

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Busca de Produtos Naturais como Inibidores
Específicos de Enzimas

RICHELE PRISCILA SEVERINO*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

*** Bolsista FAPESP**

São Carlos - SP
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S498bp

Severino, Richele Priscila.

Busca de produtos naturais como inibidores específicos de enzimas / Richele Priscila Severino. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

244 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Produtos naturais. 2. Inibidores enzimáticos. 3. Trypanosoma cruzi. 4. Catepsinas lisossomais. 5. Cinética enzimática. I. Título.

CDD: 547.3 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

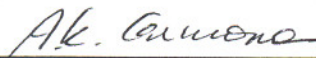
*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado da candidata **Richele Priscila Severino**, realizada em 24 de outubro de 2008:*



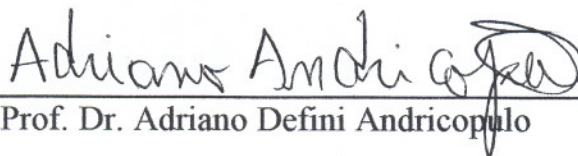
Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira



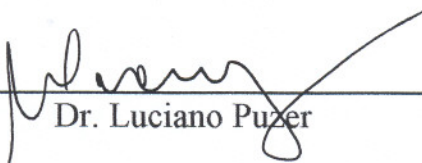
Prof. Dr. João Batista Fernandes



Profa. Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona



Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo



Dr. Luciano Puzer

*“Nunca ande pelo caminho traçado,
pois ele conduz somente até onde os
outros já foram”.*

Graham Bell

Dedico este trabalho...

A duas grandes mulheres, minha mãe Edinete e minha irmã Raiane, meus maiores exemplos de vida, amor e perseverança.

Ao meu pai Laércio e meu irmão Maico, que sempre estiveram ao meu lado.

Ao meu esposo Hudson, pelo amor, carinho e renúncia. Uma pessoa maravilhosa que sempre soube apoiar e respeitar minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira pela amizade, orientação e ensinamentos transmitidos sempre com muita ética e seriedade.

Ao Prof. Dr. João Batista Fernandes, por ter me aceito como sua aluna sem mesmo conhecer-me. Agradeço pela confiança deposita, pelos ensinamentos, amizade e grande carinho durante estes anos de convivência.

Aos demais professores, Dra. Maria Fátima G. F. da Silva, Dr. Edson Rodrigues Filho, Dra. Arlene Gonçalves Corrêa e Dra. Quézia Bezerra Cass, pela amizade e colaborações.

À Profa. Dra. Adriana K. Carmona da UNIFESP, que me proporcionou conhecer o mundo fascinante das cisteíno peptidases. Obrigada pelos ensinamentos, carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Dieter Brömme da University of British Columbia - UBC por me acolher e me ajudar a desenvolver os ensaios enzimáticos com as catepsinas lisossomais. Aos amigos da University of British Columbia - UBC, em especial a Jadwiga Kaleta.

Ao Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo e ao Dr. Rafael V. C. Guido, ambos do IFSC-USP, pela colaboração nos estudos de modelagem molecular e cinética enzimática.

*Ao Prof. Dr. Glaucius Oliva (IFSC-USP) pela realização dos ensaios na enzima gGAPDH e ao Prof. Dr. Sérgio Albuquerque pela realização dos ensaios em *T. cruzi* (FCFRP-USP).*

Aos professores Dra. Heloísa Araújo do Departamento de Ciências Fisiológicas e Dr. Flávio H. da Silva do Departamento de Genética, ambos da UFSCar, pelas colaborações e contribuições.

Aos demais professores do DQ-UFSCar pela contribuição na minha formação.

Aos funcionários e técnicos do DQ-UFSCar.

Aos meus amigos, alunos e ex-alunos dos laboratórios de Produtos Naturais e de Síntese de Produtos Naturais da UFSCar, pela amizade, companhia, incentivo, prontidão e por me proporcionarem momentos tão felizes. Impossível nomeá-los sem cometer falhas...

Agradeço em especial ao Emerson e a Nádia, obrigada por tudo, além da sincera e sólida amizade.

Aos meus amigos Luciano e Márcio que contribuíram muito para a realização deste trabalho. Obrigada pelo apoio constante!

Aos amigos feitos em São Carlos, dentro e fora da universidade, durante esses dez anos... obrigada pela amizade e convivência.

Aos professores Dr. Roberto G. de S. Berlinck, Dr. André L. M. Porto e aos amigos do IQSC-USP pela amizade e compreensão, especialmente nestes últimos meses.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho... muito obrigada!

Aos meus amigos e familiares pelo constante incentivo e compreensão, principalmente nos momentos de ausência. Valeu pela torcida!

Aos meus pais Laércio e Edinete, que muitas vezes sem mesmo entender meus objetivos, nunca mediram esforços para minhas realizações pessoais e profissionais, sempre me incentivando para que tudo fosse alcançado com muita responsabilidade, honestidade e para que eu nunca desistisse diante das dificuldades.

Aos meus irmãos Raiane e Maico pelo amor e desprendimento, por estarem sempre ao meu lado incentivando e aconselhando nos momentos mais difíceis. Também ao meu "pequeno" e grande amigo André por tornar meus dias mais felizes.

Ao Hudson por fazer parte da minha vida de um modo tão especial, tornando tudo mais prazeroso e fácil de ser conseguido, sempre com sua presença incondicional.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

A Deus pela minha existência e oportunidade de viver tudo isso.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico em partes por milhão (ppm)
ϕ	Diâmetro
AcN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
Act	Acetona
Asn	Asparagina
cat	Catepsina
CC	Cromatografia de adsorção em coluna aberta
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
Cys	Cisteína
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
Dic	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d_6	Dimetilsulfóxido deuterado
DTE	Ditioeritritol
E-64	L-3-carboxi-trans-2,3-epoxipropionil-leucilamido(4-guanino)butano)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EI	Complexo enzima-inibidor
ES	Complexo enzima-substrato
ESI	Complexo ternário enzima-substrato-inibidor
G-3-P	Gliceraldeído-3-fosfato
gGAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal
Glu	Ácido glutâmico
h	Altura

Hex	Hexano
His	Histidina
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
IC ₅₀	Potência inibitória
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
kDa	Kilodalton (10 ³ g/mol)
<i>K_i</i>	Constante de dissociação do complexo EI (constante de afinidade)
<i>K_m</i>	Constante de Michaelis-Menten
L	Litro
m	Multiplete
M	Molar (mol/L)
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
MHz	Mega hertz
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo – forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo – forma reduzida
NCE	Nova entidade química
<i>n</i> -PrOH	<i>n</i> -Propanol
°C	Graus Celsius
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PENDANT	<i>Polarization Enhancement Nurtured During Attached Nucleus Testing</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
R _f	Fator de retenção
RLCC	Cromatografia locular em contracorrente (<i>Rotation Locular Countercurrent Chromatography</i>)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Singleto
t	Tripleto
Tio-NAD ⁺	Tionicotinamida adenina dinucleotídeo – forma oxidada
TMS	Tetrametil-silano
UV	Ultravioleta
V_m	Velocidade máxima de reação
Z-RR-MCA	Carbobenzoxi-arginina-arginina-7-amino-4-metilcumarina
Z-FR-MCA	Carbobenzoxi-fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação
ν_{max}	Frequência em cm^{-1}

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Composição percentual do líquido viscoso da casca da castanha (LCC) natural brasileiro.....	009
TABELA 3.1 - Massa dos extratos das casca da castanha de <i>A. occidentale</i>	025
TABELA 3.2 - Fracionamento do sólido precipitado do extrato metanólico (AOS).....	025
TABELA 3.3 - Frações obtidas do fracionamento de AOS1	026
TABELA 3.4 - Sistemas testados para utilização no RLCC para o fracionamento de AOD	029
TABELA 3.5 - Condições utilizadas para o fracionamento de AOD utilizando RLCC.....	030
TABELA 3.6 - Amostras obtidas por reação de precipitação a partir do extrato diclorometânico AOD	033
TABELA 3.7 - Condições do meio reacional para a realização dos ensaios na enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i> totalizando um volume de 1 mL.....	037
TABELA 4.1 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da flavanona I.....	049
TABELA 4.2 - Correlações de ¹ H- ¹ H observadas no experimento de COSY para a flavanona I....	050
TABELA 4.3 - Correlações de ¹ H- ¹³ C a <i>J</i> ¹ da flavanona I observadas no experimento de HSQC.	051
TABELA 4.4 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da flavanona II.....	054
TABELA 4.5 - Sistemas testados utilizando RLCC para o fracionamento do extrato diclorometânico (AOD).....	056
TABELA 4.6 - Condições utilizadas no fracionamento do extrato diclorometânico utilizando RLCC.....	058
TABELA 4.7 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C do cardanol III (CDCl ₃ , 200 e 50 MHz).....	061
TABELA 4.8 - Quantidade de material de partida, do produto e rendimento total para a reação de hidrogenação da mistura de ácidos anacárdicos AC	065
TABELA 4.9 - Quantidade de material de partida, produto e rendimento total para reação de esterificação de AC 1	069
TABELA 4.10 - Quantidade de material de partida, do produto e rendimento total e para a reação de redução de AC 2	072
TABELA 4.11 - Quantidade de material de partida, do produto e rendimento total da reação de acetilação de AC 1	075
TABELA 4.12 - Quantidade de material de partida, do produto e rendimento total da reação de dimetilação de AC1	077
TABELA 4.13 - Quantidade de material de partida, do produto e rendimento total da reação de ozonólise da fração AC	079
TABELA 4.14 - Inibição dos extratos e frações de <i>A. occidentale</i> frente à enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i>	082
TABELA 4.15 - Inibição das substâncias derivadas do ácido anacárdico frente à enzima gGAPDH.....	083
TABELA 4.16 - Derivados do ácido anacárdico sintetizados por Pereria (PEREIRA <i>et al.</i> , 2008).	085
TABELA 4.17 - Resultados da triagem biológica dos compostos frente à enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i>	086
TABELA 4.18 - Valores de <i>K_i</i> e αK_i para os inibidores não-competitivos da enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i>	087
TABELA 4.19 - Porcentagem de lise dos extratos de <i>A. occidentale</i> nos ensaios tripanocidas.....	088

TABELA 4.20 - Porcentagem de lise do precipitado AOS nos ensaios tripanocidas.....	089
TABELA 4.21 - Valores de IC ₅₀ determinados para as substâncias puras nos ensaios tripanocidas.....	089
TABELA 5.1 - Catepsinas lisossomais, localização e função fisiopatológica.....	097
TABELA 8.1 - Dados utilizados no desenvolvimento da metodologia de triagem de inibidores.....	137
TABELA 8.2 - Porcentagem de inibição dos derivados do ácido cinâmico e diidrocinâmico na concentração de 25 µM.....	142
TABELA 8.3 - Porcentagem de inibição das cumarinas preniladas e outras cumarinas na concentração de 25 µM.....	143
TABELA 8.4 - Porcentagem de inibição das pirano cumarinas na concentração de 25 µM.....	144
TABELA 8.5 - Porcentagem de inibição das furano cumarinas na concentração de 25 µM.....	145
TABELA 8.6 - Porcentagem de inibição dos limonóides testados na concentração de 25 µM.....	145
TABELA 8.7 - Porcentagem de inibição para triterpenos do tipo ursânico testados na concentração de 25 µM.....	147
TABELA 8.8 - Porcentagem de inibição para diferentes triterpenos testados na concentração de 25 µM.....	148
TABELA 8.9 - Porcentagem de inibição de alguns ácidos e derivados quando testados na concentração de 25 µM.....	149
TABELA 8.10 - Porcentagem de inibição das amidas naturais testadas na concentração de 25 µM.....	150
TABELA 8.11 - Porcentagem de inibição das lignanas testadas na concentração de 25 µM.....	151
TABELA 8.12 - Porcentagem de inibição das flavonas polimetoxiladas testadas na concentração de 25 µM.....	152
TABELA 8.13 - Porcentagem de inibição das flavonas com diferentes substituintes testadas na concentração de 25 µM.....	154
TABELA 8.14 - Porcentagem de inibição das flavonas substituídas com anel pirano testadas na concentração de 25 µM.....	155
TABELA 8.15 - Porcentagem de inibição das flavonas substituídas com anel furano testadas na concentração de 25 µM.....	155
TABELA 8.16 - Porcentagem de inibição para flavanonas substituídas na posição 3 testadas na concentração de 25 µM.....	156
TABELA 8.17 - Porcentagem de inibição para flavanonas com diferentes substituintes testadas na concentração de 25 µM.....	157
TABELA 8.18 - Porcentagem de inibição para a chalcona e a diidrochalcona testadas na concentração de 25 µM.....	158
TABELA 8.19 - Porcentagem de inibição dos alcalóides quinolínicos testados na concentração de 25 µM.....	159
TABELA 8.20 - Porcentagem de inibição dos alcalóides furoquinolínicos testados na concentração de 25 µM.....	160
TABELA 8.21 - Porcentagem de inibição dos alcalóides indolpiridoquinazolínicos testados na concentração de 25 µM.....	161
TABELA 8.22 - Porcentagem de inibição dos alcalóides cantinônicos testados na concentração de 25 µM.....	161
TABELA 8.23 - Porcentagem de inibição dos alcalóides acridônicos prenilados testados na concentração de 25 µM.....	162
TABELA 8.24 - Porcentagem de inibição dos alcalóides acridônicos testados na concentração de 25 µM.....	163

TABELA 8.25 - Porcentagem de inibição dos alcalóides acridônicos tetracíclicos testados na concentração de 25 μM	164
TABELA 8.26 - Porcentagem de inibição para amidas sintéticas que possuem Cl e NO ₂ como substituintes do anel B testadas na concentração de 25 μM	165
TABELA 8.27 - Porcentagem de inibição para amidas sintéticas, com diferentes substituintes no anel B, testadas na concentração de 25 μM	167
TABELA 8.28 - Porcentagem de inibição para diferentes amidas testadas na concentração de 25 μM	168
TABELA 8.29 - Porcentagem de inibição para amidas com diferentes padrões de substituição testadas na concentração de 25 μM	169
TABELA 8.30 - Porcentagem de inibição para peptídeos com diferentes espaçadores testados na concentração de 25 μM	171
TABELA 8.31 - Porcentagem de inibição para o grupo (I) dos derivados fenólicos testados na concentração de 25 μM	172
TABELA 8.32 - Porcentagem de inibição para o grupo (II) dos derivados fenólicos testados na concentração de 25 μM	173
TABELA 8.33 - Porcentagem de inibição para o grupo (III) dos derivados fenólicos testados na concentração de 25 μM	174
TABELA 8.34 - Porcentagem de inibição para o grupo (IV) dos derivados fenólicos testados na concentração de 25 μM	174
TABELA 8.35 - Porcentagem de inibição para o grupo (V) dos derivados fenólicos testados na concentração de 25 μM	175
TABELA 8.36 - Porcentagem de inibição para o grupo (VI) dos derivados fenólicos testados na concentração de 25 μM	176
TABELA 8.37 - Porcentagem de inibição para o grupo (VII) dos derivados fenólicos testados na concentração de 25 μM	176
TABELA 8.38 - Porcentagem de inibição para o grupo (VIII) dos derivados fenólicos testados na concentração de 25 μM	177
TABELA 8.39 - Porcentagem de inibição para retro-chalconas testadas na concentração de 25 μM	178
TABELA 8.40 - Porcentagem de inibição para éteres sintéticos testados na concentração de 25 μM	179
TABELA 8.41 - Porcentagem de inibição das chalconas com diferentes substituintes testadas na concentração de 25 μM	181
TABELA 8.42 - Porcentagem de inibição de chalconas com diferentes substituintes no anel B, testadas na concentração de 25 μM	182
TABELA 8.43 - Porcentagem de inibição de chalconas dimetoxiladas no anel B e com diferentes substituintes do anel A, testadas na concentração de 25 μM	183
TABELA 8.44 - Porcentagem de inibição das chalconas substituídas por metoxilas no anel A, testadas na concentração de 25 μM	184
TABELA 8.45 - Porcentagem de inibição de flavonas com diferentes substituintes no anel A e B, testadas na concentração de 25 μM	185
TABELA 8.46 - Porcentagem de inibição de flavonas testadas na concentração de 25 μM	186
TABELA 8.47 - Porcentagem de inibição de flavonas dimetoxiladas no anel A testadas na concentração de 25 μM	188
TABELA 8.48 - Porcentagem de inibição de flavonas substituídas na posição 6 do anel A por um átomo de flúor, testadas na concentração de 25 μM	189
TABELA 8.49 - Porcentagem de inibição de flavonas substituídas na posição 6 do anel A com um grupo metoxila, testadas na concentração de 25 μM	190

TABELA 8.50 - Porcentagem de inibição de cumarinas metoxiladas na posição 7, testadas na concentração de 25 μM	191
TABELA 8.51 - Porcentagem de inibição de cumarinas testadas na concentração de 25 μM	192
TABELA 8.52 - Porcentagem de inibição dos intermediários sintéticos com diferentes substituintes no anel A e B, testados na concentração de 25 μM	193
TABELA 8.53 - Porcentagem de inibição dos intermediários sintéticos com diferentes substituintes no anel A e metoxilados na posição 6, testados na concentração de 25 μM	194
TABELA 8.54 - Porcentagem de inibição dos intermediários sintéticos com diferentes substituintes no anel A e substituídos na posição 6 por um grupo NO_2 , testados na concentração de 25 μM	195
TABELA 8.55 - Porcentagem de inibição dos alcalóides acridônicos testados na concentração de 25 μM	196
TABELA 8.56 - Porcentagem de inibição dos alcalóides 4-quinolínicos-2-substituídos, testados na concentração de 25 μM	197
TABELA 8.57 - Avaliação da potência da série de produtos naturais frente à catepsinaV.....	199
TABELA 8.58 - Determinação da afinidade para uma série de alcalóides frente à catepsina V.....	202

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Diferentes fontes de agentes terapêuticos.....	006
FIGURA 1.2 - Constituintes fenólicos de <i>A. occidentale</i> L.....	008
FIGURA 1.3 - (A) Incidência da Doença de Chagas na América Latina. (B) Distribuição geográfica do inseto-vetor causador da Doença de Chagas (PAHO, 2008).....	010
FIGURA 1.4 - Ciclo de vida do protozoário <i>T. cruzi</i>	012
FIGURA 1.5 - Estruturas químicas dos fármacos nifurtimox e benzonidazol e do agente esterilizante violeta genciana.....	013
FIGURA 1.6 - Metabolismo da glicólise e do glicerol no glicossoma. Enzimas envolvidas: 1. HK (hexoquinase); 2. PGI (fosfoglicose isomerase); 3. PFK (6-fosfofrutoquinase); 4. ALDO (frutose-difosfato aldolase); 5. GDH (glicerol-3-fosfato desidrogenase); 6. GK (glicerol quinase); 7. TIM (triosefosfato isomerase); 8. gGAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal); 9. PGK (3-fosfoglicerato quinase) (GUIDO, 2008).....	015
FIGURA 1.7 - (A) Estrutura quaternária da enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i> . (B) Reação enzimática catalizada pela gGAPDH (GUIDO, 2008).....	16
FIGURA 3.1 - Esquema de um equipamento de RLCC.....	027
FIGURA 4.1 - Constituintes majoritários do LCC técnico e dos extratos orgânicos de <i>A. occidentale</i>	043
FIGURA 4.2 - Espectro de RMN ¹ H da flavanona I (MeOD, 200 MHz).....	047
FIGURA 4.3 - Espectro de RMN ¹³ C da flavanona I (MeOD, 50 MHz).....	047
FIGURA 4.4 - Mapa de contorno de COSY da flavanona I (MeOD, 400 MHz).....	048
FIGURA 4.5 - Mapa de contorno de HSQC da flavanona I (MeOD, 400 MHz).....	048
FIGURA 4.6 - Espectro de RMN ¹ H da flavanona acetilada II (CDCl ₃ , 200 MHz).....	052
FIGURA 4.7 - Espectro de RMN ¹³ C da flavanona acetilada II (CDCl ₃ , 50 MHz).....	053
FIGURA 4.8 - Experimento PENDANT da flavanona acetilada II (CDCl ₃ , 50 MHz).....	053
FIGURA 4.9 - Espectro de RMN ¹ H do extrato AOD (CDCl ₃ , 200 MHz).....	055
FIGURA 4.10 - Equipamento RLCC (<i>Rotation Locular Countercurrent Chromatography</i>).....	057
FIGURA 4.11 - Espectro de RMN ¹ H do cardanol III (CDCl ₃ , 200 MHz).....	060
FIGURA 4.12 - Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz) do cardanol III (CDCl ₃ , 50 MHz).....	060
FIGURA 4.13 - Experimento DEPT 135 do cardanol III (CDCl ₃ , 50 MHz).....	061
FIGURA 4.14 - Espectro de RMN ¹ H da fração AC , (CDCl ₃ , 200 MHz).....	063
FIGURA 4.15 - Espectro de RMN ¹ H de AC 1 (CDCl ₃ , 200 MHz).....	066
FIGURA 4.16 - Espectro de RMN ¹³ C de AC 1 (CDCl ₃ , 50 MHz).....	067
FIGURA 4.17 - Experimento DEPT 135 de AC 1 (CDCl ₃ , 50 MHz).....	067
FIGURA 4.18 - Espectro de infravermelho de AC 1	068
FIGURA 4.19 - Espectro de RMN ¹ H de AC 2 (CDCl ₃ , 200 MHz).....	070
FIGURA 4.20 - Espectro de RMN ¹³ C de AC 2 (CDCl ₃ , 50 MHz).....	070
FIGURA 4.21 - Experimento de DEPT 135 de AC 2 (CDCl ₃ , 50 MHz).....	071
FIGURA 4.22 - Espectro de infravermelho de AC 2	071
FIGURA 4.23 - Espectro de RMN ¹ H de AC 3 (CDCl ₃ , 200 MHz).....	073
FIGURA 4.24 - Espectro de RMN ¹³ C de AC 3 (CDCl ₃ , 50 MHz).....	074

FIGURA 4.25 - Espectro de infravermelho de AC 3	074
FIGURA 4.26 - Espectro de RMN ¹ H de AC 8 (CDCl ₃ , 200 MHz).....	076
FIGURA 4.27 - Espectro de RMN ¹ H de AC 9 (CDCl ₃ , 200 MHz).....	077
FIGURA 4.28 - Espectro de infravermelho de AC 9	078
FIGURA 4.29 - Espectro de RMN ¹ H de AC 11 (CDCl ₃ , 200 MHz).....	079
FIGURA 4.30 - Espectro de RMN ¹³ C de AC 11 (CDCl ₃ , 50 MHz).....	080
FIGURA 4.31 - Curvas de concentração x resposta utilizadas na determinação de IC ₅₀ pelo método de regressão não-linear de melhor ajuste dos dados cinéticos coletados experimentalmente. (A) Determinação de IC ₅₀ para o composto AC 1 . (B) Determinação de IC ₅₀ aproximado para o composto AC 11 , considerando que este não estava puro.....	084
FIGURA 4.32 - Gráfico de Lineweaver-Burk mostrando que os compostos AC 1 (A) e 10e (B) inibem não-competitivamente a enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i> em relação ao cofator NAD ⁺	087
FIGURA 5.1 - Mecanismo de hidrólise de peptídeos por cisteíno peptidase.....	103
FIGURA 5.2 - Sobreposição estrutural das catepsinas K (verde), V (ciano), L (amarelo) e S (magenta). Em destaque os resíduos conservados entre as catepsinas. Resíduos pertencentes a tríade catalítica estão indicados com a legenda em vermelho.....	104
FIGURA 5.3 - Estrutura do substrato comercial Z-FR-MCA, onde Z = carbobenzoxi, Phe = fenilalanina, Arg = arginina e MCA = 7-amino-4-metil-cumarina.....	105
FIGURA 5.4 - Equilíbrio cinético estabelecido entre enzima e substrato. A formação das espécies E•S, E•P e E•S [‡] é determinante na velocidade da reação e formação dos produtos... ..	106
FIGURA 5.5 - Esquema clássico de inibidor competitivo, onde o inibidor se liga exclusivamente a enzima livre.....	108
FIGURA 5.6 - Gráfico Lineweaver-Burk característico de um inibidor competitivo.....	109
FIGURA 5.7 - Esquema clássico de inibidor não-competitivo, onde o inibidor se liga a enzima livre e ao complexo enzima-substrato.....	110
FIGURA 5.8 - Gráfico de Lineweaver-Burk característico de um inibidor não-competitivo.....	111
FIGURA 5.9 - Esquema clássico de inibidor incompetitivo, onde o inibidor se liga exclusivamente ao complexo enzima-substrato.....	112
FIGURA 5.10 - Gráfico de Lineweaver-Burk característico de um inibidor incompetitivo.....	113
FIGURA 5.11 - Estrutura do inibidor irreversível específico de cisteíno peptidases, E-64.....	114
FIGURA 5.12 - Biflavonóides naturais inibidores das catepsinas B, com valores de IC ₅₀ determinados utilizando o substrato Z-FR-MCA.....	115
FIGURA 5.13 - Produtos naturais inibidores da catepsina B, com valores de IC ₅₀ determinados utilizando o substrato Z-RR-MCA.....	116
FIGURA 5.14 - Produtos naturais inibidores da catepsina K, com valores de IC ₅₀ determinados utilizando o substrato Z-FR-MCA.....	117
FIGURA 7.1 - Esquema geral dos ensaios enzimáticos com o substrato fluorogênico Z-FR-MCA, mostrando o ponto de clivagem pelas catepsinas.....	128
FIGURA 7.2 - Curva ilustrativa utilizada na determinação dos valores de IC ₅₀ pelo método de regressão não-linear de melhor ajuste dos dados cinéticos coletado experimentalmente.....	130
FIGURA 7.3 - Gráfico padrão utilizado na determinação da constante K _i	131
FIGURA 8.1 - Curva para determinação da constante de Michaelis-Menten (K _m) do substrato ZFRMCA frente à catepsina V.....	198
FIGURA 8.2 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o inibidor 97	203
FIGURA 8.3 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o inibidor 98	204
FIGURA 8.4 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o inibidor 102	204

FIGURA 8.5 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o inibidor 104	205
FIGURA 8.6 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o inibidor 105	205
FIGURA 8.7 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o inibidor 106	206
FIGURA 8.8 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o inibidor 107	206
FIGURA 8.9 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o inibidor 110	207
FIGURA 8.10 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o inibidor 11	207
FIGURA 8.11 - Alinhamento das estruturas primárias das enzimas catepsina V e catepsina K. Os números acima das seqüências são referentes à seqüência de aminoácidos da catepsina V.	209
FIGURA 8.12 - Sobreposição dos C α de 30 complexos cristalográficos da catepsina K. As estruturas dos 30 ligantes (amarelo) estão sobrepostas na conformação bioativa (cristalográfica).	210
FIGURA 8.13 - Modelo farmacofórico derivado dos complexos cristalográficos. Esferas verdes delimitam as posições espaciais no sítio ativo favoráveis para presença de grupos hidrofóbicos. Esferas vermelhas delimitam as posições espaciais no sítio ativo favoráveis para presença de grupos aceptores de ligação de hidrogênio e a esfera azul delimita a posição espacial no sítio ativo favorável para presença de grupos doadores de ligação de hidrogênio.....	210
FIGURA 8.14 - Modo de interação proposto pela docagem molecular com o programa GOLD para dois compostos testados frente à catepsina V (composto 97 e 98 , magenta e ciano, respectivamente). (A) Modo de ligação apresentado simultaneamente com o modelo farmacofórico. (B) Detalhes do modo de ligação dos compostos com os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação.....	212
FIGURA 8.15 - Alinhamento obtido para os alcalóides acridônicos, 102 (alaranjado), 104 (azul), 106 (ciano), 108 (magenta), 110 (lilás) e 111 (cinza), simultaneamente com o modelo farmacofórico (esferas hidrofóbicas).....	213
FIGURA 8.16 - Modo de interação proposto pela docagem molecular com o programa GOLD para os compostos 102 (alaranjado) e 104 (azul), testados frente à catepsina V.....	214
FIGURA 8.17 - Modo de interação proposto pela docagem molecular com o programa GOLD para os compostos 106 (ciano) e 108 (magenta), testados frente à catepsina V.....	215
FIGURA 8.18 - Modo de interação proposto pela docagem molecular com o programa GOLD para os compostos 110 (lilás) e 111 (cinza), testados frente à catepsina V.....	216
FIGURA 8.19 - Modo de interação proposto pela docagem molecular com o programa GOLD para o composto 107 (verde), testado frente à catepsina V. O modelo farmacofórico está representado pelas esferas A, B e C e a ligação de hidrogênio está ilustrada em azul. O sítio de ligação está representado contornado pela superfície de Connolly (amarelo).....	217

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 4.1 - Modificações sugeridas na parte fenólica do ácido anacárdico.....	064
ESQUEMA 4.2 - Modificações na cadeia lateral do ácido anacárdico.....	064
ESQUEMA 4.3 - Reação de hidrogenação da fração AC	065
ESQUEMA 4.4 - Reação de esterificação do ácido anacárdico AC 1	069
ESQUEMA 4.5 - Reação de redução do éster AC 2	072
ESQUEMA 4.6 - Reação de acetilação de AC 1	075
ESQUEMA 4.7 - Reação de dimetilação de AC 1	077
ESQUEMA 4.8 - Reação de ozonólise da fração AC	079

RESUMO

BUSCA DE PRODUTOS NATURAIS COMO INIBIDORES ESPECÍFICOS DE ENZIMAS

Este trabalho descreve a busca de metabólitos secundários bioativos de plantas, com o intuito de serem avaliados contra as enzimas: gGAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal) do *Trypanosoma cruzi* e as catepsinas lisossomais K, V, L e S. A descrição deste trabalho está dividida em duas partes.

Parte I: Estudo do óleo das cascas da castanha de *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) - A doença de Chagas, uma infecção parasitária causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, é um importante problema de saúde pública que afeta milhões de pessoas na América Latina. Com base no papel essencial no ciclo de vida de *T. cruzi*, a enzima gGAPDH tem sido considerada um alvo atraente para o desenvolvimento de novos agentes tripanocidas. Do extrato diclorometânico das cascas da castanha de *A. occidentale* obtiveram-se compostos fenólicos que foram avaliados frente à enzima gGAPDH e as formas tripomastigotas de *T. cruzi*. A substância mais promissora foi o ácido 2-pentadecenil-6-hidroxi-benzóico (**AC 1**), com valores de IC₅₀ de 28 µM na enzima gGAPDH e 66,7 µg/mL nas formas tripomastigotas. Além disso, foi determinado que **AC1** é um inibidor do tipo não-competitivo para a enzima gGAPDH em relação tanto ao substrato G-3-P (K_i = 2 µM) quanto ao cofator NAD⁺ (K_i = 4 µM).

Parte II: Estudo de produtos naturais e derivados sintéticos buscando inibidores de cisteíno peptidases lisossomais - Depois de completado o genoma humano, onze cisteíno peptidases lisossomais foram identificadas. Essas enzimas têm a função primária de degradar proteínas, de forma não seletiva, dentro do lisossomo e são encontradas em vários órgãos e tecidos. A catepsina K está associada ao processo de reabsorção óssea, catepsina L ao câncer de pele e as catepsinas V e S ao sistema imune. Neste trabalho, foram selecionadas quatro enzimas (catepsinas K, V, L e S) como alvos moleculares para a identificação de novos inibidores. Foi realizada a caracterização cinética dos inibidores mais potentes

frente à catepsina V, através da potência biológica (IC_{50}), mecanismo de ação e constante K_i . A substância mais promissora foi o alcalóide acridônico citibrasina (**107**), com valor de IC_{50} de 1,2 μM e K_i de 0,24 μM . Além disso, foi determinado que citibrasina é um inibidor do tipo competitivo para a catepsina V em relação ao substrato ZFRMCA. Adicionalmente foi realizado o estudo de modelagem molecular para os alcalóides acridônicos que apresentaram inibição significativa frente à catepsina V.

ABSTRACT

SEARCH OF NATURAL PRODUCTS AS SPECIFIC INHIBITORS OF ENZYMES

The present work describes the search of bioactive secondary metabolites isolated from plants, against enzymes: gGAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* and lysosomal cathepsins K, V, L and S. This work is divided in two parts:

Part I: Study of the oil from the nut shells of *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) - Chagas' disease, a parasitic infection caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, is a major public health problem affecting millions of individuals in Latin America. On the basis of the essential role in the life cycle of *T. cruzi*, the enzyme gGAPDH has been considered an attractive target for the development of novel antitrypanosomatid agents. From the dichloromethane extract of *A. occidentale* were isolated phenolic compounds which were investigated on their inhibition activity against gGAPDH and trypomastigote forms of *T. cruzi*. The most promising compound was the 6-n-pentadecylsalicylic acid (**AC1**) with IC₅₀ values of 28 μM against gGAPDH and 66.7 μg/mL against trypomastigote forms. In addition, a detailed mechanistic characterization of the effects of **AC1** on the *T. cruzi* gGAPDH-catalyzed reaction showed clear noncompetitive inhibition with respect to both substrate G-3-P and cofactor NAD⁺.

Part II: Study of natural products and synthetic derivatives searching for inhibitors of lysosomal cysteine peptidases - After completing the human genome, eleven lysosomal cysteine peptidases were identified. Those enzymes are involved in general protein degradation. The lysosomal cysteine peptidases are found in various tissues and those are found in many organs. Cathepsin K is associated to bone resorption, cathepsin L to skin cancer, at last cathepsins V and S are associated to the immune system. In this work, four enzymes (cathepsins K, V, L and S) were selected as a molecular target for the identification of new inhibitors. Some potent inhibitors of cathepsin V were found, and a study including kinetic characterization of the most potent inhibitors, including potency (IC₅₀), mechanism of action and constant K_i was carried out. The most promising compound is the

acridone alkaloid citbrasine (**107**), with values of IC_{50} of 1.2 μM and K_i of 0.24 μM . Moreover, it was determined that citbrasine is a competitive inhibitor against cathepsin V in relation to the substrate ZFRMCA. Additionally, it was carried out the study of molecular modeling for acridone alkaloids that showed significant inhibition of cathepsin V.

SUMÁRIO

PARTE I. Estudo do Óleo das Cascas da Castanha de <i>Anacardium occidentale</i> L. (Anacardiaceae)	005
1 - INTRODUÇÃO	005
1.1 - <i>Anacardium occidentale</i> L. (Anacardiaceae).....	006
1.2 - <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas.....	010
1.2.1 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	011
1.2.2 - Fases da doença e tratamentos.....	012
1.2.3 - A enzima gGAPDH como alvo terapêutico.....	014
2 - OBJETIVOS	019
3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	023
3.1 - Equipamentos.....	023
3.2 - Materiais e métodos gerais.....	023
3.3 - Metodologia do estudo de <i>Anacardium occidentale</i> L.....	024
3.3.1 - Fracionamento do precipitado do extrato Metanólico (AOS).....	025
3.3.3.1 - Fracionamento da fração AOS1.....	026
3.3.1.2 - Reação de acetilação do AOS.....	026
3.3.2 - Fracionamento extrato diclorometânico (AOD)	027
3.3.3 - Fracionamento do extrato diclorometânico AOD utilizando cromatografia Líquido-Líquido – RLCC (<i>Rotation Locular Countercurrent Chromatography</i>).....	027
3.3.4 - Isolamento dos constituintes do extrato AOD por precipitação fracionada (PARAMASHIVAPPA <i>et al.</i> , 2001).....	032
3.4 - Modificações estruturais.....	033
3.4.1- Reação de hidrogenação catalítica da fração AC para obtenção de AC1.....	033
3.4.2 - Reação de metilação com diazometano para obtenção de AC 2.....	033
3.4.3 - Reação de redução com hidreto de lítio alumínio para obtenção de AC 3.....	034
3.4.4 - Reação de acetilação para obtenção de AC 8.....	034
3.4.5 - Reação de dimetilação para obtenção de AC 9.....	035
3.4.6 - Reação de ozonólise para obtenção de AC 11.....	035
3.5 - Ensaio biológicos.....	036
3.5.1 - Ensaio bioquímicos com a enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i>	036

3.5.2 - Ensaio tripanocida <i>in vitro</i> sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	038
4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	043
4.1 - Estudos de <i>Anacardium occidentale</i>	043
4.1.1 - Extrato metanólico de <i>Anacardium occidentale</i> (AOM).....	044
4.1.1.1 - Identificação das flavanonas glicosiladas I e II.....	044
4.1.2 - Fracionamento do extrato diclorometânico de <i>Anacardium occidentale</i> (AOD) utilizando RLCC (<i>Rotation Locular Counter-Current Chromatography</i>).....	055
4.1.2.1 - Identificação do cardanol III.....	058
4.1.3. Isolamento dos constituintes do extrato diclorometânico (AOD) por precipitação fracionada.....	062
4.2 - Modificações estruturais.....	062
4.2.1 - Reação de hidrogenação catalítica da fração AC para obtenção de AC 1.....	065
4.2.2 - Reação de metilação de AC1 para obtenção de AC 2.....	068
4.2.3 - Reação de redução de AC 2 com hidreto de lítio alumínio para obtenção de AC 3.....	072
4.2.4 - Reação de acetilação de AC 1 para obtenção de AC 8.....	075
4.2.5 - Reação de dimetilação de AC 1 para obtenção de AC 9.....	076
4.2.6 - Reação de ozonólise da fração AC para obtenção de AC 11.....	078
4.3 - Resultados dos ensaios biológicos.....	080
4.3.1 - Ensaio para avaliação do potencial de inibição de <i>A. occidentale</i> frente à enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i>	080
4.3.2 - Ensaio para avaliação do potencial de inibição dos ácidos anacárdicos e seus derivados frente à enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i> (NOVO PROTOCOLO).....	084
4.3.3 - Determinação da atividade tripanocida <i>in vitro</i> sobre as formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	088
PARTE II. Estudo de Produtos Naturais e Derivados Sintéticos Buscando Inibidores de Cisteíno Peptidases Lisossomais.....	095
5 - INTRODUÇÃO.....	095
5.1 - Cisteíno peptidases lisossomais.....	096
5.1.1 - Catepsinas humanas como alvo terapêutico.....	098
5.1.2 - Catepsinas lisossomais estudadas.....	100
5.1.2.1 - Catepsina K (EC 3.4.22.38).....	100
5.1.2.2 - Catepsina V (EC 3.4.22.43).....	101
5.1.2.3 - Catepsina L (EC 3.4.22.15).....	101

5.1.2.4 - Catepsina S (EC 3.4.22.27).....	102
5.1.3 - Características estruturais e mecanismo de ação.....	102
5.2 - Substratos fluorogênicos.....	104
5.3 - Inibidores enzimáticos.....	105
5.3.1 - Potência e seletividade dos inibidores.....	106
5.3.2 - Modo de ligação e mecanismo de ação.....	107
5.4 - Inibidores de cisteíno peptidases.....	113
5.5 - Estudos de docagem molecular e modelos de interação.....	117
6 - OBJETIVOS.....	121
7 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	125
7.1 - Equipamentos e Materiais.....	125
7.1.1 – Espectrofluorímetros.....	125
7.1.2 - Solventes e reagentes.....	125
7.1.3 - Enzimas estudadas.....	125
7.2 - Padronização e validação dos ensaios cinéticos.....	126
7.2.1 - Determinação dos parâmetros cinéticos para hidrólise do substrato Z-FR-MCA pelas catepsinas K, V, L e S.....	126
7.2.2 - Metodologia e condições gerais dos ensaios cinéticos em cubeta e placa de ELISA.....	126
7.2.3 - Determinação experimental do valor de K_m	128
7.2.4 - Triagem, identificação e seleção de inibidores das enzimas estudadas.....	129
7.2.5 - Determinação da potência dos inibidores (IC_{50}) frente à catepsina V.....	130
7.2.6 – Determinação do mecanismo de ação e afinidade (K_i) dos inibidores frente à catepsina V.....	130
7.3 - Modelagem molecular dos inibidores da catepsina V.....	131
8 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	135
8.1 - Otimizações das condições de ensaio em espectrofluorímetro de cubeta.....	136
8.2 - Adaptações da metodologia de ensaio para espectrofluorímetro de placa de ELISA.....	137
8.3 - Considerações gerais sobre os parâmetros cinéticos.....	139
8.4 - Considerações gerais para avaliação da coleção de possíveis inibidores naturais e derivados sintéticos.....	140
8.5 - Triagem e identificação de novos candidatos a inibidores das catepsinas lisossomais K, V, L e S.....	141

8.5.1 - Derivados do ácido cinâmico e diidrocinâmico.....	141
8.5.2 - Cumarinas.....	143
8.5.3 - Limonóides.....	145
8.5.4 - Triterpenos.....	146
8.5.5 - Ácidos e derivados.....	148
8.5.6 - Amidas.....	149
8.5.7 - Lignanas.....	150
8.5.8 - Flavonóides e derivados.....	151
8.5.9 - Alcalóides.....	158
8.5.10 - Amidas sintéticas.....	164
8.5.11 - Peptídeos.....	169
8.5.12 - Ácido anacárdico e derivados.....	172
8.5.13 - Retro-chalconas sintéticas.....	177
8.5.14 - Éteres sintéticos.....	178
8.6 - Busca de novos inibidores da catepsina V.....	180
8.6.1 - Flavonóides sintéticos.....	180
8.6.2 - Cumarinas sintéticas.....	190
8.6.3 - Alcalóides e intermediários sintéticos.....	192
8.7 - Determinação do valor de K_m para ZFRMCA frente à catepsina V.....	197
8.8 - Determinação da potência (IC_{50}) para os melhores inibidores da catepsina V.....	198
8.9 - Determinação do mecanismo de ação e do valor de K_i	202
8.10 - Estudos de docagem molecular e modelos de interação.....	208
8.10.1 - Modelo farmacofórico baseado na estrutura dos complexos cristalográficos.....	208
8.10.2 - Análise dos resultados de docagem molecular.....	211
PARTE III.....	217
9 - Conclusões.....	223
10 - Referências Bibliográficas.....	227
11 - Anexo.....	241

PARTE I

Estudo do Óleo das Cascas da Castanha de Anacardium occidentale L. (Anacardiaceae)

Nessa parte do trabalho foi feito uma descrição sucinta dos aspectos mais relevantes da espécie *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) e uma breve revisão da literatura sobre a Doença de Chagas, onde são discutidos dados epidemiológicos, tratamento, formas de prevenção e os impactos sociais. Atenção especial é dada a via glicolítica do parasita onde se destaca o papel da enzima glicossomal gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) como alvo biológico na busca de protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos. Posteriormente são descritas as metodologias para o estudo dos extratos vegetais, isolamento e identificação dos compostos, modificações estruturais, assim como a avaliação biológica nas formas tripomastigostas de *T. cruzi* e na enzima gGAPDH. Para os inibidores mais promissores desta enzima foi determinado a potência (IC₅₀), mecanismo de inibição e a constante de afinidade (K_i).

PARTÉ I
Introdução

PARTE I. Estudo do Óleo das Cascas da Castanha de *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae).

1 - INTRODUÇÃO

Os avanços da química e da biologia, bem como a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e farmacológicos, tornaram possível o planejamento de importantes inovações terapêuticas. Durante séculos as plantas representaram para o Homem a única fonte de agentes terapêuticos. No início do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias biologicamente ativas para o desenvolvimento de medicamentos (HOSTETTMANN *et al.*, 2003).

Com o desenvolvimento industrial e da síntese orgânica, passou-se a priorizar os produtos farmacológicos sintéticos. Dados do FDA (*US Food and Drug Administration*) indicam que entre os anos de 1981 e 2006, das 1184 novas moléculas bioativas aprovadas, 30% são de origem sintética e 5% são produtos naturais. Entretanto, quando se considera o número de moléculas que são derivadas de produtos naturais ou foram planejadas baseadas em produtos naturais, esse número sobe para 52% (FIGURA 1.1). Dos anos quarenta até os dias atuais, um bom exemplo da importância dos produtos naturais no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos está no tratamento de câncer. Dos 155 fármacos utilizados, 73% são sintéticos, sendo que desses aproximadamente 47% deles foram baseados em produtos naturais ou derivados de produtos naturais (NEWMAN & CRAGG, 2007).

Nesta busca por compostos bioativos, procuram-se identificar moléculas que apresentem algumas das propriedades desejadas para um fármaco (potência e seletividade), mas que ainda precisam ser otimizadas em relação a outras propriedades (biodisponibilidade e toxidez). Os compostos bioativos que se destacam nesta fase são selecionados como compostos líderes (*lead compounds*) (BARREIRO & FRAGA, 2001).

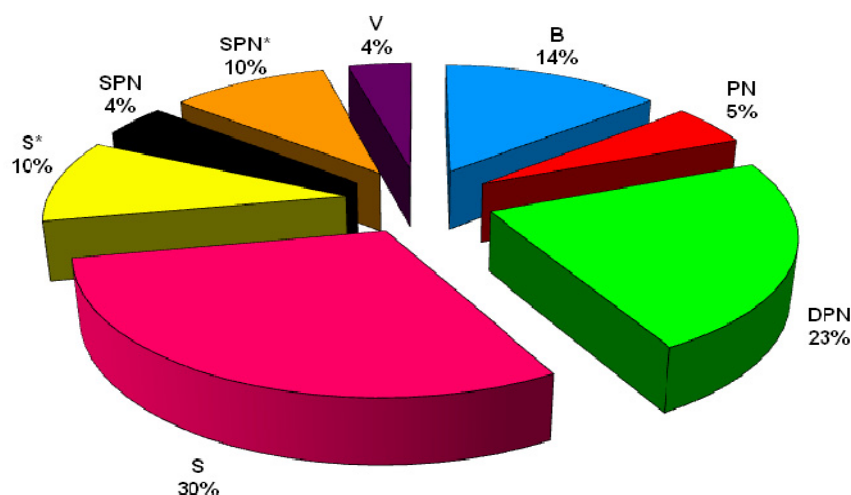


FIGURA 1.1 - Diferentes fontes de agentes terapêuticos.

B: biológicos (peptídeos ou proteínas isolados de organismos/linhagens de células ou produzidos biotecnologicamente); PN: produtos naturais; DPN: derivados de produtos naturais; S: sintéticos (droga totalmente sintética); SPN: sintéticos modelados a partir de produtos naturais; V: vacinas; (*) produtos naturais mimitizados (apresenta influência dos produtos naturais ou são protótipos com algumas derivatizações sintéticas, grupo farmacofórico ou imitação da natureza).

No processo de identificação e seleção de compostos capazes de interagir com o alvo selecionado, é possível explorar o imenso espaço químico com o auxílio de diversas técnicas, entre elas os ensaios biológicos automatizados em larga escala (HTS – *High Throughput Screening*) (RAHMAN *et al.*, 2001; EISENTHAL & DANSON, 2002). A busca racional por fármacos de origem vegetal tem como base o *screening*, onde se utiliza uma grande variedade de extratos para testes biológicos específicos, empregando informações de quimiosistemática e/ou da etnofarmacologia. A procura de substâncias biologicamente ativas em plantas destaca-se dos outros meios, principalmente pelo fato dos vegetais apresentarem uma grande diversidade molecular e funcionalidade biológica. As plantas possuem alta capacidade de produzir estruturas moleculares extremamente funcionalizadas, complexas e incomuns, fazendo da flora um atraente foco químico e biológico (BAKER *et al.*, 2007; HARVEY, 2007; LAM, 2007).

1.1 - *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae)

A família Anacardiaceae possui entre suas espécies *A. occidentale* L., mais conhecida como cajueiro, uma planta típica de solos argilosos (LORENZI, 1992). O cajueiro, considerado nativo do Brasil, está presente em todos os estados,

porém é na região nordeste que melhor se adapta (ARAÚJO & SILVA, 1995). Ocorre principalmente em campos e dunas no nordeste do país, principalmente nos estados do Piauí e Maranhão (LORENZI, 1992).

Além do Brasil, o cajueiro é cultivado em mais 25 países, sendo que em termos de importância econômica, sua exploração restringe-se à Índia, Brasil, Moçambique, Vietnã, Tanzânia e Guiné-Bissau (ARAÚJO & SILVA, 1995). Os três primeiros juntos são responsáveis por 80% da produção mundial de castanha de caju e o Brasil participa com 35% desse total. A região nordeste contribui com 99% da produção nacional (<http://www.brasilrepublica.com/ceara.htm>).

O cajueiro é uma planta abundante, de ramificação baixa e porte médio, sendo aproveitadas todas as partes: tronco, folhas, pseudofruto, castanha, líquido viscoso da casca da castanha (LCC). As aplicações abrangem desde a construção naval, setor industrial (como alimentação e cosméticos), até o uso em medicina popular (FERRÃO, 1995).

É amplamente cultivado para aproveitamento industrial de suas castanhas e frutos. A parte denominada popularmente “fruto” é na verdade um “pseudofruto”, sendo que seu verdadeiro fruto é a castanha afixada ao pedúnculo desenvolvido (LORENZI, 1992). O pseudofruto pode ser consumido *in natura*. Já a castanha só pode ser consumida torrada devido ao alto teor de ácidos que queima a mucosa bucal. A sua extração e industrialização são de grande importância econômica para o nordeste do país. Da casca da castanha é obtido um óleo resinoso cáustico (LCC) e de coloração escura de amplo uso na fabricação de vernizes, isolantes e inseticidas. A exudação da casca fornece uma goma resinosa totalmente inatacada por insetos e a própria casca é rica em tanino (DA SILVA, 2003).

O líquido (LCC) pode ser extraído da casca da castanha de caju por meio de processos artesanais (panelas de ferro furadas no fundo que são aquecidas até que os alvéolos do mesocarpo estourem e liberem o líquido) ou por processos industriais (por ruptura, forno, por solventes) (FERRÃO, 1995).

