



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Daniel Goulart Bernardes

Título: Latenciação de compostos isoxazólicos: uso de ferramentas *in silico* no aprimoramento de propriedades físico-químicas

Florianópolis

2020

Daniel Goulart Bernardes

Título: Latenciação de compostos isoxazólicos: uso de ferramentas *in silico* no aprimoramento de propriedades físico-químicas.

Dissertação submetida ao Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em ciência farmacêutica

Orientador: Prof^a. Dra. Lílian Sibelle Campos Bernardes

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bernardes, Daniel Goulart

Latenciação de compostos isoxazólicos: uso de ferramentas
in silico no aprimoramento de propriedades físico-químicas.
/ Daniel Goulart Bernardes ; orientadora, Lílian Sibelle
Campos Bernardes, 2020.
104 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Doença de Chagas. 3. Docking molecular.
4. Síntese orgânica. I. Bernardes, Lílian Sibelle Campos .
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmácia. III. Título.

Daniel Goulart Bernardes

Latenciação de compostos isoxazólicos: uso de ferramentas *in silico* no aprimoramento de propriedades físico-químicas.

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Lílian Sibelle Campos Bernardes
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Nelilma Correia Romeiro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Thiago Caon
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmácia.

Profa. Dra. Elenara Lemos Senna
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação

Profa. Dra. Lílian Sibelle Campos Bernardes
Orientadora

Florianópolis, 2020.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Leila, minha maior inspiração, sempre me incentivou a seguir em frente com as dificuldades e me ajudou a caminhar até aqui.

Ao meu pai, Geraldo, por me mostrar a importância do conhecimento.

Às minhas irmãs Thaís e Andréa, por me incentivarem a estudar, acreditarem em mim e me apoiar sempre.

Aos meus tios Kátia e Éder e meus primos Renan e Cássia, por serem meus pais e irmãos e me levarem mais longe que meus sonhos.

À minha orientadora e amiga Lílian, por acreditar em mim, pelas conversas, pelos ensinamentos sobre a vida, sobre as reações químicas e por ter aceitado me guiar nessa aventura.

À minha amiga Ana Cláudia por me incentivar a trilhar esse caminho, pelas risadas, lágrimas, por todo o apoio e por estar sempre disposta a ajudar.

Às minhas amigas Camila e Monique, por terem ouvido meus desabafos tantas vezes e tornado minha vida mais leve.

Ao meu irmão de laboratório Rafael, por ter me ajudado desde o primeiro dia no laboratório e compartilhado seu conhecimento.

À equipe do Laboratório de Química Farmacêutica: Victor, Pâmela, Lucas, Prof^a Miriam, Carol, Lara, Cassio, Suellen. Pela ajuda, pelas risadas, pelas conversas, vocês foram pontos de luz quando eu estava no escuro.

Ao PGFAR/UFSC e à CAPES pelo auxílio concedido e pela bolsa de estudos.

Normality is a paved road: It's comfortable to walk, but no flowers grow on it.

(Vincent Van Gogh, 1988)

RESUMO

Descoberta e desenvolvimento de fármacos é um processo oneroso em virtude do tempo, valor financeiro e recursos humanos. Diante dessas dificuldades, doenças negligenciadas como a Doença de Chagas, podem ficar comprometidas no que tange a obtenção de novos fármacos. As pesquisas permanecem restritas ao ambiente acadêmico, sem aporte financeiro. Apenas o fármaco benznidazol é comercializado no Brasil, e este apresenta uma série de efeitos adversos, além do prolongado tempo de tratamento. Em vista disso, nosso grupo de pesquisa desenvolveu o composto 3-(3,4-metilenodioxifenil)-5-(4-hidroxi-metilfenil)isoxazol, com atividade biológica *in vitro* contra o parasita *trypanossoma cruzi*. Esse composto apresentou um IC₅₀ satisfatório comparado ao medicamento de referência, no entanto suas características físico-químicas comprometem sua solubilidade em meio aquoso. Fármacos devem apresentar características físico-químicas para absorção e biodisponibilidade no organismo humano. Ferramentas de modificação molecular, como a latenciação, são aplicadas para promover melhorias nas suas características farmacocinéticas. O acoplamento de aminoácidos aumenta a solubilidade em meio aquoso e por consequência sua biodisponibilidade por via oral, forma de administração preferencial de fármacos. Há diversos transportadores de peptídeos no organismo responsáveis pela obtenção dos aminoácidos da dieta, dessa forma, os aminoácidos conhecidos foram acoplados no composto e, através do docking molecular obteve-se informações de interação, conformação das moléculas e sítios de ligação com o transportador PEPT1, presente nos enterócitos do intestino de humanos.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *docking* molecular, síntese orgânica.

ABSTRACT

Drug discovery and development is an expensive process due to time, financial value and human resources. Faced with these difficulties, neglected diseases such as Chagas' disease may be compromised when it comes to obtaining new drugs. Research remains restricted to the academic environment, with no financial contribution. Only the drug benznidazole is available in Brazil, and it has a number of adverse effects, in addition to the prolonged treatment time. In view of this, our research group developed the compound 3- (3,4-methylenedioxyphenyl) -5- (4-hydroxymethylphenyl) isoxazole, with biological activity in vitro against the parasite *trypanosoma cruzi*. This compound had a satisfactory IC₅₀ compared to the reference drug, however its physical-chemical characteristics compromise its solubility in aqueous medium. Drugs must have physicochemical characteristics for absorption and bioavailability in the human body. Molecular modification tools, such as latency, are applied to promote improvements in their pharmacokinetic characteristics. The coupling of amino acids increases the solubility in aqueous medium and, consequently, its bioavailability by the oral route, the preferred form of drug administration. There are several peptide transporters in the body responsible for obtaining the amino acids from the diet, thus, the known amino acids were coupled to the compound and, through molecular docking, interaction information, conformation of the molecules and binding sites with the PEPT1 transporter were obtained, present in human intestine enterocytes.

Keywords: Chagas Disease, molecular docking, organic synthesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas.	18
Figura 2. Estruturas químicas dos derivados isoxazólicos 1 e 2	18
Figura 3. Estrutura bidimensional do ligante alanina - dibromotirosinaEstrutura bidimensional do ligante alanina - dibromotirosina.....	29
Figura 4. Equação da função ChemPLP do GOLD.....	30
Figura 5. Etapas da síntese do derivado latenciado	30
Figura 6. Estrutura tridimensional do transportador de membrana PEPT1 PDB 4TPH (GUETTOU et al., 2014).....	34
Figura 7. Interações do peptídeo alanina dibromotirosina com o transportador de membrana PEPT1 (complexo cristalográfico 4TPH).....	35
Figura 8. Derivados isoxazólicos série A e derivados isoxazólicos série B.....	36
Figura 9. (A) Representação tridimensional do transportador PEPT1 com destaque do ligante no sítio ativo na cadeia A; (B) Diagrama bidimensional de interação do dipeptídeo alanina dibromotirosina; (C) Representação tridimensional da interação do dipeptídeo alanina dibromotirosina com o PEPT1	40
Figura 10. Enalapril	44
Figura 11. Valaciclovir	45
Figura 12: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol triptofano e o transportador PEPT1.....	46
Figura 13: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol tirosina e o transportador PEPT1.	47
Figura 14: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol fenilalanina e o transportador PEPT1.	48
Figura 15: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol arginina e o transportador PEPT1.....	49
Figura 16: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol leucina e o transportador PEPT1.	50
Figura 17: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol metionina e o transportador PEPT1.	51
Figura 18: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol lisina e o transportador PEPT1.....	51
Figura 19: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol histidina e o transportador PEPT1.	52

Figura 20: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol glutamina e o transportador PEPT1.....	53
Figura 21: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol glutamato e o transportador PEPT1.....	54
Figura 22: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol asparagina e o transportador PEPT1.....	55
Figura 23: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol isoleucina e o transportador PEPT1.....	55
Figura 24: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol treonina e o transportador PEPT1.....	56
Figura 25: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol aspartato e o transportador PEPT1.....	57
Figura 26: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol cisteína e o transportador PEPT1.....	57
Figura 27: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol valina e o transportador PEPT1.....	58
Figura 28: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol serina e o transportador PEPT1.....	59
Figura 29: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol prolina e o transportador PEPT1.....	60
Figura 30: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol alanina e o transportador PEPT1.....	60
Figura 31: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol glicina e o transportador PEPT1.....	61
Figura 32: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol triptofano da série B e o transportador PEPT1.....	64
Figura 33: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol fenilalanina e o transportador PEPT1.....	64
Figura 34: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol tirosina e o transportador PEPT1.....	65
Figura 35: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol glutamato e o transportador PEPT1.....	66
Figura 36: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol histidina e o transportador PEPT1.....	66
Figura 37: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol arginina e o transportador PEPT1.....	67

Figura 38: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol glutamina e o transportador PEPT1.....	68
Figura 39: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol lisina e o transportador PEPT1.....	68
Figura 40: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol aspartato e o transportador PEPT1.....	69
Figura 41: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol metionina e o transportador PEPT1.....	70
Figura 42: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol isoleucina e o transportador PEPT1.....	71
Figura 43: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol leucina e o transportador PEPT1.....	71
Figura 44: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol treonina e o transportador PEPT1.....	72
Figura 45: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol asparagina e o transportador PEPT1.....	73
Figura 46: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol valina e o transportador PEPT1.....	73
Figura 47: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol prolina e o transportador PEPT1.....	74
Figura 48: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol serina e o transportador PEPT1.....	75
Figura 49: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol cisteína e o transportador PEPT1.....	75
Figura 50: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol alanina e o transportador PEPT1.....	76
Figura 51: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol glicina e o transportador PEPT1.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Representação gráfica dos aminoácidos em duas dimensões	20
Tabela 2: Representação gráfica dos aminoácidos em três dimensões	21
Tabela 3: Valores de RMSD encontrados durante a etapa de validação com o ligante alanina-dibromotirosina para as funções de <i>score Chemplp</i> , <i>Chemscore</i> e <i>Goldscore</i> , considerando tamanhos variados de Grid e GA runs.....	38
Tabela 4: Valores de RMSD encontrados para as funções de <i>score Chemplp</i> , considerando tamanhos variados de Grid e GA runs.....	38
Tabela 5: Valores de RMSD encontrados para as funções de <i>score Chemplp</i> , considerando Grid de 6 Å e tamanhos variados de GA runs.	39
Tabela 6: <i>Score</i> dos derivados isoxazólicos série A	46
Tabela 7: <i>Score</i> dos derivados isoxazólicos série B	63
Tabela 8: Propriedades físicos químicas dos derivados isoxazólicos série A.....	78
Tabela 9: Propriedades físicos químicas dos derivados isoxazólicos série B.....	79
Tabela 10 Propriedades físicos químicas do isoxazol 1 e fármacos Valaciclovir e Enalapril.....	80
Tabela 11: Rendimentos das metodologias de síntese do isoxazol 1	83
Tabela 12: Variações na metodologia de oxidação	84

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Esquema de síntese do derivado isoxazol acoplado ao aminoácido a partir do isoxazol 2	81
Esquema 2: Esquema de síntese do isoxazol 2 a partir da oxima 3	82

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Tabela de valores de minimização de energia final dos derivados isoxazólicos série A	97
Anexo 2. Tabela de valores de minimização de energia derivados isoxazólicos série B.....	98
Anexo 3. Espectro de ¹ H NMR do composto isoxazol 1 (300MHz, CDCl ₃ /CD ₃ COCD ₃)	99
Anexo 4. Tabela com os valores de <i>score</i> obtidos nos estudos de docking molecular dos derivados isoxazólicos série A no GOLD.....	99
Anexo 5 Tabela de valores do Ranking obtidos nos estudos de docking molecular dos derivados isoxazólicos série B no GOLD.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt: Acetato de etila

CCD: Cromatografia em camada delgada

CCDC: The Cambridge Crystallographic Data Centre

CDCl₃: Clorofórmio deuterado

CD₃COCD₃: Acetona deuterada

δ: Deslocamento químico em partes por milhão em relação ao trimetilsilano (TMS = 0 ppm)

d: Duplete

DABCO: 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano

DCM: Diclorometano

DMF: Dimetilformamida

FM: Fórmula molecular

Hz: Hertz

CI₅₀: Concentração inibitória para 50% da população estudada

J: Constante de acoplamento

logP: Logaritmo do coeficiente de partição octanol/água

MeOH: Metanol

NCS: N-clorosuccinimida

OMS: Organização Mundial da Saúde

P.M: Massa molecular

¹H NRM/RMN: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s: Simpleto

t: Tripleto

LISTA DA NOMENCLATURA DOS AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Código	Abreviação
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Leucina	Leu	L
Valina	Val	V
Isoleucina	Ile	I
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Cisteína	Cys	C
Tirosina	Tyr	Y
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Aspartato	Asp	D
Glutamato	Glu	E
Arginina	Arg	R
Lisina	Lys	K
Histidina	His	H
Triptofano	Trp	W
Metionina	met	M

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Planejamento de fármacos	15
1.2 Doença de Chagas.....	16
1.3 Transportador PEPT 1 e Aminoácidos	19
1.4 Docking molecular	22
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Materiais	28
3.2 Metodologia	28
3.2.1 Estudos <i>in silico</i>	28
3.2.2 Síntese.....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Estudos <i>in silico</i> : planejamento e estudos do docking molecular	34
4.1.1 <i>Docking</i> molecular dos fármacos enalapril e valaciclovir no transportador de membrana PEPT1.....	43
4.1.2 Análise dos derivados isoxazólicos série A.....	45
4.1.3 Análise dos derivados isoxazólicos série B.....	62
4.1.4 Análise das propriedades físico-químicas dos compostos	77
4.2 Síntese.....	80
4.2.1 Reação de oxidação do isoxazol	83
4.2.2 Reação de aminação redutiva	85
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	86
6 Conclusões	88
7 REFERÊNCIAS	89
8 ANEXOS.....	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 Planejamento de fármacos

Fármacos são entidades químicas de origem sintética ou natural que modulam funções do corpo sem provocar novas alterações desconhecidas. A ação de um fármaco ocorre por meio de interação molecular e modificação de alvos específicos, estimulando ou inibindo esses alvos. Um candidato ideal a fármaco deve possuir características tais como: segurança e efetividade; boa absorção oral, toxicidade inexistente e o mínimo de efeitos colaterais (ZANG; TANG, 2018; TOMAR et al., 2019).

A descoberta e desenvolvimento de um novo composto é um processo demorado e de alto custos e riscos, em função do valor investido. O tempo médio investido no desenvolvimento de fármacos é de 12 a 24 anos. Nesse processo muitos compostos falham antes de se tornarem medicamentos (LOMBARDINO; LOWE, 2004; VAN NORMAN, 2016).

A abordagem tradicional de desenvolvimento de fármacos envolve uma triagem cega de moléculas químicas obtidas na natureza ou sintetizadas em laboratório o que acarreta em muitas etapas no planejamento de fármacos e alto custo de produção. No desenvolvimento racional, são empregadas técnicas computacionais, que reduzem os custos e minimizam o tempo total do processo (TOMAR et al., 2019).

O desenvolvimento racional de fármacos requer uma pesquisa de proteína-alvos e compostos com potencial para se tornarem candidatos a fármacos. O primeiro estágio consiste na identificação, purificação e determinação da estrutura do alvo, geralmente uma proteína. Com o avanço das técnicas de cristalografia e ressonância magnética nuclear, bancos de dados passaram a oferecer estruturas de proteínas de alta resolução, como o PDB - protein molecular são empregadas na busca virtual e ranqueamento de compostos que interagem com o alvo definido. Após a definição dos compostos que foram identificados, suas características físico-químicas podem ser otimizadas de forma a melhorar as propriedades farmacocinéticas (WANG et al., 2015; KHANNA et al., 2019).

O principal objetivo da química medicinal é descobrir fármacos candidatos a testes clínicos. Com o avanço da tecnologia e o acesso a computadores mais potentes, houve o avanço da química computacional. Nesse processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, o *docking* molecular tornou-se uma ferramenta valiosa na identificação de um composto líder (CAMPBELL et al., 2018). O emprego de técnicas computacionais na descoberta de novos fármacos tornou-se essencial nos estágios preliminares do processo, com intuito de minimizar os custos e reduzir a ocorrência de falhas no estágio final. Essa ferramenta traz informações importantes acerca da interação e afinidade de um ligante e uma

proteína (MACALINO et al., 2015). O refinamento das técnicas de cristalografia, softwares de modelagem molecular e a capacidade de processamento dos computadores introduziu uma nova abordagem no desenvolvimento de fármacos, empregando a estrutura tridimensional do alvo biológico no design racional de moléculas ativas. O método baseado na estrutura do receptor é chamado de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor - SBDD do inglês *structure-based drug design* (HARDIANTO et al., 2019).

A química medicinal envolve a descoberta, desenho, identificação e a síntese de novos compostos, assim como os modelos de ação em nível molecular (SILVA, 2013). O processo de elaboração de novos fármacos tem início com a fase da descoberta, a qual envolve identificação de um alvo terapêutico. A partir do alvo definido e conhecimento da estrutura química de ligantes deste alvo, podem ser empregadas ferramentas que auxiliam no planejamento do composto protótipo. Esse composto pode ter sua eficácia aumentada por meio de estratégias de modificação molecular (PATRICK 2013), dentre elas, a latenciação. O processo de latenciação é uma modificação química em um composto biologicamente ativo em forma de transporte inativo, que *in vivo* irá sofrer reação química ou enzimática, liberando o composto ativo (HARPER, 1959; CHUNG et al.; 2005). A conversão de compostos em derivados peptídicos aumenta a solubilidade do composto em água e explora o sistema de transporte natural do organismo, aumentando a capacidade do composto ser transportado através das membranas (NAGASAWA et al., 1975; STROMGAARD, 2002).

Em sequência, há a otimização do composto líder, no qual análogos químicos são sintetizados e testados por triagem; a partir dessa etapa ocorre a otimização do composto protótipo e avaliação das propriedades físico-químicas (KENAKIN, 2019).

1.2 Doença de Chagas

A Doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanossoma Cruzi*, cujo principal vetor é um inseto triatomíneo. Aproximadamente 8 (oito) milhões de pessoas são infectadas no mundo, a maioria na América Latina, onde a doença é um grande problema de saúde pública, provocando incapacidade nos indivíduos acometidos e mais de dez mil mortes por ano (WHO, 2018). Na América Latina, teve início como uma doença de população carente e rural, onde o triatomíneo adaptou-se ao ambiente das casas de madeira. Milhares de pessoas foram infectadas e vieram a óbito sem o diagnóstico correto e assistência médica. A urbanização progressiva da população rural foi um dos principais fatores que contribuiu para a expansão da patologia (COURA; VIÑAS 2010).

O triatomíneo é um inseto com hábitos noturnos que vive em rachaduras nas paredes ou, ainda, presente em animais. O parasita adulto é excretado no ato da defecação do inseto, o qual ocorre enquanto ele alimenta-se de sangue, sendo inoculado diretamente na pele lesionada (FEASEY et al., 2009).

O ciclo de vida do parasita é heteroxênico, apresentando uma fase dentro do hospedeiro e outra dentro do vetor. A forma epimastigota multiplica-se primeiro no intestino do inseto, onde se transforma em tripomastigota, forma infectante para os mamíferos. A forma tripomastigota entra na corrente sanguínea pela lesão no local da picada. Essa forma invade e as células do hospedeiro e transforma-se em amastigota. No interior das células, a forma amastigota multiplica-se por divisão binária e diferencia-se em tripomastigota, que pode invadir uma nova célula no hospedeiro (LEWIS et al., 2018).

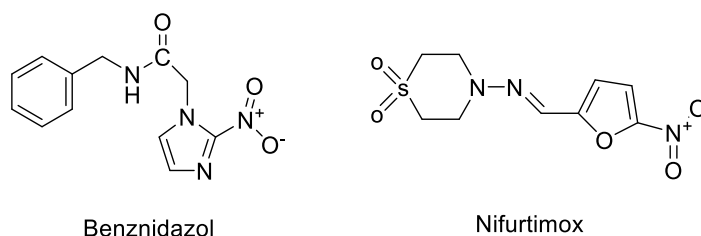
O protozoário é capaz de invadir e multiplicar-se em células como macrófagos e células musculares lisas e estriadas. O processo de inflamação severo é acompanhado de necrose das células (COURA; CASTRO, 2002). Dentre as manifestações clínicas, a doença aguda é caracterizada pela presença do parasita no sangue do paciente, e em, aproximadamente, 95% dos casos é assintomática. Após três a quatro meses da fase aguda, o parasita dificilmente é detectado na corrente sanguínea o paciente entra numa fase de latência, a qual pode durar de dez a trinta anos ou ao longo da vida. A resposta imune do organismo provocada pelo parasita acarreta em distúrbios microvasculares e danos no miocárdio, essas alterações geram as manifestações clínicas cardíacas características da doença de Chagas como arritmia, falência cardíaca e aneurisma (GOSLING et al., 2019).

Há mais de 20 anos, apenas dois fármacos são utilizados no tratamento da doença de Chagas e ambos têm eficácia limitada, assim como efeitos adversos frequentes e significativos. Esses fármacos são nitro heterocíclicos, o nifurtimox descoberto em 1960 e benznidazol, em 1970. O tratamento com benznidazol é realizado por via oral durante sessenta dias em adultos e durante um período de sessenta a noventa dias em crianças. (MAYA et al., 2010; BERMUDEZ et al., 2016; SCARIM et al., 2018; TORRICO et al., 2018).

O Benznidazol (Rochagan ®) e o Nifurtimox (Lampit ®) são os únicos fármacos disponíveis para o tratamento e, ambos possuem diversos efeitos colaterais como dermatopatia alérgica, anorexia, vômito, polineuropatia periférica e alterações psíquicas (URBINA, 2010; LEAL et al., 2012). O Nifurtimox foi descontinuado no Brasil a partir dos anos 80. Seu mecanismo de ação envolve a formação de radicais intermediários reativos (COURA; CASTRO, 2002). Os mamíferos possuem mecanismos de remoção desses radicais, os tripanossomídeos, por sua vez, não dispõem desse sistema de remoção, o que acarreta em colapso oxidativo levando-os à morte, dessa forma, a toxicidade elevada desse medicamento é atribuída a formação de radicais livres altamente reativos. (MELOS; ECHEVARRIA, 2012;

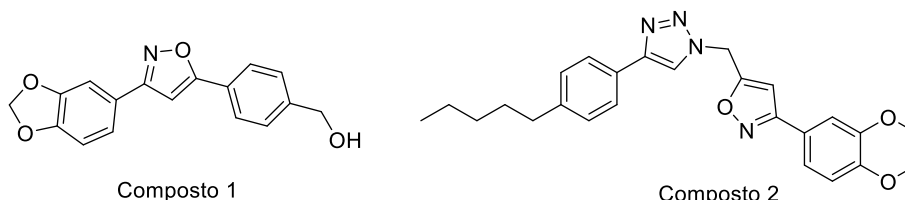
LEMKE; WILLIAMS, 2012). Na figura 1 é possível observar as fórmulas moleculares dos fármacos citados.

Figura 1. Fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas.



Frente a essas únicas opções de tratamento disponível, ambas com efeitos adversos e tempo de tratamento prolongado, nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com a síntese de derivados heterociclos, na busca por compostos mais promissores para o tratamento dessa patologia. Dentre os trabalhos desenvolvidos, os compostos 3-(3,4-metilenodioxifenil)-5-(4-hidroxi metilfenil)isoxazol (**1**) e 3-(3,4-dimetoxifenil)-5-((4-(4-pentilfenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)isoxazol (**2**), ambos apresentados na figura 1, mostraram atividade promissora contra a forma amastigota de *Trypanossoma cruzi in vitro*, com $CI_{50} = 5,26 \mu M$ e $12,9 \mu M$, respectivamente (ZIMMERMANN et al., 2018). O composto **1**, embora tenha sido mais ativo em relação ao composto **2**, apresenta baixa solubilidade, o que pode comprometer uma investigação aprofundada de seu potencial biológico em outros testes *in vivo* e *in vitro* (DA ROSA et al., 2017). Portanto, estratégias de modificação na estrutura desse composto foram avaliadas com a finalidade de sintetizar análogos com maior hidrossolubilidade.

Figura 2. Estruturas químicas dos derivados isoxazólicos **1** e **2**.



Dentre as estratégias para aprimorar as propriedades físico-químicas de um composto a modificação molecular por latenciação foi a opção escolhida para ser empregada no composto com atividade já comprovada. Essa ferramenta consiste na modificação do

composto biologicamente ativo que, após a permeação, sofre ação das enzimas *in vivo*, liberando o composto ativo (WERMUTH, 2003).

O acoplamento de aminoácidos no composto é uma estratégia de latenciação. Dessa forma, o novo composto pode ser transportado pelo carreador de membrana PEPT 1, presente no intestino delgado humano.

1.3 Transportador PEPT 1 e Aminoácidos

Após a administração por via oral, o fármaco atravessa a membrana intestinal e é distribuído pelo organismo conforme suas propriedades físico-químicas. No epitélio intestinal, o transportador PEPT1 é responsável pela captação de di e tripeptídeos provenientes da dieta. O PEPT1 possui capacidade de transportar substratos fisiológicos e também muitos fármacos como antibióticos beta-lactâmicos, além de pró-fármacos como valaciclovir e enalapril, ambos devido à semelhança estrutural com os peptídeos. (SAI, 2005; BRANDSCH, 2013).

O transportador de membrana PEPT1 captando moléculas a partir da membrana apical. No interior dos enterócitos, os dipeptídeos e tripeptídeos sofrem hidrólise e são carregados por transportadores de aminoácidos localizados na membrana basolateral do lúmen. Os pró-fármacos também sofrem hidrólise e a parte ativa da molécula é então transportada por carreadores de fármacos. Por sua vez, os fármacos beta-lactâmicos e inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) são carregados por transportadores peptídeomiméticos (RUBIO ALIAGA & HANNELORE, 2002; BRANDSCH et al., 2008).

O transportador PEPT1 é um transportador de peptídeo o qual contém 12 domínios transmembranares com as porções N-terminal e C-terminal voltadas para o citosol. Nos humanos, o PEPT1 possui 708 resíduos de aminoácidos e está presente principalmente nas células epiteliais do intestino delgado, sendo estereosseletivo com afinidade maior por *L*-enantiômeros (RUBIO-ALIAGA & DANIEL, 2002).

Os resíduos do sítio ativo presentes nos modelos de PEPT1 baseados em bactérias são altamente conservados nos mamíferos, como o resíduo de tirosina 147 (Tyr), asparagina 151, asparagina 329 (Asn) e ácido glutâmico 402 (Glu). O resíduo de tirosina 29 (Tyr) também encontra-se conservado nos homólogos humanos e pode estabelecer ligações de hidrogênio com o substrato (GUETTOU 2014). O anel imidazólico presente nos resíduos de histidina do transportador interage com o grupo amino do substrato por ligação de prótons (*proton binding*) (TERADA et al., 1998).

O fármaco precisa ser rapidamente dissolvido no meio aquoso do trato gastrointestinal para que possa ser absorvido adequadamente. Uma vez que a molécula encontra-se

dissolvida no fluido gástrico, ela deve permanecer solúvel ao longo de todo o trato gastrointestinal. Alguns fármacos administrados por via oral são absorvidos através de peptídeos transportadores do transepitélio intestinal. Esses transportadores podem carregar di e tripeptídeos, além de outros substratos fisiológicos (LIU et al., 2009). Na tabela 1 abaixo é possível observar os aminoácidos proteicos nas suas estruturas em duas em duas dimensões com suas classificações e na tabela 2 as estruturas em três dimensões.

