



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

**Xantina Oxidorredutase:
Estudos *in silico* e avaliação da atividade inibitória**

(versão final após defesa pública)

Marco José Milheiro de Almeida

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Medicinal
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Renato Emanuel Félix Boto
Co-orientador: Prof. Doutor Samuel Martins Silvestre

Covilhã, abril de 2018

À avó Susana e ao Avô José,
Em sua memória.

Agradecimentos

Esta dissertação foi o desafio mais exigente de todo o meu percurso acadêmico e não poderia ter sido concluída sem a ajuda extraordinária de algumas pessoas, às quais devo o meu profundo agradecimento por me fazerem acreditar que um dia eu chegaria aqui.

Não poderia deixar de agradecer, acima de todos, à minha família. Aos meus pais que tornaram esta etapa da minha vida possível e que asseguraram toda a minha carreira universitária. Um especial agradecimento à minha mãe, Anabela, por ser a pessoa mais compreensiva com quem sempre contei e quem sempre me apoiou. Não poderia deixar de esquecer os meus avós “adotivos”, Maria e o Zé, pela transmissão de valores sem preço e por me tornarem na pessoa que sou hoje.

Em segundo lugar, e inevitavelmente, aos meus orientadores. Em especial, ao Professor Doutor Renato Emanuel Félix Boto por ter aceite ser o meu orientador e por toda a sapiência que me transmitiu ao longo desta caminhada. De igual modo, ao Professor Doutor Samuel Martins Silvestre, que me co-orientou de forma sábia.

Aos meus três “mosqueteiros”, que desde o primeiro ano de licenciatura, partilharam comigo todos os momentos da minha vida académica e pessoal. Por serem mais do que irmãos e terem uma paciência de “santo” para ouvir todas as minhas teorias disparatadas. Obrigado pela confiança, compreensão, dedicação e amizade.

Por último, à minha namorada, pelo seu apoio incondicional e incansável. Sem ela não teria sido possível escrever esta parte da minha tese, pois melhor do que ninguém sabe que sou o maior trapalhão do mundo a expressar-me por escrito. E que não tenho qualquer tipo de jeito para estas coisas.

A todos os que, de uma forma ou de outra, me ajudaram a concluir esta etapa da minha vida, o meu mais sincero “bem hajam”.

Resumo

A descoberta e desenvolvimento de um novo fármaco é um processo complexo e dispendioso. Os estudos *in silico* têm sido fundamentais neste processo a fim de encontrar novas entidades químicas mais efetivas e seguras. Neste panorama, a utilização de programas, como o *Autodock* ou o *GOLD*, nos quais através da predição das interações das moléculas com a proteína-alvo se pode selecionar os compostos de maior interesse, é fundamental. Deste modo, consegue-se solucionar os problemas associados aos métodos tradicionais.

Neste trabalho pretendeu-se estudar novos possíveis inibidores da xantina oxidorredutase sendo que para isso foi realizado numa primeira fase um estudo de *docking* molecular para permitir a seleção dos compostos mais promissores. Estes compostos, posteriormente, foram sintetizados e a sua atividade inibitória foi avaliada *in vitro*. A xantina oxidorredutase pertence à classe das molibdoenzimas e está envolvida no catabolismo de purinas. Esta enzima está envolvida em patologias, como a gota, situações de isquemia/reperfusão, entre outras. O alopurinol tem sido o composto mais utilizado no tratamento da gota. Devido às reações de hipersensibilidade que esta molécula provoca foi produzido o febuxostat. Contudo um dos principais problemas deste são os distúrbios hepáticos a nível enzimático. Assim torna-se importante desenvolver novos inibidores da xantina oxidorredutase.

No *docking* molecular foram utilizados os programas *Autodock* e *GOLD*, tendo sido estudadas 4 classes de compostos: esteroides, barbituratos, cianinas e sais de amónio quaternários derivados de benzoxazoles e benzotiazoles, e a sua interação com a xantina oxidorredutase foi avaliada com o objetivo de selecionar os compostos mais promissores para serem estudados através da avaliação da sua atividade inibitória *in vitro* da xantina oxidorredutase.

De modo geral, obtiveram-se bons resultados no *docking* molecular uma vez que alguns dos compostos testados apresentam maior afinidade para a xantina oxidorredutase do que o febuxostat, inibidor conhecido da xantina oxidorredutase e utilizado na clínica. Para além disso, verificou-se que a maioria dos compostos interagiu com a proteína à entrada do sítio ativo, o que indica que podem ser capazes de inibir a sua atividade ao impossibilitar a sua interação com os seus ligandos endógenos. Os compostos com estrutura base trimetincianinas, da classe das cianinas, apresentaram inibição na xantina oxidorredutase.

Palavras-chave

Modelos *in silico*; Autodock; GOLD; Xantina oxidorreductase; Síntese, Atividade Inibitória.

Abstract

The discovery and development of a new drug is a complex, expensive process. In silico studies have been instrumental in this process in order to find new, more effective and safe chemical entities. In this scenario, the use of programs, such as Autodock or GOLD, in which through the prediction of interactions of molecules with the target protein can select the compounds of major interest, is fundamental. In this way, it is possible to solve the problems associated with traditional methods.

In this work, new possible xanthine oxidoreductase inhibitors were studied and a molecular docking study was carried out in the first phase to allow selection of the most promising compounds. These compounds were subsequently synthesized and their inhibitory activity was evaluated in vitro. Xanthine oxidoreductase belongs to the class of molybdoenzymes and is involved in the purine catabolism. This enzyme is involved in pathologies, such as gout, ischemia/reperfusion situations, among others. Allopurinol has been the most widely used compound in the treatment of gout. Due to hypersensitivity reactions of this molecule it was produced febuxostat. However one of the main problems of it is the liver disorders at the enzymatic level. Thus it becomes important to develop new inhibitors of xanthine oxidoreductase.

In the molecular docking, the Autodock and GOLD programs were used, and four classes of compounds were studied: steroids, barbiturates, cyanines and quaternary ammonium salts derived from benzoxazoles and benzothiazoles and their interaction with xanthine oxidoreductase was evaluated with the objective of selecting the most promising compounds to be studied through the evaluation of its inhibitory activity in vitro of xanthine oxidoreductase.

In general, good molecular docking results were obtained since some of the compounds tested had higher affinity for xanthine oxidoreductase than febuxostat, a known xanthine oxidoreductase inhibitor and used in the clinic. In addition, it was found that most of the compounds interacted with the protein at the entrance of the active site, indicating that they may be able to inhibit their activity by precluding their interaction with their endogenous ligands. The compounds with base structure trimethocyanins, of the cyanine class, showed inhibition on xanthine oxidoreductase.

Keywords

In Silico Models; Autodock; GOLD; Xanthine oxidoreductase; Synthesis; Inhibitory Activity.

Índice

Resumo	iv
Abstract	vi
Lista de Figuras.....	x
Lista de Esquemas	xi
Lista de Tabelas	xii
Lista de Gráficos	xiii
Lista de Acrónimos e símbolos	xiv
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. Xantina oxidorreductase	2
1.1.1. Importância biológica.....	3
1.1.2. Mecanismo de ação da Xantina oxidorreductase	4
1.1.3. Inibidores da Xantina oxidorreductase	5
1.2. Estudos <i>in silico</i>	6
1.2.1. <i>Docking</i> molecular	6
1.2.2. Programas, <i>Scoring</i> e Algoritmos	7
1.2.2.1. <i>Autodock</i>	7
1.2.2.2. <i>GOLD</i>	8
1.3. Cianinas	9
1.3.1. Caraterísticas estruturais	9
1.3.1.1. Síntese de sais de amónio quaternário	10
1.3.1.2. Síntese de cianinas	11
1.3.2. Aplicações	11
1.4. Esteroides	12
1.4.1. Caraterísticas estruturais	12
1.4.2. Ácidos biliares.....	13
1.5. Barbituratos	13
1.6. Objetivos.....	14
Capítulo 2 - Resultados e discussão	15
2.1 <i>Docking</i> molecular	16
2.2 Síntese.....	29
2.3 Avaliação da atividade inibitória da xantina oxidorreductase	31
Capítulo 3 - Conclusão e perspetivas futuras.....	36
Capítulo 4 - Parte experimental	38
4.1. <i>Docking</i> Molecular	39
4.1.1. <i>Autodock 4</i>	39
4.1.2. <i>GOLD</i>	40

4.2.	Síntese	40
4.2.1.	Carbocianinas	41
4.2.1.1.	Síntese de sais de amónio quaternário	41
4.2.2.	Barbituratos	45
4.2.3.	Esteroides	45
4.3.	Estudos <i>in vitro</i>	47
4.3.1.	Preparação das soluções dos compostos	47
4.3.2.	Procedimento experimental	47
Capítulo 5 - Referências Bibliográficas.....		48
Capítulo 6 - Anexos.....		55
Anexo 1 - Auxiliar de estruturas dos compostos 1-8.....		56
Anexo 2 - Auxiliar de estruturas dos compostos 9-19.		57
Anexo 3 - Auxiliar de estruturas dos compostos 20-28.....		58
Anexo 4 - Auxiliar de estruturas dos compostos 29-36.....		59
Anexo 5 - Auxiliar de estruturas dos compostos 37-47.....		60
Anexo 6 - Auxiliar de estrutura do composto 48.		61
Anexo 7 - Dados complementares ao teste da atividade inibitória da XOR.		62

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura cristalizada da subunidade da xantina oxidoredutase constituída por 3 domínios (adaptado de ⁴).	2
Figura 2: Estrutura do alopurinol e o febuxostat, inibidores da XOR.	5
Figura 3: Estrutura geral das cianinas (adaptado de ²⁷).	10
Figura 4: Estrutura do núcleo esteroide.	13
Figura 5: Formação do ácido barbitúrico pela reação do ácido malónico e da ureia.	13
Figura 6: Docking do ligando co-cristalizado da XOR obtido no Autodock 4 com a conformação com maior afinidade gerada.	17
Figura 7: Re-docking do ligando co-cristalizado da XOR obtido no GOLD com a conformação com maior afinidade gerada.	18
Figura 8: Sobreposição das conformações com melhor afinidade obtidas no Autodock 4, GOLD e o ligando co-cristalizado da XOR.	18
Figura 9: Interação da conformação com melhor afinidade do composto 1, da classe dos esteroides, com a XOR.	21
Figura 10: A localização do composto 1 na entrada do sítio ativo da XOR após a simulação computacional com o programa <i>Autodock 4</i> .	22
Figura 11: Interação da conformação com melhor afinidade do composto 17, da classe dos barbituratos, com a XOR.	22
Figura 12: A localização do composto 17 na entrada do sítio ativo da XOR após a simulação computacional com o programa <i>Autodock 4</i> .	23
Figura 13: Interação da conformação com melhor afinidade do composto 30, da classe das cianinas, com a XOR.	24
Figura 14: A localização do composto 30 na entrada do sítio ativo da XOR após a simulação computacional com o programa <i>Autodock 4</i> .	24
Figura 15: Interação da conformação com melhor afinidade do composto 24, da classe das cianinas, com a XOR.	25
Figura 16: A localização do composto 24 na entrada do sítio ativo da XOR após a simulação computacional com o programa <i>Autodock 4</i> .	25
Figura 17: Interação da conformação com melhor afinidade do composto 41, da classe das SAQ, com a XOR.	26
Figura 18: A localização do composto 41 na entrada do sítio ativo da XOR após a simulação computacional com o programa <i>Autodock 4</i> .	27
Figura 19: Representação da sobreposição das 4 classes ao febuxostat.	28
Figura 20: Imagens microscópicas de duas soluções de concentrações diferentes (5 μ M e 30 μ M) do composto 25.	35

Lista de Esquemas

Esquema 1: Diagrama esquemático da hidroxilação oxidativa da HX a XA e, posteriormente, a AU e geração de ROS, no metabolismo das purinas (adaptado de ⁴).	3
Esquema 2: Modelo estrutural da enzima na forma de XDH e XO (adaptado de ⁴).	3
Esquema 3: Reação redox do cofator de molibdênio (adaptado de ¹²).	5
Esquema 4: Passos básicos do docking molecular (adaptado de ¹⁹).	7
Esquema 5: Síntese geral dos SAQ com grupos alquilo.	10
Esquema 6: Método do tioalquilo para obtenção de monometinocianinas simétricas e assimétricas (adaptado de ²⁷).	11
Esquema 7: Método do ortoéster para obtenção de trimetinocianinas simétricas (adaptado de ²⁷).	11

Lista de Tabelas

Tabela 1: Lista de resultados obtidos do docking efetuado pelo GOLD para os compostos selecionados.	19
Tabela 2: Lista de resultados obtidos do <i>docking</i> efetuado pelo <i>Autodock</i> 4 para cada classe.	20
Tabela 3: Energias de ligação correspondentes à conformação de maior afinidade de cada classe que apresentou os melhores resultados.	28
Tabela 4: Lista de compostos selecionados para a síntese laboratorial e avaliação biológica.	29
Tabela 5: Lista de compostos sintetizados, fornecidos e comercialmente disponíveis para o teste de atividade inibitória da XOR.	31
Tabela 6: Resultados do teste da atividade inibitória da XOR (em $\mu\text{M} \pm$ desvio padrão)	62

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Curva de calibração para o AU a 295 nm com respetiva equação da reta e coeficiente de determinação.	31
Gráfico 2: Percentagem de inibição da enzima XOR obtida para cada composto em relação ao controlo positivo.	32
Gráfico 3: Curva de calibração para o AU a 295 nm com respetiva equação da reta e coeficiente de determinação.	33
Gráfico 4: Percentagem de inibição da enzima XOR obtida para o controlo positivo, o alopurinol, e composto..	34

Lista de Acrónimos e símbolos

aa	Aminoácido
AB	Ácidos biliares
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Algoritmo genético
ASN	Asparagina
Ar	Anel Aromático
ARG	Arginina
AU	Ácido úrico
CADD	Design de fármacos assistido por computador, do inglês <i>computer-aided drug design</i>
c.c.f	Cromatografia de camada fina
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	dimetilsulfóxido hexadeuterado
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina, do inglês <i>Flavine Adenine Dinucleotide</i>
FTIR	Espetroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, do inglês Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GLU	Glutamato
HX	Hipoxantina
IV	Infravermelho
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol
Metanol-d ₄	Metanol tetradeuterado
MPT	Molibdopterina
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina, do inglês <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
PA	Proteína-alvo
PDB	Banco de dados de Proteínas, do inglês <i>Protein Data Bank</i>
pf	Pontos de fusão
PHE	Fenilalaninas
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Protão

RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMSD	Desvio da raiz quadrada média, do inglês <i>Root Mean Square deviation</i>
ROS	Espécies reativas de oxigénio, do inglês <i>Reactive oxygen species</i>
SAQ	Sais de amónio quaternários derivados de benzoxazoles e benzotiazoles
s	Singleto
t	Tripleto
THR	Treonina
UV	Ultravioleta
XA	Xantina
XDH	Xantina desidrogenase
XO	Xantina oxidase
XOR	Xantina oxidorreductase
δ	Desvio químico

Capítulo 1 - Introdução

1.1. Xantina oxidorredutase

A xantina oxidorredutase (XOR) é uma enzima envolvida no catabolismo de bases azotadas purínicas no nosso organismo e que tem como principais substratos a hipoxantina (HX) e a xantina (XA)¹. Esta enzima pertence à classe das molibdoenzimas uma vez que apresenta um cofator de molibdênio, a molibdopterina (MPT)². A XOR é um homodímero com 290 kDa de peso molecular que apresenta, para além do domínio da MPT, o domínio do dinucleótido de flavina e adenina (FAD) como cofatores. Adicionalmente, também é importante destacar o domínio composto por dois centros de ferro e enxofre, sendo que cada monómero é constituído pelas 3 domínios³. Na figura 1 está representada esquematicamente um exemplo de um monómero desta enzima.

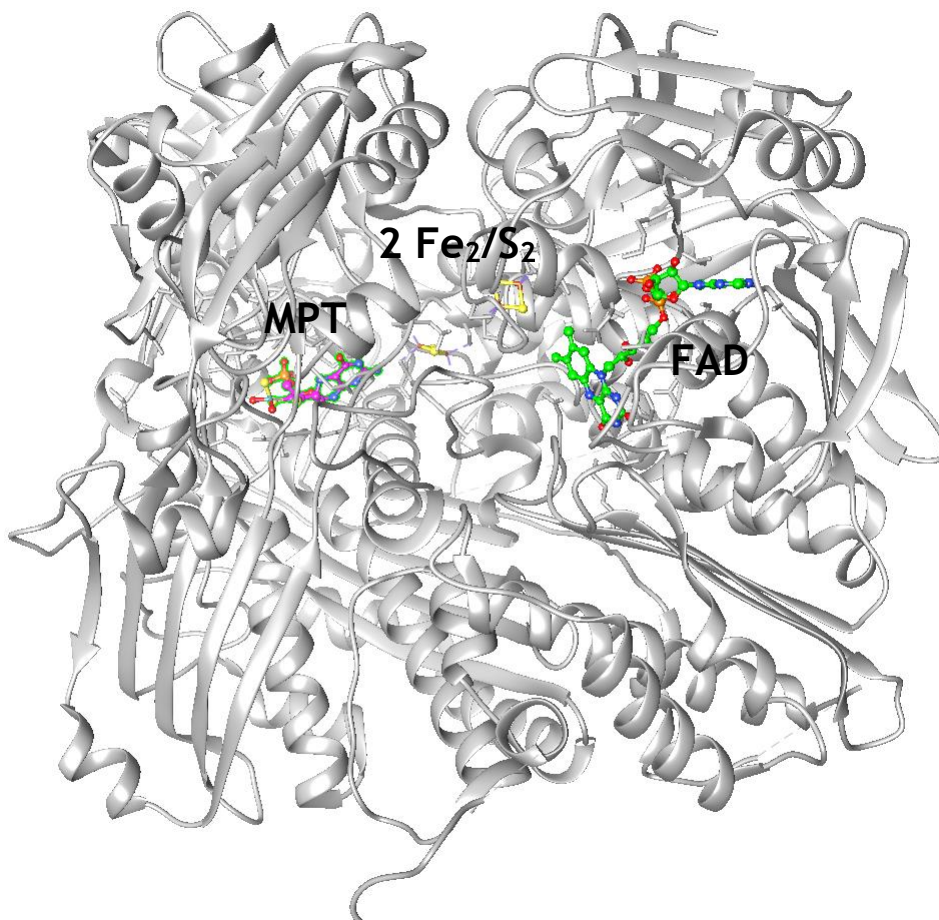
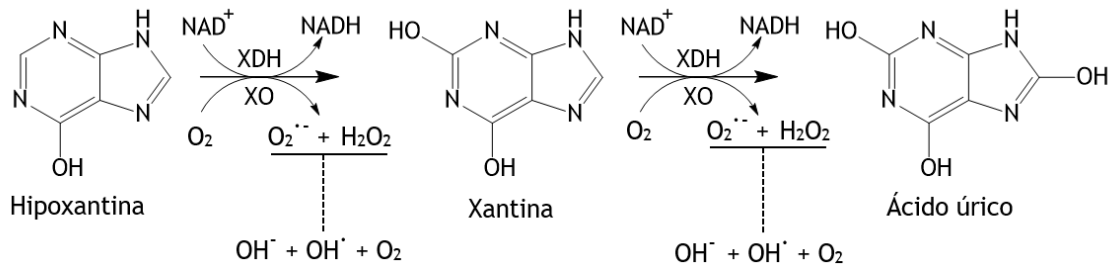


Figura 1: Estrutura cristalizada da subunidade da xantina oxidorredutase constituída por 3 domínios (FAD, a verde, 2 Fe₂/S₂, a amarelo, e MPT, a magenta) (adaptado de ⁴).

A XOR, como já foi referido, está envolvida no catabolismo de purinas, nomeadamente, nas etapas finais deste processo. Esta enzima converte a HX e XA a ácido úrico (AU), sendo que isto ocorre mediante uma hidroxilação sequencial em C2 e de seguida em C8¹.

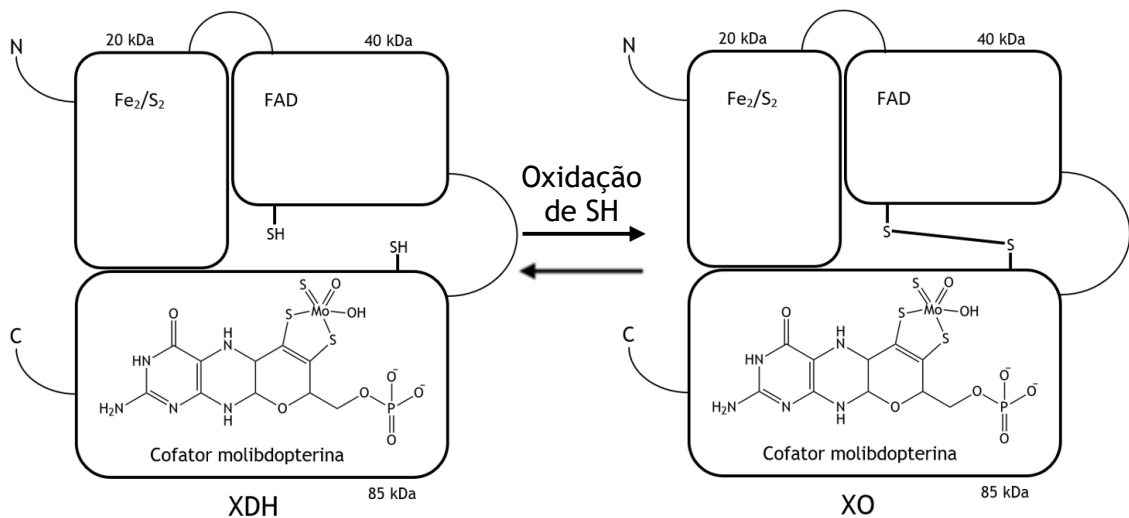
A XOR é comumente designada por xantina oxidase (XO). Contudo, essa designação não é a mais correta uma vez que esta proteína apresenta 2 formas, a forma desidrogenase (xantina desidrogenase (XDH)) e/ou a forma de XO. Quando as subunidades estão na forma XDH, a

forma oxidada do dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD^+) é reduzida a forma reduzida do dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH) e o oxigénio molecular é reduzido a peróxido de hidrogénio e radical superóxido na oxidação do substrato da enzima, o que pode levar à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), como por exemplo, o radical hidroxilo. Quando as subunidades estão na forma XO, o NAD^+ não é envolvido no processo (esquema 1)^{1,2}.



Esquema 1: Diagrama esquemático da hidroxilação oxidativa da HX a XA e, posteriormente, a AU e geração de ROS, no metabolismo das purinas (adaptado de ⁴).

Um facto que é importante ser destacado é que as formas XO e XDH podem coexistir no processo oxidativo da HX em determinadas situações. Para além disto, a XO e a XDH são capazes de se interconverter uma na outra. Quando ocorre a formação de quatro cistinas através da ligação de oito cisteínas por pontes dissulfureto presentes nos 2 cofatores (FAD e MPT), estamos na presença da enzima na forma XO. Quando esta ligação entre dois átomos de enxofre não é formada estamos na presença da forma XDH (esquema 2)⁴.



Esquema 2: Modelo estrutural da enzima na forma de XDH e XO. A interconversão entre XDH e XO procede de forma reversível mediante formação de quatro pontes dissulfureto (adaptado de ⁴).

1.1.1. Importância biológica

A XOR é necessária para o metabolismo normal das purinas e pode ser encontrada em grandes quantidades no fígado, no intestino e no leite. A XOR também está associada a múltiplas

doenças humanas devido à sua capacidade de gerar AU e ROS, como o radical superóxido e o peróxido de hidrogénio⁵.

