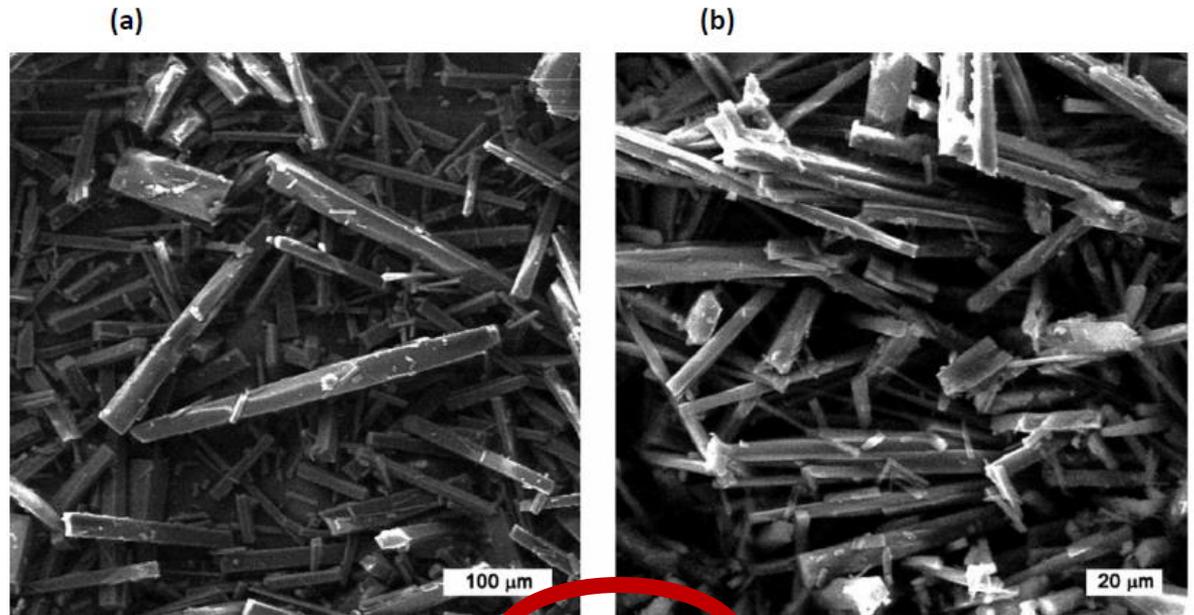


Figure 8. Photomicrographs of different crystal habits of 5PhEBfx-O (a) and 5PhEBfx-Y (b)

diferente *hábitos cristalinos*

Structural relationships in the solid state of the anti-chagas agent (*E*)-phenylethenylbenzofuroxan

Felipe Terra Martins · Alejandro Pedro Ayala ·
Williams Porcal · Hugo Cerecetto ·
Mercedes González · Javier Ellena

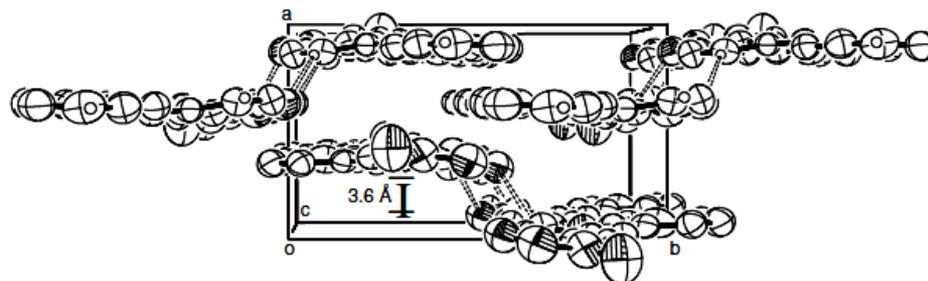


Fig. 5 Crystal structure of benzofuroxan 1 projected onto the *ab* plane (110) showing the infinite one-dimensional dimeric chains connected by weak hydrogen bonds