Tabela 1. Representação gráfica dos aminoácidos em duas dimensões

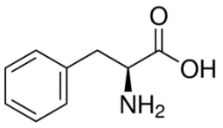
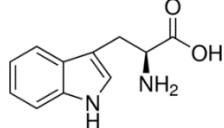
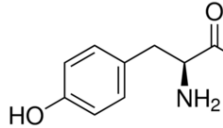
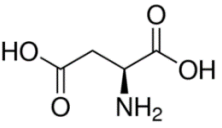
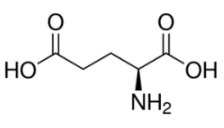
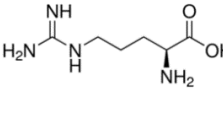
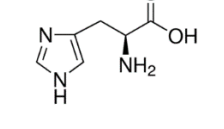
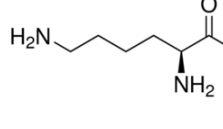
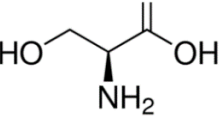
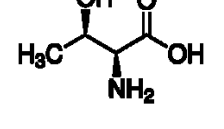
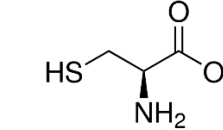
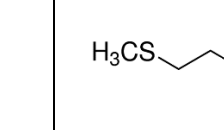
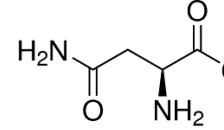
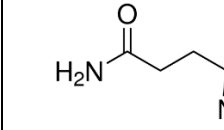
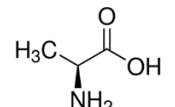
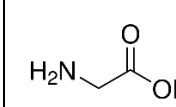
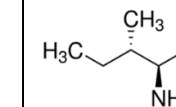
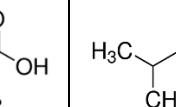
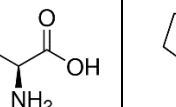
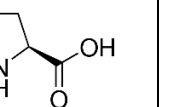
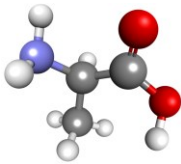
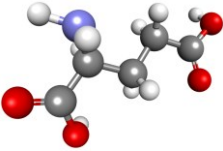
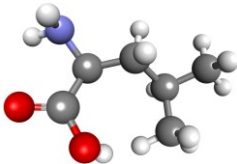
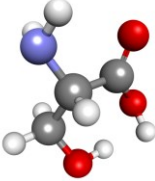
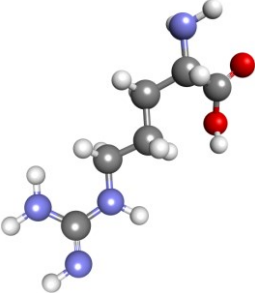
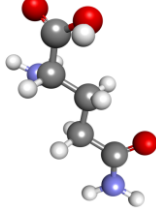
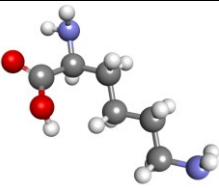
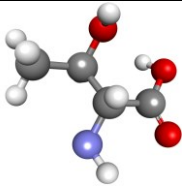
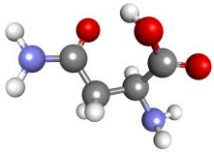
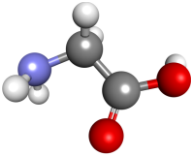
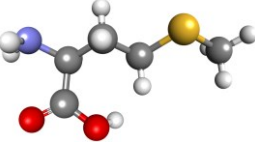
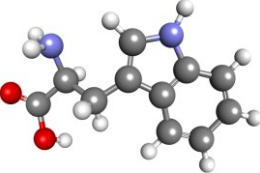
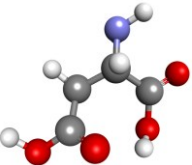
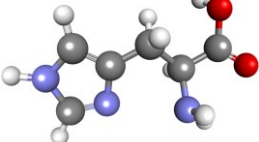
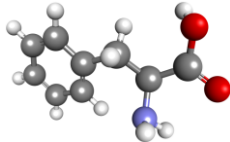
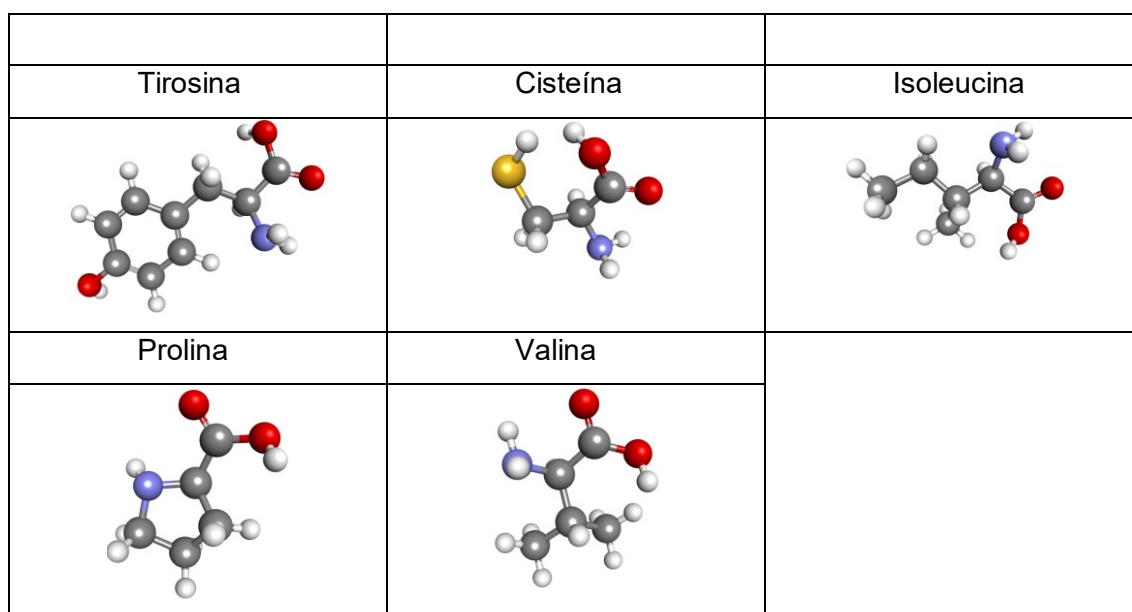
AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS			AMINOÁCIDOS ÁCIDOS		
fenilalanina	triptofano	tirosina	ácido aspártico	ácido glutâmico	
					
AMINOÁCIDOS BÁSICOS			AMINOÁCIDOS HIDROXILICOS		
arginina	histidina	lisina	serina	treonina	
					
AMINOÁCIDOS SULFURADOS		AMINOÁCIDOS AMÍDICOS			
cisteína	metionina	asparagina		glutamina	
					
AMINOÁCIDOS ALIFÁTICOS					
alanina	glicina	isoleucina	leucina	prolina	valina
					

Tabela 2: Representação gráfica dos aminoácidos em três dimensões

Alanina	Glutamato	Leucina
		
Serina	Arginina	Glutamina
		
Lisina	Treonina	Asparagina
		
Glicina	Metionina	Triptofano
		

Aspartato	Histidina	Fenilalanina
		



1.4 Docking molecular

O planejamento e descoberta de novos fármacos com auxílio de ferramentas computacionais é um campo da modelagem molecular o qual abrange a estratégia de *docking* molecular de uma ou mais moléculas pequenas com um alvo determinado, nesse caso uma proteína (WISHART, 2015). O método de *structure based drug design* (SBDD) tem a vantagem de retratar o modo de ligação experimental de uma molécula pequena a determinada estrutura-alvo. O *docking* molecular é um processo capaz de prever a conformação e orientação de um ligante dentro da estrutura-alvo. Um *score* é baseado em vários termos e gerado para cada pose em termos de orientação de ligação com o receptor. Essa informação traz um contexto de interação do receptor com o ligante (KALYAANAMOORTHY & CHEN, 2011).

Os estudos de *docking* são baseados em ferramentas computacionais e têm por objetivo prever a melhor orientação e conformação de um ligante a uma molécula receptora de interesse. Assim como apurar a estrutura ótima e prever a atividade (KITCHEN et al., 2004).

A predição de um ligante em um sítio ativo de uma proteína conhecida é uma das áreas de estudo do *docking* com maior sucesso, nessa configuração o ligante é tratado como uma estrutura flexível, capaz de adotar um número determinado de poses, conforme a configuração dos softwares disponíveis e o receptor possuindo conformação rígida (LEACH, 2006).

Essa ferramenta tem a capacidade de avaliar e prever interações entre proteína e ligante, o que é essencial no desenvolvimento de novos fármacos (VIJI et al., 2010), envolve a formação de conformêros 3D de uma determinada estrutura e a busca por diferentes conformações e orientações (poses) frente a determinada proteína alvo e a aferição de afinidade de ligação das diferentes poses. As poses são geradas por algoritmos e são avaliadas por uma função *score* capaz de classifica-las e identificar o modo de ligação assim como sua energia de afinidade (SOUZA et al., 2013; KHANNA et al., 2018).

O *docking* consiste de uma etapa de predição de orientações conformacionais, ou poses, da conformação bioativa no sítio de ligação e outra, que gera uma estimativa de probabilidade de ligação e interação com o receptor-alvo através de uma ferramenta de *score* (KONTOYIANNI, 2004).

A ferramenta de *docking* possibilita a avaliação dos tipos de interação entre o alvo e o ligante, dentre essas, as ligações de hidrogênio possuem um papel importante na estabilização das estruturas das proteínas, devido a sua ocorrência nas estruturas secundárias das mesmas, sendo alfa hélice e folhas beta pregueadas. Assim, as ligações de hidrogênio são de suma importância na determinação da afinidade de ligação (DE AZEVEDO, 2019).

O *docking* tem por objetivo a conformação de ligação e a afinidade de ligação (TROTT; OLSON, 2009). Para que as interações entre um ligante e uma macromolécula aconteçam, é necessária a complementariedade estrutural entre ambos. Essa complementariedade favorece a formação de ligações tipo dipolo-dipolo, íon-íon, ligações de hidrogênio e forças de dispersão, de forma a contribuir para a energia de ligação entre o ligante o receptor (SANT'ANNA, 2009), ainda, envolve a exploração de vários modos de ligação do sítio ativo com a conformação mais energeticamente estável do ligante (JONES et al., 1995).

As moléculas de água ocupam um espaço em torno da proteína e determinam a estrutura de biomoléculas. As proteínas orientam os aminoácidos polares para a superfície, deslocando grupos não polares para seu interior. Moléculas de água ocupam sítios de hidratação na superfície de biomoléculas. A primeira camada de solvatação é fundamental para a atividade da proteína (CAVASOTTO, 2016). As estruturas cristalográficas utilizadas nos estudos de *docking* mostram importantes interações intermoleculares no complexo proteína ligante, dentre elas: ligações de hidrogênio; interação cátion – π a qual ocorre entre um sistema π rico em elétrons e um cátion adjacente; interação ânion – π , presente entre sistemas aromáticos deficientes de elétrons; empilhamento π – amida, tipo de interação dipolo-dipolo a qual ocorre entre um sistema π rico em elétrons e uma amida (FOKOUÉ et al., 2020).

a) Métodos de cálculo clássicos e quânticos

A mecânica molecular é baseada na aproximação de Born-Oppenheimer, a qual trata os movimentos dos núcleos e dos elétrons de forma separada. Born-Oppenheimer descreve a energia da molécula em termos de posição nuclear. Esse parâmetro também é chamado de potencial de energia de superfície (GUND, 1996). Na mecânica molecular a densidade eletrônica pode ajustar-se às alterações geométricas dos núcleos. O modelo de mecânica molecular considera a molécula como um conjunto de átomos ligados entre si (COELHO et al., 1999). Esse método é baseado na energia potencial do sistema. As funções de energia potencial referem-se a um campo de força, o qual pode ser utilizado para calcular a energia molecular baseada no alongamento da ligação, valência da ligação, torsões e interações van der Waals (KOSTAL, 2016).

A energia total do sistema pode ser dividida em energia cinética e potencial. A energia cinética pode ser subdividida em vibracional, translacional e rotacional. A energia potencial pode ser subdividida em alongamento de ligação, dobramento de ligação, energia conformacional e ligações de hidrogênio (YOUNG, 2001).

A construção da estrutura 3D da molécula pode resultar em alterações no comprimento das ligações, ângulos das ligações ou ângulos de torsão. Essas moléculas precisam ser submetidas a um processo de minimização de energia, realizado por softwares de mecânica molecular, o qual calcula a energia da molécula inicial e após provoca variações no comprimento e ângulo das ligações e, ainda, nos ângulos de torsão criando novas estruturas (PATRICK, 2017).

As modificações na estrutura da molécula provocam alterações no potencial de energia de superfície. Moléculas grandes apresentam potenciais de superfície com muitas dimensões e graus de liberdade. O mínimo de energia corresponde a parte inferior do vale na representação do potencial de energia. O processo de otimização de energia consiste em localizar o mínimo de energia, no qual o arranjo dos átomos corresponde a um estado de equilíbrio do sistema (FORESMAN; FRISCH, 1996).

Os métodos semiempíricos (MNDO, AM1 e PM3) empregam parâmetros determinados com base na experiência e observação, esses métodos tendem a ser rápidos e precisos, possuem ainda, parâmetros ajustáveis para reproduzir propriedades químicas importantes. Dentre esses métodos, o mais popular é o *modified neglect of diatomic overlap* - MNDO (STEWART, 1989). Esse método, no entanto, tem baixa capacidade de prever a geometria e energia das ligações de hidrogênio e foi modificado para os elementos C, H, O e N,

originando o método AM1, que possui rápida capacidade de cálculo e robustez e amplo alcance de funções químicas (CRAMER, 2002).

Austin method 1 (AM1) é um método semiempírico criado para eliminar os problemas que o método MNDO apresentava, como não reproduzir as ligações de hidrogênio devido a repulsão da interação entre os núcleos das moléculas. A estratégia adotada para o desenvolvimento desse método foi modificar o termo de interação entre os núcleos usando funções Gaussianas (DEWAR, 1985; LEACH, 2001). Funções Gaussianas são procedimentos para computar a energia total das moléculas nas suas geometrias de equilíbrio (FORESMAN; FRISCH, 1996)

O método *Parametized model 3* - PM3 também é baseado no MNDO. Esse nome é em decorrência de ser o terceiro método, sendo o AM1 considerado o segundo. Ambos os métodos PM3 e AM1 usam a mesma forma funcional e ambos predizem propriedades termodinâmicas e estruturais com o mesmo nível de exatidão (LEACH, 2001).

b) *Docking* com o GOLD

O software de *docking* GOLD consiste em três partes principais: uma função *score*, *goldscore* é uma função molecular mecânica que leva em conta quatro termos:

$$\text{GOLD Fitness} = S_{\text{hb_ext}} + S_{\text{vdw_ext}} + S_{\text{hb_int}} + S_{\text{vdw_int}}$$

Na qual $S_{\text{hb_ext}}$ corresponde à ligação de hidrogênio entre proteína e ligante, $S_{\text{vdw_ext}}$ corresponde à interação de van der Waals, $S_{\text{hb_int}}$ é a contribuição para a função fitness devido a interação intramolecular das ligações de hidrogênio na molécula do ligante e $S_{\text{vdw_int}}$ corresponde a tensão intramolecular do ligante (VERDONK, 2003).

Ligações de hidrogênio ocorrem entre um heteroátomo, geralmente nitrogênio e oxigênio, rico em elétrons e um hidrogênio deficiente de elétrons. O hidrogênio usualmente realiza uma ligação covalente com o átomo eletronegativo. A força de ligação de hidrogênio pode variar entre 16 a 60 kJ mol⁻¹ e a distância de ligação varia entre 2,2 - 3,9 Å. As interações de Van der Waals ocorrem entre regiões hidrofóbicas de moléculas diferentes e são mais fracas que ligações de hidrogênio variam entre 2 a 4 kJ mol⁻¹ (FITZGERALD, 2003; PATRICK, 2016).

O GOLD usa uma função de algoritmo genético que possibilita a modificação dos seguintes parâmetros: ângulos diedros das ligações rotacionáveis, geometria dos anéis dos

ligantes, ângulos diedros dos grupos OH e NH₃ das proteínas e o mapeamento das posições do ligante no sítio ativo (VERDONK, 2003). O algoritmo genético gera e avalia populações de conformações e as posiciona no sítio ativo tendo como base fragmentos âncoras. A aptidão (fitness) de determinada conformação é avaliada levando em consideração as interações intraligante e proteína-ligante tipo van der Waals, ligações polares, interações de hidrogênio e interações unfavourable donor-donor (PEVZNER et al., 2014).

As funções *score* disponibilizadas no GOLD possuem características intrínsecas. A função *goldscore* utiliza energia de ligação de hidrogênio, energia de Van der Waals e tensão de torção do ligante; a função *chemscore* leva em conta área de contato hidrofóbica, flexibilidade do ligante, ligação de hidrogênio e mudança no total de energia livre que ocorre durante a interação ligante e receptor; a função *chemplp* considera ligação de hidrogênio, múltiplos potenciais lineares de van der Waals e termos de repulsão, essa é a função *score* mais rápida e mais eficiente para a predição de pose no docking molecular (KORB et al., 2009; LIEBESCHUETZE 2012; CCDC 2020).

c) Algoritmo de otimização

A minimização de energia das moléculas é fundamental para o estudo de docking. A energia mínima dos arranjos de átomos corresponde a um estado de estabilidade do sistema. Qualquer movimento fora do mínimo provoca um aumento na energia do sistema. Para obter a estrutura geométrica do sistema correspondente ao mínimo de energia, algoritmos de minimização são aplicados (LEACH, 2001; PATRICK, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Planejamento *in silico* e síntese de derivados latenciados do 3-(3,4-metilenodioxifenil)-5-(4-hidroximetilfenil) isoxazol (**1**) de forma a obter compostos com perfis de solubilidade adequados para a realização de ensaios biológicos.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Investigação de carreadores de peptídeos de membrana;
- b) Busca na base de dados por estruturas cristalográficas homólogas a transportadores de membrana;
- c) Desenho dos derivados latenciados com os vinte aminoácidos proteicos acoplados ao esqueleto isoxazol;
- d) Obtenção da estrutura tridimensional e otimização da energia das moléculas;
- e) Selecionar os aminoácidos apropriados para a interação com o transportador PEPT1, por meio de *docking* molecular;
- f) Síntese química do composto **1** e conversão ao derivado aldeído;
- g) Latenciação do composto **1**, por meio de acoplamento reductivo, com os aminoácidos selecionados por meio de *docking* molecular;
- h) Avaliação *in silico* das propriedades farmacocinéticas dos compostos latenciados sintetizados;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

- Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H foram adquiridos em espectômetro Bruker Fourier 300MHz no departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC;
- Os pontos de fusão foram aferidos em um equipamento MICROQUÍMICA MQAFP-301, com visor digital;
- As análises cromatográficas em camada delgada (CCD) foram realizadas em folhas de sílica G60 gel SILICYCLE ® e as purificações por cromatografia em coluna foram feitas utilizando sílica gel com tamanhos de partícula 40-63 e 63-200 μm (Sigma Aldrich);
- Os seguintes reagentes: hidrocloreto de hidroxilamina (CAS 5470-11-1), DABCO (280-57-9), N-clorosuccinimida (CAS 128-09-6), ascorbato de sódio (CAS 134-02-02), bicarbonato de sódio (CAS 144-55-8), sulfato de cobre II (CAS 7758-98-7), álcool 4-etinilbenzílico (CAS 10602-04-7) foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich®.

3.2 Metodologia

3.2.1 Estudos *in silico*

a) Preparação das estruturas dos compostos contendo aminoácidos:

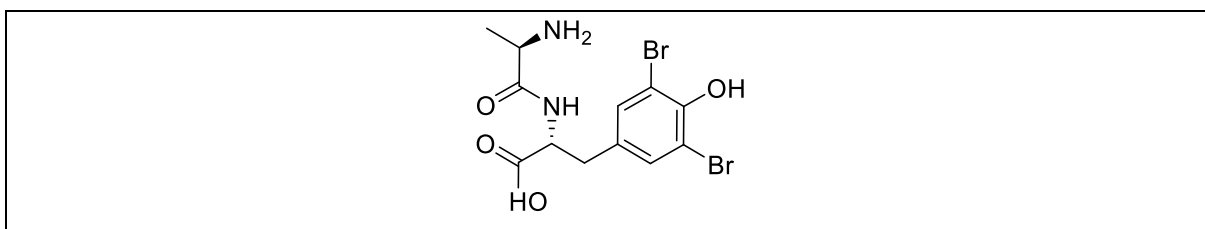
As estruturas 2D dos 40 compostos, contendo os vinte diferentes aminoácidos, foram construídas utilizando o software Chem Draw Ultra 12.0 (<http://www.perkinelmer.com/category/chemdraw>). Os derivados do composto 1 foram desenhados com os vinte aminoácidos ligados pela porção amina (derivados isoxazólicos série A); e após essa etapa o mesmo composto 1 foi desenhado com os vinte aminoácidos ligados pela porção ácido carboxílico (derivados isoxazólicos série B). As estruturas tridimensionais desses derivados foram obtidas pelo software Corina Classic (<https://www.mn-am.com/products/corina>, 2019 Molecular Networks GmbH), por meio do código *SMILES* gerado no Chem Draw Ultra 12.0. A otimização destes compostos foi feita no programa ArgusLab (versão 4.0.1) (<http://www.arguslab.com/arguslab.com/ArgusLab.html>). A

otimização das estruturas foi realizada através do método Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS) (NOCEDAL; WRIGHT, 1999), um método quasi-Newton. Esse método utiliza o valor da função *score* e pode ser considerado como um método eficaz (TROTT; OLSON, 2009)

b) *Docking* molecular

O estudo de *docking* molecular foi realizado em um processador Intel Core i7 com Windows 10, utilizando o programa GOLD (versão 5.03). O complexo cristalográfico do transportador PEPT1, identificado como 4TPH (GUETTOU et al., 2014), foi retirado do banco de dados PDB (“RCSB Protein Data Bank – RCSB PDB,” 2019). A estrutura da proteína foi otimizada com o aplicativo PDB hydro (<http://lorenz.dynstr.pasteur.fr/pdb/index.php>), o qual é utilizado para reparar as cadeias laterais faltantes no arquivo obtido do PDB. No preparo da proteína, pelo programa GOLD, as moléculas de água foram inseridas considerando a importância para o efeito hidrofóbico originado da interação entre as partes apolares do ligante com o sítio ativo (MENG et al., 2011). O sítio ativo da proteína foi verificado na estrutura cristalográfica ligado ao alanina-dibromotirosina, um dipeptídeo transportado pelo PEPT1, observado na figura abaixo.

Figura 3. Estrutura bidimensional do ligante alanina - dibromotirosina



As simulações foram realizadas conforme os seguintes parâmetros: o sítio ativo foi definido em 6Å em torno do ligante original da cadeia [A] da proteína. A função CHEMPLP *score* foi aplicada e o número de (algoritmos genéticos) GA runs estabelecido foi de 300. Na figura abaixo é possível observar os parâmetros de cálculos empregados pelo GOLD para o *docking* molecular na função ChemPLP.

Figura 4. Equação da função ChemPLP do GOLD

$$\text{fitness}_{\text{PLP}} = -(\text{w}_{\text{PLP}} \cdot \text{f}_{\text{PLP}} + \text{W}_{\text{lig-clash}} \cdot \text{f}_{\text{lig-clash}} + \text{W}_{\text{lig-tors}} \cdot \text{f}_{\text{lig-tors}} + \text{f}_{\text{chem-cov}} + \text{W}_{\text{prot}} \cdot \text{f}_{\text{chem-prot}} + \text{W}_{\text{cons}} \cdot \text{f}_{\text{cons}})$$

$$\text{fitness}_{\text{ChemPLP}} = \text{fitness}_{\text{PLP}} - (\text{f}_{\text{chem-hb}} + \text{f}_{\text{chem-cho}} + \text{f}_{\text{chem-met}})$$

A análise das poses obtidas nos cálculos de *docking* molecular dos compostos propostos (Grupos 1 e 2) no sítio ativo da enzima PEPT1 foi realizada utilizando o programa Discovery Studio Visualizer v.16.1.0.15350, 2015 (<http://www.3dsbiovia.com/products/collaborative-science>). Para cada grupo de compostos foram analisados os *scores* obtidos e as principais interações moleculares foram identificadas por meio das medidas de distância entre os átomos do ligante e da enzima.

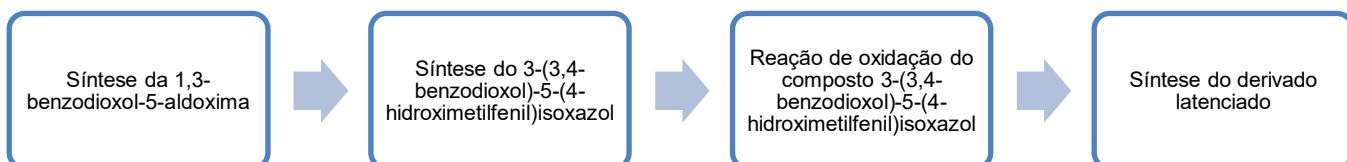
c) Avaliação *in silico* das propriedades físico-químicas

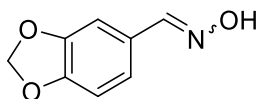
A avaliação das propriedades físico-químicas dos compostos selecionados para síntese foi feita com o auxílio do software de acesso livre Osiris Data Warrior (<http://www.openmolecules.org/datawarrior/>).

3.2.2 Síntese

A figura 5 abaixo apresenta um fluxograma, onde é possível observar as etapas para a síntese do derivado latenciado.

Figura 5. Etapas da síntese do derivado latenciado



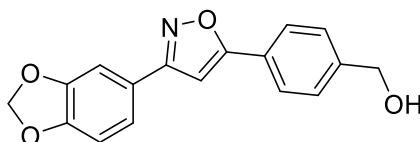
a) 1,3-benzodioxol-5-aldoxima (**3**) (HAJIPOUR; RAFIEE; RUOHO, 2010)

Composto 3

Uma mistura contendo piperonal (180,0 mg; 1,20 mmol), cloridrato de hidroxilamina (117,0 mg; 1,20 mmol) e DABCO (134,6 mg; 1,20 mmol) foram adicionados a um gral de vidro e macerados até que o consumo total do aldeído fosse verificado por cromatografia em camada delgada. Então, a reação foi diluída em água, extraída com diclorometano, seca sobre Na_2SO_4 anidro e rotaevaporada. O produto foi obtido como um sólido branco na mistura dos isômeros (*E*) e (*Z*), com rendimento de 82% (163,3 mg 1,08 mmol) F.M. $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_3$. P.M.: $165,15 \text{ g mol}^{-1}$. P.F.: 109,2–111,8.

b) 3-(3,4- benzodioxol)-5-(4-hidroximetilfenil)isoxazol (**1**)

Metodologia 1 (micro-ondas)



Composto 1

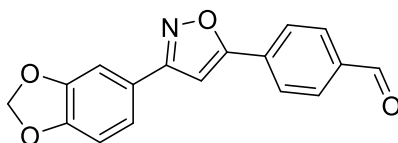
A uma solução de 1,3 benzodioxol-5-aldoxima (30,0 mg; 0,18 mmol) em DMF 0,3 mL em um tubo de micro-ondas adicionou-se lentamente *N*-clorosuccimida (25,0 mg; 0,19 mmol). O tubo foi selado e submetido à irradiação micro-ondas (30 °C, 150 W) por 10 min. O consumo do material de partida foi acompanhado por CCD. Em seguida, sulfato de cobre II (1,0 mg; 2 mol%), ascorbato de sódio (5,3 mg; 15mol%), bicarbonato de sódio (66,0 mg; 0,78 mmol) e álcool 4-etinilbenzilíco (25,0 mg; 0,19 mmol) foram adicionados ao tubo que, então, foi irradiado por 10min (30 °C; 150 W). Ao final, a reação foi diluída com 15,0 mL de solução saturada de NaCl, extraída com AcOEt (3 x 10,0 mL), seca sobre Na_2SO_4 anidro e o solvente

foi evaporado evaporador rotatório. O extrato reacional bruto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica flash com fase estacionária hexano:acetato de etila (6:4 v/v) como fase móvel, levando ao isolamento do composto 1 como um sólido branco com rendimento de 28% (14,5 mg; 0,05mmol). O rendimento médio obtido nas múltiplas vezes que a reação foi reproduzida foi de 37,6%. **F.M.:** C₇H₁₃NO₄. **P.M.:** 295,29 g mol⁻¹. **P.F.:** 180,1–181,7 °C. **RMN H¹ (300MHz, CDCl₃/CD₃COCD₃)** δ = 7,88 (d, J= 8,2 Hz, 2H, Ar); 7,55 (d, J= 8,0 Hz, 2H, Ar); 7,48 (dd, J=1,6 Hz, J= 8,0 Hz, 1H, Ar); 7,43 (d, J= 1,6 Hz, 1H, Ar); 7,28 (s, 1H, CH-isozaxol); 6,99 (d, J= 8,0, 1H, Ar); 6,10 (s, 2H, OCH₂O); 4,72 (sl, 2H, CH₂).

Metodologia 2 (HIMO et al., 2005)

Inicialmente, *N*-clorosiccinimida (21 mg 0,16 mmol) foi adicionada lentamente à uma solução de 1,3-benzodioxol-5-aldoxima (25,0 mg g, 0,15 mmol) em DMF (1,0 ml) e a reação agitada por 24h em temperatura ambiente, o consumo do material de partida foi verificado por análise cromatográfica. A reação foi diluída com solução saturada de NaCl (15,0 mL), extraída com éter dietílico (3 x 15,0 mL), seca sobre Na₂SO₄ anidro e evaporador rotatório e utilizada diretamente na próxima etapa da reação. Em seguida: sulfato de cobre II (1,0 mg, 2 mol%), ascorbato de sódio (4,0 mg, 15 mol%), bicarbonato de sódio (54,0 mg 0,64 mmol) e álcool 4-etinilbenzílico (21,0 mg, 0,15 mmol) foram adicionados ao produto obtido e a reação foi agitada por 24 h em temperatura ambiente. Ao final, a reação foi diluída com 15,0 mL de solução aturada de NaCl, extraída com AcOEt (3x 10,0 mL), seca sobre Na₂SO₄ anidro e em evaporador rotatório. O extrato reacional bruto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica flash com fase estacionário hexano:acetato de etila (6:4) como fase móvel, levando ao isolamento de 3-(3,4-metilenodioxifenil)-5-(4-hidroximetilfenil)isoxazol como um sólido branco com rendimento médio de 13% (5,9 mg, 0,01 mmol).

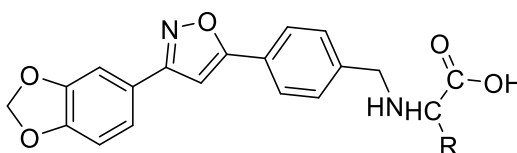
- c) Oxidação do 3-(3,4-metilenodioxifenil)-5-(4-hidroximetilfenil)isoxazol (**1**) (HUNTER; PRIEST, 2006; KIM et al., 2011)



Composto 2

A uma solução de 3-(3,4-benzodioxol)-5-(4-hidroxiometilfenil)-isoxazol (**1**) (40,0 mg, 0,13 mmol) diluído em 2,0 mL de acetona foram adicionados 52,0 μ L de reagente de Jones (0,40 mmol) 3 mol eq. A solução permaneceu sob agitação magnética por 1h a 0°. Após a conversão total do álcool a aldeído acompanhada por cromatografia a reação foi cortada com metanol, diluída com solução saturada de NaCl, extraída com AcOEt 3 x 15 mL, a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e seca rotaevaporador. Rendimentado: 3 – (3,4 benzodioxol) – 5- (4-benzaldeído) - isoxazol (**2**) 77,4%

- d) Síntese do derivado latenciado 3 – (3,4 benzodioxol) – 5- (4-benzaldeído) – isoxazol alanina (LAKE & LINDE, 2012 e ABDEL-MAGID et al., 1996).



Composto desejado

Foi adicionado ao balão o aminoácido alanina (10,2 mg; 0,11 mmol) dissolvida em 2,0 mL de metanol anidro, o isoxazol 2 (20,0 mg; 0,07mmol) e a Trietilamina (21,0 μ L; 0,15 mmol). A reação ficou sob agitação em temperatura ambiente por 3h. Após esse período a reação foi colocada em banho de gelo (0°C) e adicionado o borohidreto de sódio (5,8 mg; 0,15 mmol). A reação ficou sob agitação em temperatura ambiente over night. Após 24h, a formação do produto foi visualizada por cromatografia. A reação foi diluída com solução saturada de NaCl e extraída com AcOEt (3 x 15 mL). A Fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e seca em rota evaporador.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

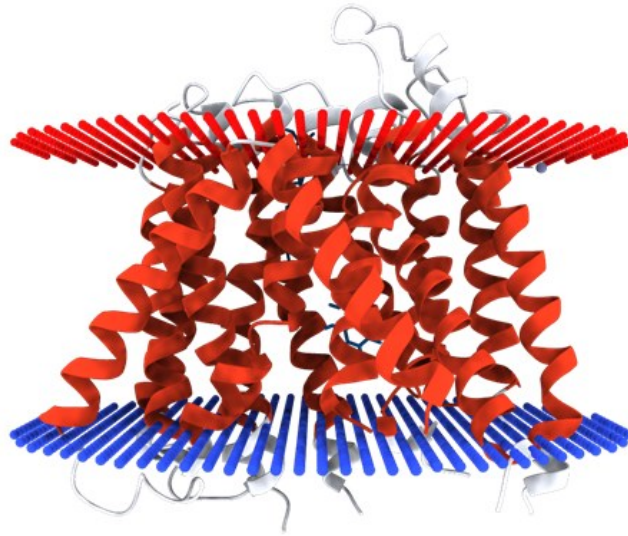
Os resultados obtidos durante o desenvolvimento do projeto são apresentados a seguir e estão divididos em duas seções: a primeira descreve as etapas de planejamento dos derivados latenciados e estudos *in silico* realizados e a segunda descreve as tentativas de síntese desses derivados.

4.1 Estudos *in silico*: planejamento e estudos do docking molecular

A busca de um transportador de membrana capaz de realizar o transporte de aminoácidos foi fundamental para o planejamento dos derivados isoxazólicos. O transportador de membrana PEPT1 foi selecionado para o estudo, por possuir capacidade de transportar peptídeos oriundos da dieta assim como fármacos peptídeo miméticos. É possível encontrar diversas estruturas cristalográficas desse transportador na base de dados Protein Data Bank (BERMAN, 2000)). Até o momento não está disponível uma estrutura cristalográfica de alta resolução da proteína de humanos, mas estruturas homólogas da bactéria *Shewanella oneidensis* são reportadas na literatura. Essa família de transportadores de membrana é altamente conservada em todos os reinos. O modelo de PEPT1 utilizado nos estudos *in silico* apresenta 20% de identidade sequencial com o modelo homólogo humano, no entanto, os resíduos de aminoácidos do sítio ativo são altamente conservados (GUETTOU et al., 2014).