Entre estas patologias encontra-se a gota, na qual ocorre a deposição de cristais de AU nas articulações tendo como consequência a inflamação das mesmas^{4,5}. A formação de ROS está também associada a várias condições patológicas, designadamente lesões por isquemia/reperfusão, sendo que estas situações podem ocorrer devido à produção destas espécies reativas por parte da atividade elevada da XOR⁶. Outras patologias associadas às ROS são várias doenças cardiovasculares, podendo estar envolvida a formação de peroxinitrito. Este é formado a partir do radical superóxido e do óxido nítrico, e é um potente oxidante que está envolvido na nitração de resíduos de treonina das proteínas fazendo com que as mesmas percam a sua função². Para além destas, existem outras patologias onde as ROS estão implicadas como a indução de apoptose/necrose, a indução/supressão da expressão de muitos genes, a ativação de cascatas de sinalização celular, o dano oxidativo de ácidos desoxirribonucleicos (ADN) e lípidos, a inflamação, os distúrbios metabólicos, a aterosclerose, a insuficiência renal, a hipoxia e a carcinogénese⁴.

1.1.2. Mecanismo de ação da Xantina oxidoredutase

A reação de hidroxilação da purina ocorre com o auxílio do cofator MPT⁷. Este cofator forma-se através da ligação do molibdénio a dois átomos de enxofre de um derivado do anel de pterina. Os dois átomos de oxigénio e um átomo de enxofre que estão ligados ao molibdénio, mas que não interagem na formação do cofator MPT, encontram-se voltados para o sítio ativo da XOR^{8,9}.

Para que ocorra a reação de hidroxilação é necessário que uma molécula de água forneça um grupo hidroxilo, para que este seja incorporado na HX e XA^{10,11}. No esquema 3 está representada, de uma forma mais detalhada, a reação redox pela XOR. Esta reação redox é iniciada com a sequestração do hidrogénio do grupo hidroxilo do cofactor de Mo pelo glutamato 1261, reduzindo o Mo (VI) a Mo (IV). Posteriormente, com adição de uma molécula de água o Mo (IV) inicia o seu processo de oxidação, libertando dois eletrões, um protão e AU da reação. Estes dois eletrões serão sequestrados pelos centros de ferro e enxofre e, posteriormente, pelo o FAD onde serão utilizados para reduzir o NAD⁺ a NADH, na XDH, e o oxigénio molecular a radical superóxido ou a peróxido de hidrogénio, na XO. No caso da XO, a redução do oxigénio molecular só ocorre se o FAD estiver no estado FADH[•] para formar superóxido ou no estado FADH₂ para formar peróxido de hidrogénio, sendo que estes nunca se formam ao mesmo tempo^{12,13}.

usados para tratar pacientes com gota ou com intolerância ao alopurinol e/ou febuxostat⁴.

1.2. Estudos *in silico*

Nas últimas três décadas, o design de fármacos assistido por computador (CADD) tem desempenhado um papel importante no desenvolvimento de moléculas terapeuticamente importantes.

Os três maiores propósitos onde o CADD é utilizado são:

(1) Na filtragem de grandes bibliotecas de compostos em menores conjuntos de compostos ativos que podem ser testados experimentalmente;

(2) Na orientação da otimização dos *leads*, quer no aumento da sua afinidade, quer na otimização do metabolismo de fármacos e da restante farmacocinética;

(3) No design de compostos novos através da construção de moléculas adicionando um grupo funcional de cada vez.

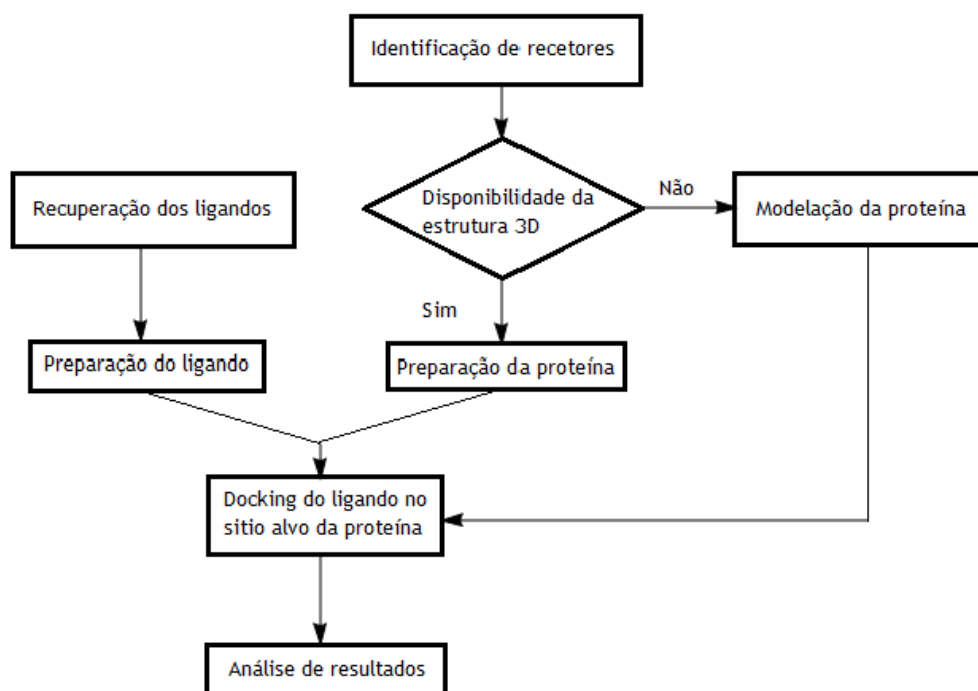
O CADD pode ser classificado em duas categorias: o método baseado na estrutura e o método baseado no ligando. O método baseado na estrutura depende do conhecimento da estrutura da proteína-alvo (PA) de modo a calcular, designadamente, as energias de interação dos compostos testados. O método baseado no ligando depende do conhecimento dos ligandos com atividade conhecida para pesquisar através de relações quantitativas estrutura-atividade, de modo a comparar ou construir novos ligandos¹⁷.

1.2.1. *Docking* molecular

O principal objetivo do *docking* molecular é a simulação computacional de um ligando com a PA, de estrutura conhecida através de processos de identificação molecular, sendo obtidas conformações de ligandos otimizadas com a energia livre do sistema minimizada. Os estudos de *docking* molecular podem ser efetuados entre proteína-proteína, proteína-ligando e proteína-nucleótido. O *docking* molecular é considerado um método de CADD baseado na estrutura e o sistema pode ser por chave/fechadura (alvo e ligando configurados como estruturas rígidas) ou por *Induced Fit* (alvo e ligando configurados como estruturas flexíveis)^{18,20}.

O *docking* molecular, através da simulação da interação entre o ligando e a PA, prevê a afinidade do ligando, de modo a formar um complexo ligando-proteína estável. Esta interação envolve vários tipos de interações não covalentes, como as ligações de hidrogénio e as ligações iónicas, hidrofóbicas e de *Van der Waals*.

Para a realização do *docking* molecular são necessárias diversas etapas, como a preparação da estrutura da PA em três dimensões, a preparação dos ligandos, a predição da energia de ligação do complexo proteína-ligando e a análise de resultados (esquema 4)¹⁹.



Esquema 4: Passos básicos do *docking* molecular (adaptado de ¹⁹).

Em suma, o uso de técnicas assistidas por computador no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos está a ganhar popularidade levando à sua rápida implementação e apreciação ²⁰, desempenhando um papel fundamental neste processo de design e descoberta de fármacos²¹.

1.2.2. Programas, *Scoring* e Algoritmos

Nesta subsecção será abordada de forma sucinta os programas e algoritmos capazes de realizar o *docking* molecular. Existem diversos programas para a realização deste processo, entre os quais são de destacar o *Autodock* e o *GOLD*, sendo estes os dois programas utilizados no desenvolvimento desta dissertação.

1.2.2.1. *Autodock*

Desde o seu lançamento, em 1990, o *Autodock* provou ser uma ferramenta eficaz e capaz de prever de forma rápida e precisa as conformações de ligandos e as energias de ligação destes com a PA. Quando se pretende procurar o espaço conformacional disponível para um ligando numa proteína, o *Autodock* utiliza um método baseado numa grelha 3D para permitir uma

avaliação rápida da energia de ligação das diferentes conformações. Este método baseia-se na incorporação da PA ou de uma região espacial da PA numa grelha 3D pré-definida, sendo criados pontos bem definidos pelo utilizador dentro dessa mesma grelha. Em cada um desses pontos será colocado um átomo-sonda que servirá como base para os cálculos de energias das interações desse específico átomo-sonda com a PA. Após ter calculado as energias em todos os pontos criados dentro da grelha, os dados das energias são armazenados numa tabela, de modo a que o *Autodock* possa utilizar esses dados, permitindo-lhe seleccionar os pontos que apresentem menor energia livre.

Para a pesquisa conformacional, o método mais utilizado neste programa é o algoritmo genético *Lamarckian*. Este algoritmo permite a criação de uma população de conformações de teste, que serve de base a todo o processo. Esta população, devido a sucessivas alterações, sofre uma troca nos parâmetros conformacionais, o que leva a uma competição que ocorre de forma análoga à evolução biológica, sendo seleccionadas as conformações com menor energia de ligação. O parâmetro “*Lamarckian*” é uma característica adicional que permite que as conformações individuais “procurem” o seu espaço conformacional local, adquirindo a menor energia livre, transmitindo-se essas informações para as conformações posteriormente consideradas, de modo a otimizar o processo.

O *Autodock* utiliza um campo de força de energias livres semi-empírico de modo a prever as energias livres de ligação de moléculas pequenas à PA. O campo de força é baseado num modelo termodinâmico que permite a incorporação de energias intramoleculares na predição da energia livre de ligação, o que é realizado pela avaliação das energias tanto do estado de ligação como do estado de não-ligação. Para além disso, também incorpora um método de dessolvatação baseado na carga, o qual utiliza um conjunto de átomos e cargas pré-definidos para a realização do processo. O método foi calibrado com um conjunto de 188 estruturas e energias de ligação conhecidas, e o erro padrão é cerca de 2-3 kcal/mol na predição de energia livre de ligação em estudos de validação cruzada²².

1.2.2.2. GOLD

O *GOLD* foi desenvolvido em 1995 e é considerado um programa de *docking* automatizado. Este programa utiliza o algoritmo genético como base de cálculo, de modo a explorar uma gama completa de flexibilidade conformacional do ligando com uma flexibilidade parcial da proteína, satisfazendo a exigência fundamental de que o ligando deve deslocar a água que se encontra no sítio ativo da proteína²³.

Um dos *scores* utilizados no *GOLD* é o *GOLDScore*, sendo este uma função de *score default* do programa. Para efetuar os cálculos, o *GOLDScore* baseia-se em 4 energias específicas, que posteriormente, serão utilizadas para gerar um *score* para cada conformação. Essas energias são:

- 1) Energia da ligação por pontes de hidrogénio externas proteína-ligando;
- 2) Energia de interações de *Van der Waals* externas proteína-ligando;
- 3) Energia de interações de *Van der Waals* internas proteína-ligando;
- 4) Energia da tensão de torção do ligando.

O *GOLD* utiliza um método exclusivo de modo a colocar o ligando no local de ligação, o qual se baseia em pontos de controlo. Neste mecanismo são acrescentados pontos de controlo nos grupos de ligação do hidrogénio da proteína e do ligando, o que permite mapear pontos aceitadores no ligando e pontos doadores na proteína e vice-versa. Além disso, o *GOLD* gera pontos de controlo hidrofóbicos na cavidade da proteína, onde qualquer ligando com grupos hidrofóbicos pode ser mapeado²⁴.

1.3. Cianinas

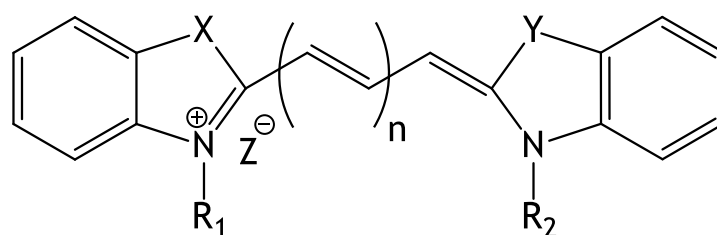
Em 1856, Greville Williams, ao fazer reagir iodeto de isopentilo com quinolina, a qual possuía lepidina como impureza, obteve um composto de cor azul²⁵. Este composto foi denominado por cianina, da palavra grega “*Kyanos*”, azul escuro, devido à brilhante cor azul que origina em solução, designação esta que passou a representar uma classe de corantes²⁶⁻²⁸. Estes tipos de compostos foram utilizados em fotografia, há mais de 100 anos, no processo de revelação das mesmas, como sensibilizadores de haletos de prata, devido às suas propriedades fotossensíveis. Estas moléculas apresentam a capacidade de sensibilizar os halogenetos de prata numa área espectral onde estes são, normalmente, insensíveis, o que levou a um interesse crescente no estudo e síntese de novos compostos deste tipo²⁶.

1.3.1. Características estruturais

A sua importância sintética deve-se ao seu baixo custo de síntese, à sua relativa estabilidade, bem como aos seus coeficientes de absorção molar elevados e intensidades médias de fluorescência. De facto, através de simples modificações estruturais, como a cadeia metínica ou alteração do núcleo heterocíclico, o comprimento de onda a que absorvem estes corantes pode alterar, permitindo-lhes absorver radiação com comprimentos de ondas entre os 340 nm e os 1400 nm do espectro eletromagnético, o que correspondente ao intervalo que vai do ultravioleta (UV) ao infravermelho (IV)^{27,29,30}.

As cianinas são compostos catiónicos constituídos por duas subunidades heterocíclicas azotadas terminais separadas por uma cadeia mono- ou polimetínica de número ímpar de carbonos (cromóforo)³¹. As subunidades heterocíclicas mais comuns são o benzotiazole, benzoxazole, indole, benzimidazole e a quinolina. De acordo com o tamanho da cadeia

cromófora, podem classificar-se como monometinocianinas ($n=0$), trimetinocianinas ($n=1$), pentametinocianinas ($n=2$), entre outras, sendo n o número de grupos metino existentes entre as duas subunidades, como pode ser verificado na figura 3³¹.



$X=Y$ ou $X=Y = NR, O, S, Se, \dots$

$Z = Tos, I, Br, Cl, \dots$

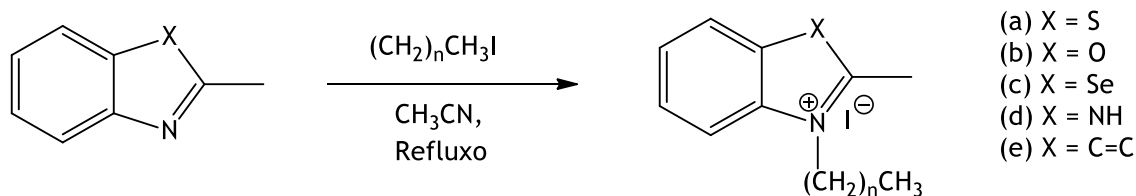
$n = 0, 1, 2, 3, \dots$

$R_1 = R_2 = (CH_2)_aCH_3, (CH_2)_aCO_2H, \dots$ (sendo que $a = 0, 1, 2, 3, \dots$)

Figura 3: Estrutura geral das cianinas (adaptado de ²⁷)

1.3.1.1. Síntese de sais de amónio quaternário

A síntese de sais de amónio quaternário (SAQ) é necessária, uma vez que são precursores das cianinas. Estes compostos podem ser sintetizados através de uma reação simples de quaternização de aminas terciárias ou através da troca aniônica de sais disponíveis comercialmente. Os SAQ podem ser obtidos mediante duas vias de síntese: por refluxo da base heterocíclica com um agente alquilante na presença de um solvente polar, como por exemplo o acetonitrilo³², ou por fusão *in situ* da base heterocíclica com um reagente alquilante^{33,34}, como por exemplo o ácido 11-bromoundecanóico³⁵. Recentemente, a técnica de micro-ondas começou a ser utilizada na síntese destes sais devido à diminuição do tempo reacional, bem como à obtenção de produtos mais puros e com melhores rendimentos³⁶. A diversidade dos SAQ é elevada, devido à existência de diversas bases heterocíclicas, como por exemplo, benzotiazole, benzoxazole, benzosselenazole, benzimidazole, quinolina, entre outras, (esquema 5)³⁴.

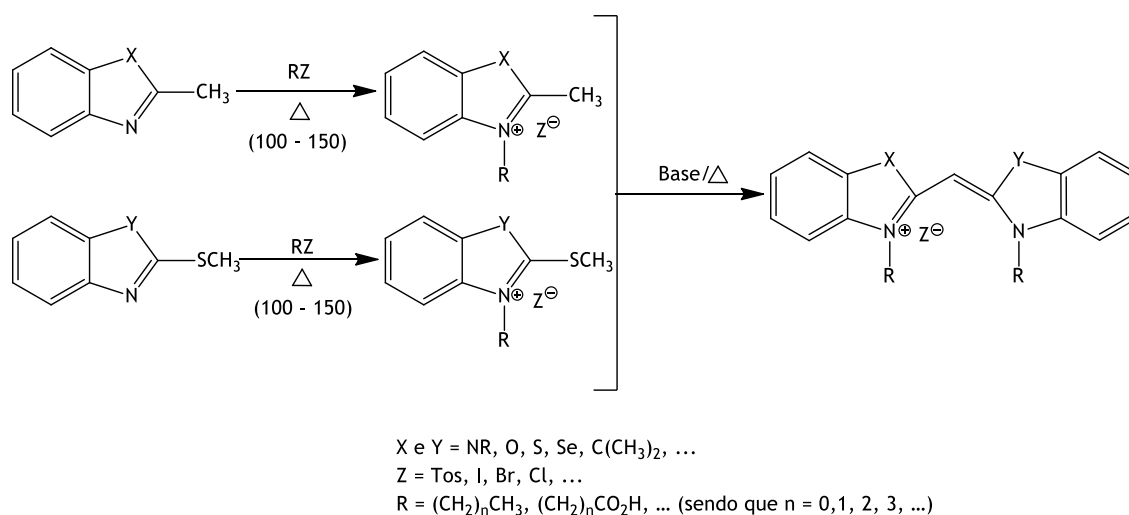


Esquema 5: Síntese geral dos SAQ com grupos alquilo. (a) benzotiazole, (b) benzoxazole, (c) benzosselenazole, (d) benzimidazole e (e) quinolina.

1.3.1.2. Síntese de cianinas

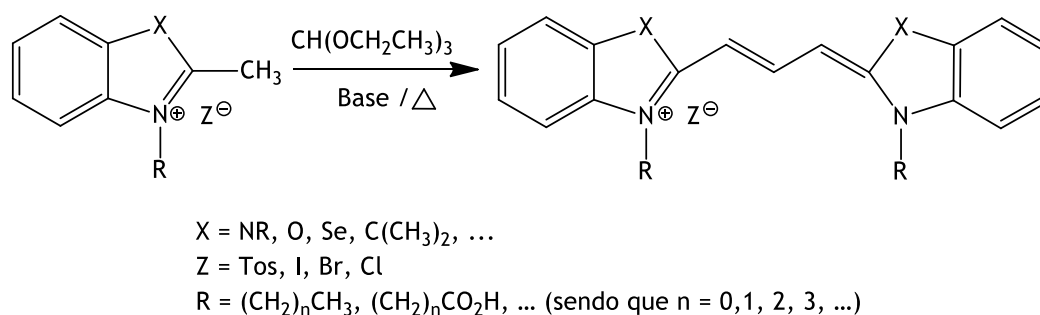
Na síntese de cianinas, o processo utilizado depende do comprimento da cadeia polimetínica que se pretende. De modo geral, esta síntese requer simples adições nucleofílicas, antecedidas ou seguidas por reações de eliminação que envolvem desprotonação e remoção do grupo de saída. Os SAQ de 2-metilbenzoazóis são precursores chave desta reação e originam bases metilénicas nucleofílicas, também denominadas bases de Fischer²⁷.

As monometinocianinas simétricas e assimétricas são principalmente sintetizadas pelo método de tialquilo. Este método consiste na condensação de dois SAQ heterocíclicos: um dos sais com um grupo metilo reativo e o outro contém um grupo tialquilo, sendo que este último é o grupo abandonante (esquema 6)^{27,29,37}.



Esquema 6: Método do tialquilo para obtenção de monometinocianinas simétricas e assimétricas (adaptado de ²⁷).

Na síntese de trimetinocianinas simétricas, o método utilizado é o do orto éster. Este método envolve a condensação de dois SAQ pela ação de um orto éster, normalmente o trietilortoformiato, sob condições básicas, normalmente usando piridina (esquema 7)²⁷.



Esquema 7: Método do ortoéster para obtenção de trimetinocianinas simétricas (adaptado de ²⁷).

1.3.2. Aplicações

Após a descoberta de Williams, o interesse nestes compostos levou à sua utilização na coloração de têxteis. No entanto, estes compostos demonstraram ser pouco eficazes neste uso

devido à fraca resistência à luz. Estudos posteriores levaram à descoberta das suas propriedades fotossensíveis e, posteriormente, de outras aplicações. Desde então, estes compostos começaram a ser utilizados na produção de meios de gravação ótica (CD, DVD)²⁵ e como antitumorais, por tecnologia laser (fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica para tumores superficiais, como por exemplo, melanomas³⁸) ou como uma molécula que pode ser inserida no nosso organismo e que leva à morte celular das células cancerígenas por interação, por exemplo, com os seus recetores específicos³⁹. Através da tecnologia laser também podem ser utilizados na área da oftalmologia⁴⁰ e em intervenções cirúrgicas³⁸. Adicionalmente, também podem ser usados como mostradores de cristais líquidos (LCD)⁴¹. Devido às suas características hidrofóbicas e catiónicas, as quais permitem uma interação forte com ADN, as cianinas têm também sido aplicadas como sondas fluorescentes na deteção e sequenciação de ADN⁴², bem como em ensaios imunológicos, na microscopia de fluorescência, na marcação de proteínas⁴³ e em estudos de potencial de membrana⁴⁴. As cianinas também apresentam um elevado potencial terapêutico na doença de Alzheimer sendo capazes de inibir a agregação da proteína tau e dos péptidos beta amiloide^{45,46}.

1.4. Esteroides

Os esteroides têm desempenhado um papel importante no desenvolvimento de fármacos para doenças cardiovasculares, autoimunes, tumores e osteoartrite⁴⁷. A base estrutural destes compostos pode ser encontrada no organismo humano, como por exemplo nos ácidos biliares, nas hormonas sexuais, nos derivados da vitamina D, entre outros⁴⁸. Os esteroides de origem animal derivam do colesterol e são responsáveis por algumas funções, como o metabolismo, a digestão e o funcionamento dos órgãos sexuais⁴⁹. Os ácidos biliares pertencem à família dos esteroides e têm sido alvo de interesse na investigação e desenvolvimento de novos fármacos, para a aplicação no tratamento de tumores, como antivirais, antifúngicos, entre outros^{50,51}.

1.4.1. Características estruturais

A estrutura base dos esteroides é o ciclopentanoperidrofenantreno, o qual é composto por quatro anéis ligados entre si, sendo estes constituídos por três anéis (A, B e C) de 6 carbonos e um anel (D) de 5 carbonos, o que perfaz um total de 17 carbonos, tal como se pode ver na figura 4. A sua numeração é efetuada segundo regras definidas pela IUPAC^{51,52}. A maioria dos esteroides tem um grupo metilo no carbono 10 e o outro no carbono 13, sendo possível a existência de outros grupos no carbono 17⁴⁸. Em relação à estereoquímica, os substituintes que se apresentarem acima do plano dos quatro anéis, são designados beta, se os substituintes se apresentarem abaixo do plano, são designados alfa.