O LCC, no Brasil, ainda não é muito valorizado, ao contrário do que ocorre no exterior. O Brasil exporta, *in natura*, 20 mil toneladas do líquido por ano, a preços que variam entre 200 e 300 dólares por tonelada. O líquido proveniente das cascas da castanha de caju é constituído por lipídios fenólicos, não isoprenóides, de

cadeias carbônicas longas, (saturadas e insaturadas) e material polimérico (DA SILVA, 2003).

A fração insaturada é uma mistura de compostos com uma, duas ou três insaturações não conjugadas, de configuração *cis*, que se localizam nos carbonos 8', 11' e 14' (TYMAN *et al.*, 1984; TYMAN, 1991). Alguns desses compostos estão na FIGURA 1.2.

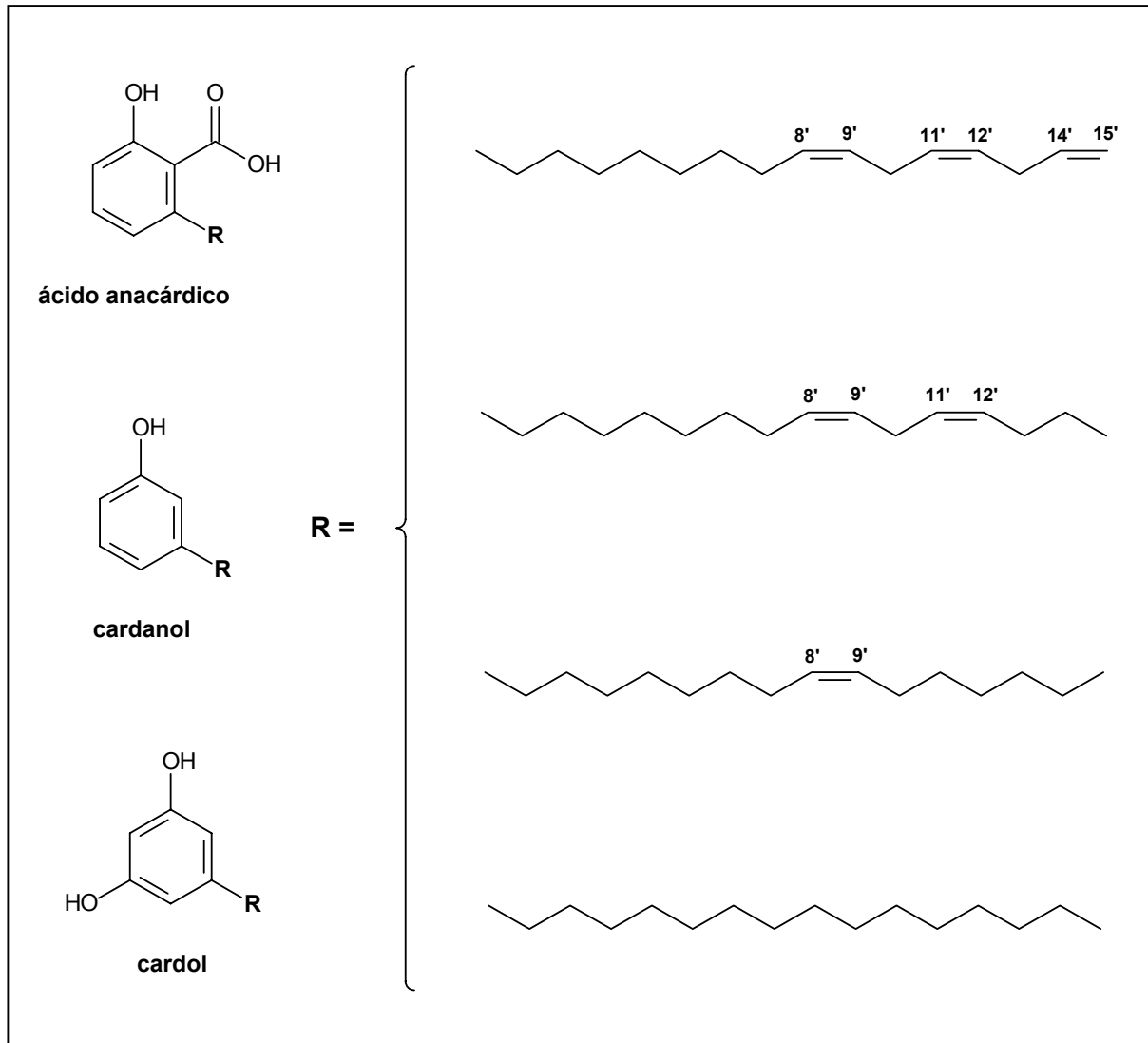


FIGURA 1.2 - Constituintes fenólicos de *A. occidentale* L.

Em um de seus trabalhos, TYMAN e colaboradores, quantificaram os constituintes do LCC brasileiro por cromatografia líquida de alta eficiência (TYMAN *et al.*, 1984) (TABELA 1.1).

TABELA 1.1 - Composição percentual do líquido viscoso da casca da castanha (LCC) natural brasileiro.

	Ácido anacárdico	Cardanol	Cardol	2-metil cardol	Polímeros e outros
cadeia saturada	0,96	-	-	-	
1 insaturação	16,98	1,13	1,90	-	7,96
2 insaturações	12,72	1,25	5,68	1,81	
3 insaturações	30,02	2,33	17,26		
Total	60,68	4,71	24,84	1,81	7,96

O óleo natural é constituído em sua maioria por ácido anacárdico. Nos processos de extração, onde são utilizadas altas temperaturas, obtém-se o LCC técnico. Esse é formado em grande parte por cardanol, que é obtido pela descarboxilação do ácido anacárdico (DA SILVA, 2003).

O óleo industrial, sem ser queimado, possui majoritariamente ácido anacárdico, cardol e cardanol (PARAMASHIVAPPA *et al.*, 2001).

Os ácidos anacárdicos são inibidores de várias enzimas, entre elas prostagladina sintase (GRAZZINI *et al.*, 1991), glicerol-3-fosfato desidrogenase (IRIE *et al.*, 1996), β -lactamase (COATES *et al.*, 1994), tirosinase (KUBO *et al.*, 1994a) e lipoxigenase (SHOBHA *et al.*, 1994). Possui ainda atividade antitumoral, antimicrobiana (KUBO *et al.*, 1993a e 1993b) e antiacne (KUBO *et al.*, 1994b). Já os cardanóis apresentam várias aplicações, entre elas na forma de resinas de fenol formaldeído em vernizes e tintas (TYMAN, 1980). Além disso, os cardóis apresentam atividades contra a filariose de gado, *Setearia digitata* (WASSERMANN & DAWSON, 1948; SURESH & KALEYSA RAJ, 1990), ação antibacteriana contra *Streptococcus mutans* e *Propionibacterium acne* (HIMEJIMA & KUBO, 1991) e contra o molusco *Briomphalaria glabratus* (KUBO *et al.*, 1986).

O LCC caracteriza-se por ser amplamente utilizado em diversos setores. O produto de polimerização é empregado como resina termoplástica, em isolantes elétricos, superfícies de atrito, revestimento para discos de fricção de freios, resina para tintas, vernizes e adesivos (DA SILVA, 2003). Além disso, pode ser usado como inseticida, germicida e precursor em síntese orgânica para obtenção de compostos de uso farmacológico, como por exemplo, a lasiodiplodina, um macrolídeo de 12 membros, de ocorrência natural, que exibe propriedade reguladora do crescimento de plantas e atividade antileucêmica (DOS SANTOS *et al.*, 1999).

1.2 - *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da tripanossomíase americana ou Doença de Chagas. Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), estima-se que esta doença afeta cerca de 18 milhões de indivíduos, principalmente da América do Sul e Central (REY, 2002). Essa doença tem principal ocorrência em países pobres (FIGURA 1.3) devido principalmente às precárias condições sanitárias e de moradia que a população vive, sendo um ambiente favorável para a proliferação do inseto vetor. Dessa forma, o controle do inseto vetor requer ações de saúde constantes, seja através de aplicação de inseticidas nas regiões endêmicas ou pela contínua educação da população sob risco de contaminação. Infelizmente, é muito comum a negligência dessas ações quando se atinge níveis pequenos de transmissão vetorial, como é o caso Brasil (FIGURA 1.3B) (MONCAYO & ORTIZ YANINE, 2006).

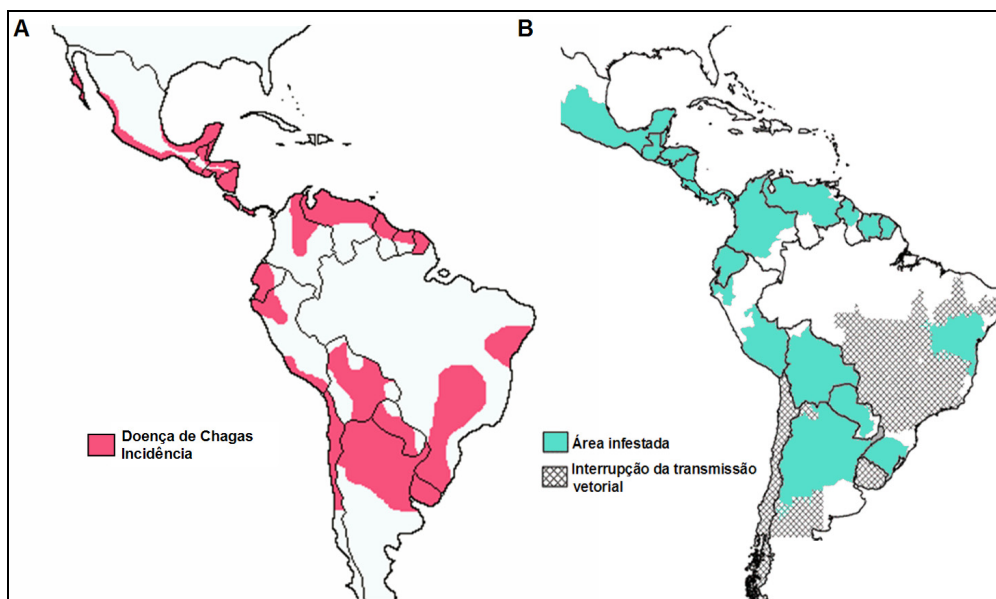


FIGURA 1.3 - (A) Incidência da Doença de Chagas na América Latina. (B) Distribuição geográfica do inseto-vetor causador da Doença de Chagas (PAHO, 2008).

A Doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, pertencente à família *Trypanosomatidae*, sendo um dos parasitas de maior e mais bem sucedida distribuição na natureza. Apresenta-se sob as formas flageladas (epimastigota e tripomastigota) e aflagelada (amastigota) (VERONESI, 1991; COURA & CASTRO, 2002).

O agente transmissor da doença é um inseto da ordem *Hemiptera*, família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae*, usualmente denominado triatomídeo e popularmente conhecido como barbeiro (VERONESI, 1991).

O mecanismo habitual de contaminação se dá pelo contato com as fezes do triatomíneo infectado com as mucosas ou a pele. As mucosas mesmo íntegras, não constituem barreira à penetração do *T. cruzi*, ao passo que a pele só se deixa atravessar quando picada pelo inseto ou por pequenas escarificações causadas pelo indivíduo ao coçar-se. Este tipo de transmissão representa 80% das contaminações (COURA & CASTRO, 2002; REY 2002). A contaminação também pode ocorrer por transfusão sanguínea, transplantes de órgãos, congênita e via oral através de alimentos contaminados (DIAS & SCHOFIELD, 1999). Esta última contaminação é menos frequente, porém no início do ano de 2005 foi constatada através do consumo de caldo de cana contaminado, em Santa Catarina. Episódios como esse já haviam sido reportados anteriormente em outras regiões do Brasil (Ministério da Saúde 2005).

1.2.1 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo e de várias fases com diferentes estágios de desenvolvimento em diferentes hospedeiros (BOZA-SEPÚLVEDA, 1996). Apresenta a característica de se dividir no interior das células do hospedeiro definitivo e não no sangue periférico.

Quando o inseto vetor contaminado com *T. cruzi* se alimenta de mamíferos, ele deposita suas fezes contendo as formas tripomastigotas (FIGURA 1.4), que entram no corpo do hospedeiro pela ferida da picada ou pelas mucosas (1). No mamífero as formas tripomastigotas penetram as células e se transformam em amastigotas (aflagelada) intracelulares (2). As formas amastigotas multiplicam-se por fissão binária nas células dos tecidos infectados; nesse ponto elas podem infectar outras células e se transformar em amastigotas intracelulares e provocar novas infecções (3). Em seguida se transformam em tripomastigotas. As células se rompem e os protozoários são liberados na corrente sanguínea (4). Quando um triatomíneo não infectado se alimenta de um mamífero infectado, ele se contamina ingerindo as formas tripomastigotas do *T. cruzi* (5). As formas tripomastigotas ingeridas se transformam em epimastigotas no tubo digestivo do “barbeiro” (6)

seguido por multiplicações (7) e se transformam nas formas tripomastigotas (8), que serão eliminadas junto com as fezes do barbeiro, dando início a um novo ciclo (<http://www.cbu.edu/~seisen/ParasitesOnParade.htm>).

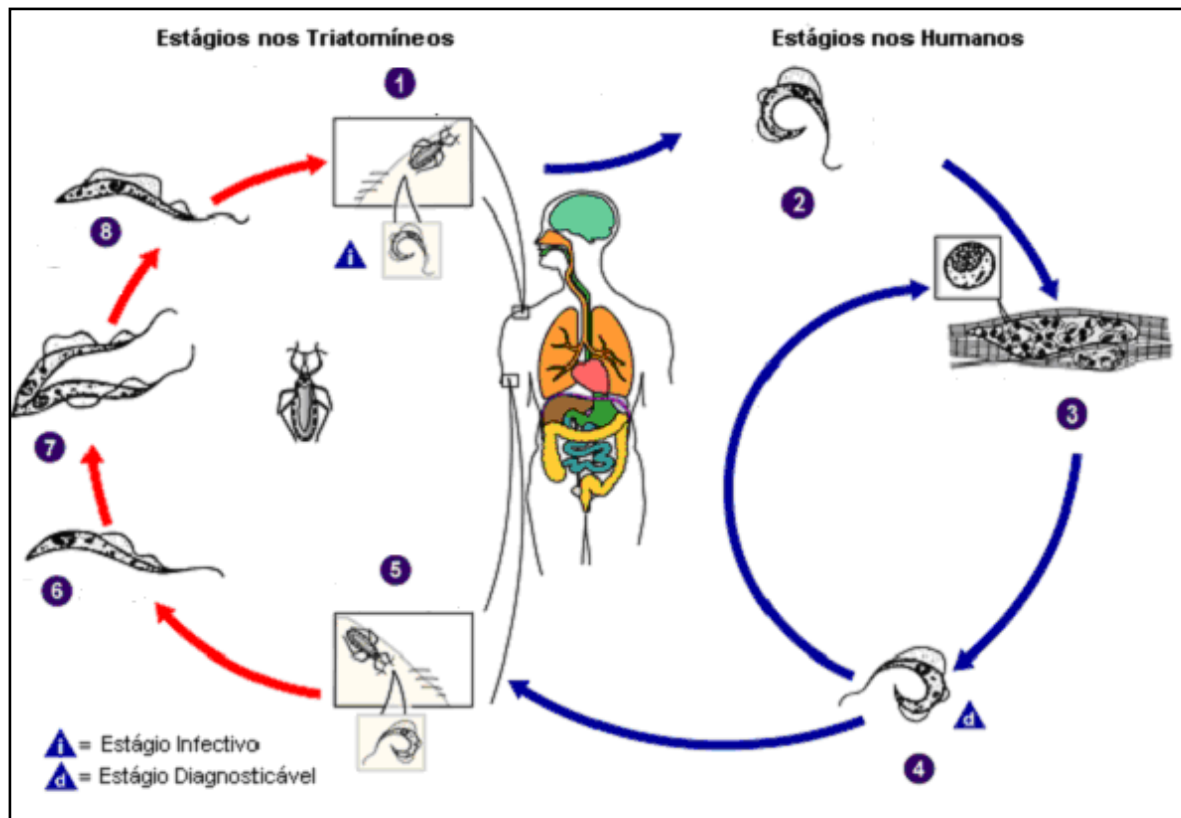


FIGURA 1.4 - Ciclo de vida do protozoário *T. cruzi*.

1.2.2 - Fases da doença e tratamentos

Quando o indivíduo é infectado ocorre um período de incubação (mínimo de quatro dias) e em seguida tem início a fase aguda da doença, que raramente é fatal (taxa de mortalidade de 2-8%). O parasita invade diferentes células hospedeiras que se rompem, causando inflamação nos tecidos. O fígado e o baço apresentam aumento de volume e o coração sofre dilatação global. Após a fase aguda ocorre uma tendência à imunidade, mas o indivíduo continua infectado. Posteriormente tem início a fase crônica da doença onde a maioria dos indivíduos desenvolve distúrbios cardíacos, neurológicos e digestivos (VERONESI, 1991; COURA & CASTRO, 2002).

Após quase 100 anos, desde a descoberta da doença, apesar do genoma e proteoma do *T. cruzi* ser conhecido, até o momento nenhum novo

fármaco foi desenvolvido para a Doença de Chagas. Muitos esforços foram feitos para tratar a doença, mas nenhum medicamento efetivo foi encontrado. Os ensaios clínicos revelaram poucos medicamentos ativos contra *T. cruzi*. Atualmente, procura-se amenizar as diversas manifestações da doença, através da administração de diuréticos para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva. Os fármacos indicados há mais de três décadas são o Nifurtimox (Lampit[®], Bayer) e Benznidazol (Rochagan[®], Roche), entretanto são ativos somente na fase aguda da doença. Violeta genciana é utilizada para esterilizar sangue contaminado (FIGURA 1.5) (SCHOFIELD *et al.*, 2006). O fármaco mais utilizado no tratamento dos infectados é o benznidazol (um derivado imidazólico). Entretanto, nenhum dos medicamentos citados produz a cura da tripanossomíase. O nifurtimox produz severos efeitos colaterais como anorexia, náuseas, vômitos, alergia cutânea, dor abdominal e perda de peso em quase todos os pacientes adultos. Já com o uso de benznidazol ocorrem erupções cutâneas e distúrbios na produção de sangue (REY, 2002).

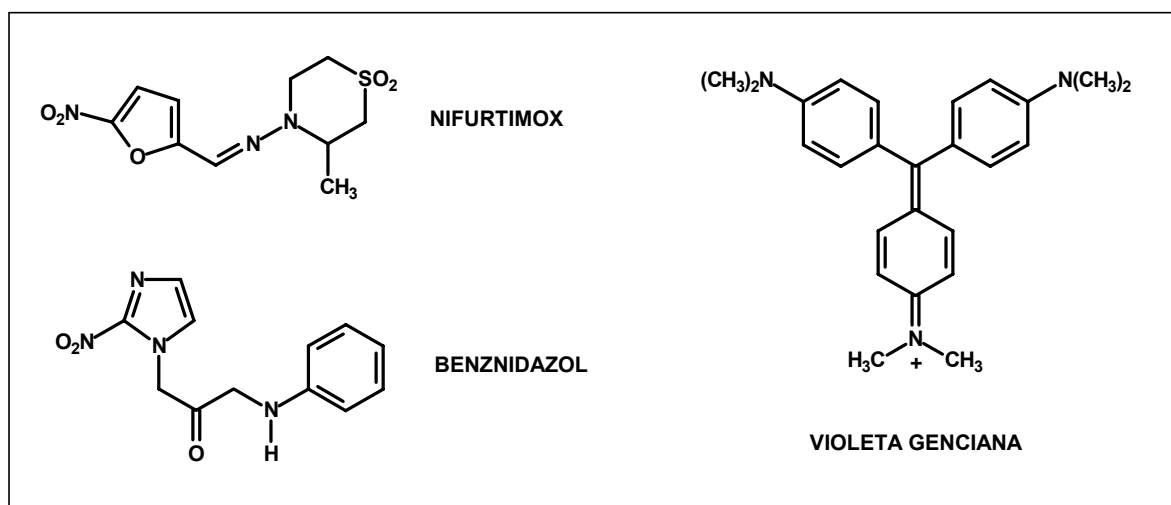


FIGURA 1.5 - Estruturas químicas dos fármacos nifurtimox e benznidazol e do agente esterilizante violeta genciana.

Diante desta problemática, faz-se necessária uma busca contínua de substâncias com ação tripanocida. Esta necessidade de buscar novos fármacos estimulou a pesquisa de inibidores altamente específicos podendo ser então utilizados como protótipos para o planejamento racional de fármacos antichagásicos.

1.2.3 - A enzima gGAPDH como alvo terapêutico

Enzimas são alvos terapêuticos extremamente atrativos para o planejamento de novas substâncias bioativas, devido ao seu papel essencial nos processos fisiopatológicos, fácil obtenção, adequação para ensaio biológico, e pela facilidade de elaboração de coleções dirigidas de compostos. Os inibidores enzimáticos candidatos a fármacos podem ser classificados em inibidores competitivos, incompetitivos, não-competitivos e inibidores irreversíveis (RAHMAN, *et al.*, 2001; EISENTHAL & DANSON, 2002; COPELAND, 2005).

O processo de planejamento de substâncias bioativas com propriedades antiparasitárias, baseia-se principalmente na investigação bioquímica comparativa entre parasita e hospedeiro. Essa investigação tem como objetivo identificar rotas bioquímicas potencialmente diferentes, que possam vir a ser alvo de modulação seletiva por pequenas moléculas. Como muitos parasitas apresentam vias metabólicas extremamente simplificadas, geralmente, estes organismos possuem enzimas cuja função é essencial para a sua sobrevivência, enquanto estas mesmas macromoléculas não são necessariamente indispensáveis no hospedeiro. Neste contexto, várias enzimas envolvidas em rotas distintas do metabolismo do *T. cruzi*, vêm sendo investigadas como potenciais alvos moleculares para o desenvolvimento de novos agentes tripanocidas. Dentre elas destacam-se: (i) cruzaina ou cruzipaina (CP), (ii) tripanotiona redutase (TR) e (iii) enzimas constituintes da via glicolítica, tais como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH), enzima NAD⁺-dependente que exerce função central na glicólise, fonte vital de energia para o *T. cruzi* (GUIDO, 2008).

A forma infectante do parasita de *T. cruzi* (tripomastigota), possui uma organela especial denominada glicossoma, na qual residem nove enzimas envolvidas nas reações da via glicolítica (FIGURA 1.6). Esta via bioquímica é a principal fonte de energia da forma tripomastigota do *T. cruzi* e *T. brucei*. Isso se deve ao fato de que o parasita possui mitocôndrias inativas durante determinadas fases de seu ciclo celular, o que impede o funcionamento de rotas metabólicas alternativas mais eficientes para a produção de ATP. Além disso, estudos mostram que as formas amastigostas também são amplamente dependentes dessa via para obtenção de energia (MICHELS, 1988; VERLINDE *et al.*, 1994; GUIDO, 2008).

Esta grande dependência da glicólise como fonte de energia faz das enzimas glicolíticas potenciais alvos para o desenho de fármacos tripanocidas.

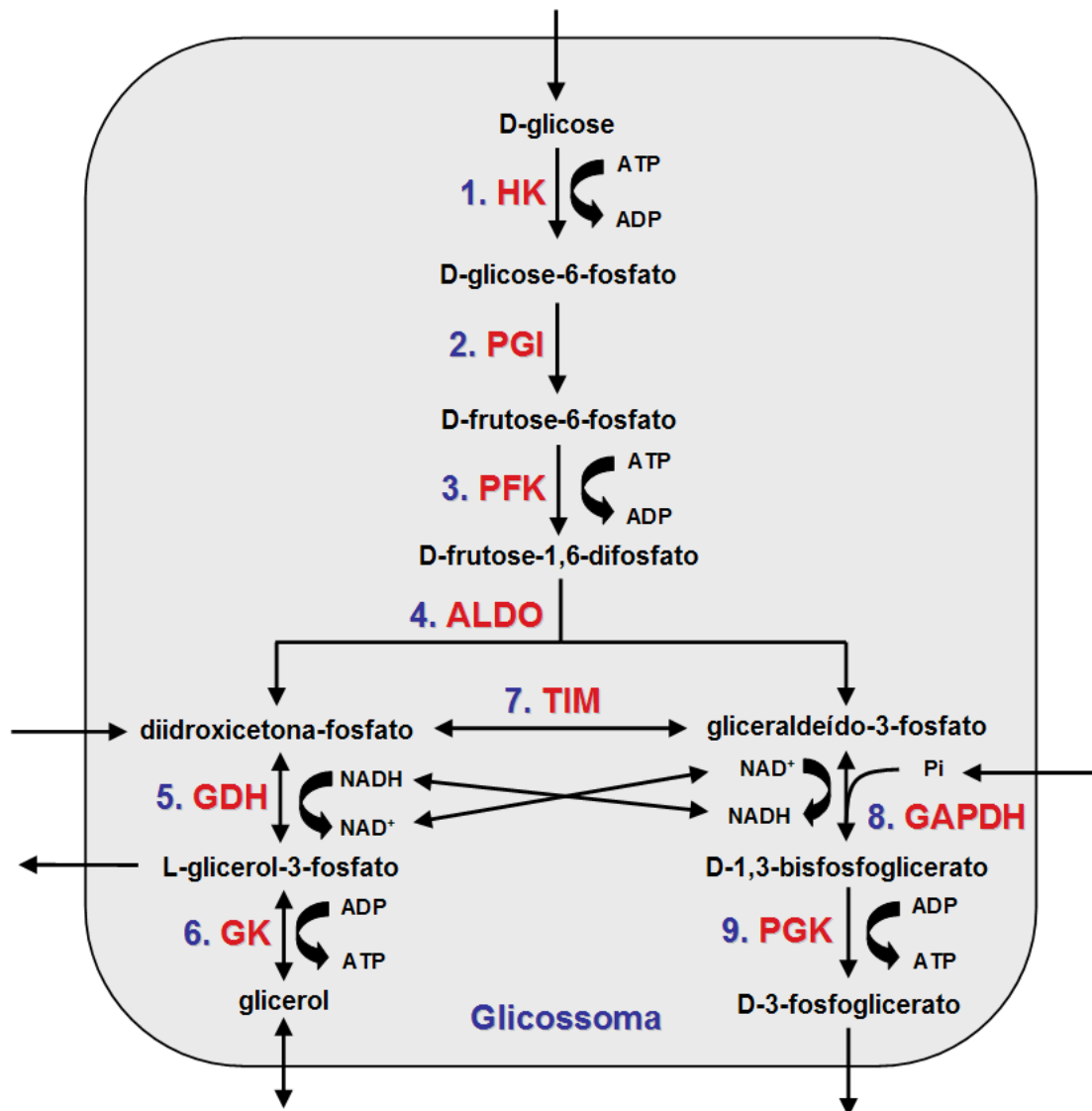


FIGURA 1.6 - Metabolismo da glicólise e do glicerol no glicossoma. Enzimas envolvidas: **1. HK** (hexoquinase); **2. PGI** (fosfoglicose isomerase); **3. PFK** (6-fosfofrutoquinase); **4. ALDO** (frutose-difosfato aldolase); **5. GDH** (glicerol-3-fosfato desidrogenase); **6. GK** (glicerol quinase); **7. TIM** (triosefosfato isomerase); **8. gGAPDH** (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal); **9. PGK** (3-fosfoglicerato quinase) (GUIDO, 2008).

A gGAPDH glicossômica mostra potenciais sítios ativos com diferenças significativas quando comparada com a enzima homóloga humana. Assim inibidores podem ser desenhados, sintetizados ou obtidos de fontes naturais e testados diretamente na enzima (TOMAZELA *et al.*, 2000).

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH, EC 1.2.1.12) catalisa a conversão do substrato gliceraldeído-3-fosfato (G-3-P) em 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG) na presença do cofator NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e fosfato inorgânico (FIGURA 1.7A e 1.7B). A gGAPDH é uma enzima tetramérica composta de subunidades idênticas (359 resíduos) e peso molecular de 156 kDa. Como esta enzima também está presente em humanos, é necessária a busca de inibidores específicos para a isoforma do parasita. Estudos cristalográficos da enzima gGAPDH revelaram diferenças estruturais importantes com relação à homóloga humana, principalmente no sítio ativo e no sítio de ligação do cofator NAD^+ , regiões promissoras para o desenho de novos inibidores específicos (SOUZA *et al.*, 1998).

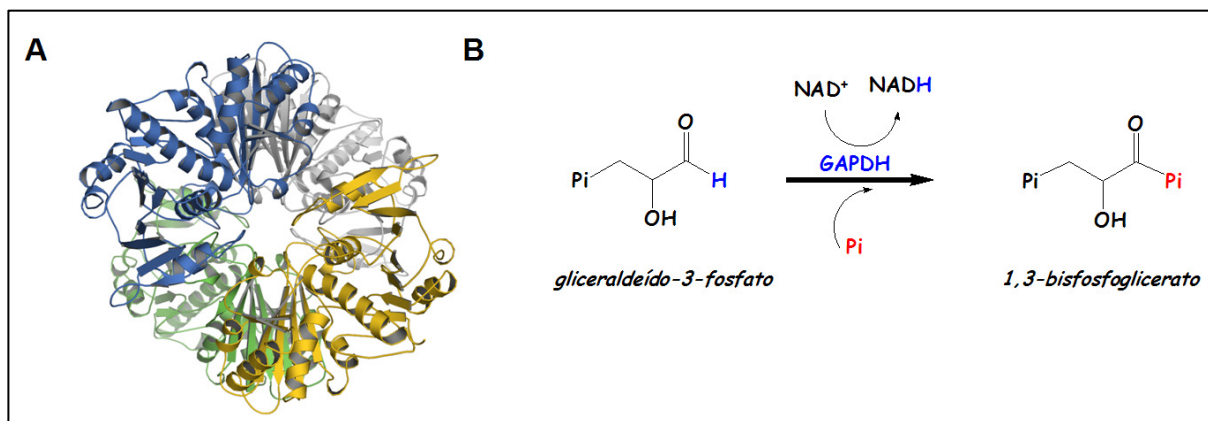


FIGURA 1.7 - (A) Estrutura quaternária da enzima gGAPDH de *T. cruzi*. (B) Reação enzimática catalizada pela gGAPDH (GUIDO, 2008).

Além de sua função já bem estabelecida na via glicolítica, a gGAPDH continua a ser investigada por estar envolvida em outros eventos celulares. Classificada como proteína multifuncional, a gGAPDH de mamíferos está altamente relacionada com diversas atividades celulares, como apoptose, transporte nuclear de RNA, replicação de DNA, reparo de DNA, formação de microtúbulos e fusão de membrana nuclear. Além disso, acredita-se que a gGAPDH esteja envolvida em doenças neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, Huntington), câncer de próstata e distúrbios metabólicos (GUIDO, 2008).

Com o objetivo de desenvolver novos e potentes agentes antichagásicos, a gGAPDH é considerada um alvo molecular extremamente atrativo.

PARTÉ I
Objetivos

2 - OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- Isolamento e identificação dos constituintes químicos do óleo das cascas das castanhas de *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae);
- Avaliar o potencial dos metabólitos isolados nos ensaios biológicos de atividade antiparasitária nas formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* e na enzima gGAPDH;
- Realizar modificações estruturais nos princípios ativos a fim de potencializá-los e contribuir para o estudo de relação estrutura x atividade.

PARTÉ I
Procedimento
Experimental

3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 - Equipamentos

- **Evaporadores rotativos**

Os extratos e frações foram evaporados em evaporadores rotativos BÜCHI modelo Rotavapor R-114, equipado com banho BÜCHI B-480 e BÜCHI Rotavapor ELB1, equipado com banho BÜCHI 461, ambos com recirculador de água refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5 °C.

- **Espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN)**

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C foram obtidos em aparelhos BRÜKER modelo ARX 200 MHz e DRX 400 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

- **Cromatógrafo líquido em contracorrente (RLCC)**

Cromatógrafo Rotatório Locular em Contracorrente (RLCC: *Rotation Locular Countercurrent Chromatography*) EYELA modelo RLCC-1000, equipado com uma bomba de cerâmica EYELA modelo VSP-3050, um desgaseificador GASTOR 101 e um coletor automático EYELA modelo DC-1200.

- **Espectrômetro de infravermelho**

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados num equipamento BOMEM modelo M102 com transformada de Fourier e calibração interna. As amostras foram preparadas na forma de um filme líquido sobre pastilhas de KBr. As absorções estão expressas em número de ondas (cm^{-1}).

3.2 - Materiais e métodos gerais

- **Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)**

Fase estacionária: sílica gel 60 com F_{254} ($\phi = 0,2$ mm), em folhas de alumínio da MERK.

- **Cromatografia de adsorção em coluna aberta (CC)**

Fases estacionárias: sílica gel 60 (70-230 *mesh*), denominada sílica comum e sílica gel 60 (230-400 *mesh*), denominada sílica do tipo *flash*.

- **Cromatografia de exclusão em coluna aberta**

Fase estacionária: Sephadex LH-20, Amershan Pharmacia Biotech AB.

- **Reveladores**

Como reveladores para CCDA foram utilizadas solução de vanilina, iodo sólido, solução de cloreto férrico e câmara de radiação ultravioleta, nos comprimentos de onda 254 e 360 nm.

- Solução de vanilina em ácido sulfúrico: a vanilina (3,0 g) foi dissolvida em uma solução contendo 135 mL de H₂O destilada, 135 mL de MeOH e 30 mL de H₂SO₄ (conc.). A solução foi estocada em um frasco escuro e a baixa temperatura (aproximadamente 10 °C).

- Solução de cloreto férrico: o FeCl₃ foi dissolvido em etanol originando uma solução 5%.

- **Solventes**

Foram utilizados solventes (Hexano, Diclorometano, Acetato de Etila, Acetona, Metanol e Água destilada) todos comerciais destilados no DQ – UFSCar e solventes deuterados MERCK e ALDRICH para a obtenção dos espectros de RMN.

- **Material vegetal (*Anacardium occidentale* L.)**

As cascas e os extratos da casca da castanha do caju (*A. occidentale*) foram recebidos do CEIS (Centro de Estudo de Insetos Sociais) da Unesp de Rio Claro.

3.3 - Metodologia do estudo de *Anacardium occidentale* L.

De *A. occidentale* foram recebidos extratos preparados a partir de 400 g de cascas da castanha em 1 L de solvente (hexano, diclorometano e metanol), como mostra a TABELA 3.1.

TABELA 3.1 - Massa dos extratos das casca da castanha de *A. occidentale*.

Solvente	Massa (g)	Código do Extrato
Hexano	37,7	AOH
Diclorometano	32,8	AOD
Metanol	59,8	AOM

Através de testes preliminares em CCDA, o extrato diclorometânico (**AOD**) despertou maior interesse, pois apresentava uma maior variedade de constituintes, sendo a maioria deles de média polaridade.

O extrato metanólico (**AOM**) apresentou no fundo do frasco um precipitado de cor marrom escuro e odor adocicado. Este extrato foi filtrado em um funil de placa sinterizada e lavado com diclorometano, obtendo-se 5,0 g de um sólido denominado **AOS**.

3.3.1 - Fracionamento do precipitado do extrato Metanólico (AOS)

O sólido precipitado do extrato metanólico (**AOS**) (4,4 g) foi fracionado por CC ($h \times \phi = 45,0 \times 4,0$ cm) utilizando sílica *flash* desativada com MeOH como suporte cromatográfico e eluição gradiente com solventes em ordem crescente de polaridade. O fracionamento deste sólido originou 36 frações sendo reunidas após análise por CCDA em 7 novas frações, como é mostrado na TABELA 3.2.

TABELA 3.2 - Fracionamento do sólido precipitado do extrato metanólico (**AOS**).

Junções	Fração	Massa (g)
1-7	AOS1	0,8
8-15	AOS2	0,1
16-20	AOS3	0,2
21-23	AOS4	0,1
24-26	AOS5	2,65
27-30	AOS6	0,1
31-36	AOS7	0,1

3.3.3.1 - Fracionamento da fração AOS1

Realizou-se o refracionamento de **AOS1** (0,8 g) por cromatografia de exclusão ($h \times \phi = 40,0 \times 3,0$ cm), utilizando Sephadex LH-20 e eluição com MeOH 100%, obtendo-se 16 frações que foram analisadas por CCDA e reunidas em 7 novas frações (TABELA 3.3). A fração **AOS1.6** foi identificada através da análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (uni e bidimensional) como flavonóide (**Substância I**).

TABELA 3.3 - Frações obtidas do fracionamento de **AOS1**.

Junções	Fração	Massa (mg)
1 - 5	AOS1.1	42,8
6 - 7	AOS1.2	58,7
8 - 10	AOS1.3	155,5
11 - 13	AOS1.4	84,4
14	AOS1.5	28,1
15	AOS1.6	183,7
16	AOS1.7	118,1

3.3.1.2 - Reação de acetilação do AOS

Em função da alta polaridade do precipitado obtido do extrato metanólico (**AOS**), parte da amostra foi acetilada. Dissolveram-se 80 mg da amostra em 3 mL de piridina e 3 mL de anidrido acético. Deixou-se sob agitação por 24 h. Em seguida, adicionou-se 6 mL de MeOH e deixou-se em repouso por 30 min. Acrescentou-se 2 mL de água destilada gelada, deixando mais 30 min em repouso.

Posteriormente transferiu-se o material para um funil de separação adicionando 100 mL de AcOEt. Lavou-se então a fase orgânica com 20 mL de água destilada, 20 mL de solução de HCl (5%) e novamente com 20 mL de água destilada. Cada lavagem foi feita por duas vezes. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado.

A purificação dessa amostra foi feita por cromatografia de exclusão ($h \times \phi = 30,0 \times 2,5$ cm), com Sephadex-LH 20, eluição com MeOH 100%, obtendo-se um sólido esbranquiçado que foi analisado por RMN ^1H e ^{13}C e caracterizado como flavonóide (**Substância II**).

3.3.2 - Fracionamento extrato diclorometânico (AOD)

Foram realizados inúmeros fracionamentos do extrato **AOD** utilizando as técnicas convencionais de cromatografia em coluna (fase estacionária sílica gel e Sephadex LH-20). Esta metodologia não foi eficiente, pois grande parte do material ficou retido na fase estacionária e não houve separação dos compostos.

3.3.3 - Fracionamento do extrato diclorometânico AOD utilizando cromatografia líquido-líquido – RLCC (*Rotation Locular Countercurrent Chromatography*)

O equipamento de RLCC possui 16 colunas de vidro compostas de 37 compartimentos cada. A velocidade de rotação, o ângulo de inclinação e o fluxo são variados de acordo com a análise a ser realizada.

A técnica consiste na introdução de duas fases líquidas imiscíveis nas colunas, sendo que uma delas é a fase estacionária e a outra é a fase móvel (FIGURA 3.1).

Esta técnica se baseia na diferença de afinidade da amostra em solventes de diferentes polaridades (MARSTON & HOSTETTMANN, 1994).

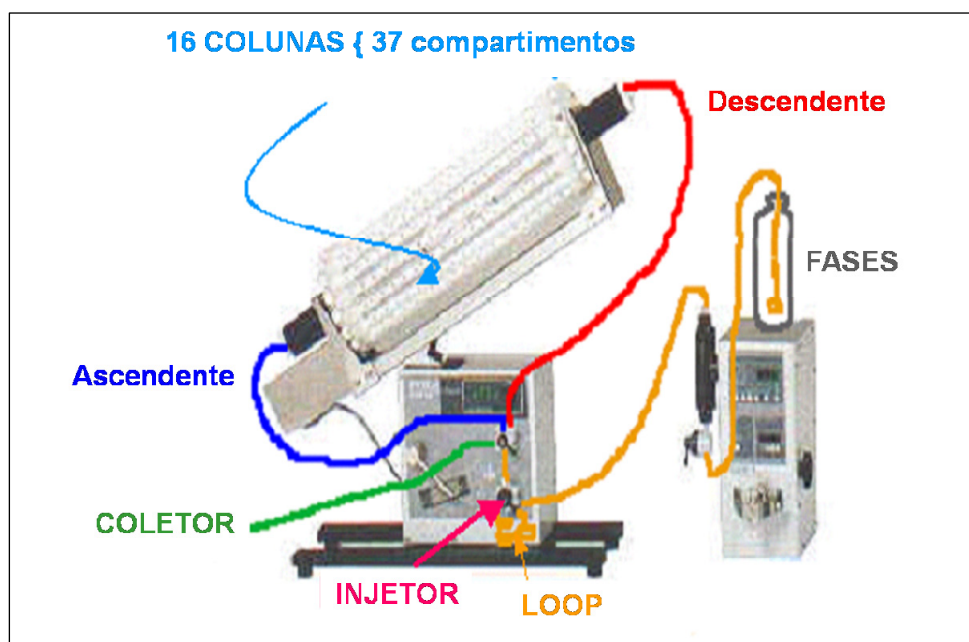


FIGURA 3.1 - Esquema de um equipamento de RLCC.

A escolha da mistura de eluentes a ser utilizada é efetuada através de dois parâmetros: análises por CCDA e partição líquido-líquido.

Na técnica de CCDA a amostra deve apresentar um R_f superior a 0,8 quando eluída em uma das fases e na outra um R_f na ordem de 0,2.

Já a partição líquido-líquido é realizada com uma pequena quantidade da amostra a ser analisada. As fases são escolhidas de acordo com a qualidade de separação da amostra em cada uma delas.

A fase móvel pode ser introduzida nas colunas no modo ascendente ou descendente, conforme sua densidade em relação à fase estacionária. Quando a fase móvel é menos densa que a fase estacionária, o modo de eluição utilizado é ascendente. Já quando a fase móvel é a fase mais densa, o modo de eluição é descendente.

No equipamento de RLCC são introduzidos 400 mL da fase estacionária e 700 mL da fase móvel. Durante a introdução da fase estacionária as colunas são mantidas em repouso na posição horizontal. Já na introdução da fase móvel as colunas são rotacionadas na posição vertical. Após as duas fases estarem introduzidas, a amostra é injetada manualmente em um reservatório (*loop*) de 3 mL e as frações obtidas são coletadas automaticamente. A fase móvel é passada pelas colunas até a finalização da análise.

Através da análise do extrato **AOD** por CCDA (eluição em Hex/CH₂Cl₂/Act na proporção de 1:3:1), foi evidenciada a presença de manchas com R_{fs} variando entre 0 e 1, sendo a maioria delas visíveis no UV (254 nm).

Inicialmente foram feitos inúmeros testes de partição do extrato vegetal em misturas ternárias e quaternárias bifásicas de solventes orgânicos. Foram testados 26 diferentes sistemas. Para isso, 40 mL da mistura de solventes foi adicionada a 200 mg de amostra. Após agitação em um funil de separação e formação de duas fases imiscíveis, as fases foram separadas e concentradas para serem pesadas, analisadas por CCDA e RMN ¹H.

A TABELA 3.4 mostra os seis sistemas que apresentaram melhor eficiência no fracionamento do extrato **AOD**. Alguns dos sistemas que apresentaram boa resolução, quando injetados no equipamento apresentaram alguns inconvenientes para utilização em maior escala.

TABELA 3.4 - Sistemas testados para utilização no RLCC para o fracionamento de **AOD**.

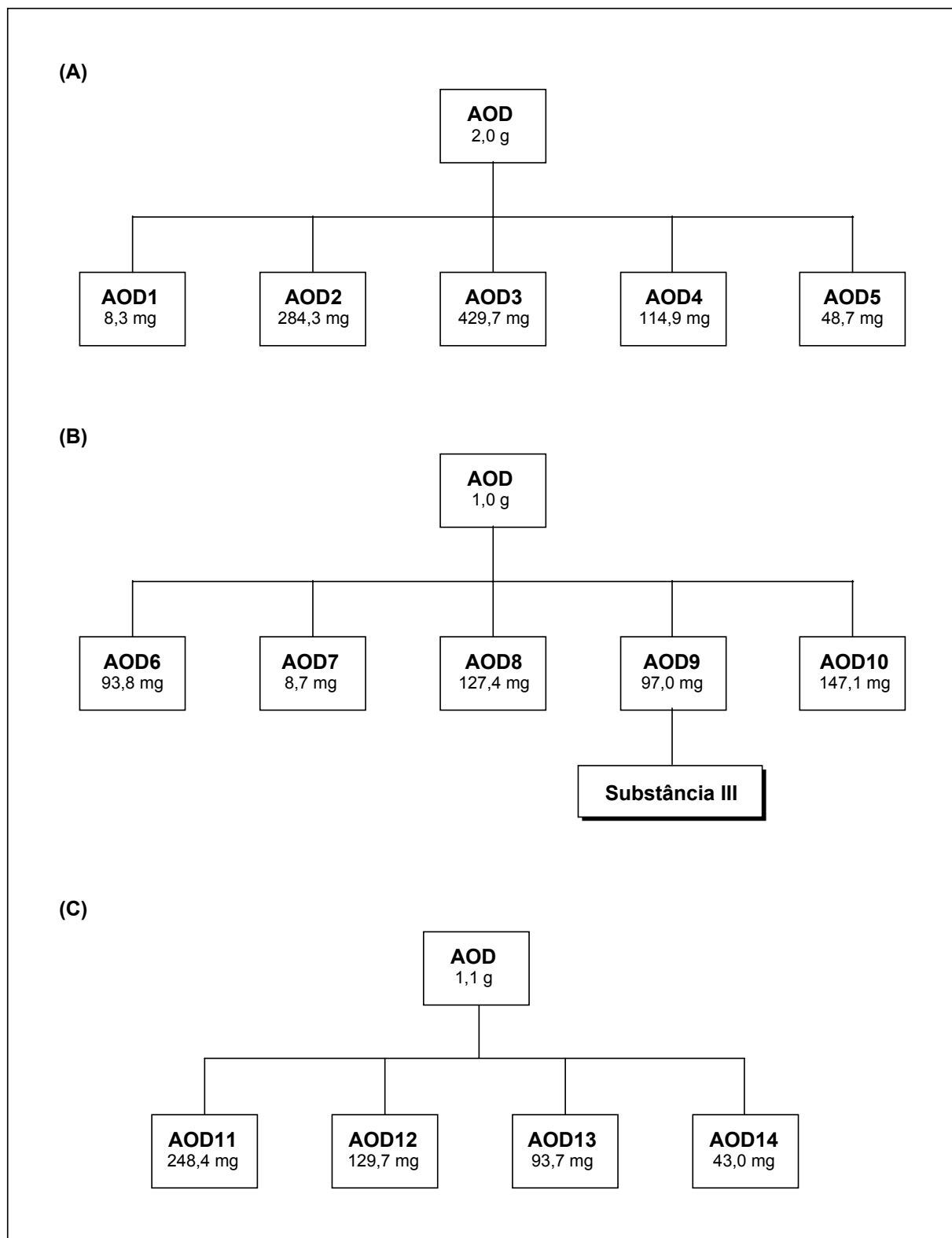
Sistema	Solventes	Proporção
1	Dic/MeOH/H ₂ O	7:4:2
2	Hex/Dic/MeOH/H ₂ O	5:5:8:2
3	Hex/Dic/AcN	10:3:7
4	Hex/MeOH/H ₂ O	10:9:1
5	Dic/MeOH/n-PrOH	6:6:0,5:4
6	Hex/AcOEt/MeOH/H ₂ O	5:2:4:1

O sistema que permitiu melhor fracionamento do extrato **AOD** entre as duas fases imiscíveis foi o sistema **4** (Hex/MeOH/H₂O, na proporção de 10:9:1). A análise por CCDA indicou que o material presente em cada uma das duas fases tinha características bem distintas e isso pode ser comprovado através das análises de RMN ¹H.

Depois de estabelecido o sistema de fases a ser utilizado, as condições de injeção e análise foram otimizadas. Os melhores resultados foram obtidos com as condições que estão descritas na TABELA 3.5. As frações foram coletadas com o auxílio de um coletor automático, coletando 800 gotas por fração, o equivalente a 10 mL cada. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas conforme suas similaridades (FLUXOGRAMA 3.1).

TABELA 3.5 - Condições utilizadas para o fracionamento de **AOD** utilizando RLCC.

	Fracionamento 1	Fracionamento 2	Fracionamento 3
Massa de material injetado (g)	2,0	1,0	1,1
Fluxo de eluição (mL/min)	4,0	1,5	1,5
Solventes utilizados	Hex/MeOH/H ₂ O	Hex/MeOH/H ₂ O	Hex/MeOH/H ₂ O
Proporção	10:9:1	10:9:1	10:9:1
Fase estacionária	mais polar (fase mais densa)	menos polar (fase menos densa)	mais polar (fase mais densa)
Fase móvel	menos polar (fase menos densa)	mais polar (fase mais densa)	menos polar (fase menos densa)
Modo de eluição	ascendente	descendente	ascendente
Total de frações	110	55	22
Tempo de análise (h)	4	6	2,5



ESQUEMA 3.1 - Fracionamento do extrato **AOD** utilizando RLCC. (A) Fracionamento A: modo de eluição ascendente. (B) Fracionamento B: modo de eluição descendente. (C) Fracionamento C: modo de eluição ascendente.

Com o fracionamento A foi conseguido uma fração constituída majoritariamente por ácidos anacárdicos saturados e insaturados (fração **AOD3** –

429,7 mg) que apresentou excelente resultado nos ensaios biológicos. Sendo assim, este fracionamento foi repetido algumas vezes até a obtenção de 2 g da fração enriquecida e esta foi denominada **AC**, por ser rica em ácidos anacárdicos.

3.3.4 - Isolamento dos constituintes do extrato AOD por precipitação fracionada (PARAMASHIVAPPA *et al.*, 2001)

- **Isolamento dos ácidos anacárdicos**

O extrato **AOD** (25 g) foi dissolvido em 150 mL de metanol aquoso (5%). Aos poucos, sob agitação magnética, 15 g de hidróxido de cálcio foi adicionado. Depois de completada a adição do hidróxido de cálcio, a temperatura da mistura foi elevada para 50 °C e agitada por 1 h e 30 min. Deixou-se em repouso por mais 1 h e 30 min. A solução sobrenadante foi monitorada por CCDA. Completada a reação, o precipitado (teoricamente o anacardato de cálcio) foi filtrado e lavado com 100 mL de metanol por 2 vezes. A pasta foi secada sob vácuo por 45 min. Em seguida o precipitado foi suspenso em água destilada (110 mL) e solução de ácido clorídrico 11 M (20 mL). A mistura foi agitada por 1 h. A solução resultante foi extraída com 200 mL de acetato de etila por 3 vezes. A fase orgânica foi lavada com 100 mL de água destilada por 3 vezes, secada com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida. O sólido formado foi denominado **AO1**.