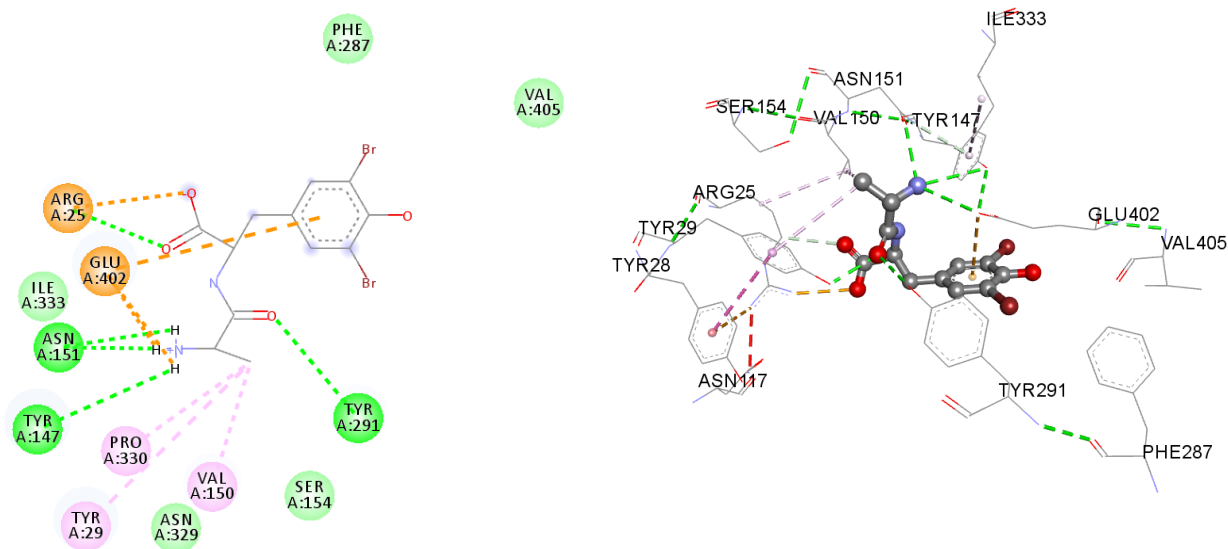
Assim, foi selecionada a estrutura cristalográfica 4TPH, como é possível observar na figura 6, uma estrutura homóloga ao transportador PEPT1 humano, por apresentar o dipeptídeo alanina dibromotirosina co-cristalografado com a proteína (GUETTOU et al., 2014).

Figura 6. Estrutura tridimensional do transportador de membrana PEPT1 PDB 4TPH (GUETTOU et al., 2014)



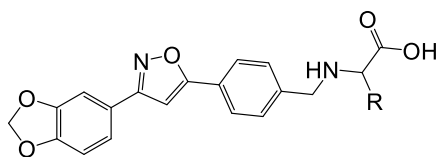
Inicialmente, foi realizada uma análise do complexo selecionado, a fim de identificar as principais interações estabelecidas entre o dipeptídeo e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo do PEPT1. Assim, foi possível observar que no complexo cristalográfico 4TPH (figura 7, o peptídeo alanina dibromo tirosina realiza interação de hidrogênio com o resíduo de Arg25 a uma distância de 2,48Å, com o resíduo Asn151 com distâncias de 2,36Å, com o resíduo de Tyr147 com distância de 2,84Å e com o resíduo de Tyr 291 com distância de 2,73Å. Os resíduos Pro330, Tyr29 e Val150 interagem por ligação tipo π -alquil, já os aminoácidos Arg25 e Glu402 interagem por ligação tipo ânion- π . É possível observar que o ligante ainda realiza interações de van der Waals com os aminoácidos Phe287, Val405, Ile333, Asn329 e Ser154.

Figura 7. Interações do peptídeo alanina dibromotirosina com o transportador de membrana PEPT1 (complexo cristalográfico 4TPH).

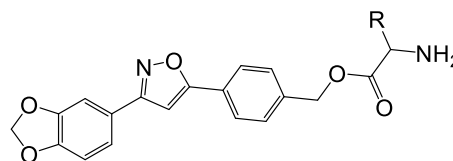


Na sequência, considerando que o PEPT1 tem a capacidade de transportar aminoácidos, foram planejados derivados latenciados do isoxazol 1, contendo um resíduo de aminoácido acoplado. Assim, foram construídos no programa ChemDraw (<http://www.cambridesoft.com>), quarenta derivados isoxazólicos, divididos em dois grupos: Derivados isoxazólicos série A, no qual o aminoácido se encontra acoplado ao esqueleto isoxazol pela porção amina; derivados isoxazólicos série B, contendo o aminoácido ligado ao esqueleto isoxazol pelo terminal ácido carboxílico (Figura 8).

Figura 8. Derivados isoxazólicos série A e derivados isoxazólicos série B



Derivados isoxazólicos série A



Derivados isoxazólicos série B

AMINOÁCIDOS: ácido aspártico (ASP), ácido glutâmico (GLU), histidina (HIS), isoleucina (ILE), glutamina (GLN), tirosina (TYR), triptofano (TRP), serina (SER), alanina (ALA), leucina (LEU), valina (VAL), metionina (MET), treonina (THR), cisteína (CYS), asparigina (ASN), glicina (GLY), lisina (LYS), fenilalanina (PHE), arginina (ARG), prolina (PRO).

A partir do desenho das estruturas bidimensionais, foram adquiridas as estruturas tridimensionais, utilizando o software Corina Classic (Molecular Networks GmbH, www.mn-am.com). Dessa forma os quarenta derivados isoxazólicos foram submetidos ao processo de minimização de energia, a fim de encontrar o arranjo de átomos que corresponde ao estado de equilíbrio do sistema (resultados obtidos encontram-se no anexo 1). Uma vez refinadas, as estruturas foram submetidas aos estudos de *docking* molecular com o transportador de membrana PEPT1.

O processo de *docking* molecular requer uma etapa de validação, a qual determina os parâmetros que serão empregados no software utilizado para os estudos. A validação é realizada com a mesma estrutura presente no complexo cristalográfico, nesse caso, o dipeptídeo alanina dibromotirosina.

Para validação, foram construídas as estruturas planar e tridimensional da alanina dibromotirosina e subsequente etapa de refinamento de energia. O dipeptídeo construído foi submetido ao processo de *docking* molecular, onde os parâmetros do software GOLD foram testados e modificados a fim de obter um RMSD menor de 2Å (GOLD configuration file user guide, 2019) preconizado na literatura como ideal para os estudos de *docking* (VERDONK et., 2003). Considerando que o GOLD possibilita a variação de alguns parâmetros, em um primeiro momento foram estabelecidos diferentes tamanhos do GRID: 6Å, 8Å e 10Å; o número e GA runs foi definido como 10, 20 e 30 e as funções *score* testadas foram *Chempfp*, *Chemscore* e *Goldscore*. A tabela 2 apresenta os resultados encontrados, onde é possível observar que o menor RMSD (2,5282) foi obtido com a função *score Chempfp*. Portanto, essa função foi definida como padrão para as avaliações subsequentes. É importante salientar que o GRID ou *docking* box é o espaço determinado pelo usuário no qual o software de *docking* molecular pode explorar as interações entre um ligante e uma molécula alvo. Espaços estreitos podem comprometer o número de conformações geradas, por sua vez, espaços amplos podem produzir poses irrelevantes (FEINSTEIN & BRYLINSKI, 2015)

Tabela 3: Valores de RMSD encontrados durante a etapa de validação com o ligante alanina-dibromotirosina para as funções de *score* *Chemplp*, *Chemscore* e *Goldscore*, considerando tamanhos variados de Grid e GA runs.

GRID	GA RUNS	SCORING FUNCTION	MENOR RMSD
6 Å	10	<i>Chemplp</i>	2,7233
6 Å	20	<i>Chemplp</i>	2,5517
6 Å	30	<i>Chemplp</i>	2,5282
8 Å	10	<i>Chemplp</i>	2,6976
8 Å	20	<i>Chemplp</i>	2,5639
8 Å	30	<i>Chemplp</i>	2,5646
10 Å	10	<i>Chemplp</i>	2,6727
10 Å	20	<i>Chemplp</i>	2,5772
10 Å	30	<i>Chemplp</i>	2,6997
6 Å	10	<i>Chemscore</i>	2,9316
6 Å	20	<i>Chemscore</i>	2,8107
6 Å	30	<i>Chemscore</i>	2,7724
8 Å	10	<i>Chemscore</i>	2,7156
8 Å	20	<i>Chemscore</i>	2,6261
8 Å	30	<i>Chemscore</i>	2,6622
10 Å	10	<i>Chemscore</i>	2,5813
10 Å	20	<i>Chemscore</i>	2,9567
10 Å	30	<i>Chemscore</i>	2,7857
6 Å	10	<i>Goldscore</i>	6,9265
6 Å	20	<i>Goldscore</i>	3,3728
6 Å	30	<i>Goldscore</i>	5,2656
8 Å	10	<i>Goldscore</i>	6,0425
8 Å	20	<i>Goldscore</i>	4,1423
8 Å	30	<i>Goldscore</i>	2,9533
10 Å	10	<i>Goldscore</i>	5,1416
10 Å	20	<i>Goldscore</i>	5,6713
10 Å	30	<i>Goldscore</i>	5,3247

Na busca de um menor valor de RMSD, foram feitas novas avaliações considerando diferentes tamanhos de GRID (12 e 15 Å) e mantendo 30 GA runs, bem como foram realizados testes mantendo o GRID de 6Å e variando o número de GA runs (40, 50 e 60). Porém, como é possível observar na tabela 3, os valores de RMSD obtidos foram maiores que o definido anteriormente, sendo o menor RMSD encontrado com GRID de 6Å e 50 GA runs.

Tabela 4: Valores de RMSD encontrados para as funções de *score* *Chemplp*, considerando tamanhos variados de Grid e GA runs.

GRID	GA RUNS	SCORING FUNCTION	RMSD
6Å	40	Chemplp	2,6077
6Å	50	Chemplp	2,5318
6Å	60	Chemplp	2,6187
8Å	40	Chemplp	2,5331
8Å	50	Chemplp	2,6271
8Å	60	Chemplp	2,5925
12Å	10	Chemplp	2,7021
12Å	20	Chemplp	2,6035
12Å	30	Chemplp	2,6465
15Å	10	Chemplp	2,7906
15Å	20	Chemplp	2,6134
15Å	30	Chemplp	2,6767

A variação do tamanho do GRID deve ser realizada com cautela, pois tamanhos pequenos podem forçar a molécula a encaixar-se dentro do sítio ativo estabelecido e tamanhos muito grandes podem predizer interações com resíduos de aminoácidos que não compõem o sítio ativo da proteína e mostrar um resultado falso positivo (FEINSTEIN & BRYLINSKI, 2015) Optou-se, então, por utilizar o GRID padrão do aplicativo GOLD, no tamanho de 6Å, visto que nas avaliações realizadas, este parâmetro apresentou baixos valores de RMSD, quando utilizado a função *score* CHEMPLP, com 30 e 50 GA runs.

A análise dos resultados descritos anteriormente permitiu observar que em alguns casos, valores maiores de GA runs levou à diminuição do valor de RMSD. Diante disso, uma vez definidos o tamanho do GRID e função *score*, o próximo passo foi a definição do valor de GA runs, na tentativa de encontrar um menor valor de RMSD. A tabela 4 apresenta os diferentes valores testados bem como os resultados encontrados, onde é possível observar que quando utilizado 300 GA runs o valor de RMSD (2,4076) obtido foi menor do que os valores descritos anteriormente.

Tabela 5: Valores de RMSD encontrados para as funções de *score Chemplp*, considerando Grid de 6 Å e tamanhos variados de GA runs.

GRID	GA RUNS	SCORING FUNCTION	MENOR RMSD
6Å	100	Chemplp	2,6093

6Å	150	Chemplp	2,5679
6Å	200	Chemplp	2,6223
6Å	250	Chemplp	2,6169
6Å	300	Chemplp	2,4076
6Å	350	Chemplp	2,5492
6Å	400	Chemplp	2,5913
6Å	450	Chemplp	2,5578
6Å	500	Chemplp	2,4911
6Å	1000	Chemplp	2,4531
6Å	1500	Chemplp	2,5461
6Å	2000	Chemplp	2,5076

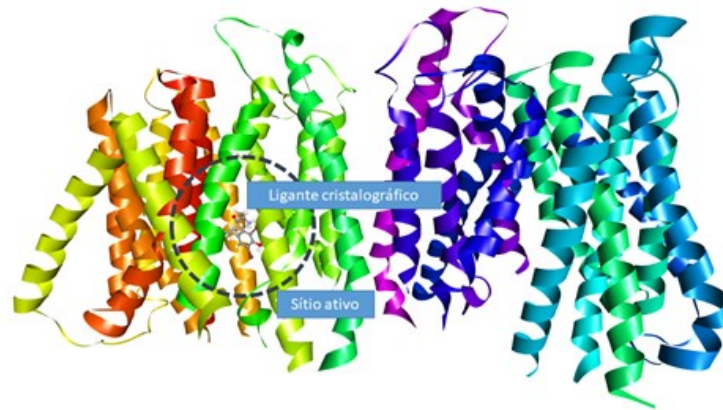
Com os parâmetros de validação definidos, foi iniciado o processo de validação do *docking* com a estrutura do dipeptídeo alanina dibromotirosina, previamente elaborada conforme descrito na seção Materiais e Métodos (página 29).

Após a finalização desse processo de *docking*, foi possível observar que o resíduo Glu402 realiza interação de H a uma distância de 2,19Å com a hidroxila do anel fenólico da dibromotirosina, o resíduo Ser406 interage por ligação de carbono com o átomo de bromo no anel aromático da tirosina, os resíduos Phe288, Phe287, Tyr291 e Tyr147 interagem com o átomo de bromo do anel aromático da tirosina e, ainda, os resíduos Val405, Leu403, Tyr29 e Val150 interagem com o ligante por meio de forças de van der Waals.

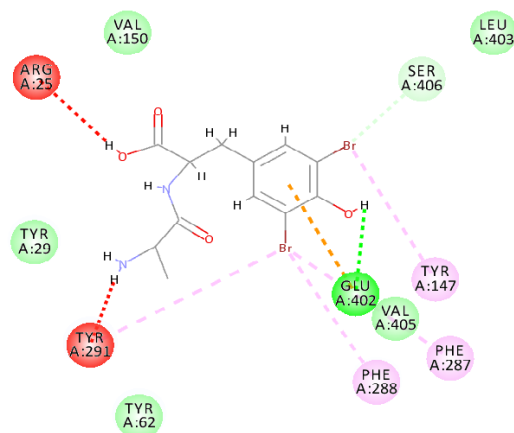
A figura 9 apresenta a estrutura tridimensional do complexo PEPT1 (4TPH) com destaque para o ligante alanina dibromotirosina e o sítio ativo da proteína (A), as estruturas bidimensional e tridimensional do ligante alanina dibromotirosina e as principais interações com o alvo molecular (B e C, respectivamente).

Figura 9. (A) Representação tridimensional do transportador PEPT1 com destaque do ligante no sítio ativo na cadeia A; (B) Diagrama bidimensional de interação do dipeptídeo alanina dibromotirosina; (C) Representação tridimensional da interação do dipeptídeo alanina dibromotirosina com o PEPT1

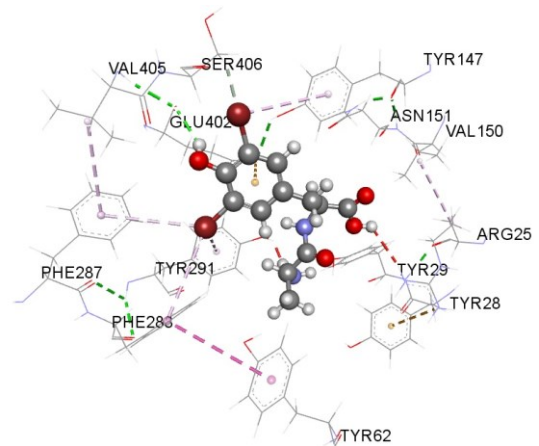
A)



B)



C)



Ao analisar as interações do peptídeo alanina dibromotirosina cristalografado acoplado com a proteína e comparar com as interações da mesma molécula desenhada para o processo de validação do docking, notou-se que os resíduos de interação em comum são Val150, Val405, Phe287, Tyr147, Glu402, Tyr291 e Tyr29. É possível observar que a distância de ligação entre o resíduo arginina 25 e a porção ácido da dibromotirosina é de 2,54Å, valor dentro do preconizado na literatura para ligações de Hidrogênio (FITZGERALD, 2003)

A ocorrência de interação não favorável pode diminuir a estabilidade do complexo proteína-ligante, pois esse tipo de ligação indica uma força de repulsão ocorrendo entre as moléculas (DHORAJIWALA, 2019). No caso da interação do aminoácido Arg25 essa repulsão ocorreu entre o átomo de hidrogênio do aminoácido com o hidrogênio da porção ácido da tirosina. Ao analisar a ligação com o resíduo Tyr291, foi observada uma distância de 1,4Å, o que seria um valor de ligação de hidrogênio, no entanto, essa ligação não favorável ocorre entre o átomo de hidrogênio ligado ao oxigênio do anel aromático da tirosina e o átomo de

hidrogênio ligado ao nitrogênio da porção amina da alanina. Contudo, o resíduo Tyr291 realiza interação do tipo π -alquil com o átomo de bromo do anel aromático da tirosina.

É importante ressaltar, que os resíduos de interação encontrados na estrutura cristalográfica podem ser diferentes dos obtidos no processo de redocagem, pois o cristal foi obtido por cristalografia de raio X, dessa forma o ligante alanina dibromotirosina está co-cristalizado no transportador (GUETTOU et al., 2014). Por sua vez, para o processo de redocagem, é necessária a construção da mesma molécula encontrada no complexo cristalográfico. Essa molécula pode apresentar diferenças em sua estrutura tridimensional, assim como na conformação espacial, ângulos de torção e distâncias de ligação. Mesmo após o processo de refinamento de energia, a estrutura final pode, ainda, conter diferenças se comparada com o ligante cristalografado, o que pode acarretar no aparecimento de interações não favoráveis.

Contudo, dentre os principais resíduos de interação encontrados na redocagem, sendo o total de onze, sete foram iguais ao ligante cristalografado (o resíduo Arg25 não foi levado em consideração em virtude de apresentar interação não-favorável). Além dos resíduos de interação em comum, o ligante construído para a redocagem apresentou interações com os resíduos Tyr62, Ser406 e Phe288, os quais compõem o sítio ativo da proteína (GUETTOU et al., 2014). Com essas informações pode se inferir que a estrutura planejada, assim como os parâmetros utilizados no programa GOLD podem ser validados. Uma vez feita a validação do processo de *docking*, foi realizado o estudo de *docking* molecular das duas séries de derivados propostos. Adicionalmente, também foi feito o estudo de *docking* dos fármacos enalapril e valaciclovir, os quais são transportados pelo carreador de membrana PEPT1 (RUBIO-ALIAGA & DANIEL 2002) e foram observados quais resíduos de interação de aminoácidos esses compostos apresentaram em comum com os derivados isoxazólicos planejados para esse trabalho.

Primeiro os derivados da Série A foram submetidos e os resultados foram avaliados. Nessa série o derivado acoplado ao aminoácido triptofano apresentou o maior *score* de pontuação. Em sequência os derivados da série B foram submetidos e o derivado triptofano novamente o maior *score* de pontuação. Dessa forma, foram selecionados os dez compostos derivados de cada série com o maior *score* para posterior síntese. Para a síntese dos compostos derivados izoxazólicos da série A foi selecionado o aminoácido glicina, para a síntese dos compostos da série B foi selecionado o aminoácido alanina. Ambos os aminoácidos foram selecionados em função de possuírem as estruturas mais simples dentre os 20 aminoácidos conhecidos.

4.1.1 *Docking* molecular dos fármacos enalapril e valaciclovir no transportador de membrana PEPT1.

Enalapril

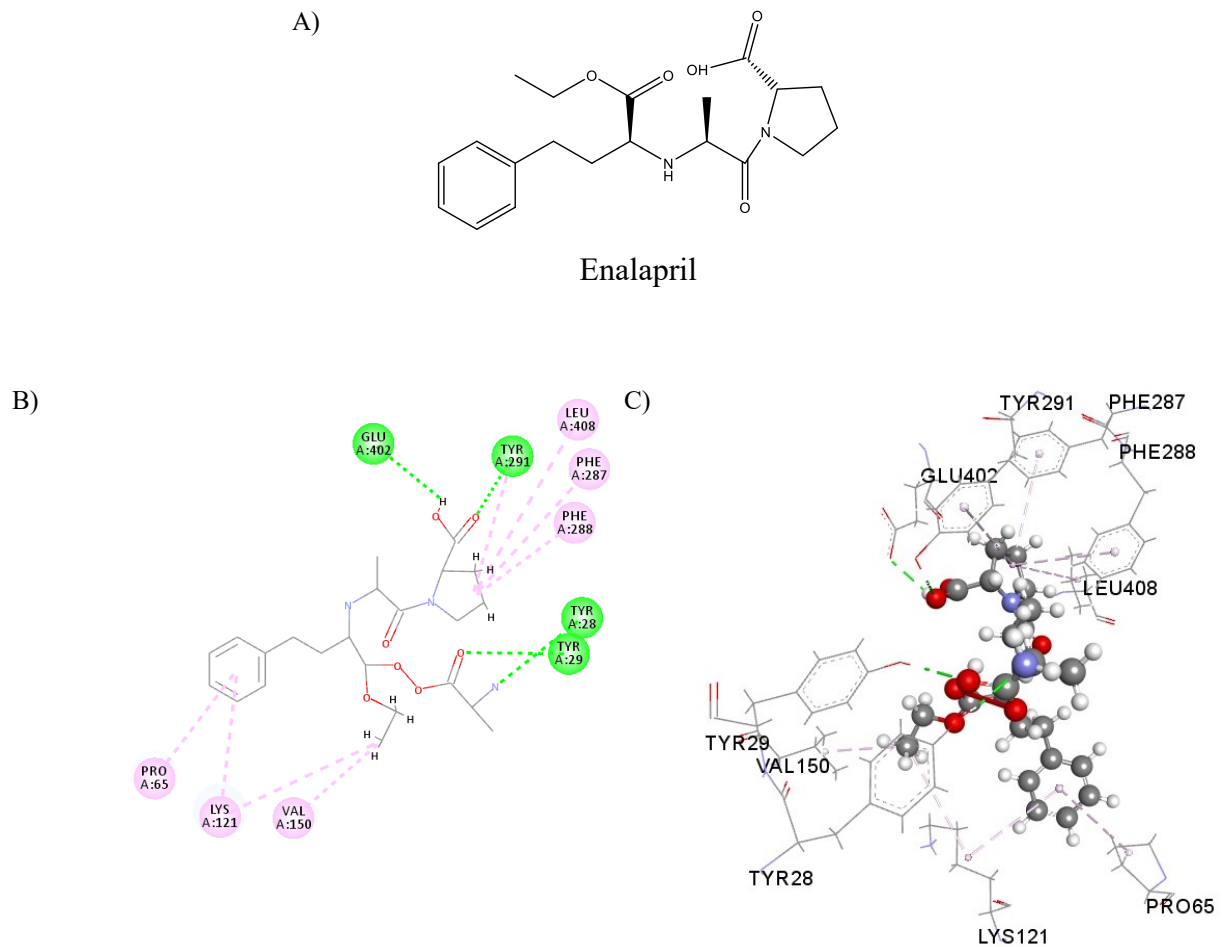
O PEPT1 é apto a transportar fármacos peptideomiméticos e di e tripeptídeos oriundos da dieta. Após a etapa de validação do docking, foram utilizados os mesmos parâmetros para avaliar os resíduos de interação dos fármacos enalapril e valaciclovir com o transportador de membrana (RUBIO-ALIAGA & DANIEL, 2002).

Primeiramente foi analisada a molécula de enalapril. O resíduo de Glu402 realiza interações de hidrogênio a uma distância de 2,33Å com a hidroxila do ácido carboxílico, o resíduo de Tyr291 interage com a carbonila do mesmo ácido a uma distância de 2,16Å e interage com a amina cíclica por ligação tipo π - alquil. O resíduo Tyr28 interage por ligação de hidrogênio com a amina a uma distância de 2,15Å, por sua vez o resíduo de Tyr29 interage com o éster a uma distância de 2,10Å. Os resíduos Pro65, Lis121, Val150 realizam interação tipo π -alquil com o anel aromático do enalapril. Por último, os resíduos Leu408, Phe287 e Phe288 realizam interações tipo π - alquil com a amina cíclica.

Foi possível observar que os resíduos que interagem e compõem o sítio ativo do PEPT1 são: Glu402, Tyr291, Phe287 e 288, Tyr28 e 29, Lys121 e Pro65. Ainda, dentre as interações encontradas no enalapril, os resíduos de aminoácidos Glu402, Phe287, Phe288, Tyr291, Val150, Tyr29 apresentaram interações com o transportador nos estudos de validação do *docking*.

Na figura 10 é possível observar a estrutura química do enalapril (A), bem como as representações bidimensional (B) e tridimensional (C) das principais interações enalapril-transportador.

Figura 10. Enalapril



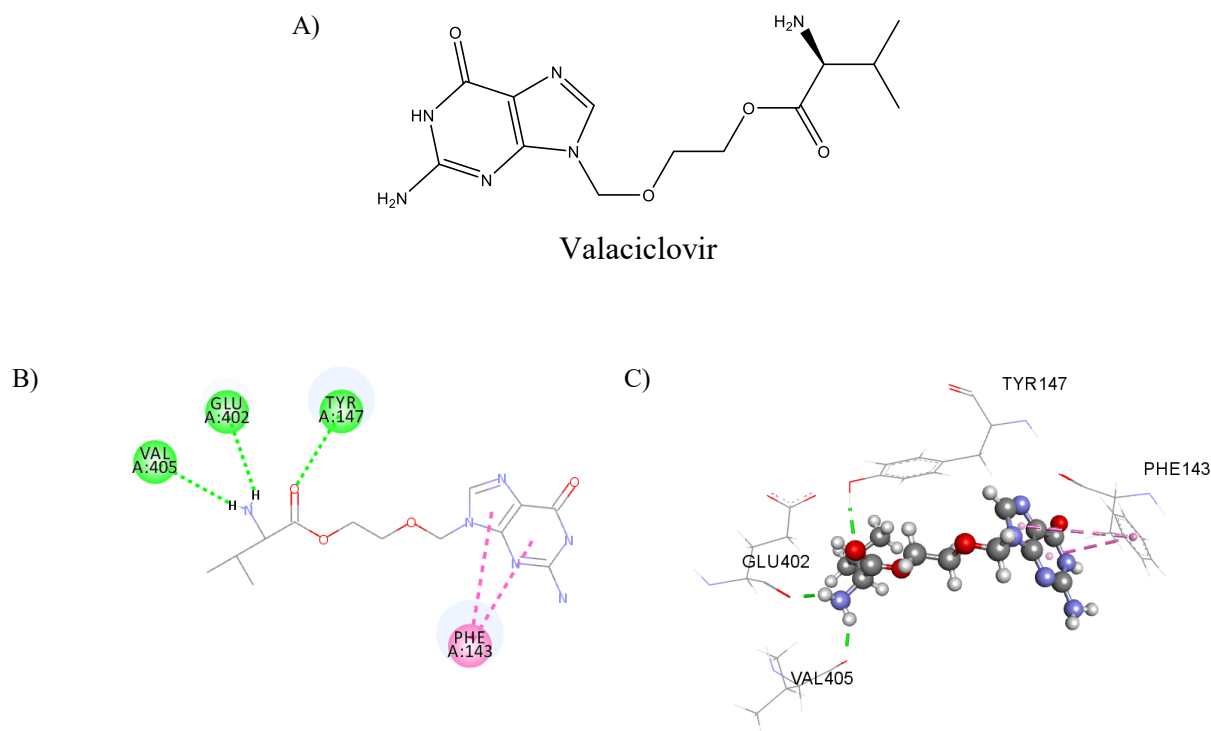
Valaciclovir

Foram avaliadas também as interações do outro fármaco relatado na literatura, o valaciclovir. O éster da molécula de valaciclovir realiza interação de hidrogênio com o resíduo de Tyr147 a uma distância de 2,07 Å. A amina terminal realiza interação de hidrogênio com o resíduo Glu402 a uma distância de 1,90 Å e também com o resíduo Val405 a distância de 1,97. Por último, o resíduo Phe143 realiza interação do tipo π stacked com o imidazol e também com a pirimidina.

Ao avaliar as interações do valaciclovir com o transportador PEPT1, foi possível observar que os resíduos Glu402 e Tyr147 compõem o sítio ativo da molécula alvo. A molécula de valaciclovir preparada para os estudos de *docking* molecular apresentou em comum com os resultados do redocking os resíduos Tyr147, Glu402 e Val405.

Na figura 11 é possível observar a estrutura química (A) do valaciclovir, bem como as representações bidimensional (B) e tridimensional (C) das interações valaciclovir-transportador.

Figura 11. Valaciclovir



4.1.2 Análise dos derivados isoxazólicos série A

A função *fitness score* do software GOLD é composta dos seguintes parâmetros: energia de interação de hidrogênio proteína – ligante (ligação de hidrogênio externa), interações de van der Waals proteína – ligante (interação de Vdw externas); interações de van der Waals internas e energia de tensão do ligante (GOLD configuration file user guide, 2019).

Baseado na função *fitness score*, o GOLD determina a afinidade do ligante com o receptor. Os vinte aminoácidos acoplados individualmente ao isoxazol foram avaliados. Como pode ser observado na tabela 6 abaixo, o derivado isoxazólico da série A ligado ao triptofano possui o maior valor de *score*: 91,29.