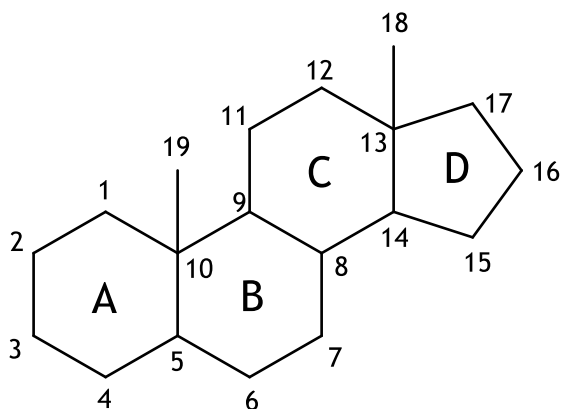


Figura 4: Estrutura do núcleo esteroide.

1.4.2. Ácidos biliares

Além dos grupos metilo angulares em C10 e C13, os ácidos biliares apresentam ainda uma pequena cadeia alifática ligada ao carbono 17, que termina num álcool ou num ácido carboxílico. Caracteristicamente, a fusão dos anéis A e B tem configuração beta. Estes compostos derivam do colesterol e são sintetizados nos hepatócitos. As suas funções principais no organismo são a regulação lipídica e a solubilização e transporte de lípidos, controlo da homeostase da glicose e do colesterol e a interferência nas vias apoptóticas e inflamatórias^{50,51}. A última função referida ocorre devido à potencial capacidade antitumoral de vários ácidos biliares sendo, por isso, estes alvo de estudo para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diversos tumores⁵⁰.

1.5. Barbituratos

Em 1864 um químico alemão chamado Adolph Von Baeyer, prémio Nobel da Química em 1904, sintetizou o ácido barbitúrico através da ciclização da ureia com o ácido malónico, com eliminação de água (figura 5)⁵³.

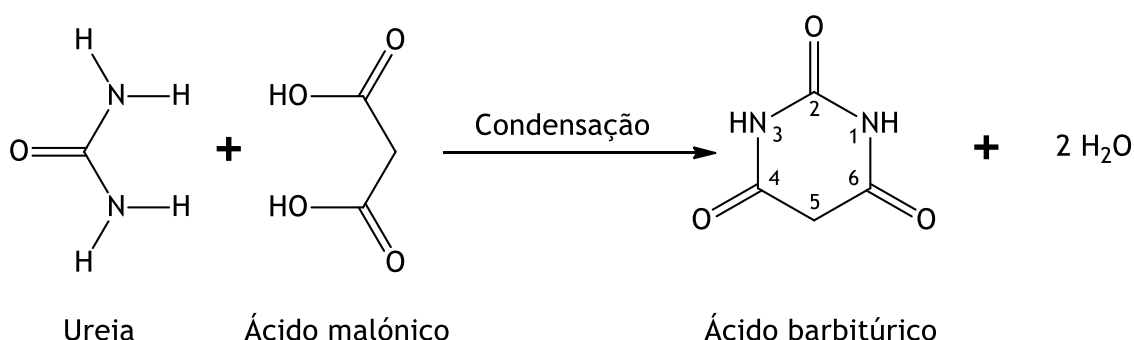


Figura 5: Formação do ácido barbitúrico pela reação do ácido malónico e da ureia.

Antes da comercialização das benzodiazepinas, os barbitúricos eram muito utilizados como sedativo-hipnóticos por serem potentes depressores do sistema nervoso central, além de

apresentarem outras propriedades farmacológicas, como atividade anestésica e anticonvulsivante⁵³, Estes compostos foram importantes na compreensão da função dos recetores do ácido γ -aminobutírico, tendo sido genericamente substituídos por outros fármacos devido a problemas de segurança, incluindo a tolerância e dependência aos mesmos, bem como à sua janela terapêutica relativamente estreita. Apesar disso, têm apresentado interesse noutras áreas, nomeadamente como agentes antibacterianos⁵⁴, antitumorais^{55,56}, antiangiogénicos, imunomoduladores, herbicidas, fungicidas, antivirais e antioxidantes^{57,58}. Os barbitúricos mais utilizados foram o mefobarbital, o fenobarbital, o amobarbital, o butobarbital, o pentobarbital, o secobarbital, o talbutal, o metohexital e o tiopental^{53,59}.

1.6. Objetivos

Os objetivos deste trabalho visaram a realização do *docking* molecular de uma lista de compostos tendo como PA a XOR, utilizando os programas *Autodock* e *GOLD*. Dos resultados do *docking* molecular, serão selecionados os compostos com possível atividade inibitória, sendo realizada a síntese desses compostos. Posteriormente, os compostos sintetizados serão testados através da avaliação da atividade inibitória da XOR, utilizando o método de Gupta⁶⁰ e as condições descritas por Zhao⁶¹.

As cianinas, SAQ, esteroides e barbituratos foram escolhidos para o presente estudo, não só por serem compostos que já estão a ser trabalhados pelo grupo de investigação em que este trabalho se insere, mas também devido a apresentarem características de potencial interesse para a inibição da XO. Por exemplo, as cianinas e os SAQ em causa apresentam um anel de 5 membros com dois átomos eletronegativos, algo que se assemelha como o febuxostat, e os barbituratos, apesar de apresentarem um anel de 6 membros, também têm átomos eletronegativos e apresentam uma semelhança com o febuxostat, designadamente no tamanho. Os esteroides também são um grupo interessante para trabalhar, nomeadamente devido à sua estrutura rígida.

Capítulo 2 - Resultados e discussão

2.1 Docking molecular

Neste trabalho pretendeu-se, através do uso de programas de *docking* molecular (*Autodock 4* e *GOLD*), prever a interação com a XOR de compostos pertencentes às classes dos esteroides, das cianinas, dos barbitúricos e dos SAQ. Além disso, esta ferramenta computacional permitiu a seleção dos compostos que apresentam possíveis e melhores interações com o sítio ativo da XOR, podendo-se excluir a síntese de compostos menos promissores.

No estudo realizado com o *Autodock 4*, a validação do método de *docking* foi realizada por 2 abordagens diferentes. Na primeira abordagem, após a separação do complexo ligando-proteína obtido no banco de dados de proteínas (PDB) com o código 1N5X, foi efetuado um *docking* com o mesmo ligando utilizando os parâmetros descritos na literatura por Chen⁶², de modo a verificar se as conformações geradas obtinham um valor de desvio da raiz quadrada média (RMSD) inferior a 2,0 Å. Na segunda abordagem, fez-se a comparação dos resultados obtidos no *docking* do ligando co-cristalizado da XOR e um ligando testado por Chen⁶², com os resultados obtidos no *docking* realizado por Chen⁶². Apesar de haver várias entradas no PDB para estruturas cristalizadas da XOR, a escolha recaiu sobre a 1N5X uma vez que esta apresentava como ligando o febuxostat e permitiu obter os melhores resultados de validação.

Na validação pela primeira abordagem, a melhor conformação gerada no *docking* do ligando co-cristalizado (febuxostat) obteve uma energia mínima de ligação de -8,68 Kcal/mol, sendo o valor de RMSD inferior a 2,0 Å (0,79 Å), o que permitiu a validação do método. Na validação pela segunda abordagem, os resultados do *docking* foram semelhantes aos obtidos por Chen, S.⁶² (dados não apresentados), considerando-se, assim, o método validado.

Na figura 6A podemos verificar que o febuxostat interage com a proteína no seu sítio ativo, nomeadamente, através dos aminoácidos (aa's) presentes à entrada do mesmo (duas fenilalaninas (PHE), a 914 e a 1009, o glutamato (GLU) 802, a arginina (ARG) 880, a treonina (THR) 1010 e a asparagina (ASN) 768). Na figura 6B podemos verificar que os aa's ASN 768, THR 1010 e ARG 880 interagem com o ligando por um total de 6 ligações de H.

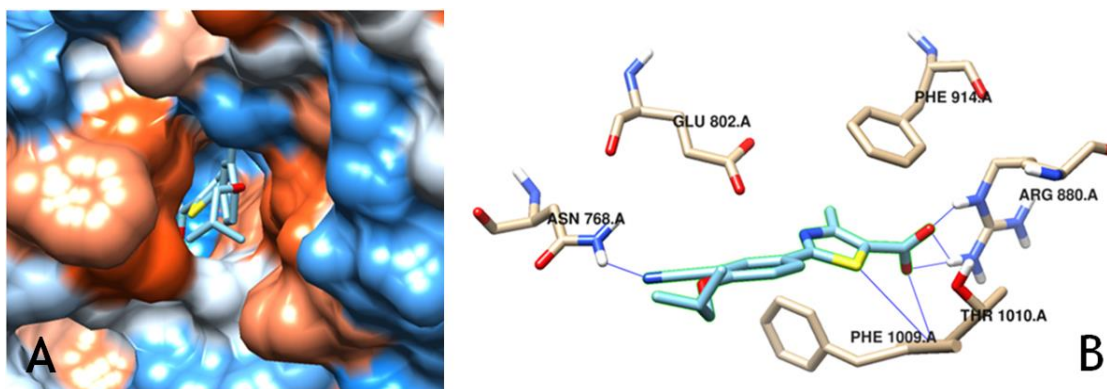


Figura 6: *Docking* do ligando co-cristalizado da XOR obtido no *Autodock 4* com a conformação com maior afinidade gerada. A) entrada do sítio ativo; B) interações dos aminoácidos da XOR.

De seguida procedeu-se à validação do *docking* com o *GOLD*, procedendo à separação do complexo ligando-proteína obtido no *protein data bank* (PDB) com o código 1N5X, foi efetuado um *docking* com o mesmo ligando utilizando os parâmetros *default*. Os resultados obtidos no *GOLD* foram comparados com os resultados obtidos no *Autodock 4*, de modo a verificar se os resultados seriam semelhantes. Esta comparação foi realizada através da sobreposição da melhor conformação gerada em cada programa e através da análise das suas interações obtidas com os aa's da XOR.

O *GOLD* utiliza um *score*¹ próprio, ao contrário do *Autodock 4*, que utiliza um *score* baseado em energias de afinidade (Kcal/mol). Por outras palavras, o ranking do *score* dos resultados obtidos no *GOLD* é analisado de forma decrescente de valores sendo que estes não apresentam unidades. Sendo assim, os rankings dos *scores* do *Autodock 4* e do *GOLD* têm de ser analisados de forma distinta.

Na figura 7 encontra-se representada a conformação obtida do febuxostat com maior *score* através do *GOLD*. Na figura 7A podemos verificar que o febuxostat interage com a proteína no seu sítio ativo, nomeadamente, através dos aa's presentes à entrada (duas PHE, uma ARG, uma THR e uma ASN). Na figura 7B podemos verificar que os aa's ARG, THR e ASN interagem com o ligando por um total de 3 ligações de H com o ligando.

¹ *Score* - informação dada por um programa de *docking molecular*, resultante do cálculo efetuado através de um dado algoritmo e permite efetuar um ranking dos ligandos testados.

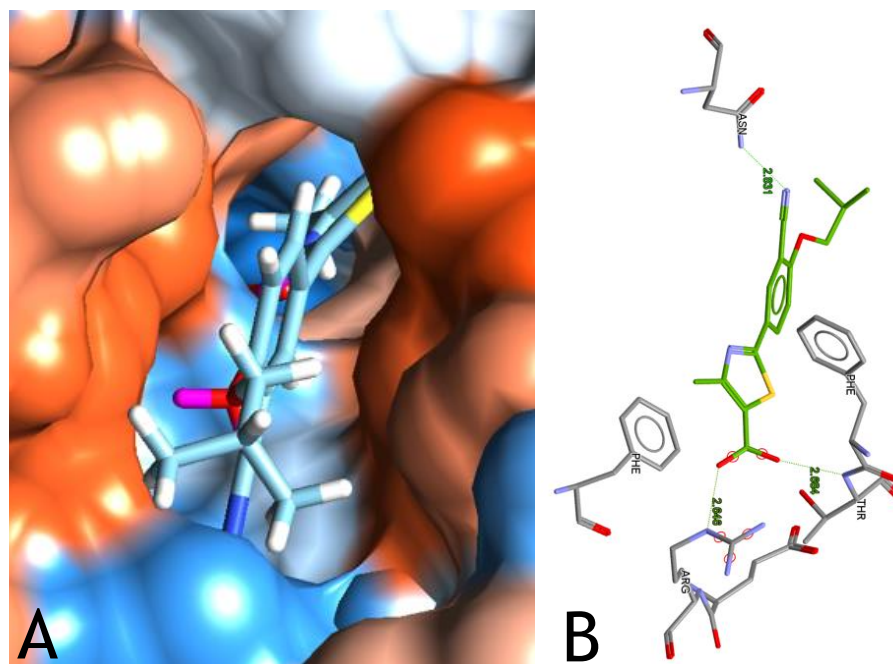


Figura 7: *Re-docking* do ligando co-cristalizado da XOR obtido no GOLD com a conformação com maior afinidade gerada. A) Entrada do sítio ativo; B) interações com aa's da XOR.

Na figura 8 encontra-se a sobreposição entre a conformação do febuxostat com maior afinidade obtida no *GOLD* e o febuxostat ligado à enzima (figura 8A), o que permitiu verificar que os resultados obtidos no *GOLD* são semelhantes ao observado para o ligando co-cristalizado com a enzima, e a sobreposição da conformação do febuxostat com maior afinidade obtida no *GOLD* com a conformação do febuxostat com maior afinidade obtida no *Autodock 4*, que também são semelhantes, o que indica que apesar de serem programas distintos, com algoritmos e *scores* diferentes, os resultados não têm grandes variações (figura 8B).

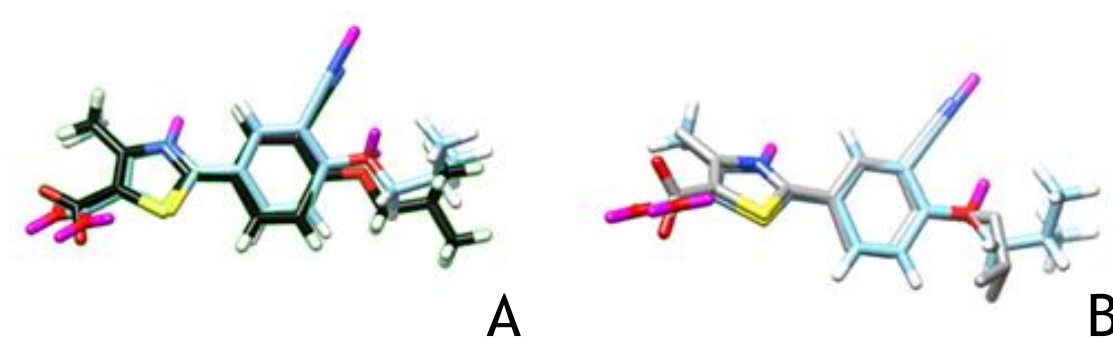


Figura 8: Sobreposição das conformações com melhor afinidade obtidas no Autodock 4, GOLD e o ligando co-cristalizado da XOR. A) Sobreposição de uma conformação obtida no *GOLD* (azul) com o ligando co-cristalizado febuxostat (preto); B) Sobreposição de uma conformação obtida no *GOLD* (azul) com uma conformação obtida no Autodock 4 (cinzento).

O valor de RMSD obtido no GOLD para a conformação de maior afinidade foi de 0,72 Å (similar ao obtido no Autodock 4 para a conformação de maior afinidade, 0,79 Å) e o *score* obtido

para esta mesma conformação foi de 80,541. No caso do GOLD, como o RMSD também foi inferior a 2,0 Å para a conformação de maior afinidade, o método pode ser considerado validado também através deste programa.

A realização do *docking* pelo *GOLD* permitiu testar vários ligandos de uma só vez, ao contrário do *Autodock 4*, o que facilitou a análise dos resultados.

Através do *GOLD* foram realizados 4 *dockings* em separado das 4 classes de compostos em estudo na presente dissertação (esteroides, barbituratos, cianinas e SAQ, apresentados nos anexos 1-6). Os resultados referentes a cada *docking* destas classes foram analisados, discutidos e, posteriormente, as conformações com melhor *score* obtido foram selecionadas.

Na Tabela 1 são apresentados os resultados obtidos pelo *GOLD* para os 10-15 compostos de cada classe que apresentaram os melhores resultados.

Tabela 1: Lista de resultados obtidos do *docking* efetuado pelo *GOLD* para os compostos selecionados.

<i>GOLD</i>							
Esteroides		Barbituratos		Cianinas		SAQ	
Comp ⁽¹⁾	GS ⁽²⁾	Comp ⁽¹⁾	GS ⁽²⁾	Comp ⁽¹⁾	GS ⁽²⁾	Comp ⁽¹⁾	GS ⁽²⁾
TEI ⁽³⁾	80,541	TEI ⁽³⁾	80,541	TEI ⁽³⁾	80,541	TEI ⁽³⁾	80,541
1	61,229	11	65,745	23	100,748	38	74,226
2	56,543	12	65,639	24	96,194	39	73,982
3	53,736	13	63,964	25	89,681	40	73,248
4	51,789	14	62,961	26	86,438	41	72,769
5	48,079	15	62,458	27	85,942	42	72,575
6	46,699	16	61,785	28	85,393	43	70,849
7	46,566	17	61,523	29	85,065	44	70,626
8	46,284	18	61,362	30	84,793	45	70,202
9	46,190	19	61,270	31	83,242	46	68,699
10	45,774	20	60,316	32	82,066	47	67,982
-----	-----	21	-----	33	78,897	-----	-----
-----	-----	22	-----	34	78,573	-----	-----
-----	-----	-----	-----	35	78,312	-----	-----
-----	-----	-----	-----	36	77,681	-----	-----
-----	-----	-----	-----	37	77,331	-----	-----

⁽¹⁾ Comp - Composto

⁽²⁾ GS - *GOLDScore*

⁽³⁾ TEI - febuxostat

Os compostos 21 e 22 da classe dos barbitúricos não apresentam valores no *GOLD* uma vez que só foram testados no *Autodock 4*.

Através da análise dos resultados da tabela 1, foi possível verificar que, pelo programa *GOLD*, o *score* obtido da conformação com melhor afinidade do febuxostat foi superior ao das conformações com melhor afinidade das 4 classes, exceto na classe das Cianinas em que 10 compostos obtiveram um *score* superior.

Após a análise dos resultados obtidos no *GOLD*, para os compostos presentes na tabela 1, foi realizado um *docking* para cada um utilizando o programa *Autodock 4*. Na tabela 2 encontram-se os resultados obtidos pelo *Autodock 4* dos compostos selecionados de cada classe.

Tabela 2: Lista de resultados obtidos do *docking* efetuado pelo *Autodock 4* para cada classe.

Autodock 4							
Esteroides		Barbituratos		Cianinas		SAQ	
Comp ⁽¹⁾	E ⁽²⁾	Comp ⁽¹⁾	E ⁽²⁾	Comp ⁽¹⁾	E ⁽²⁾	Comp ⁽¹⁾	E ⁽²⁾
TEI ⁽³⁾	-8,68	TEI ⁽³⁾	-8,68	TEI ⁽³⁾	-8,68	TEI ⁽³⁾	-8,68
1	-10,87	17	-10,79	27	-11,74	43	-10,57
9	-10,46	16	-10,45	30	-11,14	40	-9,89
3	-9,88	11	-9,13	24	-10,27	41	-9,86
7	-9,23	12	-9,13	23	-10,12	47	-9,52
2	-9,12	13	-8,5	31	-10,12	38	-9,34
5	-8,67	18	-8,2	26	-9,99	39	-9,22
4	-8,65	19	-7,44	34	-9,05	44	-8,71
10	-8,4	14	-7,38	25	-9,02	46	-8,69
6	-8,28	20	-7,06	35	-8,97	45	-8,57
8	-8,26	15	-6,86	33	-8,96	42	-7,81
-----	-----	21	-7,14	29	-8,9	-----	-----
-----	-----	22	-7,14	37	-8,41	-----	-----
-----	-----	-----	-----	32	-7,76	-----	-----
-----	-----	-----	-----	36	-7,35	-----	-----
-----	-----	-----	-----	28	-7,13	-----	-----

⁽¹⁾ Comp - Composto

⁽²⁾ E - Energia (Kcal/mol)

⁽³⁾ TEI - febuxostat

Através da análise dos resultados da tabela 2, foi possível verificar que no programa *Autodock 4*, a energia obtida na conformação com melhor afinidade do febuxostat, na sua maioria, era

maior do que as observadas nas conformações com melhor afinidade dos compostos testados, sendo que em algumas das conformações com melhor afinidade se observou uma energia maior que com a conformação com melhor afinidade do Febuxostat.

Em relação à análise das interações das conformações com melhor afinidade dos compostos testados, esta só foi realizada a análise referente ao composto com melhor afinidade testado no programa *Autodock 4*. Na figura 9 podemos verificar que a conformação com melhor afinidade da classe dos esteroides efetua interações por ligações de hidrogénio entre o carboxilato ligando ao anel aromático no esteroide 1 e os aa's THR 1010 e ARG 880, e por interações hidrofóbicas, entre o anél aromático do esteroide e os aa's PHE (914 e 1009) e ASN 768.

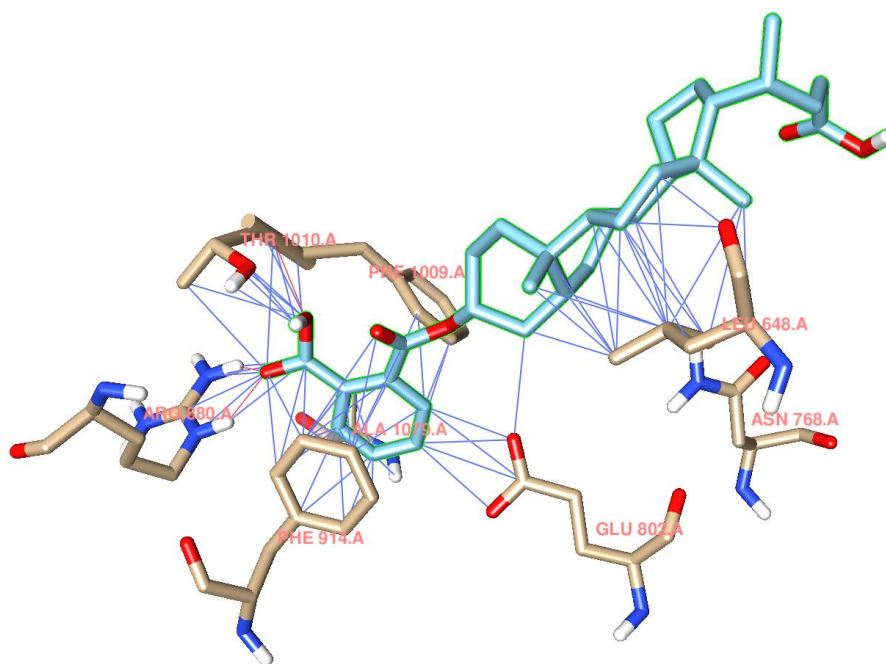


Figura 9: Interação da conformação com melhor afinidade do composto 1, da classe dos esteroides, com a XOR. Traço vermelho - interações por ligações de hidrogénio; Traço azul - interações hidrofóbicas.

Na figura 10 temos representada a entrada do sítio ativo da XOR e a conformação com melhor afinidade da classe dos esteroides, sendo possível observar o encobrimento da entrada do sítio ativo por parte do composto testado.