- **Isolamento dos cardóis e cardanóis**

A solução metanólica aquosa obtida depois da filtração do precipitado foi concentrada a 200 mL sob pressão reduzida. Posteriormente adicionaram-se 50 mL de solução de amônia (25%) e foi deixada sob agitação por 30 min. Esta solução foi então extraída com hexano/acetato de etila (98:2) por 3 vezes, utilizando 200 mL da mistura de solventes para cada extração. A fase orgânica foi lavada com 50 mL de solução de hidróxido de sódio (2,5%), seguida por 25 mL de solução de ácido clorídrico (5%) e 150 mL de água destilada. Em seguida foi secada com sulfato de sódio anidro e concentrada, originando o sólido **AO2**. A solução metanólica de amônia foi extraída com acetato de etila/hexano (80:20) (200 mL), por 3 vezes. A fase orgânica foi lavada com 25 mL de solução de ácido clorídrico (5%), seguida por

200 mL de água destilada. Esta foi secada com sulfato de sódio anidro e concentrada originando **AO3**. A TABELA 3.6 mostra as respectivas massas das etapas de isolamento.

TABELA 3.6 - Amostras obtidas por reação de precipitação a partir do extrato diclorometânico **AOD**.

Amostra	Massa (g)
AO1	13,10
AO2	3,58
AO3	0,15

3.4 - Modificações estruturais

3.4.1 - Reação de hidrogenação catalítica da fração AC para obtenção de AC1

Em um balão de fundo redondo, sob agitação magnética, adicionou-se paládio 10% em carvão ativo (3 mg) e a mistura dos ácidos anacárdicos (**AC**) (300 mg) em metanol (5 mL) deixando-se a atmosfera do balão sob H₂ e a temperatura ambiente. Após 6 h a reação havia se completado, então filtrou-se a solução em celite, carvão ativo e sílica comum. Em seguida, evaporou-se o solvente à pressão reduzida em rotaevaporador. O sólido saturado de cor amarelada foi denominado **AC 1**.

3.4.2 - Reação de metilação com diazometano para obtenção de AC 2

A solução de diazometano foi preparada dissolvendo 2,1 g de *p*-toluilsulfonilmetilnitrosamida em 30 mL de éter etílico. Esta solução foi resfriada em banho de gelo e transferida para um balão de destilação, juntando-se uma solução de 0,4 g de KOH em 10 mL de etanol 96%. Deixou-se o sistema em repouso por 5 min em banho de gelo e em seguida iniciou-se a destilação em banho de óleo. Uma alíquota de 3 mL do destilado foi acrescentada a amostra **AC 1** (130 mg; 0,37 mmol), deixando-a em repouso até não observar mais a liberação de gases. O diazometano foi eliminado a temperatura ambiente deixando o frasco aberto na capela. Um sólido de cor esbranquiçada foi observado, sendo o mesmo denominado de **AC 2**.

3.4.3 - Reação de redução com hidreto de lítio alumínio para obtenção de AC 3

Em um balão de fundo redondo, sob agitação magnética e atmosfera de N_2 , dissolveu-se $LiAlH_4$ (50 mg; 0,29 mmol) em éter etílico anidro (3 mL). Em outro balão, também sob atmosfera de N_2 , dissolveu-se **AC 2** (100 mg; 0,28 mmol) em éter etílico anidro (3 mL). O balão que continha $LiAlH_4$ foi resfriado a 0 °C e em seguida com o auxílio de uma seringa, adicionou-se lentamente a solução que continha **AC 2** ao balão contendo $LiAlH_4$. Após a adição, o frasco de reação foi retirado do banho de gelo permitindo alcançar a temperatura ambiente, acompanhando seu desenvolvimento por CCDA usando como eluente Hex/Dic/Act (3,0:1,5:0,5). Depois de 48 h, cessou-se a reação embora o material de partida ainda pudesse ser observado. Transferiu-se o conteúdo do balão reacional para um Erlenmeyer imerso num banho de gelo e adicionou-se gota a gota 0,5 mL de H_2O destilada e 0,5 mL de solução de NaOH 10%. Ocorreu a turvação da solução sendo esta filtrada em funil de placa sinterizada contendo celite. Em seguida extraiu-se com a fase orgânica, lavando-a 3 vezes com H_2O destilada e secando-a com Na_2SO_4 anidro. Evaporou-se o solvente à pressão reduzida em rotaevaporador. O produto da reação continha várias impurezas e ainda restava material de partida. Este foi então submetido à cromatografia em sílica *flash* com eluição isocrática utilizando Hex/AcOEt (4,5:0,5). O produto desta reação foi denominado **AC 3**.

3.4.4 - Reação de acetilação para obtenção de AC 8

Em um balão contendo 0,5 mL de anidrido acético, foram adicionadas 2 gotas de H_2SO_4 concentrado. Esta solução ficou sob agitação a temperatura ambiente, por 5 min, quando foi adicionado **AC 1** (50 mg; 0,14 mmol) previamente solubilizado em 2,5 mL de anidrido acético. Posteriormente o meio reacional foi aquecido em banho de óleo a 75 °C, por 45 min, sendo a reação acompanhada por CCDA. Depois de terminada a reação, a solução foi diluída com CH_2Cl_2 e lavada 2 vezes com H_2O destilada e solução saturada de $NaHCO_3$, até a obtenção de pH aproximado de 6,5. Em seguida fez-se a extração da fase orgânica num funil de separação, lavando-a 3 vezes com H_2O destilada e secando-a com Na_2SO_4 anidro. Evaporou-se o solvente à pressão reduzida em rotaevaporador. O produto da reação continha várias impurezas e ainda restava material de partida. Este foi então

submetido à cromatografia em sílica *flash*, com eluição isocrática utilizando Hex/Dic (4:1), para purificação do produto (**AC 8**).

3.4.5 - Reação de dimetilação para obtenção de AC 9

Em um balão contendo **AC 1** (50 mg; 0,14 mmol) solubilizado em 4,0 mL de CH₂Cl₂ foi adicionado 1 mL de solução de NaOH (3 M), 0,03 mL de catalisador de transferência de fase Aliquat 336 e por último, sob agitação constante, 0,5 mL de (CH₃)₂SO₄. A reação ficou sob agitação por 4 h e 30 min, a temperatura ambiente, quando que através de CCDA, verificou-se o fim da reação. A mistura foi diluída com CH₂Cl₂, lavada 2 vezes com H₂O destilada, 2 vezes com solução de NH₄OH (2 M) e 2 vezes com salmoura. Posteriormente foi seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente foi evaporado a pressão reduzida em rotaevaporador. O produto da reação apresentou várias impurezas e foi submetido à cromatografia em sílica *flash*, com eluição gradiente, para purificação do produto (**AC 9**).

3.4.6 - Reação de ozonólise para obtenção de AC 11

Em um balão de fundo redondo com duas bocas, foram dissolvidos sob agitação magnética, 100 mg da mistura dos ácidos anacárdicos (**AC**) em CH₂Cl₂ (4 mL). Após total dissolução, adaptou-se um tubo secante numa das bocas do balão e na outra se colocou uma entrada para O₃ com a ponta da pipeta de vidro imersa na solução. A temperatura do meio reacional foi mantida a -78 °C com o auxílio de um banho de etanol com gelo seco. Um cilindro de O₂ foi conectado ao ozonizador, sendo o fluxo de O₃ controlado para não haver explosões. O fim da reação foi observado após 6 h pela mudança de coloração da solução, de amarelo claro para levemente azulado, e confirmado por CCDA. Para destruir o excesso de O₃, adicionou-se 2 mL de uma solução de KI (0,8 g) em ácido acético (5 mL). A solução foi deixada para atingir temperatura ambiente ainda sob agitação durante 1 h. Em seguida, lavou-se a mistura com uma solução 10% de tiosulfato de sódio, até todo o iodeto ser eliminado. Extraiu-se a fase orgânica com H₂O destilada e solução de bicarbonato de sódio 5%, lavando-a por 3 vezes com H₂O destilada e secando-a com MgSO₄ anidro. O produto obtido foi submetido à cromatografia em *sephadex* LH-20 eluída em 100 % de MeOH e o produto da reação foi denominado **AC 11**.

3.5 - Ensaios biológicos

Todos os extratos, frações e substâncias foram enviadas ao teste de inibição da enzima gGAPDH de *T. cruzi* e algumas amostras foram testadas nas suas formas tripomastigotas.

3.5.1 - Ensaios bioquímicos com a enzima gGAPDH de *T. cruzi*

Os ensaios bioquímicos com gGAPDH foram realizados no Instituto de Física da USP – São Carlos. A gGAPDH usada no ensaio de inibição enzimática é uma enzima recombinante obtida em um sistema de expressão de *Escherichia coli*. A preparação e purificação da enzima gGAPDH segue procedimento descrito por Souza (SOUZA *et al.*, 1998).

A atividade da enzima foi monitorada através de ensaio espectrofotométrico de ultravioleta (UV), com base na reação bioquímica catalisada pela enzima gGAPDH de *T. cruzi*, a temperatura de 25 °C. A reação enzimática foi iniciada com a adição da enzima ao meio reacional, monitorando a formação do NADH por UV durante 30 segundos. As condições do meio reacional para os ensaios enzimáticos estão descritas na TABELA 3.7.

TABELA 3.7 - Condições do meio reacional para a realização dos ensaios na enzima gGAPDH de *T. cruzi* totalizando um volume de 1 mL.

Condições do Meio Reacional	Cofator NAD ⁺ (*)	Cofator NAD ⁺ (**)	Cofator Tio-NAD ⁺
Solução tampão trietolamina	50 mM	100 mM	100 mM
pH	8,6	7,5	7,5
Etilenodiaminotetracetato dissódico (EDTA)	1 mM	1 mM	1 mM
β-mercaptoetanol	1 mM	1 mM	1 mM
Arseniato de sódio	30 mM	30 mM	30 mM
Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD ⁺)	2,5 mM	400 μM	-
Tionicotinamida adenina dinucleotídeo (Tio-NAD ⁺)	-	-	250 μM
DL-gliceraldeído-3-fosfato (G3P)	0,3 mM	600 μM	800 μM
Enzima gGAPDH	4-9 mg	13 nM	41 nM
Espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta	340 nm	340 nm	400 nm

(*) condições reacionais inicialmente utilizadas para a realização dos ensaios enzimáticos com gGAPDH. (**) NOVO PROTOCOLO - condições reacionais utilizadas atualmente para a realização dos ensaios enzimáticos com gGAPDH.

Nestes ensaios alguns cuidados devem ser tomados antes da realização de triagens bioquímicas: (i) aquisição de um espectro de varredura da amostra a ser avaliada (na faixa de 200 e 400 nm) para verificar possíveis interferências do candidato a inibidor na região do espectro de absorção em que se realizam as leituras dos ensaios cinéticos; (ii) o composto em estudo deve ser adicionado ao tampão na presença de NAD⁺ e analisado a 340 nm, para avaliar se por si só ele é capaz de reduzir o NAD⁺ a NADH; (iii) finalizados estes testes preliminares, os candidatos a inibidores são dissolvidos em DMSO e adicionados ao meio reacional, não devendo a concentração de DMSO exceder 10% do volume final do ensaio, pois nesta concentração o solvente orgânico não afeta significativamente a atividade da enzima.

No processo de triagem de candidatos a inibidores, um teste em dose única (200 μg/mL para mistura de substâncias) ou concentração única (200 μM para

compostos puros) foi empregado. As misturas de substâncias que apresentaram inibição superior a 30% foram selecionadas para purificação e os compostos puros que apresentaram inibição superior a 50% tiveram sua potência determinada através de valores de IC₅₀.

Para a determinação dos valores de IC₅₀ (concentração de inibidor necessária para reduzir em 50% a atividade enzimática) foram utilizadas cinco concentrações de inibidor, capazes de reduzir a atividade enzimática em 15-85%. Todas as medidas foram realizadas em triplicata, utilizando como controle negativo a mistura reacional acrescida de 10% de DMSO e como controle positivo uma solução 200 µM de uma amostra denominada inibidor padrão (cumarina sintética com IC₅₀ de 64 µM).

Os dados experimentais coletados foram analisados graficamente utilizando o programa SigmaPlot versão 7.0 e os valores de IC₅₀ determinados através de análise não-linear de melhor ajuste.

3.5.2 - Ensaio tripanocida *in vitro* sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi*

Os ensaios tripanocidas foram realizados no Departamento de Análises Clínicas, Toxológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto - USP.

Para a realização do ensaio foi utilizado sangue de camundongos albinos Swiss experimentalmente infectados com a cepa Y do parasita. O sangue foi obtido através de punção cardíaca após sete dias de infecção, onde ocorre o pico de parasitemia.

O sangue contaminado é diluído em sangue de um animal sadio para atingir uma população de 50 a 100 formas tripomastigotas em 50 campos microscópicos, resultando numa concentração de 2×10^6 formas tripomastigotas por mL. Como anticoagulante foi utilizado citrato de sódio (C₆H₈O₇) a 3,8 % e pH 7,3 na proporção de um volume de citrato para três de sangue infectado.

Em uma placa de microtitulação com 96 poços foi colocado o sangue infectado e os extratos e/ou as substâncias puras dissolvidas em DMSO. Em seguida, todo material foi incubado por um período de 24 h a 4 °C.

Como controle positivo foi utilizado o sangue infectado e para controle negativo utilizou-se o sangue infectado com violeta de genciana a uma concentração de 250 µg/mL.

Após o período de incubação, o número de parasitas foi determinado colocando-se uma alíquota de 5 μ L de sangue sobre uma lâmina coberta com uma lamínula de 22 x 22 mm e contando-se os parasitas em 50 campos microscópicos, segundo a técnica descrita por Brener (BRENER, 1962).

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados dos ensaios foram expressos em porcentagem de lise parasitária. Os extratos foram inicialmente ensaiados numa concentração de 4 mg/mL e as substâncias puras nas concentrações de 100, 250 e 500 μ M.

PARTÉ I
Resultados
e Discussões

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 - Estudos de *Anacardium occidentale*

Para investigar a potencialidade de *A. occidentale* como planta biologicamente ativa, foi necessário o isolamento e identificação de seus constituintes químicos. Para isso utilizou-se um óleo comercial (LCC), também conhecido por LCC técnico e os extratos obtidos pela maceração das cascas da castanha de caju com solvente orgânico.

O óleo comercial e os extratos foram analisados por CCDA e RMN ^1H . O LCC comercial apresentava coloração bastante escura e possuía odor característico de queima. Este óleo obtido como subproduto da indústria castanheira, era constituído majoritariamente por cardanol **(a)**, proveniente da descarboxilação a quente dos ácidos anacárdicos **(b)**. Já os extratos das cascas obtidos por extração com solvente orgânico eram ricos em derivados fenólicos, entre eles cardanol **(a)**, ácidos anacárdicos **(b)** e cardol **(c)** (FIGURA 4.1). Visto que o LCC comercial não apresentava ácido anacárdico em quantidade expressiva, optou-se pela sua não utilização.

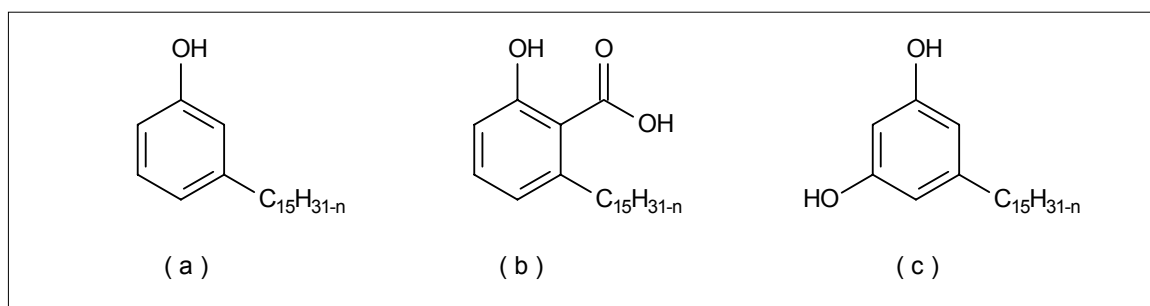


FIGURA 4.1 - Constituintes majoritários do LCC técnico e dos extratos orgânicos de *A. occidentale*.

Dados da literatura apresentam diversas técnicas de separação para estes constituintes fenólicos (KIONG & TYMAN, 1981; SHOBBA & RAVINDRANATH, 1991; PARAMASHIVAPPA *et al.*, 2001; KUMAR *et al.*, 2002).

4.1.1 - Extrato metanólico de *Anacardium occidentale* (AOM)

O extrato metanólico (AOM) foi analisado por CCDA e quando revelado em vanilina observaram-se manchas de coloração vermelho púrpuro referente à presença de derivados fenólicos e manchas de coloração marrom escuro.

Observou-se ainda no frasco que armazenava este extrato a presença de um precipitado que foi filtrado e analisado por RMN ^1H . A presença de vários sinais bem definidos na região aromática (δ_{H} 6,0 - 7,5 ppm) e ausência de sinais referentes a metilas despertaram o interesse deste material, que foi submetido a CC e parte acetilada. Em ambos os casos, os sólidos obtidos foram analisados por RMN ^1H e ^{13}C e caracterizados como flavonóides do tipo flavanona.

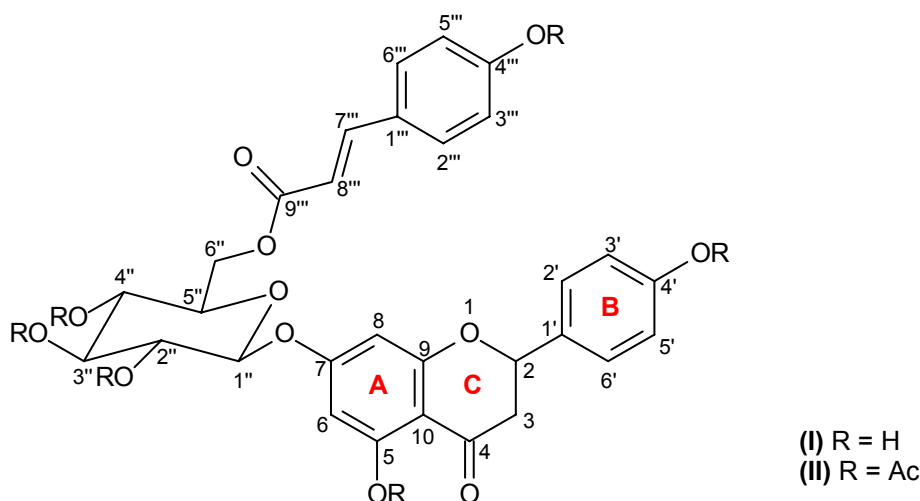
Os flavonóides são biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e constituem uma importante classe de polifenóis presentes em abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. Suas unidades biossintéticas provêm de um caminho misto, onde o anel A tem origem pelo caminho do acetato e os anéis B e C no caminho do chiquimato. O termo fenólico ou polifenol pode ser definido como sendo uma substância que tem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais (ésteres, metoxilas, glicosídeos e outros). Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural, sendo amplamente distribuídos no reino vegetal, apresentando enorme variedade estrutural em plantas superiores, sendo quase ausente em algas e fungos (DEWICK, 2002; SIMÕES *et al.*, 2003).

Existem diversas formas estruturais de flavonóides, sendo que a maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu esqueleto principal, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três átomos de carbono entre elas (SIMÕES *et al.*, 2003).

4.1.1.1 - Identificação das flavanonas glicosiladas I e II

O prunin-6''-O-*p*-coumarato I, uma flavanona glicosilada, foi isolada do precipitado oriundo do extrato metanólico de *A. occidentale* (AOM) como um sólido amorfo marrom. A identificação deste metabólito foi realizada inicialmente através de experimentos de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) (FIGURA 4.2 e 4.3) e os dados

obtidos estão descritos na TABELA 4.1, em comparação com os da literatura. El Sissi e colaboradores descrevem o isolamento desse flavonóide de *Acacia farnesiana* (Leguminosae) (EL SISSI *et al.*, 1974) e após alguns anos este mesmo flavonóide foi isolado do extrato acetônico de *A. occidentale* (RAHMAN *et al.*, 1978).



A análise do espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.2) sugeriu a presença de uma flavanona devido a presença de sinais em δ_{H} 2,64 (dd, $J = 2,8$ e $17,0$ Hz), δ_{H} 2,99 (dd, $J = 12,0$ e $17,0$ Hz) e em δ_{H} 5,21 (dd, $J = 2,8$ e $12,0$ Hz) atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H-3a, H-3b e H-2 do anel C de flavanonas.

Em δ_{H} 7,55 (d, $J = 15,8$ Hz) e δ_{H} 6,30 (d, $J = 15,8$ Hz) observou-se a presença de dois dubletos, integrando para um hidrogênio cada. A constante de acoplamento ($J = 15,8$ Hz) foi consistente com valores de deslocamento de prótons olefínicos-*trans* em sistemas carbonílicos α,β -insaturados.

Na região de hidrogênios aromáticos (δ_{H} 6,14-7,35) foram observados três conjuntos de sinais. O primeiro conjunto com dois dubletos (δ_{H} 7,35 e 6,75), ambos com $J = 8,6$ Hz e integrando para dois hidrogênios cada, apresentou um padrão de acoplamento típico de um anel aromático dissustituído, onde dois dos hidrogênios são equivalentes. O segundo conjunto também apresentou dois dubletos (δ_{H} 7,22 e 6,79), ambos com $J = 8,6$ Hz, integrando para dois hidrogênios cada, também acoplamento típico de anel aromático dissustituído com dois hidrogênios equivalentes. No terceiro conjunto de sinais foi observada a presença de dois dubletos (δ_{H} 6,20 e 6,14), ambos com $J = 2,2$ Hz, integrando para um hidrogênio cada.

Os sinais de hidrogênios carbinólicos que apareceram no espectro de RMN ^1H entre δ_{H} 3,18-3,65 indicaram a presença de uma glicosilação.

Os dubletos em δ_{H} 6,79 (d, $J = 8,6$ Hz) e δ_{H} 7,22 (d, $J = 8,6$ Hz) foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-3', H-5' e H-2', H-6', que são quimicamente equivalentes. Já os dubletos em δ_{H} 6,75 (d, $J = 8,6$ Hz) e δ_{H} 7,35 (d, $J = 8,6$ Hz) foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-3'', H-5'' e H-2'', H-6'', também quimicamente equivalentes.

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.3) apresentou vinte e cinco sinais referentes a carbonos, sendo que quatro deles estavam com intensidade duplicada (δ_{C} 130,3, 128,4, 115,7 e 115,1 e um deles encoberto pelo sinal do solvente, totalizando trinta átomos de carbono (TABELA 4.1).

Verificou-se ainda a presença de um carbono carbonílico em δ_{C} 198,42 e dezoito sinais de carbonos aromáticos, indicando a presença de um terceiro anel aromático além dos dois anéis aromáticos do esqueleto principal de uma flavanona. Oito destes carbonos eram totalmente substituídos, indicando a presença de substituintes no anel A e B.

A existência de sinais referentes a carbonos carbinólicos sugeriu a presença de três hidroxilas como substituintes, sendo elas nas posições 5, 4' e 4''. A glicosilação foi evidenciada pelos sinais de CH carbinólicos com deslocamento químico em δ_{C} 99,2 (C-1''), 76,1 (C-3''), 73,8 (C-5''), 72,9 (C-2'') e 69,8 (C-4'').

A suposição de três anéis aromáticos diferentes foi confirmada por meio das correlações ^1H - ^1H , observadas no experimento COSY (FIGURA 4.4), conforme a TABELA 4.2.

Através da análise do espectro de HSQC (FIGURA 4.5) foram observadas as correlações dos sinais em δ_{C} 63,3 com dois hidrogênios (δ_{H} 4,54 e 4,27, que acoplavam entre si com $J = 11,8$ Hz), evidenciando a existência de um CH_2 . Com isto pode-se atribuir todos os demais carbonos da substância I (TABELA 4.3).

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C , associados com aqueles obtidos das análises dos espectros bidimensionais (COSY e HSQC) e comparação com os dados da literatura (RAHMAN *et al.*, 1978) (TABELA 4.1), possibilitou identificar o composto I como sendo a flavanona naringenina-7-O-(6''-O-*p*-cumaroil)- β -D-glucosídeo.

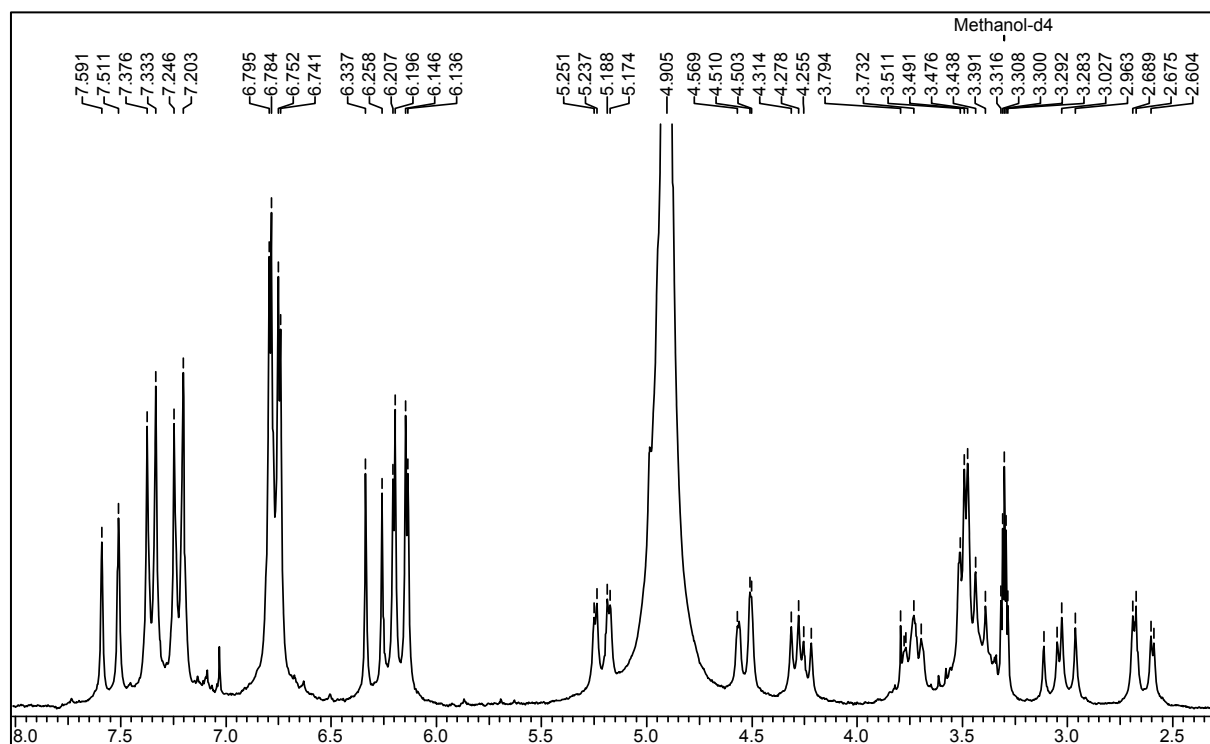


FIGURA 4.2 - Espectro de RMN ^1H da flavanona I (MeOD, 200 MHz).

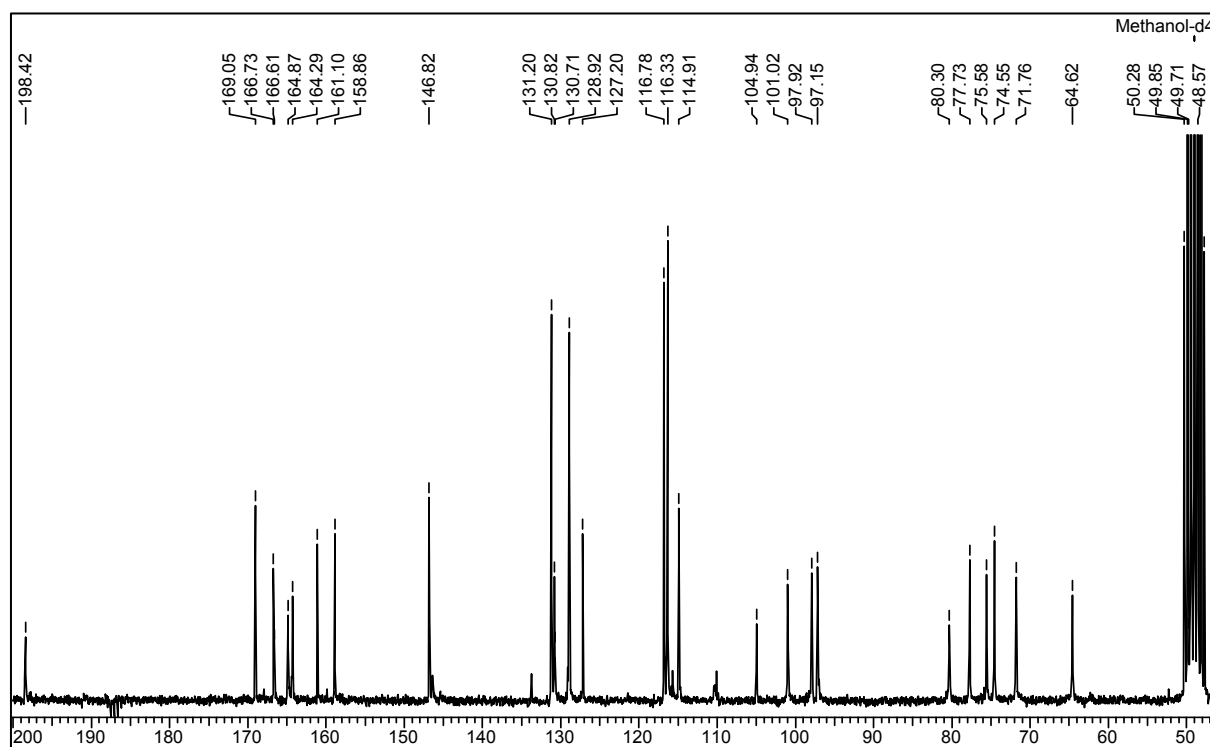


FIGURA 4.3 - Espectro de RMN ^{13}C da flavanona I (MeOD, 50 MHz).

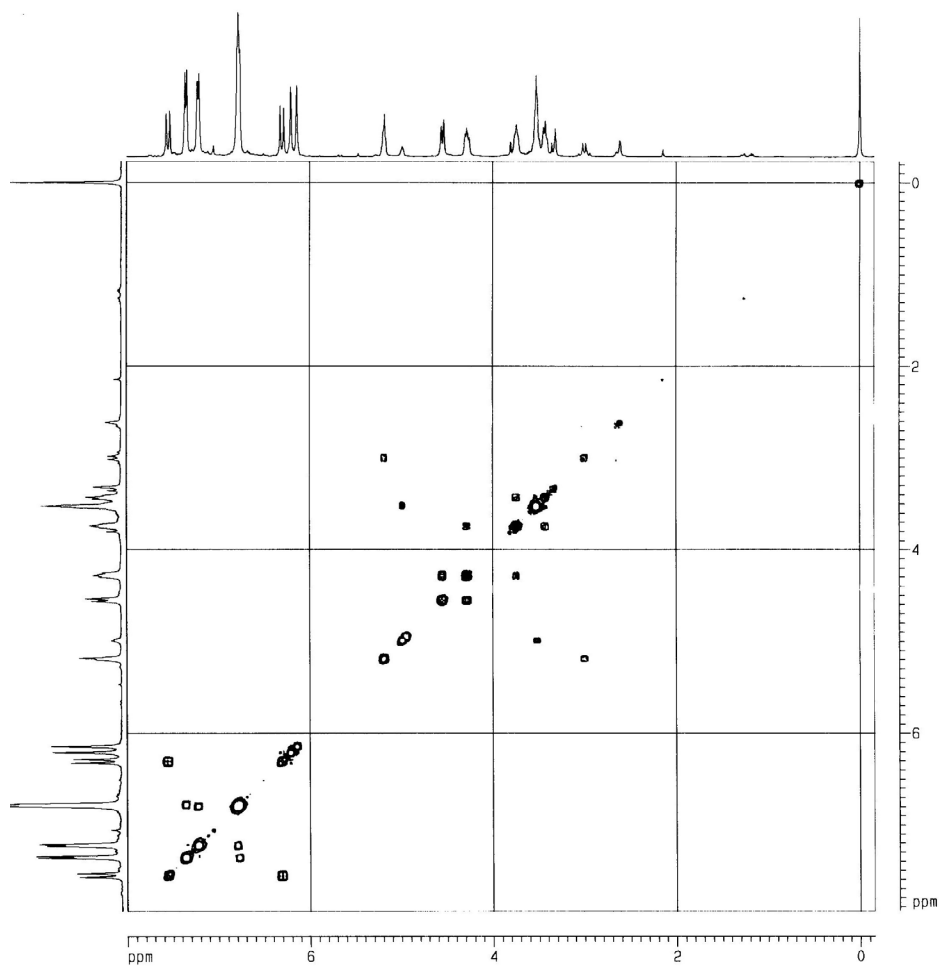


FIGURA 4.4 - Mapa de contorno de COSY da flavanona I (MeOD, 400 MHz).

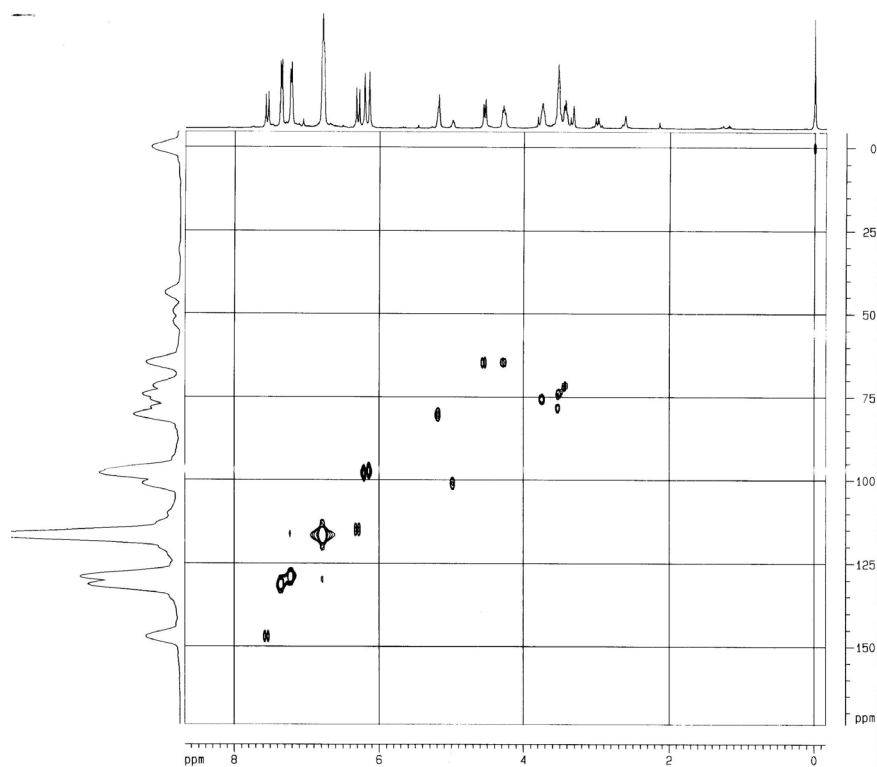


FIGURA 4.5 - Mapa de contorno de HSQC da flavanona I (MeOD, 400 MHz).

TABELA 4.1 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C da flavanona I.

H/C	RMN ^1H (MeOD, 200 MHz) (δ = ppm; J = Hz)	RAHMAN <i>et al.</i> , 1978 (DMSO- d_6)	RMN ^{13}C (MeOD, 50 MHz) (δ = ppm)	RAHMAN <i>et al.</i> , 1978 (DMSO- d_6)
2	5,21 (dd, J = 2,8 e 12,0)	5,50 (d, J : 12,0)	80,3	78,6
3a	2,99 (dd, J = 12,0 e 17,0)	2,70 - 4,15 (m)	**	42,0
3b	2,64 (dd, J = 2,8 e 17,0)			
4	-	-	198,4	197,2
5	-	-	164,9	163,0
6	6,20 (d, J = 2,2)	6,22 (s)	97,9	96,3
7	-	-	166,7	165,0
8	6,14 (d, J = 2,2)	6,22 (s)	97,2	95,5
9	-	-	164,3	162,6
10	-	-	104,9	103,3
1'	-	-	130,8	128,6
2'	7,22 (d, J = 8,6)	7,35 (d, J : 8,5)	128,9	128,4
3'	6,79 (d, J = 8,6)	6,83 (d, J : 9,0)	116,3	115,1
4'	-	-	158,9	157,7
5'	6,79 (d, J = 8,6)	6,83 (d, J : 9,0)	116,3	115,1
6'	7,22 (d, J = 8,6)	7,35 (d, J : 8,5)	128,9	128,4
1''	5,18 (m)*	5,13 (d, J : 6,0)	101,0	99,2
2''	3,35 (m)	2,70 - 4,15 (m)	74,6	72,9
3''	3,35 (m)	2,70 - 4,15 (m)	77,7	76,1
4''	3,35 (m)	2,70 - 4,15 (m)	71,8	69,8
5''	3,65 (m)	2,70 - 4,15 (m)	75,6	73,8
6a''	4,54 (dd, J = 1,4 e 11,8)	4,41 (m)	64,6	63,3
6b''	4,27 (dd, J = 7,0 e 11,8)			
1'''	-	-	127,2	125,0
2'''	7,35 (d, J = 8,6)	7,55 (d, J : 9,0)	131,2	130,3
3'''	6,75 (d, J = 8,6)	6,83 (d, J : 9,0)	116,8	115,7
4'''	-	-	161,1	159,8
5'''	6,75 (d, J = 8,6)	6,83 (d, J : 9,0)	116,8	115,7
6'''	7,35 (d, J = 8,6)	7,55 (d, J : 9,0)	131,2	130,3
7'''	6,30 (d, J = 15,8)	7,59 (d, J : 16,0)	114,9	113,9
8'''	7,55 (d, J = 15,8)	6,63 (d, J : 16,0)	146,8	144,9
9'''	-	-	169,0	166,4

(*) Sinal observado nos espectros bidimensionais e encoberto pelo sinal do solvente (MeOD). (**) Sinal encoberto pelos sinais do solvente.

TABELA 4.2 - Correlações de ^1H - ^1H observadas no experimento de COSY para a flavanona I.

H	δ (ppm)	δ (ppm)
2	5,21	2,99 e 2,64
3a	2,99	5,21 e 2,64
3b	2,64	5,21 e 2,64
6	6,20	6,14
8	6,14	6,20
2' e 6'	7,22	6,79
3' e 5'	6,79	7,22
1''	5,18	3,35
2''		
3''	3,35	5,18 e 3,35
4''		
5''	3,65	3,35
6a''	4,54	4,27
6b''	4,27	4,54 e 3,65
2''' e 6'''	7,35	6,75
3''' e 5'''	6,75	7,35
7'''	6,30	7,55
8'''	7,55	6,30

TABELA 4.3 - Correlações de ^1H - ^{13}C a J' da flavanona I observadas no experimento de HSQC.

H/C	H (δ)	C (δ)
2	5,21	80,3
3a	2,99	**
3b	2,64	**
6	6,20	97,9
8	6,14	97,2
2'	7,22	128,9
3'	6,79	116,3
5'	6,79	116,3
6'	7,22	128,9
1''	5,18	101,0
2''	3,35	74,6
3''	3,35	77,7
4''	3,35	71,8
5''	3,65	75,6
6a''	4,54	64,6
6b''	4,27	64,6
2'''	7,35	131,2
3'''	6,75	116,8
5'''	6,75	116,8
6'''	7,35	131,2
7'''	6,30	114,9
8'''	7,55	146,8

(*) Sinal observado nos espectros bidimensionais e encoberto pelo sinal do solvente (MeOD).

(**) Sinal encoberto pelos sinais do solvente.

O sólido esbranquiçado II foi obtido pela reação de acetilação do precipitado do extrato metanólico de *A. occidentale* (AOM) para a confirmação da estrutura I que apresentou alguns sinais encobertos pelo sinal do solvente deuterado (MeOD). Este acetato já havia sido descrito na literatura por Rahman e colaboradores e sua identificação foi feita através dos experimentos de RMN ^1H , ^{13}C e PENDANT, em comparação com os dados da literatura (RAHMAN, *et al.*, 1978).

Os espectros de RMN ^1H (FIGURA 4.6) das flavanonas I e II foram bastante semelhantes, com diferenças significativas apenas na região mais blindada. O espectro de RMN ^1H de II apresentou os sinais referentes a hidrogênios de metilas e o espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.70) apresentou sinais característicos de metilas e carbonilas de éster, mostrando que as seis hidroxilas de

I foram esterificadas. As multiplicidades dos carbonos foram confirmadas pelo experimento de PENDANT (FIGURA 4.8) e o sinal referente à C-3 que estava encoberto pelo sinal do solvente em I pode ser confirmado pelo derivado acetilado II.

A TABELA 4.4 mostra os dados referentes a flavanona II denominada hexacetato de naringenina-7-O-(6"-O-p-cumaroil)- β -D-glucosídeo.

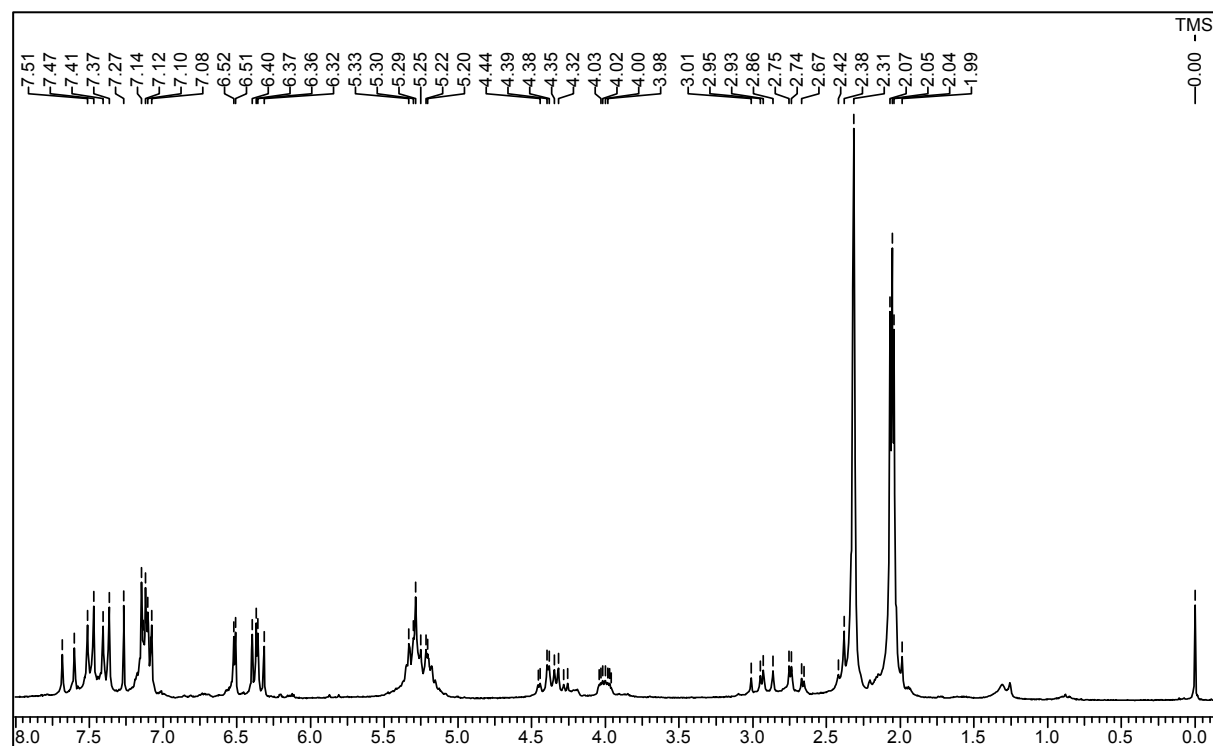


FIGURA 4.6 - Espectro de RMN ^1H da flavanona acetilada II (CDCl_3 , 200 MHz).

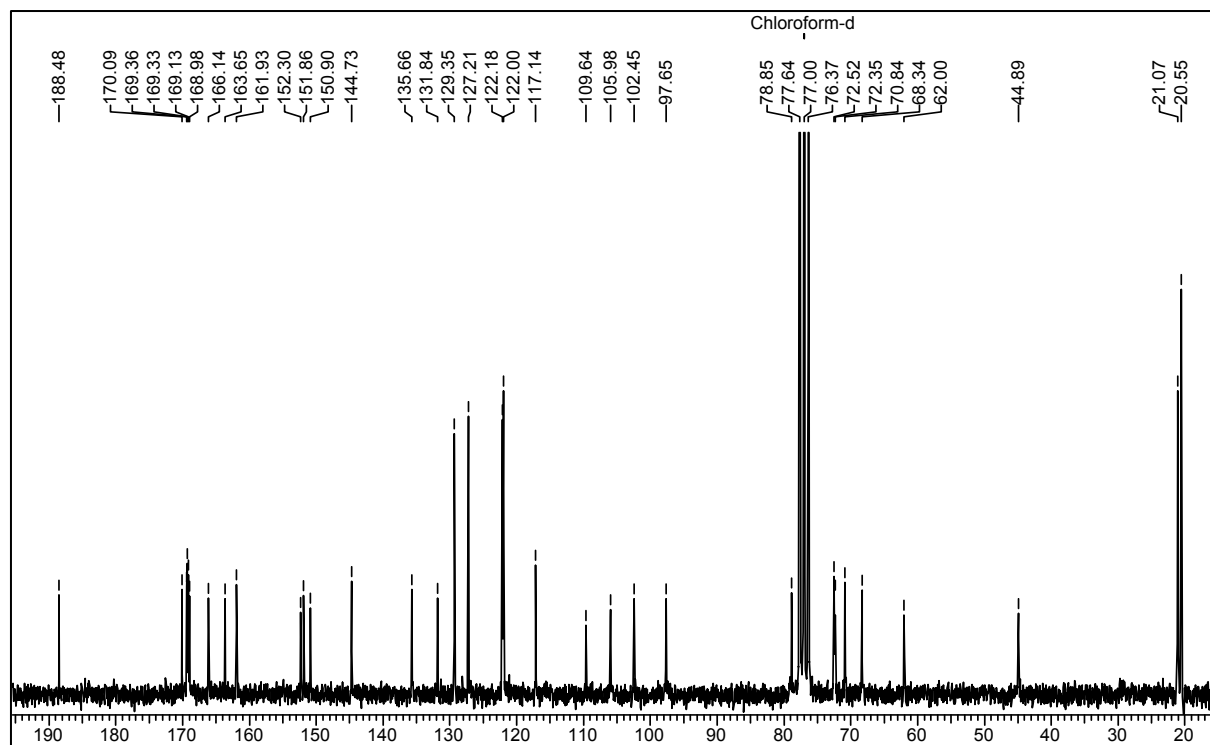


FIGURA 4.7 - Espectro de RMN ^{13}C da flavanona acetilada II (CDCl_3 , 50 MHz).

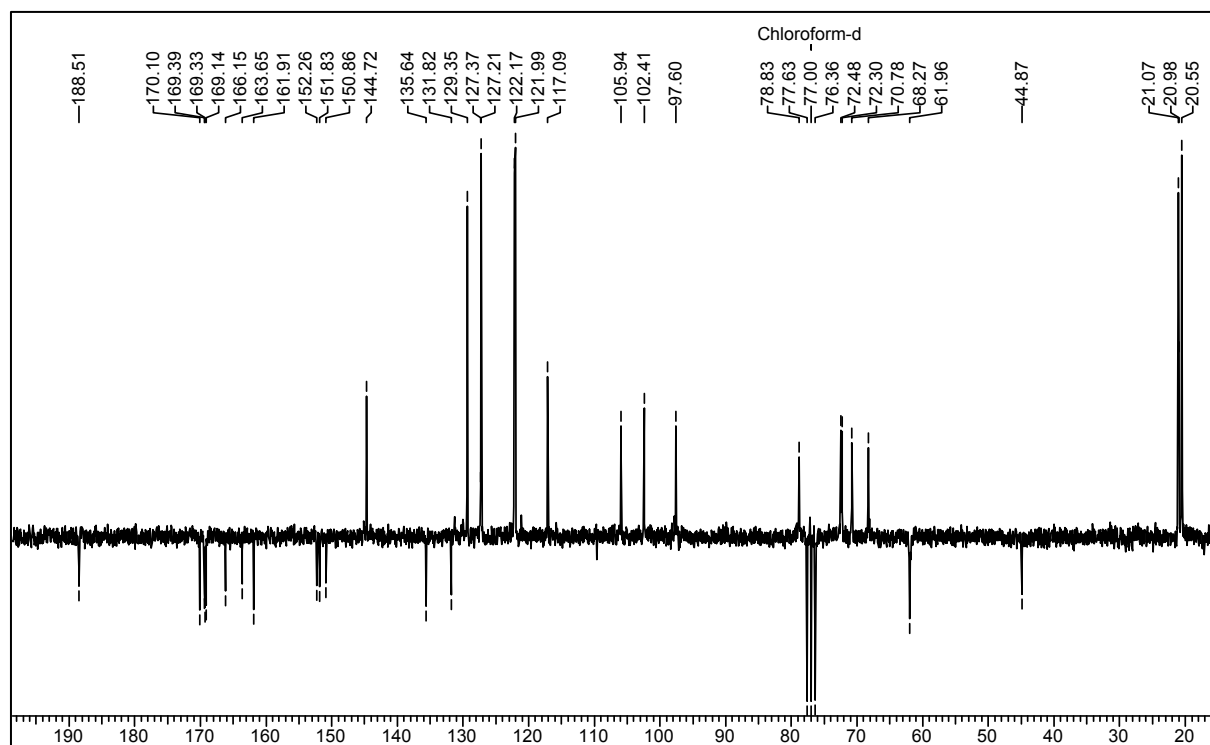


FIGURA 4.8 - Experimento PENDANT da flavanona acetilada II (CDCl_3 , 50 MHz).