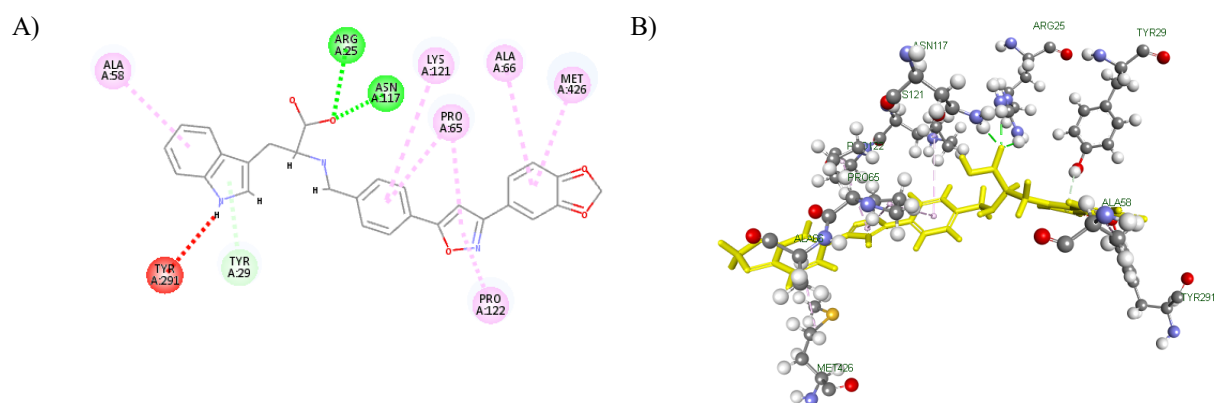
Tabela 6: Score dos derivados isoxazólicos série A

Aminoácido	Score	Aminoácido	Score
Triptofano	91.29	Asparagina	77.97
Tirosina	89.74	Isoleucina	76.17
Fenilalanina	86.78	Treonina	75.68
Arginina	86.11	Ácido aspártico	73.24
Leucina	84.67	Cisteína	73.18
Metionina	84.46	Valina	72.84
Lisina	83.28	Serina	71.89
Histidina	82.50	Prolina	68.90
Glutamina	80.79	Alanina	67.51
Ácido glutâmico	79.61	Glicina	66.19

Todos os vinte derivados foram analisados de forma individual, tendo seus resíduos de interação comparados com os resíduos encontrados nos resultados de redocking e com o sítio ativo do receptor. As descrições se encontram a seguir:

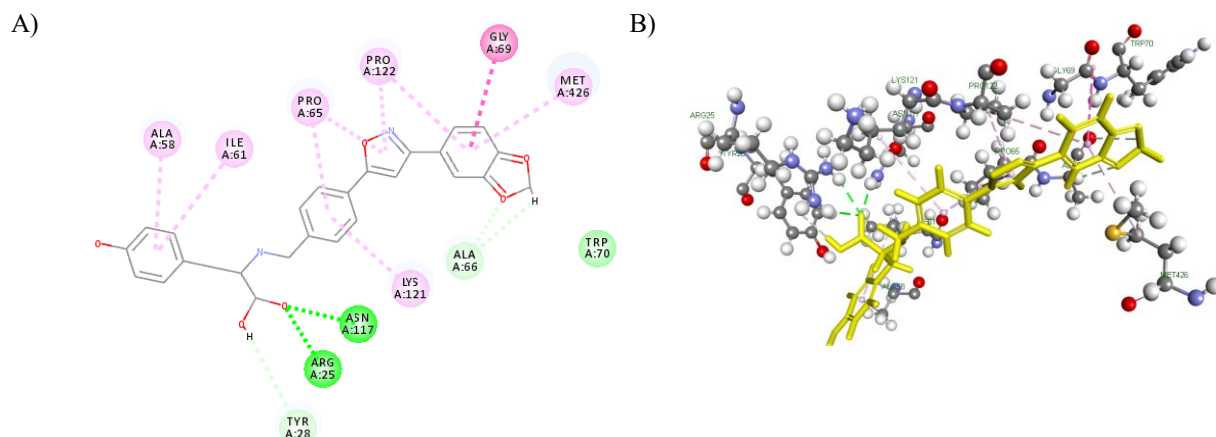
Derivado isoxazol triptofano: A porção ácida do triptofano realiza ligação de hidrogênio com o aminoácido Arg25 com distância de 2,10 Å, e ligação de hidrogênio com o aminoácido asparagina 117 com uma distância de 1,62 Å. O resíduo Tyr29 interage com a porção pirrol do triptofano e o resíduo Ala58 interage com o anel aromático da porção triptofano da molécula. O resíduo Tyr291 realiza interação não favorável, pois o hidrogênio ligado ao átomo de oxigênio do resíduo Tyr291 faz ligação não favorável com o nitrogênio do anel pirrol da porção triptofano da molécula. Os resíduos Lys121 e Pro65 interagem com o anel aromático da porção isoxazol por ligação pi-alquil. Além dessa interação, o resíduo Pro65 assim como o resíduo Pro122 interagem com a porção isoxazol da molécula. Os resíduos Ala66 e Met426 realizam interação com o anel aromático ligado a porção metilenodioxí (Figura 12).

Figura 12: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol triptofano e o transportador PEPT1.



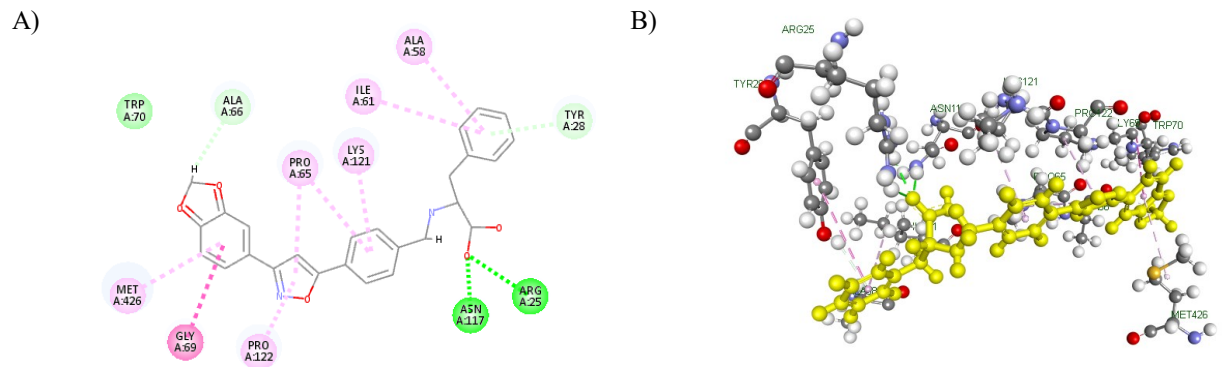
Derivado isoxazol tirosina: apresenta a porção ácido do aminoácido realizando ligação de hidrogênio com o aminoácido Asn117 a uma distância de 2,01 Å e duas ligações de H com o aminoácido Arg25 com distâncias de 2,41 e 2,07 Å. Os resíduos Ala58 e Ile61 realizam interação do tipo π -alquil com o anel aromático da porção aminoácido. Já o resíduo Tyr28 interage com a porção ácido da tirosina por ligação carbono-hidrogênio. A Lys121 interage com o anel aromático da porção isoxazol, assim como o resíduo Pro65. Esse resíduo interage, ainda, com o anel isoxazólico, assim como o resíduo Pro122. Esse mesmo resíduo de Pro122 com ligação π -alquil, assim como os resíduos Gly69 com ligação π -amida e o resíduo Met426 por ligação π -alquil interagem com o anel aromático ligado ao metilenodioxí. Ainda, o resíduo Ala66 interage com a porção metilenodioxí como doador de hidrogênio. Por último, o resíduo Trp70 realiza interação de van der waals. Os resíduos de aminoácido Arg25, Pro65 e Tyr28 realizam interação com a molécula alvo e fazem parte do seu sítio ativo.

Figura 13: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol tirosina e o transportador PEPT1.



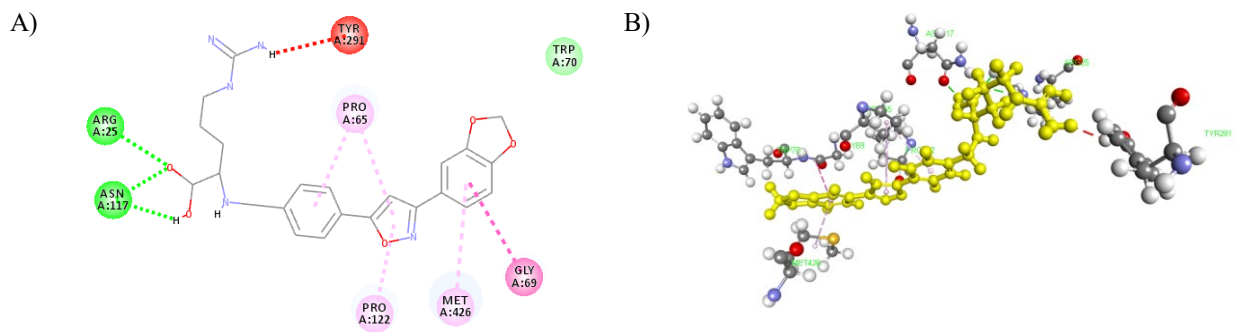
Derivado isoxazol fenilalanina: a porção ácido do aminoácido realiza interações de hidrogênio com o resíduo Arg 25 a uma distância de 2,25 e 2,01Å e com o resíduo Asn117 a uma distância de 1,87. O resíduo Tyr28 realiza interação do tipo carbono hidrogênio com o anel aromático do aminoácido fenilalanina, assim como os resíduos Ala58 e Ile61, que por sua vez, interagem por ligação tipo π -alquil. Os resíduos Lys121 e Pro65 realizam interação tipo π -alquil com o anel aromático do isoxazol. O resíduo Pro65, interage, ainda, com o anel isoxazol por ligação π -alquil, assim como o resíduo Pro122. Já o resíduo Gly69 interage com o anel aromático ligado ao metilenodioxí por ligação tipo π -amida e o resíduo Met426 interage com o mesmo anel por ligação π -alquil. Por sua vez, o resíduo Ala66 interage com o hidrogênio do metileno do grupo metilenodioxí. Por último o resíduo Trp70 faz interação de van der waals com a porção isoxazol do derivado. Dentre as interações encontradas, os aminoácidos Arg25 e Pro65 são resíduos que fazem parte do sítio ativo do transportador PEPT1.

Figura 14: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol fenilalanina e o transportador PEPT1.



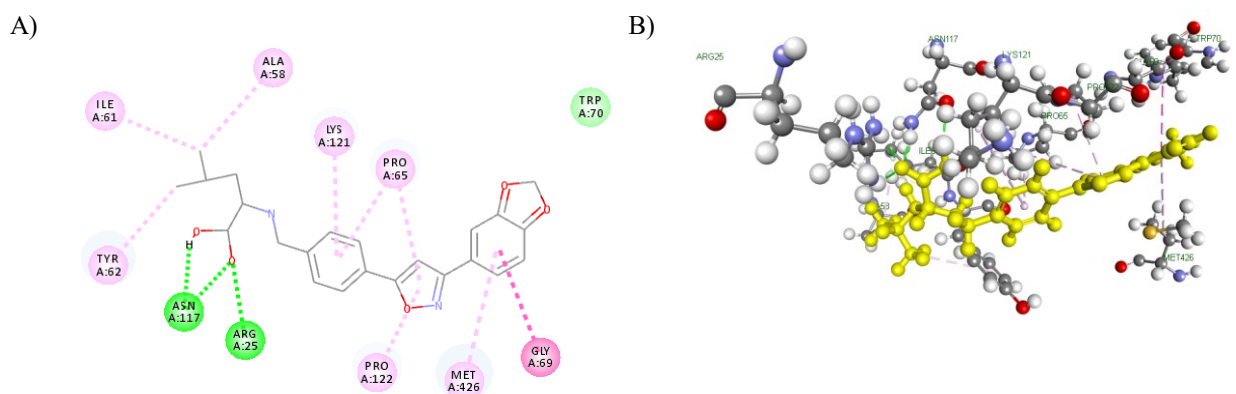
Derivado isoxazol arginina: o terminal ácido da porção aminoácido realiza interação de hidrogênio com o resíduo de Arg25 com distâncias de 2,15 e 2,11Å e com o resíduo de Asn117 com distâncias de 1,61 e 2,01Å. O resíduo pro65 interage com o anel aromático e com o anel isoxazol por ligação do tipo π . O resíduo pro122 interage com o anel isoxazol por ligação tipo π . Os resíduos Met426 e Gly69 interagem com o anel aromático ligado ao metilenodioxi da porção isoxazol por meio de ligação tipo π . Por último o resíduo Trp70 faz interação de van der waals com a porção aminoácido da molécula. O resíduo tyr291 realiza interação não favorável com o hidrogênio da amina do aminoácido arginina acoplado ao isoxazol. Os resíduos de aminoácido Arg25 e Pro65 estão inseridos no sítio ativo da molécula alvo.

Figura 15: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol arginina e o transportador PEPT1.



Derivado isoxazólico leucina: o terminal ácido da porção leucina realiza interação de hidrogênio com o resíduo Asn117 com distâncias de 2,29 e 1,61Å e com o resíduo Arg25 com distâncias 2,06 e 2,09Å. Os resíduos Ala58, Ile61 e Tyr62 realizam interação tipo alquil com a cadeia lateral da porção aminoácido da molécula. Os resíduos Lys121 e Pro65 realizam interação tipo π -alquil com o anel aromático do derivado isoxazólico. O resíduo Pro65 realiza, ainda, interação com o anel isoxazol por ligação π -alquil, assim como o resíduo Pro122. Já os resíduos Met426 e Gly69 interagem com o anel aromático ligado ao metilenodioxí por ligação tipo π . Por último, o resíduo Trp70 faz interação de van der waals com a porção isoxazol da molécula. Os aminoácidos Arg25 e Pro65 são resíduos encontrados no sítio ativo do transportador PEPT1.

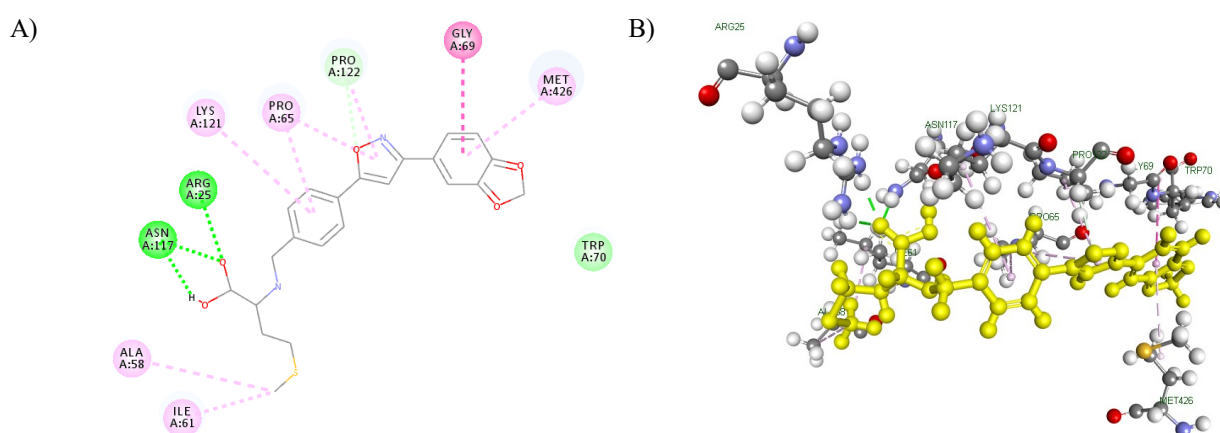
Figura 16: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol leucina e o transportador PEPT1.



Derivado isoxazol metionina: o terminal ácido da porção metionina realiza interação de hidrogênio com o resíduo Arg25 com distância de 2,10Å e com o resíduo Asn117 com distância de 1,59 e 2,20Å. Os resíduos Ala58 e Ile61 interagem por ligação tipo alquil com a

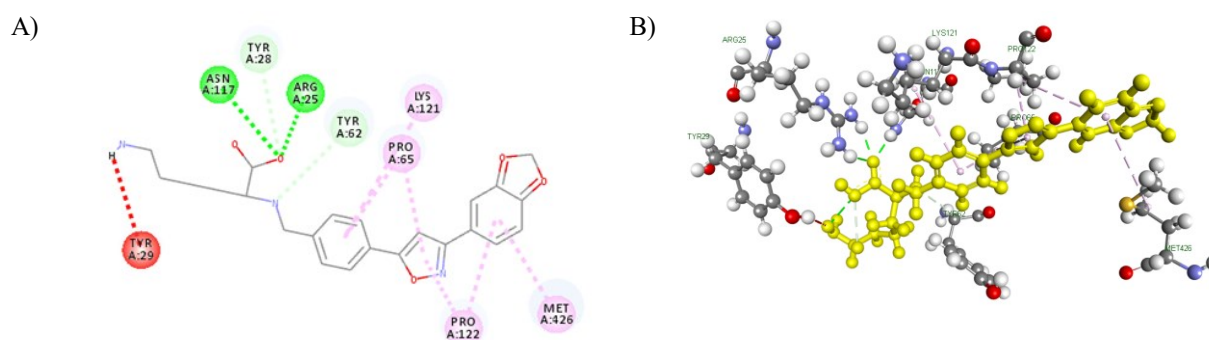
cadeia lateral do aminoácido metionina. Os resíduos Lys121 e Pro65 realizam interação tipo π -alquil com o anel aromático do isoxazol. O resíduo Pro65 faz, ainda, interação com o anel isoxazol por ligação tipo π -alquil. Novamente com o anel isoxazol, o resíduo Pro122 interage por ligação carbono hidrogênio. O resíduo Gly69 interage com o anel aromático ligado ao metilenodioxí por ligação tipo π -amida, já o resíduo Met426 interage com a mesma porção por ligação tipo π -alquil. Por último, o resíduo Trp70 realiza interação de van der Waals com a porção isoxazol. Os resíduos Arg25 e Pro65 fazem parte do sítio ativo da molécula alvo.

Figura 17: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol metionina e o transportador PEPT1.



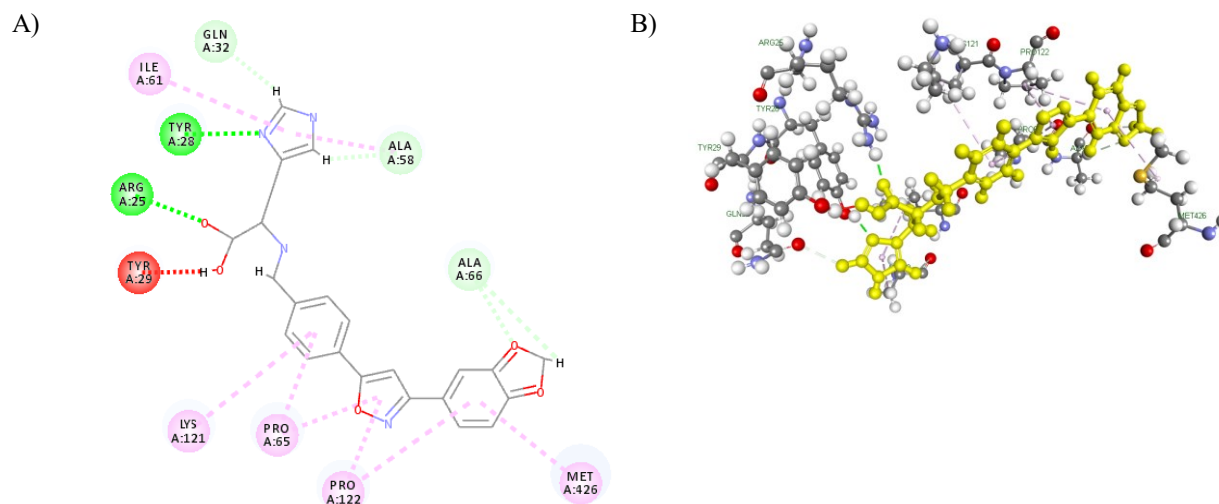
Derivado isoxazol lisina: apresenta o terminal ácido realizando interação de hidrogênio com o resíduo Arg25 com distâncias de 2,12 e 1,85Å e com o resíduo Asn117 com distância de 1,99Å. O resíduo Tyr28 por sua vez, interage com a mesma porção com ligação tipo carbono hidrogênio. O resíduo Tyr62 faz ligação carbono hidrogênio com a amina do aminoácido acoplado. Os resíduos Pro65 e Lys121 realizam interação tipo π -alquil com o anel aromático da porção isoxazol. O resíduo Pro65 realiza, ainda, interação tipo π -alquil com o anel isoxazol, da mesma forma que o resíduo Pro122. Por último, o resíduo Met426 e novamente o resíduo Pro122 fazem interação tipo π -alquil com o anel aromático ligado a porção metilenodioxí da molécula. Com um score de 83,28, o derivado acoplado ao aminoácido lisina apresenta quatro resíduos de interação encontrados no sítio ativo do alvo molecular: Arg25, Pro65, Tyr28 e Tyr62.

Figura 18: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol lisina e o transportador PEPT1.



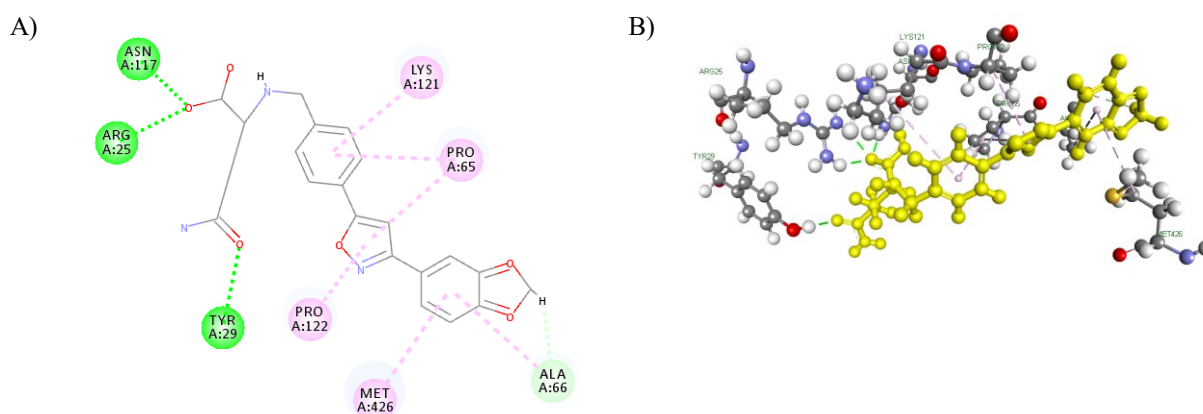
Derivado isoxazol histidina: O resíduo Arg25 realiza interação de hidrogênio a uma distância de 1,80Å com a porção ácido do aminoácido, já o resíduo Tyr28 realiza interação de hidrogênio com o nitrogênio do anel imidazol da histidina a uma distância de 2,11Å. Com o anel imidazol da histidina, o resíduo Ile61 interage por ligação tipo π -alquil, o resíduo Gln32 por ligação carbono hidrogênio assim como o resíduo Ala58. Os resíduos Lys121 e Pro65 interagem com o anel aromático da porção isoxazol por ligação tipo π -alquil. Com o anel isoxazol, o resíduo Pro65 e Pro122 interagem por ligação tipo π -alquil. Já o resíduo Met426 e novamente o resíduo Pro122 interagem com o anel aromático ligado ao metilenodioxí por ligação tipo π -alquil. Por último, o resíduo Ala66 faz interação com o metilenodioxí por ligação carbono hidrogênio. O hidrogênio da porção ácido do resíduo Tyr29 faz uma interação não favorável com hidrogênio do ácido carboxílico da porção histidina. Esse resíduo é encontrado nas interações do redocking interagindo através de ligação de hidrogênio com a porção amina da alanina, como o derivado isoxazólico está acoplado à histidina pela porção amina, tendo apenas o terminal ácido livre, a ausência da amina e conformação espacial da molécula podem provocar a interação não favorável. Nesse derivado isoxazólico é possível observar que os resíduos de aminoácido Arg25, Tyr28 e Pro65 fazem parte do sítio ativo da molécula alvo.

Figura 19: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol histidina e o transportador PEPT1.



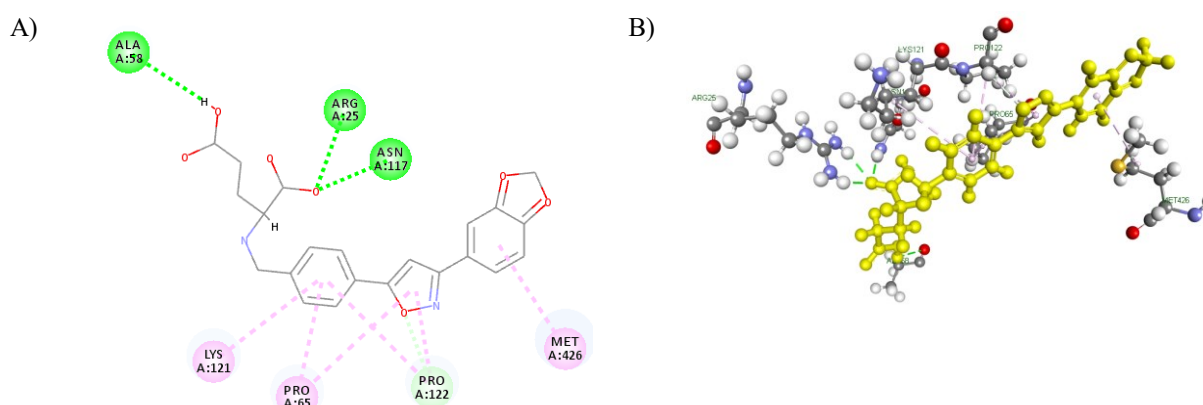
Derivado isoxazol glutamina: apresenta o terminal ácido da porção aminoácido realizando interação de hidrogênio com o resíduo Asn117 com uma distância de 1,62Å, com o resíduo Arg25 com distâncias de 2,10 e 2,11Å; já o resíduo Tyr29 faz interação de hidrogênio com a amida da porção aminoácido da molécula com distância de 2,12Å. Os resíduos Lys121 e Pro65 interagem por ligação tipo π -alquil com o anel aromático. Os resíduos Pro65 e Pro122 interagem diretamente com o anel isoxazol por ligação tipo π -alquil. Por sua vez, os resíduos Met426 e Ala66 interagem com o anel aromático ligado ao metilenodioxí por ligação tipo π -alquil. Por último, o resíduo Ala66 interage por ligação tipo carbono hidrogênio com o metilenodioxí da porção isoxazol da molécula. Foi observado que os resíduos Arg25, Tyr29 e Pro65 são encontrados no sítio ativo do transportador PEPT1.

Figura 20: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol glutamina e o transportador PEPT1.



Derivado isoxazol glutamato: a cadeia lateral ácida da porção aminoácido realiza interações de hidrogênio com o resíduo Ala58 a uma distância de 2,51Å, já o resíduo Arg25 com distância de 1,95 Å e o resíduo Ans117 com distância de 1,92Å interagem com o terminal ácido do glutamato. Os resíduos Pro65, pro122 e Lys121 realizam interação tipo π -alquil com o anel aromático do isoxazol. Por sua vez, os resíduos Pro65 e pro122 interagem com o anel isoxazol por ligação tipo π -alquil. É possível observar, ainda, que o resíduo Pro65 está ligado ao oxigênio do anel isoxazol como doador de ligação de hidrogênio. Ainda, o resíduo Met426 interage com o anel aromático ligado ao metilenodioxí por ligação do tipo π -alquil. Os resíduos Arg25 e Pro65 fazem parte do sítio ativo da molécula alvo.

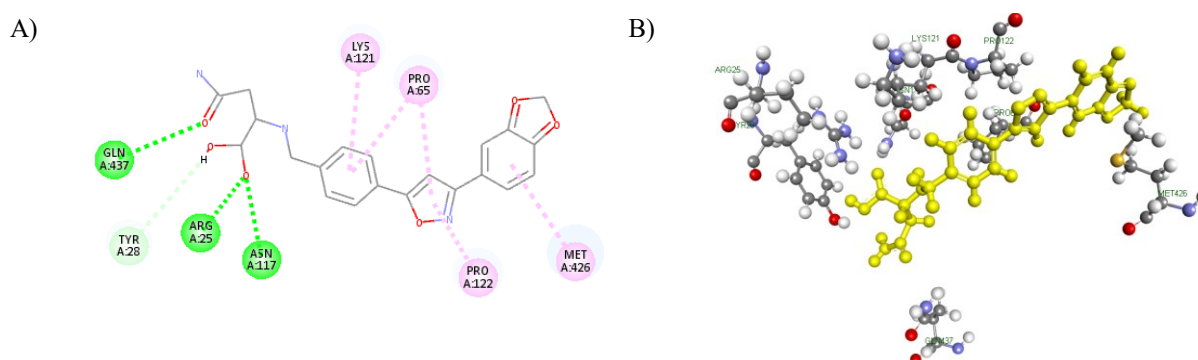
Figura 21: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol glutamato e o transportador PEPT1.



Derivado isoxazol asparagina: apresenta a amida da porção aminoácido com interação de hidrogênio com o resíduo de Gln437 com distância de 2,93Å, já o resíduo Arg25 com

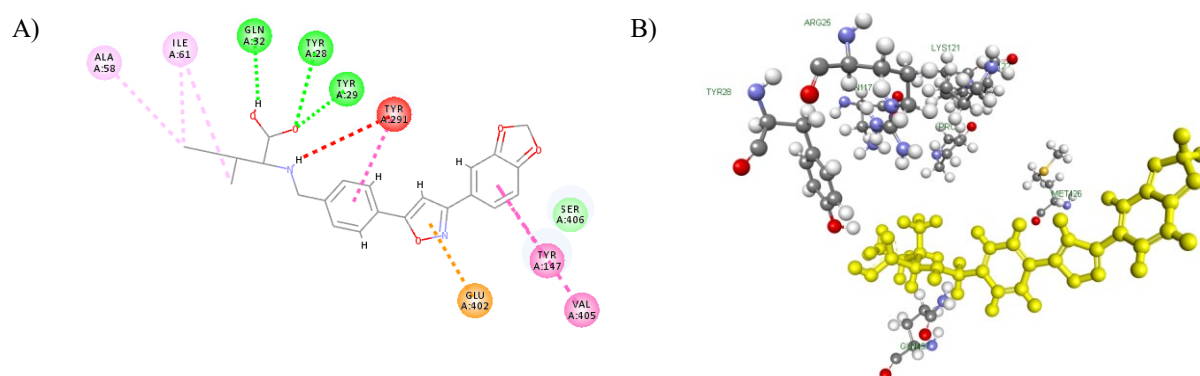
distância de 1,88 Å e o resíduo Asn117 com distância de 2,07Å interagem com a porção ácido da asparagina. O resíduo Tyr28 realiza interação carbono hidrogênio com a porção ácido também da asparagina. Os resíduos Lys121 e Pro65 realizam interação tipo π -alquil com o anel aromático do isoxazol. O resíduo Pro65 faz, ainda, interação tipo π -alquil com o anel isoxazol, assim como resíduo Pro122. Por último o resíduo Met426 interage por ligação tipo π -alquil com o anel aromático ligado ao metilenodioxí. Os resíduos de aminoácido Tyr28 e Arg25 fazem parte do sítio ativo do transportador PEPT1.

Figura 22: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol asparagina e o transportador PEPT1.



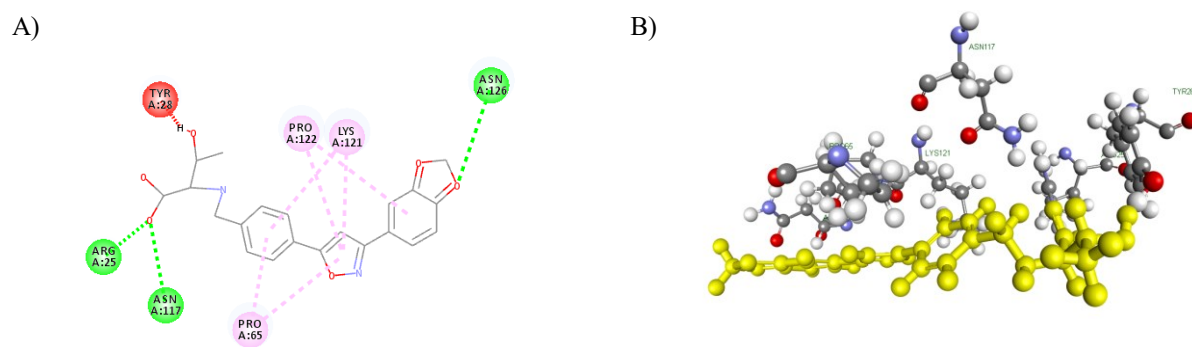
Derivado isoxazol isoleucina: Nesse derivado a porção ácido do aminoácido realiza interação de hidrogênio com o resíduo Gln32 a uma distância de 1,99Å, com o resíduo de Tyr28 a uma distância de 2,21Å e com o resíduo de Tyr29 com distância de 2,10Å. Os resíduos Ala58 e Ile61 interagem com a cadeia lateral da isoleucina por ligação do tipo alquil. O resíduo Tyr291 interage com o anel aromático do isoxazol por ligação do tipo π -amida. Contudo, esse mesmo resíduo faz uma interação não favorável com o hidrogênio do terminal amina da isoleucina. O resíduo Glu402 interage com o anel isoxazol com ligação do tipo π . Por sua vez, os resíduos Tyr147 e Val405 interagem com o anel aromático ligado ao metilenodioxí. Por último o resíduo Ser405 faz interação de van der waals com a porção isoxazol. Os resíduos Tyr28 e Tyr29 fazem parte do sítio ativo da molécula alvo, assim como os resíduos Tyr147, Glu402 e Ser406 que, pela primeira vez dentre os derivados analisados, aparecem realizando interações com o derivado isoxazol.