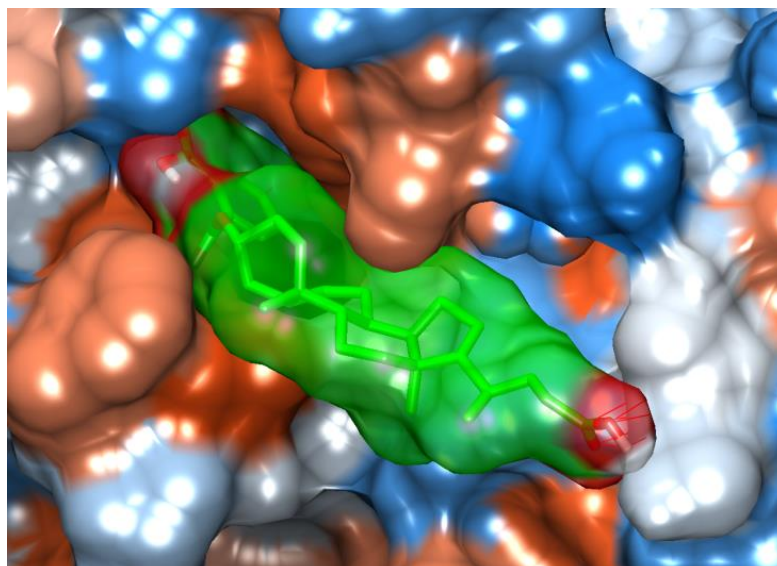


Figura 10: A localização do composto 1 na entrada do sítio ativo da XOR após a simulação computacional com o programa *Autodock 4*.

Os resultados demonstram que os esteroides estudados podem ter potencial como possíveis inibidores da XOR porque através da sua interação à entrada do sítio ativo desta proteína, bloqueiam o sítio ativo da mesma impedindo o acesso a este de outras moléculas, incluindo o ligando endógeno.

Na classe dos barbituratos, o composto com melhor afinidade testado apresenta interações por ligações de hidrogénio das aminas e enxofre com os aa's THR 1010 e ARG 880, e por interações hidrofóbicas, devido à interação do anel do barbitúrico com os aa's PHE (914 e 1009) e o anel aromático com o aa ASN 768, como é representado na figura 11.

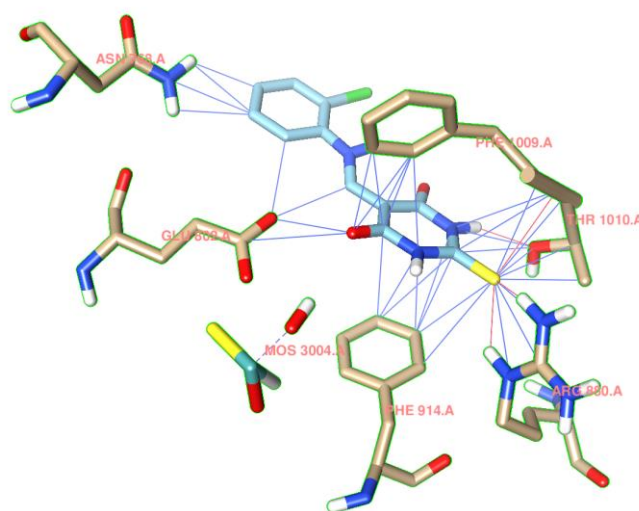


Figura 11: Interação da conformação com melhor afinidade do composto 17, da classe dos barbituratos, com a XOR. Traço vermelho - interações por ligações de hidrogénio; Traço azul - interações hidrofóbicas.

Na figura 12 temos representada a entrada do sítio ativo da XOR e a conformação do composto 17, da classe dos barbituratos, sendo possível verificar que este entrou no sítio ativo da XOR.

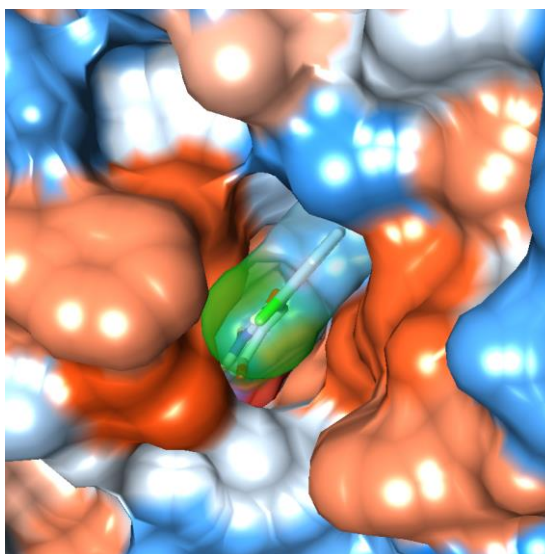


Figura 12: A localização do composto 17 na entrada do sítio ativo da XOR após a simulação computacional com o programa *Autodock 4*.

Os resultados demonstram que os barbituratos estudados podem servir como possíveis inibidores da XOR através da sua penetração parcial no sítio ativo da XOR e o bloqueio da entrada do sítio ativo da XOR, sendo que de ambas as formas, este género de compostos pode impedir o acesso ao sítio ativo de outros compostos, incluindo o ligando endógeno.

Na classe das cianinas, a análise das interações foi realizada para dois compostos que evidenciaram maior afinidade, uma vez que nesta classe foram estudadas monometinocianinas e trimetinocianinas que se diferenciam na cadeia cromófora. As interações observadas para a monometinocianina (composto 30) foram por ligações de hidrogénio entre a amina secundária do grupo acetamida e o aa GLU 802, e por interações hidrofóbicas, entre o metilo do grupo acetamida e os aa's PHE 914 e PHE 1009, como é representado na figura 13.

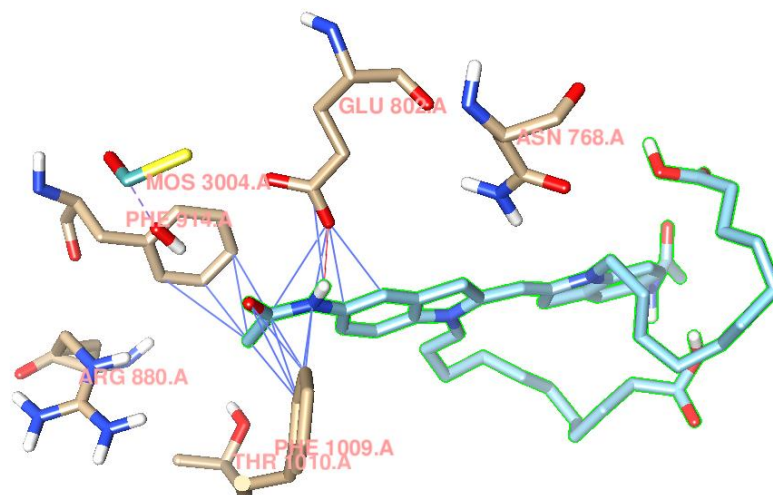


Figura 13: Interação da conformação com melhor afinidade do composto 30, da classe das cianinas, com a XOR. Traço vermelho - interações por ligações de hidrogénio; Traço azul - interações hidrofóbicas.

Na figura 14 temos representada a entrada do sítio ativo da XOR e a respetiva conformação com melhor afinidade do composto 30, sendo possível verificar a entrada da monometinocianina no sítio ativo da XOR.

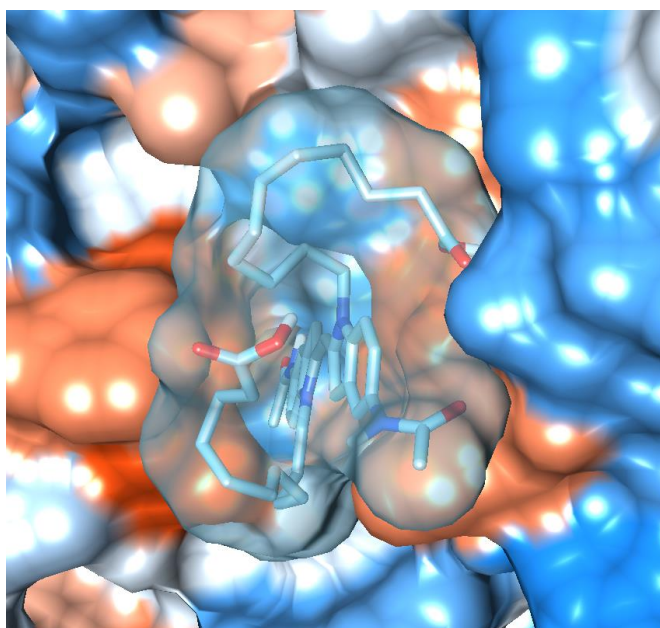


Figura 14: A localização do composto 30 na entrada do sítio ativo da XOR após a simulação computacional com o programa Autodock 4.

Os resultados demonstram que as monometinocianinas estudadas podem servir como possíveis inibidores da XOR através do seu posicionamento à entrada do sítio ativo, o que permite a sua potencial utilização como bloqueadores da entrada do sítio ativo desta proteína, o que pode impedir o acesso a este de outros compostos, incluindo o ligando endógeno.

As interações referentes à trimetinocianina (composto 24) evidenciam ligações de hidrogénio entre a amina secundária do grupo acetamida e o aa GLU 802, e por interações hidrofóbicas, entre o metilo do grupo acetamida e os aa's PHE 914 e entre o anel aromático e PHE 1009 e PHE 914, como é representado na figura 15.

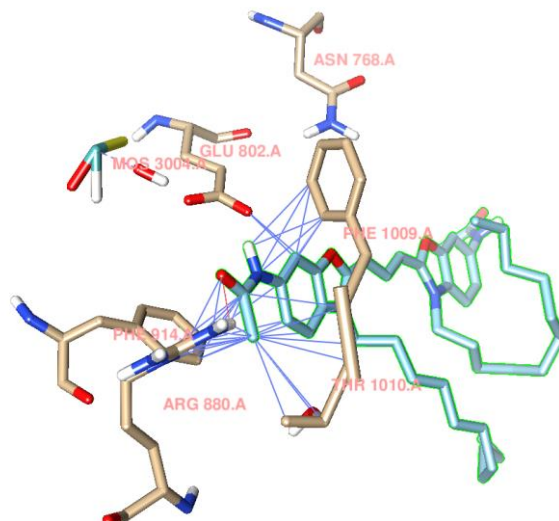


Figura 15: Interação da conformação com melhor afinidade do composto 24, da classe das cianinas, com a XOR. Traço vermelho - interações por ligações de hidrogénio; Traço azul - interações hidrofóbicas.

Na figura 16 temos representada a entrada do sítio ativo da XOR e a conformação com melhor afinidade do composto 24, sendo possível ver que esta interagiu com a XOR à entrada do sítio ativo desta.

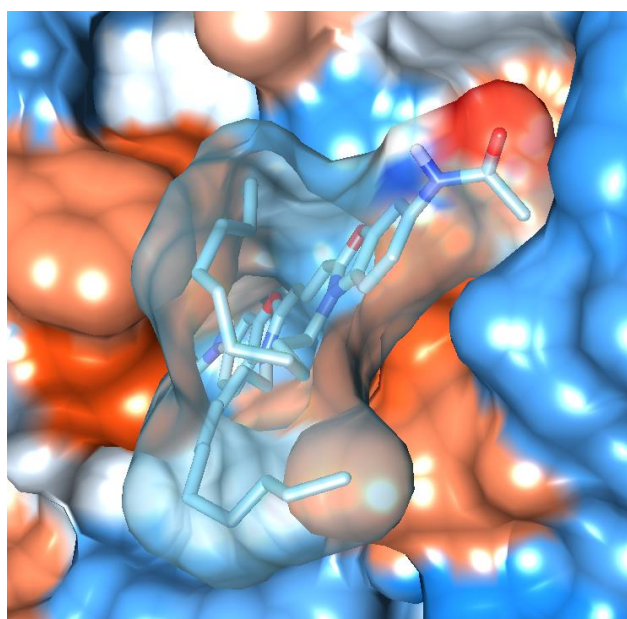


Figura 16: A localização do composto 24 na entrada do sítio ativo da XOR após a simulação computacional com o programa Autodock 4.

Os resultados demonstram que as trimetinocianinas estudadas podem servir como possíveis inibidores da XOR através do seu posicionamento à entrada do seu sítio ativo, e tal como as monometinocianinas, bloqueiam a entrada do sítio ativo desta proteína e bloqueiam o acesso a este de outros compostos, incluindo o ligando endógeno.

Contudo, os resultados desta simulação computacional realizada na classe das cianinas pelo programa *Autodock 4* podem ser discutíveis devido ao elevado grau de torção que a cadeia alquílica ligada ao azoto apresenta, como se pode ver na figura 15. Um composto que apresente uma torção na sua estrutura desta magnitude, não deve apresentar uma energia tão baixa. Isto porque, as moléculas que originam muitas torções apresentam uma tensão estrutural maior o que leva a que a sua energia seja superior. A justificação para esta torção pode ter por base o método utilizado pelo algoritmo do *Autodock 4* para efetuar as torções nas moléculas em causa. O algoritmo, ao calcular as torções desta cadeia alquílica de 11 carbonos, tendo em conta a liberdade de rotação das ligações e os seus ângulos de torção, leva ao fracionamento desta cadeia em unidades de 2 carbonos, sendo que os cálculos das torções são realizados distintamente para cada unidade. Por fim, o algoritmo faz o somatório das energias dessas frações dando a energia final de torção. Para que isto não acontecesse, uma das possíveis hipóteses seria modificar os parâmetros do *Autodock 4* para que as torções fossem inseridas manualmente pelo utilizador.

Na classe dos SAQ, o composto 41 com melhor afinidade testado apresenta interações por ligações de hidrogénio do carbonilo do grupo acetamida com os aa's THR 1010 e ARG 880, e por interações hidrofóbicas, do metilo do grupo acetamida com os aa's PHE 914 e anel aromático com os aa's PHE 914 e PHE 1009, como é representado na figura 17.

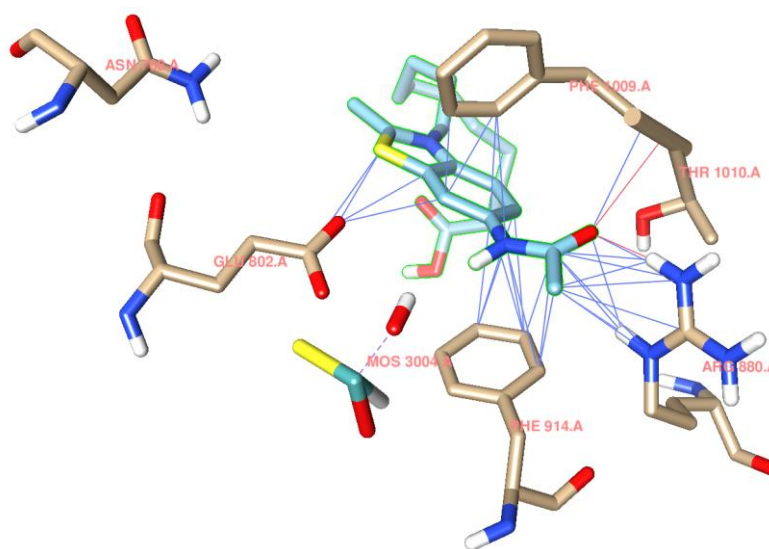


Figura 17: Interação da conformação com melhor afinidade do composto 41, da classe das SAQ, com a XOR. Traço vermelho - interações por ligações de hidrogénio; Traço azul - interações hidrofóbicas.

Na figura 18 temos representada a entrada do sítio ativo da XOR e a respetiva conformação com melhor afinidade da classe dos SAQ, sendo possível a sua entrada no sítio ativo da XOR.

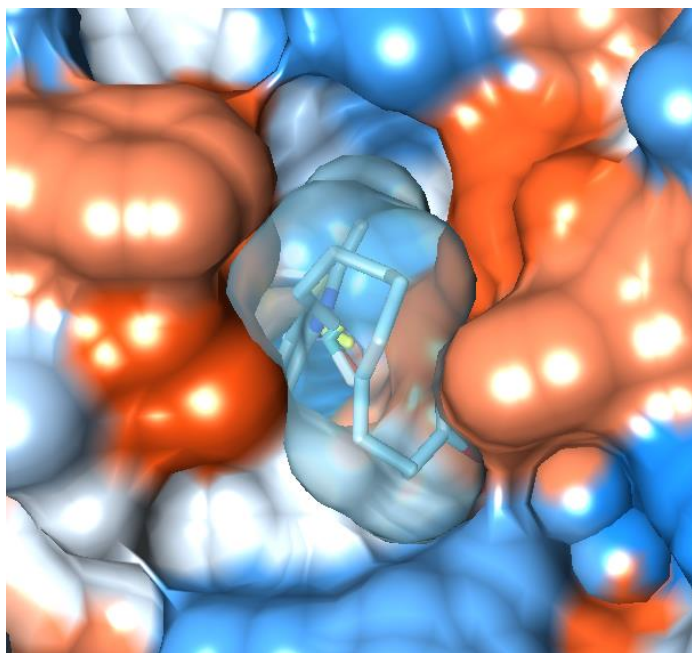


Figura 18: A localização do composto 41 na entrada do sítio ativo da XOR após a simulação computacional com o programa *Autodock 4*.

Os resultados demonstram que os SAQ estudados podem ter potencial como possíveis inibidores da XOR através da sua penetração parcial no sítio ativo da XOR, o que permite o seu uso como bloqueadores da entrada do sítio ativo da XOR, impedindo o acesso ao sítio ativo da XOR de outros compostos, incluindo o ligando endógeno. Contudo, como os SAQ são precursores da classe das cianinas, os resultados da simulação computacional realizada nesta classe pelo programa *Autodock 4* podem ser discutíveis devido ao elevado grau de torção que a cadeia alquílica ligada ao azoto apresenta. Neste caso, uma potencial solução para se realizar um estudo mais eficiente da interação dos SAQ com a XOR é a mesma discutida acima para as cianinas.

Na tabela seguinte, está representado o melhor composto de cada classe tendo em conta o ranking e energias do *Autodock 4*. Nesta tabela podemos observar que os compostos com melhor afinidade para a XOR dentro de cada classe apresentam uma energia de ligação inferior à do Febuxostat, o que indica que apresentam uma potencial maior afinidade que este inibidor conhecido da XOR para esta proteína.

Tabela 3: Energias de ligação correspondentes à conformação de maior afinidade de cada classe que apresentou os melhores resultados.

Resumo		
Classes	Composto	Energias (Kcal/mol)
Febuxostat	-	-8,68
Esteroides	1	-10,87
Barbituratos	17	-10,79
Cianina	30	-11,74
SAQ	41	-10,57

De modo a facilitar a comparação das 4 classes com o febuxostat, foi realizada uma sobreposição da conformação de maior afinidade de cada classe e o febuxostat. Como podemos ver na figura 19, as conformações e o febuxostat partilham, de um modo geral, o mesmo espaço conformacional. Numa análise mais aprofundada, podemos verificar que a classe das cianinas apresenta-se mais deslocada espacialmente em relação à conformação do febuxostat. Isto pode ser devido ao seu tamanho, que impossibilita a sua entrada no sítio ativo.

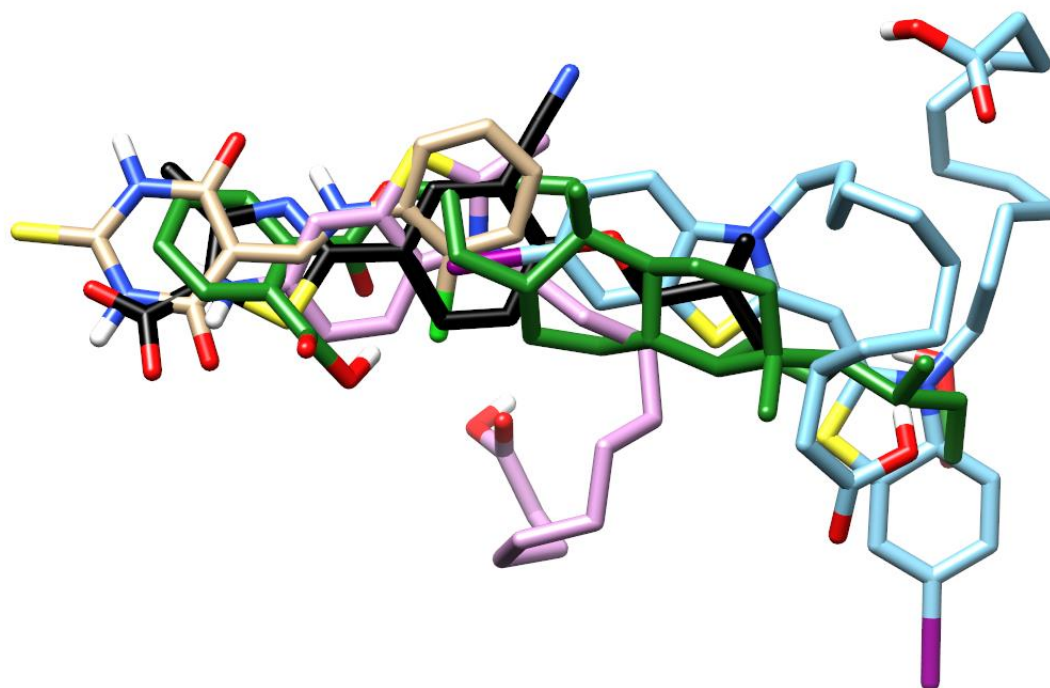


Figura 19: Representação da sobreposição das 4 classes ao febuxostat. febuxostat (preto), o composto 1 dos esteroides (verde), o composto 17 dos barbituratos (castanho claro), o composto 30 das cianinas (azul) e o composto 41 dos SAQ (roxo).

Tendo em consideração os resultados e a análise de toda a simulação computacional podemos considerar que as 4 classes poderão ter atividade inibitória na XOR. Com base nisto, os melhores compostos selecionados de cada classe prosseguiram para a avaliação da sua atividade inibitória na XOR *in vitro*. A maioria destes compostos foi sintetizada no laboratório previamente à sua avaliação biológica.

2.2 Síntese

Neste subcapítulo vai ser abordada a síntese de alguns compostos e o motivo da sua escolha, bem como os problemas que ocorreram ao longo da síntese, os seus rendimentos obtidos e a sua pureza obtida.

Em relação aos compostos a sintetizar e avaliar, estes foram escolhidos tendo em consideração os resultados obtidos na simulação computacional realizada anteriormente, bem como a facilidade da sua síntese, a disponibilidade dos precursores, os seus rendimentos (η) e a sua pureza. Na tabela 4 estão representados os compostos selecionados.

Tabela 4: Lista de compostos selecionados para a síntese laboratorial e avaliação biológica.

Esteroides	Barbituratos	Cianinas	SAQ
1	19	23	40
4	21	24	41
5		25	43
10		26	44
		33	46
		36	
		37	

Em relação aos compostos 1 e 4 da classe de esteroides, a sua síntese não será necessária devido a estes se encontrarem comercialmente disponíveis. Os compostos 21 e 33 não foram sintetizados devido a terem sido fornecidos pelo Mestre João Serrano e pelo Professor Doutor Renato Boto.

Durante a síntese dos restantes compostos surgiram diversos percalços, entre eles a impossibilidade de síntese e/ou a baixa pureza do produto obtido.

A síntese dos compostos 23, 24, 36, 37, 40 e 46, sendo que estes apresentavam o benzoxazole como estrutura base, não foi possível a sua síntese devido à existência de uma abertura do anel oxazole que foi descoberta através da análise dos espetros de Ressonância Magnética Nuclear de Protão (RMN ^1H) (dados não apresentados).