TABELA 4.4 - Dados de RMN ¹H e ¹³C da flavanona II.

H/C	RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) (δ= ppm; J = Hz)	RAHMAN <i>et al.</i> , 1978 (CDCl ₃)	RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz) (δ= ppm)	PENDANT
2	5,36 (m)	5,36 (dd, J = 5,0 e 11,0)	78,8	CH
3a	2,69 (dd, J = 2,6 e 16,8)	2,57 - 3,25 (m)	44,9	CH ₂
3b	2,93 (dd, J = 12,2 e 16,8)			
4	-	-	188,4	C
5	-	-	161,9	C
6	6,38 (d, J = 2,4)	6,43 (d, J = 2,6)	105,9	CH
7	-	-	163,6	C
8	6,51 (d, J = 2,4)	6,60 (d, J = 2,5)	97,6	CH
9	-	-	166,1	C
10	-	-	109,6	C
1'	-	-	135,6	C
2'	7,49 (d, J = 8,6)	7,46 (d, J = 9,0)	129,3	CH
3'	7,12 (d, J = 8,6)	7,19 (d, J = 9,0)	121,9	CH
4'	-	-	152,2	C
5'	7,12 (d, J = 8,6)	7,19 (d, J = 9,0)	121,9	CH
6'	7,49 (d, J = 8,6)	7,46 (d, J = 9,0)	129,3	CH
1''	-	-	102,4	CH
2''	-	-	72,5	CH
3''	5,0 - 5,5 (m)	5,33 (m)	72,3	CH
4''	-	-	68,3	CH
5''	3,80 - 4,20 (m)	4,08 (m)	70,8	CH
6a''	4,42 (dd, J = 2,6 e 12,2)	4,41 (m)	62,0	CH ₂
6b''	4,30 (dd, J = 5,6 e 12,2)			
1'''	-	-	131,8	C
2'''	7,68 (d, J = 8,6)	7,57 (d, J = 8,5)	122,3	CH
3'''	7,09 (d, J = 8,6)	7,19 (d, J = 9,0)	127,2	CH
4'''	-	-	150,8	C
5'''	7,09 (d, J = 8,6)	7,19 (d, J = 9,0)	127,2	CH
6'''	7,68 (d, J = 8,6)	7,57 (d, J = 8,5)	122,2	CH
7'''	7,64 (d, J = 16,0)	7,72 (d, J = 16,0)	117,1	CH
8'''	6,35 (d, J = 16,0)	6,41 (d, J = 16,0)	144,7	CH
9'''	-	-	170,1	C
OAc*	-	-	151,8	C
5, 4' e 4''-OAc	-	-	169,3	C
	2,04 (s) (3 H)			
OAc**	2,05 (s) (3 H)	2,06 (s) (9 H)	20,5 (3 C)	3 CH ₃
	2,07 (s) (3 H)			
4' e 4''-OAc	2,31(s) (6 H)	2,33 (s) (9 H)	21,1(3 C)	3 CH ₃
5-OAc	2,32 (s) (3 H)			

(*) carbonilas referentes a acetilação das hidroxilas nas posições 2'', 3'' e 4''. (**) metilas referentes a acetilação das hidroxilas nas posições 2'', 3'' e 4''.

4.1.2 - Fracionamento do extrato diclorometânico de *Anacardium occidentale* (AOD) utilizando RLCC (*Rotation Locular Countercurrent Chromatography*)

O extrato diclorometânico (AOD) foi considerado o mais interessante do ponto de vista químico, pois possuía maior variedade dos derivados fenólicos e outros metabólitos em menor proporção.

A caracterização da mistura foi baseada na presença de sinais na região de δ 6,5 - 7,5 ppm, referente aos hidrogênios aromáticos, assim como sinais na região de δ 4,5 - 6,0 ppm referentes aos hidrogênios olefínicos, indicando as insaturações das cadeias alquílicas e os hidrogênios alílicos atribuídos aos sinais na faixa de δ 2,25 - 3,0 ppm (FIGURA 4.9).

Este extrato quando submetido à CCDA apresentava substâncias com coloração púrpura para os ácidos anacárdicos e vermelha intensa para os cardóis e cardanóis, quando revelados com vanilina e H_2SO_4 . Os fracionamentos dos extratos de *A. occidentale* realizados por técnicas convencionais de cromatografia em coluna (CC) não foram eficientes para o isolamento de substâncias.

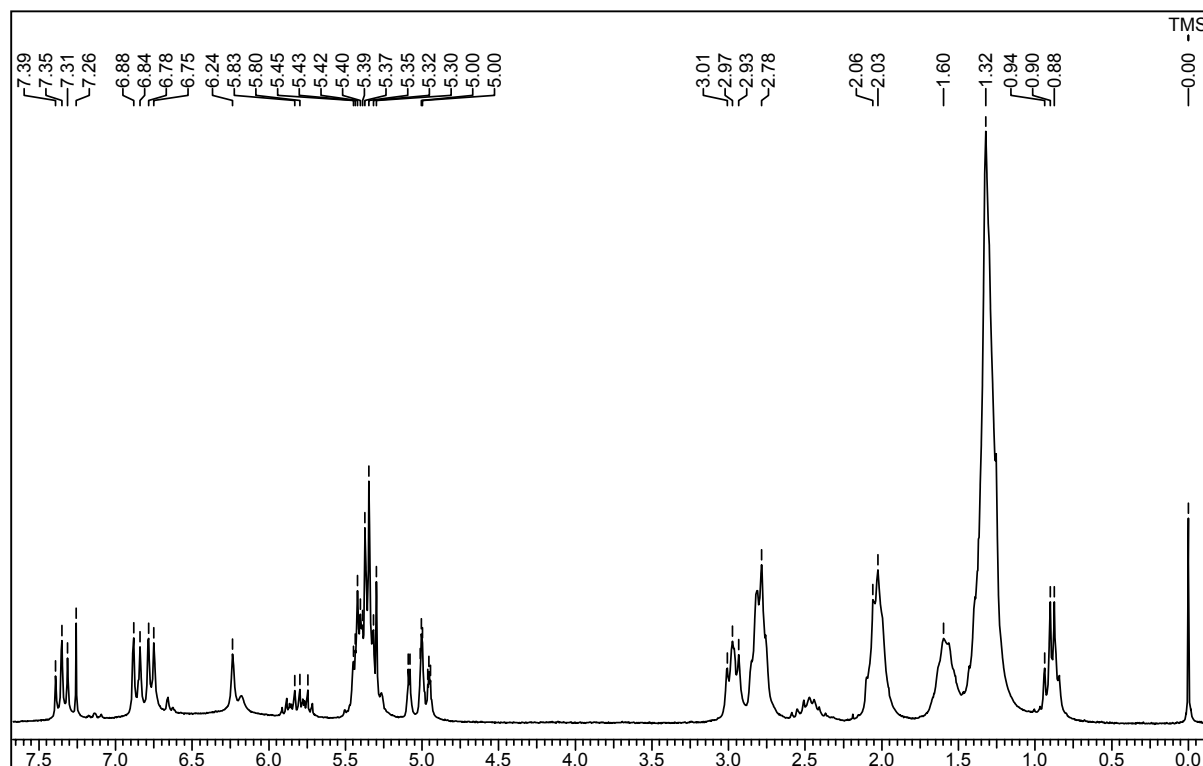


FIGURA 4.9 - Espectro de RMN 1H do extrato **AOD** ($CDCl_3$, 200 MHz).

Trabalhos já realizados pelo grupo de Produtos Naturais da UFSCar utilizando RLCC mostram a eficiência desta técnica (LEITE *et al.*, 2005; Beltrame *et al.*, 2006). Foram realizados 26 testes com diferentes misturas e proporções de solventes. Estes testes foram feitos utilizando pequenas quantidades de amostra, para estabelecer as melhores condições para o fracionamento do extrato AOD. Depois de estabelecidos alguns bons sistemas (TABELA 4.5), esses foram aplicados em grande escala, sendo que alguns deles não permitiram resultados satisfatórios.

TABELA 4.5 - Sistemas testados utilizando RLCC para o fracionamento do extrato diclorometânico (AOD).

Sistema	Solventes	Proporção	Observações
1	Dic/MeOH/H ₂ O	7:4:2	ocorreu formação de emulsão
2	Hex/Dic/MeOH/H ₂ O	5:5:8:2	-
3	Hex/Dic/AcN	10:3:7	elevada proporção de AcN
4	Hex/MeOH/H ₂ O	10:9:1	-
5	Dic/MeOH/ <i>n</i> -PrOH	6:6:0,5:4	difícil separação das fases
6	Hex/AcOEt/MeOH/H ₂ O	5:2:4:1	-

Quando se utilizou o sistema 1, ao injetar a fase móvel, ocorreu formação de emulsão e precipitação de parte do material vegetal nas colunas, havendo assim o entupimento e impossibilitando a utilização desse sistema. Já o sistema 3, quando feito em grande escala, proporcionou uma alta concentração de acetonitrila, inviabilizando seu uso na velocidade desejada, visto que o sistema do equipamento é praticamente aberto, logo esse sistema foi descartado. O sistema 5, quando aplicado em pequena proporção (40 mL) apresentou uma boa separação das fases, mas quando injetado no equipamento, não houve boa separação das fases, fazendo com que a fase estacionária fosse arrastada pela fase móvel. Para tentar melhorar a resolução do sistema 5, fizeram-se variações no fluxo de inserção da fase móvel, mas o resultado ainda não foi satisfatório.

Os sistemas 2, 4 e 6 apresentaram resultados bastante satisfatórios, mas a resolução do fracionamento foi mais eficiente quando utilizado o sistema 4, sendo este escolhido para o desenvolvimento das análises.

A FIGURA 4.10 ilustra o equipamento de RLCC utilizado. A utilização deste equipamento requer procedimentos como:

- a) Sempre purgar o sistema no início da colocação da fase estacionária;
- b) Após o sistema ter adquirido pressão, verificar vazamento entre as conexões ou na bomba;
- c) Realizar a variação do fluxo da fase estacionária para verificar se a alteração de pressão não provoca vazamento;
- d) Realizar o condicionamento do equipamento injetando a fase estacionária com as colunas na vertical (90°) e com rotação;
- e) Posteriormente injetar a fase móvel com as colunas na horizontal sem rotação alguma;
- f) Depois de observar que a fase móvel já está saindo do sistema, injetar a amostra;
- g) Dissolver a amostra numa mistura de 1:1 das fases a serem utilizadas durante a análise e filtrar essa mistura num filtro de porosidade pequena, respeitando o limite a ser injetado.

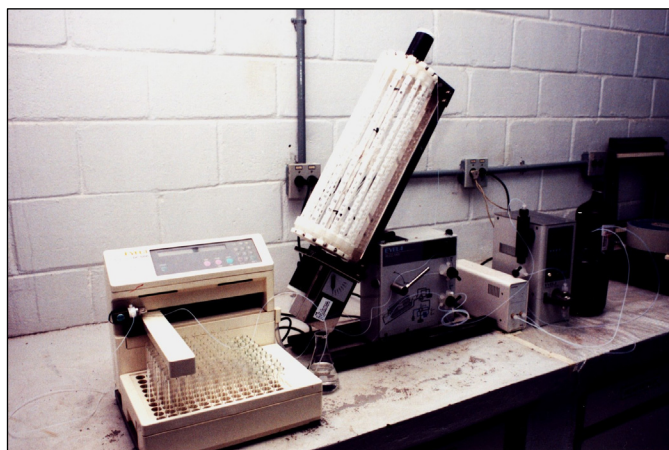


FIGURA 4.10 - Equipamento RLCC (*Rotation Locular Countercurrent Chromatography*).

O sistema 4 (Hex/MeOH/H₂O - 10:9:1) mostrou-se bastante eficiente no fracionamento do extrato diclorometânico (AOD), tanto na eluição ascendente como descendente. As condições de análise foram estabelecidas por tentativa, fazendo variações de (i) fluxo (0,5-2,0 mL/min), (ii) modo de eluição e (iii) massa de material injetada. Os melhores resultados foram obtidos nas condições descritas na TABELA 4.6:

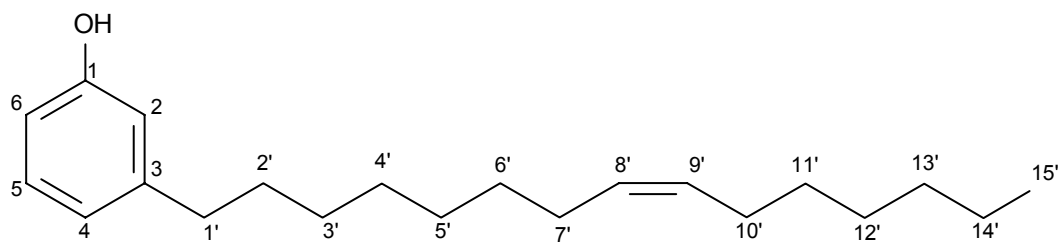
TABELA 4.6 - Condições utilizadas no fracionamento do extrato diclorometânico utilizando RLCC.

	Vantagens	Desvantagens
Fracionamento A Modo Ascendente	<ul style="list-style-type: none"> ✓ grande massa de material injetado (2,0 g); ✓ fluxo alto (4,0 mL/min) ✓ pouco tempo de análise (4 h); ✓ as frações apresentavam diferenças significativas na concentração dos compostos fracionados; ✓ a técnica pôde discriminar quantidade de insaturações na cadeia alquílica dos derivados fenólicos; 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ não houve isolamento de nenhuma substância pura; ✓ houve separação apenas por classe de compostos;
Fracionamento B Modo Descendente	<ul style="list-style-type: none"> ✓ as frações apresentavam diferenças significativas na concentração dos compostos; ✓ isolou-se a substância III; 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ menor massa de material injetado (1,0 g) quando comparado ao fracionamento A; ✓ fluxo baixo (1,5 mL/min); ✓ muito tempo de análise (36 h);

A técnica de cromatografia contracorrente (RLCC) foi o método mais eficiente para o fracionamento do extrato OAD. Mostrou-se bastante eficiente na separação das diferentes classes dos constituintes fenólicos, com um baixo custo e curto tempo de análise. Embora a maioria das frações oriundas deste fracionamento não estivesse pura, os seus constituintes puderam ser identificados para prosseguir os estudos monitorados por bioensaios. A fração constituída majoritariamente por ácidos anacárdicos saturados e insaturados foi denominada **AC** e apresentou excelentes resultados nos ensaios realizados.

4.1.2.1 - Identificação do cardanol III

O 8'Z-pentadecenil cardanol (**III**), um óleo marrom claro, foi identificado através da análise dos espectros de RMN ¹H e ¹³C em comparação com dados de alguns análogos descritos na literatura (YAMAGIWA *et al.*, 1987).



(III)

A análise do espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.11) sugeriu a presença de um derivado fenólico devido à presença de quatro sinais referentes a hidrogênios aromáticos: um tripleto (δ_{H} 7,12, $J = 7,6$ Hz) integrando para um hidrogênio; dois dubletos (δ_{H} 6,64 e 6,74), ambos com $J = 7,6$ Hz, integrando para um hidrogênio cada; um singletto largo (δ_{H} 6,64), integrando para um hidrogênio. Este conjunto de sinais sugere um fenol dissustituído na posição *meta*.

A presença de um tripleto (δ_{H} 2,54, $J = 7,6$ Hz), integrando para dois hidrogênios, pode ser atribuído aos hidrogênios benzílicos. Um tripleto (δ_{H} 0,88, $J = 5,5$ Hz) integrando para três hidrogênios sugeriu uma metila terminal da cadeia carbônica linear.

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.12) apresentou dezessete sinais de carbono, sendo que dois sinais apresentaram-se com intensidade duplicada, totalizando vinte e um sinais de carbono. As multiplicidades dos carbonos foram determinadas pelo experimento de DEPT 135 (FIGURA 4.13).

Observou-se a presença de dois sinais referentes a carbono quaternário sendo um deles em δ_{C} 144,9 e o outro ligado a oxigênio em δ_{C} 155,4. Pode-se ainda observar um sinal referente a metila (δ_{C} 14,1), dois sinais referentes a carbono e dupla ligação (δ_{C} 129,9 e 129,8) e quatro sinais característicos de CH aromático (δ_{C} 129,3, 120,8, 115,3 e 112,5).

As atribuições dos sinais de ^1H e ^{13}C estão descritos na TABELA 4.7.

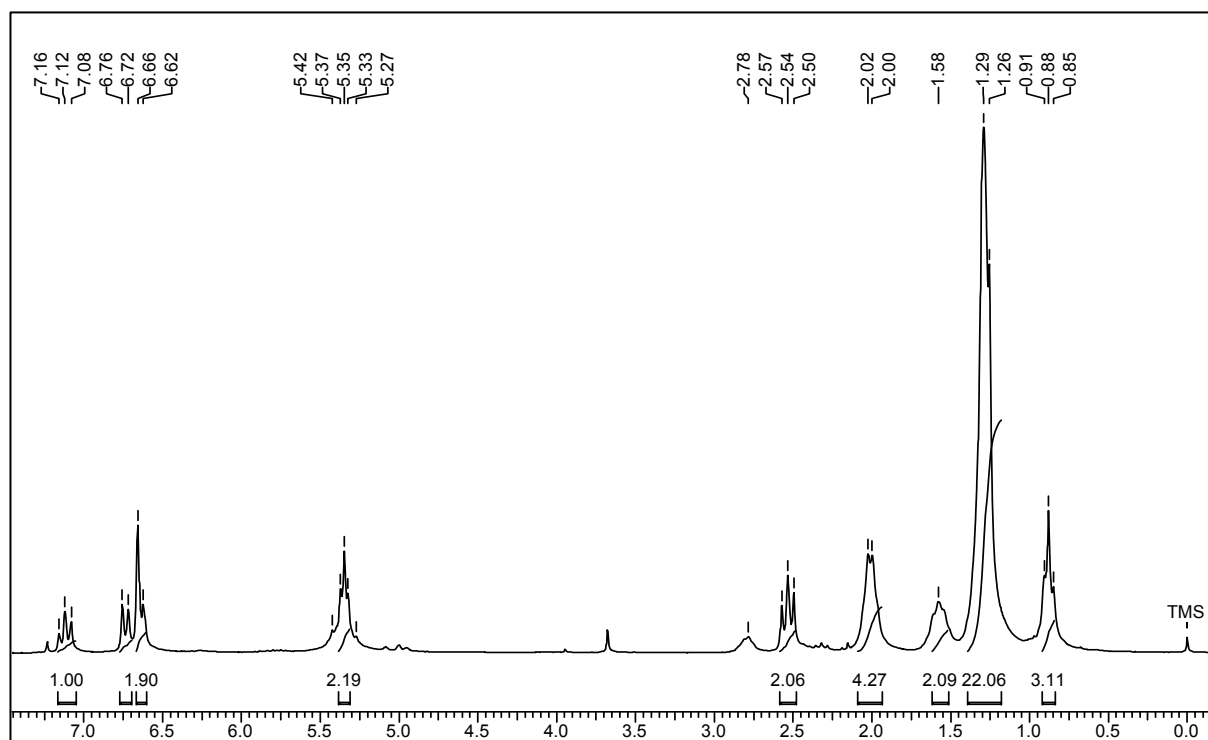


FIGURA 4.11 - Espectro de RMN ^1H do cardanol III (CDCl_3 , 200 MHz).

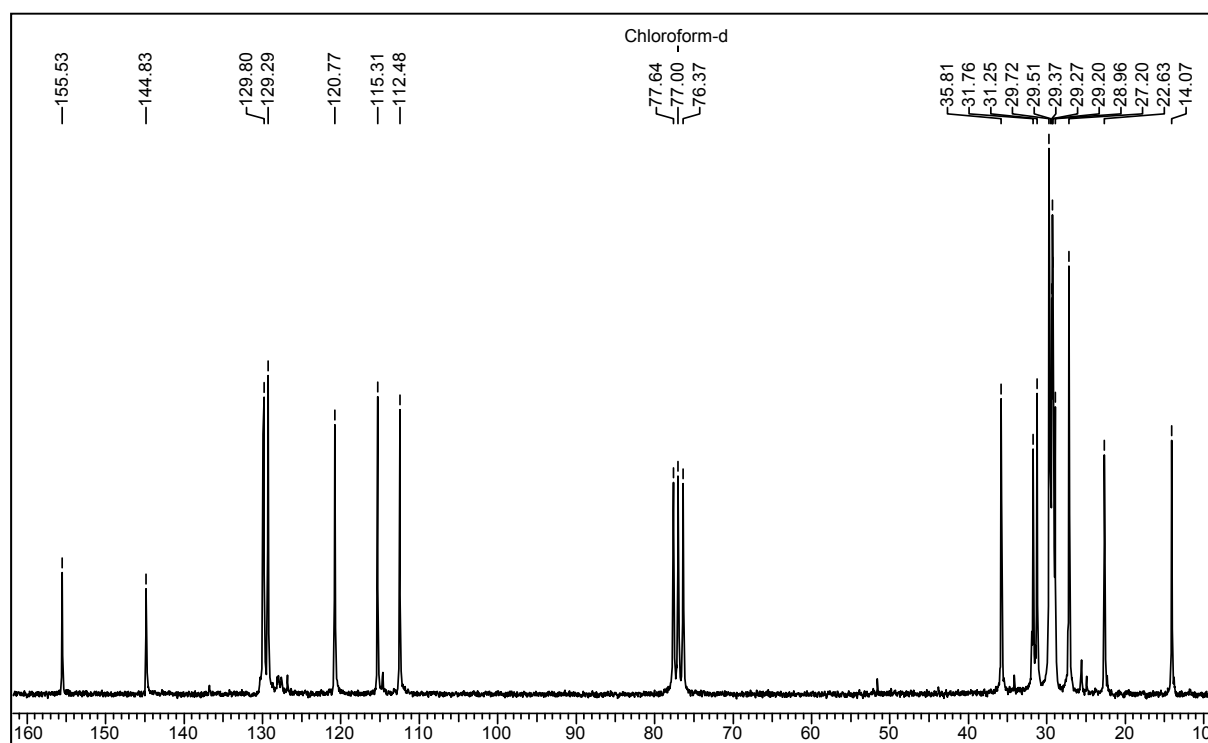


FIGURA 4.12 - Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz) do cardanol III (CDCl_3 , 50 MHz).

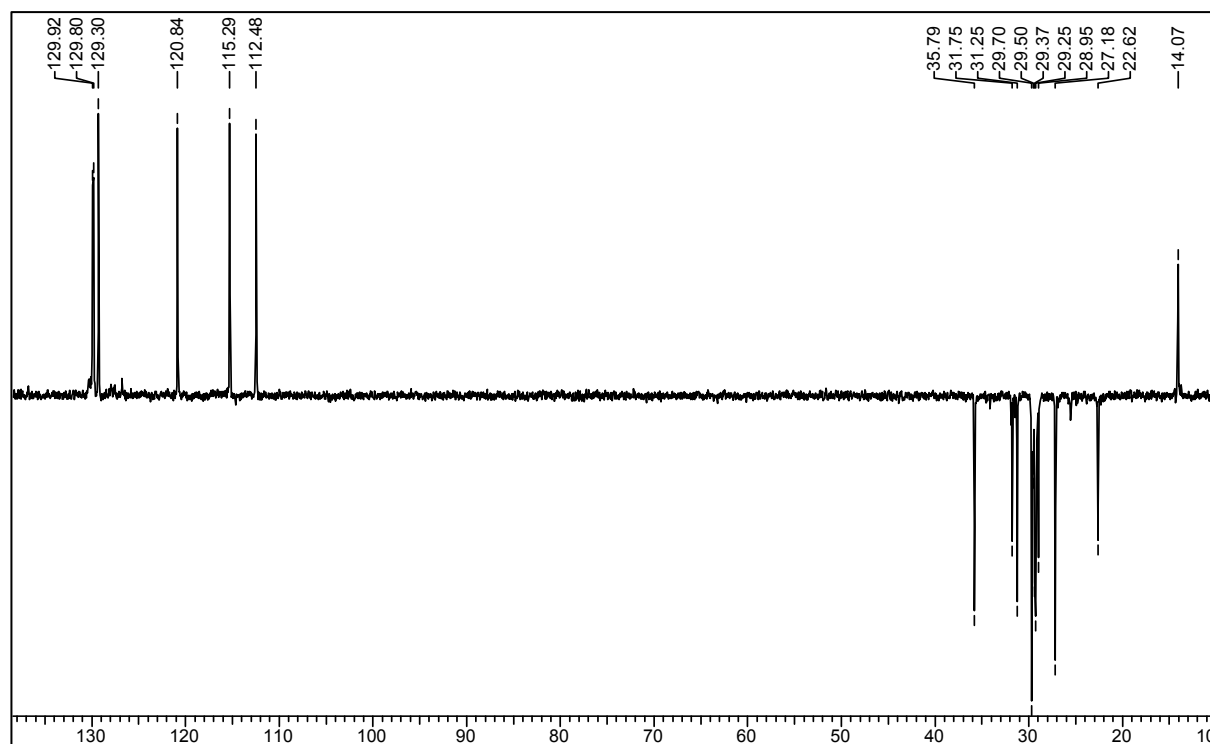


FIGURA 4.13 - Experimento DEPT 135 do cardanol III (CDCl₃, 50 MHz).

TABELA 4.7 - Dados de RMN ¹H e ¹³C do cardanol III (CDCl₃, 200 e 50 MHz).

H/C	RMN ¹ H (δ = ppm; J = Hz)	RMN ¹³ C (δ = ppm)	DEPT 135
1	-	155,4	C
2	6,64 (sl, 1H)	115,3	CH
3	-	144,9	C
4	6,74 (d, 1H, J = 7,6)	120,8	CH
5	7,12 (t, 1H, J = 7,6)	129,3	CH
6	6,64 (d, 1H, J = 7,6)	112,5	CH
1'	2,54 (t, 2H, J = 7,6)	35,8	CH ₂
2'- 6'	1,1 - 1,7 (m, 24H)	*	CH ₂
7' e 10'	2,01 (ql, 4H, J = 6,0)	*	CH ₂
8' e 9'	5,35 (m, 2H)	129,9 e/ou 129,8	CH
11'		*	CH ₂
12'		29,0	CH ₂
13'	1,1 - 1,7 (m, 24H)	27,2	CH ₂
14'		22,6	CH ₂
15'	0,88 (t, 3H, J = 5,5)	14,1	CH ₃

(*) δ : 29,2-31,8 (8C)

4.1.3. Isolamento dos constituintes do extrato diclorometânico (AOD) por precipitação fracionada

O extrato AOD foi extraído da casca, previamente separada da castanha, utilizando diclorometano. Segundo a literatura, Kiong e Tyman separaram ácidos anacárdicos e cardóis, do LCC natural, utilizando $Pb(OH)_{2(s)}$, obtendo-se assim o anacardato de chumbo, que após a extração com solvente orgânico fornece a mistura de ácidos anacárdicos e o filtrado orgânico após cromatografia em coluna, fornece os cardóis (KIONG & TYMAN, 1981). Recentemente, Paramashivappa e colaboradores desenvolveram um método para o isolamento dos constituintes majoritários do LCC natural, utilizando $Ca(OH)_{2(s)}$ para a formação de um precipitado estável com ácido anacárdico (anacardato de cálcio) e após tratamento ácido e extração com solvente orgânico, obtém-se a mistura de ácidos anacárdicos. A solução orgânica depois de tratada com base leva a obtenção da mistura dos cardóis e cardanóis (PARAMASHIVAPPA *et al.*, 2001).

O procedimento descrito por Paramashivappa e colaboradores foi aplicado ao extrato diclorometânico (AOD), com pouco sucesso, pois os cardóis e cardanóis não puderam ser isolados, apenas a mistura dos ácidos anacárdicos. Atribui-se a ineficiência do procedimento para este extrato em função dele não apresentar os derivados fenólicos nas mesmas concentrações do LCC natural, variando assim o pH do meio, que é condição fundamental para o sucesso da técnica, inviabilizando a aplicação de precipitação para o isolamento dos constituintes do extrato AOD.

4.2 - Modificações estruturais

Na busca de inibidores específicos para a enzima gGAPDH de *T. cruzi*, foi realizado um *screening* de várias espécies vegetais, entre elas *A. occidentale*. A fração **AC**, proveniente do fracionamento utilizando RLCC, era constituída majoritariamente por ácidos anacárdicos saturados e insaturados (FIGURA 4.14) e foi ensaiada em diferentes modelos biológicos, entre eles na enzima gGAPDH do *Trypanosoma cruzi*, obtendo-se 88% de inibição na concentração de 1,75 μ M. Este resultado serviu para guiar as demais etapas deste trabalho, uma vez que este foi o produto natural com atividade inibitória mais promissora testado nesta enzima.

Entretanto, devido às diversas dificuldades inerentes ao processo de separação destes compostos, foram propostas algumas modificações químicas com o objetivo de potencializar as suas atividades, além de se tentar estabelecer relação estrutura-atividade.

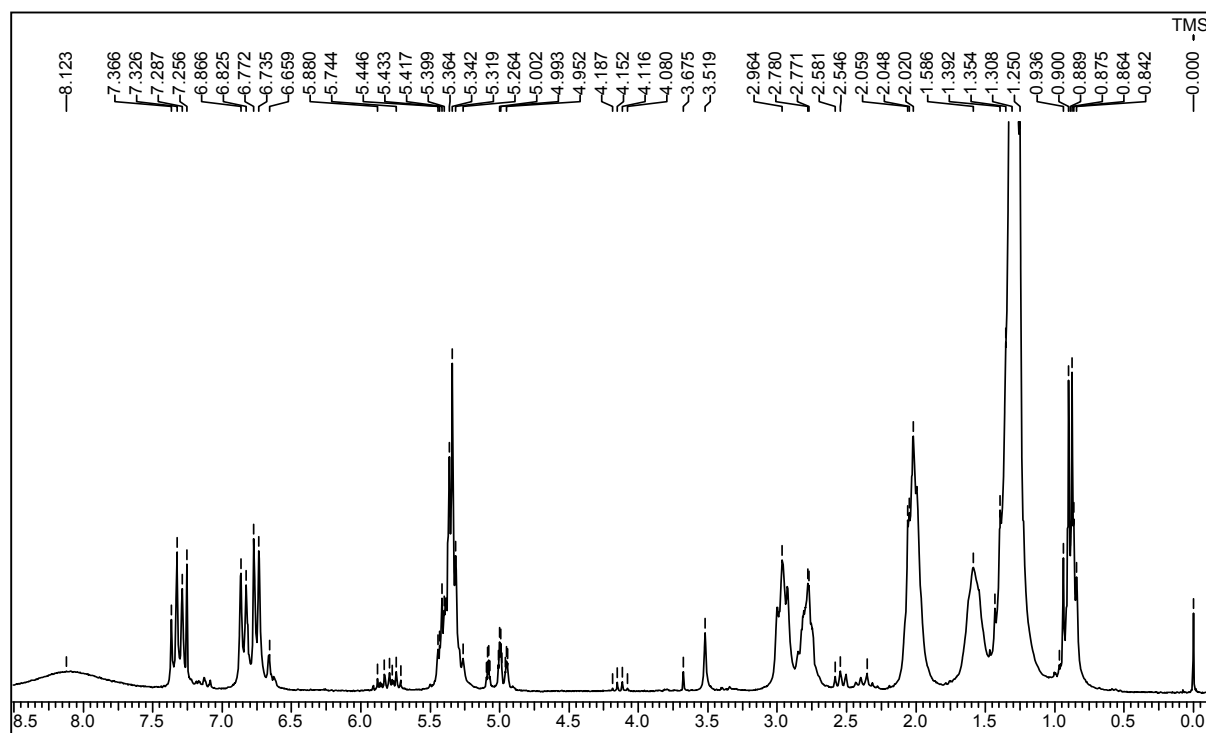
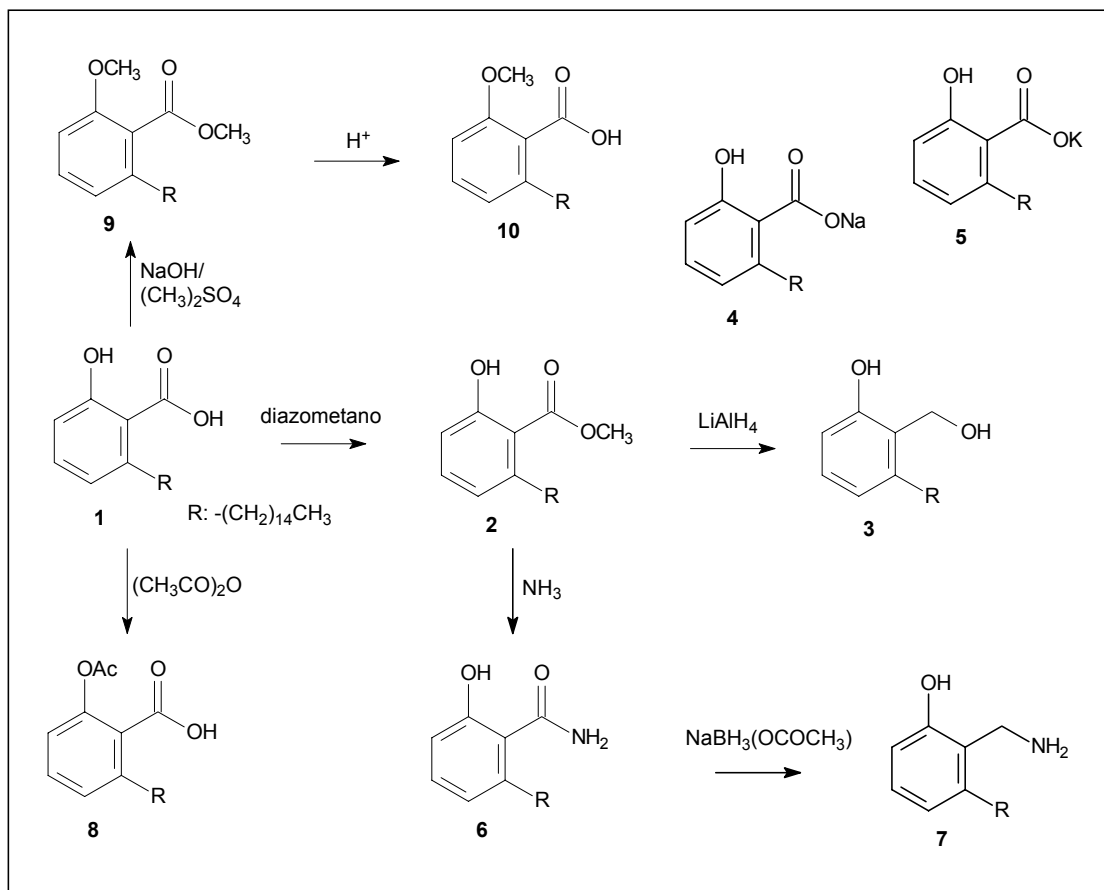
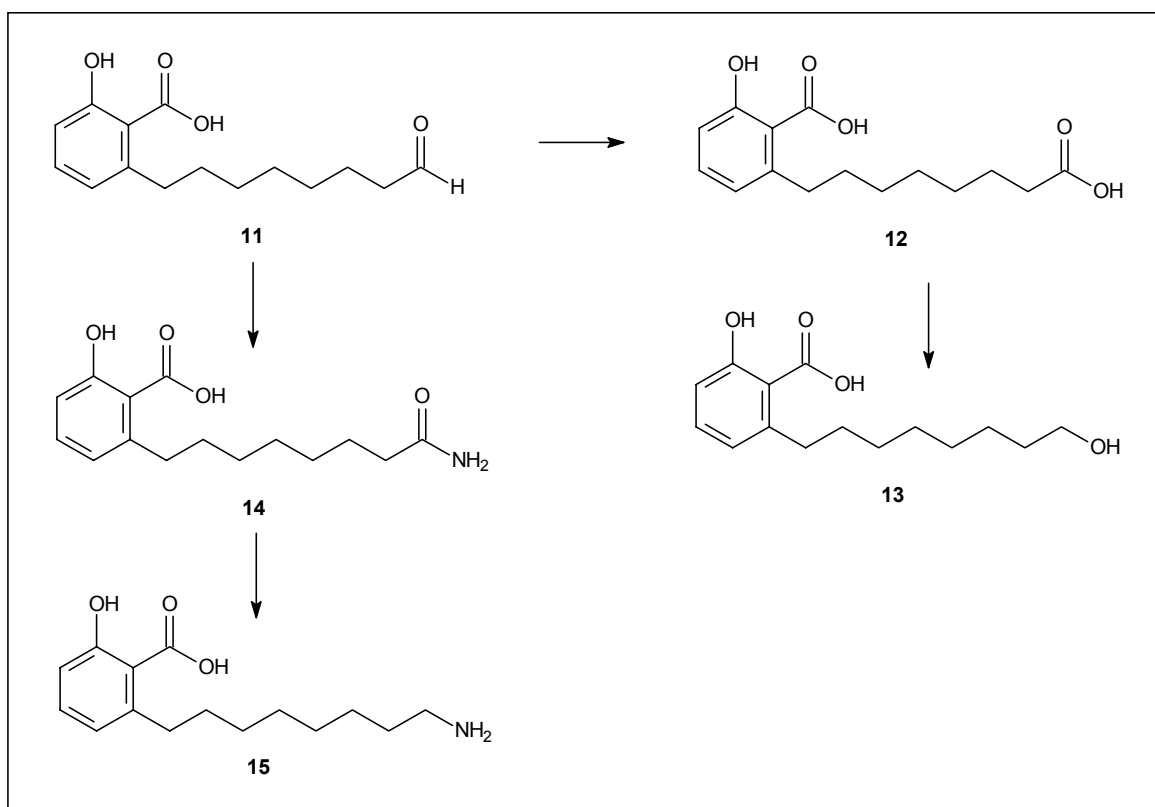


FIGURA 4.14 - Espectro de RMN ^1H da fração **AC**, (CDCl_3 , 200 MHz).

Considerando que a fração era rica em ácidos anacárdicos, a proposta inicial foi a modificação da densidade eletrônica próxima ao grupo carboxila (porção fenólica) (ESQUEMA 4.1) e variação cadeia carbônica lateral (ESQUEMA 4.2).



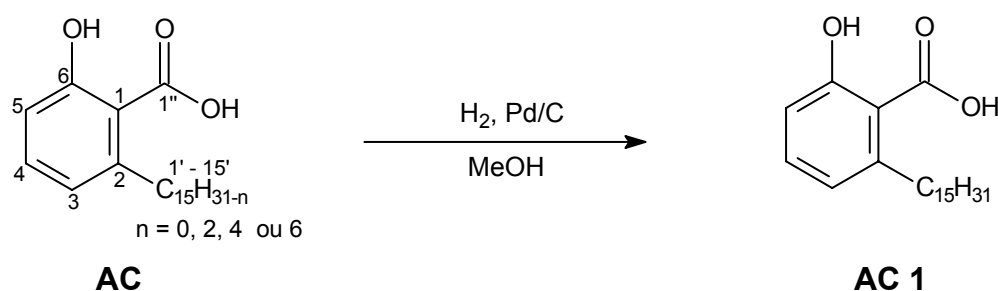
ESQUEMA 4.1 - Modificações sugeridas na parte fenólica do ácido anacárdico.



ESQUEMA 4.2 - Modificações na cadeia lateral do ácido anacárdico.

4.2.1 - Reação de hidrogenação catalítica da fração AC para obtenção de AC 1

Devido à dificuldade de separação dos diferentes ácidos anacárdicos, saturados e insaturados, optou-se pela hidrogenação da mistura. A reação de hidrogenação catalítica heterogênea foi realizada utilizando a fração **AC** como substrato, paládio/carvão ativo como catalisador e atmosfera de H₂ como fonte de hidrogênio (ESQUEMA 4.3 - TABELA 4.8).



ESQUEMA 4.3 - Reação de hidrogenação da fração **AC**.

TABELA 4.8 - Quantidade de material de partida, do produto e rendimento total para a reação de hidrogenação da mistura de ácidos anacárdicos **AC**.

Substrato de trabalho	Produto	Rendimento (%)
Mistura de ác. anacárdicos	Ác. anacárdico saturado	Bruto
AC	AC 1	99
(300,0 mg)	(299 mg; 0,86 mmol)	

No espectro de RMN ¹H (FIGURA 4.15) a ausência dos sinais referentes aos hidrogênios olefínicos (δ_{H} 4,8-6,0) e aos hidrogênios alílicos (δ_{H} 1,8-2,8) confirmaram a obtenção do composto saturado.

Através da análise dos espectros de RMN ¹³C (FIGURA 4.16) e do experimento de DEPT 135 (FIGURA 4.17), pode-se confirmar a ausência de carbonos insaturados.

No espectro no infravermelho (FIGURA 4.18) foram observadas absorções características de ligações O-H de hidroxilas livres (ν_{max} = 3439). A presença da hidroxila quelada posicionada em C-6 também foi evidenciada pelo aparecimento de duas bandas de vibração C=O, uma banda característica de carbonila quelada (ν_{max} = 1605), outra referente à carbonila livre (ν_{max} = 1655) e duas bandas de vibração C-O (ν_{max} = 1248 e 1221). A cadeia alquílica pôde ser

evidenciada por dois conjuntos de bandas de absorção, deformação axial de ligações C-H ($\nu_{\max} = 2918$ e 2850) e deformação angular ($\nu_{\max} = 1466$ e 1446).

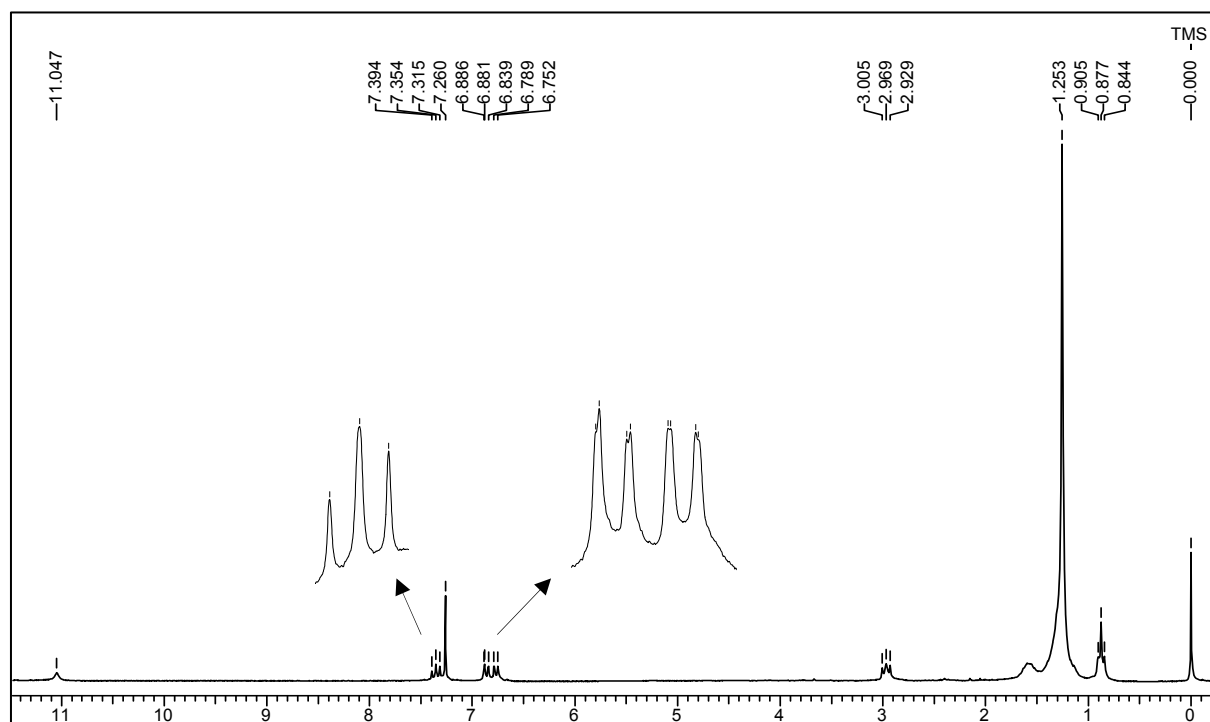


FIGURA 4.15 - Espectro de RMN ^1H de **AC 1** (CDCl_3 , 200 MHz).

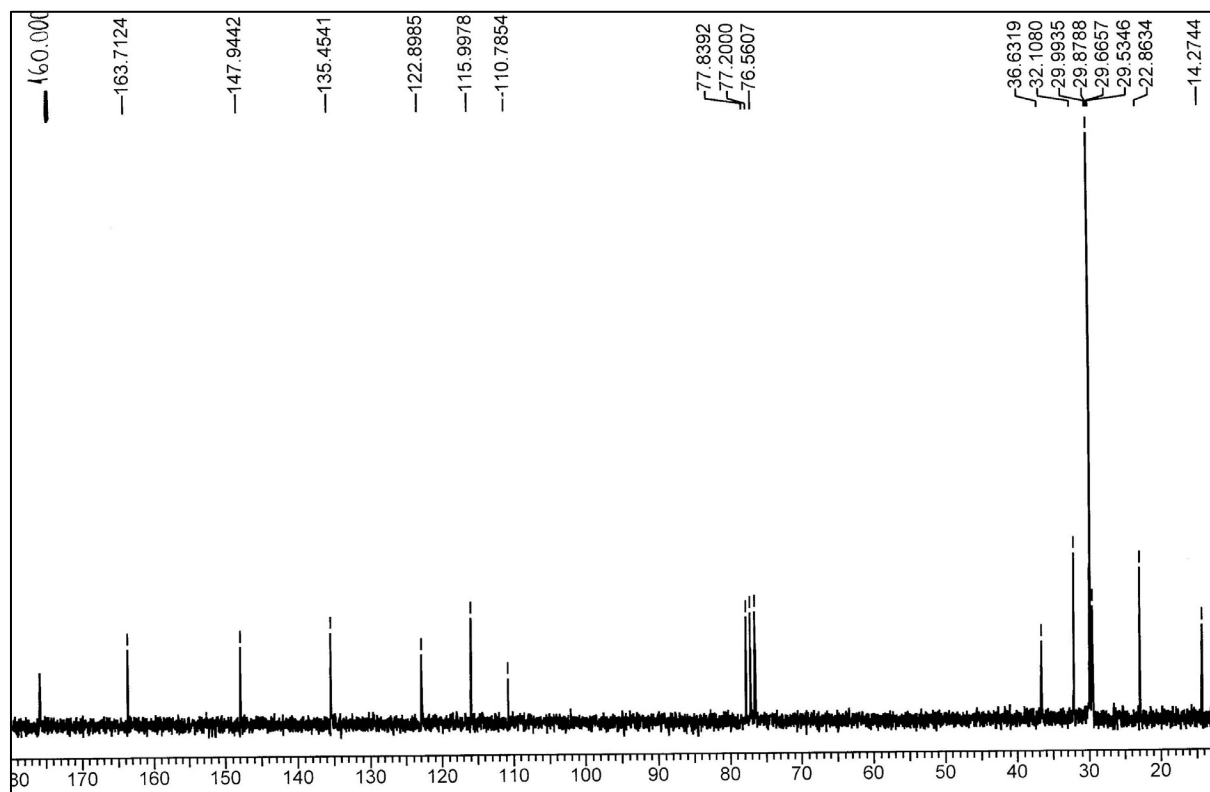


FIGURA 4.16 - Espectro de RMN ^{13}C de **AC 1** (CDCl_3 , 50 MHz).

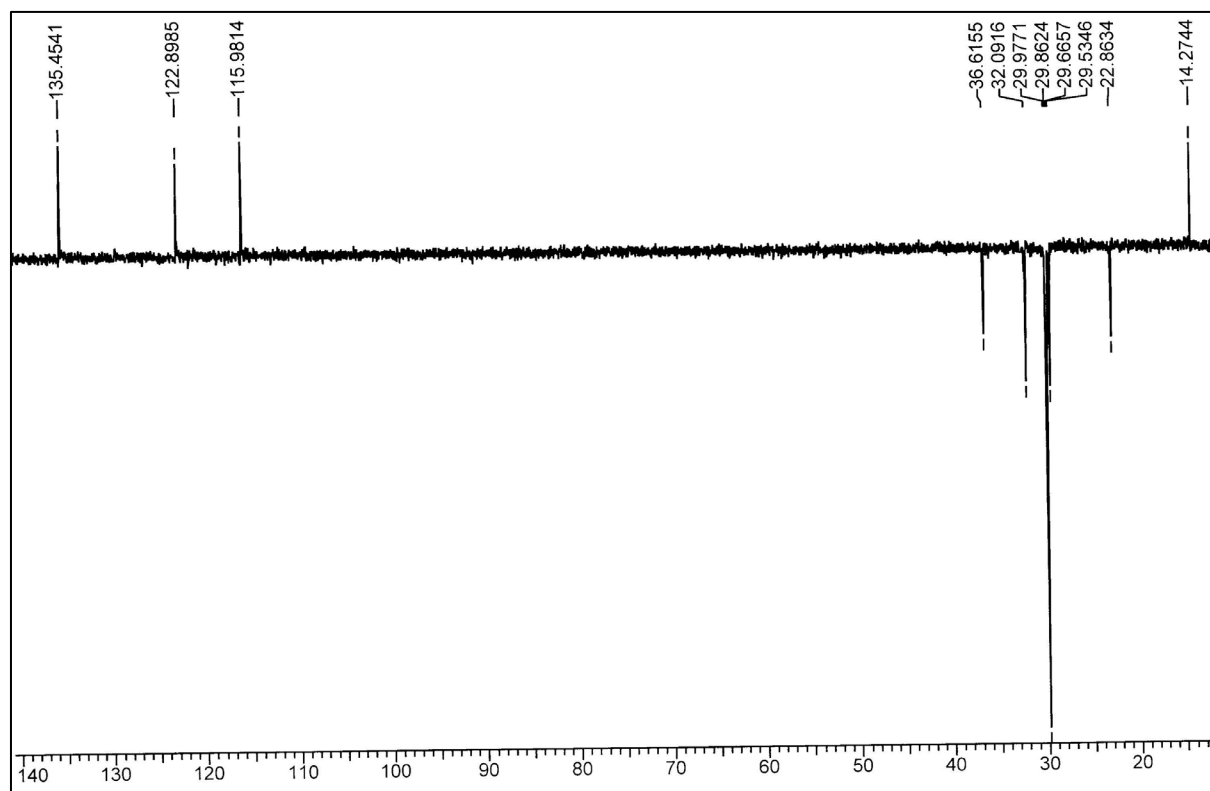


FIGURA 4.17 - Experimento DEPT 135 de **AC 1** (CDCl_3 , 50 MHz).