Figura 23: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol isoleucina e o transportador PEPT1.



Derivado isoxazol treonina: o terminal ácido da porção aminoácido apresenta interação de hidrogênio com o resíduo Arg25 com distâncias de 1,78 e 1,83Å, com o resíduo Asn117 a uma distância de 2,74Å. O grupo metilenodióxi da porção isoxazol realiza interação de hidrogênio com o resíduo Asn116 a uma distância de 3,05Å. Os resíduos Pro122, Pro65 e Lys121 realizam interações tipo π – alquil com a porção isoxazol. O resíduo Tyr28 realiza interação não favorável com o grupo hidroxila da porção treonina da molécula. Os resíduos Arg25 e Pro65 fazem parte do sítio ativo do transportador PEPT1.

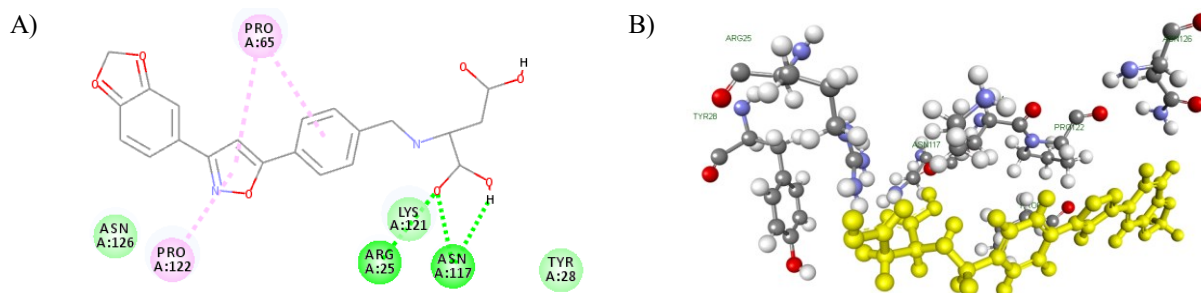
Figura 24: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol treonina e o transportador PEPT1.



Derivado isoxazol aspartato: tem sua porção aminoácido realizando interações de hidrogênio com o resíduo Arg25 com distâncias de 2,10 e 2,11Å e com o resíduo asn117 com distâncias de 1,60 e 2,11Å, ambos com a cadeia lateral ácida do aminoácido aspartato. O resíduo Lys121 realiza interação do tipo doador de hidrogênio com o oxigênio da cadeia lateral ácida do aminoácido. O resíduo Tyr28 interage por forças de van der waals com a porção aminoácido. Ocorre, ainda, interação do resíduo Pro65 com o anel aromático do isoxazol e também com o anel isoxazol, ambos os casos por ligação do tipo π - alquil. Resíduo Pro122

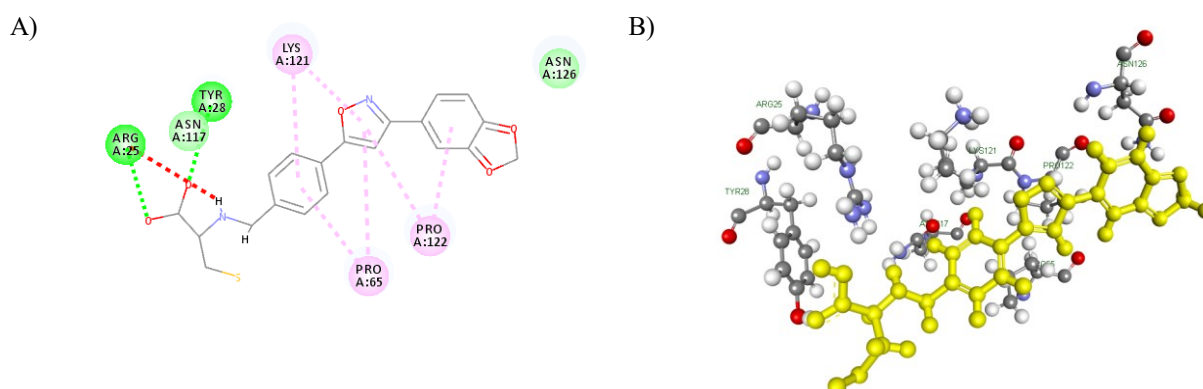
interage com o anel isoxazol também por ligação do tipo π -alquil. Por último, o resíduo Asn126 realiza interação de van der waals com a porção isoxazol da molécula. Dentre os resíduos de interações encontrados, os aminoácidos Arg25 e Pro65 fazem parte do sítio ativo da molécula alvo.

Figura 25: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol aspartato e o transportador PEPT1.



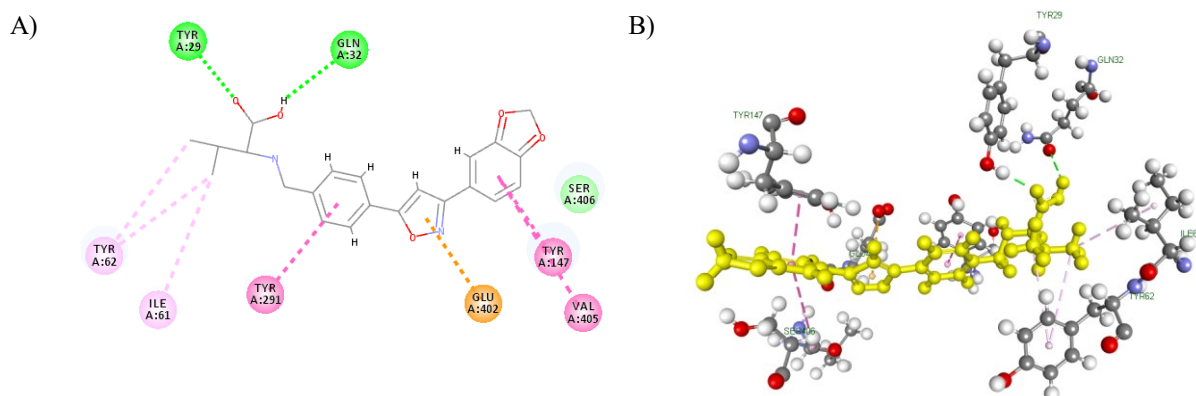
Derivado isoxazol cisteína: o terminal ácido da porção aminoácido realiza interação de hidrogênio com o resíduo Arg25 com distância de 2,12Å e com o resíduo Tyr28 com uma distância 2,12Å. É possível observar que o hidrogênio da porção amina do resíduo Arg25 faz interação não favorável com o hidrogênio também da porção amina terminal do aminoácido cisteína acoplado ao isoxazol. Os resíduos Lys121 e Pro65 realizam ambos interação do tipo π -alquil com o anel aromático do isoxazol e, ainda, com o anel isoxazol. O resíduo Pro122 por sua vez, realiza interação do tipo π -alquil com o anel aromático ligado ao metilenodioxí. Por último, o resíduo Ans126 faz interação de van der waals com a porção isoxazol da molécula. Os resíduos Arg25, Tyr29, Tyr28, Pro65 e Ile61 são encontrados no sítio ativo do transportador PEPT1. Esse derivado apresentou, junto com o derivado isoleucina, o maior número de resíduos de interação em comum com os resíduos encontrados no transportador.

Figura 26: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol cisteína e o transportador PEPT1.



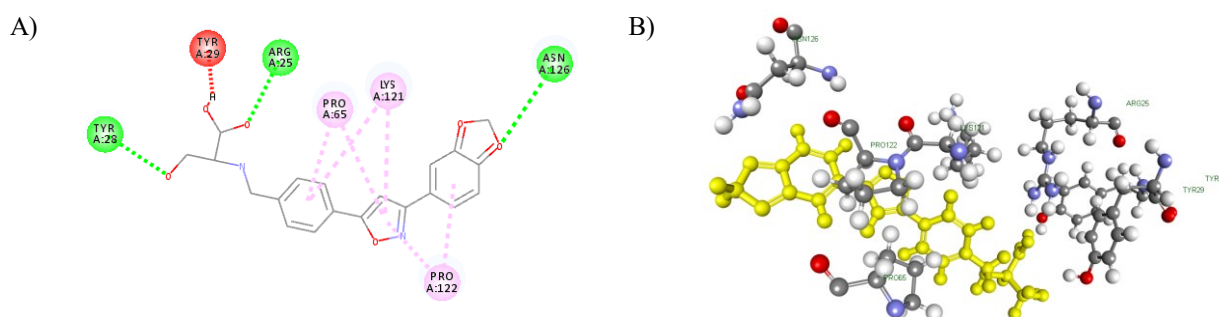
Derivado isoxazol valina: possui o terminal ácido do aminoácido realizando interação de hidrogênio com o resíduo Tyr29 a uma distância de 2,07Å e com o resíduo de Gln32 a uma distância de 2,58Å. A cadeia lateral da valina interage com os resíduos de aminoácido Tyr62 e Ile61 por ligação tipo π -alquil. O resíduo Tyr291 realiza interação do tipo π -amida com o anel aromático do isoxazol. Já o aminoácido Glu402 interage com o anel isoxazol por ligação tipo π -ânion. Os resíduos Tyr147 e Val405 interagem com o anel aromático ligado ao metilenodioxí por ligação do tipo π -amida. Por último, o resíduo Ser406 realiza interação de van der waals com a porção isoxazol. Ao avaliar as interações apresentadas por esse derivado isoxazol acoplado à valina, foi observado que os resíduos de aminoácido Tyr291, Tyr147, Tyr62, Tyr29, Ile61 e Ser406 fazem parte do sítio ativo do transportador PEPT1. Assim, esse é o derivado isoxazólico dessa série com o maior número de interações com o sítio ativo do receptor. Contudo, o seu *score* foi de 72.84, o que mais uma vez ressalta que outros fatores devem ser levados em conta para determinar a afinidade de ligação entre o alvo molecular e o ligante, e não apenas a quantidade de resíduos de interação em comum com o sítio ativo da molécula alvo.

Figura 27: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol valina e o transportador PEPT1.



Derivado isoxazol serina: o terminal ácido da porção aminoácido realiza interação de hidrogênio com o resíduo Arg25 a uma distância de 2,07Å, já a hidroxila da cadeia lateral interage por ligação de hidrogênio com o resíduo Tyr28 com uma distância de 2,07Å. O resíduo Tyr29 possui um hidrogênio ligado ao oxigênio do anel aromático realizando interação não favorável com o hidrogênio ligado ao oxigênio da porção ácida do aminoácido serina acoplado ao isoxazol. Por sua vez, os resíduos Pro65 e Lys121 interagem ambos com anel aromático e com o anel isoxazol por ligação do tipo π -alquil. O resíduo Pro122 interage com o anel isoxazol e, ainda, com o anel aromático ligado ao metilenodioxí. Há, ainda, o resíduo Asn126, o qual faz ligação de hidrogênio com o oxigênio da porção metilenodioxí do isoxazol com distância de 3,05Å. Os resíduos Arg25, Tyr28, e Pro65 compõem o sítio ativo do transportador PEPT1.

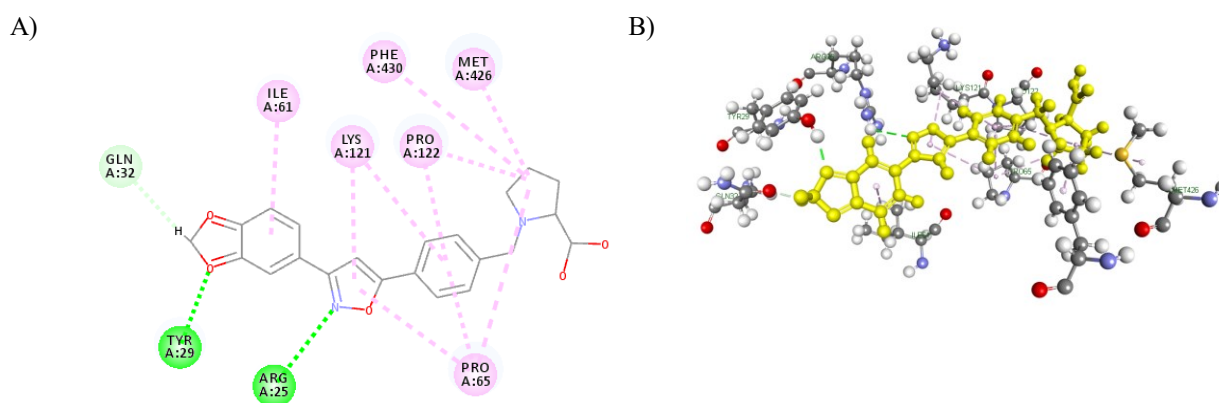
Figura 28: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol serina e o transportador PEPT1.



Derivado isoxazol prolina: o resíduo Tyr29 realiza interação de hidrogênio com a porção metilenodioxí a uma distância de 2,07Å, o resíduo Gln32 realiza interação tipo carbono hidrogênio com o metileno da mesma porção metilenodioxí, já o resíduo Arg25 realiza interação de hidrogênio com distância de 2,09Å com o nitrogênio do anel isoxazol. O resíduo

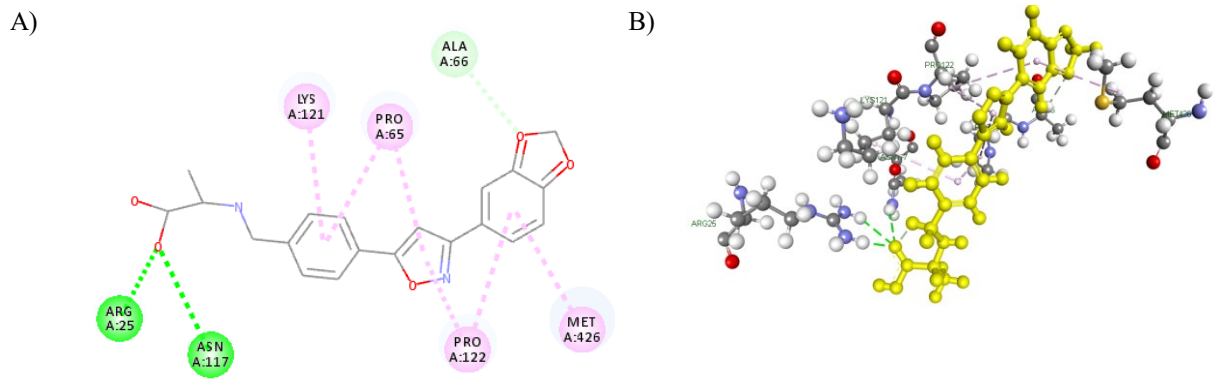
Ile61 interage com o anel aromático da prolina por ligação tipo π -alquil. Os resíduos Lys121, Pro65 e Pro122 interagem com o anel aromático do isoxazol e, ainda, com o anel isoxazol através de ligação tipo π . O anel amina da prolina interage, ainda, com os resíduos Pro122, Phe430, Met426 e Pro65, todos por meio de ligação do tipo π . Os resíduos Tyr29, Arg25, Pro65, Phe430 e Ile61 fazem parte do sítio ativo da molécula alvo.

Figura 29: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol prolina e o transportador PEPT1.



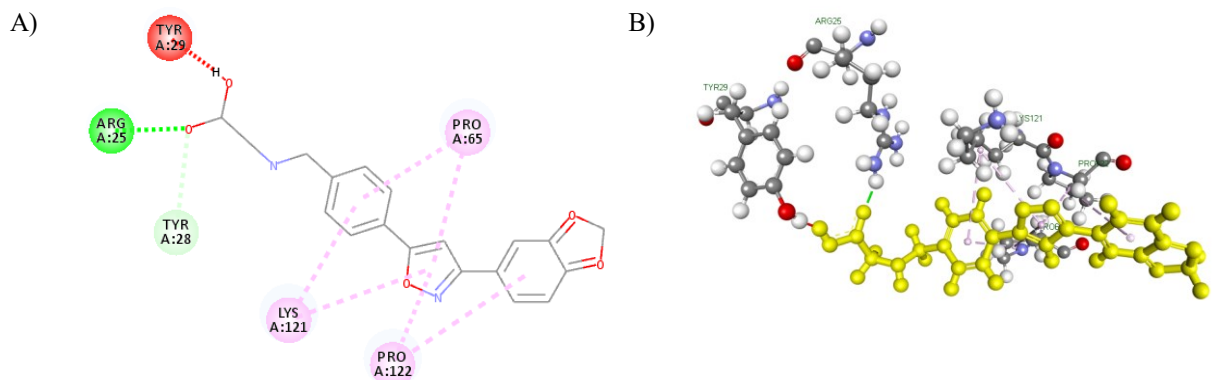
Derivado isoxazol alanina: o terminal ácido da porção aminoácido realiza interação de hidrogênio com o resíduo Arg25 com distâncias de 1,87 e 1,92Å e com o resíduo de Asn117 com uma distância de 2,76Å. O resíduo Ays121 interage com o anel aromático do isoxazol por ligação do tipo π . Já o resíduo Pro65 realiza interação do tipo π com o anel aromático do isoxazol e com o anel isoxazol, assim como o resíduo Pro122, que interage, ainda com o anel aromático ligado ao metilenodioxí. Já o resíduo Met426 interage com o metilenodioxí por ligação do tipo π . O resíduo Ala66 interage com o metilenodioxí por ligação carbono hidrogênio. Nesse caso apenas os resíduos Arg25 e Pro65 fazem parte do sítio ativo do transportador PEPT1.

Figura 30: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol alanina e o transportador PEPT1.



Derivado isoxazol glicina: o terminal ácido da porção aminoácido realiza interação e hidrogênio com o resíduo de Arg25 com uma distância de 1,73Å. O resíduo Tyr28 também interage com o terminal ácido da glicina por meio de interação de hidrogênio. Os resíduos Lys121 e Pro65 interagem com o anel aromático do isoxazol e com o anel isoxazol por meio de ligação do tipo π . Por sua vez, o resíduo Pro122 interage com o anel isoxazol e com o anel aromático ligado ao metilenodioxo por ligação do tipo π . Foi observado que os resíduos Arg25, Tyr28, Pro65 e Tyr29 compõem o sítio ativo da molécula alvo. É importante ressaltar que a interação não favorável do resíduo Tyr29 com o ácido carboxílico da glicina acoplada ao isoxazol pode ocorrer em função da configuração espacial da molécula obtida pelo processo de minimização de energia, ou, ainda, pelo derivado latenciado não estar ionizado (BAXTER et al., 1998).

Figura 31: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol glicina e o transportador PEPT1.



O *score* de afinidade do complexo ligante molécula alvo depende de fatores como tipos de interações moleculares que cada resíduo faz, sendo que as ligações de hidrogênio são as de maior energia e as forças de van der Waals de menor energia; é importante avaliar quais desses resíduos de aminoácido são resíduos do sítio ativo da molécula alvo, o que pode também contribuir para uma maior interação desse complexo (GOLD configuration file user guide, 2019; PATRICK, 2016).

Os derivados isoxazólicos planejados foram submetidos a processos antes da realização do *docking*, portanto, as interações ligante-receptor precisam compensar as mudanças de entropia provenientes da associação entre moléculas, como perda de energia translacional, graus de liberdade de rotação, redução nos padrões de rotação interna do ligante e da proteína e a reorganização das moléculas de água para a formação do complexo (CAVASOTTO, 2016).

Nos derivados da série A, pode-se observar que o derivado isoxazol triptofano obteve um maior *score* de afinidade com o transportador PEPT1, esse derivado interagiu com sete resíduos de aminoácidos da molécula alvo, dentre os quais cinco foram também encontrados na validação do *docking* e dois desses mesmos cinco, são resíduos de aminoácidos do sítio ativo do transportador PEPT1. Esses resultados foram obtidos utilizando a função *score* CHEMPLP, a qual é pré-definida como padrão no software GOLD por mostrar melhor desempenho na predição poses (GOLD configuration file user guide, 2019)

4.1.3 Análise dos derivados isoxazólicos série B

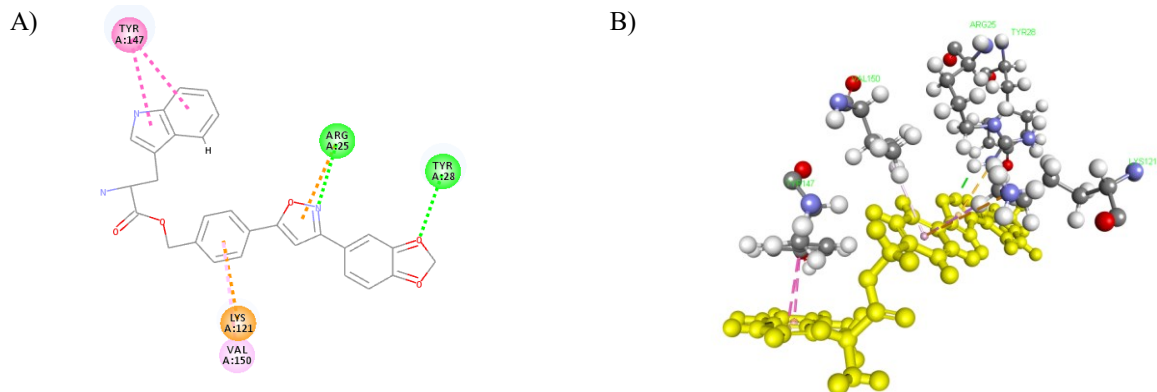
Os vinte derivados isoxazólicos série B foram analisados de forma individual, tendo seus resíduos de interação comparados com os resíduos encontrados nos resultados de redocking e com o sítio ativo do receptor. Os valores de *score* encontrados estão na tabela 6 e as descrições das interações se encontram a seguir:

Tabela 7: Score dos derivados isoxazólicos série B

Aminoácido	Score	Aminoácido	Score
Triptofano	85,63	Isoleucina	73,97
Fenilalanina	83,71	Leucina	73,91
Tirosina	82,27	Treonina	73,49
Ácido glutâmico	80,09	Asparagina	72,61
Histidina	79,64	Valina	72,47
Arginina	78,89	Prolina	70,57
Glutamina	76,09	Serina	70,28
Lisina	75,91	Cisteína	68,45
Ácido aspártico	74,80	Alanina	67,36
Metionina	74,34	Glicina	65,84

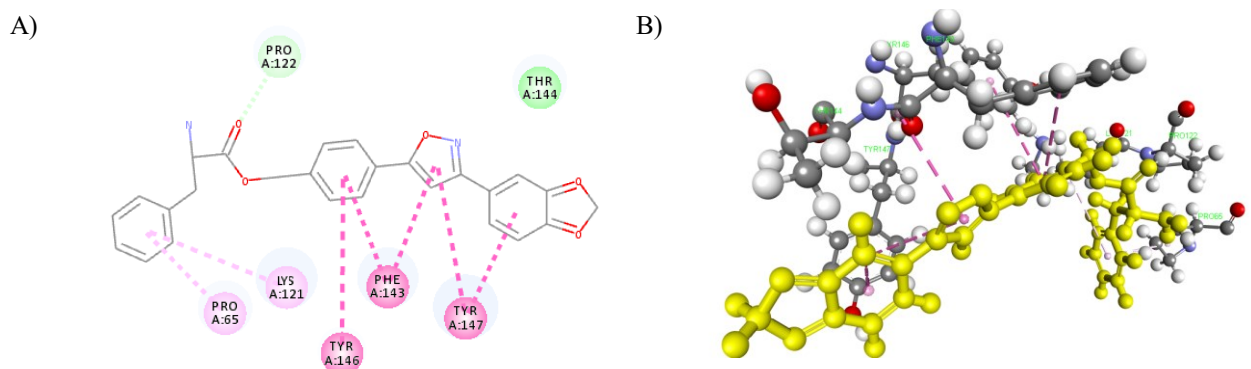
Derivado isoxazol triptofano: esse derivado também apresentou o maior score de energia de afinidade. Nesse derivado, o anel pirrol e o anel aromático da porção triptofano realiza interação tipo π stacked com o resíduo de Tyr147. Os resíduos Val150 e Lys121 interagem com o anel aromático do isoxazol por meio de ligação tipo π -alquil e ligação tipo cátion. O hidrogênio da amina do resíduo Arg25 realiza interação de hidrogênio com o nitrogênio do anel isoxazol a uma distância de 2,08Å, o terminal amina desse mesmo resíduo interage por meio de ligação tipo π cátion com o anel isoxazol. Por último, o resíduo Tyr28 realiza interação de hidrogênio com o oxigênio do metilenodioxo do isoxazol com distância de 2,08Å. O resíduo Tyr147 faz parte do sítio ativo do transportador PEPT1 e aparece realizando interação com a porção pirrol do aminoácido, o que não foi observado no mesmo derivado da série A. Os resíduos Arg25 e Tyr28 também compõem o sítio ativo do transportador.

Figura 32: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol triptofano da série B e o transportador PEPT1.



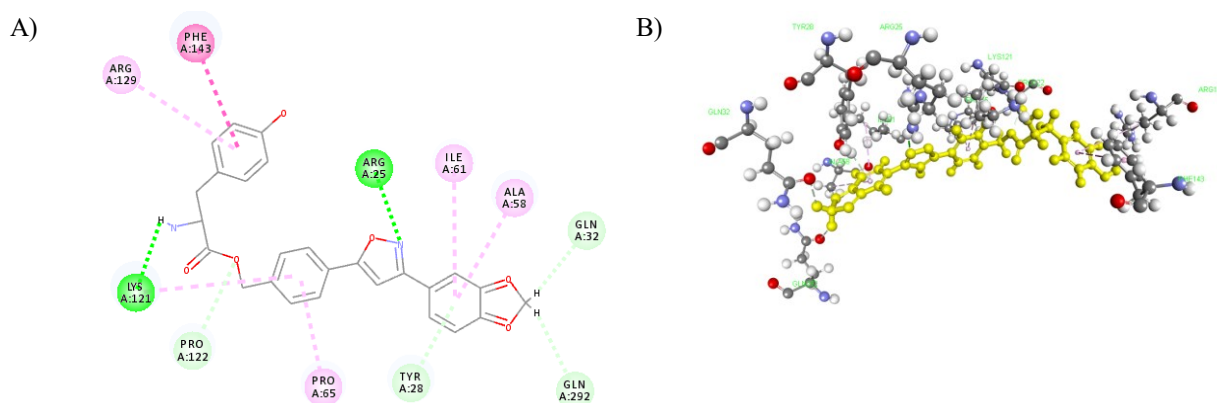
Derivado fenilalanina: o anel aromático da cadeia lateral da porção aminoácido realiza interação do tipo π com os resíduos Pro65 e Lys121. O resíduo Pro122 realiza interação do tipo doador de hidrogênio com o terminal ácido da fenilalanina. Os resíduos Tyr147 e Phe143 realizam interação do tipo π com o anel isoxazol. O resíduo Phe143 assim como o resíduo Tyr147 interagem com o anel isoxazol por ligação do tipo π . O resíduo Tyr147 interage, ainda, com o anel aromático ligado a porção metilenodioxi do isoxazol. Por último, o resíduo Thr144 interage com a porção isoxazol por forças de van der Waals. Novamente o resíduo Tyr147 faz interação com o derivado, nesse caso diretamente com o anel isoxazol. O resíduo Pro65 também está presente no sítio ativo da molécula alvo.

Figura 33: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol fenilalanina e o transportador PEPT1.



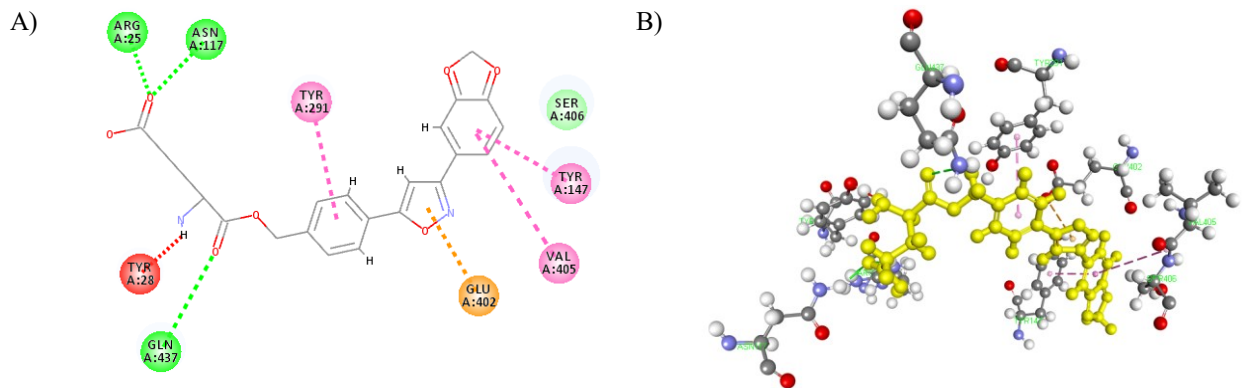
Derivado isoxazol tirosina: com um *score* de 82,27, esse derivado foi o que apresentou o segundo maior de número de interações dentre todos os derivados, resultando em 11 interações. Dentre as quais nitrogênio do anel isoxazol realiza interação de hidrogênio com o resíduo de Arg25 a uma distância de 2,21Å e o resíduo Lys121 também faz interação de hidrogênio, mas com a porção amina terminal do aminoácido tirosina, com uma distância de 1,75Å. Os resíduos Arg129 e Phe143 interagem com o anel fenólico do aminoácido por ligação do tipo π . O resíduo Pro122 interage com a porção ácido da tirosina através de ligação carbono hidrogênio. Os resíduos Pro122 e Lys121 interagem com o anel aromático do isoxazol por ligação tipo π . Os resíduos Ile61, Tyr28 e Ala58 interagem com o anel aromático ligado ao metilenodioxí por ligação do tipo π . Por último, os resíduos Gln292 e Gln32 interagem com a porção metilenodioxí do isoxazol por ligação do tipo carbono hidrogênio. Os resíduos Arg25, Pro65, Ile61 e Tyr28 fazem parte do sítio ativo do transportador PEPT1.

Figura 34: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol tirosina e o transportador PEPT1.