Na síntese dos compostos 25 e 26 os rendimentos obtidos foram na ordem dos 50-80% e a sua estrutura e pureza foi comprovada por espectros de RMN ^1H , Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN ^{13}C), IV e por ponto de fusão(pf). Numa análise mais detalhada, ambos os compostos apresentaram no espectro de RMN ^1H foram identificados os sinais do hidrogénio do carbono alfa e do hidrogénio do carbono beta na sua cadeia metínico, o sinal do hidrogénio da amida do grupo acetamida. No espectro de RMN ^{13}C foram identificados os sinais referentes ao carbono alfa, o sinal do grupo carbonilo da acetamida. No espectro de IV também foi identificado a banda referente ao grupo amida da acetamida. A comprovação desta análise foi realizada através da comparação dos resultados obtido com os resultados descritos na literatura por Boto³⁵, que se demonstraram similares.

O composto 41 devido à formação de um óleo impossibilitou a sua cristalização e a sua caracterização, contudo podemos afirmar que a estrutura é a desejada devido a este composto ter sido utilizado como precursor na síntese do composto 26 que foi caracterizado e comprovada a sua estrutura, como está referido acima.

A síntese do composto 48 não constata nos compostos selecionados do *docking*, contudo achou-se por bem realizar a sua síntese de modo a estabelecer um termo de comparação entre o grupo acetamida e a amina primária nesta classe de compostos, nos testes de atividade inibitória da XOR. A sua síntese teve como precursor o composto 25 sendo realizada uma hidrólise do grupo acetamida para amina primária. Este composto foi obtido com um rendimento de 35% e a sua estrutura e pureza foi comprovada por espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , IV e por pf. No espectro de RMN ^1H foram identificados os sinais referentes ao hidrogénio do carbono alfa, ao hidrogénio do carbono beta e ao hidrogénio do grupo amina, no espectro de RMN ^{13}C foi identificado o sinal referente ao carbono alfa, e no espectro de IV também foi identificado a banda referente ao grupo amina.

Os compostos 5, 10, 19 e 43 foram sintetizados e caracterizados por espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e IV e pf. A análise foi realizada através da comparação dos resultados obtido com os resultados descritos na literatura por Chang⁶³ para os compostos 5 e 10, por Figueiredo⁶⁴ para o composto 19 e por Boto³⁵ para o composto 43, sendo que os resultados obtidos se demonstraram similares a estes.

Os rendimentos obtidos dos compostos sintetizados foram da ordem dos 15-50% para as trimetinocianinas, dos 50% para os SAQ e para os barbituratos e dos 50-60% para os esteroides. Assim, no geral podemos constatar que os rendimentos foram satisfatórios, à exceção do composto 26. No caso deste composto o rendimento foi muito baixo provavelmente devido a perdas de composto durante os processos de separação e purificação. Ainda assim, foi obtida quantidade suficiente deste composto. Como tal, todos os compostos sintetizados puderam prosseguir para a avaliação da sua atividade inibitória da XOR.

Sendo assim, na tabela 5 estão representados os compostos sintetizados, fornecidos e comercialmente disponíveis que serão utilizados no teste de atividade inibitória da XOR.

Tabela 5: Lista de compostos sintetizados, fornecidos e comercialmente disponíveis para o teste de atividade inibitória da XOR.

Esteroides	Barbituratos	Cianinas	SAQ
1	19	25	44
4	21	26	
5		33	
10		48	

2.3 Avaliação da atividade inibitória da xantina oxidoredutase

Neste subcapítulo foi avaliada a atividade inibitória dos compostos mencionados na Tabela 5, utilizando o alopurinol como controlo positivo em vez do febuxostat devido a este não se encontrar disponível no laboratório. A avaliação foi realizada num espectrofotómetro de UV-visível para medir a concentração de AU formado a 295 nm. O método baseia-se na formação de AU a partir da XA por ação enzimática da XOR, sendo necessário perceber o intervalo de concentração em que há linearidade de absorvância. Para tal, foi realizada uma curva de calibração a 295 nm obtida a partir de várias concentrações de AU tendo sido observada uma linearidade entre 12,5 e 400 μM (gráfico 1).

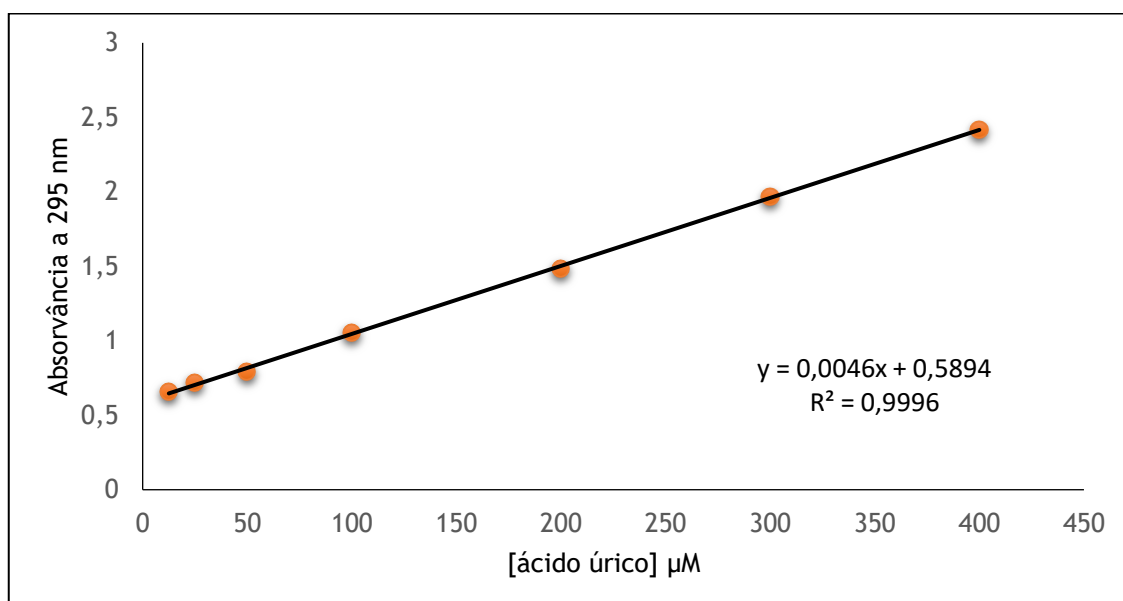


Gráfico 1: Curva de calibração para o AU a 295 nm com respetiva equação da reta e coeficiente de determinação.

Na realização do teste da atividade inibitória da XOR foi utilizada uma concentração de 30 μM de composto em cada poço, utilizando o método de Gupta⁶⁰ e as condições descritas por Zhao⁶¹.

Na análise dos resultados obtidos (anexo 7 e gráficos 2 e 3), verificamos que os compostos 25 e 48 apresentam alguma atividade inibitória, apesar de esta ser bastante inferior à do controlo positivo, o alopurinol.

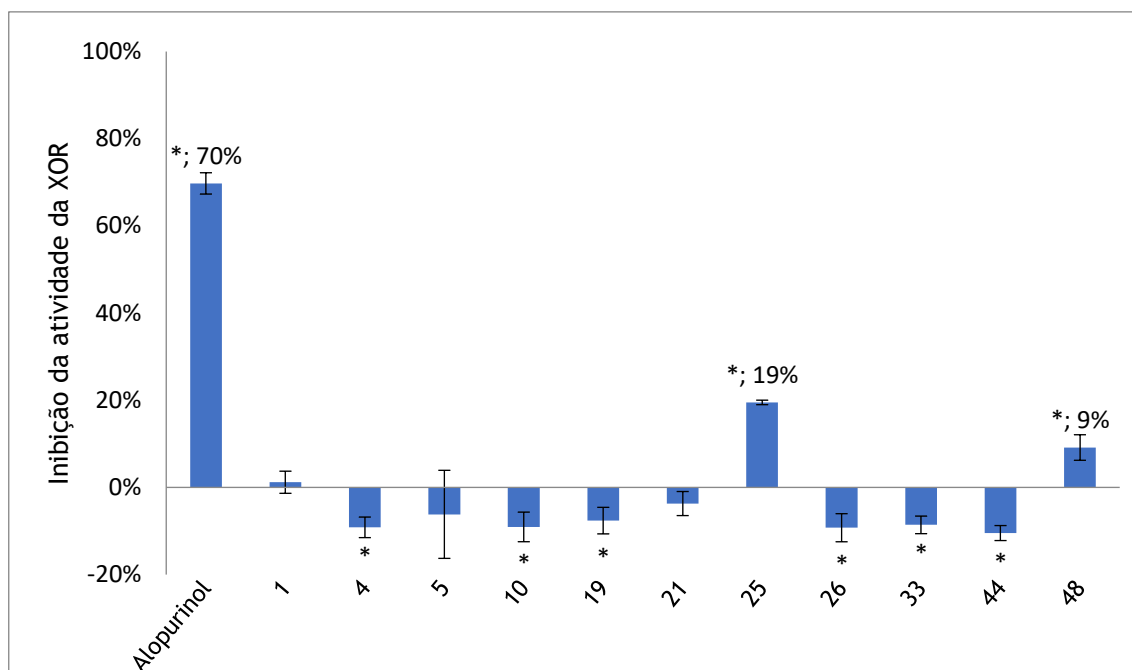


Gráfico 2: Percentagem de inibição da enzima XOR obtida para cada composto em relação ao controlo positivo. Os desvios padrão são representativos das 3 experiências realizadas independentes. * $p < 0.05$ em relação ao controlo (Teste t -Student).

Numa análise mais pormenorizada do gráfico 2 os resultados obtidos para os compostos 25 e 48, demonstraram que estes compostos apresentam a capacidade de inibir a XOR. Esta inibição pode estar relacionada com o grupo presente em C6 do benzotiazole, que pode ser tanto uma acetamida ou uma amina primária. Devido às concentrações usadas, uma pequena quantidade dos compostos 25 e 48, precipitaram.

Para resolver este problema foi realizada uma nova curva de calibração (gráfico 3) com concentrações inferiores a $12,5 \mu\text{M}$ de modo a repetir o estudo da avaliação da atividade inibitória da XOR a concentrações mais baixas de modo a eliminar a precipitação na solução.

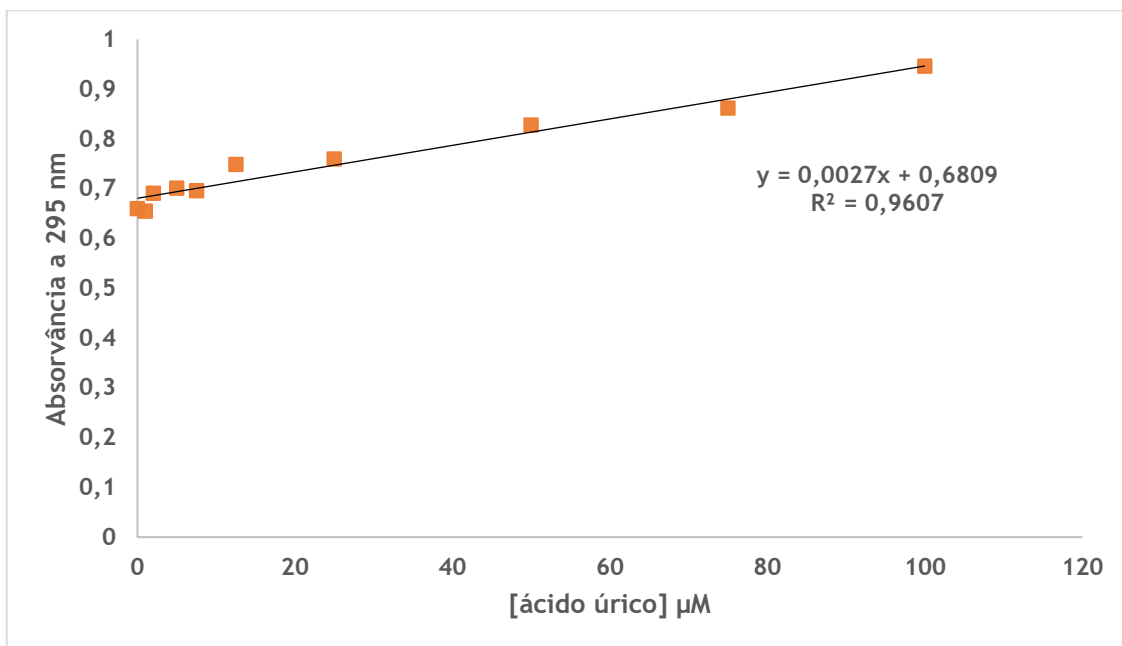


Gráfico 3: Curva de calibração para o AU a 295 nm com respetiva equação da reta e coeficiente de determinação.

Por forma a verificar se a inibição obtida não era devido a essa pequena quantidade de composto precipitado, efetuaram-se novos ensaios, com novas concentrações (30, 10, 5 e 1 μM), onde as misturas em que se observou precipitação (30, 10 μM) foram filtradas, sendo comparadas com misturas com a mesma “concentração” não filtradas. Este processo foi realizado porque o precipitado pode impedir o feixe de luz de passar pela solução levando a que o equipamento registre isto como uma absorvância quando na verdade o feixe é bloqueado.

O alopurinol foi utilizado nas concentrações acima referidas, de modo a que se tenha um controlo positivo para cada concentração. No gráfico 4 estão representados os resultados desses testes.

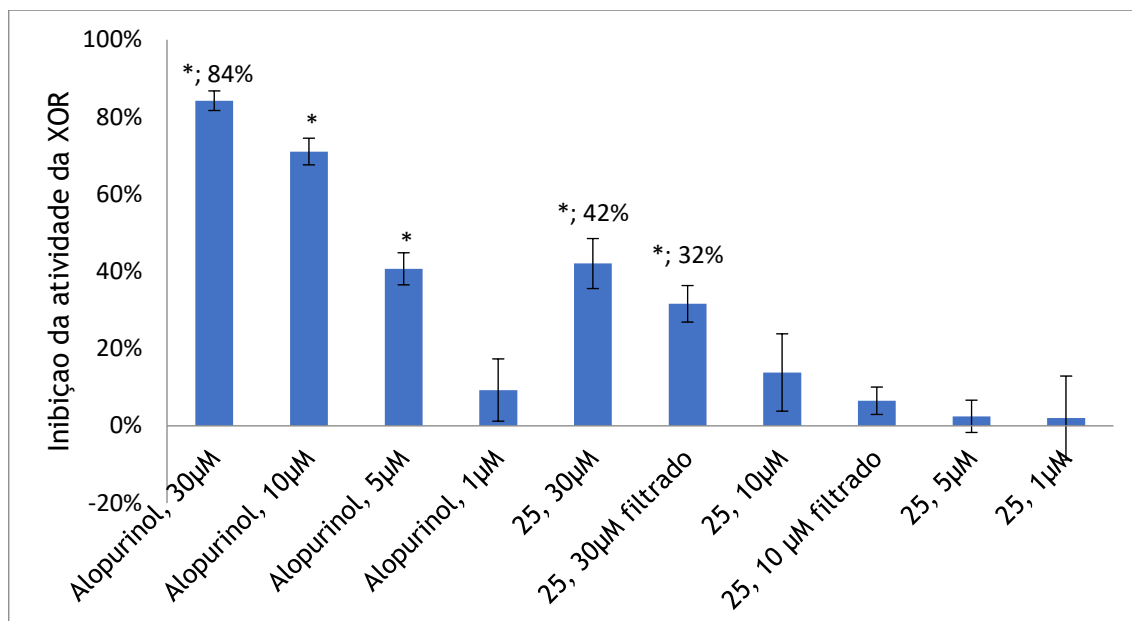


Gráfico 4: Percentagem de inibição da enzima XOR obtida para o controle positivo, o alopurinol, e composto. Teste comparativo de várias concentrações (30, 10, 5 e 1 μM) com o objetivo de relacionar a inibição com a precipitação do composto 25. Os desvios padrão são representativos das 2 experiências realizadas independentemente. * $p < 0.05$ em relação ao controle (Teste *t*-Student).

Em relação à análise dos resultados do gráfico 4, pode-se verificar que pela comparação das concentrações de 30 e 10 μM filtradas e não filtradas que a leitura pelo equipamento é afetada parcialmente pela precipitação, mas ao mesmo tempo demonstra que existe inibição por parte do composto. Mesmo em concentrações inferiores, como a de 5 e 1 μM , as quais não apresentavam precipitado verifica-se que a inibição ocorre, apesar de ser baixa.

Com o intuito de confirmar a inexistência de precipitado na concentração 5 μM do composto 25, foram obtidas imagens ao microscópio (Figura 20) com uma ampliação total de 400x que demonstraram a existência de precipitado na solução de 30 μM , e a sua inexistência na concentração de 5 μM . Nas imagens obtidas para esta concentração viram-se apenas uns cristais de tamanho muito reduzido que provavelmente poderão advir da solução tampão porque caso fossem do composto, estes cristais apresentariam uma tonalidade arroxeadada, como se verifica na imagem relativa à solução de 30 μM .

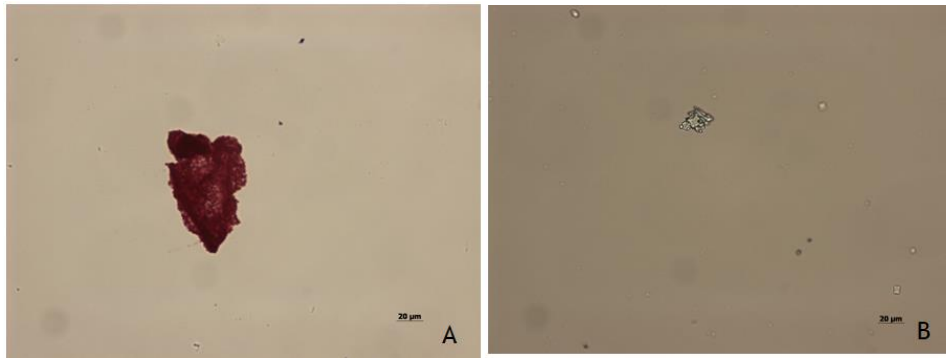


Figura 20: Imagens microscópicas de duas soluções de concentrações diferentes ($5\ \mu\text{M}$ e $30\ \mu\text{M}$) do composto 25. A) Solução de concentração de $30\ \mu\text{M}$ - presença precipitado arroxeadado; B) Solução de concentração de $5\ \mu\text{M}$ - ausência de precipitado arroxeadado.

Capítulo 3 - Conclusão e perspectivas futuras

O *docking* é uma ferramenta computacional utilizada para otimizar o processo de descoberta e o desenvolvimento de fármacos. Esta ferramenta tem uma ampla gama de algoritmos, o que permite com que os dados obtidos sejam o mais próximo ao que acontece na realidade. Desta forma, o *docking* tem vindo a assumir um papel de destaque no que concerne ao processo inicial de descoberta e desenvolvimento de fármacos, uma vez que a sua utilização permite o uso de grandes bibliotecas de compostos, reduzindo a quantidade de compostos e, conseqüentemente, a síntese de compostos em grande escala.

Este trabalho teve como objetivo a utilização do *docking* para estudos cuja PA é a XOR, sendo que, esta proteína está envolvida no processo de catabolismo de bases azotadas purínicas presentes no ser humano, originando AU. A XO, uma forma da XOR, no catabolismo de bases azotadas purínicas usa o oxigénio molecular como aceitador de eletrões, o que leva à produção concomitante de ROS, como o radical anião superóxido e peróxido de hidrogénio e, conseqüentemente, a patologias além da gota, como por exemplo, a lesão de isquemia/reperfusão, doenças cardiovasculares, entre outras. Posto isto, este trabalho visou utilizar o *docking* para estudos com a XOR com o intuito de descobrir possíveis fármacos para o tratamento dessas patologias.

No que diz respeito aos resultados, podemos afirmar que, de um modo geral, os compostos se revelaram promissores no estudo de *docking*. Contudo, tal não se verificou na avaliação da sua atividade inibitória *in vitro* na XOR, onde os compostos não se apresentaram tão promissores como o esperado, sendo que apenas os compostos 25 e 48 conseguiram inibir a proteína.

Em suma, a utilização do *docking* neste trabalho permitiu a diminuição da lista inicial de compostos para 47 compostos promissores, o que diminuiu o tem dispendido em síntese e permitiu a síntese mais focada de compostos promissores para uma posterior determinação da sua atividade inibitória na XOR. Todavia, dos compostos obtidos pela análise dos resultados do *docking*, houve compostos que não foram possíveis de serem sintetizados devido aos problemas previamente enunciados. Face a tudo o que foi referido, como trabalho futuro será importante seguir as seguintes linhas de investigação: utilização de uma biblioteca de compostos, pertencentes as classes referenciadas no trabalho, mais alargada no estudo *docking* e *Virtual Screening* para procurar novos inibidores da XOR, e a síntese dos compostos que não foram produzidos e que tiveram bons resultados no *docking* de modo a verificar a sua atividade *in vitro* na XOR.

Capítulo 4 - Parte experimental

4.1. Docking Molecular

Para o estudo do *docking* molecular foram utilizados dois programas, o *Autodock 4* e o *GOLD*. A enzima utilizada foi XOR, a qual foi obtida na PDB, com o código 1N5X e resolução de 2.8 Å. A validação do método é importante porque permite que os dados obtido no *docking* tenham uma maior credibilidade. Isto consiste na avaliação do RMSD obtido do *docking* do ligando co-cristalizado com a proteína, sendo que este tem de ser inferior a 2 Å. Neste estudo o ligando foi o febuxostat, o qual é um inibidor conhecido da XOR, uma vez que este ligando foi cristalizado com a proteína em questão. Para o desenho de estruturas bidimensionais e a minimização de energias dos compostos foi utilizado o programa ChemOffice v12.0 da CamBridgeSoft.

4.1.1. Autodock 4

A validação do *docking* foi realizada com base nas configurações descritas abaixo, sofrendo algumas adaptações⁶².

A proteína 1N5X foi preparada procedendo-se à remoção das moléculas de água e a separação do ligando utilizando o programa chimera 1.11.2 da UCSF Chimera.

No *AutodockTools* procedeu-se à adição de cargas *Gasteiger* e de hidrogénios polares. Os átomos foram definidos como *Assign AD4 type*.

As torções flexíveis foram atribuídas aos ligandos, sendo estes autorizados a rodar livremente.

O *Autogrid 4* foi utilizado para gerar campos de afinidade na *grid*, com a seguinte configuração de parâmetros:

- *Grid*: 80x80x80 Å;
- Espaçamento de *grid*: 0,375 Å;
- Coordenadas espaciais: X 96,56; Y 55,159; Z 39,981;
- Para executar a *grid* procedeu-se à adição da frase (atom_par Mo 3.05 0.056 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding) onde constam os dados do Mo, no ficheiro "AD4_parameters.dat" utilizado no *AutoDockTools*, tendo como objetivo a introdução dos dados referentes ao Mo para que seja possível a realização do *docking*.

O algoritmo genético *Lamarckian* foi utilizado para determinar as posições de ligação apropriadas, as orientações e as conformações de ligandos. Os parâmetros de *AutoDock 4* utilizados foram os que se encontram descritos abaixo:

- O número máximo de avaliações de energia: 25 000 000 por "runs";
- Número de conformações geradas: 100;

- As iterações do “*Solis et Wets local search*”: 3000;
- O número de indivíduos em população: 300.

Todos os outros parâmetros que não se encontram mencionados mantiveram-se em *default*.

Os resultados foram diferenciados através do RMSD, sendo que os quais nas melhores conformações geradas devem ser inferiores a 2 Å, para o método ser considerado válido.