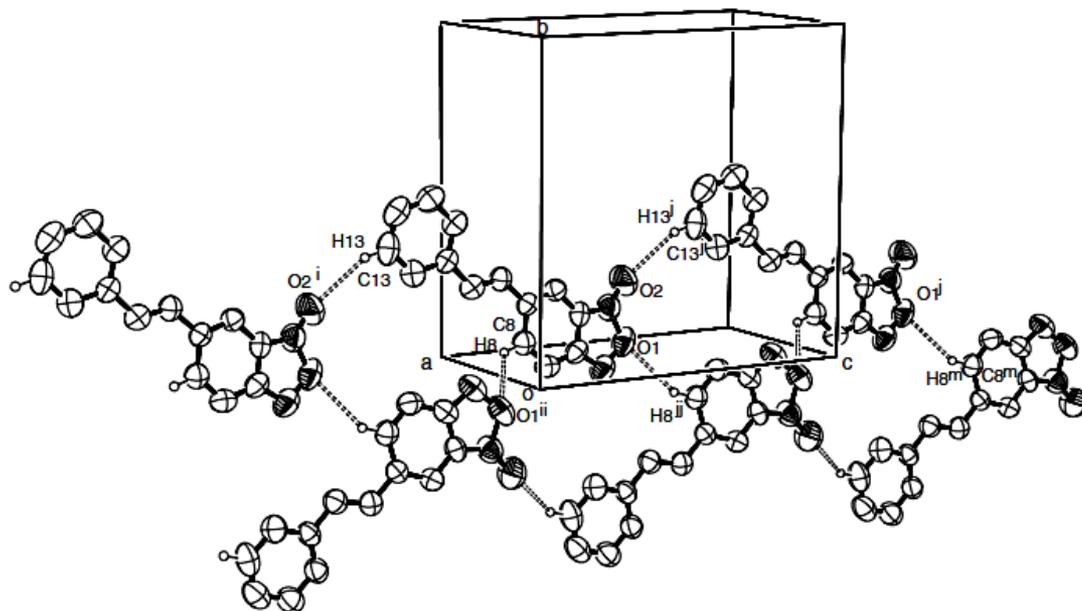


Fig. 6 Crystal packing of benzofuroxan 1 along the [001] direction. Double dotted lines represent the intermolecular hydrogen bonds. The H-atoms involved in the hydrogen bonds are shown as spheres of

arbitrary radii. Symmetry codes: (i) $x; y; z - 1$; (ii) $-x + 1/2; -y; z - 1/2$; (j) $x; y; z + 1$; (jj) $-x + 1/2; -y; z + 1/2$; (m) $-x + 1/2; -y; z + 3/2$



Cytotoxic, mutagenic and genotoxic effects of new anti-*T. cruzi* 5-phenylethenylbenzofuroxans. Contribution of phase I metabolites on the mutagenicity induction

Mauricio Cabrera^{a,1}, María Laura Lavaggi^{a,1}, Paola Hernández^a, Alicia Merlino^a, Alejandra Gerpe^a, Williams Porcal^a, Mariana Boiani^a, Ana Ferreira^b, Antonio Monge^c, Adela López de Cerain^c, Mercedes González^{a,*}, Hugo Cerecetto^{a,*}

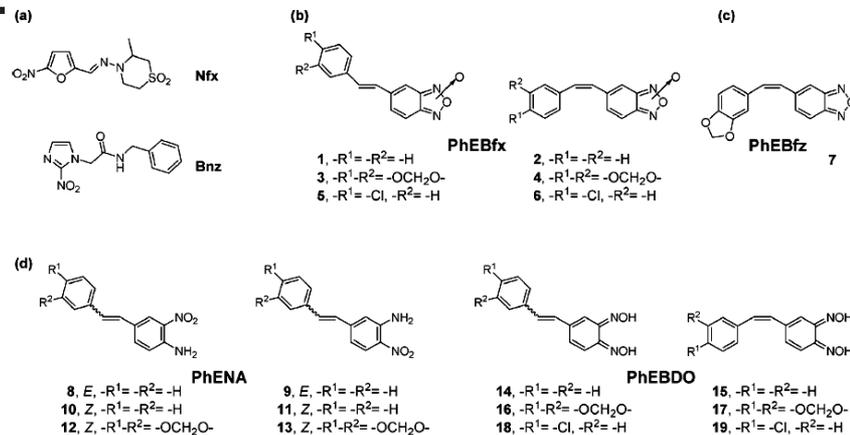


Table 3
Revertants in *Salmonella typhimurium* treated with different doses of compounds 1–6, equimolecular mixtures of them, Nfx and Bnz.