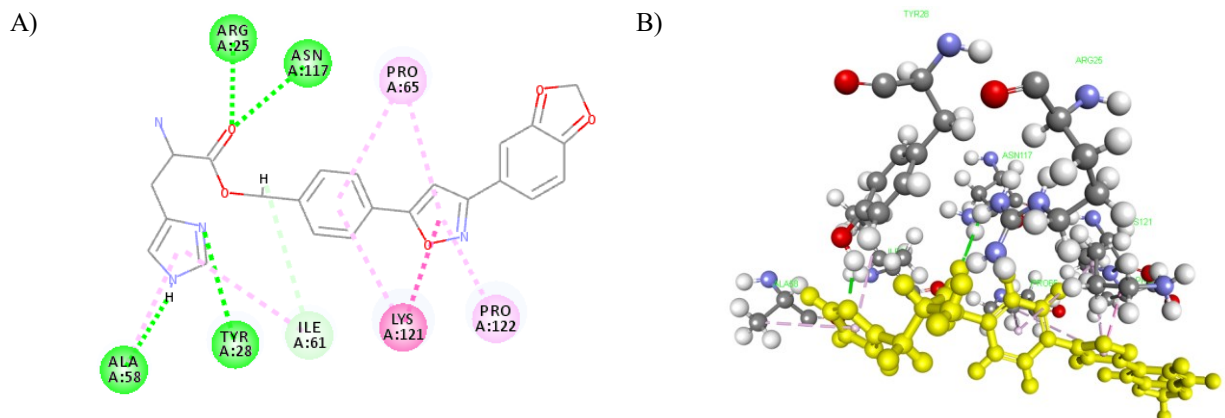
Derivado isoxazol glutamato: apresenta a cadeia lateral ácida da porção aminoácido realizando interação de hidrogênio com os resíduos Arg25 com distâncias de 1,89 e 2,14Å e Asn117 com distância de 3,09Å. O resíduo Gln437 realiza interação de hidrogênio com a porção ácida do aminoácido a uma distância de 3,09Å. O resíduo de Tyr291, por sua vez interage com o anel aromático do isoxazol por ligação do tipo π . Já o resíduo Glu402 interage com o anel isoxazol por ligação do tipo π -ânion. Os resíduos Val405 e Tyr147 interagem com o anel aromático ligado ao metilenodioxí através de ligação π . Por último o resíduo Ser406 interage com a porção isoxazol por forças de van der Waals. Os resíduos Tyr147, Tyr291 e Arg25 estão no sítio ativo da molécula alvo.

Figura 35: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol glutamato e o transportador PEPT1.



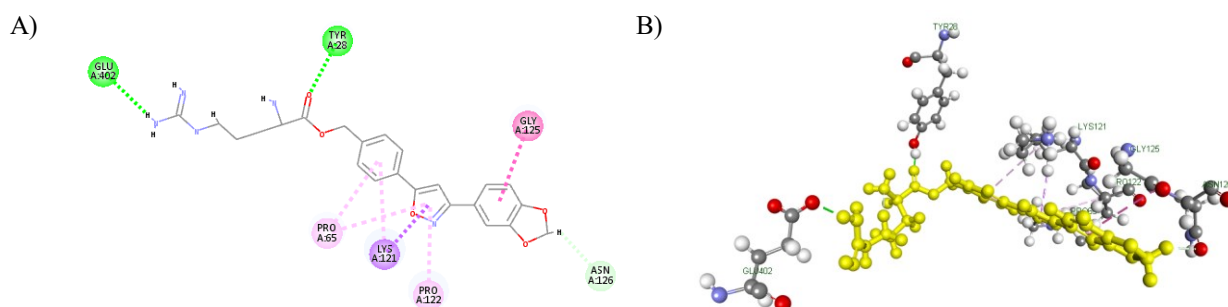
Derivado isoxazol histidina: o terminal ácido da sua porção aminoácido realiza interações de hidrogênio com os resíduos de aminoácido Arg25 com distância de 2,41Å, com o resíduo Asn117 com distância de 2,01Å. Por sua vez, o resíduo Ala58 com distância de 1,88Å e o resíduo Tyr28 com distância de 2,03Å fazem interação de hidrogênio com o anel imidazol do aminoácido histidina. Já o resíduo Ile61 interage com o mesmo anel imidazol por ligação π e com o hidrogênio do terminal ácido por ligação tipo carbono hidrogênio. Os resíduos Pro65 e Lys121 interagem com o anel aromático do isoxazol e com o anel isoxazol por meio de ligação do tipo π . Há, ainda, o resíduo Pro122, o qual interage apenas com o anel isoxazol por ligação do tipo π . Foi observado que o resíduo Ile61, juntamente com os resíduos Arg25, Tyr28 e Pro65 estão presentes no sítio ativo do transportador PEPT1.

Figura 36: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol histidina e o transportador PEPT1.



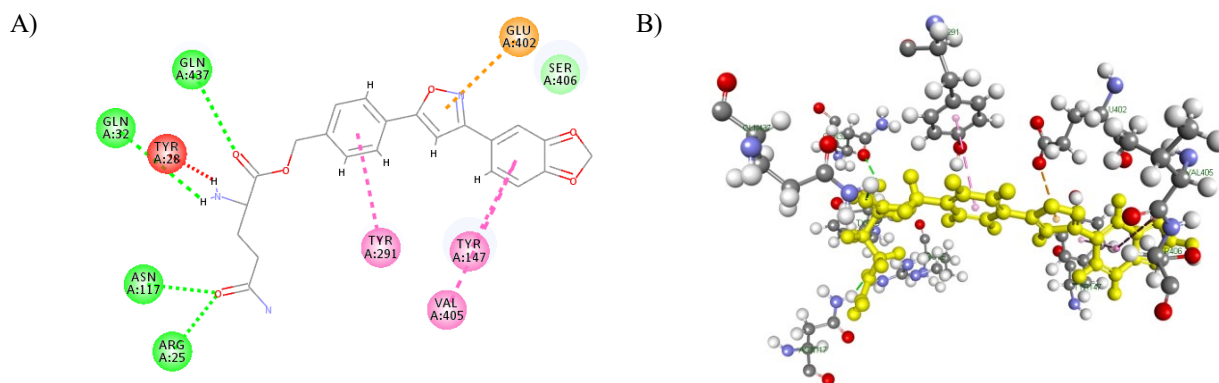
Derivado isoxazol arginina: a amina da cadeia lateral da porção aminoácido realiza interação de hidrogênio com o resíduo Glu402 a uma distância de 2,08Å e o resíduo Tyr28 realiza interação de hidrogênio com o terminal ácido da arginina a uma distância de 2,06Å. Já o resíduos Pro65 e Lys121 interagem ambos com o anel aromático do isoxazol e com o anel isoxazol por ligação do tipo π . O resíduo Pro122 interage apenas com o anel isoxazol por ligação do tipo π , já o resíduo Gly125 interage com o anel aromático ao lado da porção metilenodioxí do isoxazol também por ligação do tipo π . Por último o resíduo Asn126 faz ligação carbono hidrogênio com o hidrogênio do metilenodioxí do isoxazol. Dentre as interações encontradas, os resíduos Glu402, Tyr28 e Pro65 estão presentes no sítio ativo do transportador PEPT1.

Figura 37: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol arginina e o transportador PEPT1.



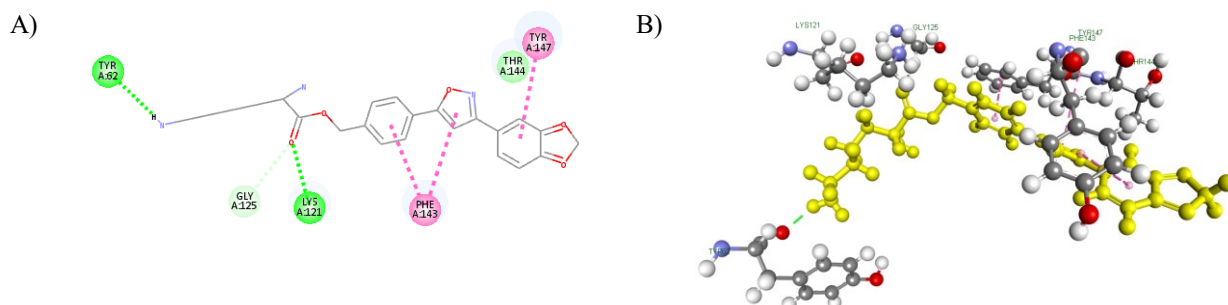
Derivado isoxazol glutamina: esse derivado acoplado apresentou dez interações, sendo uma não favorável; dentre as quais, a amida da cadeia lateral da porção aminoácido realiza interação de hidrogênio com o resíduo de Arg25 a distância de 1,95 e 2,21Å, asn117 com distância de 1,87Å. Já o resíduo Gln32 realiza interação de hidrogênio com o terminal amina do aminoácido acoplado a uma distância de 2,57Å, e, ainda, o resíduo gln437 interage com a porção ácido do aminoácido tirosina acoplado ao isoxazol por meio ligação de hidrogênio, a uma distância 2,73Å. O resíduo Tyr291 interage com o anel aromático do isoxazol por ligação do tipo π . Já o resíduo Glu402 interage com o anel isoxazol através de ligação tipo π ânion. O resíduo Ser406 realiza interação de van der waals com a porção isoxazol da molécula. Por último, os resíduos Tyr147 e Val405 interagem com o anel aromático ligado ao metilenodioxí por ligação do tipo π . O resíduo Tyr28 realiza interação não favorável com o hidrogênio da amina do aminoácido glutamina acoplado ao isoxazol 1. Dentre as interações observadas, os resíduos Arg25, Tyr291, Tyr28, Tyr147, Glu402 e Ser406 são resíduos de aminoácidos que integram o sítio ativo do transportador PEPT1.

Figura 38: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol glutamina e o transportador PEPT1.



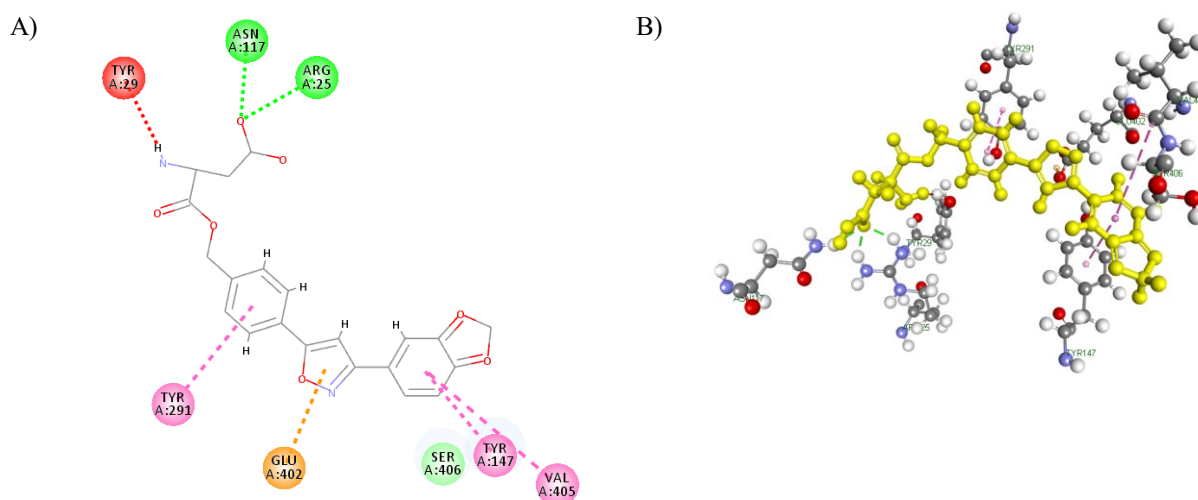
Derivado isoxazol lisina: a amina da cadeia lateral da porção aminoácido realiza interação de hidrogênio com o resíduo Tyr62 com uma distância de 2,09Å, o resíduo Lys121 realiza interação de hidrogênio com distância de 2,13Å com a porção ácido da lisina acoplada ao isoxazol. Na mesma porção ácido, o resíduo Gly125 interage com ligação do tipo carbono hidrogênio. O resíduo Phe143 interage com o anel aromático do isoxazol e, ainda, com o anel isoxazol por ligação do tipo π . O resíduo Tyr147 interage com o anel aromático ligado a porção metilenodioxí do isoxazol. Por último o resíduo Thr144 interage com a porção isoxazol por meio de interação de van der waals. Os resíduos Tyr62 e Tyr147 são resíduos de aminoácidos do sítio ativo da molécula alvo.

Figura 39: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol lisina e o transportador PEPT1.



Derivado isoxazol aspartato: o derivado isoxazólico apresenta o terminal ácido carboxílico da sua porção aminoácido com interação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido Asn117 a uma distância de 1,87Å e com o resíduo de Arg25 com distâncias de 1,90 e 2,13Å. O resíduo Tyr291 realiza interação do tipo π com o anel aromático do isoxazol. Já o resíduo Glu402 interage com o anel isoxazol por meio de ligação tipo π ânion. Os resíduos Tyr147 e Val405 interagem com o anel aromático ligado ao metilenodioxi da porção isoxazol. Por último o resíduo Ser406 interage com a porção isoxazol por forças de van der Waals. Nesse caso, o hidrogênio da hidroxila fenólica do resíduo Tyr29 realiza interação não favorável com o hidrogênio do terminal amina do ácido aspártico. Foi observado que os resíduos de interação Tyr29, Tyr147, Tyr291, Glu402 e Ser406 compõem o sítio ativo do transportador PEPT1.

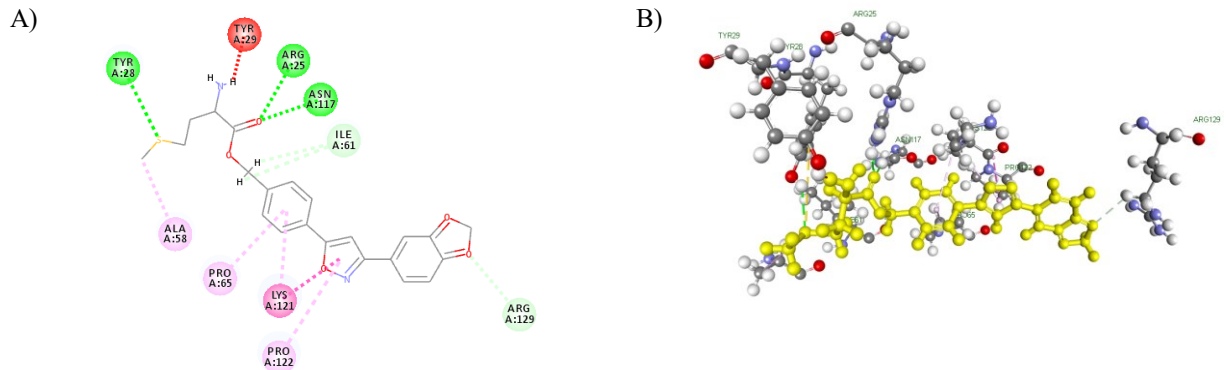
Figura 40: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol aspartato e o transportador PEPT1.



Derivado isoxazol metionina: esse derivado apresentou um total de dez interações, sendo uma não favorável. O terminal ácido da porção aminoácido realiza interação de hidrogênio com Arg25 com distâncias de 2,41 e 2,62Å e Asn117 com distância e 1,99Å. O resíduo Tyr28 realiza interação de hidrogênio a uma distância de 2,76Å e, ainda, ligação π ambos com o átomo de enxofre da cadeia lateral do aminoácido metionina acoplado ao isoxazol. O resíduo Ala58 interage com a cadeia lateral por ligação tipo π . Já os resíduos Pro65, Lys121 e Pro122 interagem com o anel aromático do isoxazol por meio de ligação tipo π . Além dessa interação, os mesmos resíduos Lys121 e Pro122 interagem com o anel isoxazol por ligação tipo π . Por sua vez, o resíduo Arg129 interage por ligação tipo carbono

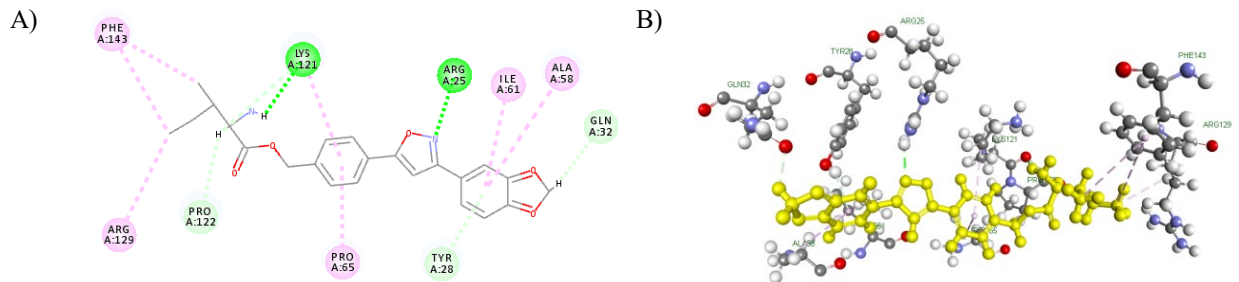
hidrogênio com o metilenodioxí da porção isoxazol. Novamente o resíduo Tyr29 realiza interação não favorável com o hidrogênio da amina do aminoácido metionina acoplado ao isoxazol 1. Os resíduos Tyr 28, Arg25 e Pro65 estão no sítio ativo da molécula alvo.

Figura 41: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol metionina e o transportador PEPT1.



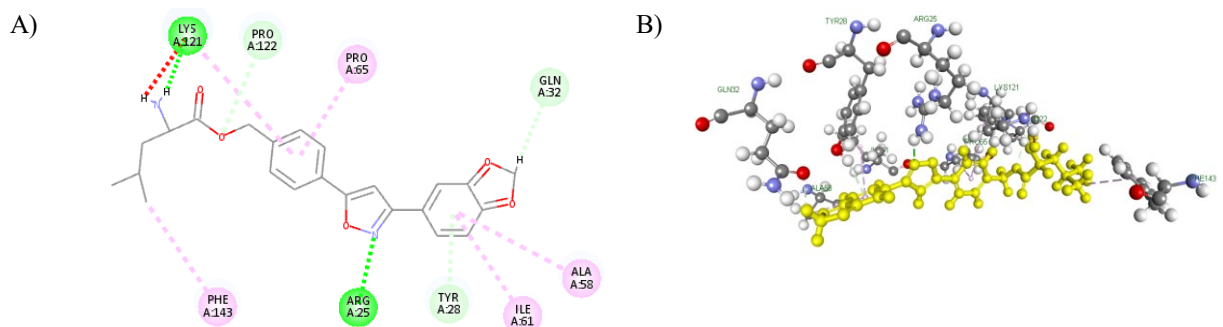
Derivado isoxazol isoleucina: o resíduo Lys121 realiza interação de hidrogênio a uma distância de 2,08Å com a porção amina do aminoácido, esse resíduo, ainda, interage com o anel aromático do isoxazol por ligação tipo π . Por sua vez, o resíduo Arg25 faz ligação de hidrogênio a uma distância de 2,26Å com o nitrogênio do anel isoxazol. Os resíduos Phe143 e Arg129 interagem com a cadeia lateral do aminoácido isoleucina por ligação do tipo alquil. Ainda com a porção aminoácido da molécula, o resíduo Pro122 interage com o terminal amina. Já os resíduos Tyr28, Ile61 e Ala58 interagem com o anel aromático ligado ao metilenodioxí por ligação tipo π . Por último o resíduo Gln32 interage com o metilenodioxí por ligação carbono hidrogênio. O resíduo Tyr28 interage com o anel aromático ao lado da porção metilenodioxí por ligação carbono - hidrogênio e o resíduo Gln32 faz ligação carbono hidrogênio com o metileno da porção metilenodioxí do isoxazol. Os resíduos Arg25, Pro65, Ile61 e Tyr 28 fazem parte do sítio ativo do transportador PEPT1.

Figura 42: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol isoleucina e o transportador PEPT1.



Derivado isoxazol leucina: o terminal amina da porção aminoácido realiza interação de hidrogênio com o resíduo Lys121 a uma distância de 1,94Å. Esse mesmo resíduo tem uma interação não favorável entre hidrogênios com o átomo ligado ao nitrogênio da amina. Esse resíduo, ainda, realiza interação do tipo π com o anel aromático do isoxazol. Já o resíduo Pro65 interage apenas com o anel aromático do isoxazol. O resíduo Arg25 faz interação de hidrogênio a uma distância 2,33Å com o nitrogênio do anel isoxazol. Por sua vez, os resíduos Tyr28, Ile61, e Ala58 interagem com o anel aromático ligado ao metlenodioxí. O resíduo Pro122 interage com o oxigênio da porção ácido por meio de doador de elétron π . Por último, o resíduo Gln32 interage com o a porção metlenodioxí por ligação carbono hidrogênio. Ao analisar as interações, apenas os resíduos Ile61, Tyr28 e Arg25 são resíduos de aminoácidos do sítio ativo da molécula alvo.

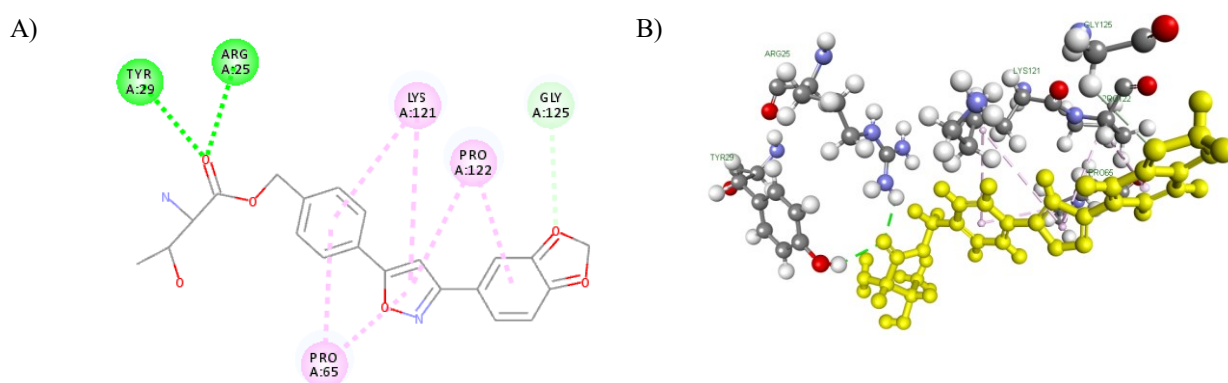
Figura 43: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol leucina e o transportador PEPT1.



Derivado isoxazol treonina: o terminal ácido da porção aminoácido realiza interação de hidrogênio com o resíduo Tyr29 com distância de 2,25Å e com o resíduo Arg25 com

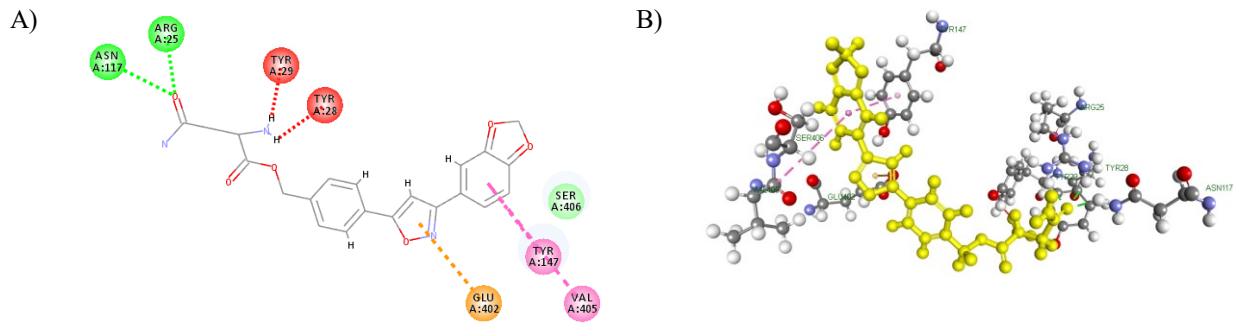
distância de 2,23Å. Os resíduos Lys121 e Pro65 interagem por ligação do tipo π com o anel aromático do isoxazol e também com o anel isoxazol. Já o resíduo Pro122 interage também com o anel isoxazol e com o anel aromático ligado à porção metilenodioxí, ambos por ligação tipo π . Por último, o resíduo Gly125 interage com a porção metilenodioxí do isoxazol por meio de doador de elétron π . Os resíduos Tyr29, Arg25 e Pro65 compõem o sítio ativo da molécula alvo.

Figura 44: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol treonina e o transportador PEPT1.



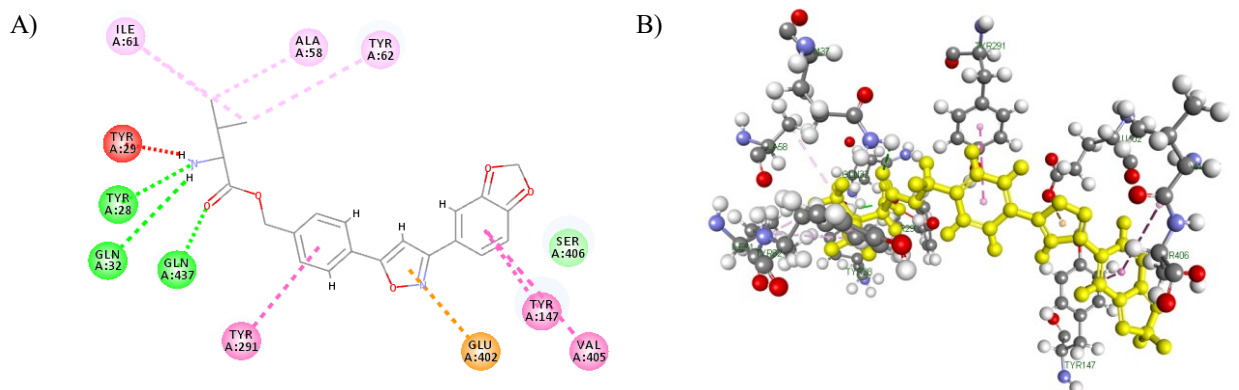
Derivado isoxazol asparagina: apresenta a cadeia lateral amida da porção aminoácido realizando interação de hidrogênio com o resíduo Arg25 com distâncias 1,96 e 2,19Å e com resíduo Asn117 com distância de 1,98Å. Nesse caso, os resíduos Tyr28 e Tyr29 apresentam interação não favorável entre hidrogênios com o terminal amina do aminoácido asparagina acoplado. Já o resíduo Glu402 interage por ligação tipo π ânion com o anel isoxazol. Por sua vez, os resíduos Tyr147 e Val405 interagem com o anel aromático ligado ao metilenodioxí da porção isoxazol da molécula. Por último, o resíduo Ser406 interage por forças e van der waals com a porção isoxazol da molécula. Dentre os resíduos observados, cinco estão presentes no sítio ativo do transportador PEPT1: Arg25, Tyr28, Tyr29, Tyr147 e Glu402.

Figura 45: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol asparagina e o transportador PEPT1.



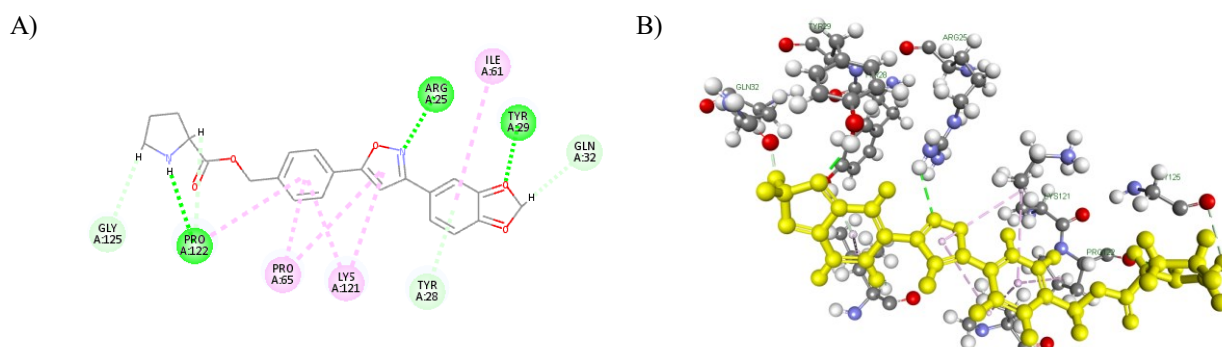
Derivado isoxazol valina: o terminal amina da porção aminoácido interage por meio de ligações hidrogênio com o resíduo Tyr28 a uma distância de 2,23Å, com o resíduo gln32 a uma distância de 3,03Å. Já o resíduo Gln437 faz interação de hidrogênio a uma distância de 2,75Å com o terminal ácido da porção aminoácido. Os resíduos Ile61, Ala58 e Tyr62 interagem por ligação tipo alquil com a cadeia lateral do aminoácido valina. O resíduo Tyr291 interage com o anel aromático do isoxazol. Por sua vez, o resíduo Glu402 interage com o anel isoxazol por ligação tipo π ânion. Já os resíduos Tyr147 e Val405 interagem por ligação tipo π com o anel aromático ligado ao metilenodioxí. Por último, o resíduo Ser406 interage por forças de van der waals com a porção isoxazol. Esse derivado apresentou 11 interações, sendo uma delas não favorável e um *score* relativamente baixo comparado aos outros da mesma série, o que ressalta o fato de não ser apenas o número de resíduos de interação que precisa ser levado em consideração na determinação da pontuação. Das onze interações encontradas nesse derivado, nove resíduos estão presentes no sítio ativo do transportador, são eles: Tyr28, Ile61, Tyr62, Tyr29, Tyr291, Tyr147, Glu402, Ser406 e Arg25.

Figura 46: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol valina e o transportador PEPT1.



Derivado isoxazol prolina: apresenta o terminal ácido da porção aminoácido interagindo por ligação de hidrogênio com o resíduo Pro122 a uma distância de 2,68Å. Esse mesmo resíduo, ainda, interage com o anel aromático do isoxazol por ligação tipo π . Também com interação de hidrogênio, o resíduo Arg25 interage com o nitrogênio do anel isoxazol a uma distância 2,68Å e por último o resíduo Tyr29 a uma distância de 2,14Å interage com o oxigênio do metilenodioxí da porção isoxazol. Por sua vez, o resíduo Gly125 interage com o terminal amina através de ligação carbono hidrogênio. Já os resíduos Pro65 e Lys121 interagem com o anel aromático do isoxazol e com o anel isoxazol por ligação tipo π . Os resíduos Ile61 e Tyr28 interagem com o anel aromático ligado ao metilenodioxí por ligação tipo π . Por último o resíduo Gln32 interage por ligação carbono hidrogênio com a porção metilenodioxí do isoxazol. Os resíduos Pro65, Ile61, Tyr29 e Tyr28 estão presentes no sítio ativo da molécula alvo.

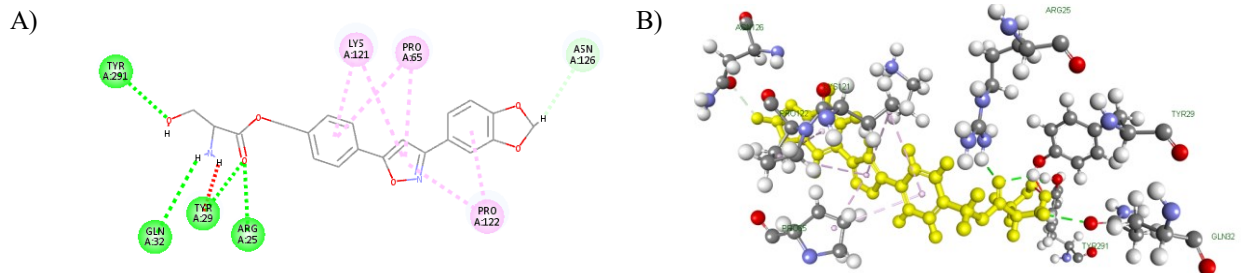
Figura 47: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol prolina e o transportador PEPT1.