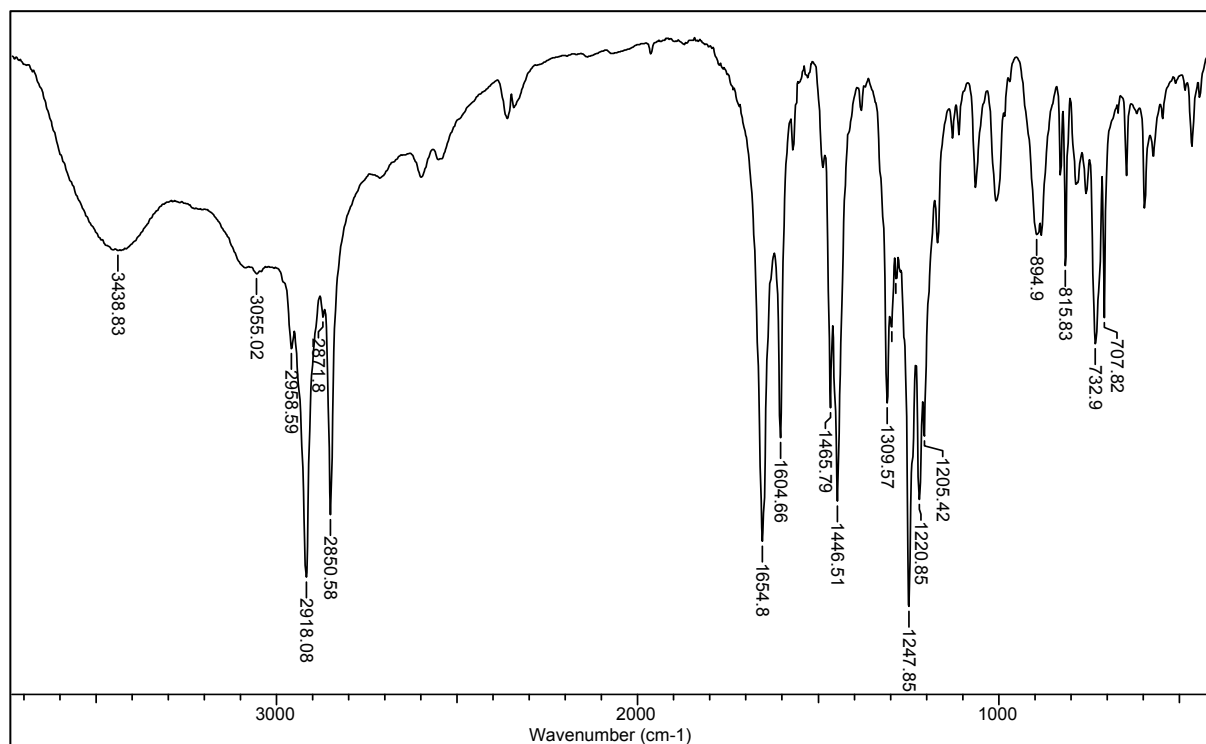


FIGURA 4.18 - Espectro de infravermelho de **AC 1**.

Dados espectroscópicos do ácido 2-pentadecil-6-hidroxibenzóico (**AC 1**)

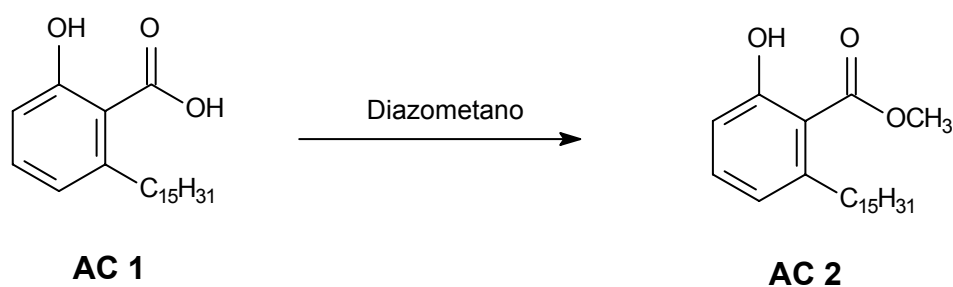
RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): δ (ppm) 11,05 (s, 1H); 7,35 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz); 6,86 (dd, 1H, $J = 8,0$ e 0,9 Hz); 6,77 (dd, 1H, $J = 8,0$ e 0,9 Hz); 2,97 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz); 1,20-1,60 (m, 26H); 0,88 (t, 3H, $J = 6,0$ Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): δ (ppm) 176,0 (CO); 163,7 (C); 147,9 (C); 135,4 (CH); 122,9 (CH); 116,0 (CH); 110,8 (C); 36,6 (CH₂); 29,7-32,2 (12CH₂); 22,8 (CH₂); 14,3 (CH₃).

IV (pastilha de KBr): ν_{\max} (cm⁻¹) 3439; 2918; 2850; 1655; 1604; 1466; 1446; 1248; 1221; 733; 708.

4.2.2 - Reação de metilação de **AC1** para obtenção de **AC 2**

A reação de esterificação de **AC 1** (ESQUEMA 4.4) foi realizada com diazometano (TABELA 4.9) e o produto obtido foi caracterizado utilizando técnicas espectroscópicas.



ESQUEMA 4.4 - Reação de esterificação do ácido anacárdico **AC 1**.

TABELA 4.9 - Quantidade de material de partida, produto e rendimento total para reação de esterificação de **AC 1**.

Substrato de trabalho	Produto	Rendimento (%)
Ác. anacárdico saturado	Éster saturado	
AC 1	AC 2	93
(130 mg; 0,37 mmol)	(127 mg; 0,35 mmol)	

A metilação da hidroxila fenólica não ocorreu, pelo fato de ela estar quelada com o oxigênio da carboxila. Considerando que as condições utilizadas para essa reação são muito brandas, não foi suficiente para romper as ligações de hidrogênio.

A formação do éster foi evidenciada através da análise do espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.19) que apresentou um singlete em δ_{H} 3,96 referente aos hidrogênios da metoxila do éster. No espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.20) o éster formado também foi confirmado pelo conjunto de sinais de metoxila em δ_{C} 52,0 e carbonila em δ_{C} 171,9. Os sinais em δ_{H} 11,11 e δ_{C} 162,5 confirmam a presença da hidroxila fenólica não esterificada. O experimento de DEPT 135 (FIGURA 4.21) foi utilizado para determinar a multiplicidade dos carbonos.

A análise do espectro no infravermelho (FIGURA 4.22) confirmou a formação do éster através da diminuição da banda de absorção característica de ligações O-H de hidroxilas ($\nu_{\text{max}} = 3414$) e aumento na banda de absorção referente às ligações da carbonila ($\nu_{\text{max}} = 1664$). A esterificação também provocou um aumento significativo na intensidade das bandas de absorção características de ligações C-H de metilas ($\nu_{\text{max}} = 1472$ e 1448).

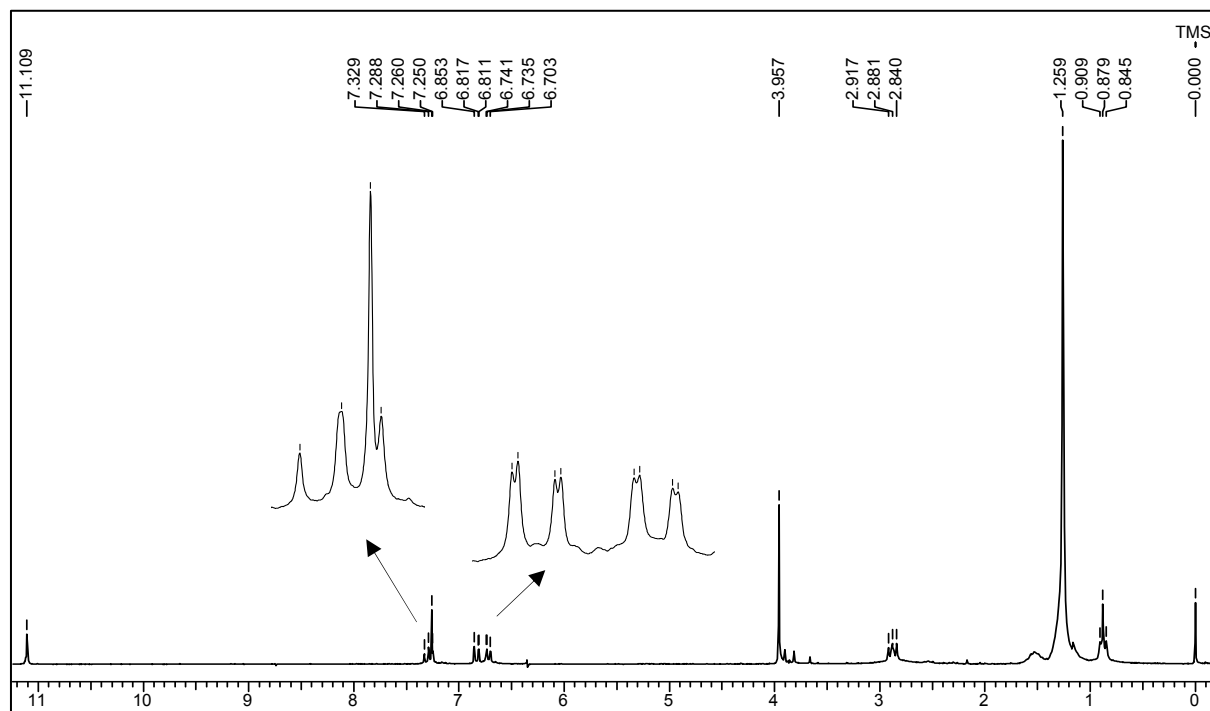


FIGURA 4.19 - Espectro de RMN ^1H de **AC 2** (CDCl_3 , 200 MHz).

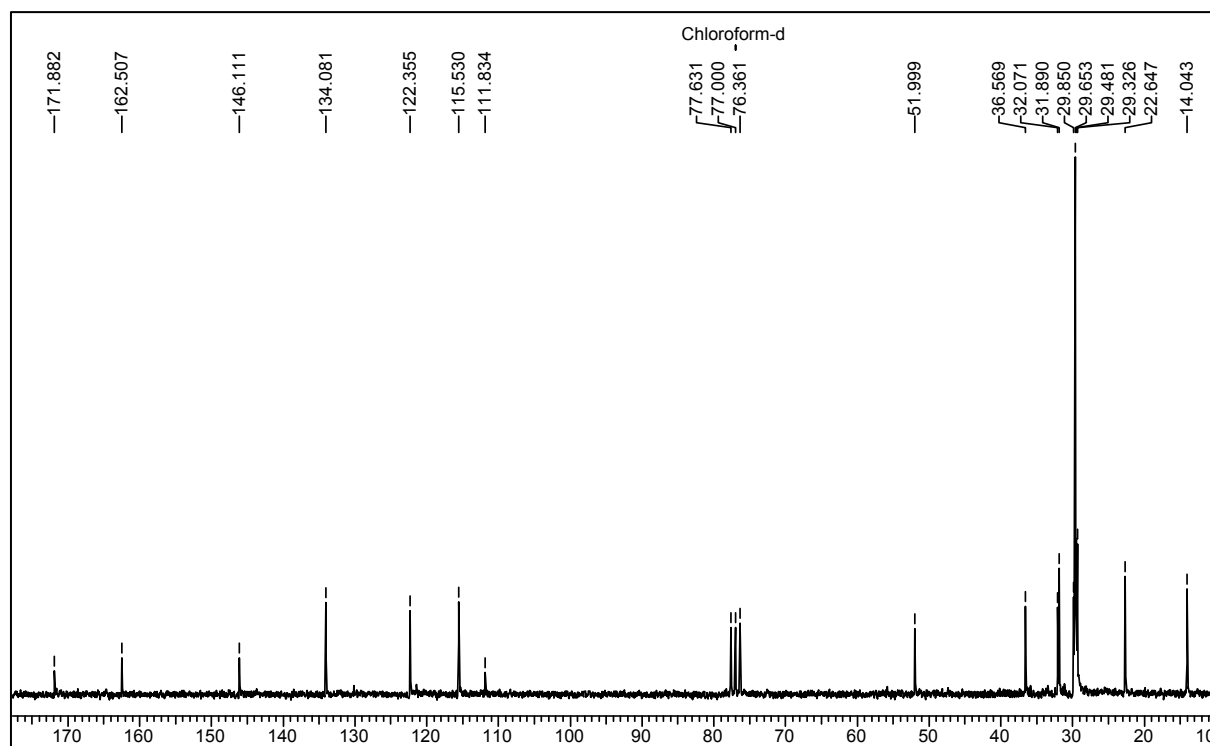


FIGURA 4.20 - Espectro de RMN ^{13}C de **AC 2** (CDCl_3 , 50 MHz).

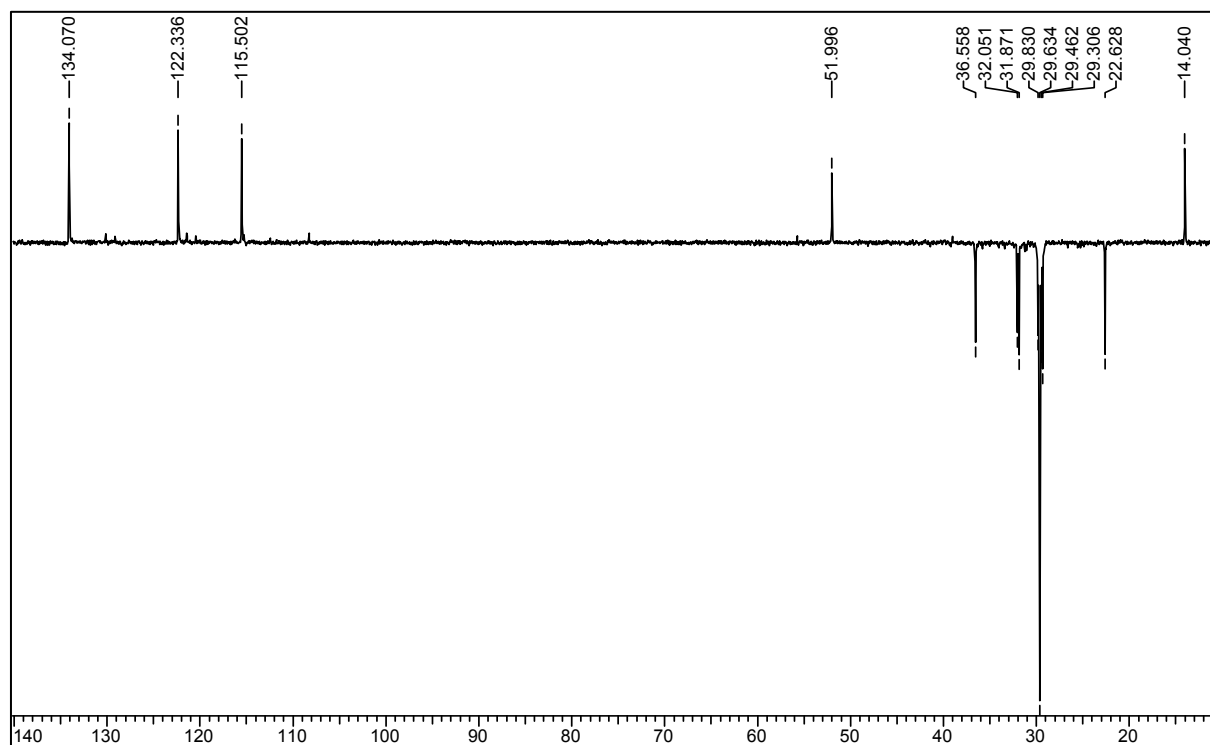


FIGURA 4.21 - Experimento de DEPT 135 de **AC 2** (CDCl₃, 50 MHz).

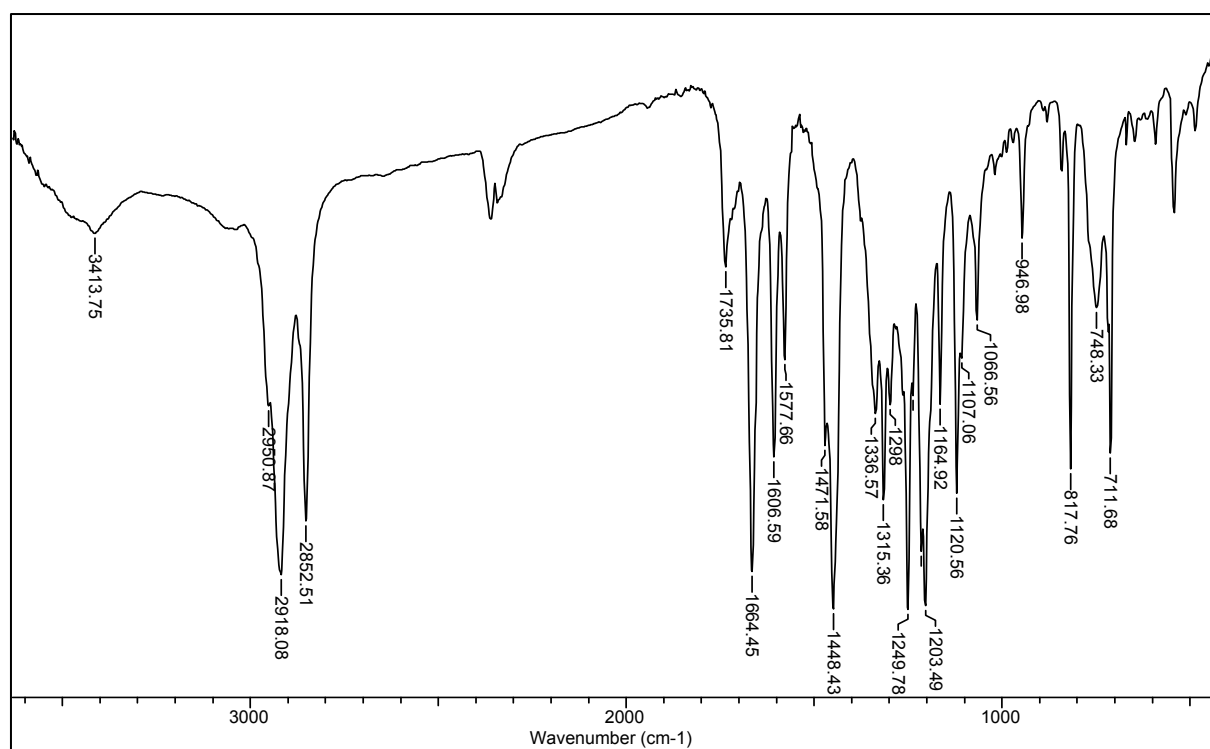


FIGURA 4.22 - Espectro de infravermelho de **AC 2**.

Dados espectroscópicos do 2-hidroxi-6-pentadecilbenzoato de metila (AC 2)

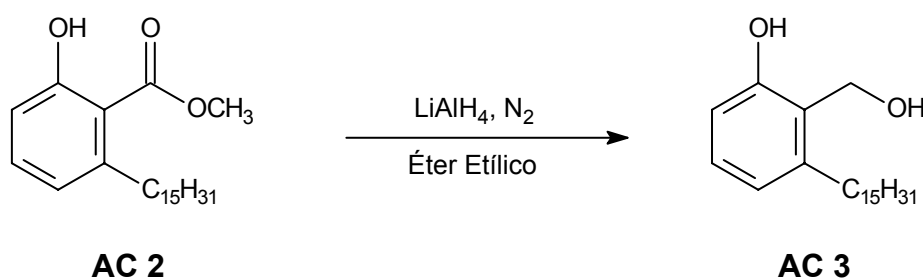
RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): δ (ppm) 11,11 (s, 1H); 7,29 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz); 6,83 (dd, 1H, *J* = 8,0 e 1,1 Hz); 6,72 (dd, 1H, *J* = 8,0 e 1,1 Hz); 3,96 (s, 3H); 2,88 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz); 1,26-1,53 (m, 26H); 0,88 (t, 3H, *J* = 6,4 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): δ (ppm) 171,9 (CO); 162,5 (C); 146,1 (C); 134,1(CH); 122,4 (CH); 115,5 (CH); 111,8 (C); 52,0 (OCH₃); 36,6 (CH₂); 29,3-32,1 (12CH₂); 22,6 (CH₂); 14,0 (CH₃).

IV (pastilha de KBr): *v*_{max} (cm⁻¹) 3414; 2918; 2852; 1664; 1606; 1472; 1448; 1250; 1203; 818; 712.

4.2.3 - Reação de redução de AC 2 com hidreto de lítio alumínio para obtenção de AC 3

O **AC 2** foi reduzido com LiAlH₄ (ESQUEMA 4.5) de acordo com os dados da TABELA 4.10 e o produto formado foi analisado por RMN ¹H e ¹³C.



ESQUEMA 4.5 - Reação de redução do éster **AC 2**.

TABELA 4.10 - Quantidade de material de partida, do produto e rendimento total e para a reação de redução de **AC 2**.

Substrato de trabalho	Produto	Rendimento (%)
Ác. anacárdico saturado AC 2 (100 mg; 0,28 mmol)	Álcool saturado AC 3 (3 mg; 0,01 mmol)	3

As condições utilizadas para esta reação não foram consideradas adequadas em função do baixo rendimento alcançado (3%). Isto pode ser explicado pelo fato do oxigênio da carbonila estar quelado com a hidroxila fenólica, dificultando

a redução da carbonila. Para melhor rendimento, sugere-se a utilização de um sistema de aquecimento com refluxo ao meio reacional.

A obtenção do álcool foi confirmada através da análise do espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.23), onde foi observado um singlete (δ_{H} 4,85) referente ao CH_2 vizinho a hidroxila do álcool.

No espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.24) observou-se um sinal (δ_{C} 59,7) referente ao carbono carbinólico e a ausência de sinais referentes ao éster.

A análise do espectro no infravermelho (FIGURA 4.25) confirmou a formação do álcool pelo aumento da banda de absorção característica de ligações O-H de hidroxilas ($\nu_{\text{max}} = 3379$).

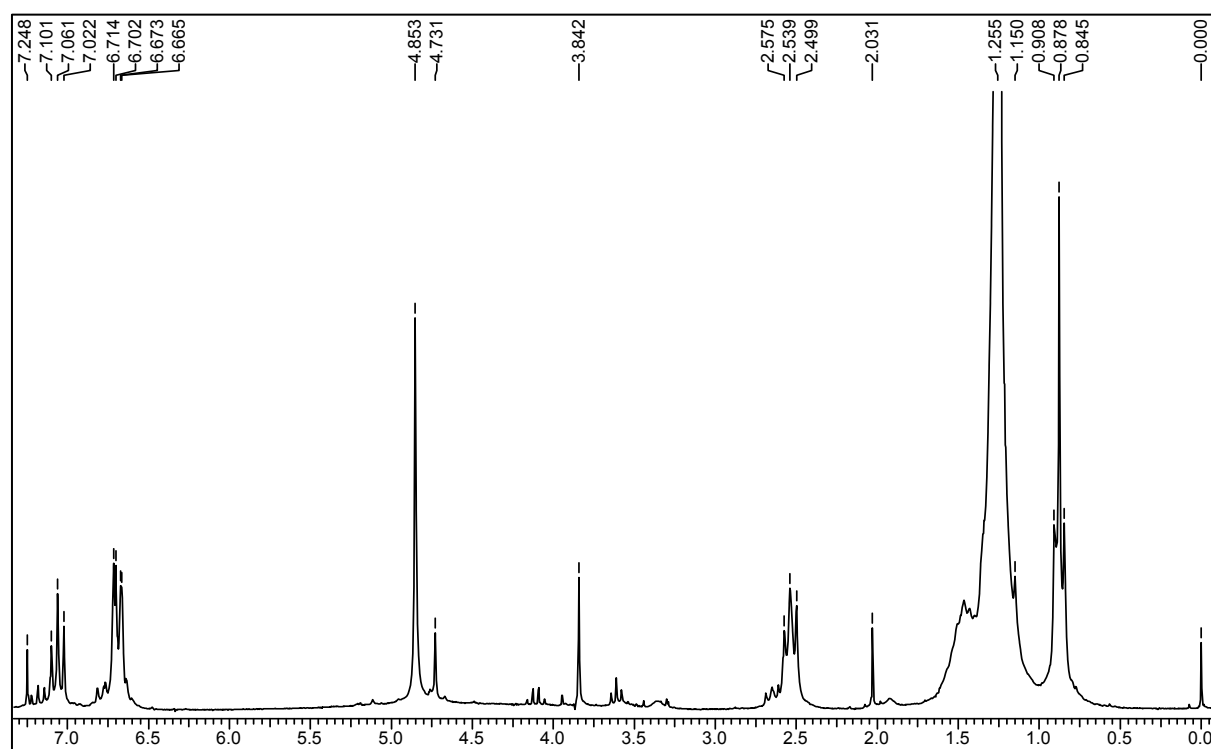


FIGURA 4.23 - Espectro de RMN ^1H de AC 3 (CDCl_3 , 200 MHz).

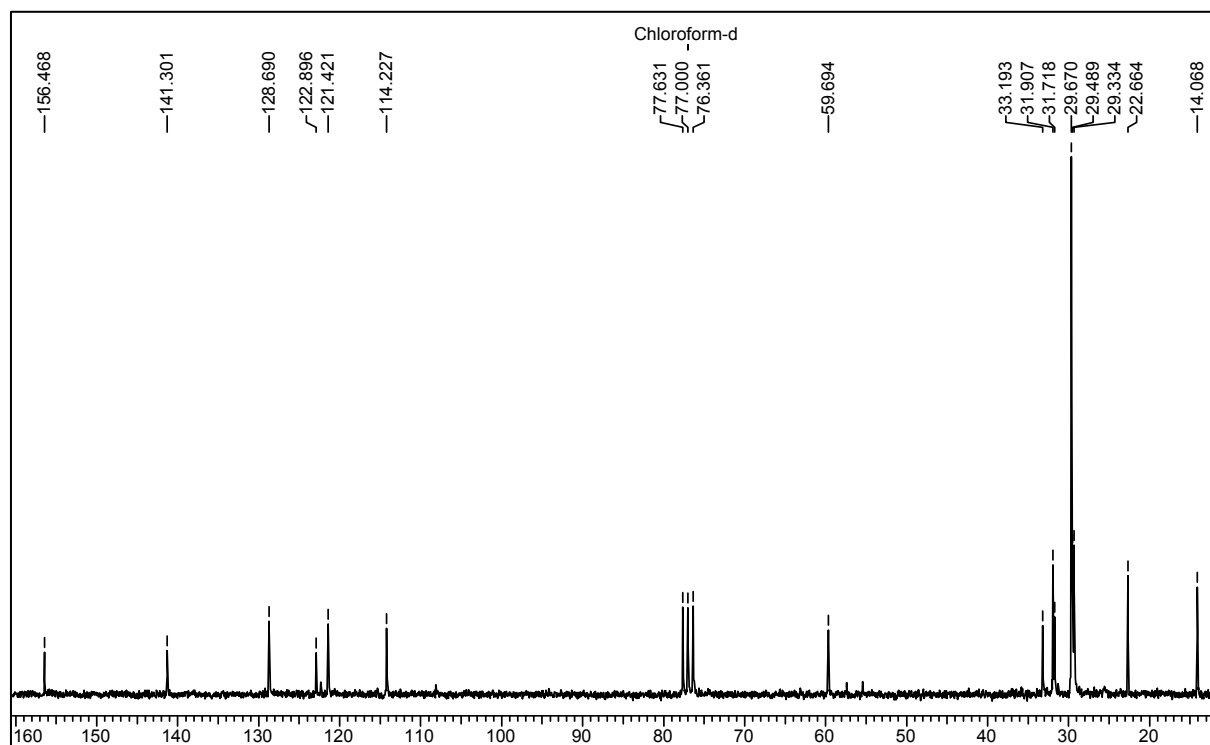


FIGURA 4.24 - Espectro de RMN ^{13}C de **AC 3** (CDCl_3 , 50 MHz).

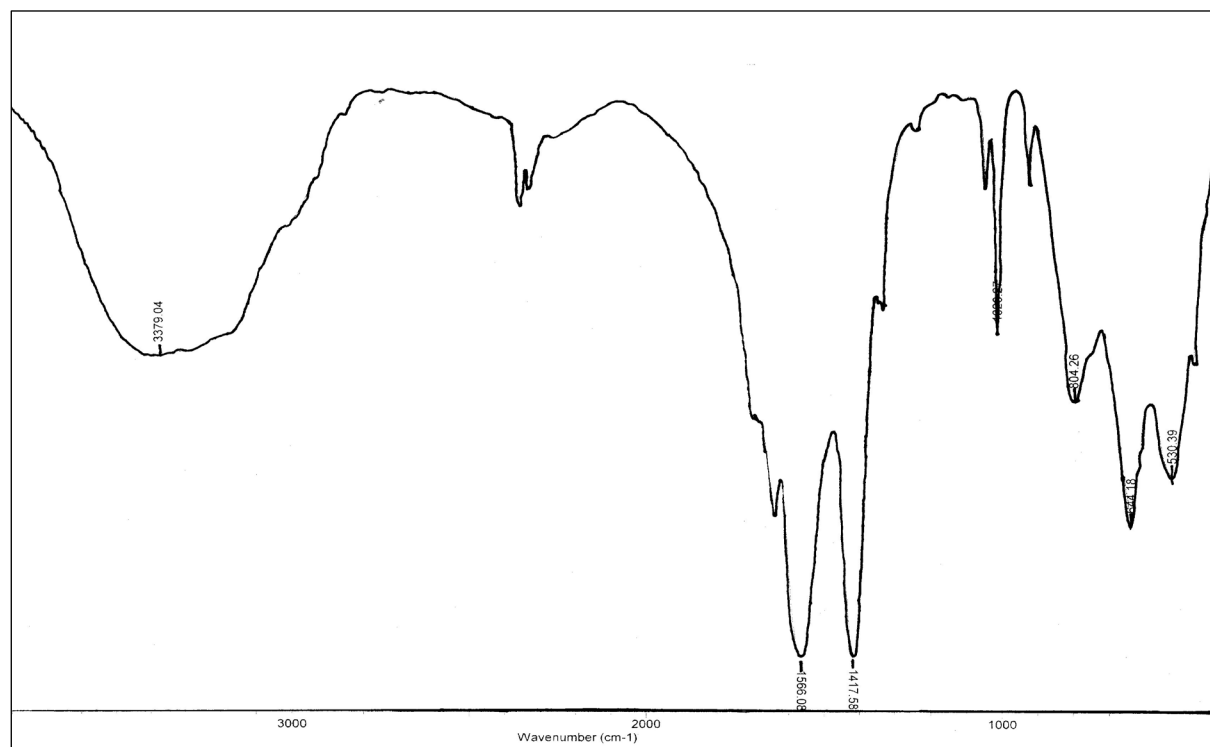


FIGURA 4.25 - Espectro de infravermelho de **AC 3**.

Dados espectroscópicos do 2-hidroximetil-3-pentadecilfenol (AC 3)

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): δ (ppm) 7,06 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz); 6,69 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz); 6,74 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz); 4,85 (s, 2H); 2,54 (t, 2H, *J* = 7,8 Hz); 1,20-1,60 (m, 26H); 0,88 (t, 3H, *J* = 6,6 Hz).

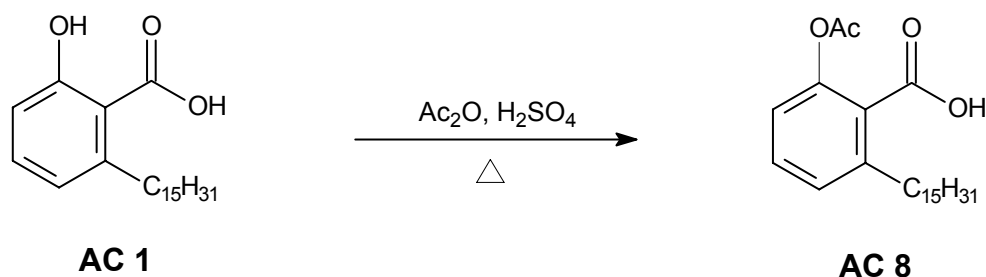
RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): δ (ppm) 156,5 (C); 141,3 (C); 128,7(CH); 122,9 (CH); 121,4 (C); 114,2 (CH); 59,7 (CH₂OH); 33,2 (CH₂); 31,9-29,3 (12CH₂); 22,7 (CH₂); 14,1 (CH₃).

IV (pastilha de KBr): ν_{\max} (cm⁻¹) 3379; 1566; 1418; 804; 644; 530.

4.2.4 - Reação de acetilação de AC 1 para obtenção de AC 8

O rendimento desta reação (ESQUEMA 4.6) não foi considerado satisfatório (TABELA 4.11). O fato de a hidroxila fenólica estar quelada com a carboxila dificultou a acetilação.

A obtenção do ácido acetilado foi confirmada através da análise do espectro de RMN ¹H (FIGURA 4.26), onde foi observada a presença de um singlete (δ_{H} 2,29) referente aos hidrogênios da metila do grupo acetil.



ESQUEMA 4.6 - Reação de acetilação de AC 1.

TABELA 4.11 - Quantidade de material de partida, do produto e rendimento total da reação de acetilação de AC 1.

Substrato de trabalho	Produto	Rendimento (%)
Ác. anacárdico saturado AC 1 (50 mg; 0,14 mmol)	Ác. anacárdico saturado acetilado AC 8 (23,4 mg; 0,06 mmol)	40

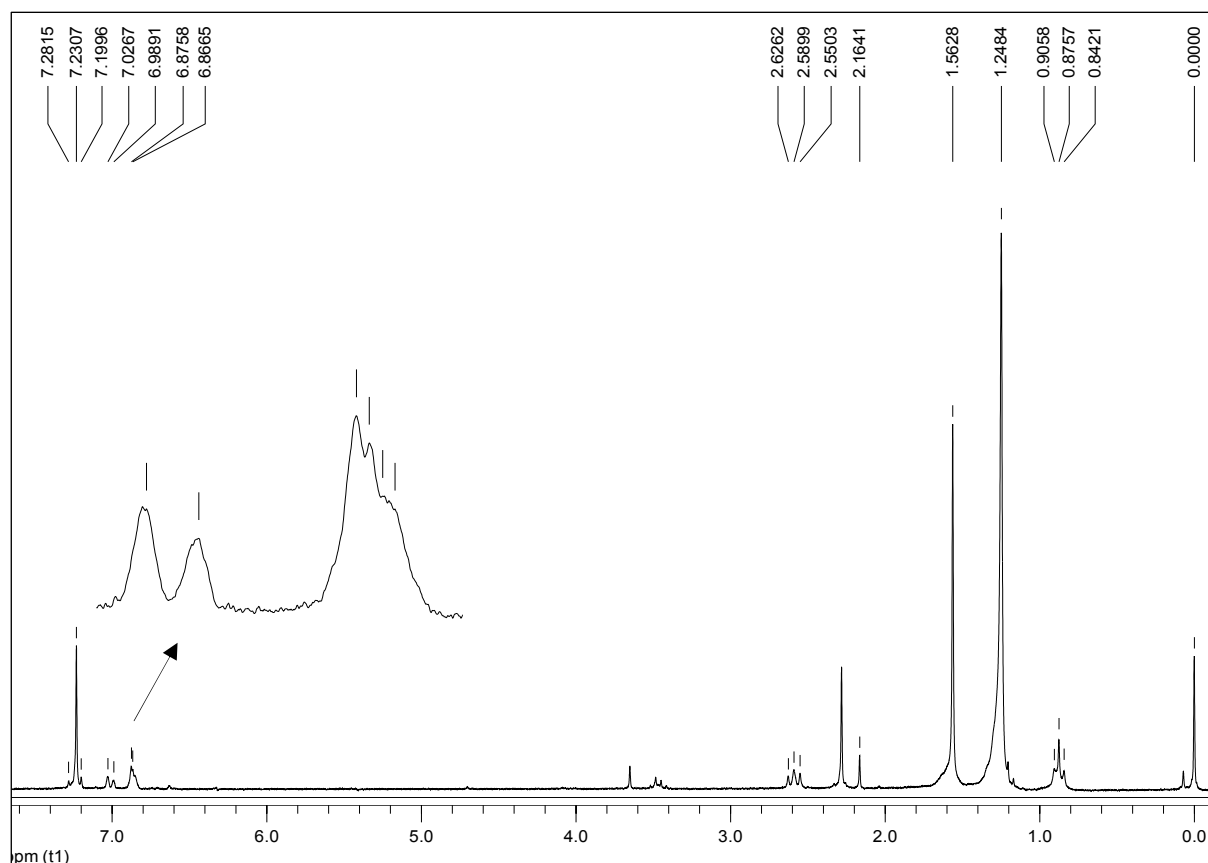


FIGURA 4.26 - Espectro de RMN ^1H de **AC 8** (CDCl_3 , 200 MHz).

Dados espectroscópicos do ácido 2-acetoxi-6-pentadecilbenzóico (**AC 8**)

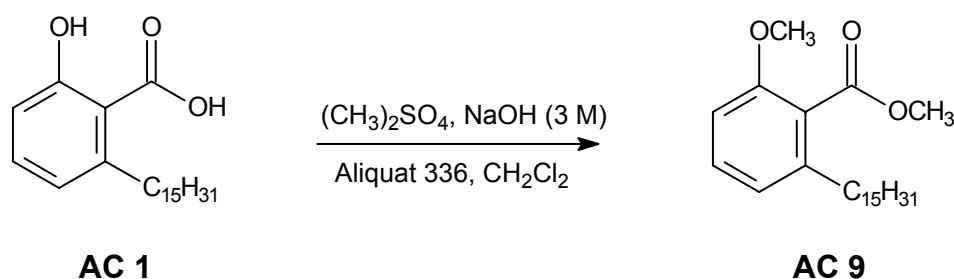
RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ (ppm) 7,23 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz); 7,01 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz); 6,86 (dd, 1H, $J = 3,7$ e 1,8 Hz); 2,59 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz); 2,28 (s, 3H); 1,25-1,56 (m, 26H); 0,88 (t, 3H, $J = 6,0$ Hz).

4.2.5 - Reação de dimetilação de **AC 1** para obtenção de **AC 9**

O ESQUEMA 4.7 e a TABELA 4.12 correspondem à reação de dimetilação de **AC 1**. A formação do éster pode ser confirmada através da análise do espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.27), que apresentou sinais característicos de hidrogênios de metoxilas. Foram observados dois singletos, um em δ_{H} 3,90 referente à metoxila aromática e outro em δ_{H} 3,81 referente à metoxila do éster.

A análise do espectro no infravermelho (FIGURA 4.28) confirmou a formação do éster metoxilado pelas bandas de absorção referentes às ligações da carbonila ($\nu_{\text{max}} = 1734$ e 1267). A dimetilação também provocou um aumento

significativo na intensidade das bandas de absorção características de ligações C-H de metilas ($\nu_{\max} = 1583$ e 1468).



ESQUEMA 4.7 - Reação de dimetilação de **AC 1**.

TABELA 4.12 - Quantidade de material de partida, do produto e rendimento total da reação de dimetilação de **AC1**.

Substrato de trabalho	Produto	Rendimento (%)
Ác. anacárdico saturado AC 1 (50 mg; 0,14 mmol)	Éster metilado saturado AC 9 (15 mg; 0,04 mmol)	28

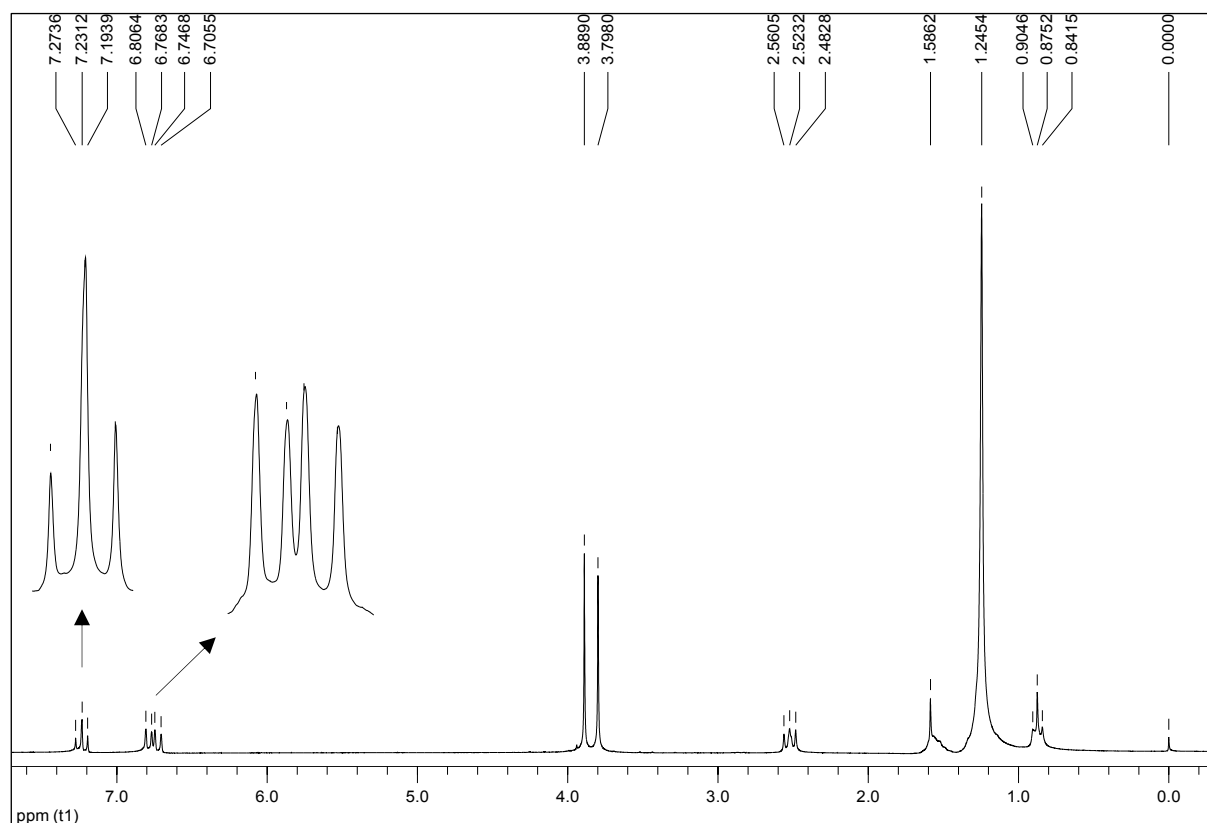


FIGURA 4.27 - Espectro de RMN ^1H de **AC 9** (CDCl_3 , 200 MHz).

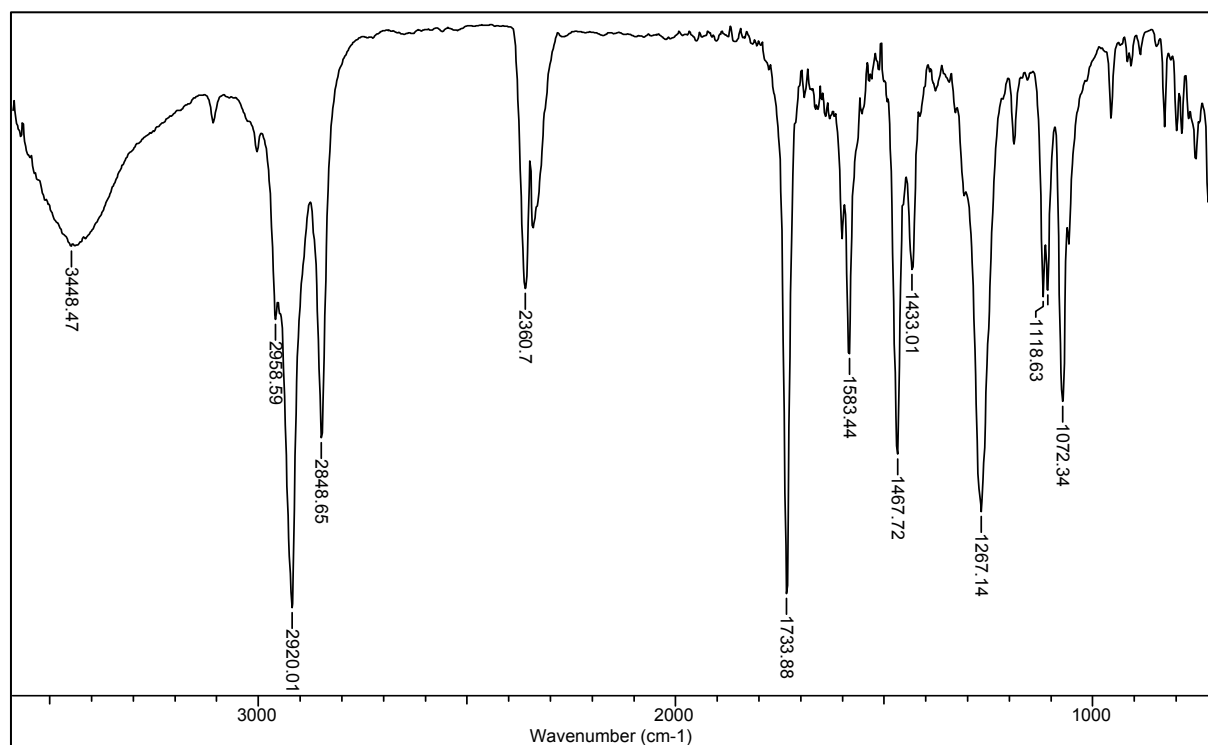


FIGURA 4.28 - Espectro de infravermelho de **AC 9**.

Dados espectroscópicos do 2-metoxi-6-pentadecilbenzoato de metila (**AC 9**)

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): δ (ppm) 7,23 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz); 6,79 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz); 6,72 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz); 3,89 (s, 3H); 3,80 (s, 3H); 2,52 (t, 2H, $J = 8,0$ Hz); 1,24-1,59 (m, 26H); 0,88 (t, 3H, $J = 6,5$ Hz).

IV (pastilha de KBr): ν_{max} (cm⁻¹) 3448; 2920; 2849; 1734; 1583; 1467; 1267; 1072.

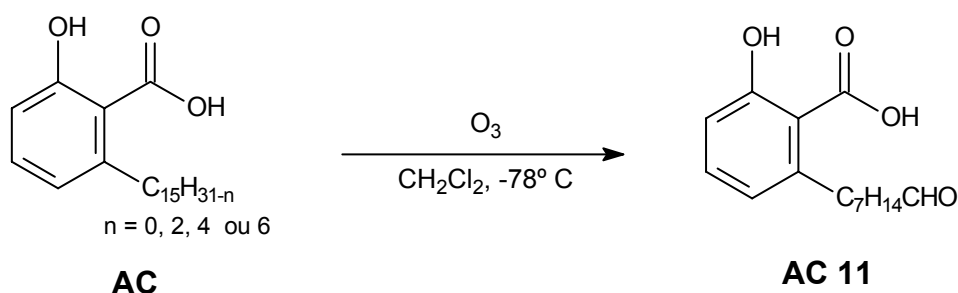
4.2.6 - Reação de ozonólise da fração AC para obtenção de AC 11

A formação do ácido saturado com aldeído na extremidade da cadeia alquílica (ESQUEMA 4.8 e TABELA 4.13) pode ser confirmada através da análise do espectro de RMN ¹H (FIGURA 4.29), onde foi observada a presença de um tripleto (δ_{H} 9,76) referente ao hidrogênio do aldeído.

Já no espectro de RMN ¹³C (FIGURA 4.30), a formação do aldeído pode ser confirmada pela presença de um sinal em δ_{C} 201,1. Observou-se ainda a integridade da função ácida pelo sinal em δ_{C} 173,2.

Através da análise cuidadosa dos espectros, pode-se observar que ainda havia ácido anacárdico totalmente saturado remanescente da mistura. Devido

à pequena quantidade de material e a instabilidade do aldeído, o composto **AC 11** não pode ser purificado.



ESQUEMA 4.8 - Reação de ozonólise da fração **AC**.

TABELA 4.13 - Quantidade de material de partida, do produto e rendimento total da reação de ozonólise da fração **AC**.