Na realização do *docking*, todos os parâmetros descritos anteriormente foram utilizados, exceto os ligandos, sendo que a proteína foi sempre a 1N5X.

4.1.2. GOLD

A proteína 1N5X foi preparada no *GOLD* procedendo-se à remoção das moléculas de água, à adição de hidrogénios e retirou-se o ligando da proteína. O sítio de ligação foi definido através da posição espacial do febuxostat, tendo este um raio de 10 Å. O número de conformações geradas foi 30 “*run*” e a função de *score* utilizado foi o *GOLDScore*. Todos os restantes parâmetros para a realização da validação foram os *default* do programa.

A validação da função de *score* foi obtida verificando se o RMSD era inferior a 2 Å e as conformações obtidas foram comparadas com as do *Autodock 4* para verificar se os resultados eram semelhantes, apesar do uso de dois algoritmos diferentes. Na realização do *docking* dos ligandos todos os parâmetros utilizados estão descritos anteriormente, sendo que a proteína foi sempre a 1N5X.

4.2. Síntese

Todos os reagentes e solventes utilizados eram analiticamente puros e foram adquiridos na *Sigma-Aldrich Company* e *Acros Organics*. Sempre que necessário, foram secos e purificados por métodos padronizados⁶⁵.

Para a cromatografia em camada fina (c.c.f.) utilizaram-se placas de alumínio revestidas por sílica-gel (*Macherey-Nagel 60 G/UV₂₅₄*) com 0,2 mm. O eluente e as proporções volumétricas, no caso de eluentes mistos, são referidos em cada método de síntese. Após eluição, a visualização das placas foi realizada à luz UV a 254 nm e/ou 365 nm.

Os espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C foram efetuados num espectrómetro *Bruker Avance III* de 400 MHz, sendo o RMN ¹H obtido a 400,13 MHz e o RMN ¹³C a 100,61 MHz. O processamento dos espetros foi efetuado no *software TOPSPIN 3.5*. Como padrão interno utilizou-se o dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO-*d*₆, desvio químico (δ) = 2,50 ppm e 39,52 ppm em RMN de ¹H e ¹³C, respetivamente) ou clorofórmio deuterado (CDCl₃, δ = 7,26 ppm e 77,16 ppm em RMN de ¹H e ¹³C, respetivamente). Na descrição dos compostos, os dados obtidos vêm

indicados da seguinte forma: para RMN de ^1H - solvente; desvio padrão (δ); multiplicidade do sinal (s (singleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete) ou m (multiplete)); constante de acoplamento (J , em Hertz); atribuição do próton na molécula; para RMN de ^{13}C - solvente; desvio químico (δ); atribuição do carbono na molécula.

Os pontos de fusão (pf) foram determinados em tubos capilares abertos, num aparelho de determinação de pontos de fusão Büchi B-540 e não foram corrigidos.

Os espectros de IV foram realizados por Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e foram registados num espectrofotómetro *Thermo Fisher Scientific Nicolet iS10: smart iTR*, obtidos por brometo de potássio (KBr) e software Omnic 8.2.

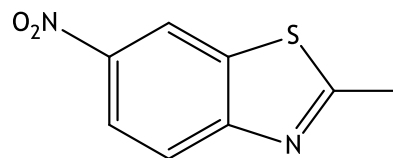
Na aquisição dos espectros de IV, as amostras foram trituradas com KBr de modo a obter-se um pó, o qual foi compactado em pastilha. Como referência utilizou-se o ar, à temperatura ambiente e as amostras foram adquiridas utilizando 32 varrimentos com uma resolução de 8 cm^{-1} no intervalo de 4000 e 400 cm^{-1} . Na descrição dos compostos, os dados obtidos são indicados pela seguinte ordem: frequência máxima da banda de absorção ($\nu_{\text{máx}}$ em cm^{-1}) e atribuição a um grupo de átomos na molécula, no caso das bandas características.

4.2.1. Carbocianinas

4.2.1.1. Síntese de sais de amónio quaternário

Síntese do 2-metil-6-nitrobenzo[d]tiazole

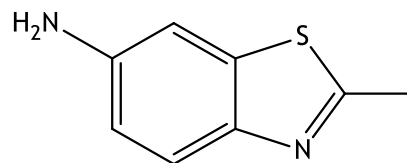
A uma solução de 2-metilbenzo[d]tiazole (3,484 g; 3 mL) e H_2SO_4 concentrado (14 mL), arrefecida num banho de gelo, adicionou-se, lentamente durante 30 minutos, uma mistura de HNO_3 concentrado (3 mL) e H_2SO_4 concentrado



(2 mL). Retirou-se a mistura reacional do banho de gelo e deixou-se à temperatura ambiente durante 4h sob agitação magnética. A reação foi acompanhada por c.c.f., com os eluentes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, na proporção 9/1. Após o término da reação foi adicionado gelo à mistura e deixou-se durante 24h a 4°C . Dada a precipitação completa do produto, este foi filtrado a pressão reduzida e posteriormente recristalizado de metanol (MeOH). Como produto final, foi obtido o 2-metil-6-nitrobenzo[d]tiazole, com um η de 60%. Pf $158\text{-}161^\circ\text{C}$ [$166\text{-}167^\circ\text{C}$]^{66,67}. FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1} ; KBr) 3068 (CH aromático), 1571 (C=C aromático), 1509 (C=C aromático), 1334 (C-N aromático).

Síntese do 6-amino-2-metilbenzo[d]tiazole

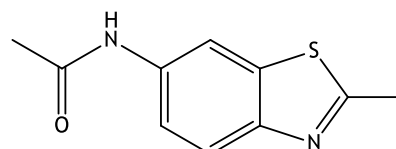
Uma solução constituída por 2-metil-6-nitrobenzo[d]tiazole (2,501 g; 12,88 mmol), cloreto de estanho di-hidratado (23,76 g; 10,55 mmol), MeOH (35 mL) e HCl concentrado (35 mL) foi colocada em refluxo,



sob agitação, a 100°C durante 90 minutos. A reação foi acompanhando por c.c.f (CH₂Cl₂/CH₃OH, na proporção 9/1). Após o término da reação foi evaporado o MeOH a pressão reduzida. À mistura foi adicionado gelo e posteriormente, uma solução de NaOH a 20% até atingir o pH=10. A solução, de aspeto leitoso, foi filtrada a vácuo e a massa branca resultante lavada com CH₂Cl₂. Após evaporação do CH₂Cl₂, obteve-se o 6-amino-2-metilbenzo[d]tiazole, com um η de 82%. Pf 117-118°C [120-123°C]⁶⁸. RMN ¹H (400,13 MHz; DMSO-d₆; δ em ppm) δ 2,66 (3H, d, CH₃), 5,28 (2H, s, NH₂), 6,82 (1H, dd, J=6,82 Hz, 5-CH), 7,01 (1H, d, 7-CH), 7,56 (1H, d, J=8,7 Hz, 4-CH). FTIR u_{máx} (cm⁻¹; KBr) 3377 (NH), 3320 (NH), 1604 (C=C aromático), 1559 (NH).

Síntese da N-(2-metilbenzo[d]tiazol-6-il)acetamida

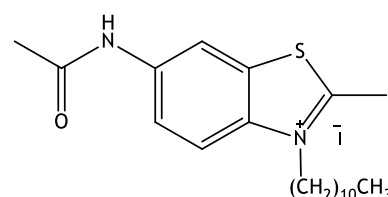
O 6-amino-2-metilbenzo[d]tiazole (1,28 g; 6,2 mmol) foi dissolvido no menor volume possível de clorofórmio (5 mL). A mistura foi colocada em banho de gelo e sob agitação. Adicionou-se lentamente, anidrido acético seco



(0,91 mL; 9,5 mmol). A reação durou 3h e foi acompanhada por c.c.f. (CH₂Cl₂/MeOH, na proporção 9/1). Terminada a reação, a fase orgânica foi lavada com uma solução aquosa de NaHCO₃ a 5% e água destilada. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e posteriormente evaporada sob pressão reduzida. O sólido foi lavado com éter dietílico e filtrado a vácuo. O composto obtido foi o N-(2-metilbenzo[d]tiazole-6-il)acetamida com um η de 63%. Pf 140-142°C. RMN ¹H (400,13 MHz; CDCl₃; δ em ppm) δ 2,14 (3H, s, COCH₃), 2,75 (3H, s, CH₃), 7,23 (1H, d, J=2,1 Hz, 5-CH), 7,76 (1H, d, J=8,7 Hz, 4-CH), 8,34 (1H, d, J=2,1 Hz, 7-CH). FTIR u_{máx} (cm⁻¹; KBr) 3433 (NH), 3294 (CH aromático), 1666 (C=O), 1588 (C=C aromático), 1463 (C=C aromático).

Síntese do iodeto de 6-acetamida-2-metil-3-undecil-2-metilbenzo[d]tiazol-3-io (44)

A uma solução de N-(2-metilbenzo[d]tiazol-6-il)acetamida (0,902 g; 4,38 mmol) e 1-iodoundecano (3,64 g; 12,9 mmol) foi adicionado acetonitrilo (18 mL) e colocado em refluxo, com agitação, durante 11 dias. Após o término da reação procedeu-se à filtração do sólido e,

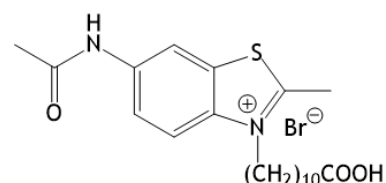


posteriormente, à recristalização do sal, obtendo-se o sal iodeto de 6-acetamida-2-metil-3-undecil-2-metilbenzo[d]tiazol-3-io com um η de 51%. Pf 119-121°C. RMN ¹H (400,13 MHz;

CDCl₃; δ em ppm) δ 0,79 (3H, t, *J*=6,8 Hz, N(CH₂)₁₀CH₃), 1,18-1,30 (14H, m, NCH₂CH₂CH₂(CH₂)₇CH₃), 1,31-1,42 (2H, m, NCH₂CH₂CH₂(CH₂)₇CH₃), 1,76-1,89 (2H, m, NCH₂CH₂CH₂(CH₂)₇CH₃), 2,26 (3H, s, NHOC(=O)CH₃), 3,17 (3H, s, CH₃), 4,60 (2H, t, *J*= 7,8 Hz, NCH₂CH₂CH₂(CH₂)₇CH₃), 7,64 (1H, d, *J*= 9,2 Hz, 5-CH), 8,23 (1H, dd, *J*= 9,1; 1,9 Hz, 4-CH), 8,65 (1H, d, *J*=1,8 Hz, 7-CH), 10,25 (1H, s, NHOC(=O)CH₃). FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹; KBr) 3440 (NH), 3038 (CH aromático), 2921 (CH alquílico), 2851 (CH alquílico), 1678 (C=O), 1588 (C=C aromático), 1480 (C=C aromático), 1265 (C-N aromático).

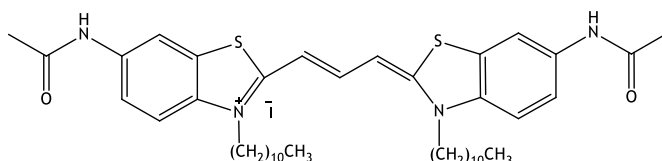
Síntese do brometo de 6-acetamida-3-(10-carboxidecil)-2-metilbenzo[*d*]tiazol-3-io (41)

Uma mistura de *N*-(2-metilbenzo[*d*]tiazol-6-il)acetamida (0,410 g; 1,99 mmol) e ácido 11-bromoundecanóico (1,215 g; 4,31 mmol) foi colocada a 150 °C, com agitação, durante 24 horas. Após o término da reação arrefeceu-se à temperatura ambiente adicionou-se éter etílico. O composto não precipitou, formando-se um óleo, o que impossibilitou a sua caracterização seguindo a reação sem o caracterizar.



Síntese do iodeto de 6-acetamida-2-((1*E*,3*E*)-3-(6-acetamida-3-undecilbenzo[*d*]tiazole-2(3*H*)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-undecilbenzo[*d*]tiazol-3-io (25)

Ao sal iodeto de 6-acetamida-2-metil-3-undecil-2-metilbenzo[*d*]tiazol-3-io (0,200 g; 0,41 mmol) adicionou-se *o*-formiato de trietilo (0,15 mL; 0,41 mmol) e

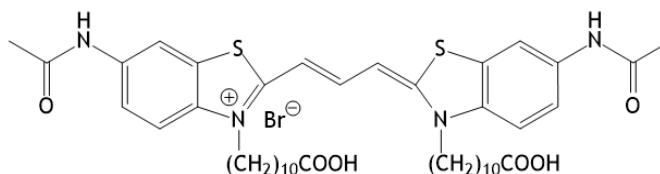


piridina seca (2 mL). A mistura foi colocada sob refluxo durante três dias com agitação. Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e adicionou-se éter dietílico. Filtrou-se o sólido, lavou-se com éter dietílico e recristalizou-se de acetonitrilo seco. Obteve-se o iodeto de 6-acetamida-2-((1*E*,3*E*)-3-(6-acetamida-3-undecilbenzo[*d*]tiazole-2(3*H*)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-undecilbenzo[*d*]tiazol-3-io com um η de 54%. Pf 200-203°C. RMN ¹H (400,13 MHz; DMSO-*d*₆; δ em ppm) δ 0,84 (6H, t, N(CH₂)₁₀CH₃), 1,27 (32H, m, NCH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 1,72 (4H, m, NCH₂CH₂CH₂(CH₂)₇CH₃), 2,08 (6H, s, NHCO(=O)CH₃), 4,25 (4H, t, NCH₂CH₂CH₂(CH₂)₇CH₃), 6,50 (2H, d, *J*= 12,4 Hz, α, α'-CH), 7,61 (5H, m, 4, 4', 5, 5'-CH; β-CH), 8,32 (2H, s, 7, 7'-CH), 10,25 (2H, s, NHCO(=O)CH₃). RMN ¹³C (100,61 MHz; DMSO-*d*₆; δ em ppm) δ 14,41 (N(CH₂)₁₀CH₃), 22,57 (CH₃), 24,44 (NHCO(=O)CH₃), 26,42 (CH₂), 27,80 (CH₂), 29,15 (CH₂), 29,18 (CH₂), 29,39 (CH₂), 29,46 (CH₂), 31,76 (CH₂), 46,66 (NCH₂), 98,93 (α, α'-CH), 113,00 (7,7'-CH), 114,04 (4, 4'-CH), 119,70 (5, 5'-CH), 126,07 (7a, 7a'-C), 137,21 (C), 163,76 (NHCO(=O)CH₃), 169,05 (2, 2'-C). FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹; KBr) 3437 (NH), 3048 (CH aromático), 2922 (CH alquílico), 2851 (CH alquílico), 1681 (C=O), 1599 (C=C), 1544 (C=C), 1434 (CH).

Síntese do brometo de 6-acetamida-2-((1E,3E)-3-(6-acetamida-3-(10-carboxidecil)benzo[d]tiazole-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-(10-carboxidecil)benzo[d]tiazol-3-io (26)

Ao sal brometo de 6-acetamida-3-(10-carboxidecil)-2-

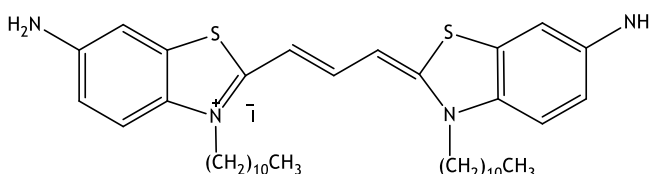
metilbenzo[d]tiazol-3-io (0,7973 g; 2,04 mmol) adicionou-se o-formiato de trietilo (0,70 mL) e piridina seca (8 mL). A mistura foi



colocada sob refluxo durante três dias com agitação. Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e adicionou-se éter dietílico. Filtrou-se o sólido, lavou-se com éter dietílico e recristalizou-se com acetonitrilo seco. Obteve-se o brometo de 6-acetamida-2-((1E,3E)-3-(6-acetamida-3-(10-carboxidecil)benzo[d]tiazole-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-(10-carboxidecil)benzo[d]tiazol-3-io com um η de 15%. Pf 187-190°C. RMN ¹H (400,13 MHz; DMSO-d₆; δ em ppm) δ 1,21 (32H, m, NCH₂CH₂(CH₂)₈COOH), 1,69 (4H, m, NCH₂CH₂CH₂(CH₂)₇COOH), 2,08 (6H, s, NHCOCH₃), 4,26 (4H, t, NCH₂CH₂CH₂(CH₂)₇COOH), 6,51 (2H, d, α , α' -CH), 7,58 (5H, m, 4, 4', 5, 5'-CH; β -CH), 8,34 (2H, s, 7, 7'-CH), 10,29 (2H, s, NHCOCH₃). FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹; KBr) 3446 (NH), 3036 (CH aromático), 2921 (CH alquílico), 2850 (CH alquílico), 1678 (C=O), 1599 (C=C), 1543 (C=C), 1432 (CH).

Síntese do iodeto de 6-amino-2-((1E,3E)-3-(6-amino-3-undecilbenzo[d]tiazol-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-undecilbenzo[d]tiazol-3-io (48)

Ao iodeto de 6-acetamida-2-((1E,3E)-3-(6-acetamida-3-undecilbenzo[d]tiazole-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-undecilbenzo[d]tiazol-3-io foi



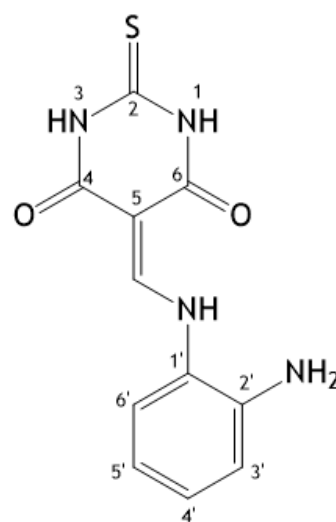
adicionada uma solução de HCl a 10% e foi colocada em refluxo durante um dia. Ao fim deste tempo, adicionou-se amoníaco à mistura e filtrou-se o sólido. Este processo foi repetido por duas vezes, de modo a garantir a hidrólise. Obteve-se o iodeto de 6-amino-2-((1E,3E)-3-(6-amino-3-undecilbenzo[d]tiazol-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-undecilbenzo[d]tiazol-3-io com um η de 35%. Pf 168-171°C. RMN ¹H (400,13 MHz; DMSO-d₆; δ em ppm) δ 0,84 (6H, t, $J=6,6$ Hz, N(CH₂)₁₀CH₃), 1,09-1,43 (36H, m, NCH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 1,56-1,78 (4H, m, NCH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 4,17 (4H, t, $J=7,6$ Hz, NCH₂CH₂CH₂(CH₂)₇CH₃), 6,39 (2H, d, $J=12,7$ Hz, α , α' -CH), 6,79 (2H, d, $J=8,9$ Hz, CH), 7,04 (2H, d, $J=2,1$ Hz, CH), 7,43 (2H, d, $J=8,7$ Hz, CH), 7,45 (1H, d, $J=12,4$ Hz, β -CH). RMN ¹³C (100,61 MHz; DMSO-d₆; δ em ppm) δ 14,40 (N(CH₂)₁₀CH₃), 22,57 (CH₂), 26,43 (CH₂), 27,84 (CH₂), 29,18 (CH₂), 29,39 (CH₂), 29,46 (CH₂), 31,76 (CH₂), 46,39 (NCH₂), 97,64 (α , α' -CH), 106,53 (CH), 114,51 (CH), 115,26 (CH), 126,68 (C), 132,49 (C), 147,08 (C), 160,96 (2, 2'-C). FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹; KBr) 3301 (NH), 3038 (CH

aromático), 2922 (CH alquílico), 2851 (CH alquílico), 1600 (C=O), 1552 (C=C aromático), 1461 (CH), 1426 (CH), 1265 (C-N aromático).

4.2.2. Barbituratos

Síntese de 5-(((2-Aminofenil)amino)metileno)-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona (19)

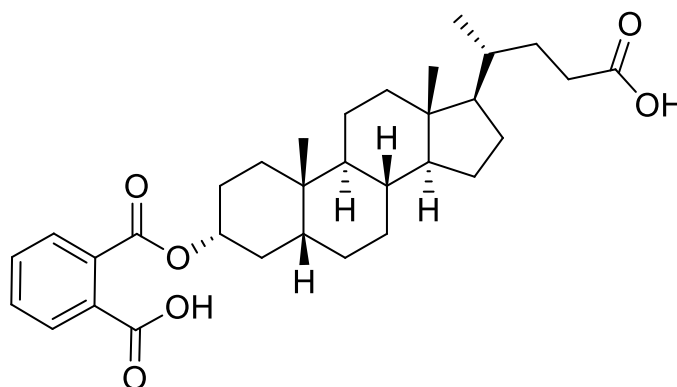
Uma solução de ácido tiobarbitúrido (1 mmol) e trietilo de *o*-formiato (1 mmol) e butan-1-ol (10 mL) foi colocada num balão de 50 mL, em refluxo e com agitação, num banho de parafina. Verificou-se que ocorreu uma mudança da coloração para vermelho. Aproximadamente 1 hora após o início da reação foi adicionada a *o*-fenilenodiamina (1 mmol) e colocou-se em refluxo por mais 3 horas. Após o término da reação filtrou-se o sólido a quente e lavou-se com etanol a quente e éter dietílico a frio. Obteve-se o 5-(((2-Aminofenil)amino)metileno)-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona com um η de 80%. Pf 246-249 °C. RMN de ^1H (400,13 MHz; DMSO $_d_6$; δ ppm) δ 5,18 (2H, s, 1'-Ar-NH $_2$), 6,74 (1H, t, $J = 7,7$ Hz, 5'-ArCH), 6,88 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, 3'-ArCH), 7,06 (1H, t, $J = 7,7$ Hz, 4'-ArCH), 7,36 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, 6'-ArCH), 8,44 (1H, d, $J = 12,3$ Hz, 5-CCH), 11,92 (1H, d, 1'-Ar-NH), 12,00 (1H, s, NH), 12,16 (1H, s, NH). RMN de ^{13}C (100,61 MHz; DMSO- d_6 ; δ ppm) δ 94,24 (5-C), 118,04 (3'-ArCH), 118,79 (5'-ArCH), 120,15 (6'-ArCH), 126,45 (1'-ArC), 128,14 (4'-ArCH), 140,85 (2'-ArC), 153,67 (5-CCH), 162,07 (CO), 164,46 (CO), 178,14 (2-CS). FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm $^{-1}$; KBr) 3429 (NH), 3345 (NH), 1689 (C=O), 1626 (C=C), 1163 (C=S).



4.2.3. Esteroides

Síntese do éster ftálico do ácido litocólico

Uma mistura de ácido litocólico (0,188 g; 0,50 mmol), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (0,50 mmol; 0,061 g) e anidrido ftálico (1,50 mmol; 0,222 g) em piridina (0,5 mmol; 7,25 mL) foi colocada num balão de 25 mL, em refluxo e com agitação, num banho de parafina durante 24h. A reação foi

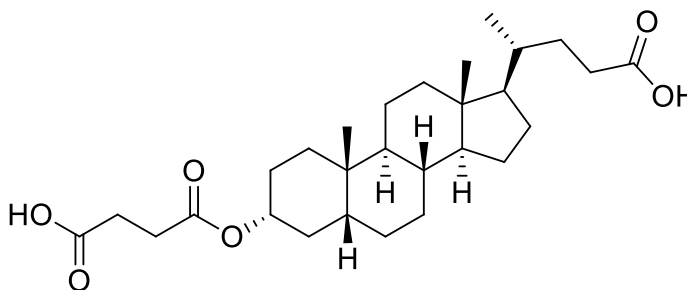


seguida por c.c.f. (éter de petróleo/acetato etilo com a proporção 4/1).