Compound	Doses (μg/plate)	-S9	+S9	Compound	Doses (μg/plate)	-S9	+S9	Compound	Doses (μg/plate)	-S9	+S9
1	0.0	20 ± 5	15 ± 4	3	0.0	21 ± 4	31 ± 10	5	0.0	21 ± 4	31 ± 10
	1.0	13 ± 3	16 ± 6		1.0	17 ± 2	46 ± 0		1.0	18 ± 3	32 ± 2
	2.0	8 ± 2	18 ± 3		2.0	17 ± 1	39 ± 6		2.0	20 ± 1	35 ± 4
	5.0	11 ± 5	25 ± 10		6.0	26 ± 8	66 ± 1 ^a		6.0	25 ± 1	86 ± 7 ^a
	15.0	3 ± 1	34 ± 12 ^a		17.0	27 ± 3	262 ± 5 ^a		17.0	23 ± 1	102 ± 20 ^a
	45.0	4 ± 2	134 ± 6 ^{a,b}		50.0	21 ± 1	225 ± 25 ^{a,b}		50.0	26 ± 0	118 ± 17 ^{a,b}
	50.0	26 ± 1	152 ± 2 ^a								
2	0.0	21 ± 4	31 ± 10	4	0.0	21 ± 4	31 ± 10	6	0.0	19 ± 1	25 ± 1
	0.4	12 ± 9	28 ± 4		3.0	53 ± 6 ^a	40 ± 7		1.0	17 ± 4	30 ± 6
	1.0	19 ± 6	22 ± 6		9.0	78 ± 4 ^a	76 ± 5 ^a		3.0	20 ± 1	49 ± 0
	3.0	21 ± 5	35 ± 5		28.0	114 ± 6 ^{a,b}	350 ± 25 ^a		8.0	16 ± 1	79 ± 1 ^a
	10.0	24 ± 6	48 ± 2		83.0	183 ± 31 ^a	382 ± 24 ^{a,b}		25.0	45 ± 3	59 ± 9 ^{a,b}
	30.0	41 ± 11	38 ± 1		250.0	393 ± 39 ^a	226 ± 3 ^a				
1 + 2^c	0.0	19 ± 1	25 ± 1	3 + 4^c	0.0	19 ± 1	25 ± 1	5 + 6^c	0.0	20 ± 0.5	11 ± 7
	0.5	10 ± 1	24 ± 2		2.0	22 ± 13	22 ± 1		1.0	24 ± 5	16 ± 2
	1.0	19 ± 8	23 ± 6		6.0	41 ± 3 ^a	31 ± 1		2.0	28 ± 2	22 ± 2
	4.0	17 ± 4	21 ± 6		17.0	41 ± 4 ^a	47 ± 4		5.0	17 ± 1	27 ± 9
	13.0	Toxicity	39 ± 13		50.0	50 ± 14 ^a	373 ± 0 ^a		15.0	14 ± 1	71 ± 13 ^a
					150.0	66 ± 24 ^{a,b}	545 ± 32 ^{a,b}		45.0	27 ± 1	81 ± 9 ^{a,b}
Nfx	0.0	21 ± 4	31 ± 10	Bnz	0.0	21 ± 4	31 ± 10	7	0.0	19 ± 3	25 ± 1
	0.5	29 ± 6	37 ± 5		62.0	56 ± 1 ^a	65 ± 9 ^a		2.8	20 ± 1	21 ± 0
	1.0	43 ± 17	39 ± 18		185.0	77 ± 6 ^{a,b}	83 ± 5 ^a		8.3	22 ± 3	34 ± 0
	3.0	62 ± 2 ^a	53 ± 9		556.0	115 ± 8 ^a	151 ± 2 ^a		25.0	27 ± 7	35 ± 0
	10.0	144 ± 11 ^{a,b}	64 ± 6 ^a		1667.0	232 ± 2 ^a	192 ± 10 ^{a,b}		75.0	37 ± 17	68 ± 0 ^a
	30.0	117 ± 17 ^a	39 ± 11 ^{a,b}		5000.0	254 ± 103 ^a	309 ± 3 ^{a,b}		225.0	41 ± 22	292 ± 0 ^{a,b}

^a Revertants number was at least two times higher than DMSO (0.0 μg/plate of compound).

^b Mutagenic, according to Chu et al. (1981): second consecutive dose levels twice the spontaneous frequencies of revertants.

^c Equimolecular mixture of each of the geometric isomer (E and Z). Positive controls: NPD (20.0 μg/plate, -S9) 1223 ± 237 revertants, 2-AF (10.0 μg/plate, +S9) 801 ± 82 revertants.