Substrato de trabalho	Produto	Rendimento (%)
Mistura de ác. anacárdicos	Ác. anacárdico saturado com aldeído	Bruto
AC	AC 11	51
(100,0 mg)	(50,6 mg; 0,13 mmol)	

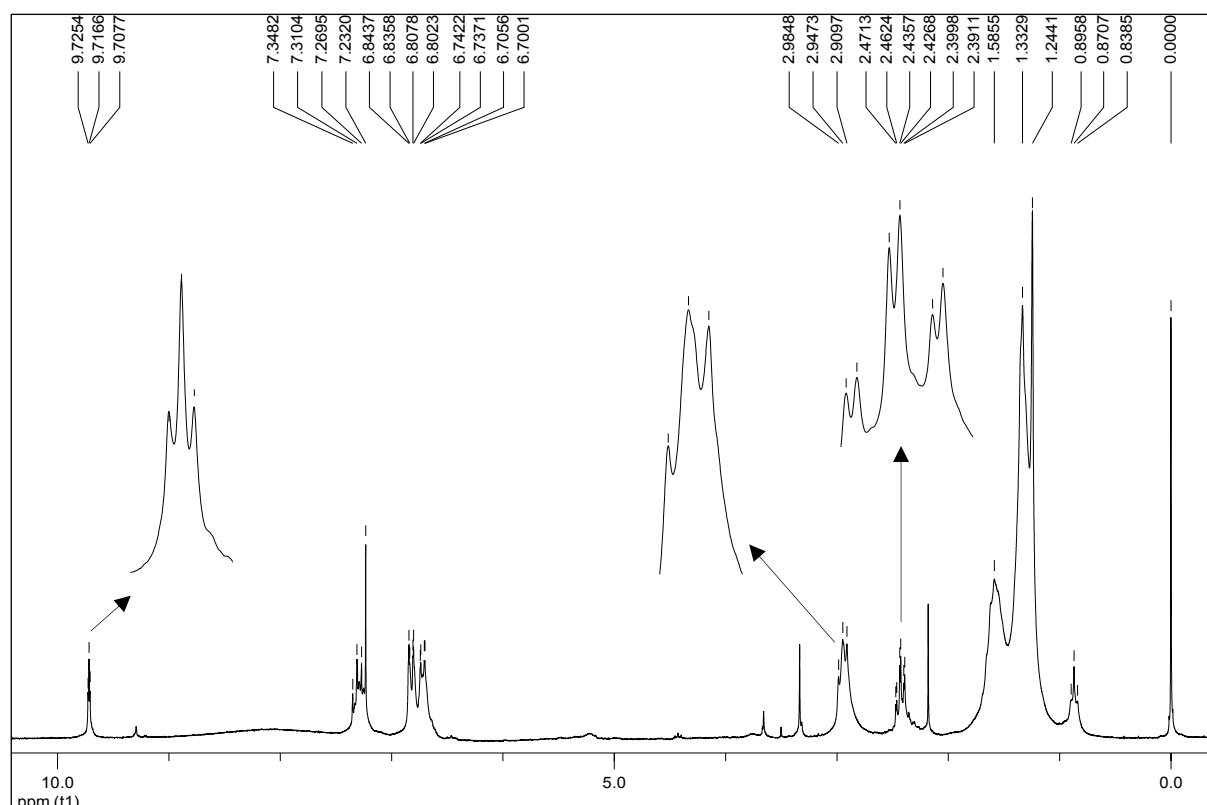


FIGURA 4.29 - Espectro de RMN ^1H de **AC 11** (CDCl_3 , 200 MHz).

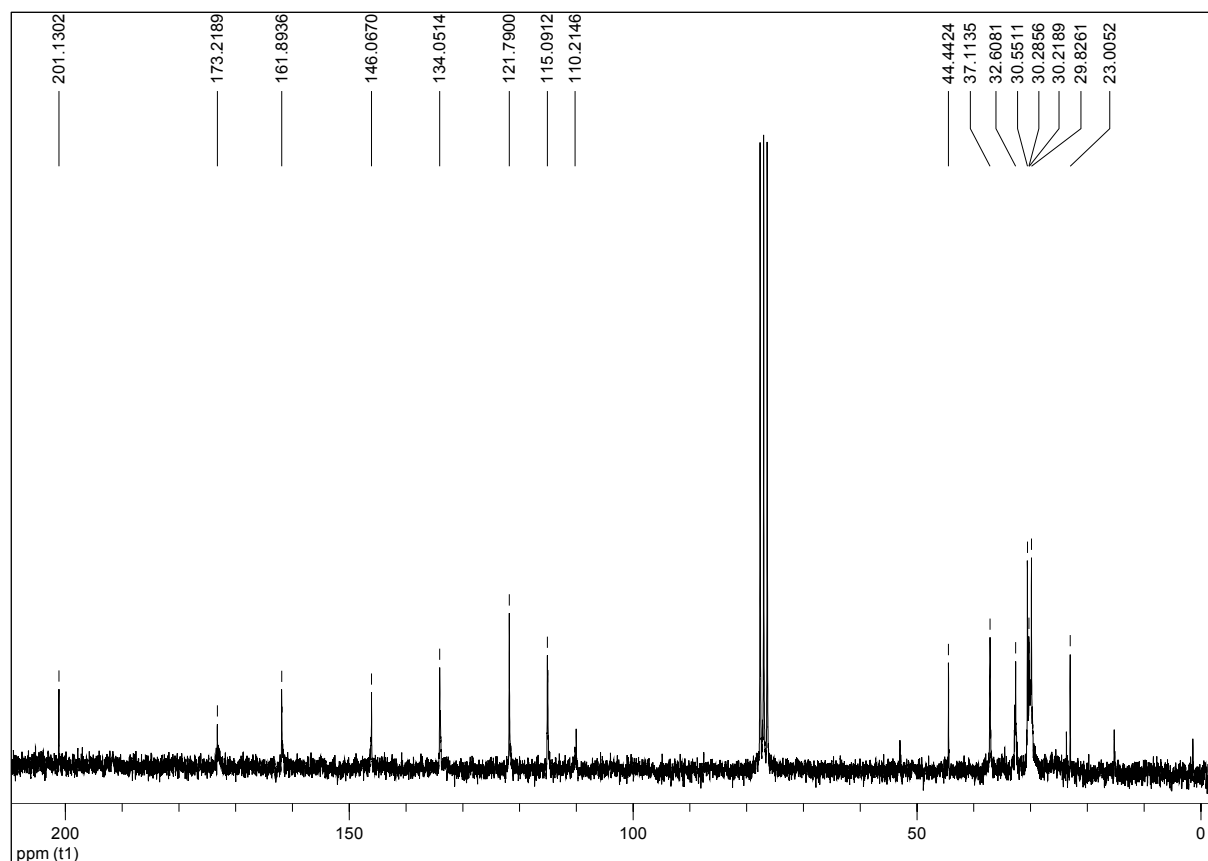


FIGURA 4.30 - Espectro de RMN ^{13}C de **AC 11** (CDCl_3 , 50 MHz).

Dados espectroscópicos do ácido 2-hidroxi-6-(8-oxooctil)benzóico (**AC 11**)

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ (ppm) 9,72 (t, 1H, $J = 1,8$ Hz); 7,31(t, 1H, $J = 7,5$ Hz); 6,82 (dd, 1H, $J = 7,5$ e 1,1 Hz); 6,72 (dd, 1H, $J = 7,5$ e 1,1 Hz); 2,94 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz); 2,43 (ddd, 2H, $J = 7,3$, 7,1 e 1,8 Hz); 1,24-1,58 (m, 10H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ (ppm) 201,1 (CHO); 173,2 (CO); 161,9 (C); 146,1 (C); 134,0 (CH); 121,8 (CH); 115,1 (CH); 110,2 (C); 44,4 (CH_2); 37,1 (CH_2); 32,6 (CH_2); 30,6 (CH_2); 30,3 (CH_2); 29,8 (CH_2); 23,0 (CH_2).

4.3 - Resultados dos ensaios biológicos

4.3.1 - Ensaio para avaliação do potencial de inibição de *A. occidentale* frente à enzima gGAPDH de *T. cruzi*

Diversos extratos de plantas e produtos naturais isolados foram avaliados quanto à atividade inibitória da enzima gGAPDH de *T. cruzi*. Dentre as

várias substâncias que apresentaram atividade, destacam-se as cumarinas (ALVIM-JR. *et al.*, 2005; PAVÃO *et al.* 2002; VIEIRA *et al.*, 2001) e flavonóides (TOMAZELA *et al.* 2000).

A busca por moléculas capazes de interferir na atividade da enzima gGAPDH *in vitro* foi realizada inicialmente através da triagem bioquímica, onde os extratos e substâncias puras foram avaliados em dose única padrão. Todas as medidas foram feitas em triplicata e a porcentagem de inibição foi determinada de acordo com equação 1 (PEREIRA *et al.*, 2008).

$$\% \text{ Inibição} = 100 \times (1 - V_i/V_0) \quad (1)$$

Sendo, V_i a velocidade de reação observada na presença de inibidor e V_0 a velocidade de reação observada na ausência do inibidor (velocidade de controle).

Os extratos de *A. occidentale* mostraram uma excelente atividade frente à enzima gGAPDH, quando testados na concentração de 100 µg/mL. A composição dos extratos diclorometânico (**AOD**) e metanólico (**AOM**) diferiu apenas pela proporção dos seus constituintes, sendo estes majoritariamente compostos fenólicos com cadeia alquílica de quinze átomos de carbono saturados e insaturados. Visto que o extrato diclorometânico (**AOD**) apresentava maior quantidade de material, iniciou-se o seu fracionamento utilizando diferentes metodologias, devido à dificuldade de separação de seus constituintes.

As frações provenientes do fracionamento utilizando cromatografia contracorrente eram constituídas por derivados fenólicos com cadeia alquílica diferenciada pela quantidade e posição de insaturações. A fração mais ativa (**AOD4**) era constituída pela mistura de ácidos anacárdicos com cadeia alquílica de quinze átomos de carbono, sendo a primeira insaturação sempre localizada no carbono oito. Os resultados de inibição mostraram-se bastante significativos (TABELA 4.14).

Diante dos resultados obtidos, foram propostas algumas modificações estruturais a fim de tentar potencializar os compostos ativos já identificados.

TABELA 4.14 - Inibição dos extratos e frações de *A. occidentale* frente à enzima gGAPDH de *T. cruzi*.

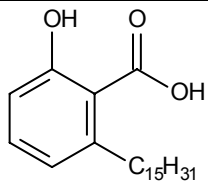
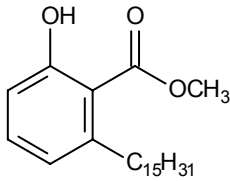
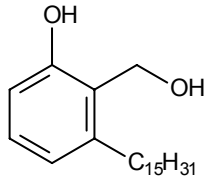
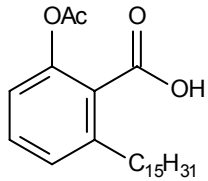
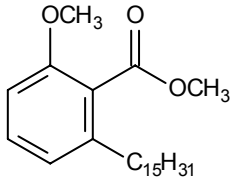
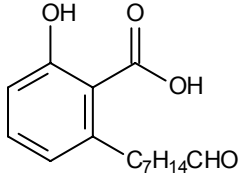
Extratos	Concentração (µg/mL)	Inibição (%)
AOD	100	100
AOM	100	99
AOS	100	86
Frações	Concentração (µg/mL)	Inibição (%)
AOD1	20	84
AOD2	5	78
AOD4 ^(*)	2	88

(*) a fração **AOD4** foi renomeada como fração **AC**.

A fração mais potente (**AOD4**) era constituída por uma mistura de ácidos anacárdicos com cadeia lateral que continha uma a três insaturações. Esta mistura apresentou uma inibição de 88% na concentração de 2 µg/mL e foi renomeada como fração **AC**. Na tentativa de avaliar a atividade de uma substância pura, realizou-se uma reação de hidrogenação da mistura. O ácido anacárdico totalmente saturado (**AC 1**) apresentou 96% de inibição na concentração 100 µM. Considerando o excelente resultado obtido com esta classe de substância, algumas modificações estruturais foram realizadas com o objetivo de aumentar a potência inibitória desta molécula (TABELA 4.15).

Devido a similaridade estrutural do ácido anacárdico com o ácido salicílico e o ácido acetil salicílico, estas moléculas também foram avaliadas frente à enzima gGAPDH, entretanto estes compostos não apresentaram atividade inibitória.

TABELA 4.15 - Inibição das substâncias derivadas do ácido anacárdico frente à enzima gGAPDH.

Estrutura	Composto [100 µg/mL]	Inibição (%)
	AC 1	96
	AC 2	10
	AC 3	20
	AC 8	NT
	AC 9	28
	AC 11^(*)	100

NT: composto não testado devido ao baixo rendimento da reação e não obtenção do composto puro.
 (*) **AC 11** apresentava 80% de pureza.

Os compostos **AC1** e **AC 11** se mostraram bastantes promissores como inibidores da enzima gGAPDH. Como etapa subsequente, os seus valores de IC₅₀ foram determinados como ilustra a FIGURA 4.31.

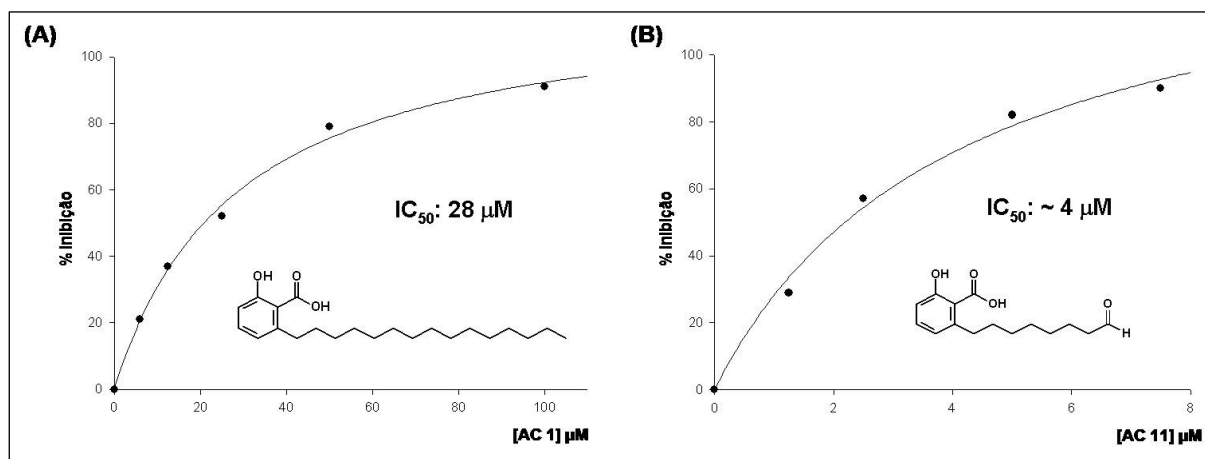


FIGURA 4.31 - Curvas de concentração x resposta utilizadas na determinação de IC₅₀ pelo método de regressão não-linear de melhor ajuste dos dados cinéticos coletados experimentalmente. (A) Determinação de IC₅₀ para o composto **AC 1**. (B) Determinação de IC₅₀ aproximado para o composto **AC 11**, considerando que este não estava puro.

Considerando que os resultados obtidos para esta classe de compostos foram extremamente promissores, realizou-se uma colaboração com o Laboratório de Síntese Orgânica de Produtos Naturais da UFSCar. O objetivo foi sintetizar uma coleção de ácidos anacárdicos, variando o tamanho da cadeia lateral alquílica, contendo ou não grupo polar na sua extremidade, e análogos com substituintes nas funções carboxila e hidroxila (PEREIRA, 2007).

4.3.2 - Ensaio para avaliação do potencial de inibição dos ácidos anacárdicos e seus derivados frente à enzima gGAPDH de *T. cruzi* (NOVO PROTOCOLO)

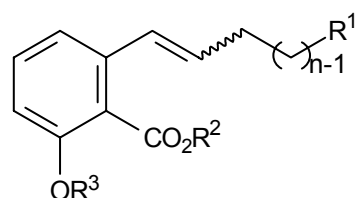
Durante a realização deste trabalho as condições do ensaio sobre a enzima gGAPDH foram modificadas. As principais modificações foram em relação ao tampão utilizado que garantiu melhor reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados e a concentração da enzima. O pH utilizado passou de 8,6 para 7,5, mimetizando melhor as condições fisiológicas.

Considerando que algumas substâncias apresentavam absorção no mesmo comprimento de onda do NADH formado (340 nm), utilizou-se como cofator o Tio-NAD⁺, detectando assim como produto de reação o Tio-NADH no comprimento de onda de 400 nm.

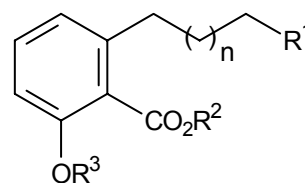
Os 21 compostos sintetizados (TABELA 4.16) e o **AC 1** foram ensaiados utilizando o novo protocolo. Para se obter o valor de IC₅₀ do composto **AC**

11 (produto da ozonólise do ácido anacárdico natural) nas novas condições de ensaio, foi sintetizado o composto **11**.

TABELA 4.16 - Derivados do ácido anacárdico sintetizados por Pereria (PEREIRA et al., 2008).



7 a-e



8-11

Composto	n	R ¹	R ²	R ³
7 a-c	4,6,8	OTHP	Et	Me
7 d-e	6,9	CH ₃	Et	Me
8 a-c	4,6,8	OTHP	Et	Me
8 d-e	6,9	CH ₃	Et	Me
9 a-c	4,6,8	OH	Et	H
9 d-e	6,9	CH ₃	Et	H
10 a-c	4,6,8	OH	H	H
10 d-e	6,9	CH ₃	H	H
11	5	CHO	H	H

Inicialmente todos os compostos foram avaliados na concentração única de 200 μ M e suas potências foram expressas em % de inibição. Para surpresa, o composto **11** não apresentou atividade significativa quando utilizado o novo protocolo de ensaio. Os dois compostos mais ativos foram o **AC 1** e **10e**, com valores de IC₅₀ de 28 e 55 μ M, respectivamente (TABELA 4.17). Estes dois compostos foram selecionados para a realização de estudos cinéticos com a enzima gGAPDH de *T. cruzi*.

TABELA 4.17 - Resultados da triagem biológica dos compostos frente à enzima gGAPDH de *T. cruzi*.

Composto	Inibição (%) 200 μ M	IC ₅₀ * (μ M)
AC 1	95	28 \pm 3
7 a-e	<10	>300
8 a-e	<10	>250
9 a-d	<10	>250
9e	13	215 \pm 17
10a	14	>250
10b	16	>250
10c	19	240 \pm 22
10d	<10	200 \pm 17
10e	91	55 \pm 5
11	<10	>250

* Os valores de IC₅₀ foram determinados com medidas em triplicata (\pm SD).

Primeiramente a autenticidade destes compostos como inibidores foi confirmada pela adição de 0,01% de Triton X-100 ao meio reacional, descartando a possibilidade de inibição inespecífica. A literatura descreve a existência de inibidores promíscuos capazes de diminuir a atividade das enzimas através da formação de agregados, ou seja, esses compostos capturam a enzima do meio reacional diminuindo assim sua atividade (McGovern *et al.*, 2003). Com o uso do detergente a hipótese de formação de agregados foi descartada.

Para explorar mais detalhadamente o mecanismo de inibição, foram determinados os valores de K_i em relação aos substrato G-3-P e o cofator NAD⁺ (TABELA 4.18).

Os resultados mostrados na TABELA 4.18 e na FIGURA 4.32 indicam que estes inibidores são do tipo não-competitivos para a enzima gGAPDH de *T. cruzi* em relação a ambos os ligantes (G-3-P e NAD⁺). Os inibidores não-competitivos possuem afinidade tanto pela enzima livre quanto pelo complexo enzima-substrato. Neste caso a constante de dissociação foi determinada para o complexo binário enzima-inibidor (K_i) e para o complexo ternário enzima-substrato-inibidor (αK_i).

TABELA 4.18 - Valores de K_i e αK_i para os inibidores não-competitivos da enzima gGAPDH de *T. cruzi*.

Inibidor	NAD ⁺		G-3-P	
	K_i (μM)	αK_i (μM)	K_i (μM)	αK_i (μM)
AC 1	4	6	2	4
10e	5	43	4	38

Quando o valor de $\alpha > 1$, o inibidor se liga preferencialmente a enzima livre, sugerindo que o inibidor se liga a enzima em um sítio distinto do sítio ativo, não competindo assim com o substrato.

A FIGURA 4.32 mostra o perfil de inibição encontrado para os compostos **AC1** e **10e** pelo gráfico de Lineweaver-Burk (duplo recíproco).

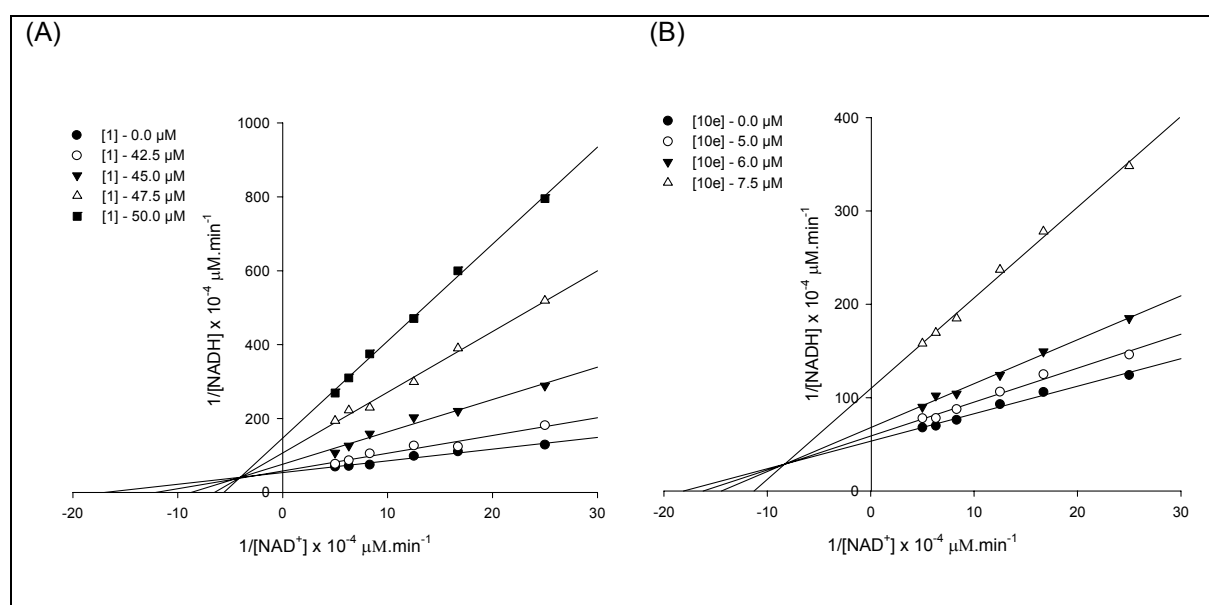


FIGURA 4.32 - Gráfico de Lineweaver-Burk mostrando que os compostos **AC 1** (A) e **10e** (B) inibem não-competitivamente a enzima gGAPDH de *T. cruzi* em relação ao cofator NAD⁺.

Os gráficos de Lineweaver-Burk mostram que todas as linhas obtidas em diferentes concentrações de inibidor na presença do cofator NAD⁺, se interceptam no quadrante superior esquerdo. Este mesmo comportamento foi observado para o substrato G-3-P.

O coeficiente angular das retas (*slope*) e o ponto de intersecção no eixo y foram afetados pela presença do inibidor não-competitivo, ou seja, observa-se uma redução da velocidade máxima (V_{max}) na presença de inibidor. Isto pode ser

explicado pelo fato de que V_{max} depende diretamente da concentração de enzima ativa, uma vez que parte da enzima livre encontra-se ligada ao inibidor, afetando assim a sua concentração. Com isto, o substrato não desloca o inibidor, acentuando assim o decréscimo de V_{max} com o aumento da concentração do inibidor.

No gráfico os comportamentos das retas variam de acordo com a concentração do inibidor e se cruzam essencialmente pelo valor de α . As retas se interceptam em valores de $1/[S]$ inferior a zero e valores de $1/v$ superior a zero.

4.3.3 - Determinação da atividade tripanocida *in vitro* sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Ensaio preliminares com os extratos brutos de *A. occidentale* provocaram lise total tanto das células quanto das formas tripomastigotas. Já nos ensaios com suas frações ocorreu apenas lise parasitária. Os extratos e frações foram ensaiados na concentração de 4 mg/mL (TABELA 4.19).

TABELA 4.19 - Porcentagem de lise dos extratos de *A. occidentale* nos ensaios tripanocidas.

Extratos [4 mg/mL]	% de lise	Frações [4 mg/mL]	% de lise
AOD	lise total	AOD2	50
AOM	lise total	AOD4	100

Já o precipitado do extrato metanólico (**AOS**) foi ensaiado em diferentes concentrações (TABELA 4.20), sendo que na concentração de 250 μ g/mL ocorreu lise parcial e diminuição do movimento das formas tripomastigotas. Nas demais concentrações observaram-se hemácias crenadas e as formas tripomastigotas permaneceram normais.

TABELA 4.20 - Porcentagem de lise do precipitado **AOS** nos ensaios tripanocidas.

AOS [$\mu\text{g/mL}$]	LISE (%)
50	23
100	68
250	94

Os resultados obtidos nos ensaios tripanocidas com as substâncias puras estão descritos na TABELA 4.21 e apóiam os resultados obtidos nos ensaios com a enzima gGAPDH de *T. cruzi*. O ácido anacárdico saturado (**AC1**) continuou sendo o composto mais ativo, com IC_{50} de 191,4 μM .

TABELA 4.21 - Valores de IC_{50} determinados para as substâncias puras nos ensaios tripanocidas.

Substância	IC_{50} (μM)
AC 1	191,4
AC 2	530,3
I	300,2

Controle positivo: violeta genciana ($\text{IC}_{50} = 83,0 \mu\text{M}$); controle negativo: sangue infectado + 5% de DMSO.

PARTE II

Estudo de Produtos Naturais e Derivados Sintéticos Buscando Inibidores de Cisteíno Peptidases Lisossomais

Essa parte inicia com uma breve introdução sobre cisteíno peptidases, em especial as catepsinas K, V, L e S, e os principais tipos de inibidores enzimáticos. Em seguida há uma breve descrição do procedimento experimental utilizado para a realização dos ensaios de triagem de produtos naturais e derivados sintéticos como inibidores de cisteíno peptidases lisossomais. Por último foi descrito os resultados de inibição frente às catepsinas (K, V, L e S) e a seleção dos inibidores mais potentes frente à catepsina V. Para estes últimos foi determinada a potência (IC_{50}), a constante de afinidade (K_i) e o mecanismo de inibição. Realizaram-se ainda estudos de modelagem molecular para melhor compreender as interações intermoleculares predominantes no mecanismo de ação destes inibidores.

PARTE II
Introdução

PARTE II. Estudo de Produtos Naturais e Derivados Sintéticos Buscando Inibidores de Cisteíno Peptidases Lisossomais.

5 - INTRODUÇÃO

A natureza, especialmente os vegetais, são fontes ricas de substâncias com grande variedade estrutural e com alto potencial farmacológico (HOSTETTMANN *et al.*, 2003).

De acordo com dados recentes do FDA, entre os anos de 1981 e 2006, 5% das novas entidades químicas (NCEs) aprovadas, são produtos naturais. Entretanto, quando se considera o número de NCEs derivadas de produtos naturais ou planejadas a partir de produtos naturais, esse número sobe para 52%, evidenciando a grande importância dos produtos naturais no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN & CRAGG, 2007).

Desta forma, as plantas representam uma fonte promissora de diversidade molecular na busca de inibidores enzimáticos específicos. Os produtos naturais de origem vegetal apresentam ampla e diversa arquitetura molecular. A espetacular diversidade molecular de padrões estruturais observados nas distintas classes de produtos naturais, como flavonóides, isoflavonóides, lignanas, neolignanas, glicosídeos, cumarinas, cromonas, isocromonas, quinonas, alcalóides, entre outras, representa fonte inesgotável de modelos originais de arquitetura molecular enantiopura, sendo que muitos se transformam em modelos para síntese de um grande número de fármacos (BARREIRO & FRAGRA, 2002).

Com os grandes avanços tecnológicos e científicos em cultura de células, técnicas de extração e identificação estrutural, processos de triagem, genética, bioquímica de proteínas, biologia estrutural e química sintética, há uma convergência para se criar um futuro promissor entre as ciências de produtos naturais e o desenvolvimento de novos fármacos. A descoberta de novos agentes terapêuticos inicia-se pela busca de uma molécula que apresente uma propriedade biológica: composto bioativo. O uso de receptores específicos como enzimas alvo, através de ensaios bioquímicos, representa uma ótima estratégia na identificação de substâncias bioativas, como inibidores enzimáticos (ROUHJ, 2003).

5.1 - Cisteíno peptidases lisossomais

As catepsinas estão distribuídas entre as famílias das aspartil peptidases (catepsinas D e E), serino peptidases (catepsinas A e G) e cisteíno peptidases (catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, W e X) (TURK *et al.*, 2000; BROMME & KALETA, 2002).

As cisteíno peptidases lisossomais formam uma numerosa e importante família de enzimas similares a papaína (do inglês, papain-like) (BARRET *et al.*, 1981). Existe um interesse crescente em caracterizá-las e confirmar o seu envolvimento em importantes processos celulares. Estas enzimas são geralmente conhecidas como enzimas que degradam aleatoriamente proteínas no lisossomo. Entretanto, este conceito tem sido revisto e demonstrou-se que algumas delas estão envolvidas em processos seletivamente controlados, tendo funções associadas à sua restrita localização tecidual.

Recentemente, extensas revisões foram publicadas sobre as catepsinas lisossomais (TURK *et al.*, 2000; BUHLING *et al.*, 2000; BROMME & KALETA, 2002; MCGRATH, 1999). Completado o genoma humano, 11 catepsinas lisossomais foram descritas e estão relativamente bem caracterizadas: B, H, L, S, C, K, O, F, V, X e W. Em relação à função, sabe-se que as cisteíno peptidases lisossomais têm a função primária de degradar, de forma não seletiva, proteínas dentro dos lisossomos. No entanto, recentemente ficou demonstrado que muitas destas enzimas não são estritamente encontradas nos lisossomos, podendo acumular-se em diferentes organelas e participar de processos celulares mais especializados levando a processos patológicos (TABELA 5.1) como, progressão de tumores malignos (SLOANE *et al.*, 1994; KOS & LAH, 1998), distrofia muscular (KOMINAMI *et al.*, 1997), doença de Alzheimer (CATALDO & NIXON, 1990), artrite reumatóide e osteoporose (YASUDA *et al.*, 2005).

As cisteíno peptidases lisossomais são encontradas em diferentes organismos, incluindo fungos, plantas, protozoários, invertebrados, peixes e mamíferos (LECAILE *et al.*, 2002). Todas as cisteíno peptidases lisossomais de mamíferos são conhecidas como catepsinas, embora o contrário não seja verdadeiro.

TABELA 5.1 - Catepsinas lisossomais, localização e função fisiopatológica.

ENZIMA	LOCALIZAÇÃO	FUNÇÃO
Catepsina B	constitutiva em mamíferos	processo de invasão e progressão tumoral
Catepsina C	vários tecidos de mamíferos	envolvida no processamento de serino peptidases
Catepsina F	macrófagos e células do músculo liso	importante papel na hidrólise de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), o que pode levar ao processo de aterosclerose
Catepsina H	vários tecidos de mamíferos	progressão de tumores; hidrolisar neuropeptídeos
Catepsina K	osteoclastos, células gigantes multinucleadas, fibroblastos sinuial e células epiteliais	importante enzima no processo de remodelagem óssea, mutações nesta enzima provocam graves anormalidades ósseas (osteoporose)
Catepsina L	constitutiva em mamíferos	participa do processo de apresentação de antígenos em células ou tecidos que não expressam a catepsina S (envolvida na progressão de tumores)
Catepsina O	ovário, testículos, timo, fígado e coração	desconhecida
Catepsina S	tecido linfático, especificamente nas células apresentadoras de antígeno	principal enzima processadora da cadeia invariante do MHC, sendo essencial para o processamento e apresentação de antígenos (envolvida na progressão de tumores)
Catepsina V	timo, testículos e células epiteliais da córnea	hidrolisa as cadeias invariantes do complexo MHC; possui a mais potente atividade elastolítica dentre as proteases humanas
Catepsina W	linfócitos	desconhecida
Catepsina X	fígado, pulmão, coração e cérebro	envolvida câncer de próstata

5.1.1 - Catepsinas humanas como alvo terapêutico

a) Catepsinas na biologia do câncer

Há crescentes evidências da contribuição das catepsinas nos eventos proteolíticos relacionados à progressão tumoral, tais como proliferação celular, apoptose, angiogênese tumoral, invasão tecidual e metástase, indicando que elas são alvo em potencial no desenvolvimento de fármacos para o tratamento do câncer (TURK *et al.*, 2002; TURK & GUNCAR, 2003). Independentemente de serem secretadas, de estarem presentes na superfície celular ou intracelular elas atuam nas vias proteolíticas responsáveis pelo aumento da progressão neoplásica. Recentemente foi descoberto que a inibição dessas catepsinas provoca uma diminuição significativa na proliferação celular tumoral em camundongos (JOYCE *et al.*, 2004; PALERMO & JOYCE, 2007).

A angiogênese é necessária para o crescimento invasivo do tumor e metástase, sendo um processo fundamental no controle da progressão do câncer. Estudos recentes têm mostrado o papel das catepsinas neste processo. Estudos mostram que a expressão da catepsina B em tumores está correlacionada com a angiogênese e acredita-se que ela promova o remodelamento da matriz extracelular para permitir a formação de capilares (MAI *et al.*, 2002; BUCK *et al.*, 1992).

Estudos recentes têm mostrado o envolvimento das catepsinas nos processos de invasão e metástase, onde essas enzimas participam da degradação de proteínas da matriz extracelular. Essa degradação ocorre tanto no interior quanto no exterior das células, já que as catepsinas podem também ser excretadas, como por exemplo, a catepsina B, que é secretada pelas células do carcinoma colo-retal humana, hepatomas e no câncer de pulmão. Uma vez que estas enzimas estão localizadas extracelularmente, elas podem agir nos sítios de contato entre as células tumorais e a membrana basal. Essas áreas estão, geralmente, acidificadas pelas células tumorais, gerando condições favoráveis para a ativação dos precursores das catepsinas que são secretados (MACIEWICZ *et al.*, 1989; HEIDTMAN *et al.*, 1997).

b) Catepsinas nas doenças cardiovasculares

O remodelamento da matriz extracelular é um dos mais importantes mecanismos nas doenças cardiovasculares. As catepsinas têm um papel central nesse remodelamento participando do desenvolvimento e da progressão das doenças cardiovasculares, incluindo a aterosclerose e a formação de aneurismas. A aterosclerose é o endurecimento e estreitamento das artérias causado pelo aparecimento de placas obstrutivas nas paredes das artérias, podendo com o tempo, restringir o fluxo sanguíneo. Há dois tipos de placas: as duras e estáveis e as macias e instáveis. Essa última pode se quebrar, separando-se da parede arterial e entrando na circulação, o que pode causar a coagulação do sangue, bloqueando parcialmente ou totalmente o fluxo sanguíneo. A degradação da elastina e do colágeno, que são os dois principais componentes da matriz extracelular responsáveis pela elasticidade da parede arterial, acarreta o afinamento e a perda da elasticidade dessa parede. As catepsinas K, S e V são as que apresentam a mais potente atividade elastolítica dentre as catepsinas (YASUDA *et al.*, 2004) e sua presença foi identificada em macrófagos nas áreas de formação de placas ateroscleróticas (LUTGENS *et al.*, 2007).

c) Catepsinas nas atividades cinino-liberadora e cinino-degradadora

As cininas são peptídeos pró-inflamatórios, que participam da manutenção da homeostase cardiovascular e desempenham um papel central em várias doenças, incluindo fibrose pulmonar e hipertensão. Recentemente tem-se mostrado fortes evidências do envolvimento das cisteíno-catepsinas tanto na liberação quanto na degradação de cininas *in vitro* (PUZER *et al.*, 2004) e *in vivo* (PUZER *et al.*, 2005). Entretanto, apesar dessas fortes evidências, ainda não se sabe se a ação dessas enzimas pode influenciar diretamente na regulação da pressão arterial pela liberação e ou degradação de cininas.

d) Catepsinas na osteoporose

A osteoporose caracteriza-se pela perda progressiva de massa óssea, levando a um grande aumento da frequência de fraturas ósseas. Os ossos são

formados por matriz protéica, que em mais de 90% é colágeno do tipo I. O processo de remodelamento do esqueleto é um processo cíclico que envolve fases de reabsorção e de substituição, sendo continuamente remodelados pela ação compensatória dos osteoblastos (que sintetizam a matriz orgânica dos ossos na qual os componentes minerais são depositados) e os osteoclastos (que solubilizam a matriz mineralizada dos ossos pela secreção de enzimas proteolíticas ao interior de um poço extracelular de reabsorção óssea, que é mantido em pH 4,5). A função específica da catepsina K na reabsorção óssea foi demonstrada pela observação que a deficiência dessa enzima causa uma displasia óssea conhecida como picnodisostose (doença hereditária rara caracterizada pelo endurecimento e fragilidade dos ossos) (GELB *et al.*, 1996). A degradação do colágeno tipo I é o principal evento que ocorre durante o processo de remodelação óssea e depende da formação do complexo da catepsina K com condroitil sulfato.

Assim, o importante papel desempenhado pela catepsina K na reabsorção óssea fez desta enzima um alvo interessante para as indústrias farmacêuticas. A empresa Merck divulgou recentemente estudos clínicos em fase II com um inibidor específico da catepsina K, denominado odanacatibe. Pacientes tratados durante dois anos com este inibidor apresentaram aumento significativo na densidade mineral óssea, reforçando o potencial deste inibidor como uma nova opção no tratamento da osteoporose (MERCK, 2008).

5.1.2 - Catepsinas lisossomais estudadas

5.1.2.1 - Catepsina K (EC 3.4.22.38)

A seqüência de aminoácidos da catepsina K mostra uma identidade relativamente alta com as catepsinas S e L (52% e 46%, respectivamente). Em humanos, catepsina K é predominantemente expressa em osteoclastos (BRÖMME & OKAMOTO 1995). Além da atividade da catepsina K estar envolvida no processo de remodelamento ósseo, ela também tem ação sobre as proteínas do tecido conjuntivo, como colágeno e elastina. A catepsina K foi caracterizada como uma das mais efetivas collagenases em mamíferos capaz de hidrolisar o colágeno do tipo I, II e IV, sendo que os sítios de clivagem da catepsina K na molécula de colágeno são únicos entre as proteases de mamíferos (GARNERO *et al.*, 1998).

5.1.2.2 - Catepsina V (EC 3.4.22.43)

A catepsina V é expressa somente em humanos, predominantemente no timo, nos testículos e na córnea epitelial, sendo sua função nesses tecidos ainda desconhecida (SANTAMARIA *et al.*, 1998; ADACHI *et al.*, 1998). No entanto, há indícios que ela esteja envolvida no controle da seleção de células T (responsáveis pela imunidade celular) (TOLOSA *et al.*, 2003). Em situações patológicas, a catepsina V é considerada um potente marcador de diagnóstico de tumores no cólon (SANTAMARIA *et al.*, 1998). Além disso, recentemente foi descrito que esta enzima apresenta a mais potente atividade elastolítica dentre as enzimas proteolíticas conhecidas, sendo inclusive mais eficiente que a elastase. Essa capacidade de hidrolisar a elastina tem sido associada, juntamente com as catepsinas K e S, ao processo de desenvolvimento da aterosclerose (YASUDA *et al.*, 2004). Estudos de especificidade da catepsina V usando substratos peptídicos, mostraram que ela apresenta características semelhantes às das catepsinas L e S (BRÖMME *et al.*, 1999; PUZER *et al.*, 2004).

5.1.2.3 - Catepsina L (EC 3.4.22.15)

Além de humanos, a catepsina L é descrita em rato, rã, pomba, carpa e *Euglena gracilis* (não sendo detectada em levedura ou *E. coli*) (BOHLEY & SEGLEN, 1992). Esta peptidase é geralmente encontrada em todos os tipos de células de mamíferos e tem como função primária degradar outras proteínas como: colágeno, elastina, miosina, actina, glucagon, insulina, ovoalbumina, entre outras. Esta enzima está associada a processos patológicos como reabsorção óssea, metástase e artrite reumatoide. Sua deficiência provoca perda de cabelo e está associada ao processo de desenvolvimento do câncer de pele. Estudos com ratos comprovam que a ausência dessas catepsinas causa alteração na morfologia do coração (TURK & GUNCAR, 2003). Ratos deficientes em catepsina L apresentam perda de pelo e hiperplasia epidérmica, além de exibirem alterações histomorfológica e funcionais no coração, resultando em cardiopatia dilatada, freqüente causa de infartos. Também está associada a inúmeras doenças, como reabsorção óssea, metástases de tumores e artrite reumatóide. A similaridade da atividade da catepsina L para com as

outras catepsinas (como a K e S) obscurece seu possível papel em alguns processos.

5.1.2.4 - Catepsina S (EC 3.4.22.27)

A catepsina S foi purificada pela primeira vez de linfonodos (TURNSEK *et al.*, 1975) e baço bovinos (KIRSCHKE, *et al.*, 1986). Sua estrutura tridimensional revelou características típicas da cisteíno-peptidases lisossomais, evidenciando semelhanças com as catepsinas K e L (McGRATH *et al.*, 1998). Em relação a substratos naturais, a catepsina S apresenta atividade colagenolítica (KIRSCHKE *et al.*, 1989) e elastinolítica (XIN *et al.*, 1992). Além disso, catepsina S é a principal enzima processadora da cadeia invariante do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II, sendo essencial para o processamento e apresentação de antígenos, em células da medula óssea (NAKAGAWA & RUDENSKY, 1999; VILLADANGOS *et al.*, 1999). A catepsina S está aparentemente envolvida na patogênese de diversas doenças degenerativas como, por exemplo, doença de Alzheimer (MUNGER *et al.*, 1995; LEMERE *et al.*, 1995) e em desordens associadas a células do sistema fagocitário mononuclear (REDDY *et al.*, 1995). Estudos recentes mostraram que a catepsina S, que degrada vários componentes da matriz extracelular, é produzida por células adiposas humanas e está diretamente associada à obesidade (TALEB *et al.*, 2006a e 2006b) e a lesões ateroscleróticas (TALEB *et al.*, 2005).

5.1.3 - Características estruturais e mecanismo de ação

As catepsinas humanas B, H, K, L, S, V e X tiveram suas estruturas determinadas (TURK & GUNCAR, 2003). A massa molecular destas enzimas varia entre 20 e 30 kDa, não incluindo a pró-região, que pode estender-se de 60 a 100 aminoácidos.

A atividade proteolítica das catepsinas é altamente conservada e formada por três resíduos: Cys25, His159 e Asn175 (numeração da papaína). Cys25 e His159 formam um par iônico que é estabilizado por ligação de hidrogênio pelo resíduo Asn175. O resíduo nucleofílico (Cys25) deve ser pré-ativado para que fique ionizado e possa reagir com o substrato. Durante a hidrólise do peptídeo, o nucleófilo (S⁻ da Cys25) ataca a carbonila da ligação peptídica do substrato,

formando um intermediário tetraédrico. Posteriormente, por um processo de acilação, este intermediário tetraédrico libera a porção C-terminal do substrato, deixando a enzima acilada (enzima-substrato tiol éster). Uma hidrólise forma um segundo intermediário tetraédrico e em seguida este intermediário sofre uma reação de desacilação, liberando a porção N-terminal e a enzima livre (FIGURA 5.1) (LECAILE *et al.*, 2002).

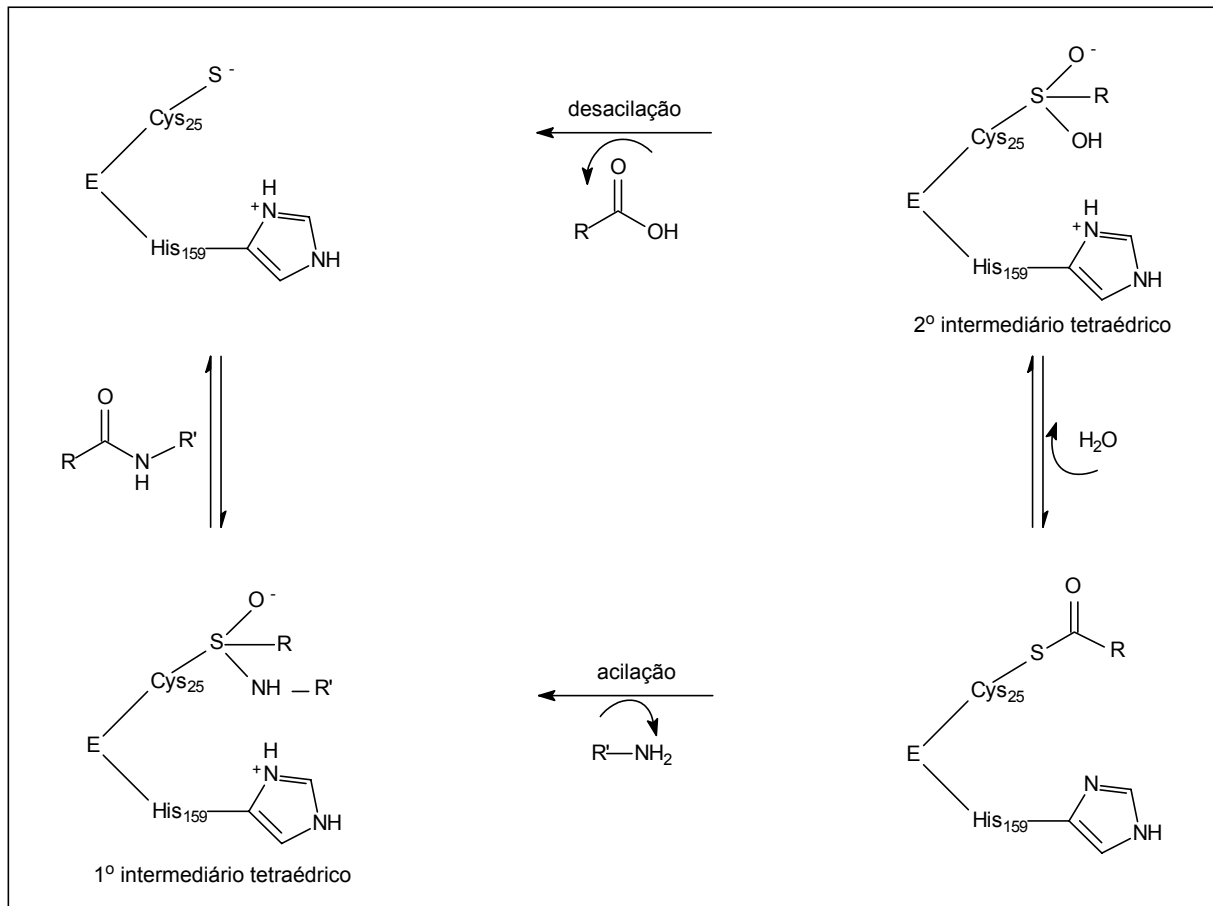


FIGURA 5.1 - Mecanismo de hidrólise de peptídeos por cisteína peptidase.

Nos últimos anos, estudos de enzimologia e de biologia estrutural vêm tentando desvendar o papel que os aminoácidos situados próximo ao sítio catalítico destas enzimas exercem sobre o mecanismo de catálise. Estruturas de cisteína peptidases em complexos com inibidores têm permitido a identificação e mapeamento do sítio de ligação dos substratos. Estas informações estruturais, em combinação com os estudos cinéticos, têm levado ao desenvolvimento de inibidores do tipo *tight-binding* e altamente seletivos para algumas das catepsinas conhecidas. No entanto, o processo de otimização de inibidores específicos para uma

determinada protease ainda apresenta muitas dificuldades, principalmente quando se trata de enzimas com alta identidade seqüencial (FIGURA 5.2) (SOMOZA *et al.*, 2000; LECAILE *et al.*, 2002).

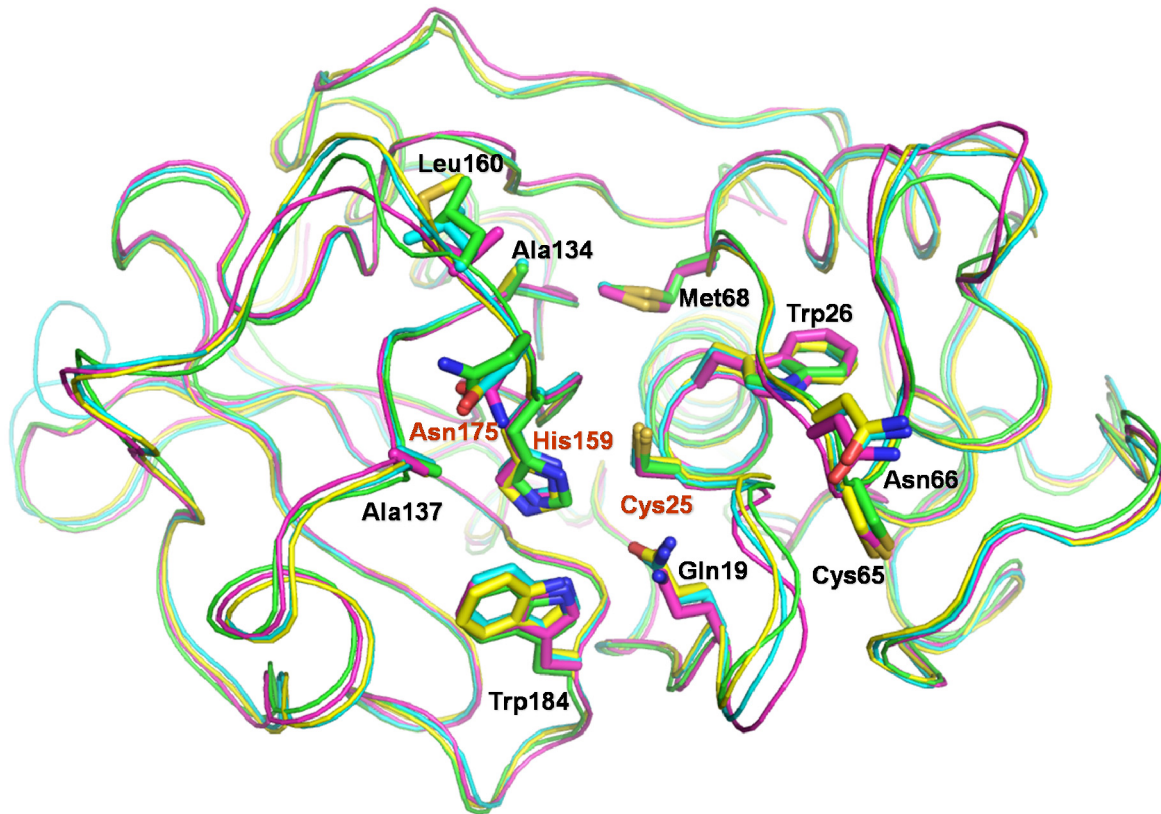


FIGURA 5.2 - Sobreposição estrutural das catepsinas K (verde), V (ciano), L (amarelo) e S (magenta). Em destaque os resíduos conservados entre as catepsinas. Resíduos pertencentes a tríade catalítica estão indicados com a legenda em vermelho.