Derivado isoxazol serina: quando acoplado ao aminoácido serina, o derivado isoxazólico possui o terminal ácido da porção aminoácido realizando interação de hidrogênio com resíduo Tyr29 a uma distância de 2,27Å e com o resíduo Arg25 a uma distância 2,14Å. No entanto, o resíduo Tyr29 realiza interação não favorável entre o hidrogênio fenólico da tirosina e o hidrogênio da amina do aminoácido serina. Ainda na porção aminoácido, o resíduo Tyr291 interage por ligação de hidrogênio com a hidroxila da cadeia lateral do aminoácido acoplado. Já o resíduo Gln32 realiza interação de hidrogênio a uma distância 2,56Å com o terminal amina do aminoácido. Já os resíduos Pro65 e Lys121 interagem ambos por ligação tipo π com o anel aromático do isoxazol e com o anel isoxazol. Já o resíduo Pro122 interage com o anel isoxazol e com o anel aromático ligado ao metilenodioxí por ligação tipo π . Por último, o resíduo Asn126 interage com o metilenodioxí por ligação do tipo carbono hidrogênio.

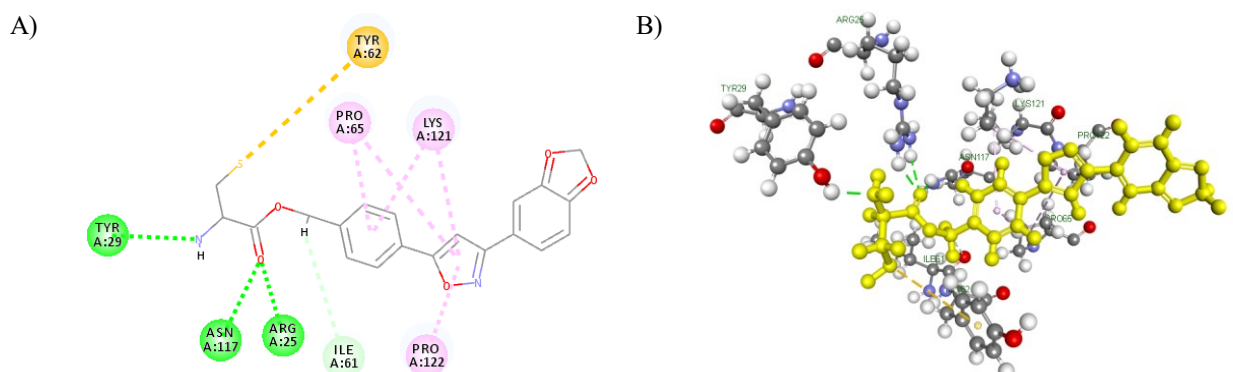
Nesse caso, observou-se que os resíduos de interação presentes no sítio ativo do transportador PEPT1 são: Tyr291, Arg25, Tyr29, Pro65, Ile61 e Tyr28.

Figura 48: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol serina e o transportador PEPT1.



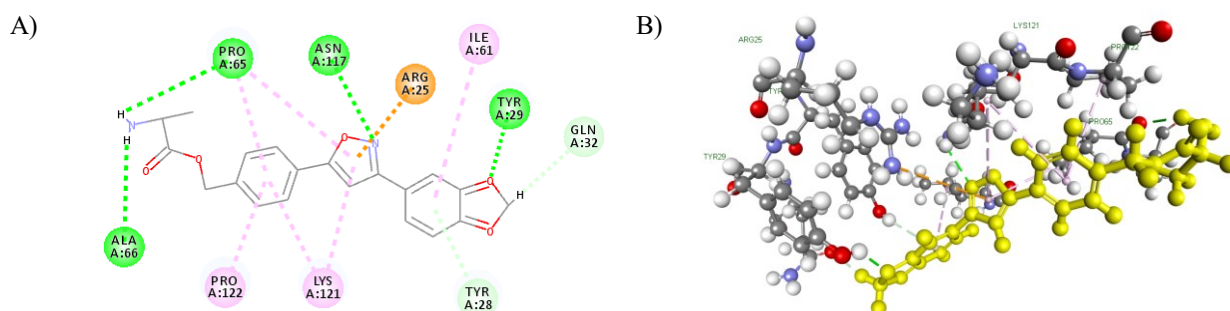
Derivado isoxazol cisteína: o terminal amina da porção aminoácido realiza interação de hidrogênio com o resíduo Tyr29 a uma distância de 2,02Å. Já os resíduos Asn117 e Arg25 interagem por ligação de hidrogênio com o terminal ácido da cisteína com distâncias de 2,09Å para a Asn e de 2,10 e 2,58Å para a Arg. Por sua vez, o resíduo Tyr62 interage com o átomo de enxofre da cadeia lateral do aminoácido por ligação tipo π . Ainda na porção aminoácido, o resíduo Ile61 interage com o terminal ácido por ligação carbono hidrogênio. Já os resíduos Pro65 e Lys121 interagem ambos por ligação tipo π com o anel aromático do isoxazol e também com o anel isoxazol. Por último, o resíduo Pro122 realiza interação tipo π apenas com o anel isoxazol. Os resíduos Arg25, Tyr62, Ile61 e Pro65 são resíduos de aminoácidos do sítio ativo do transportador PEPT1.

Figura 49: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol cisteína e o transportador PEPT1.



Derivado isoxazol alanina: esse derivado apresentou dez resíduos de interação, dentre eles, os resíduos Ala66 e Pro65 interagem por ligação de hidrogênio com distâncias de 2,07Å e 2,11Å respectivamente com o terminal amina da porção aminoácido da molécula. Por sua vez, o resíduo Pro65 interage, ainda, com o anel aromático do isoxazol e com o anel isoxazol por ligação do tipo π , assim como o resíduo Lys121. Já o resíduo Pro122 interage apenas com o anel aromático do isoxazol por ligação do tipo π . Nesse derivado, o resíduo Arg25 realiza interação do tipo π – ânion com anel isoxazol. O nitrogênio dessa mesma porção do derivado interage com o resíduo Asn117 por ligação de hidrogênio com distância de 2,61Å. Já os resíduos Ile61 e Tyr28 interagem com o anel aromático ligado ao isoxazol por ligação do tipo π . Também fazendo interação de hidrogênio, o resíduo Tyr29 interage com o oxigênio da porção metilenodioxí do isoxazol a uma distância de 2,12Å. Por último, o resíduo Gln32 interage também com o metilenodioxí por ligação do tipo carbono hidrogênio. Dentre as interações encontradas, os resíduos Pro65, Tyr29, Ile61, Tyr28, Tyr62 e Arg25 são resíduos que compõem o sítio ativo da molécula alvo

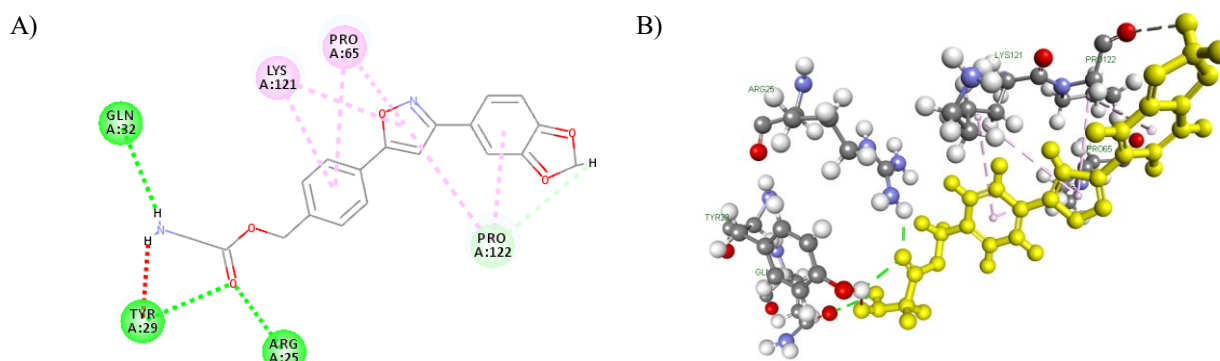
Figura 50: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol alanina e o transportador PEPT1.



Derivado isoxazol glicina: nesse caso, o resíduo Arg25 realiza interação de hidrogênio com o terminal ácido da porção aminoácido com distância de 2,10Å. O resíduo de Tyr29 por sua vez, interage também com terminal ácido por ligação de hidrogênio com distância de 2,25Å, mas nessa conformação realiza, ainda, uma interação entre hidrogênios não favorável com o hidrogênio da amina do terminal amina. Já o resíduo Gln32 também interage com o terminal amina do aminoácido por ligação de hidrogênio com distância de 2,58Å. Ambos os resíduos Lys121 e Pro65 interagem com o anel aromático do isoxazol e, ainda, com o anel isoxazol por ligação do tipo π . Por último, o resíduo Pro122 realiza interação

tipo π com o anel isoxazol, com anel aromático ligado ao metilenodioxí e também interage por ligação carbono hidrogênio com o hidrogênio da porção metilenodioxí do isoxazol. Os resíduos de aminoácidos Tyr29, Arg25 e Pro65 estão no sítio ativo do transportador PEPT1.

Figura 51: Representações bidimensional (A) e tridimensional (B) das principais interações entre derivado isoxazol glicina e o transportador PEPT1.



4.1.4 Análise das propriedades físico-químicas dos compostos

Para um composto apresentar perfil de solubilidade e permeabilidade adequados para absorção por via oral, sendo transportados de forma passiva através das membranas celulares, alguns parâmetros precisam ser avaliados; peso molecular menor ou igual a 500g mol⁻¹, logP menor ou igual a 5, número de aceptores de hidrogênio (HBA - *hydrogen bond acceptor*) menor que 10 e número de doadores de H (HBD - *hydrogen bond donor*) menor que 5. Compostos que excedem mais que um desses parâmetros pode ter comprometimento da biodisponibilidade (LIPINSKI et al., 1997).

A área de superfície polar topológica (TPSA) é utilizada para avaliar a absorção de um fármaco no intestino em células caco-2, as quais mimetizam o epitélio gastrointestinal (PALM et al., 1996; ETRL ET AL., 2000). Compostos que apresentam TPSA menor ou igual a 140Å e número de ligações rotacionáveis (RB) que corresponde ao número de ligação simples, fora do anel, ligada a um átomo não terminal; cujo valor menor ou igual a 10 possuem elevada probabilidade de boa biodisponibilidade por via oral (VEBER et al., 2002).

Drug-score é uma avaliação do potencial que um composto apresenta para tornar-se possível candidato a fármaco. Os valores de *drug-score* são obtidos pela combinação de LogP, LogS, peso molecular, toxicidade e drug-likeness (BRITO, 2011; AYATI et al., 2012). Uma molécula que apresenta um *drug score* maior que 0,00 provavelmente possui

considerável atividade biológica, enquanto moléculas com valores de -0,50 a 0,00 possuem atividade moderada e moléculas com *score* menor de -0,50 são presumidamente inativas (HUSAIN et al., 2016).

No planejamento de novas entidades químicas, a investigação do perfil farmacocinético inclui avaliação da absorção, distribuição, metabolismo, excreção e seus mecanismos. As propriedades relacionadas a farmacocinética incluem coeficiente e partição octanol-água, solubilidade em água, absorção intestinal e biodisponibilidade (ZHU et al., 2018). Compostos que apresentam propriedades físico-químicas fora dos padrões estabelecidos na literatura podem comprometer o processo de desenvolvimento de fármacos. A solubilidade em meio aquoso, por exemplo, influencia na dissolução de fármacos no trato gastrointestinal e por sua vez, na concentração final disponível do fármaco (FAQI, 2013).

a) Análise das propriedades dos derivados isoxazólicos Série A (terminal ácido livre)

Tabela 8: Propriedades físicas químicas dos derivados isoxazólicos série A

Derivados contendo aminoácido:	Peso molecular	cLogP	HBA	HBD	TPSA	RB	Drug - Score
Aspartato	410.381	0.3144	9	3	131.12	8	0,65
Glutamato	424.408	0.7688	9	3	131.12	9	0,54
Alanina	366.372	1.1363	7	2	93.82	6	0,68
Arginina	451.481	0.6897	10	5	155.72	10	0,61
Asparagina	409.397	-0.083401	9	3	136.91	8	0,57
Cisteína	398.438	1.0691	7	2	132.62	7	0,43
Fenilalanina	442.470	2.5782	7	2	93.82	8	0,33
Glicina	352.345	0.777	7	2	93.82	6	0,60
Glutamina	423.424	0.371	9	3	136.91	9	0,57
Histidina	432.435	0.622	9	3	122.5	8	0,61
Isoleucina	408.453	2.2634	7	2	93.82	8	0,56
Leucina	408.453	2.2634	7	2	93.82	8	0,40
Lisina	423.468	-0.5518	8	3	119.84	10	0,37
Metionina	426.492	1.7399	7	2	119.12	9	0,53
Prolina	392.410	2.2175	7	1	85.03	5	0,64
Serina	382.371	0.2096	8	3	114.05	7	0,73
Tirosina	458.469	2.2325	8	3	114.05	8	0,50
Treonina	396.398	0.5689	8	3	114.05	7	0,67
Triptofano	481.507	2.6176	8	3	109.61	8	0,42
Valina	394.426	1.809	7	2	93.82	7	0,58

Nifurtimox	287.29	-0,25	7	0	117	2	0,16
Benznidazol	260.252	-0.4184	7	1	92.74	5	0,33

Nos derivados isoxazólicos da série A todos os compostos se encaixam nos parâmetros estabelecidos por Lipinski e Veber, exceto o derivado acoplado a arginina, o qual viola três parâmetros para que um composto possua perfil de solubilidade e permeabilidade adequados para absorção oral, sendo esses parâmetros, o número de doadores de hidrogênio, número de aceptores de hidrogênio e área de superfície polar. No entanto, os critérios estabelecidos na literatura são para compostos absorvidos de forma passiva, os derivados isoxazólicos propostos nesse projeto são transportados de forma ativa, pelo transportador de membrana PEPT1, responsável pela captação dos peptídeos obtidos na dieta.

b) Análise das propriedades dos derivados isoxazólicos Série B (terminal amina livre)

Tabela 9: Propriedades físicas químicas dos derivados isoxazólicos série B

Derivado contendo aminoácido:	Peso molecular	Clogp	HBA	HBD	TPSA	RB	Drug - score
Aspartato	410.381	0.0551	9	2	134.11	8	0,33
Glutamato	424.408	0.5095	9	2	134.11	9	0,31
Alanina	366.372	2.6038	7	1	96.81	6	0,32
Arginina	451.481	1.5748	10	4	158.71	10	0,3
Asparagina	409.397	1.3841	9	2	139.9	8	0,32
Cisteína	398.438	2.5366	7	1	135.61	7	0,22
Fenilalanina	442.470	4.0457	7	1	96.81	8	0,22
Glicina	352.345	2.2445	7	1	96.81	6	0,44
Glutamina	423.424	1.8385	9	2	139.9	9	0,3
Histidina	432.435	2.2599	9	2	125.49	8	0,3
Isoleucina	408.453	3.7309	7	1	96.81	8	0,25
Leucina	408.453	3.7309	7	1	96.81	8	0,25
Lisina	423.468	2.6425	8	2	122.83	10	0,28
Metionina	426.492	3.2074	7	1	122.11	9	0,26
Prolina	392.410	3.319	7	1	82.82	6	0,3
Serina	382.371	1.6771	8	2	117.04	7	0,35
Tirosina	458.469	3.7	8	2	117.04	8	0,23

Treonina	396.398	2.0364	8	2	117.04	7	0,32
Triptofano	481.507	4.0851	8	2	112.6	8	0,19
Valina	394.426	3.2765	7	1	96.81	7	0,28
Nifurtimox	287.29	-0,25	7	0	117	2	0,16
Benznidazol	260.252	-0.4184	7	1	92.74	5	0,33

Os derivados isoxazólicos da série B apresentaram o derivado acoplado ao aminoácido arginina infringindo dois parâmetros estabelecidos na literatura: número de aceptores de hidrogênio e área de superfície polar. Todos os outros derivados mantiveram valores inseridos na faixa de compostos com perfil de solubilidade e permeabilidade adequados para absorção por via oral.

Na tabela abaixo é possível observar os valores que o isoxazol 1 e o enalapril não violam os parâmetros preconizados na literatura. No entanto, o fármaco valaciclovir viola o número de aceptores de hidrogênio e, ainda, o parâmetro de superfície polar total.

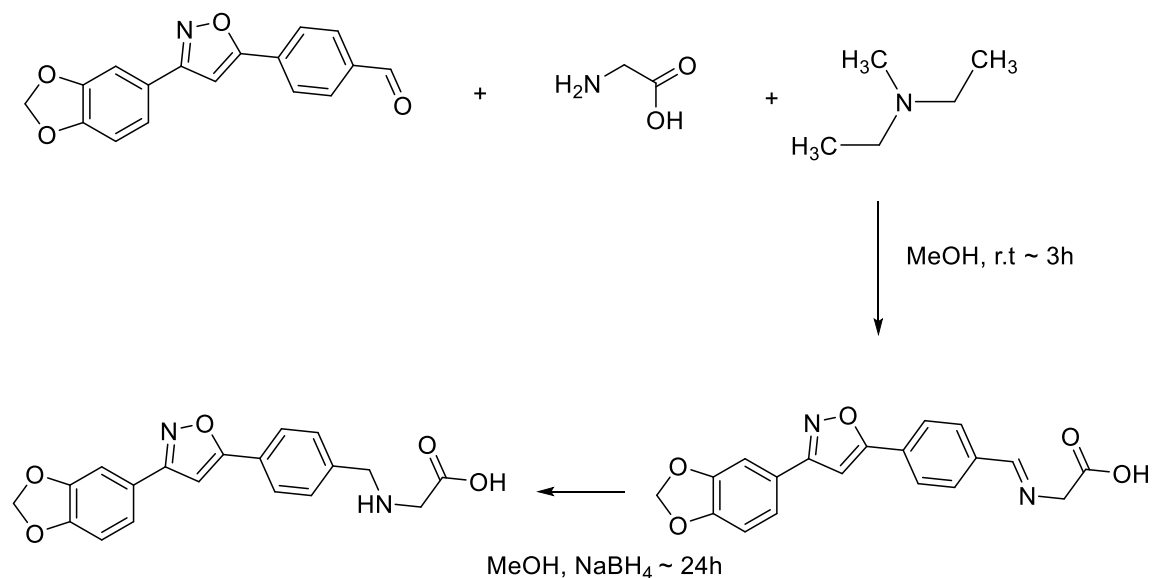
Molécula	Peso molecular	Clogp	HBA	HBD	TPSA	RB	Drug - score
Isoxazol 1	295.293	3.0844	5	1	64.72	3	0.46
Valaciclovir	360.801	-1.2541	10	4	147.84	8	0,27
Enalapril	376.451	-0.0245	7	2	95.94	10	0,76

Tabela 10 Propriedades físicas químicas do isoxazol 1 e fármacos Valaciclovir e Enalapril.

4.2 Síntese

A rota sintética proposta para obtenção dos derivados latenciados envolve uma reação de acoplamento de um derivado aldeído com um aminoácido (LAKE & LINDE 2012)), conforme apresentado no esquema 1 abaixo.

Esquema 1: Esquema de síntese do derivado isoxazol acoplado ao aminoácido a partir do isoxazol **2**.

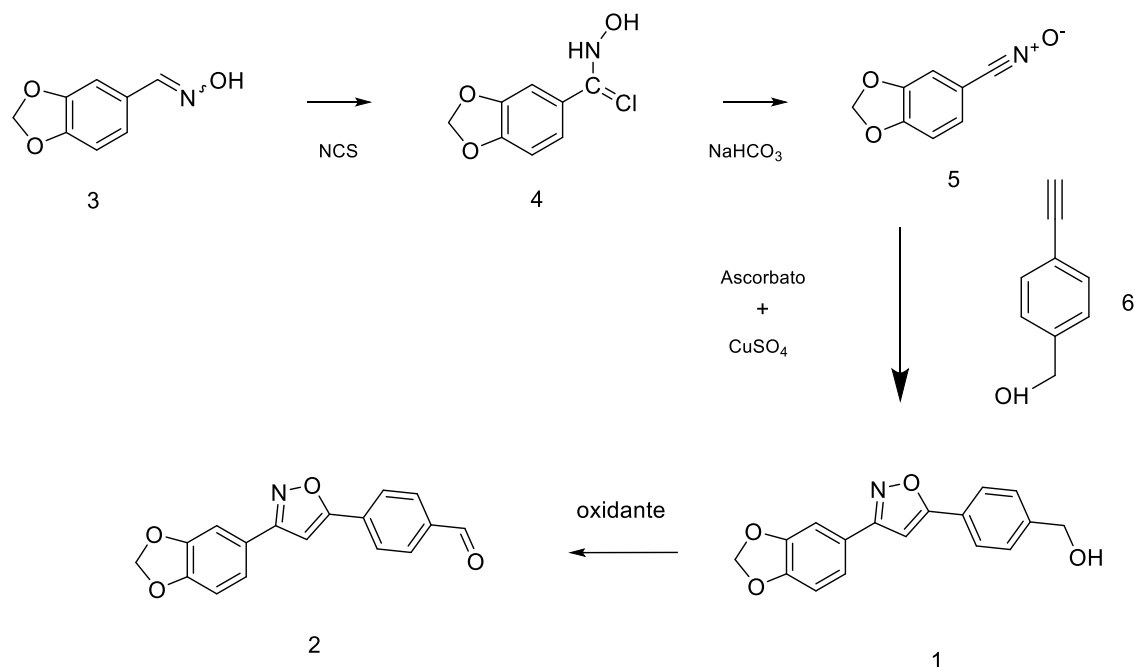


Portanto, o trabalho foi direcionado para obtenção do 3 – (3,4 benzodioxol) – 5- (4-benzaldeído) – isoxazol (**1**) para, posteriormente, serem realizadas as reações de acoplamento com os diferentes aminoácidos.

Assim, foi proposta uma rota sintética para obtenção do 3 – (3,4 benzodioxol) – 5- (4-benzaldeído) – isoxazol (**2**), a partir da oxidação da 1,3-benzodioxol-5-aldoxima (**3**) a óxido de nitrila (**5**) e posterior reação de cicloadição com um alcino terminal (Esquema 2). O isoxazol **1** formado é então oxidado ao composto **2**.

O composto 1,3-benzodioxol-5-aldoxima (**3**) foi obtido a partir da reação entre o aldeído piperonal (**6**) (adquirido comercialmente) e cloreto de hidroxilamina em bons rendimentos (80–95%). De forma geral, as oximas são substâncias cristalinas obtidas em alto rendimento e sem necessidade de purificação. Ocorre a formação de dois isômeros *E/Z*, sendo o isômero *E* majoritário variando de 90 a 100%, o que pode ser observado em CCD (HAJIPOUR; RAFIEE; RUOHO, 2010). A reação da oxima **3** com o agente oxidante *N*-clorosuccinamida levou à formação do intermediário cloreto de imidoíla (**4**), o qual reagiu com NaHCO_3 , formando o óxido de nitrila *in situ*, o qual foi utilizado diretamente na reação de cicloadição 1,3 dipolar.

Esquema 2: Esquema de síntese do isoxazol 2 a partir da oxima 3

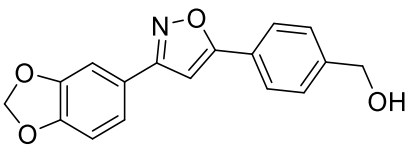


Isoxazóis 3,5 dissubstituídos podem ser obtidos utilizando catalisador de cobre I na reação de cicloadição de um óxido de nitrila gerado *in situ* com um alcino terminal (HANSEN et al., 2005) O derivado isoxazol 3,5-dissubstituído foi sintetizado através da cicloadição 1,3-dipolar entre óxido de nitrila e um alcino terminal. O alcino utilizado pode ser adquirido comercialmente. A síntese do óxido de nitrila é realizada através do cloreto de imidoíla.

Na metodologia descrita por Himo (2005) a síntese do isoxazol através da cicloadição 1,3-dipolar utiliza como material de partida a 3-benzodioxol-5-aldoxima e a reação ocorre em duas etapas: síntese do cloreto de imidoíla e cicloadição. Na primeira etapa ocorre a síntese do cloreto de imidoíla, sendo este mais apolar que o material de partida. A reação é interrompida e a segunda etapa é iniciada com a adição dos outros reagentes. O cloreto de imidoíla é um intermédário estável, com um rendimento de 70 a 90% e pode ser utilizado na etapa subsequente da reação de necessidade de purificação. Após aproximadamente 1h é possível observar por análise cromatográfica a formação de um produto com polaridade maior que o material de partida. Quando isolado foi caracterizado como 3 – (3,4 benzodioxol) – 5- (4-hidroximetilfenil) – isoxazol 1.

Em função do tempo reacional na metodologia convencional ser de aproximadamente 48h foi adotada a metodologia adaptada pelo grupo de pesquisa (ROSA et., 2017) a reação foi feita sob irradiação micro-ondas. A conversão total da 3-benzodioxol-5-aldoxima ocorreu em 10 minutos (30°C, 150W), logo após os outros reagentes foram adicionados e a reação foi irradiada por mais 10min (30°C, 150W). Posteriormente o composto 1 foi purificado por cromatografia em coluna.

Tabela 11: Rendimentos das metodologias de síntese do isoxazol 1

		Metodologia	Tempo	Rendimento
1		Himo (2005)	48h	17%
		Micro-ondas	20min	47%

4.2.1 Reação de oxidação do isoxazol

A oxidação de álcool a aldeído pode ser realizada por reagentes de oxidação fortes, como a solução de ácido crômico e ácido sulfúrico em água conhecida como reagente de Jones. Álcool primário diluído em acetona é oxidado a aldeídos rapidamente e com bom rendimento. Para evitar que o reagente de Jones oxide o álcool a ácido carboxílico, é utilizado álcool em excesso na reação, dessa forma, após a conversão do álcool a aldeído, não haverá agente oxidante suficiente para dar continuidade a reação. É necessário, ainda, interromper a reação e extrair o aldeído assim que ocorrer sua formação (SMITH E MARCH, 2007).

O isoxazol 1 possui uma porção terminal álcool que foi reduzida a aldeído com reagente de Jones, logo foi submetido à reação com 3eq reagente de Jones por 20min, conforme metodologia descrita na literatura (KIM et al., 2011). A placa de cromatografia revelou que nem todo o álcool fora convertido a aldeído. Na busca por um maior rendimento da reação, foi realizada variações na reação., optou-se por aumentar o tempo reacional, verificando a formação do aldeído e consumo do material de partida por CCD em intervalos de 10 min. A conversão total do álcool a aldeído ocorria em aproximadamente 1h de reação.

Conforme metodologia descrita, após o tempo estimado, a reação era finalizada com bicarbonato de sódio para neutralizar o reagente de Jones e diluída em acetona. Logo em seguida filtrada em celite e seca em rotaevaporador. Ao final do processo, o rendimento foi

de aproximadamente 47%. O RMN do bruto não demonstrou os sinais que elucidam a estrutura de aldeído.

Uma vez que o rendimento foi abaixo do esperado, outra variação na reação foi realizada dessa forma, após a formação do aldeído verificado em CCD, a reação foi cortada com a adição de metanol e em seguida foi diluída com solução saturada de NaCl e extraída com AcOEt, conforme metodologia descrita por Fillion e colaboradores 2005. Com essas variações na reação, o rendimento obtido foi de 86%.

A purificação do isoxazol 2 foi feita em coluna com sílica utilizando hexano:acetato 6:4 como fase móvel. No entanto, houve a formação de subprodutos, o que inviabilizou a obtenção do composto puro para realização das análises de RMN. Uma vez que, ao final das reações, a análise de CCD mostrava a formação de apenas um produto com Rf 0,6 (acima do Rf apresentado pelo material de partida isoxazol 1), optou-se por fazer a análise de RMN do material bruto. No espectro de RMN foi possível observar o sinal característico da presença de aldeído com deslocamento 9-10 ppm. Portanto, optou-se por utilizar o material bruto para a etapa subsequente da reação. A tabela 9 abaixo apresenta as variações nas metodologias realizadas para o aumento do rendimento da reação.

Tabela 12: Variações na metodologia de oxidação

	Variações na metodologia					
	Tempo de reação	Volume do reagente de Jones	Work-up	Filtração	Extração	Rendimento
Isoxazol 2	20 min	3eq	Bicarbonato de sódio	Celite	-	47%
	de 1h	3eq	Bicarbonato de sódio	Celite	-	48%
	de 1h	3eq ou até mudança de coloração	Metanol	-	AcOEt	89%

4.2.2 Reação de aminação reductiva

Aldeídos tratados com aminas primárias ou secundárias na presença de hidrogênio e um catalisador de hidrogenação podem sofrer reação de aminação reductiva. Em um primeiro momento é formado um intermediário imina, que na segunda etapa da reação química a unidade C=N sofre redução por agentes redutores (SMITH; MARCH, 2007).

Inicialmente foi adaptada a metodologia proposta por Fu e colaboradores (2018) a qual utilizava refluxo a 80°C por 12h, hidróxido de sódio como base e metanol como solvente. Em função do período de tempo longo de refluxo, optou-se por realizar a reação em micro-ondas, para otimizar o processo. Portanto, a reação ficou sob irradiação micro-ondas por um total de 6 horas, com intervalos de 30 min a 80°C para a formação da base de schiff, um produto intermediário considerado subclasse de iminas. Após esse período não houve consumo dos reagentes, ou seja, a imina não havia sido formada. Antes de descartar o material, uma vez que o processo de obtenção é demorado e de baixo rendimento, optou-se por deixar a reação sob agitação em temperatura ambiente por 24h, após esse período foi adicionado o agente redutor borohidreto de sódio e a reação permaneceu mais 24h sob agitação em temperatura ambiente. No entanto, o que foi observado na placa de CCD foi a redução do isoxazol-2 a isoxazol-1 pela ação do borohidreto de sódio (KABALKA; VARMA, 1991).

Na busca por contornar o problema apresentado, foi realizada outra tentativa de síntese do derivado latenciado seguindo outra metodologia, onde a base utilizada é a trietilamina e metanol como solvente (LAKE & LINDE, 2012; ABDEL-MAGID et al., 1996). Para compreender o mecanismo da reação e, ainda, devido ao baixo rendimento na purificação do isoxazol 1, o que dificulta a obtenção do seu aldeído isoxazol 2, a metodologia foi testada com o benzaldeído, em função de apresentar o mesmo grupo funcional do isoxazol 2 que será submetido à aminação reductiva.

Ao final da reação, na placa de CCD foi observado que o Rf do benzaldeído era de 0,8, e o produto obtido na reação apresentou também um Rf de 0,8 mas que sob ação do agente revelador ninidrina em câmara UV apresentou uma coloração característica da presença de amina. A ninidrina é capaz de detectar aminas, formando um produto de cor púrpura. E pode, ainda, reagir com aminoácidos (MOORE & STEIN, 1948).

Assim, o isoxazol 2 foi submetido à agitação juntamente com a glicina, na presença de trietilamina e peneira molecular, por 3 horas à temperatura ambiente. Na sequência, foi adicionado borohidreto de sódio em banho de gelo e a reação permaneceu por mais 24h sob agitação, à temperatura ambiente. Ao final do período reacional, foi observada a formação de dois produtos com Rfs diferentes do material de partida (Rf 0,6). Um dos produtos apresentou o mesmo Rf (0,3) do isoxazol 1, o que mostra que essa metodologia também leva à redução

do isoxazol-2 a isoxazol-1. Já o outro produto, que apresentou um $R_f = 0,8$, acreditou-se corresponder ao composto desejado XX. O material foi então submetido à purificação em coluna cromatográfica, utilizando alumina como fase estacionária e mistura de hexano:acetato de etila (6:4). Porém, o composto desejado foi isolado em quantidade insuficiente para realização das análises de RMN em nosso laboratório (0,9 mg).