Após a reação, evaporou-se o solvente da mistura reacional à secura. De seguida adicionou-se acetato de etilo (30 mL) e transferiu-se para uma ampola de decantação. Na ampola, adicionou-se à mistura 50 mL de acetato de etilo e 20 mL de uma solução aquosa de HCl 10% e agitou-se. Posteriormente, a fase aquosa foi extraída com acetato de etilo (30 mL), repetindo este processo por mais duas vezes. Por fim, procedeu-se à reunião da fase orgânica, sendo esta lavada com 20 mL de solução aquosa de HCl 10%, e posteriormente, à secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, a sua filtração e evaporação do solvente a pressão reduzida. O produto foi seco sob atmosfera de vácuo por 12 horas, tendo um η de 63%. RMN de ^1H (400,13 MHz; CDCl_3 - com traços de CD_3OH ; δ ppm) δ 0,66 (3H, d, $J=2,9$ Hz, CH_3 -18), 0,95 (3H, m, CH_3 -21), 0,98 (3H, s, CH_3 -19), 1,02 - 2,20 (28H, m), 2,34 (2H, m, CH_2 -23), 4,97 (1H, m, CH -3), 7,56 (3H, m, CH -27, CH -28, CH -29), 7,66 (1H, m, CH -30), 7,77 (1H, m, CH -32). RMN de ^{13}C (100,61 MHz; CDCl_3 - com traços de CD_3OH ; δ ppm) δ 15,78, 21,99, 24,72, 27,09, 28,02, 30,16, 30,19, 30,91, 32,00, 34,89, 34,95, 35,79, 38,51, 38,91, 39,26, 39,70, 43,99, 44,31, 51,92, 59,90, 80,18, 132,26, 132,80, 133,06, 134,56, 134,85, 135,07, 135,61, 136,31, 137,07, 173,30, 181,11. FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1} ; KBr) 3411 (OH), 2929 (CH alquílico), 2867 (CH alquílico), 1773 (C=O), 1695 (C=O), 1585 (C=C aromático) 1405 (CH), 1284 (C=O).

Síntese do éster succínico do ácido litocólico

Uma mistura de ácido litocólico (0,188 g; 0,50 mmol), DMAP (0,061 g; 0,50 mmol) e anidrido succínico; (0,222 g; 1,50 mmol) em piridina (7,25 mL; 0,5 mmol) foi colocada num balão de 25 mL



em refluxo e com agitação num banho de parafina durante 24h. A reação foi seguida por c.c.f. (éter de petróleo/ acetato etilo com a proporção 4/1).

Após a reação, evaporou-se à secura a piridina da mistura com auxílio de um evaporador rotativo e de seguida dissolveu-se em 400 mL de clorofórmio e transferiu-se para uma ampola de decantação. A mistura foi lavada com 35 mL de uma solução aquosa de HCl 6%, sendo depois adicionado 35 mL de água destilada. Posteriormente, a fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e procedeu-se à sua filtração. Por fim, evaporou-se o solvente com auxílio de um evaporador rotativo e foi seco numa estufa de vácuo a 50°C por 12 horas, tendo um η de 52%. RMN de ^1H (400,13 MHz; CDCl_3 - com traços de CD_3OH ; δ ppm) δ 0,68 (6H, d, $J=8,2$ Hz, CH_3 -19 e 21), 0,9-1,87 (28H, m), 1,99 (1H, m, CH_2 -23), 2,21 (1H, m, $J=9,5$ Hz, CH_2 -23), 2,35 (4H, t, $J=5,1$ Hz, CH_2 -26 e 27), 4,72 (1H, m, CH-3B). FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1} ; KBr) 3427 (OH), 2937 (CH alquílico), 2866 (CH alquílico), 1785 (C=O), 1704 (C=O), 1419 (CH).

4.3. Estudos *in vitro*

4.3.1. Preparação das soluções dos compostos

Os compostos em estudo foram todos dissolvidos em DMSO a uma concentração de 10 mM para, posteriormente, ser preparada uma solução de cada um deles a 30µM para efetuar o *screening*. Este passo foi realizado para garantir uma concentração final de 1% de DMSO, de modo a que o solvente não interferisse com a atividade da enzima. A solução mãe de XA 10 mM foi preparada numa solução aquosa de hidróxido de sódio 25 mM. Todas as soluções mãe foram armazenadas a 4 °C. A partir destas, foram preparadas diluições em tampão dihidrogeno fosfato de sódio 50 mM (pH 7,4) antes de cada experiência, de modo a garantir uma concentração em cada poço de 30 µM numa placa 96-*multiwell* no *screening* inicial, sendo que um dos *screenings* foi realizado com uma concentração 30 µM, 10 µM, 5 µM e 1 µM em cada poço do alopurinol e do composto 25.

4.3.2. Procedimento experimental

A atividade da XO foi determinada utilizando um espectrofotómetro UV-visível para medir a formação do AU a partir da XA, com adaptação ao o método de Gupta⁶⁰ e as condições descritas por Zhao⁶¹. Para cada ensaio, foram adicionados 50 µL da solução de teste e 50 µL de suspensão de XO do soro bovino (0,1 U / mL) ao poço de uma placa de 96 poços, sendo a mistura pré-incubada a 37°C durante 5 minutos. A reação iniciou-se com a adição de 150 µL de XA 0,42 mM, sendo a mistura resultante incubada a 37°C durante 10 min, com leituras da absorvância a 295 nm de 1 em 1 minuto sob agitação lenta, constante e automática de 20 segundos a preceder cada leitura. O tampão foi utilizado como controlo negativo e o alopurinol como um controlo positivo. De modo a descontar a absorvância de cada composto a este comprimento de onda, foi realizado um branco da amostra constituído por 50 µL da solução de teste e 200 µL de tampão. Cada estudo corresponde a três experiências, cada uma realizada em triplicado. A percentagem de inibição da enzima por cada composto em estudo foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = \left[1 - \frac{\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco da amostra}}}{\text{Abs}_{\text{controlo negativo}}} \right] \times 100$$

O tratamento de resultados, tal como a análise estatística foi realizada no programa Microsoft Office Excel 2013. Os valores apresentados nos gráficos resultam das médias dos ensaios realizados associados ao respetivo desvio padrão. O teste *t*-Student foi utilizado para avaliar a significância estatística dos valores em comparação com o controlo negativo.

Capítulo 5 - Referências Bibliográficas

- (1) Pauff, J. M.; Hille, R. Inhibition Studies of Bovine Xanthine Oxidase by Luteolin, Silibinin, Quercetin, and Curcumin. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72* (4), 725-731.
- (2) Berry, C. E.; Hare, J. M. Xanthine Oxidoreductase and Cardiovascular Disease: Molecular Mechanisms and Pathophysiological Implications. *J. Physiol.* **2004**, *555* (3), 589-606.
- (3) Nishino, T. The Conversion of Xanthine Dehydrogenase to Xanthine Oxidase and the Role of the Enzyme in Reperfusion Injury. *J. Biochem.* **1994**, *116* (1), 1-6.
- (4) Šmelcerović, A.; Tomović, K.; Šmelcerović, Ž.; Petronijević, Ž.; Kocić, G.; Tomašič, T.; Jakopin, Ž.; Anderluh, M. Xanthine Oxidase Inhibitors beyond Allopurinol and Febuxostat; an Overview and Selection of Potential Leads Based on in Silico Calculated Physico-Chemical Properties, Predicted Pharmacokinetics and Toxicity. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *135*, 491-516.
- (5) Cao, H.; Pauff, J. M.; Hille, R. X-Ray Crystal Structure of a Xanthine Oxidase Complex with the Flavonoid Inhibitor Quercetin. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77* (7), 1693-1699.
- (6) Meneshian, A.; Bulkley, G. B. The Physiology of Endothelial Xanthine Oxidase: From Urate Catabolism to Reperfusion Injury to Inflammatory Signal Transduction. *Microcirculation* **2002**, *9* (3), 161-175.
- (7) Rajagopalan, K. V.; Johnson, J. L. The Pterin Molybdenum Cofactors. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (15), 10199-10202.
- (8) Okamoto, K.; Matsumoto, K.; Hille, R.; Eger, B. T.; Pai, E. F.; Nishino, T. The Crystal Structure of Xanthine Oxidoreductase during Catalysis: Implications for Reaction Mechanism and Enzyme Inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (21), 7931-7936.
- (9) Enroth, C.; Eger, B. T.; Okamoto, K.; Nishino, T.; Pai, E. F. Crystal Structures of Bovine Milk Xanthine Dehydrogenase and Xanthine Oxidase: Structure-Based Mechanism of Conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97* (20), 10723-10728.
- (10) Xia, M.; Dempski, R.; Hille, R. The Reductive Half-Reaction of Xanthine Oxidase. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (6), 3323-3330.
- (11) Maiti, N. C.; Tomita, T.; Kitagawa, T.; Okamoto, K.; Nishino, T. Resonance Raman Studies on Xanthine Oxidase: Observation of Mo(VI)-Ligand Vibrations. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8* (3), 327-333.
- (12) Hille, R.; Nishino, T.; Bittner, F. Molybdenum Enzymes in Higher Organisms. *Coord.*

Chem. Rev. **2011**, *255* (9-10), 1179-1205.

- (13) Okamoto, K.; Kusano, T.; Nishino, T. Chemical Nature and Reaction Mechanisms of the Molybdenum Cofactor of Xanthine Oxidoreductase. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19* (14), 2606-2614.
- (14) Spector, T.; Johns, D. G. Stoichiometric Inhibition of Reduced Xanthine Oxidase by Hydroxypyrazolo [3,4-D]pyrimidines. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245* (19), 5079-5085.
- (15) Guan, Q.; Cheng, Z.; Ma, X.; Wang, L.; Feng, D.; Cui, Y.; Bao, K.; Wu, L.; Zhang, W. Synthesis and Bioevaluation of 2-Phenyl-4-Methyl-1,3-Selenazole-5-Carboxylic Acids as Potent Xanthine Oxidase Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *85*, 508-516.
- (16) Lemke, Thomas L, Williams, Da. A. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, Seventh Ed.; Lippincott Williams & Wilkins, 2013; Vol. 53.
- (17) Sliwoski, G.; Kothiwale, S.; Meiler, J.; Lowe, E. W. Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacol. Rev.* **2014**, *66* (1), 334-395.
- (18) Lengauer, T.; Rarey, M. Computational Methods for Biomolecular Docking. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6* (3), 402-406.
- (19) Tripathi, A.; Misra, K. Molecular Docking: A Structure- Based Drug Designing Approach. *JSM Chem* **2017**, *5* (2), 1042.
- (20) Chaudhary, K. K.; Mishra, N. A Review on Molecular Docking : Novel Tool for Drug Discovery. *JSM Chem.* **2016**, *4* (3), 1-4.
- (21) Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (11), 935-949.
- (22) Morris, G.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.; Belew, R.;Goodsell, D.; Olson, A. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput Chem.* **2009**, *30* (16), 2785-2791.
- (23) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking 1 Edited by F. E. Cohen. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267* (3), 727-748.
- (24) Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. Improved Protein - Ligand Docking Using GOLD. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2003**, *623* (January), 609-623.

- (25) Mishra, A.; Behera, R. K.; Behera, P. K.; Mishra, B. K.; Behera, G. B. Cyanines during the 1990s: A Review. *Chem. Rev.* **2000**, *100* (6), 1973-2011.
- (26) Tian, H.; Meng, F.; Sung-Hoon, K. Cyanine Dyes for Solar Cells and Optical Data Storage. *Funct. Dye.* **2006**, No. 2.
- (27) Almeida, P. Cianinas, a Cor Não Visível Da Fotografia. *Química - Boletim da SPQ- A Cor*, *73*. 1998, pp 9-12.
- (28) Wang, H.; Nann, T. *Springer Series on Fluorescence-1*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010; Vol. 7.
- (29) Hamer, F. M. Chemistry of Heterocyclic Compounds- The Cyanine Dyes and Related Compounds. *Intersci. Publ.* **1964**, 937-.
- (30) Hunger, K. *Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications*; Wiley-VCH, 2003.
- (31) Mojzych, M.; Henary, M. Synthesis of Cyanine Dyes. In *Heterocyclic Polymethine Dyes*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008; pp 1-9.
- (32) Pardal, A.C., Ramos S.S., Santos P.F., Reis, L.F.& Almeida, P. (2002). Synthesis and Spectroscopic Characterisation of N-Alkyl Quaternary Ammonium Salts Typical Precursors of Cyanines. *Molecules*, *7*, 320-330.
- (33) Kappe, C. O.; Dallinger, D.; Murphree, S. S. *Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists: Strategies, Instruments, and Protocols*; Wiley-VCH, 2009.
- (34) Winstead, A. J.; Nyambura, G.; Matthews, R.; Toney, D.; Oyaghire, S. Synthesis of Quaternary Heterocyclic Salts. *Molecules* **2013**, *18* (11), 14306-14319.
- (35) Boto, R. E. F.; Santos, P. F.; Reis, L. V.; Almeida, P. Synthesis and Characterization of Mono- and Dicarboxyalkyloxacarbocyanines. *Dye. Pigment.* **2007**, *75* (2), 298-305.
- (36) de la Hoz, A.; Díaz-Ortiz, Á.; Moreno, A. Microwaves in Organic Synthesis. Thermal and Non-Thermal Microwave Effects. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34* (2), 164-178.
- (37) Ficken, G. E. *Cyanine Dyes*; ACADEMIC PRESS, INC., 1971.
- (38) Panigrahi, M.; Dash, S.; Patel, S.; Mishra, B. K. Syntheses of Cyanines: A Review. *Tetrahedron* **2012**, *68* (3), 781-805.
- (39) Chen, X.; Conti, P. S.; Moats, R. a. In Vivo Near-Infrared Fluorescence Imaging of Integrin avb3 in Brain Tumor Xenografts. *Cancer Res.* **2004**, *64* (25), 8009-8014.
- (40) Langhals, H.; Varja, A.; Laubichler, P.; Kernt, M.; Eibl, K.; Haritoglou, C. Cyanine Dyes

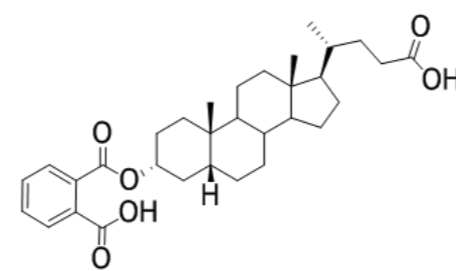
- as Optical Contrast Agents for Ophthalmological Surgery. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (11), 3903-3925.
- (41) Matsuoka, M. *Infrared Absorbing Dyes*; Springer Science+Business Media, LLC, 1990.
- (42) Kvach, M. V.; Ustinov, A. V.; Stepanova, I. A.; Malakhov, A. D.; Skorobogaty, M. V.; Shmanai, V. V.; Korshun, V. A. A Convenient Synthesis of Cyanine Dyes: Reagents for the Labeling of Biomolecules. *European J. Org. Chem.* **2008**, No. 12, 2107-2117.
- (43) Strekowski, L.; Mason, C. C.; Lee, H.; Patonay, G. Synthesis of a Functionalized Cyanine Dye for Covalent Labeling of Biomolecules with a pH- Sensitive Chromophore. *Heterocycl. Commun.* **2004**, 381-382.
- (44) Narayanan, N.; Patonay, G. A New Method for the Synthesis of Heptamethine Cyanine Dyes: Synthesis of New Near-Infrared Fluorescent Labels. *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (8), 2391-2395.
- (45) Chang, E.; Congdon, E. E.; Honson, N. S.; Duff, K. E.; Kuret, J. Structure - Activity Relationship of Cyanine Tau Aggregation Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2009**, 3539-3547.
- (46) Chegaev, K.; Federico, A.; Marini, E.; Rolando, B.; Fruttero, R.; Morbin, M.; Rossi, G.; Fugnanesi, V.; Bastone, A.; Salmona, M.; Badiola, N. B.; Gasparini, L.; Cocco, S.; Ripoli, C.; Grassi, C.; Gasco, A. NO-Donor Thiacyanines as Multifunctional Agents for Alzheimer's Disease. *Bioorganic Med. Chem.* **2015**, *23* (15), 4688-4698.
- (47) Banday, A. H.; Shameem, S. A.; Gupta, B. D.; Kumar, H. M. S. D-Ring Substituted 1,2,3-Triazolyl 20-Keto Pregnenanes as Potential Anticancer Agents: Synthesis and Biological Evaluation. *Steroids* **2010**, *75* (12), 801-804.
- (48) Yadav, S. K.; Chandra, P.; Goyal, R. N.; Shim, Y. B. A Review on Determination of Steroids in Biological Samples Exploiting Nanobio-Electroanalytical Methods. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *762*, 14-24.
- (49) Gomes, R. L.; Meredith, W.; Snape, C. E.; Sephton, M. A. Conjugated Steroids: Analytical Approaches and Applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393* (2), 453-458.
- (50) Sharma, R.; Long, A.; Gilmer, J. F. Advances in Bile Acid Medicinal Chemistry. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 4029-4052.
- (51) Mukhopadhyay, S.; Maitra, U. Chemistry and Biology of Bile Acids. *Current Science*. 2004, pp 1666-1683.
- (52) Rules, R. T. The Nomenclature of Steroids. *Eur. J. Biochem* **1969**, *10*, 1-19.

- (53) Dundee, J. W.; McIlroy, P. D. A. The History of the Barbiturates. *Anaesthesia* **1982**, *37* (7), 726-734.
- (54) Kohlhoff, S. A.; Hub, M. D.; Hammerschlag, M. R. In Vitro Activity of AZD0914, a Novel DNA Gyrase Inhibitor, against Chlamydia Trachomatis and Chlamydia Pneumoniae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58* (12), 7595-7596.
- (55) Bhaskarachar, R. K.; Revanasiddappa, V. G.; Hegde, S.; Balakrishna, J. P.; Reddy, S. Y. Design, Synthesis and Anticancer Activity of Functionalized Spiro-Quinolines with Barbituric and Thiobarbituric Acids. *Med. Chem. Res.* **2015**, *24* (9), 3516-3528.
- (56) Morgan, L. R.; Jursic, B. S.; Hooper, C. L.; Neumann, D. M.; Thangaraj, K.; LeBlanc, B. Anticancer Activity for 4,4'-Dihydroxybenzophenone-2,4-Dinitrophenylhydrazone (A-007) Analogues and Their Abilities to Interact with Lymphoendothelial Cell Surface Markers. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (23), 3407-3411.
- (57) Shaker, R. M.; Ishak, E. A. Barbituric Acid Utility in Multi-Component Reactions. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. B J. Chem. Sci.* **2011**, *66* (12), 1189-1201.
- (58) Mohammadi Ziarani, G.; Aleali, F.; Lashgari, N. Recent Applications of Barbituric Acid in Multicomponent Reactions. *RSC Adv.* **2016**, *6* (56), 50895-50922.
- (59) Vardanyan, R.; Hruby, V. Soporific Agents (Hypnotics and Sedative Drugs). *Synth. Best-Seller Drugs* **2016**, 65-76.
- (60) Gupta, S.; Rodrigues, L. M.; Esteves, A. P.; Oliveira-Campos, A. M. F.; Nascimento, M. S. J.; Nazareth, N.; Cidade, H.; Neves, M. P.; Fernandes, E.; Pinto, M.; Cerqueira, N. M. F. S. A.; Brás, N. Synthesis of N-Aryl-5-Amino-4-Cyanopyrazole Derivatives as Potent Xanthine Oxidase Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43* (4), 771-780.
- (61) Zhao, M.; Zhu, D.; Sun-Waterhouse, D.; Su, G.; Lin, L.; Wang, X.; Dong, Y. In Vitro and in Vivo Studies on Adlay-Derived Seed Extracts: Phenolic Profiles, Antioxidant Activities, Serum Uric Acid Suppression, and Xanthine Oxidase Inhibitory Effects. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62* (31), 7771-7778.
- (62) Chen, S.; Zhang, T.; Wang, J.; Wang, F.; Niu, H.; Wu, C.; Wang, S. Synthesis and Evaluation of 1-Hydroxy/methoxy-4-Methyl-2-Phenyl-1 H-Imidazole-5-Carboxylic Acid Derivatives as Non-Purine Xanthine Oxidase Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *103*, 343-353.
- (63) Chang, K.-H.; Lee, L.; Chen, J.; Li, W.-S. Lithocholic Acid Analogues, New and Potent [Small Alpha]-2,3-Sialyltransferase Inhibitors. *Chem. Commun.* **2006**, *1* (6), 629-631.

- (64) Figueiredo, J.; Serrano, J. L.; Cavalheiro, E.; Keurulainen, L.; Yli-Kauhaluoma, J.; Moreira, V. M.; Ferreira, S.; Domingues, F. C.; Silvestre, S.; Almeida, P. Trisubstituted Barbiturates and Thiobarbiturates: Synthesis and Biological Evaluation as Xanthine Oxidase Inhibitors, Antioxidants, Antibacterial and Anti-Proliferative Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 829-842.
- (65) Armarego, W. L. .; Perrin, D. . *Purification of Laboratory Chemicals*, seventh Ed.; Butterworth-Heinemann, 2013.
- (66) Hrobáriková, V.; Hrobárik, P.; Gajdoš, P.; Fitis, I.; Fakis, M.; Persephonis, P.; Zahradník, P. Benzothiazole-Based Fluorophores of Donor- π -Acceptor- π -Donor Type Displaying High Two-Photon Absorption. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (9), 3053-3068.
- (67) Santos, P. F.; Reis, L. V.; Duarte, I.; Serrano, J. P.; Almeida, P.; Oliveira, A. S.; Ferreira, L. F. V. Synthesis and Photochemical Evaluation of Iodinated Squarylium Cyanine Dyes. *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88* (5), 1135-1143.
- (68) Čaleta, I.; Grdiša, M.; Mrvoš-Sermek, D.; Cetina, M.; Tralić-Kulenović, V.; Pavelić, K.; Karminski-Zamola, G. Synthesis, Crystal Structure and Antiproliferative Evaluation of Some New Substituted Benzothiazoles and Styrylbenzothiazoles. *Farmaco* **2004**, *59* (4), 297-305.

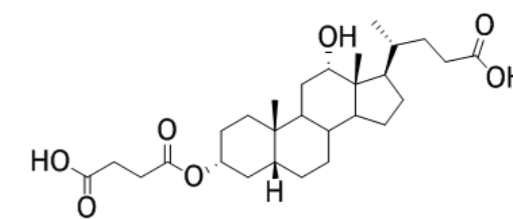
Capítulo 6 - Anexos

Anexo 1 - Auxiliar de estruturas dos compostos 1-8.