5.2 - Substratos fluorogênicos

Um avanço considerável no estudo das peptidases se deu a partir da introdução dos substratos fluorogênicos. Dentre estes, destacam-se os peptídeos que contêm a sonda fluorescente 7-amino-4-metilcumarina (MCA). Estes substratos, quando hidrolisados apresentam um espectro de absorção e de emissão diferentes daqueles da 7-amino-4-metilcumarina (MCA) ligados aos peptídeos. O fator limitante no uso destes substratos é de permitir o estudo da especificidade dos subsítios S (nomenclatura de Schechter & Berger). Esta restrição deve-se ao fato da fluorescência aparecer somente quando a ligação X-MCA (X = diferentes

aminoácidos) é clivada e o produto fluorescente é liberado. O uso do substrato fluorescente Z-Phe-Arg-MCA (Z-FR-MCA) (FIGURA 5.3) tem sido amplamente difundido devido à alta sensibilidade do método de dosagem do produto fluorescente 7-amino-4-metil-cumarina (BARRETT & KIRSCHKE, 1981).

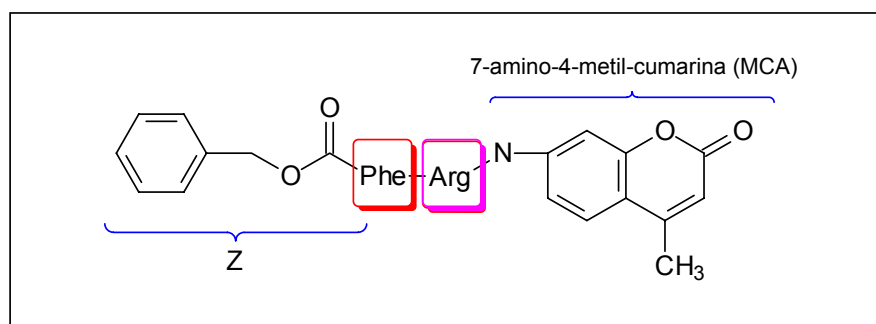


FIGURA 5.3 - Estrutura do substrato comercial Z-FR-MCA, onde Z = carbobenzoxi, Phe = fenilalanina, Arg = arginina e MCA = 7-amino-4-metil-cumarina.

Essas diferenças espectrais dos diferentes substratos (peptidil-MCA) e do produto de hidrólise permitem que as atividades enzimáticas das peptidases sejam acompanhadas no fluorímetro usando os comprimentos de onda $\lambda_{exc} = 380$ nm e $\lambda_{em} = 460$ nm (revisto por JULIANO et al., 2002).

Por outro lado, os estudos de especificidades podem ser estendidos a inibidores com o emprego de coleções de substâncias isoladas de plantas, que permitam um ensaio com grande variedade estrutural, proporcionando informações do modo de interação desses inibidores com as enzimas e um maior entendimento das relações estrutura atividade. Essas informações convergem para obtenção de inibidores enzimáticos cada vez mais específicos.

5.3 - Inibidores enzimáticos

Inibidores enzimáticos são substâncias químicas capazes de reduzir a velocidade de reações catalisadas por enzimas (COPELAND, 2000).

As reações bioquímicas catalisadas por enzimas ocorrem em geral pela associação de uma enzima (E) ao seu substrato (S) formando um complexo, chamado de complexo enzima-substrato (E•S). A formação desse complexo ocorre de forma rápida e reversível, envolvendo interações intermoleculares não-covalentes, sem registro de modificações químicas. Em seguida, a espécie E•S passa por um rápido estado de transição (E•S[‡]) resultando no complexo enzima-

produto ($E \bullet P$), que por sua vez se dissocia rapidamente liberando a enzima íntegra (E) e o produto (P) no meio reacional. Esse processo é mostrado na FIGURA 5.4 (COPELAND, 2005).

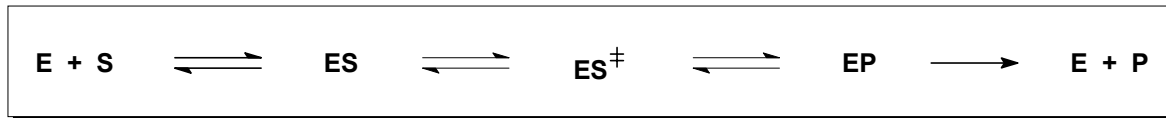


FIGURA 5.4 - Equilíbrio cinético estabelecido entre enzima e substrato. A formação das espécies $E \bullet S$, $E \bullet P$ e $E \bullet S^\ddagger$ é determinante na velocidade da reação e formação dos produtos.

A atividade catalítica de uma enzima pode ser alterada na presença de substâncias químicas que podem interagir com as diferentes formas associadas da enzima através de ligações reversíveis ou irreversíveis, interferindo assim no equilíbrio estabelecido entre E , S e P , caracterizando o seu modo de ligação e mecanismo de ação.

5.3.1 - Potência e seletividade dos inibidores

A triagem de substâncias químicas frente a uma enzima (alvo macromolecular) geralmente é abordada pelos aspectos da avaliação em dose única (% inibição) e determinação da potência inibitória (IC_{50}). Durante as triagens bioquímicas (ensaio *in vitro*), a capacidade de uma substância química (candidato a inibidor) em inibir a enzima-alvo é avaliada a partir de doses únicas, que se referem a concentrações padrões pré-estabelecidas. As substâncias que mostram inibição significativa nesse ensaio são selecionadas para estudos mais detalhados, visando à determinação da potência (POSTIGO, 2008; COPELAND, 2005).

A potência dos candidatos a inibidores, por sua vez, é estabelecida através de experimentos que levam à geração de gráficos do tipo *concentração x resposta*. A análise por regressão não-linear desses gráficos leva à determinação do fator de potência IC_{50} , que se refere à concentração de inibidor necessária para reduzir em 50% a atividade enzimática em condições experimentais padrões. Esse importante parâmetro cinético permite a análise quantitativa comparativa dentro de uma série de compostos, gerando dados úteis para o estabelecimento de relações entre a estrutura e a atividade (*SAR – Structure-Activity Relationships*).

Quando uma série de inibidores é planejada para exercer uma ação farmacológica com finalidade terapêutica, é muito importante a determinação da seletividade. Para isso a potência de cada inibidor é determinada para cada uma das enzimas, sendo o resultado dessa razão a seletividade enzimática (COPELAND, 2005).

É de grande importância que um inibidor candidato a fármaco seja seletivo apenas para a enzima-alvo, não interagindo de forma significativa com outras enzimas presentes no metabolismo alvo.

5.3.2 - Modo de ligação e mecanismo de ação

Os inibidores enzimáticos atuam por mecanismos reversíveis ou irreversíveis, associando-se às enzimas através de ligações intermoleculares não-covalentes ($E \bullet I$) ou covalentes ($E-I$), respectivamente. Os inibidores irreversíveis causam inativação enzimática, enquanto que os inibidores reversíveis podem se ligar as várias espécies da enzima em equilíbrio e não causam modificações na estrutura da enzima, sendo que a atividade enzimática pode ser recuperada com a remoção do inibidor (COPELAND, 2000).

Para o planejamento racional de fármacos através de inibição enzimática é desejável que o inibidor se ligue a enzima não covalentemente, de forma rápida e reversível, não produzindo assim mudanças na estrutura da enzima, formando o complexo enzima-inibidor ($E \bullet I$). Os inibidores reversíveis podem ser classificados em três categorias:

a) Inibidores competitivos: estes inibidores muitas vezes se assemelham estruturalmente com o substrato natural da enzima, resultando na mimetização dos padrões intermoleculares de ligação fazendo com que a enzima reconheça o inibidor como um “possível substrato”. Entretanto, pelo fato da sua estrutura química ser diferente do substrato, o inibidor não sofre reação química característica do substrato, não levando a formação de produto pela ação da enzima. Por definição, este tipo de inibidor requer a competição entre S e I pela ocupação da cavidade de interação do sítio ativo da enzima-alvo, havendo a formação da espécie $E \bullet S$ ou $E \bullet I$ (FIGURA 5.5).

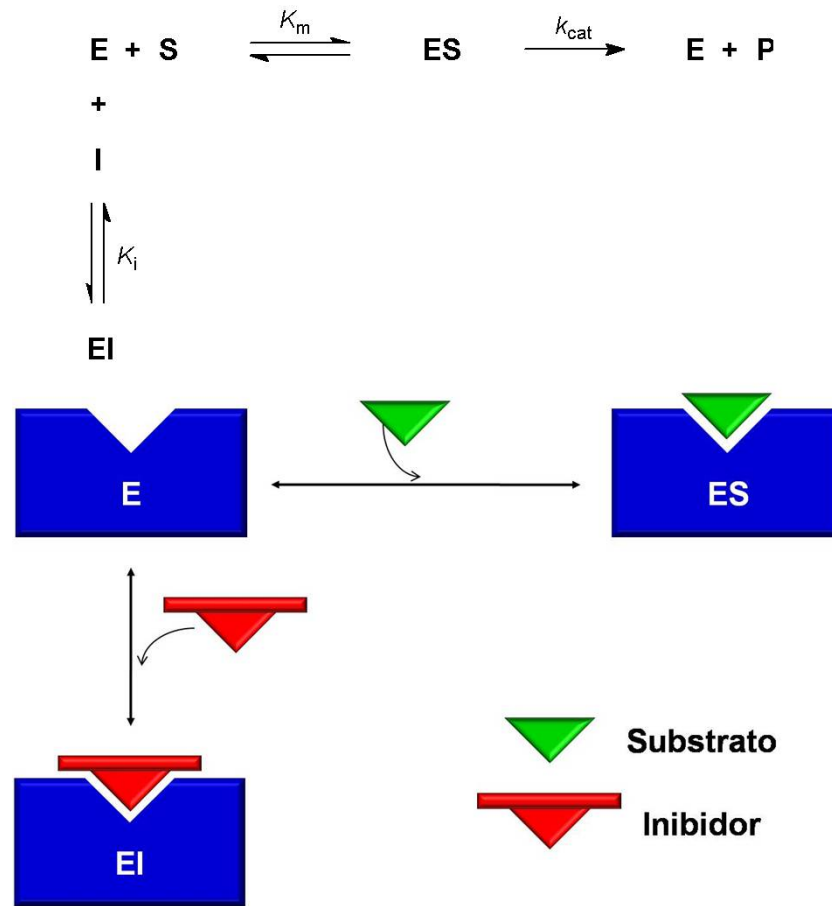


FIGURA 5.5 - Esquema clássico de inibidor competitivo, onde o inibidor se liga exclusivamente a enzima livre.

O perfil característico de um inibidor competitivo pode ser observado pelo gráfico de Lineweaver-Burk (ou duplo recíproco) (FIGURA 5.6). De acordo com o gráfico, variando a concentração de inibidor, as intersecções com o eixo y (valores recíprocos da velocidade de reação) fornecem valores de recíproco da velocidade máxima ($1/V_{max}$), que não se alteram na presença de inibidor competitivo. Por outro lado, as intersecções do gráfico com o eixo x (valores recíprocos da concentração de substrato) fornecem valores de recíproco do K_m aparente ($-1/K_M$), que aumentam com a elevação da concentração de um inibidor competitivo por um fator igual a $(1 + [I]/K_i)$. Esse efeito característico do modo de ação de inibidores competitivos ocorre uma vez que mais substrato é requerido para manter a metade da V_{max} . Os valores de V_{max} permanecem inalterados devido à capacidade do substrato (em condições de saturação) de deslocar totalmente o inibidor, já que competem pelo mesmo sítio da enzima (COPELAND, 2005).

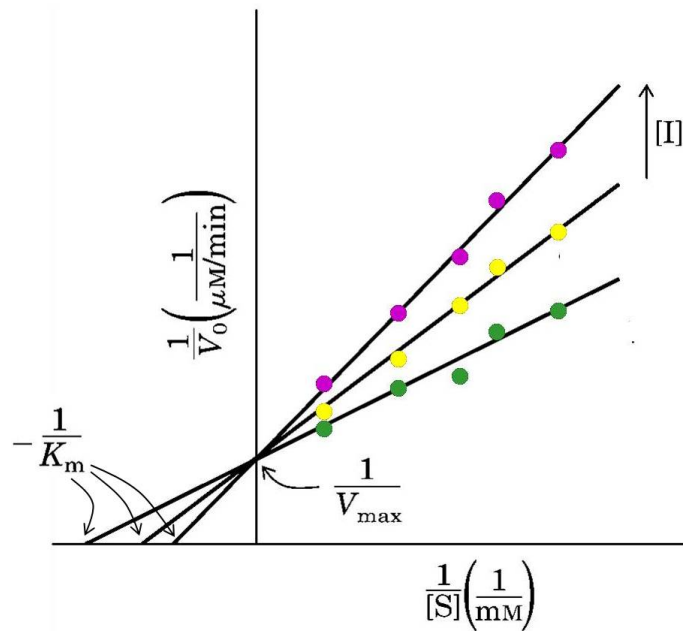


FIGURA 5.6 - Gráfico Lineweaver-Burk característico de um inibidor competitivo.

b) Inibidores não-competitivos: são inibidores que não se ligam ao sítio ativo da enzima e sim a outra região da enzima denominada sítio alostérico. Os inibidores não-competitivos podem se ligar à enzima livre para formar o complexo $E \bullet I$, ou então ao complexo enzima-substrato, para formar o complexo $E \bullet S \bullet I$, ambos cataliticamente inativos. Nos dois casos a ligação ao sítio alostérico induz mudanças conformacionais na estrutura da enzima, modificando assim a conformação do sítio ativo e impedindo a interação eficaz com o substrato (FIGURA 5.7).

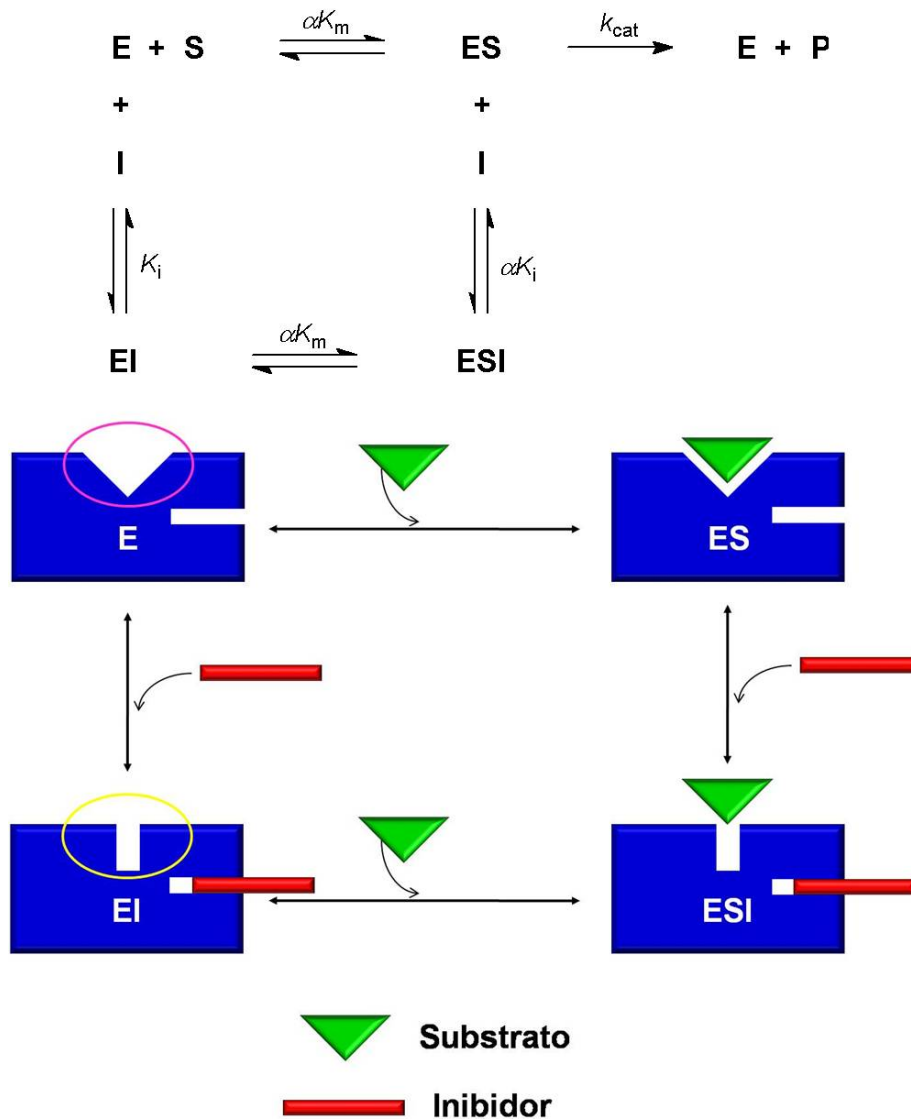


FIGURA 5.7 - Esquema clássico de inibidor não-competitivo, onde o inibidor se liga a enzima livre e ao complexo enzima-substrato.

Para inibidores não-competitivos o gráfico de Lineweaver-Burk apresenta redução de V_{max} (V_{max} aparente) por um fator igual a $(1 + [I]/K_i)$ (FIGURA 5.8). Isso pode ser explicado pelo fato de que V_{max} depende diretamente da concentração da enzima ativa, uma vez que parte da enzima livre encontra-se com a conformação modificada pelo inibidor, afetando de maneira proporcional a concentração da mesma. Desta forma o substrato não desloca o inibidor como ocorre no caso dos inibidores competitivos. O decréscimo nos valores de V_{max} se acentua com o aumento da concentração do inibidor.

Uma vez que inibidores desta categoria podem apresentar afinidades diferentes pela enzima livre e para o complexo E•S, é necessário expressar suas constantes de dissociação na forma de K_i (para a enzima livre) e αK_i (para o

complexo E•S). Se $\alpha = 1$, a afinidade do inibidor é idêntica tanto para a enzima livre como para o complexo E•S.

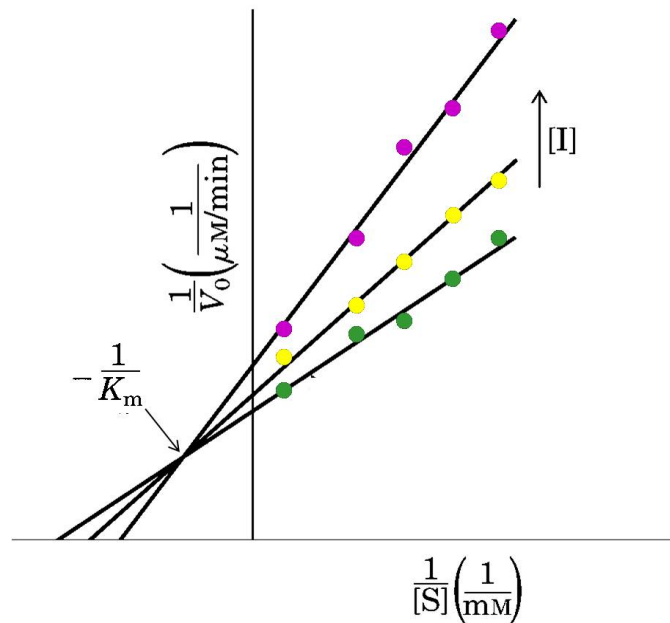


FIGURA 5.8 - Gráfico de Lineweaver-Burk característico de um inibidor não-competitivo.

c) Inibidores incompetitivos: são inibidores que se ligam exclusivamente ao complexo E•S e não possuem afinidade por qualquer sítio da enzima livre (FIGURA 5.9).

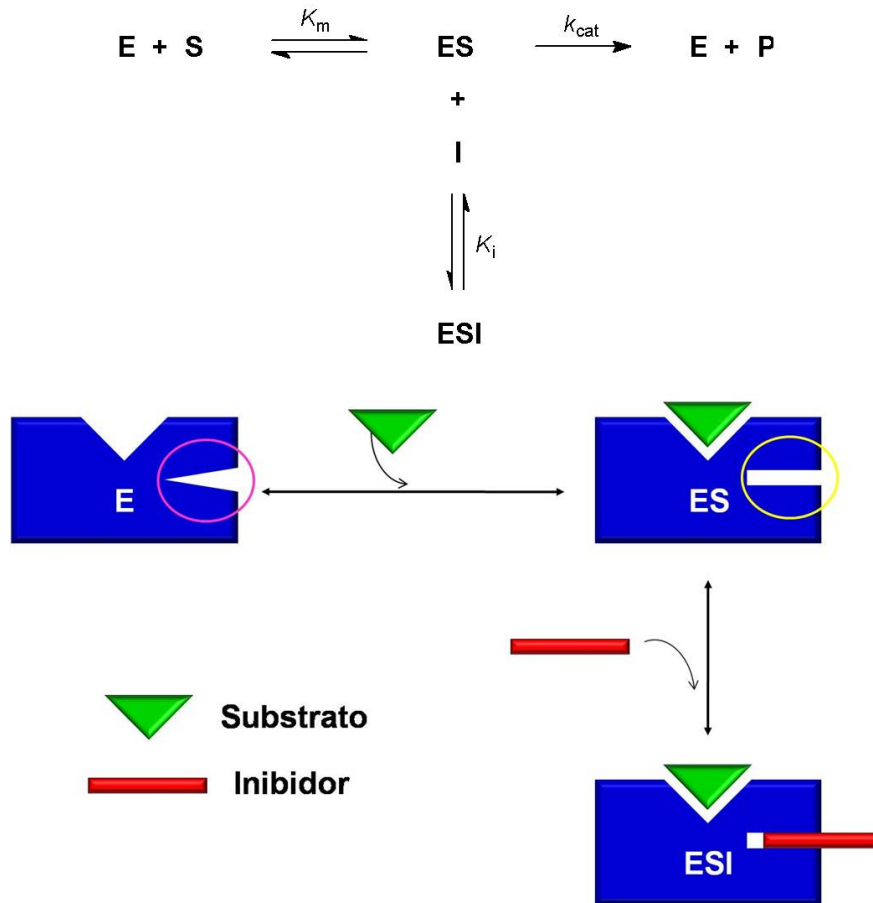


FIGURA 5.9 - Esquema clássico de inibidor incompetitivo, onde o inibidor se liga exclusivamente ao complexo enzima-substrato.

O complexo $E \cdot S \cdot I$ representa um ciclo termodinâmico entre as espécies $E \cdot S$, $E \cdot I$ e $E \cdot S \cdot I$, sendo este complexo cataliticamente inativo. O aumento da afinidade de um inibidor incompetitivo que acompanhe a formação do complexo $E \cdot S$ requer um balanço por um aumento igual da afinidade de substrato pelo complexo $E \cdot I$. Como consequência ocorre a diminuição nos valores aparentes de K_M e V_{max} , de acordo com o aumento da concentração de inibidor por um fator igual a $(1 + [I]/K_i)$ (FIGURA 5.10).

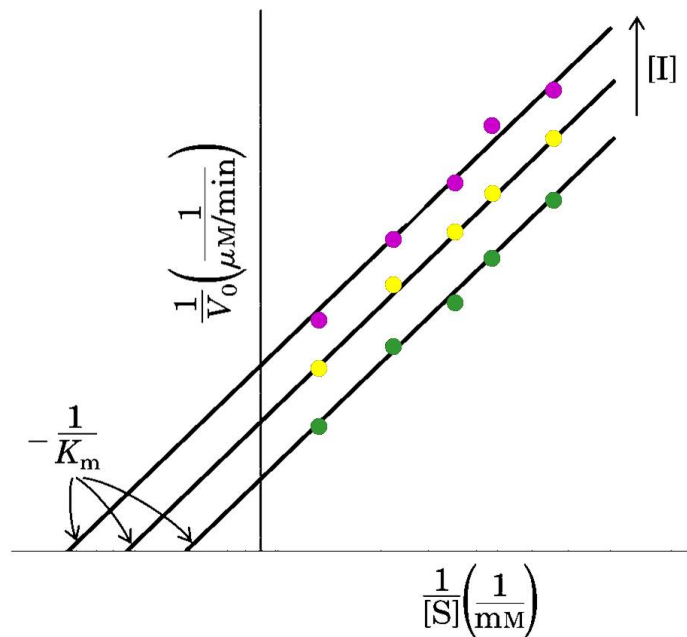


FIGURA 5.10 - Gráfico de Lineweaver-Burk característico de um inibidor incompetitivo.

O mecanismo de ação de inibidores enzimáticos é de extrema importância, pois permite o estabelecimento racional de estudos de modelagem molecular. A determinação do mecanismo de ação também fornece informações valiosas a respeito da afinidade do inibidor pela enzima-alvo, quantificada em termos da constante K_i , que se refere à dissociação do complexo enzima-inibidor.

5.4 - Inibidores de cisteíno peptidases

A maioria dos inibidores descritos interage com as cisteíno peptidases através de resíduos de aminoácidos em subsítios específicos que facilitam a ação dos grupos funcionais reativos com o grupo tiol do centro ativo. Um exemplo bem sucedido são os epóxidos peptídicos, potentes inibidores de cisteíno peptidases. O E-64, *L-trans*-epoxisuccinil-leucilamido(4-guanidino)butano (FIGURA 5.11), produzido pelo fungo *Aspergillus japonicus*, foi o primeiro destes compostos a ser isolado e caracterizado como inibidor irreversível específico para cisteíno peptidase, mas que não permite distinguir as várias enzimas desta classe. Esse composto é comumente utilizado para titulação do sítio ativo de várias destas enzimas (BARRETT *et al.*, 1982).

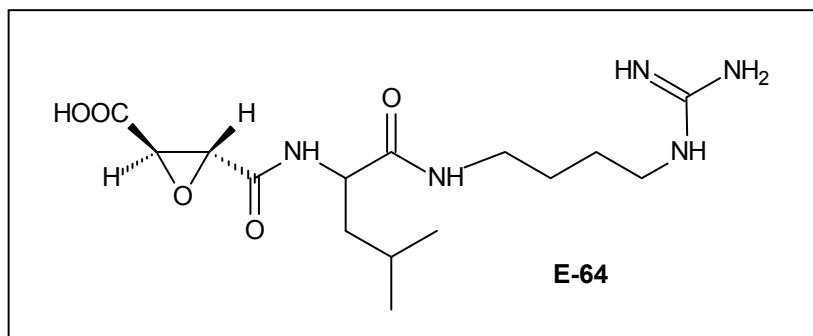


FIGURA 5.11 - Estrutura do inibidor irreversível específico de cisteíno peptidases, E-64.

Alguns análogos sintéticos ao E-64 mostraram-se eficientes inibidores para a papaína, catepsina L e B. Existem ainda vários tipos de inibidores derivados de peptídeos com grupos reativos na extremidade C-terminal que se ligam ao grupo tiol das cisteíno peptidases, como os peptidil-aldeídos, halometilcetonas, aciloximetilcetonas, diazometilcetonas, sais de peptidil-sulfonas, peptidil-vinilsulfonas, peptidil-nitrilas, N-peptidil-O-acilhidroxilaminas, entre outros. Apesar de potentes, estes inibidores são pouco seletivos e isto decorre da similaridade de especificidade dos subsítios em torno do centro de catálise dessas enzimas. Investigações estão sendo realizados na busca de inibidores específicos de cisteíno peptidases. Baseado no mecanismo de ação dessas enzimas, coleções de inibidores peptídicos e não peptídicos foram sintetizados, na tentativa de inibir a ação dessas enzimas (CUNHA *et al.*, 2005; YASUDA *et al.*, 2005; LIM *et al.*, 2004; ROBICHAUD *et al.*, 2003; SCHIRMEISTER & KAEPLER, 2003; BROMME & KALETA, 2002; LECAILLE *et al.*, 2002; OTTO & SCHIRMEISTER, 1997).

Tendo em vista a necessidade de investigação de novos inibidores potentes e seletivos para as catepsinas, estudos do extrato acetônico dos galhos e folhas de *Taxodium mucronatum* (Taxodiaceae) e do extrato metanólico das folhas de *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae) levaram ao isolamento de biflavonas (I - VI) com expressiva atividade inibitória frente às catepsinas B e K, sendo os valores de IC₅₀ determinados para catepsina B (FIGURA 5.12) (ZENG *et al.*, 2006).

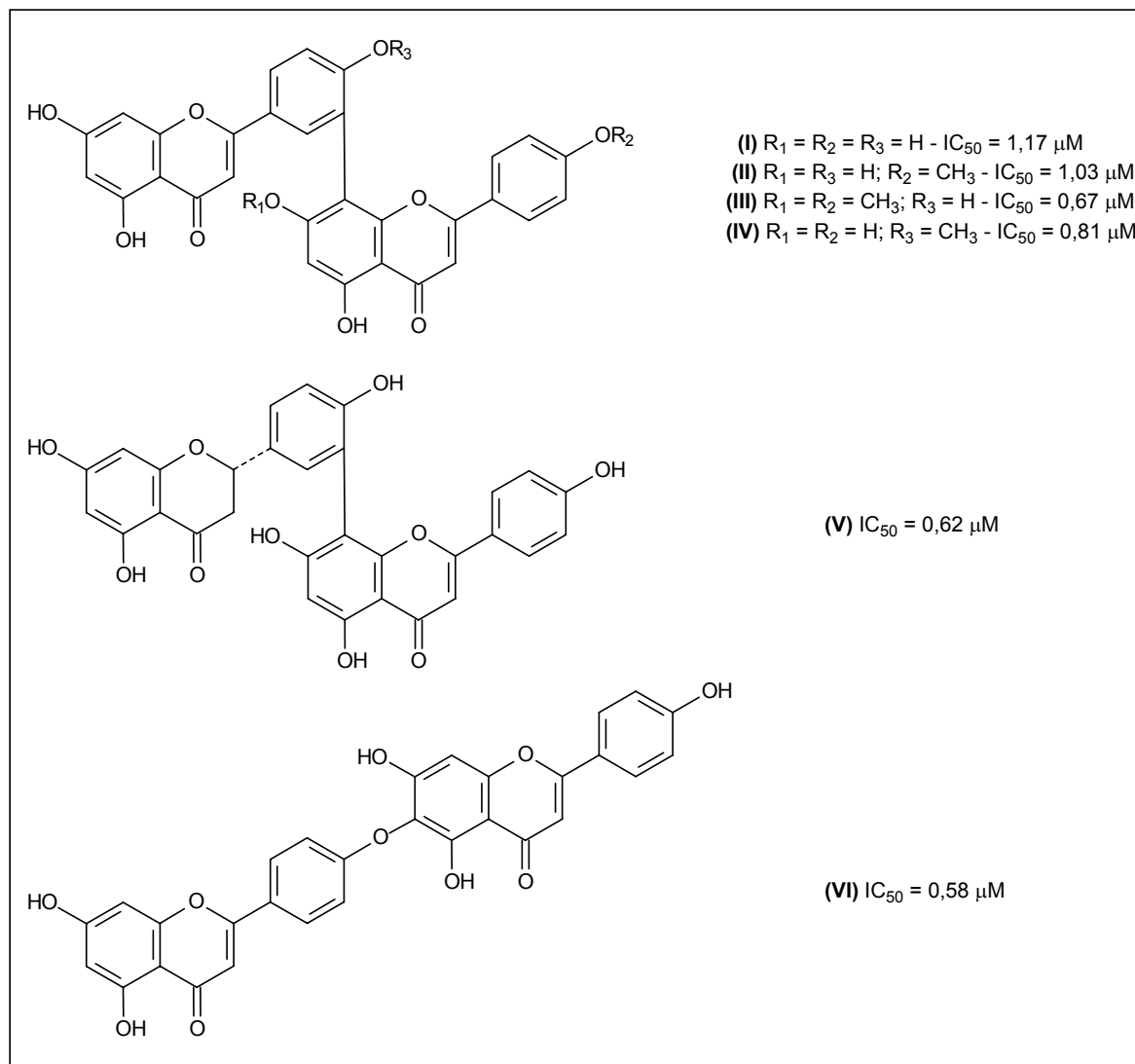


FIGURA 5.12 - Biflavonóides naturais inibidores das catepsinas B, com valores de IC_{50} determinados utilizando o substrato Z-FR-MCA.

Investigações realizadas com o extrato metanólico da esponja marinha *Theonella aff. mirabilis* levou ao isolamento de um peptídeo (VII) com moderada atividade biológica (FUSETANI *et al.*, 1999). Trabalhos realizados com o sobrenadante de uma espécie de *Pseudomonas* sp., também de origem marinha, propiciou o isolamento e identificação de ftalatos (VIII e IX) com atividade inibitória de ordem micromolar (HOANG *et al.*, 2008) (FIGURA 5.13).

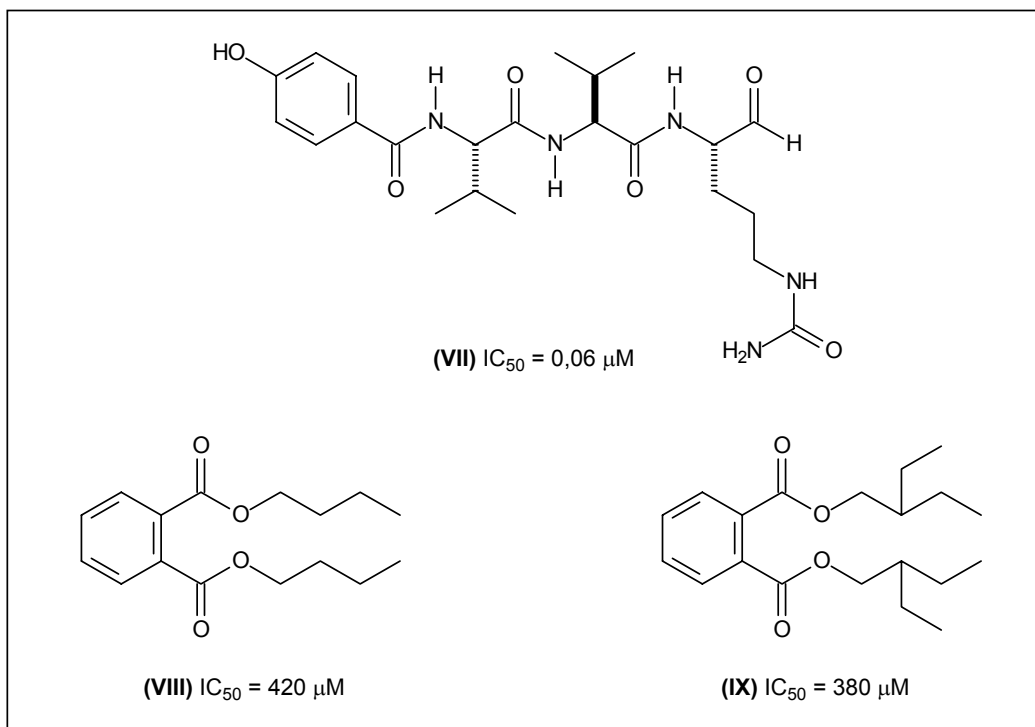


FIGURA 5.13 - Produtos naturais inibidores da catepsina B, com valores de IC_{50} determinados utilizando o substrato Z-RR-MCA.

Estudos dos extratos metanólicos de uma esponja pertencente à ordem Haplosclerida (PAL93-05) (PATIL *et al.*, 2002a) e do extrato metanólico/diclorometânico de *Artocarpus altilis* (Moraceae), levaram ao isolamento de flavonóides (X - XII) e alcalóide (XIII), respectivamente, com expressiva atividade frente à catepsina K (PATIL *et al.*, 2002b) (FIGURA 5.14).

A atividade das cisteíno peptidases da família papaína também é regulada por diversos inibidores endógenos protéicos naturais, entre os quais se destacam as cistatinas e as serpinas (TURK *et al.*, 2002).

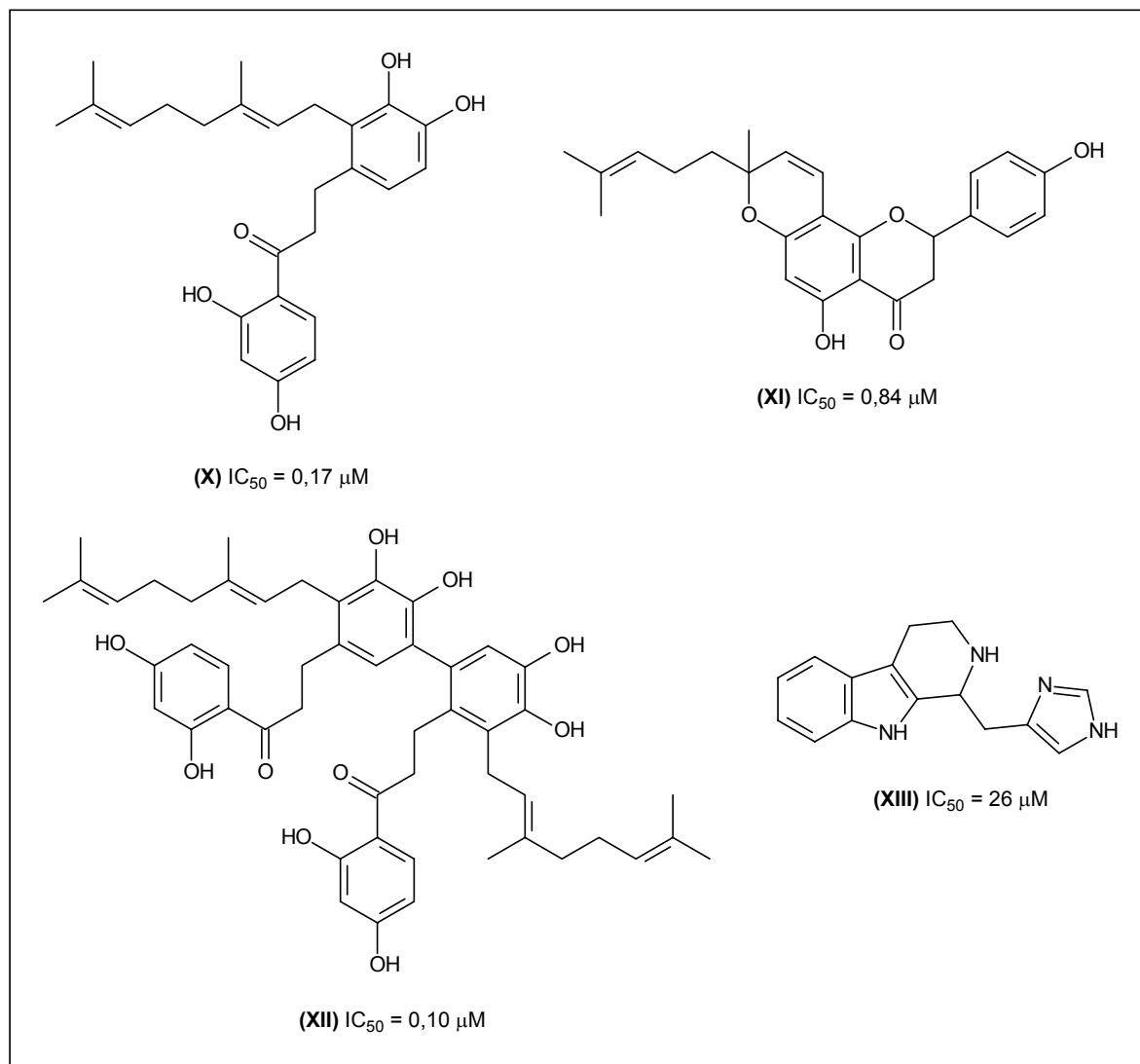


FIGURA 5.14 - Produtos naturais inibidores da catepsina K, com valores de IC_{50} determinados utilizando o substrato Z-FR-MCA.

5.5 - Estudos de docagem molecular e modelos de interação

Uma dificuldade freqüentemente encontrada durante as etapas de planejamento e otimização de compostos com atividade biológica é a definição da conformação bioativa da molécula em estudo (KLEBE, 2006; KITCHEN *et al.*, 2004).

Na ausência de estruturas cristalográficas ou ressonância magnética nuclear que permitam a determinação do modo de interação entre o ligante e o sítio de ligação da macromolécula, os estudos de modelagem molecular são alternativas bastante úteis para a geração de modelos de interação que permitam identificar a conformação bioativa da molécula do ligante (KITCHEN *et al.*, 2004).

Devido ao rápido avanço na área estrutural e de biologia molecular, as técnicas de desenvolvimento de moléculas bioativas baseadas na estrutura do receptor têm assumido grande importância. Baseado na capacidade dos programas de docagem molecular predizerem, com certo intervalo de confiança, o modo de interação entre o ligante e o alvo molecular, vários estudos utilizando esse método vêm sendo amplamente empregados para a identificação da conformação bioativa de moléculas e elucidação do mecanismo de ação (KLEBE, 2006; KITCHEN *et al.*, 2004).

Basicamente, os programas de docagem molecular realizam o acoplamento da molécula do ligante dentro do sítio de ligação da macromolécula de interesse. Para isso, o processo de docagem molecular é dividido em duas etapas principais:

- geração de todos os complexos possíveis entre a molécula do ligante e a macromolécula (amostragem);
- identificação dentre os complexos gerados daquele que poderia corresponder ao complexo real (pontuação e seleção).

Assim, para realizar essas etapas os programas utilizam diferentes funções de busca e diferentes funções de pontuação. Neste trabalho foram empregados dois programas de docagem molecular: FlexX (RAREY *et al.*, 1996) e GOLD 3.1 (JONES *et al.*, 1997). Esses programas apresentam métodos distintos de amostragem e pontuação para a identificação das conformações bioativas das moléculas em estudo.

O programa FlexX, disponível na plataforma SYBYL 7.3 (SYBYL, 2004), é um método de docagem molecular automático de ligantes nos sítios de ligação de proteínas. Este programa associa um método eficiente de amostragem do espaço conformacional da molécula do ligante, algoritmo de construção incremental, com um método robusto para o cálculo da energia de interação, baseado na função de pontuação de Böhm (RAREY *et al.*, 1996; RAREY *et al.*, 1997). Já o programa GOLD 3.1 utiliza o algoritmo genético para explorar a flexibilidade conformacional da molécula do ligante, além disso, atribui a uma flexibilidade parcial da molécula da proteína. Durante a etapa de pontuação e seleção, este programa emprega uma função baseada em mecânica molecular para a identificação das conformações bioativas.

PARTE II
Objetivos

6 - OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade de metabólitos secundários de plantas e alguns derivados sintéticos, buscando inibidores específicos das catepsinas K, V, L e S, usando como ferramenta o substrato com apagamento intramolecular de fluorescência Z-FR-MCA. Para isto é necessário:

- Padronizar e validar os ensaios bioquímicos utilizando produtos naturais como candidatos a inibidores;
- Realizar triagem bioquímica, identificação e seleção de inibidores das catepsinas K, V, L e S;
- Aplicar a metodologia desenvolvida em fluorímetro de cubeta para placa de ELISA (96 poços);
- Utilizar enzimas recombinantes humanas (não comercial);
- Determinar a potência (IC_{50}) dos inibidores mais promissores, assim como o mecanismo de ação e suas constantes de afinidade (K_i);
- Estudar as interações intermoleculares de complexos enzima-inibidor através de modelagem molecular.

PARTE II
Procedimento
Experimental

7 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

7.1 - Equipamentos e Materiais

7.1.1 - Espectrofluorímetros

- **Leitor de cubeta:** marca Perkin Elmer, modelo Luminescence Spectrometer -LS 50 B; marca Hitachi, modelos F-2500 e F-2000.
- **Leitor de placa de ELISA:** Molecular Devices Corporation – Spectra MAX GEMINI XS.

7.1.2 - Solventes e reagentes

- Os reagentes e solventes de grau analítico (P.A), foram adquiridos da Aldrich, Sigma e Merck.
- Inibidor irreversível específico de cisteíno peptidase E-64 [L-3-carboxi-trans-2,3-epoxipropionil-leucilamido(4-guanino)butano] e DTE (ditioeritritol) foram obtidos da Sigma.
- O substrato Z-FR-MCA (Cbz-Phe-Arg-MCA ou carbobenzoxi-fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina ou benziloxicarbonil-fenilalanina-arginina-4-metil-7-coumarilamida) foram adquiridos da empresa Bachem Inc e Sigma.

7.1.3 - Enzimas estudadas

As catepsinas K, V, L e S recombinantes humanas foram expressas em *Pichia pastoris* de acordo com a metodologia descrita previamente por Linnevers e cols. (1997) e gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Dieter Brömme, da University of British Columbia, Vancouver, Canadá. A concentração molar das enzimas foi determinada por titulação do sítio ativo com E-64 [L-trans-epoxisuccinil-leucilamida-(4-guanidino)-butano], de acordo com o procedimento descrito por Barrett e cols. (BARRETT *et al.*, 1982). Estas enzimas foram estocadas em soluções contendo 0,01% de Tween 20 (v/v) para melhorar a estabilidade das enzimas durante os ensaios.

7.2 - Padronização e validação dos ensaios cinéticos

Os ensaios cinéticos das catepsinas K, V, L e S foram desenvolvidos com base nos ensaios reportados na literatura (OTTO *et al.*, 1997; LECAILLE *et al.*, 2002; SCHIRMEISTER & KAEPLER, 2003).

7.2.1 - Determinação dos parâmetros cinéticos para hidrólise do substrato Z-FR-MCA pelas catepsinas K, V, L e S

Nos ensaios cinéticos das catepsinas K, V e L foi usado o tampão acetato de sódio 100 mM, com 5 mM de EDTA, pH 5,5. Para a catepsina S usou-se o tampão fosfato de sódio 100 mM, com 1 mM de EDTA, pH 6,5. As enzimas foram utilizadas na concentração estimada de 3 nM, sendo estas pré-ativadas com DTE 5,0 mM durante 5 minutos, a 27 °C.

As concentrações das enzimas para a determinação das velocidades iniciais foram escolhidas de modo que a hidrólise do substrato não fosse superior a 5%. Os valores de fluorescência obtidos foram convertidos para $\mu\text{M}/\text{min}$ usando uma curva de calibração determinada através da hidrólise total do substrato.

Considerando que os compostos avaliados estavam dissolvidos em DMSO, foi necessário determinar as condições ideais onde o solvente utilizado não afetasse significativamente a atividade da enzima.

7.2.2 - Metodologia e condições gerais dos ensaios cinéticos em cubeta e placa de ELISA

A determinação da atividade enzimática foi monitorada pela hidrólise do substrato fluorogênico Z-FR-MCA, monitorada continuamente pelo aumento de fluorescência. Os experimentos foram feitos inicialmente em cubeta de quartzo e posteriormente em placa de ELISA.

- **Cubeta de quartzo:** utilizou-se cubetas com volume de 500 e 1000 μL , mantidas em compartimento termostatizado, sendo a fluorescência detectada em espectrofluorímetro com fenda de excitação ajustada para $\lambda_{\text{ex}}=380$ nm e

emissão $\lambda_{em}=460$ nm. Para a padronização e validação dos ensaios, as medidas de atividade das enzimas foram inicialmente realizadas a 37 e 27 °C.

- **Placa de ELISA:** foram utilizadas placas de 96 poços, com volume de 300 μ L/poço, coloração preta e fundo plano, mantidas em compartimento termostaticado a 27 °C, sendo a fluorescência detectada em espectrofluorímetro com fenda de excitação ajustada para $\lambda_{ex}=380$ nm e emissão $\lambda_{em}=460$ nm.

A metodologia geral utilizada nos ensaios está esquematizada na FIGURA 7.1. As condições experimentais foram as mesmas tanto para as medidas realizadas em cubeta quanto em placa de ELISA. As medidas realizadas no espectrofluorímetro de cubeta foram importantes para otimizar as condições utilizadas na placa de ELISA.

As enzimas foram pré-ativadas com DTE por 5 minutos e posteriormente pré-incubadas por mais 5 minutos com as amostras a serem testadas. No caso do controle negativo utilizou-se DMSO e no controle positivo E-64 (10 μ M), também dissolvido em DMSO. A determinação da atividade enzimática foi feita através do monitoramento contínuo e direto da hidrólise do substrato fluorogênico Z-FR-MCA durante 300 segundos.