Ainda, adaptações das metodologias descritas foram feitas na busca pelo aumento do rendimento do produto final. No primeiro momento foi utilizado ácido acético, que conforme a literatura pode ser utilizado para catalisar a reação de aminação redutiva (SMITH; MARCH, 2007). Outra proposta de adaptação foi a utilização do cianoborohidreto de sódio como agente redutor. Em ambos os casos ocorreu a redução do isoxazol **2** a isoxazol **1**.

Antes da etapa de purificação, foi realizada uma análise de RMN ^1H do material bruto, onde foi possível observar sinais que caracterizam a presença do isoxazol **1** **RMN ^1H (300MHz, CDCl_3)** ($\delta = 7,88$ (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, Ar); $7,55$ (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, Ar); $7,28$ (s, 1H, CH-isoxazol); $6,99$ (d, $J = 8,0$, 1H, Ar) $4,72$ (sl, 2H, CH_2). Não foi possível identificar todos os sinais do isoxazol **1** uma vez que a presença de impurezas na amostra provoca ruídos no espectro de RMN e dificulta a análise dos deslocamentos, integrais e constantes de acoplamento contudo, no espectro não foi observada a presença do deslocamento típico de aldeído em $\delta = 9-10$ ppm, o que pode implicar que houve consumo do material de partida isoxazol -2, sendo que uma parte dele foi convertido a isoxazol **1** e houve a formação do produto esperado, o derivado latenciado isoxazol alanina (**RMN ^1H (300MHz, CDCl_3)** ($\delta = 3,35$ (s, 2H, CH_2); $3,10$ (quadrupeto, $J = 7,25$ Hz) CH).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O avanço da química computacional vem contribuindo para a pesquisa e desenvolvimento de novos compostos com potencial candidato a fármaco abordagens *in silico*, por exemplo, representam uma redução no tempo e custos financeiros e operacionais, além de apresentar metodologias que podem interferir diretamente na síntese e avaliação da atividade de novos compostos. Essas abordagens permitiram um conhecimento maior acerca de diversas estruturas responsáveis pelo transporte de fármacos, como os transportadores de peptídeos dependente de prótons, em particular o PEPT1, discutido no presente trabalho. Sua capacidade de transportar peptídeos provenientes da dieta assim como fármacos peptídeo miméticos possibilitou o planejamento dos compostos latenciados apresentados.

O composto isoxazol **1**, previamente sintetizado pelo nosso grupo de pesquisa, apresentou atividade *in vitro* contra a forma amastigota de *trypanosoma cruzi*, no entanto, a sua baixa solubilidade aquosa compromete a absorção por via oral, uma vez que essa é a forma de administração mais utilizada. O processo de latenciação por acoplamento de aminoácidos aumenta a polaridade desses derivados e dessa forma aumenta a viabilidade por administração oral, pois essas moléculas podem ser transportadas pelo transportador de membrana pelo PEPT1.

A avaliação *in silico* dos derivados isoxazólicos mostrou que esses compostos interagem com determinados resíduos de aminoácidos, como o resíduo Arg25, o qual faz parte do sítio ativo do transportador PEPT1 e foi encontrado em todos os derivados isoxazólicos série A, exceto nos derivados isoxazol isoleucina e derivado isoxazol valina. Ainda na série A, outros resíduos que compõem o sítio ativo do transportador foram encontrados realizando interações com os derivados, dentre eles o resíduo Tyr29, Pro65. Dentre os derivados dessa série, o derivado isoxazol triptofano apresentou o maior *score* (91.29) de pontuação no GOLD, mas mostrou interações com apenas três resíduos de aminoácidos do sítio ativo do transportador PEPT1, enquanto o derivado isoxazol isoleucina apresentou um *score* de 76.17, mas mostra interação com sete resíduos dos aminoácidos que fazem parte do sítio ativo do PEPT1.

Os derivados isoxazólicos da série B, apresentaram uma variação nas interações com os resíduos que compõem o sítio ativo do receptor, foi possível observar interações com os resíduos Tyr147, Ser406, Tyr28, Glu402, Ile61e Arg25, Pro65, Tyr291 e Tyr62. A análise dessa série revelou que o derivado isoxazol triptofano tem novamente o maior *score* (85,63), mas interage com apenas três resíduos de aminoácidos que compõem o sítio ativo do receptor, por sua vez o derivado isoxazol valina possui um *score* de 72,47 e apresentou interações com sete resíduos de aminoácidos do sítio ativo do transportador PETP1. Com base nos dados *in silico* é possível o planejamento da síntese dos derivados isoxazólicos.

Os estudos de docking molecular mostraram quais derivados isoxazólicos possuíram um maior *score* de afinidade com o transportador de membrana, assim como os principais resíduos de interação desses compostos. Além disso, ainda é necessário investigar como ocorre a formação do complexo entre os derivados isoxazólicos e o receptor PEPT1, e dessa forma determinar com ainda mais precisão qual o derivado apresenta maior probabilidade de ser carregado pelo transportador de membrana PEPT1. Embora a avaliação da inibição *in vitro* do parasita seja ainda uma importante etapa no desenvolvimento de novas moléculas, a contribuição da química computacional é fundamental para o desenvolvimento racional de novos compostos com atividade tripanocida.

6 CONCLUSÕES

- Foram planejados 40 compostos derivados do isoxazol 1.
- A validação do estudo de *docking* utilizando a estrutura cristalográfica disponibilizada no banco de dados PDB (Protein Data Bank) – 4TPH e o dipeptídeo elaborado para os estudos *in silico* apresentou um RMSD com o valor preconizado na literatura.
- Os estudos de *docking* classificaram por *score* os derivados isoxazólicos com maior aptidão de serem carregados pelo transportador de membrana PEPT1.
- Foram avaliados os principais resíduos de interação entre os 40 derivados isoxazólicos planejados e o transportador PEPT1, os resíduos Arg25, Tyr 28, Tyr 29, Pro65, Ile61, Ser406, Glu402, Tyr147 compõem o sítio ativo do transportador PEPT1 e foram observados realizando interações com os derivados série A e derivados série B
- Nas duas séries de derivados isoxazólicos, o derivado isoxazol triptofano obteve o maior *score* de afinidade pelo transportador PEPT1.
- A avaliação *in silico* das propriedades físico-químicas dos derivados da série A e dos derivados da série B apontou que todos os compostos exceto o derivado isoxazol arginina série A e o derivado isoxazol arginina da série B violam os parâmetros de Lipinski e Veber para que um composto tenha um perfil adequado para absorção por via oral.
- A reação de ciclo-adição 1,3-dipolar para a obtenção do isoxazol 1 foi adaptada num procedimento por irradiação micro-ondas, levando a obtenção do produto final em aproximadamente 20min, enquanto a metodologia tradicional levava em torno de 24h.
- A reação de oxidação com reagente de Jones foi padronizada com 1h de reação com rendimento de 80%.
- A reação de aminação redutiva padronizada mostrou a formação do derivado com o aminoácido acoplado, visível na placa de cromatografia em câmara UV com o agente revelador ninidrina.

7 REFERÊNCIAS

3D Structure Generator CORINA Classic, Molecular Networks GmbH, Nuremberg, Germany. Disponível em: <<http://www.mn-am.com>> Acesso em: 7 junho. 2018.

AKHOON, B. A.; TIWARI, H.; & NARGOTRA, A. In Silico Drug Design Methods for Drug Repurposing. **In Silico Drug Design**, [s.l.], p. 47-84, 2019.

ANDREAS, K. **Molecular modeling of proteins**. 2. Ed. [s.l.] Humana Press, 2015.

AYATI, A.; FALAHATI, M.; IRANNEJAD, H.; EMAMI, S. Synthesis, in vitro antifungal evaluation and in silico study of 3-azoly-4-chromanone phenylhydrazones. **Daru Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 20, n. 1, p. 1-7, 2012.

BAXTER, C. A.; MURRAY, C. W.; CLARK, D. E.; WESTHEAD, D. R.; ELDRIDGE, Matthew D.. Flexible docking using tabu search and an empirical estimate of binding affinity. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, [s.l.], v. 33, n. 3, p. 367-382, 1998.

BERMAN, H. M.. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.

BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 156, p.1-16, 2016.

BRANDSCH, M. Drug transport via the intestinal peptide transporter PEPT1. **Current Opinion In Pharmacology**, [s.l.], v. 13, n. 6, p.881-887, 2013.

BRITO, M. A.; Pharmacokinetic study with computational tools in the medicinal chemistry course. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 47, n. 4, p.797-805, 2011.

CAMPBELL, I. B.; MACDONALD, S. J.; PROCOPIOU, P. A. Medicinal chemistry in drug discovery in big pharma: past, present and future. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.219-234, 2018.

CCDC 2020. Disponível em: <<https://www.ccdc.cam.ac.uk/>>. Acesso em 20 de outubro de 2020.

CHUNG, M. et al. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s.l.], v. 41, n. 2, p.155-180, 2005.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, [s.l.], v. 465, n. 7301, p.6-7, 24, 2010.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. de. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 97, n. 1, p.3-24, 2002.

CRAMER, C. J. **Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models**. 2. Ed. [s.l.], Wiley, 2002.

DE AZEVEDO, W. F. **Docking Screens for Drug Discovery**. [s.l.], Humana Press, 2019.

DEWAR, M. J. S. et al. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 107, n. 13, p.3902-3909, 1985.

ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 43, n. 20, p.3714-3717, 2000.

FAQI, A. S. Introduction. **A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development**, 1. Ed, Elsevier, [s.l.], 2013.

FEASEY, N. et al. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, [s.l.], v. 93, n. 1, p.179-200, 2009.

FEINSTEIN, W. P.; BRYLINSKI, M. Calculating an optimal box size for ligand docking and virtual screening against experimental and predicted binding pockets. **Journal Of Cheminformatics**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 1-10, 2015.

FITZGERALD, G. A. COX-2 and beyond: approaches to prostaglandin inhibition in human disease. **Nature Reviews Drug Discovery**. 2, n. 11, p. 879-890, 2003.

FOKOUÉ, H. PINHEIRO, P.; FRAGA, C.; SANT'ANNA, C. HÁ ALGO NOVO NO RECONHECIMENTO MOLECULAR APLICADO À QUÍMICA MEDICINAL? **Química Nova**, [s.l.], p. 1-12, 2020.

GOLD User Guide, Release Update 3. Cambridge Crystallographic Data Centre, 2019. Disponível em: <<http://www.ccdc.cam.ac.uk>>.

GOSLING, A. F.; GELAPE, C. L. Chagas Disease and the Kissing Bug: An Invisible Giant. **Journal Of Cardiothoracic And Vascular Anesthesia**, [S.L.], v. 33, n. 8, p. 2349-2350, 2019

GUETTOU, F. et al. Selectivity mechanism of a bacterial homolog of the human drug-peptide transporters PEPT1 and PEPT2. **Nature Structural & Molecular Biology**, [s.l.], v. 21, n. 8, p.728-731, 2014.

HAIPOUR, A. R; RAFIEEA, F.; RUOHO, E. A rapid and convenient method for the synthesis of aldoimes under microwave irradiation using in situ generated ionic liquids. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 7, n. 1, p. 114-118, 2010.

HARDIANTO, A.; YUSUF, M.; LIU, F.; RANGANATHAN, S. Structure-Based Drug Design Workflow. **Encyclopedia Of Bioinformatics And Computational Biology**, [s.l.], p. 273-282, 2019.

HARPER, N. J. Drug Latentiation. **Journal Of Medicinal And Pharmaceutical Chemistry**. [s.l.], v. 1, n. 5, p.467-500, 1959.

HIMO, F.; LOVELL, T.; HILGRAF, R.; ROSTOVTSEV, V. V.; NOODLEMAN, L.; SHARPLESS, K. B.; FOKIN, V. V. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. **Journal Of The American Chemical Society**, [S.L.], v. 127, n. 1, p. 210-216, 2005

HUSAIN, A. et al. Synthesis, molecular properties, toxicity and biological evaluation of some new substituted imidazolidine derivatives in search of potent anti-inflammatory agents. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s.l.], v. 24, n. 1, p.104-114, 2016.

J. B. Foresman, *Æ* Frisch. **Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods**. [s.l.], 3. Ed. Gaussian, 2015.

KALYAANAMOORTHY, S.; CHEN, Y. P. Structure-based drug design to augment hit discovery. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 16, n. 17-18, p. 831-839, 2011.

KENAKIN, T. P. **Pharmacology in Drug Discovery and Development: Understanding Drug Response**. [s.l.], 2. Ed. Academic Press, 2017.

KHANNA, V.; RANGANATHAN, S.; PETROVSKY, N. Rational Structure-Based Drug Design. **Encyclopedia Of Bioinformatics And Computational Biology**, [s.l.], p.585-600, 2019.

KIM, D.; BOLLA, K.; LEE, S.; HAM, J. One-pot preparation of hydroxylated potassium organotrifluoroborates and subsequent Jones oxidation to potassium organocarbonyltrifluoroborates. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 67, n. 6, p. 1062-1070, 2011.

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 3, n. 11, p.935-949, 2004.

KONTOYIANNI, M.; MCCLELLAN, L. M.; SOKOL, G. S. Evaluation of Docking Performance: Comparative Data on Docking Algorithms. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 47, n. 3, p.558-565, 2004.

KORB, O.; STÜTZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical Scoring Functions for Advanced Protein–Ligand Docking with PLANTS. **Journal of Chemical Information And Modeling**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.84-96, 2009.

LEAL, S. M. In vitro Antileishmanial, Trypanocidal and Mammalian Cell Activities of Diverse N,N'-Dihetaryl Substituted Diamines and Related Compounds. **Scientia Pharmaceutica**, [s.l.], v. 81, n. 1, p.43-55, 2013.

LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D.A.; ROCHE, V.F.; ZITO, S.W. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 7. Ed. Wolters Kluwer Health Adis, 2012.

LEWIS, M. D.; FRANCISCO, A. F.; JAYAWARDHANA, S.; LANGSTON, H.; TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M. Imaging the development of chronic Chagas disease after oral transmission. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.

LIEBESCHUETZ, J. W.; COLE, J. C.; KORB, O. Pose prediction and virtual screening performance of GOLD scoring functions in a standardized test. **Journal Of Computer-Aided Molecular Design**, [s.l.], v. 26, n. 6, p. 737-748, 2012

LIPINSKI, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal Of Pharmacological And Toxicological Methods**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.235-249, 2000.

ZHU, L.; LU, L.; WANG, S.; WU, J.; SHI, J.; YAN, T.; XIE, C.; LI, Q.; HU, M.; LIU, Z. Oral Absorption Basics: Pathways and Physicochemical and Biological Factors Affecting Absorption. In: QIU, Y. **Developing Solid Oral Dosage Forms, Pharmaceutical Theory And Practice**. 2. Ed. Academic Press, p265-288, 2009.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery — then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 3, n. 10, p.853-862, 2004.

MACALINO, S. et al. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. **Archives Of Pharmacal Research**, [s.l.], v. 38, n. 9, p.1686-1701, 2015.

MAYA, J. D. et al. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. **Biological Research**, [s.l.], v. 43, n. 3, p.323-331, 2010.

MELOS, J. L. R.; ECHEVARRIA, A. Trypanosomatids Metabolic Systems as Potential Chemotherapeutic Targets. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 4, n. 4, p.374-392, 2012

MENG, X et al. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. **Current Computer Aided-drug Design**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.146-157, 2011.

NAGASAWA, H. T.; ELBERLING, J. A.; SHIROTA, F. N. Potential latentiation forms of biologically active compounds based on action of leucine aminopeptidase. Dipeptide derivatives of the tricycloaliphatic .alpha.-amino acid, adamantanine. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 18, n. 8, p.826-830, 1975.

PALM, K. et al. Correlation of Drug Absorption with Molecular Surface Properties. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 85, n. 1, p.32-39, 1996.

PALOMO, J. M. Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides. **Rsc Adv.**, [s.l.], v. 4, n. 62, p. 32658-32672, 2014.

PATRICK, G. An introduction to medicinal chemistry. 5. Ed. [s.l.] **Oxford University Press**, 2013.

PETROU, C.; SARIGIANNIS, Y. Peptide synthesis. **Peptide Applications In Biomedicine, Biotechnology And Bioengineering**, [s.l.], p. 1-21, 2018.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, [s.l.], v. 1, n. 2, p.92-100, 2001.

RASSI, A; MARIN-NETO, J A. Chagas disease. **The Lancet**, [s.l.], v. 375, n. 9723, p.1388-1402, 2010.

ROSA, R da et al. Design and synthesis of a new series of 3,5-disubstituted isoxazoles active against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 128, p.25-35, 2017.

RUBIO-ALIAGA, I.; DANIEL, H. Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery. **Trends In Pharmacological Sciences**, [s.l.], v. 23, n. 9, p.434-440, 2002.

SAI Y. Biochemical and Molecular Pharmacological Aspects of Transporters as Determinants of Drug Disposition. **Drug Metabolism And Pharmacokinetics**, [s.l.], v. 20, n. 2, p.91-99, 2005.

SCARIM, C. B. et al. Current advances in drug discovery for Chagas disease. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 155, p.824-838, 2018.

SILVA, T. F. Medicinal Chemistry Approaches to Design of Drug Prototypes. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 5, n. 5, p.921-944, 2013.

SOUSA, S. F. et al. Protein-Ligand Docking in the New Millennium – A Retrospective of 10 Years in the Field. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 20, n. 18, p.2296-2314, 2013.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. **Journal of Computational Chemistry**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.209-220, 1989.

STROMGAARD K.; KROGSGAARD-LARSEN P.; MADSEN U. **Textbook of Drug Design and Discovery**. 5. ed. [s.l.], CRC Press, 2002.

GUND T. **Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design**. 1. Ed. [s.l.], Academic Press, 1996.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. Chagas disease. **Postgraduate Medical Journal**, [s.l.], v. 82, n. 974, p.788-798, 2006.

TERADA, T.; SAITO, H.; INUI, K. Interaction of β -Lactam Antibiotics with Histidine Residue of Rat H+/Peptide Cotransporters, PEPT1 and PEPT2. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 273, n. 10, p.5582-5585, 1998.

THEOPHIL, E.; SIEGFRIED, H.; ANDREAS, S. **The Chemistry of Heterocycles. Structure, Reactions, Synthesis, and Applications**. 2. Ed. [s.l.], Wiley-VCH, 2003.

TOMAR, V.; MAZUMDER, M.; CHANDRA, R.; YANG, J.; SAKHARKAR, M. K. Small Molecule Drug Design. **Encyclopedia Of Bioinformatics And Computational Biology**, [S.L.], p. 741-760, 2019.

TORRICO, F.; GASCON, J.; ORTIZ, L.; ALONSO-VEGA, C.; PINAZO, M.; SCHIJMAN, A.; ALMEIDA, I. C.; ALVES, F.; STRUB-WOURGAFT, N.; RIBEIRO, I. Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 18, n. 4, p. 419-430, 2018.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 115, n. 1-2, p.55-68, jul. 2010.

VAN NORMAN, G. A. Drugs, Devices, and the FDA: Part 1. **Jacc: Basic to Translational Science**, [s.l.], v. 1, n. 3, p.170-179, 2016.

VEBER, D F. et al., Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 45, n. 12, p.2615-2623, 2002.

VIJI, A.; BALACHANDRAN, V.; BABIYANA, S.; NARAYANA, B.; SALIYAN, Vinutha V. Molecular docking and quantum chemical calculations of 4-methoxy-{2-[3-(4-chlorophenyl)-5-(4-(propane-2-yl) PHENYL)-4, 5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl]- 1, 3-thiazol-4-yl}phenol. **Journal Of Molecular Structure**, [S.L.], v. 1203, p. 127452-127473, 2020.

WANG, T et al. Advances in Computational Structure-Based Drug Design and Application in Drug Discovery. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 16, n. 9, p.901-916, 2015.

ZHANG, Z; TANG, W. Drug metabolism in drug discovery and development. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [s.l.], v. 8, n. 5, p.721-732, 2018.

ZHU, Lu et al. ADME properties evaluation in drug discovery: in silico prediction of blood–brain partitioning. **Molecular Diversity**, [s.l.], v. 22, n. 4, p.979-990, 2018.

ZIMMERMANN, L A. et al. Synthesis and SAR of new isoxazole-triazole bis-heterocyclic compounds as analogues of natural lignans with antiparasitic activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 26, n. 17, p.4850-4862, 2018.

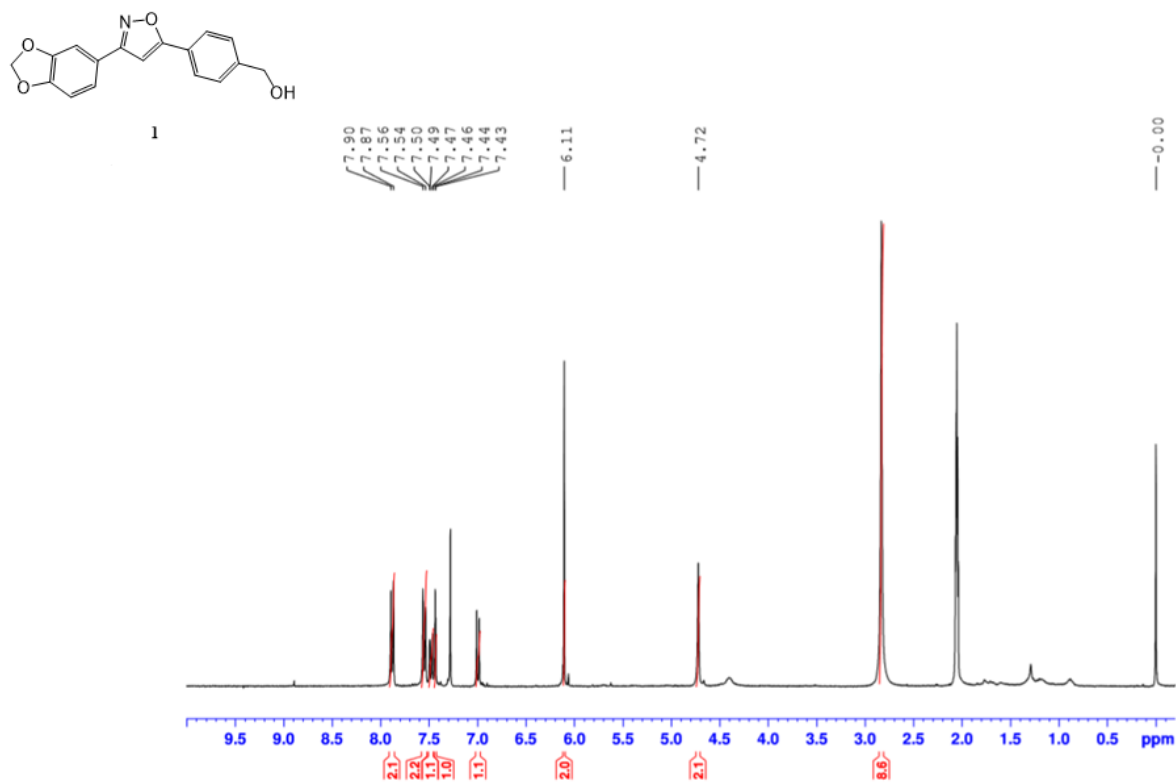
8 ANEXOS

Anexo 1. Tabela de valores de minimização de energia final dos derivados isoxazólicos série A

Derivados izoxazólicos série A	
Aminoácido acoplado	Valor de energia final (kcal/mol)
Aspartato	-128914,68
Glutamato	-132508,71
Alanina	-111169,09
Arginina	-136562,74
Asparagina	-126610.46
Cisteína	-115648.95
Fenilalanina	-130141.55
Glicina	-107581.11
Glutamina	-130199.38
Histidina	-130176.11
Isoleucina	-121945.69
Leucina	-121947.05
Lisina	-127037.87
Metionina	-122836.05
Prolina	-117704.89
Serina	-118563.38
Tirosina	-137535.93
Treonina	-122152.75
Triptofano	-141120.22
Valina	-118353.25

Anexo 2. Tabela de valores de minimização de energia derivados isoxazólicos série B

Derivados izoxazólicos série B	
Aminoácido acoplado	Valor de energia final (kcal/mol)
Ácido aspártico	-128908.70
Glutamato	-132501.05
Alanina	-111164.84
Arginina	-136559.11
Asparagina	-126604.59
Cisteína	-115643.77
Fenilalanina	-130137.28
Glicina	-107574.95
Glutamina	-130197.69
Histidina	-130172.11
Isoleucina	-121938.69
Leucina	-121939.70
Lisina	-127035.20
Metionina	-122828.87
Prolina	-117702.28
Serina	-118557.68
Tirosina	-137529.73
Treonina	-122146.14
Triptofano	-141115.12
Valina	-118348.32

Anexo 3. Espectro de ^1H NMR do composto isoxazol **1** (300MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{COCD}_3$)Anexo 4. Tabela com os valores de *score* obtidos nos estudos de docking molecular dos derivados isoxazólicos série A no GOLD.

Score	S(PLP)	S(hbond)	S(cho)	S(metal)	DE(clash)	DE(tors)	intcor	RMS(heavy)	Tempo	Nome do arquivo	Nome do ligante
91.29	-82.99	4.23	0.00	0.00	0.00	2.26	0.14	8.167	602.001	Triptofano_m1_75	Triptofano
89.74	-85.96	2.61	0.00	0.00	0.00	2.14	0.22	8.678	690.000	Tirosina_m1_170	Tirosina
86.78	-79.77	3.62	0.00	0.00	0.00	2.03	0.22	8.555	595.000	Fenilalanina_m1_46	Fenilalanina
86.11	-71.78	5.33	0.00	0.00	0.00	1.18	0.30	8.121	787.999	Arginina_m1_21	Arginina
84.67	-74.78	4.64	0.00	0.00	0.00	2.15	0.27	9.264	574.000	Leucina_m1_136	Leucina
84.46	-75.38	4.57	0.00	0.00	0.00	2.49	0.22	9.268	639.000	Metionina_m1_38	Metionina
83.28	-73.72	5.31	0.00	0.00	2.97	1.76	0.13	8.762	843.001	Lisina_m1_295	Lisina
82.50	-72.25	3.90	0.00	0.00	0.00	0.78	0.11	8.304	639.000	Histidina_m1_79	Histidina
80.79	-66.62	6.21	0.00	0.00	0.00	2.33	0.10	8.535	712.000	Glutamina_m1_192	Glutamina
79.61	-71.02	3.80	0.00	0.00	0.00	1.50	0.19	9.049	699.000	Ácido glutâmico_m1_274	Ácido glutâmico
77.97	-71.02	3.46	0.00	0.00	0.00	1.82	0.13	9.025	624.000	Asparagina_m1_63	Asparagina
76.17	-72.78	1.99	0.00	0.00	0.00	1.38	0.17	5.722	579.000	Isoleucina_m1_145	Isoleucina
75.68	-68.61	3.20	0.00	0.00	0.00	1.30	0.07	8.790	604.000	Treonina_m1_116	Treonina
73.24	-60.69	5.91	0.00	0.00	0.00	2.64	0.10	8.748	615.000	Ácido aspártico_m1_127	Ácido aspártico
73.18	-68.28	2.51	0.00	0.00	0.00	1.36	0.08	9.099	541.000	Cisteína_m1_96	Cisteína
72.84	-69.84	1.92	0.00	0.00	0.00	1.44	0.12	5.306	484.001	Valina_m1_245	Valina
71.89	-62.44	3.74	0.00	0.00	0.00	0.97	0.11	8.974	580.999	Serina_m1_58	Serina
68.90	-67.23	1.00	0.00	0.00	0.00	0.70	0.05	11.863	381.000	Prolina_m1_128	Prolina
67.51	-64.07	2.00	0.00	0.00	0.00	1.33	0.06	9.499	427.000	Alanina_m1_60	Alanina
66.19	-59.54	2.99	0.00	0.00	0.00	1.18	0.03	9.340	414.000	Glicina_m1_271	Glicina

Anexo 5 Tabela de valores do Ranking obtidos nos estudos de docking molecular dos derivados isoxazólicos série B no GOLD.

Score	S(PLP)	S(hbond)	S(cho)	S(metal)	DE(clash)	DE(tors)	intcor	RMS(heavy)	Tempo	Nome do arquivo	Nome do ligante
85.63	-82.05	2.37	0.00	0.00	0.00	1.90	0.25	8.224	656.000	Triptofano_m1_144	Triptofano
83.71	-86.46	0.00	0.00	0.00	0.00	1.47	0.20	9.193	641.000	Fenilalanina_m1_263	Fenilalanina
82.27	-82.10	1.40	0.00	0.00	0.00	2.21	0.23	11.163	749.001	Tirosina_m1_20	Tirosina
80.09	-67.88	5.09	0.00	0.00	0.00	1.66	0.17	5.633	726.000	Ácido glutâmico_m1_42	Ácido glutâmico
79.64	-73.91	3.36	0.00	0.00	0.15	2.19	0.19	8.516	676.000	Histidina_m1_270	Histidina'
78.89	-67.66	3.99	0.00	0.00	0.00	0.49	0.24	7.266	877.000	Arginina_m1_217	Arginina
76.09	-68.40	3.45	0.00	0.00	0.00	1.48	0.18	5.334	711.000	Glutamina_m1_205	Glutamina
75.91	-75.27	1.12	0.00	0.00	0.00	1.46	0.21	8.859	829.000	Lisina_m1_167	Lisina
74.80	-64.67	4.26	0.00	0.00	0.00	1.42	0.07	5.424	616.000	Ácido aspártico_m1_141	Ácido aspártico
74.34	-71.16	2.71	0.00	0.00	0.00	2.62	0.21	8.839	665.001	Metionina_m1_66	Metionina
73.97	-72.26	1.57	0.00	0.00	0.00	1.61	0.21	10.447	622.001	Isoleucina_m1_113	Isoleucina
73.91	-73.04	1.42	0.00	0.00	0.00	1.79	0.18	10.211	614.000	Leucina_m1_73	Leucina
73.49	-69.87	2.40	0.00	0.00	0.00	1.86	0.09	8.647	630.000	Treonina_m1_40	Treonina
72.61	-64.44	4.35	0.00	0.00	0.00	2.65	0.18	5.187	664.001	Asparagina_m1_14	Asparagina
72.47	-70.60	1.59	0.00	0.00	0.00	1.53	0.15	5.293	528.000	Valina_m1_75	Valina
70.57	-69.76	1.00	0.00	0.00	0.00	1.13	0.03	10.001	417.000	Prolina_m1_75	Prolina
70.28	-63.75	3.18	0.00	0.00	0.00	1.59	0.08	8.308	604.000	Serina_m1_28	Serina
68.45	-63.50	2.66	0.00	0.00	0.00	1.57	0.12	8.993	584.001	Cisteína_m1_131	Cisteína
67.36	-68.61	1.00	0.00	0.00	0.00	2.15	0.05	11.152	483.000	Alanina_m1_179	Alanina
65.84	-61.62	2.48	0.00	0.00	0.00	1.63	0.02	8.916	457.000	Glicina_m1_200	Glicina