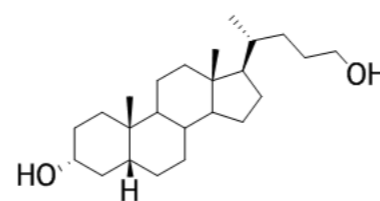
Composto 1

Ácido 2-(((3R,5R,10S,13R,17R)-17-((R)-4-carboxibutan-2-il)-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il)oxi)carbonil)benzóico



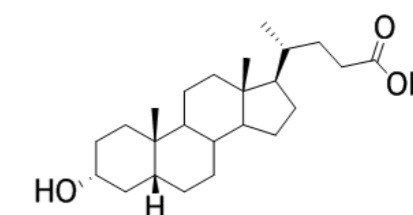
Composto 2

Ácido (4R)-4-((3R,5R,10S,12S,13R,17R)-3-((3-carboxipropanoíl)oxi)-12-hidroxi-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanóico



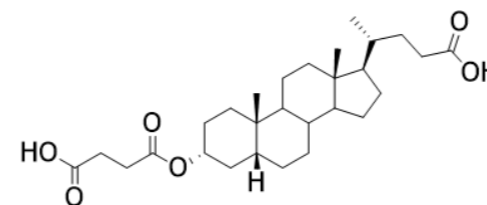
Composto 3

(3R,5R,10S,13R,17R)-17-((R)-5-hidroxipentan-2-il)-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ol



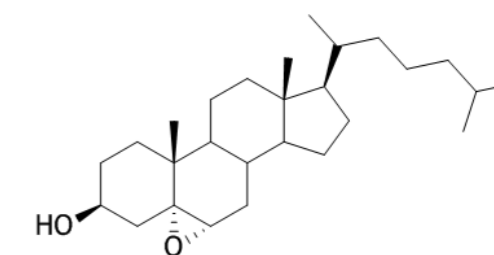
Composto 4

Ácido (R)-4-((3R,5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3-hidroxi-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanóico



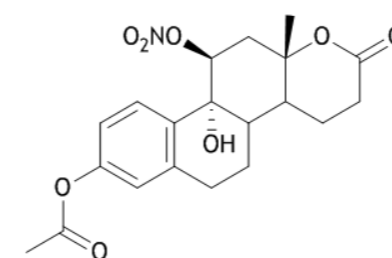
Composto 5

Ácido (4R)-4-((3R,5R,10S,13R,17R)-3-((3-carboxipropanoíl)oxi)-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanóico



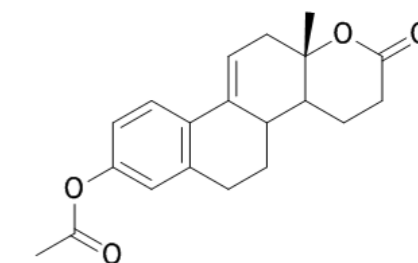
Composto 6

(3S,4aR,5aS,9R,9aR,11bR)-9a,11b-dimetil-9-((R)-6-metilheptan-2-il)hexadecahidrociclopenta[1,2]fenantro[8a,9-b]oxiren-3-ol



Composto 7

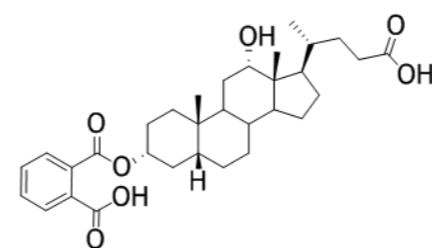
Acetato de (10bR,11S,12aS)-10b-hidroxi-12a-metil-11-(nitroxi)-2-oxo-3,4,4a,4b,5,6,10b,11,12,12a-decahidro-2H-nafto[2,1-f]cromen-8-il



Composto 8

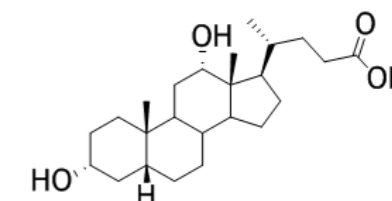
Acetato de (12aS)-12a-metil-2-oxo-3,4,4a,4b,5,6,12,12a-octahidro-2H-nafto[2,1-f]cromen-8-il

Anexo 2 - Auxiliar de estruturas dos compostos 9-19.



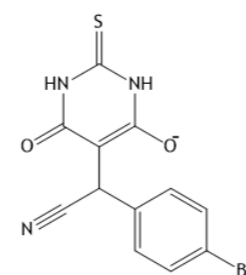
Composto 9

Ácido 2-(((3R,5R,10S,12S,13R,17R)-17-((R)-4-carboxibutan-2-il)-12-hidroxi-10,13-dimethylhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il)oxi)carbonil)benzóico



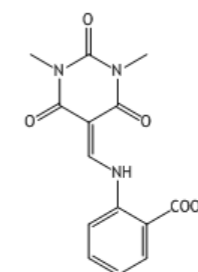
Composto 10

Ácido (R)-4-((3R,5R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-3,12-dihidroxi-10,13-dimethylhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanoico



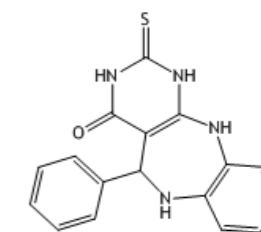
Composto 11

5-((4-Bromofenil)(ciano)metil)-6-oxo-2-tioxo-1,2,3,6-tetrahidropirimidina-4-olato



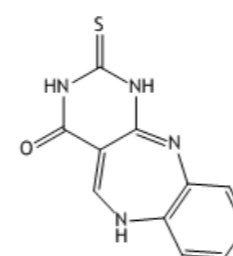
Composto 12

Ácido 2-(((1,3-dimetil-2,4,6-trioxotetrahidropirimidin-5(2H)-ilideno)metil)amino)benzóico



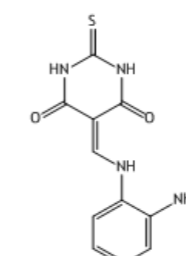
Composto 13

5-Fenil-2-tioxo-1,2,3,5,6,11-hexahidro-4H-benzo[b]pirimido[4,5-e][1,4]diazepin-4-ona



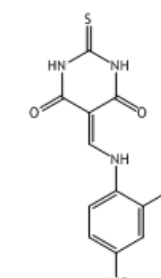
Composto 14

2-Tioxo-1,2,3,6-tetrahidro-4H-benzo[b]pirimido[4,5-e][1,4]diazepin-4-ona



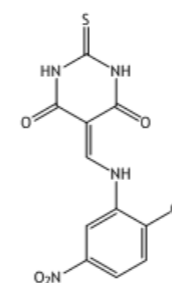
Composto 15

5-(((2-Aminofenil)amino)metileno)-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona



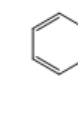
Composto 16

5-(((2-Cloro-4-nitrofenil)amino)metileno)-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona



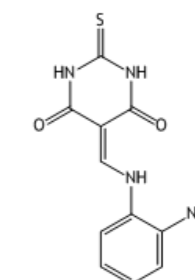
Composto 17

5-(((2-Cloro-5-nitrofenil)amino)metileno)-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona



C

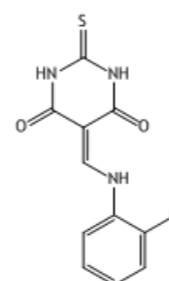
Ácido 2-(((2-tioxo-tetra-ilideno)m



Composto 19

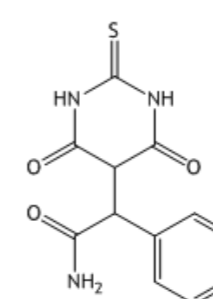
5-(((2-Aminofenil) amino)metileno)-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona

Anexo 3 - Auxiliar de estruturas dos compostos 20-28.



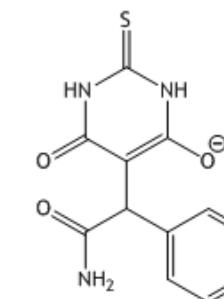
Composto 20

5-(((2-Clorofenil)amino)metileno)-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona



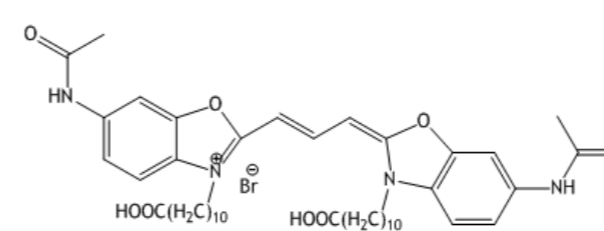
Composto 21

2-(4,6-dioxo-2-tioxohexahidropirimidin-5-il)-2-phenilacetamida



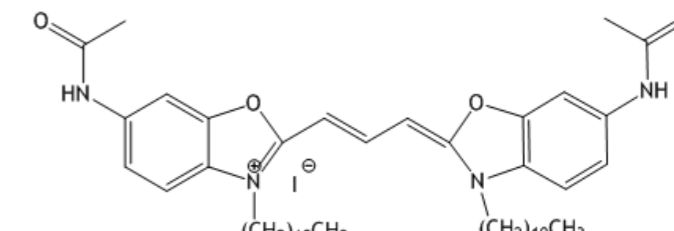
Composto 22

5-(2-amino-2-oxo-1-pheniletil)-6-oxo-2-tioxo-1,2,3,6-tetrahidropirimidin-4-olato



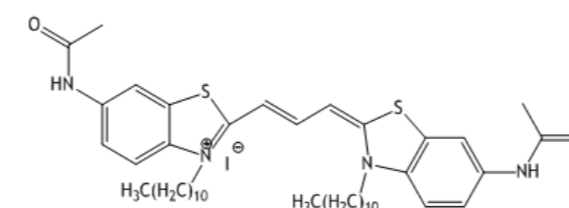
Composto 23

Brometo de 6-acetamina-2-(((1E,3E)-3-(6-acetamina-3-(10-carboxidecil)benzo[d]oxazol-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-(10-carboxidecil)benzo[d]oxazol-3-ilo



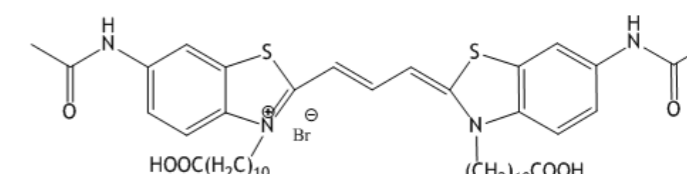
Composto 24

Iodeto de 6-acetamida-2-(((1E,3E)-3-(6-acetamida-3-undecilbenzo[d]oxazol-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-undecilbenzo[d]oxazol-3-ilo



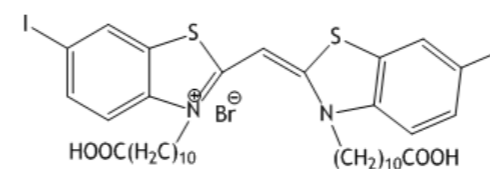
Composto 25

Iodeto de 6-acetamida-2-(((1E,3E)-3-(6-acetamida-3-undecilbenzo[d]tiazole-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-undecilbenzo[d]tiazol-3-ilo



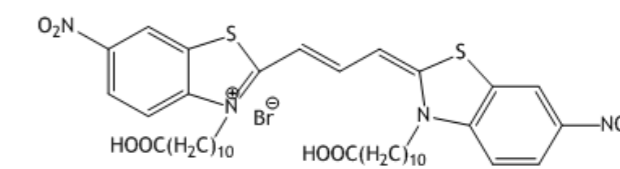
Composto 26

Brometo de 6-acetamida-2-(((1E,3E)-3-(6-acetamida-3-(10-carboxidecil)benzo[d]tiazol-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-(10-carboxidecil)benzo[d]tiazol-3-ilo



Composto 27

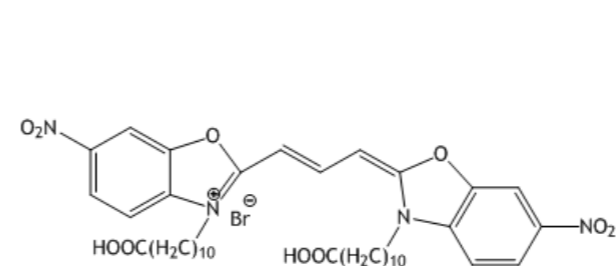
Brometo de (E)-3-(10-carboxidecil)-2-(((3-(10-carboxidecil)-6-iodobenzo[d]tiazol-2(3H)-ilideno)methyl)-6-iodobenzo[d]tiazol-3-ilo



Composto 28

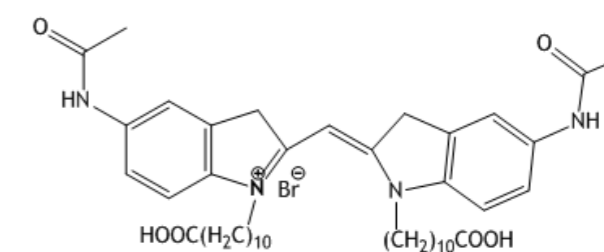
Brometo de 3-(10-carboxidecil)-2-(((1E,3E)-3-(3-(10-carboxidecil)-6-nitrobenzo[d]tiazol-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-6-nitrobenzo[d]tiazol-3-ilo

Anexo 4 - Auxiliar de estruturas dos compostos 29-36.



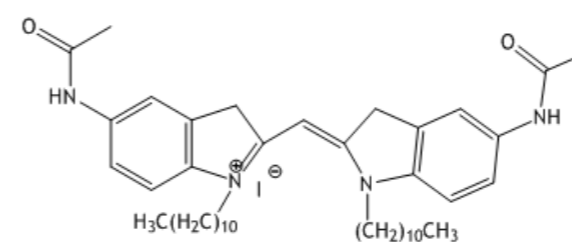
Composto 29

Brometo de 3-(10-carboxidecil)-2-((1E,3E)-3-(3-(10-carboxidecil)-6-nitrobenzo[d]oxazol-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-6-nitrobenzo[d]oxazol-3-io



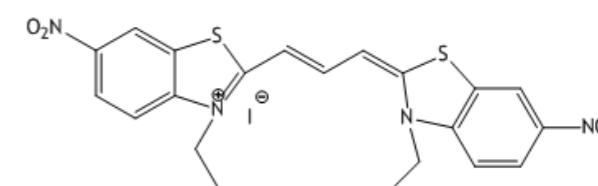
Composto 30

Brometo de (Z)-5-acetamida-2-((5-acetamida-1-(10-carboxidecil)indolin-2-ilideno)metil)-1-(10-carboxidecil)-3H-indol-1-io



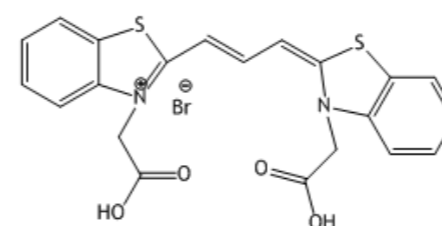
Composto 31

Iodeto de (Z)-5-acetamida-2-((5-acetamida-1-undecilindolin-2-ilideno)metil)-1-undecil-3H-indol-1-io



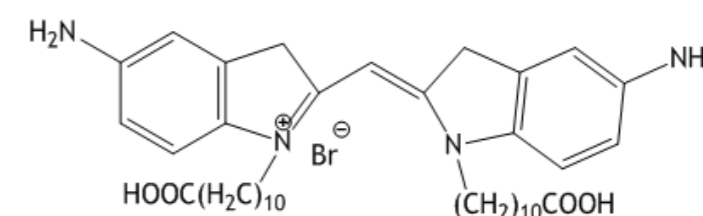
Composto 32

Iodeto de 3-etil-2-((1E,3E)-3-(3-etil-6-nitrobenzo[d]tiazol-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-6-nitrobenzo[d]tiazol-3-io



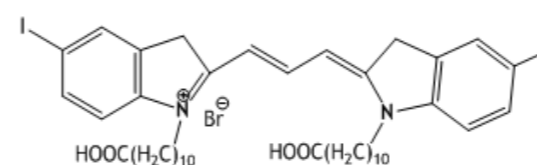
Composto 33

Brometo de 3-(carboximetil)-2-((1E,3E)-3-(3-(carboximetil)benzo[d]tiazol-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)benzo[d]tiazol-3-io



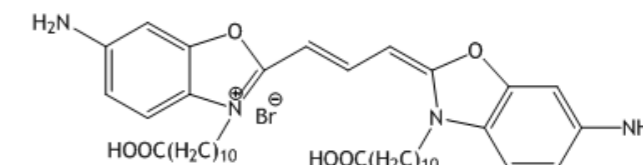
Composto 34

Brometo de (Z)-5-amina-2-((5-amina-1-(10-carboxidecil)indolin-2-ilideno)metil)-1-(10-carboxidecil)-3H-indol-1-io



Composto 35

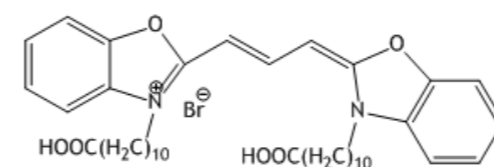
Brometo de 1-(10-carboxidecil)-2-((1E,3Z)-3-(1-(10-carboxidecil)-5-iodoindolin-2-ilideno)prop-1-en-1-il)-5-iodo-3H-indol-1-io



Composto 36

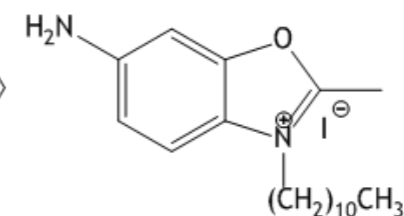
Brometo de 6-amina-2-((1E,3E)-3-(6-amina-3-(10-carboxidecil)benzo[d]oxazol-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-(10-carboxidecil)benzo[d]oxazol-3-io

Anexo 5 - Auxiliar de estruturas dos compostos 37-47.



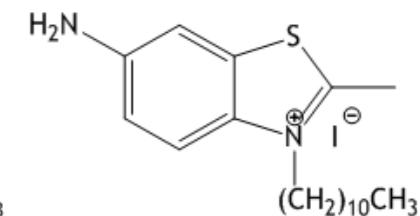
Composto 37

Brometo de 3-(10-carboxidecil)-2-((1E,3E)-3-(3-(10-carboxidecil)benzo[d]oxazol-2(3H)-ilideno)prop-1-en-1-yl)benzo[d]oxazol-3-io



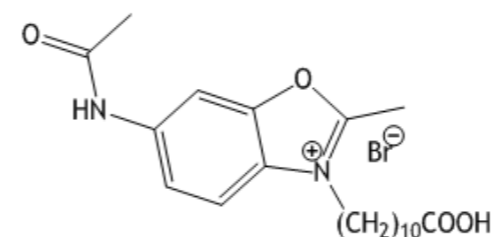
Composto 38

Iodeto de 6-amina-2-metil-3-undecilbenzo[d]oxazol-3-io



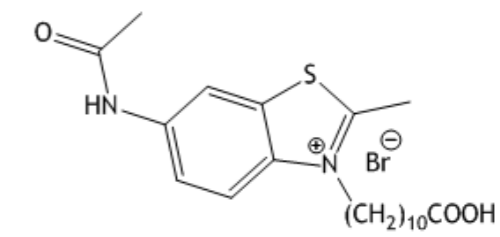
Composto 39

Iodeto de 6-amina-2-metil-3-undecilbenzo[d]tiazol-3-io



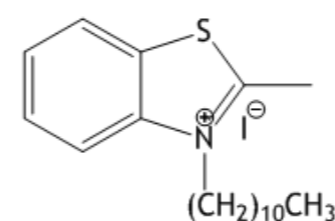
Composto 40

Brometo de 6-acetamida-3-(10-carboxidecil)-2-metilbenzo[d]oxazol-3-io



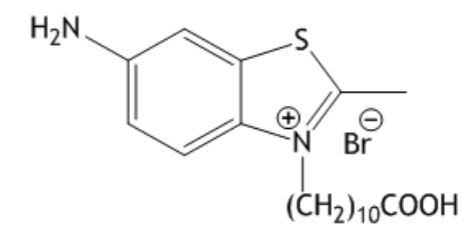
Composto 41

Brometo de 6-acetamida-3-(10-carboxidecil)-2-metilbenzo[d]tiazol-3-io



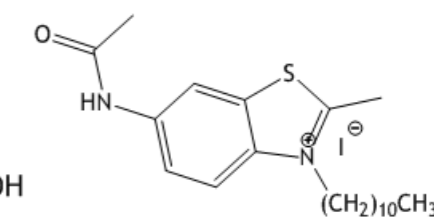
Composto 42

Iodeto de 2-metil-3-undecilbenzo[d]tiazol-3-io



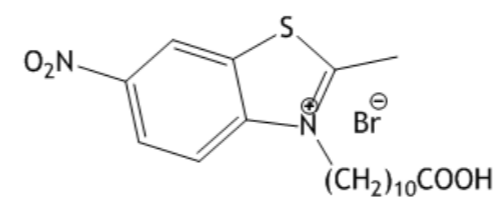
Composto 43

Brometo de 6-amina-3-(10-carboxidecil)-2-metilbenzo[d]tiazol-3-io



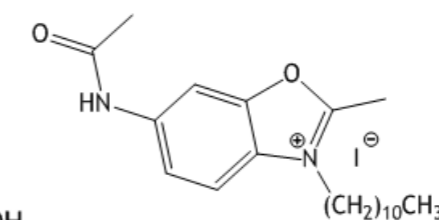
Composto 44

Iodeto de 6-acetamida-2-metil-3-undecilbenzo[d]tiazol-3-io



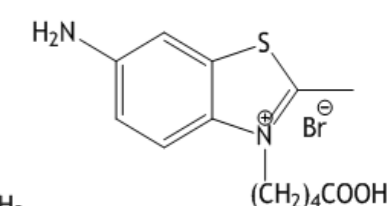
Composto 45

Brometo de 3-(10-carboxidecil)-2-metil-6-nitrobenzo[d]tiazol-3-io



Composto 46

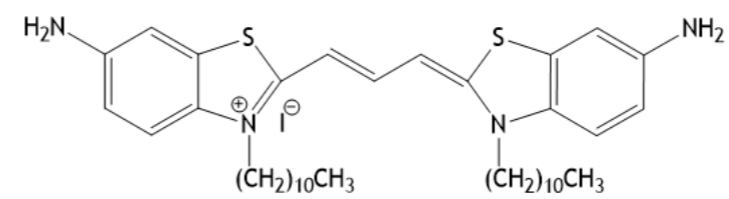
Iodeto de 6-acetamida-2-metil-3-undecilbenzo[d]oxazol-3-io



Composto 47

Brometo de 6-amina-3-(4-carboxibutil)-2-metilbenzo[d]tiazol-3-io

Anexo 6 - Auxiliar de estrutura do composto 48.



Composto 48

Iodeto de 6-amina-2-((1*E*,3*E*)-3-(6-amina-3-undecilbenzo[d]tiazol-2(3*H*)-ilideno)prop-1-en-1-il)-3-undecilbenzo[d]tiazol-3-io

Anexo 7 - Dados complementares ao teste da atividade inibitória da XOR.

Tabela 6: Resultados do teste da atividade inibitória da XOR (em $\mu\text{M} \pm$ desvio padrão)

Composto	XOR (1° teste)	XOR (2° teste)
Alopurinol (30 μM)	69,75 \pm 2,44	84,24 \pm 2,53
Alopurinol (10 μM)	-----	71,04 \pm 3,46
Alopurinol (5 μM)	-----	40,66 \pm 4,16
Alopurinol (1 μM)	-----	9,27 \pm 8,06
1	-8,59 \pm 2,02	-----
4	9,15 \pm 2,93	-----
5	-9,25 \pm 3,22	-----
10	1,19 \pm 2,54	-----
19	19,50 \pm 0,52	-----
21	-7,82 \pm 3,05	-----
25 (30 μM)	-6,18 \pm 10,10	42,03 \pm 6,48
25 (30 μM filtrado)	-----	31,61 \pm 4,72
25 (10 μM)	-----	13,82 \pm 10,01
25 (10 μM filtrado)	-----	6,50 \pm 3,55
25 (5 μM)	-----	2,47 \pm 4,18
25 (1 μM)	-----	2,03 \pm 10,88
26	-3,70 \pm 2,76	-----
33	-10,47 \pm 1,72	-----
44	-9,15 \pm 2,36	-----
8	-9,06 \pm 3,40	-----