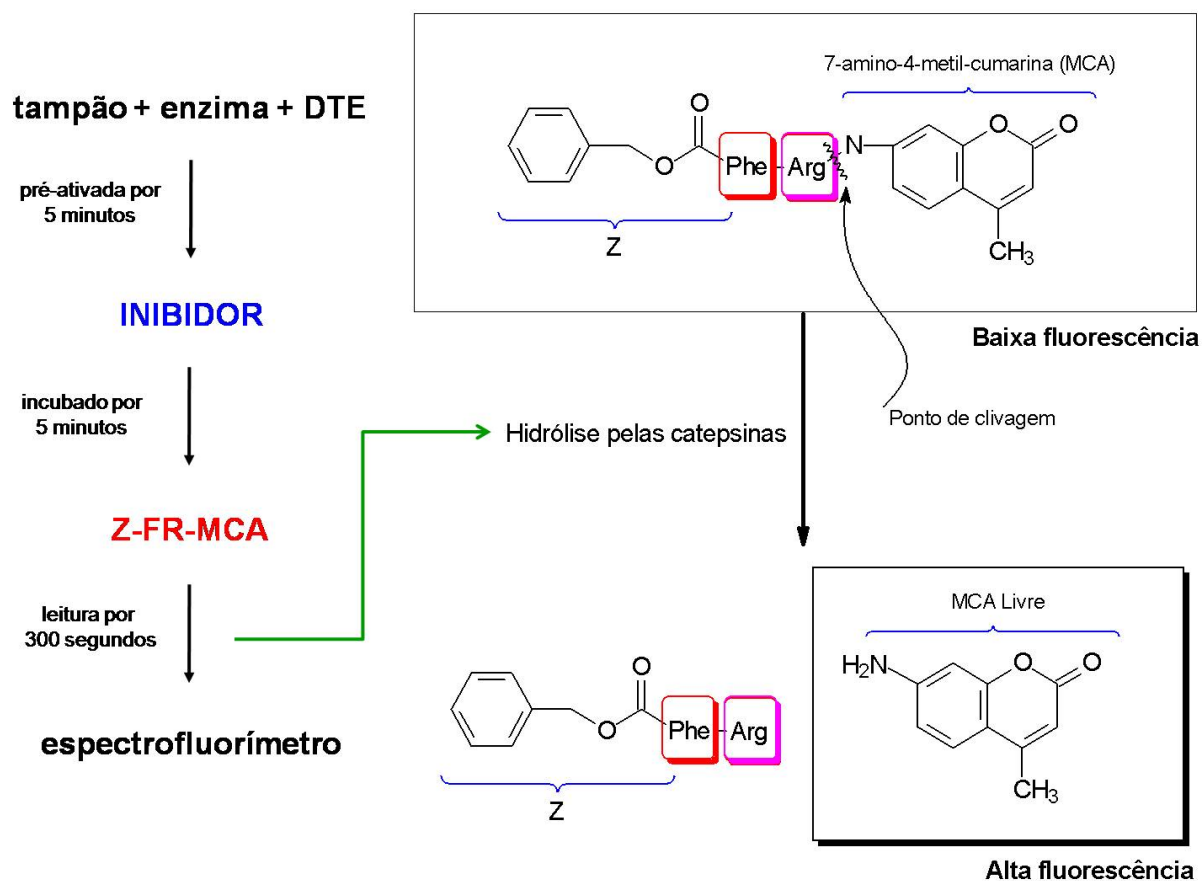


FIGURA 7.1 - Esquema geral dos ensaios enzimáticos com o substrato fluorogênico Z-FR-MCA, mostrando o ponto de clivagem pelas catepsinas.

7.2.3 - Determinação experimental do valor de K_m

A concentração do substrato a ser utilizada foi selecionada após a determinação experimental do valor de K_m para o Z-FR-MCA frente a cada uma das catepsinas. Para isto, realizaram-se medidas de velocidade da reação utilizando diferentes concentrações de substrato, até que se atingisse um claro grau de saturação, ou seja, onde o aumento da concentração de substrato não produzisse mais mudanças significativas na velocidade da reação. A determinação do valor de K_m foi feito através do método de regressão não-linear de melhor ajuste, sendo os valores experimentais comparados com os valores já descritos na literatura (valores utilizados como referência).

7.2.4 - Triagem, identificação e seleção de inibidores das enzimas estudadas

Inicialmente realizou-se uma triagem bioquímica para identificação de moléculas capazes de inibir a atividade das catpsinas K, V, L e S. Todos os compostos foram avaliados em triplicada e em dose única padrão de 25 μ M. A comparação da atividade enzimática na ausência e na presença do inibidor forneceu o percentual de inibição que foi calculado pela equação 1.

$$\% \text{ Inibição} = 100 \times (1 - V_i/V_0) \quad (1)$$

Sendo, V_i a velocidade de reação observada na presença de inibidor e V_0 a velocidade de reação observada na ausência do inibidor (velocidade de controle).

Realizada a triagem inicial, os compostos que apresentaram inibição significativa (superior a 50%) frente à catepsina V foram selecionados para a etapa posterior de determinação dos valores de IC_{50} .

7.2.5 - Determinação da potência dos inibidores (IC_{50}) frente à catepsina V

O valor de IC_{50} é definido pela concentração de inibidor responsável por provocar uma queda de 50% na atividade da enzima. O valor de 50% é apenas uma convenção criada com o objetivo de se comparar valores de potência de inibidores entre si.

A determinação da potência (IC_{50}) dos compostos selecionados foi realizada de maneira direta empregando-se o ensaio cinético padronizado durante o desenvolvimento deste trabalho.

Para calcular os valores de IC_{50} utilizou-se os dados de inibição de cada composto, quando testados a uma única concentração (25 μ M). Desta forma, determinou-se a porcentagem de inibição utilizando dez diferentes concentrações de inibidor. Nesta etapa, procurou-se explorar valores de inibição no intervalo de 15 a 90%, construindo assim uma curva concentração x resposta. Os valores de IC_{50} foram determinados através do método de regressão não-linear de melhor ajuste empregando o programa de SigmaPlot 9.0. Uma curva característica cinética

empregada na determinação do valor de IC_{50} está sendo representada na FIGURA 7.2.

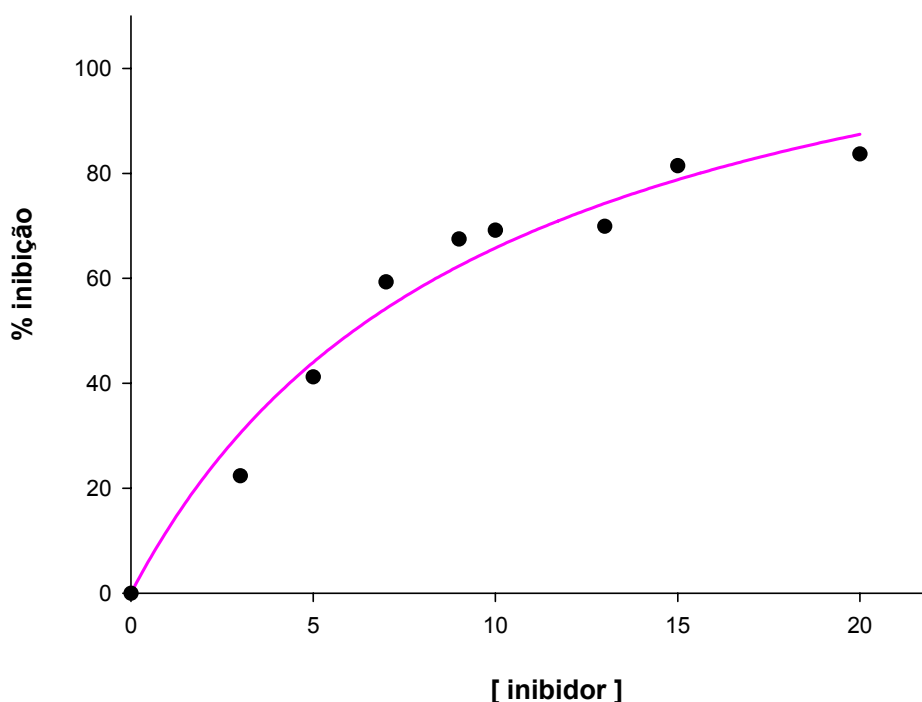


FIGURA 7.2 - Curva ilustrativa utilizada na determinação dos valores de IC_{50} pelo método de regressão não-linear de melhor ajuste dos dados cinéticos coletado experimentalmente.

7.2.6 - Determinação do mecanismo de ação e afinidade (K_i) dos inibidores frente à catepsina V

Após determinados os valores de IC_{50} os compostos mais ativos foram submetidos aos ensaios cinéticos para determinação do mecanismo de ação e conseqüentemente obtenção do valor de K_i .

Os estudos dos mecanismos de ação dos inibidores envolveram a coleta experimental de dados e o tratamento adequado usando o método de Lineweaver-Burk. O método experimental consistiu em medir a velocidade de reação em ausência de inibidor e com três diferentes concentrações de inibidor, em pelo menos cinco concentrações de substrato. A escolha das concentrações de inibidor é feita com base no valor de IC_{50} , optando-se inicialmente pelas concentrações de metade e o dobro do valor de IC_{50} . Considerando o valor de K_m do substrato Z-FR-MCA frente à catepsina V ($K_m = 6,4 \mu M$), as concentrações de substrato utilizadas nesta fase do trabalho foram: 1,6, 3,2, 6,4, 9,6, 12,8, 19 e 38 μM . Os dados

coletados deram origem a gráficos de duplo-recíproco e através do padrão de intersecção das curvas no plano de coordenadas cartesianas, foi possível determinar o mecanismo de ação.

Com os mesmos dados foi possível também determinar a constante de dissociação do complexo E•I (K_i), através de um gráfico da razão entre K_m aparente e V_{max} observados em função da concentração de inibidor. Esta constante é dada pelo módulo do valor numérico da intersecção da curva no eixo x (FIGURA 7.3).

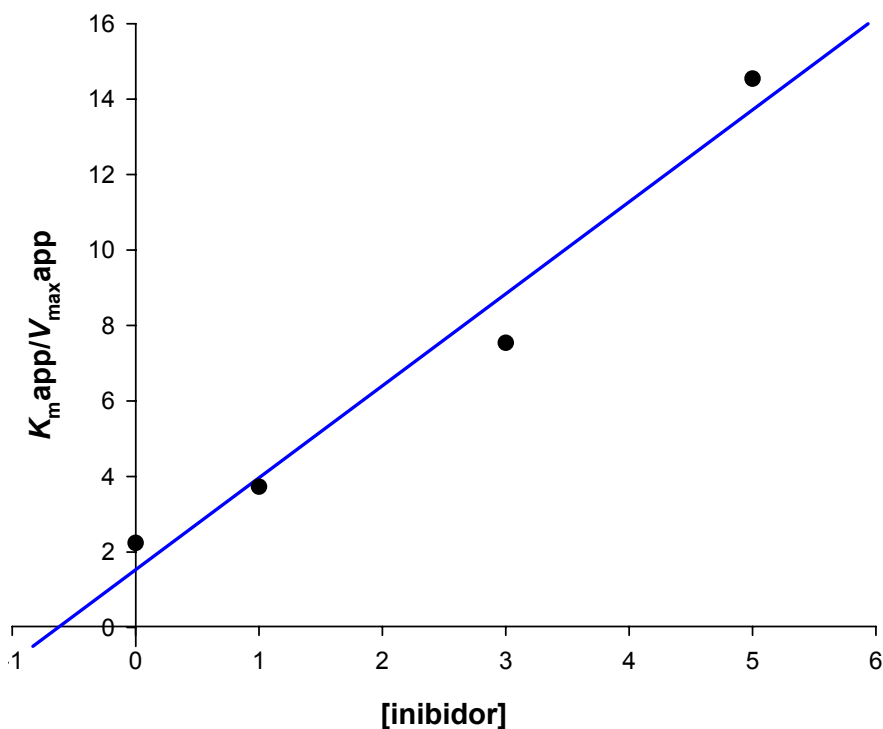


FIGURA 7.3 - Gráfico padrão utilizado na determinação da constante K_i .

7.3 - Modelagem molecular dos inibidores da catepsina V

Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo, pertencente ao Instituto de Física de São Carlos – IFSC / USP. Os estudos de modelagem molecular foram feitos através do emprego de dois programas de docagem molecular: FlexX e GOLD 3.1, sendo a inspeção visual realizada no programa Pymol.

PARTE II
Resultados
e Discussões

8 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

A importância do estudo de cisteíno peptidases lisossomais está baseada nos processos patológicos aos quais elas estão envolvidas e a dificuldade de se encontrar inibidores específicos, visto a similaridade estrutural que elas apresentam. Essas enzimas também são de grande interesse das indústrias farmacêuticas, pois estão diretamente associadas a muitas doenças do século XXI e são consideradas potenciais alvos no desenvolvimento de fármacos, pelo fato de suas estruturas tridimensionais já terem sido determinadas (SOMOZA *et al.*, 2000; LECAILE *et al.*, 2002).

Considerando a grande diversidade de produtos naturais existente em nosso laboratório, foram selecionados inicialmente vinte compostos de diferentes classes que foram avaliados em diversas enzimas: (i) cisteíno peptidases (papaína, xylellaina, cruzaína, falcipapaína-2, catepsinas B, L, K, S e X); (ii) metalo peptidase (ECA - enzima conversora da angiotensina), oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi* (OP-Tc) e oligopeptidase de *T. brucei* (OP-Tb); (iii) serino peptidase (quimotripsina).

Através destas análises preliminares, foi possível observar que os produtos naturais avaliados mostraram-se potenciais inibidores de cisteíno peptidases, sendo esta classe de enzimas selecionada para estudo.

Na busca de inibidores específicos de cisteíno peptidases, foram selecionadas quatro catepsinas lisossomais: K, V, L e S. Estas enzimas foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Dieter Brömme da University of British Columbia, Vancouver, Canadá.

Para a realização deste estudo, desenvolveu-se uma metodologia capaz de avaliar um grande número de compostos, utilizando pequena quantidade de amostra. Para isto, foi necessário determinar as condições ideais para que solvente utilizado (DMSO) não afetasse significativamente a atividade da enzima e dissolvesse totalmente as amostras a serem testadas. Depois disto determinaram-se as condições cinéticas favoráveis para a quantificação dos resultados.

Na parte inicial do trabalho foi utilizado num espectrofluorímetro de cubeta com volume final de 1000 µL. Após determinadas as condições ideais de trabalho para cada uma das enzimas, a metodologia foi adaptada para um espectrofluorímetro de placa de ELISA, trabalhando com placas pretas de 96 poços

com volume final de 200 μL por poço. Depois de validado o método em espectrofluorímetro de placa, iniciou-se a avaliação dos possíveis inibidores.

Os compostos a serem testados foram preparados em soluções estoque de 10 e 1 mM. O substrato utilizado foi o Z-FR-MCA, pelo fato das catepsinas estudadas possuírem uma boa afinidade por este substrato e já possuírem seus K_m determinados.

8.1 - Otimizações das condições de ensaio em espectrofluorímetro de cubeta

A metodologia para os testes de inibição foi desenvolvida em um espectrofluorímetro de cubeta, com volume final de 1000 μL . As catepsinas K, V, L e S recombinantes foram obtidas e estocadas numa temperatura de $-80\text{ }^\circ\text{C}$ em soluções estoques com diferentes concentrações molares.

As concentrações molares dessas enzimas foram determinadas pela titulação do sítio catalítico com o inibidor E-64 de acordo com metodologia descrita por Barrett e colaboradores (BARRET *et al.*, 1982). Depois de tituladas, as concentrações molares foram convertidas para concentração molar por unidade de *slope* (TABELA 8.1). Isso só foi possível porque o espectrofluorímetro foi calibrado anteriormente com soluções padrões de MCA livre. O trabalho foi desenvolvido inicialmente utilizando a catepsina K, que depois de titulada com E-64, apresentou concentração molar de 92 μM . Para determinar a correlação de *slope* x concentração molar, diluiu-se a enzima 100 vezes no tampão adequado e determinou-se a velocidade de hidrólise do substrato Z-FR-MCA em ausência de inibidor, por um período onde não houvesse consumo superior a 5% do substrato (300 segundos). Essas condições garantiram que a enzima não estivesse saturada pelo substrato e que a velocidade era inferior a V_{max} . Foi possível correlacionar o valor de *slope* adquirido, com a concentração da enzima em estoque. O mesmo procedimento foi adotado para as catepsinas V, L e S. Com isto, a concentração molar de enzima utilizada em cada teste foi monitorada pela velocidade de hidrólise do substrato, ou seja, estabeleceu-se o valor de *slope* “ótimo” para trabalhar com cada uma e com isto estimou-se a concentração molar de cada uma delas, para não haver a necessidade de titulações diárias. Para dar seqüência ao desenvolvimento do protocolo dos ensaios cinéticos, realizou-se também a determinação experimental do valor de K_m para o Z-FR-MCA frente às catepsinas K, V, L e S.

TABELA 8.1 - Dados utilizados no desenvolvimento da metodologia de triagem de inibidores.

Enzima	Titulação _{Z-FR-MCA} (pmol/unidade de <i>slope</i>)	K_m _{Z-FR-MCA} (μM) experimental	K_m _{Z-FR-MCA} (μM) literatura
Catepsina K	0,18	8,2	7,5 (BRÖMME <i>et al.</i> , 1996a)
Catepsina V	0,06	6,2	6,4 (BRÖMME <i>et al.</i> , 1999)
Catepsina L	0,07	3,1	2,4 (MASON, <i>et al.</i> , 1985)
Catepsina S	0,36	17,8	18,2 (BRÖMME <i>et al.</i> , 1996b)

Para um melhor controle das variáveis envolvidas neste ensaio, optou-se em trabalhar primeiramente com as catepsinas K, V e L, pois todas elas utilizam o mesmo tampão e a concentração molar de substrato pôde ser mantida constante (10 μM), visto o K_m que elas apresentam para o Z-FR-MCA. Pelo fato da catepsina S possuir um valor de K_m para Z-FR-MCA muito superior (18,2 μM) aos valores de K_m das demais catepsinas estudadas, a concentração de substrato utilizada para os ensaios com esta enzima foi de 20 μM .

Posteriormente, foi avaliado o volume de DMSO a ser utilizado, sem que interferisse na atividade da enzima. Segundo a literatura (BEYNON & BOND, 1990), quando se trabalha com avaliação de inibidores, o volume total de solvente não deve ultrapassar 5% do volume final do ensaio. Conseguiu-se estabelecer total solubilidade dos inibidores no meio reacional utilizando 2,5% de volume de DMSO. Esta concentração de solvente não interferiu significativamente na atividade da enzima. Com isto, a triagem inicial dos candidatos a inibidores foi feita com a concentração de 25 μM .

8.2 - Adaptações da metodologia de ensaio para espectrofluorímetro de placa de ELISA

Depois de determinadas as condições no espectrofluorímetro de cubeta, foi possível desenvolver a metodologia para o espectrofluorímetro de placa de ELISA, onde o volume final para cada poço foi de 200 μL . Antes da avaliação dos inibidores, foi necessário avaliar as condições do controle positivo e negativo para validar o teste, uma vez que na placa se trabalha com um volume 5 vezes menor

que na cubeta. Com o auxílio do *software* do espectrofluorímetro foi possível checar o coeficiente de correlação dos pontos das curvas de velocidade para cada um dos poços e saber se a velocidade de hidrólise estava dentro da faixa de linearidade da atividade da enzima. A leitura foi feita durante 300 segundos, sendo adquirido um ponto a cada 30 segundos. No final de 300 segundos obteve-se uma curva de 10 pontos para cada poço. O experimento foi realizado com agitação constante durante toda leitura, com temperatura a 27 °C.

Algumas considerações foram necessárias para o desenvolvimento da metodologia em espectrofluorímetro de placa. Considerando que a placa possui 96 poços e que todas as medidas foram realizadas em triplicata, foi possível avaliar 30 compostos por placa, realizando ainda o controle positivo e negativo. Como estratégia inicial de trabalho, optou-se em realizar a triagem dos compostos na concentração de 25 µM/poço.

Inicialmente foi preenchido cada poço da placa com 5 µL de inibidor com solução estoque 1 mM (em triplicata) e 5 µL de DMSO nos poços controle negativo. Em seguida adicionou-se o **MIX 1** (enzima em tampão pré-ativada por 5 minutos). Deixou-se a enzima pré-incubada por mais 5 minutos em presença dos compostos a serem testados e do DMSO no poço controle. Posteriormente, com o auxílio de uma pipeta multicanal, adicionou-se o **MIX 2** (substrato diluído em tampão). A pipetagem total da placa foi feita em tempo inferior a 1 minuto e imediatamente realizou-se a leitura da hidrólise do substrato.

Finalizada a leitura (300 segundos), os gráficos de hidrólise de cada poço foram avaliados um a um quanto às suas linearidades. Com o auxílio do *software* do espectrofluorímetro foi possível calcular o coeficiente angular de cada reta, sendo este valor a velocidade de hidrólise do substrato (V). Para o controle negativo essa velocidade foi a máxima atividade da enzima, determinada como V_0 e na presença dos compostos a serem testados foi determinada como V_i .

Considerando que os testes foram feitos em triplicata, calculou-se a média das medidas e com isto obteve-se um valor de velocidade para cada composto avaliado (V_i).

Depois de obtidos os valores de velocidade para o controle (V_0) e para os possíveis inibidores (V_i), foram realizados os tratamentos dos dados determinando assim a porcentagem de inibição para cada composto frente às diferentes enzimas (catepsinas K, V, L e S).

8.3 - Considerações gerais sobre os parâmetros cinéticos

Há vários métodos para se determinar os parâmetros cinéticos de uma reação enzimática. Para valores de $[S]$ bastante elevados a velocidade inicial (V_0) aproxima-se assintoticamente da velocidade máxima (V_{\max}). Nesse estágio, tem-se uma elevada concentração de substrato na qual a enzima está saturada, isto é, ela está inteiramente na forma de complexo enzima-substrato $[E \bullet S]$. No entanto, na prática, é muito difícil determinar V_{\max} com precisão a partir de gráficos de V_0 versus $[S]$, porque mesmo para concentrações de substratos tão altas quanto $[S] = 10 K_m$, V_0 é somente 91% da V_{\max} , de modo que o valor de V_{\max} será certamente subestimado.

O valor de K_m é uma medida relativa de afinidade da formação do complexo $E \bullet S$ em condições do estado estacionário, que se caracteriza pela alta concentração do mesmo quando comparado com a espécie E (enzima livre). O K_m determina a concentração de substrato na qual a velocidade da reação corresponde à metade da velocidade máxima, ou seja, representa metade dos sítios ativos da enzima saturado. É, portanto uma medida de afinidade da enzima pelo seu substrato, sendo este único para cada par $E \bullet S$, e totalmente dependente da temperatura e do pH do meio.

Nestes ensaios de inibição, a concentração da enzima para determinação das velocidades foi mantida de modo que a hidrólise do substrato não ultrapassasse 5%, ou seja, durante os 300 segundos de leitura garantiu-se a condição de “excesso” de substrato.

Tipicamente esses inibidores naturais ou sintéticos imitam um substrato e com isso pode-se determinar a constante de afinidade entre inibidor e enzima (K_i). Considerando que bons inibidores tenham constante cinética de afinidade (K_i e valores de *turnover* para inibidores reversíveis), essas constantes são várias ordens de magnitude inferiores àquelas apresentadas pelos substratos (K_m). Isso significa que, inibidores enzimáticos competem com substrato e muitos são ligantes extremamente fortes (*tight-binding*). Portanto, inibidores *tight-binding* não podem ser avaliados por tratamentos gráficos usuais, baseados na equação de Michaelis-Menten.

A mais importante consideração nesses casos é a de que a concentração total do inibidor não é significativamente diminuída pela forte interação

da enzima com o inibidor. De fato, muitos inibidores formam essencialmente complexos irreversíveis com as enzimas.

Inibidores irreversíveis ou *tight-binding* diminuem o número de sítios ativos disponíveis para o substrato, conseqüentemente, quando a reação é analisada com tratamentos usuais, aparecem agindo como inibidores não competitivos, sendo que de fato seus mecanismos são estritamente competitivos com o substrato. Mas estes tipos de inibidores não são o foco deste trabalho.

8.4 - Considerações gerais para avaliação da coleção de possíveis inibidores naturais e derivados sintéticos

A hidrólise do substrato fluorogênico foi monitorada pelo aumento da fluorescência detectada com fenda de excitação ajustada para λ_{ex} 380 nm e emissão λ_{em} 460 nm. O aumento da fluorescência devido à hidrólise do substrato foi continuamente registrado por 300 segundos. A leitura convertida em μmol de substrato antes e depois da hidrólise total. As constantes cinéticas V_0 e V_i foram obtidas por regressão linear usando o *software* do espectrofluorímetro. Numa catálise enzimática, a velocidade de hidrólise do substrato em ausência de inibidor é determinada como V_0 e na presença de inibidor essa velocidade é determinada como V_i .

A seleção das catepsinas para este trabalho foi baseada nos importantes papéis fisiopatológicos que elas estão envolvidas e no desafio que representa a busca de um inibidor específico, visto a similaridade estrutural que elas possuem. Além disso, levou-se em consideração a facilidade de acesso a estas enzimas.

Na busca de possíveis inibidores das catepsinas K, V, L e S, os compostos avaliados foram ensaiados em espectrofluorímetro de placa ELISA, utilizando a concentração fixa de 25 μM de inibidor por poço. Esse valor foi estipulado como a concentração máxima a ser testada, visto que este trabalho busca potentes inibidores.

Embora estas enzimas apresentem uma melhor atividade a 37 °C optou-se em trabalhar com a temperatura em 27 °C, pois nesta temperatura elas são mais estáveis, permitindo assim ensaios mais seguros e reprodutíveis. Isto foi observado através de uma curva de variação de temperatura para estas catepsinas.

A agitação utilizada pelo espectrofluorímetro de placa apresenta algumas limitações. Considerando que os poços possuem um volume muito pequeno (300 μL) e o volume final utilizado no ensaio foi de 200 μL , a agitação é limitada dificultando a homogeneização total do meio, fazendo com que as leituras das triplicatas sejam afetadas consideravelmente. Visto que este trabalho tem um caráter de triagem, o valor mais discrepante da triplicata foi desconsiderado quando necessário.

Os compostos avaliados que não interferiram significativamente na velocidade de hidrólise do substrato pelas enzimas foram considerados como não ativos (0% de inibição), ou seja, não diferiram do controle positivo. Já os compostos que apresentaram valor de inibição superior a 50% de inibição foram considerados ativos e selecionados como promissores para avaliação de potência (IC_{50}), sendo este um parâmetro cinético quantitativo.

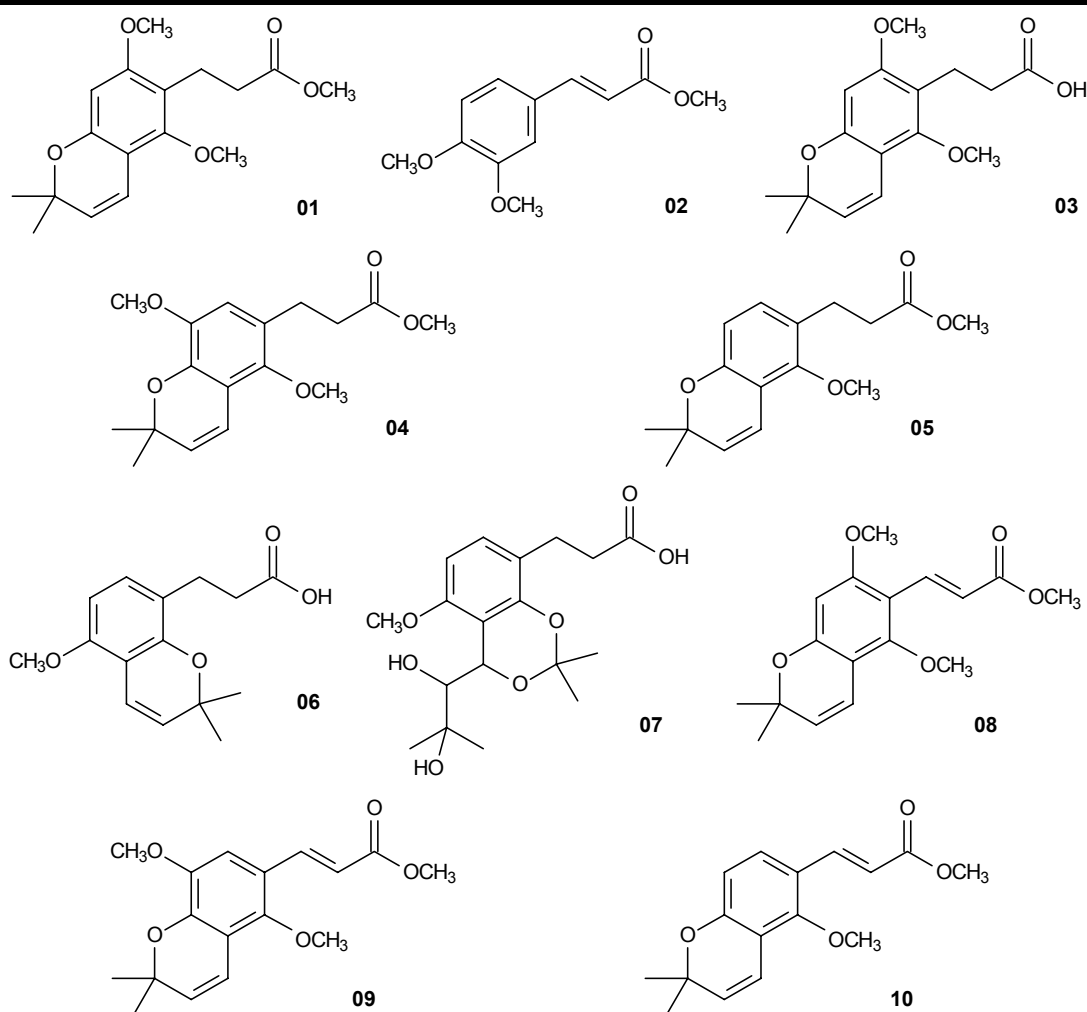
8.5 - Triagem e identificação de novos candidatos a inibidores das catepsinas lisossomais K, V, L e S

Foi realizado uma triagem bioquímica em larga escala de compostos de origem natural e sintética contra as catepsinas K, V, L e S. O trabalho de triagem de um grande número de substâncias químicas puras resultou na identificação de moléculas capazes de interferir significativamente na atividade destas enzimas. Durante o desenvolvimento deste trabalho, foram avaliados 270 compostos, sendo 111 produtos naturais isolados de plantas e 159 derivados sintéticos. A seguir estão descritos os resultados de inibição (%) na concentração de 25 μM , utilizando as condições padrões de ensaio. Os resultados preenchidos com asterisco (*) são referentes aos dados das triplicatas não reprodutíveis.

8.5.1 - Derivados do ácido cinâmico e diidrocinâmico

Os compostos derivados do ácido cinâmico e diidrocinâmico, na concentração de 25 μM , não apresentaram inibição frente às enzimas testadas (TABELA 8.2)

TABELA 8.2 - Porcentagem de inibição dos derivados do ácido cinâmico e diidrocinâmico na concentração de 25 μ M.

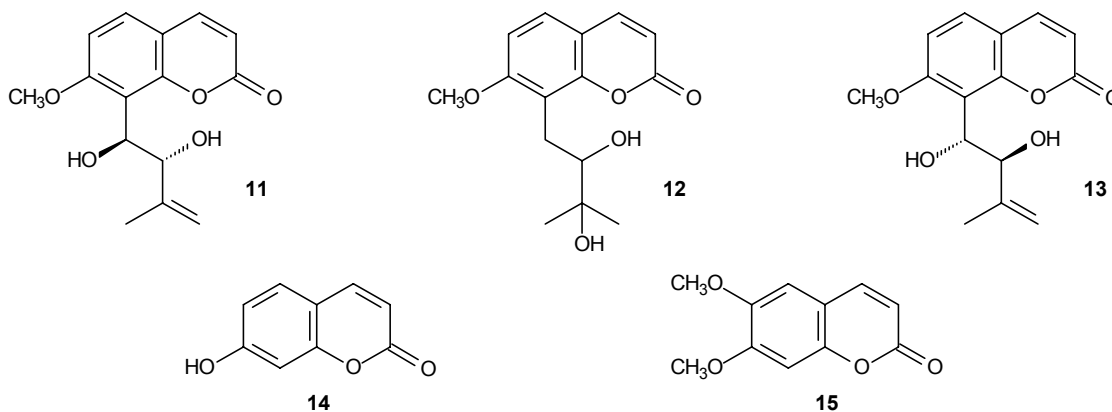


Composto	Inibição (%) <small>Cat K</small>	Inibição (%) <small>Cat V</small>	Inibição (%) <small>Cat L</small>	Inibição (%) <small>Cat S</small>
01	0	0	0	0
02	0	2	0	0
03	0	19	0	7
04	0	0	0	8
05	0	0	0	0
06	0	13	0	0
07	0	20	0	10
08	0	0	41	*
09	0	0	0	7
10	0	0	0	13

8.5.2 - Cumarinas

Dentre as cumarinas descritas na TABELA 8.3, apenas a **15** mostrou-se ativa (73%) frente à catepsina V.

TABELA 8.3 - Porcentagem de inibição das cumarinas preniladas e outras cumarinas na concentração de 25 μ M.

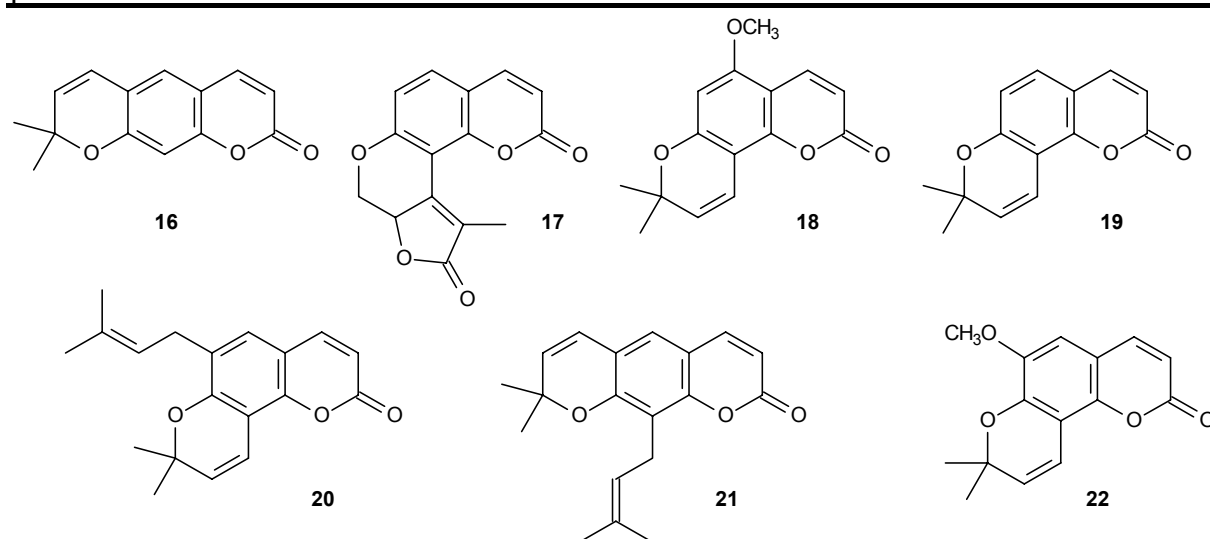


Composto	Inibição (%) Cat K	Inibição (%) Cat V	Inibição (%) Cat L	Inibição (%) Cat S
11	0	8	0	20
12	0	0	0	0
13	6	19	0	0
14	0	15	0	0
15	0	73	19	21

A TABELA 8.4 mostra os resultados obtidos com pirano cumarinas, lineares e angulares, com as diferentes catepsinas. Os melhores resultados foram obtidos frente à catepsina V.

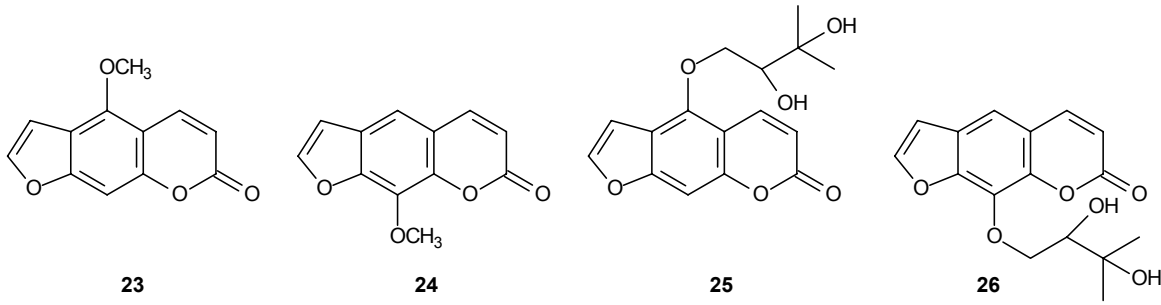
As pirano cumarinas angulares **18** (63%) e **22** (71%) apresentaram atividade inibitória moderada, mostrando que a variação na posição da metoxila não difere significativamente nos resultados. Já na ausência de substituinte (**19**) a atividade é nula e com uma prenila na posição 6 (**20**), há um aumento da atividade (41%).

Para as pirano cumarinas lineares a presença de substituinte potencializou a atividade. Quando há prenilação na posição 8 (**21** – 54%), há um aumento significativo de atividade, quando comparada com a cumarina sem substituinte (**16** – 11%). Vale ressaltar que o fato da pirano cumarina ser angular (**19**) ou linear (**16**), não diferenciou os resultados.

TABELA 8.4 - Porcentagem de inibição das pirano cumarinas na concentração de 25 μ M.

Composto	Inibição (%) <small>Cat K</small>	Inibição (%) <small>Cat V</small>	Inibição (%) <small>Cat L</small>	Inibição (%) <small>Cat S</small>
16	0	11	10	11
17	0	11	14	0
18	27	63	9	16
19	0	0	0	8
20	19	41	36	11
21	0	54	0	18
22	0	71	0	24

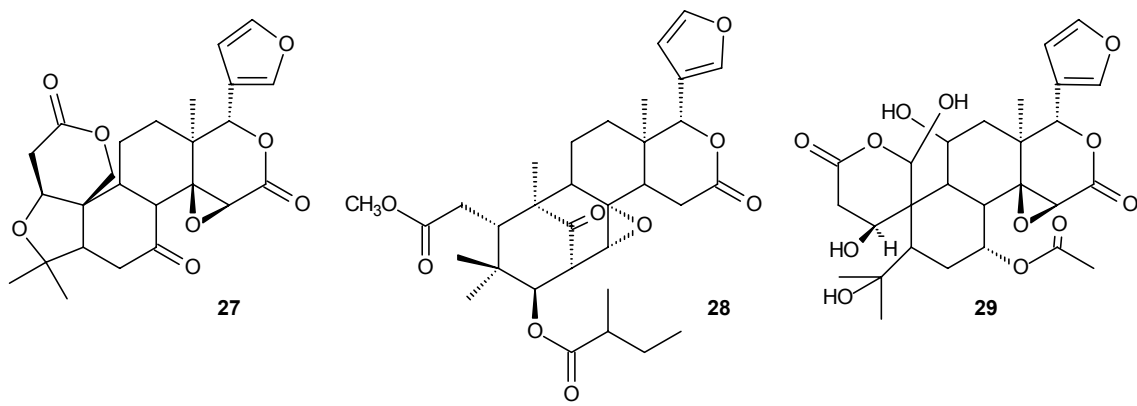
Entre as furano cumarinas (TABELA 8.5), os resultados também foram mais expressivos frente à catepsina V. A cumarina **25** apresentou 62% de inibição enquanto que a **26** foi praticamente inativa (14%), sendo a diferença entre elas apenas a posição da substituição. No caso das cumarinas **23** e **24**, que apresentaram inibição próxima de 50%, a diferença na posição do substituinte (metoxila) não diferiu nos resultados.

TABELA 8.5 - Porcentagem de inibição das furano cumarinas na concentração de 25 μ M.


Composto	Inibição (%) Cat K	Inibição (%) Cat V	Inibição (%) Cat L	Inibição (%) Cat S
23	0	48	10	4
24	0	45	32	10
25	0	62	16	29
26	0	14	0	22

8.5.3 - Limonóides

Os limonóides apresentados na FIGURA 8.6 não apresentaram atividade expressiva frente às catepsinas testadas. A falta de um maior número de estruturas impossibilita maiores conclusões, mas esta classe de compostos não demonstra ser promissora na busca de inibidores.

TABELA 8.6 - Porcentagem de inibição dos limonóides testados na concentração de 25 μ M.


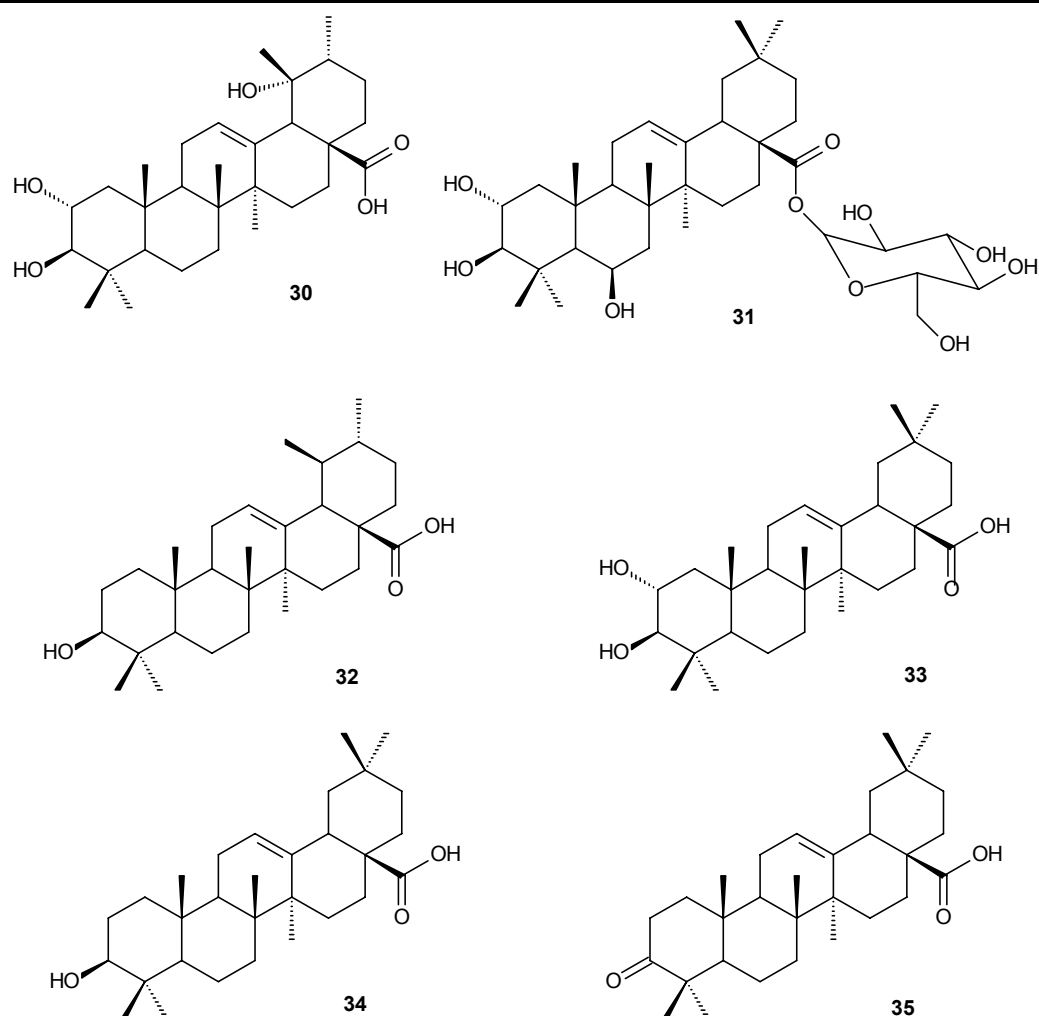
Composto	Inibição (%) Cat K	Inibição (%) Cat V	Inibição (%) Cat L	Inibição (%) Cat S
27	0	0	0	0
28	0	43	0	0
29	44	27	0	36

8.5.4 - Triterpenos

Os triterpenos possuem várias propriedades medicinais. São antiinflamatórios, antibacterianos, fungicidas, antivirais, analgésicos, cardiovasculares e antitumorais. Devido à sua grande diversidade estrutural, seu estudo tem despertado grande interesse na tentativa de novas e reais aplicabilidades (POTOCKA, 2003).

A TABELA 8.7 mostra uma série de triterpenos. Os triterpenos **34** e **35** apresentaram uma boa atividade frente à catepsina V. Observações interessantes podem ser feitas quando se compara as estruturas dos triterpenos **32**, **33**, **34** e **35**. A diferença do composto **34** em relação a **35** é a redução da carbonila na posição 3. O composto reduzido (**34**) apresenta menor atividade (70%) que sua forma oxidada (**35** - 89%). Já o triterpeno **33** apresenta uma oxidação na posição 2, que quando comparado ao triterpeno **34**, sua atividade é praticamente nula (18%) frente à catepsina V. Isso indica que os substituintes do anel A são extremamente importantes para a atividade desta classe de compostos. Outra observação interessante são as diferenças de atividades ocasionadas pela posição das metilas 19 e 20. Quando ambas as metilas estão posicionadas no carbono 20 (**34**), o composto apresenta 70% de inibição e quando posicionadas no carbono 19 e 20 (**32**), não possui atividade significativa (16%).

Estudos com células carcinômicas mostram que quando tratadas com ácido ursólico (**32**), essas apresentaram 90% de inibição em seus crescimentos (após 96 horas) e 60% de apoptose (após 48 horas). Experimentos comprovam essa atividade biológica associada com a ativação proteolítica da caspase-3 e outras caspases similares, que também são cisteíno peptidases (HOLLOSY *et al.*, 2001).

TABELA 8.7 - Porcentagem de inibição para triterpenos do tipo ursânico testados na concentração de 25 μ M.

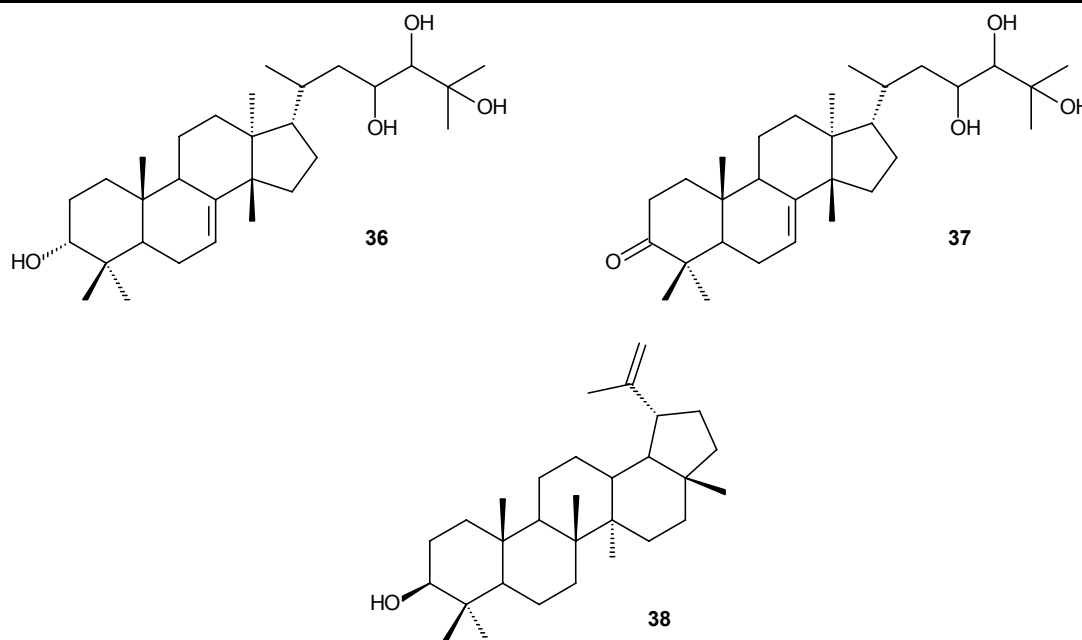
Composto	Inibição (%) Cat K	Inibição (%) Cat V	Inibição (%) Cat L	Inibição (%) Cat S
30	0	34	0	6
31	0	0	0	0
32	0	16	0	7
33	0	18	0	0
34	28	70	46	0
35	9	89	36	6

A TABELA 8.8 mostra alguns triterpenos que não apresentaram atividade inibitória significativa. A falta de um maior número de estruturas impossibilita maiores conclusões.

Estudos mostram que as enzimas lisossomais possuem importante função no desencadeamento de processos inflamatórios, sendo aumentadas significativamente em condições de artrite. Em artrite reumatóide estas enzimas também são envolvidas na destruição estrutural de macromoléculas do tecido

cognitivo e da cartilagem. Os triterpenos lupeol (**38**) e linoleato de lupeol foram administrados oralmente (50 mg/Kg) em ratos com artrite por oito dias, revelando uma reversibilidade do quadro patológico, com estabilização da membrana lisossomal. O linoleato de lupeol mostrou-se mais ativo que o lupeol (GEETHA & MARALAKSHMI, 1999).

TABELA 8.8 - Porcentagem de inibição para diferentes triterpenos testados na concentração de 25 μ M.



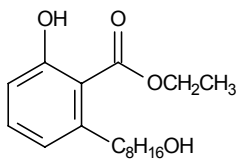
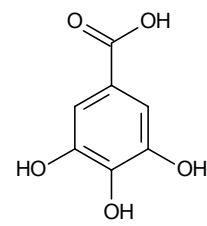
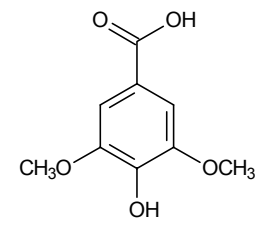
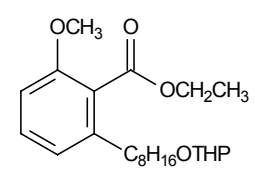
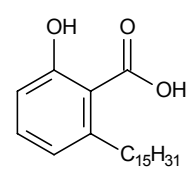
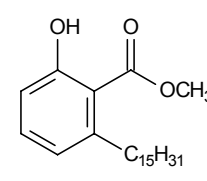
Composto	Inibição (%) Cat K	Inibição (%) Cat V	Inibição (%) Cat L	Inibição (%) Cat S
36	0	0	0	3
37	0	0	0	0
38	25	26	40	0

8.5.5 - Ácidos e derivados

Os ácidos avaliados e seus derivados (TABELA 8.9), não apresentaram resultados expressivos. Apenas o ácido anacárdico (**43**) apresentou boa inibição, mas foi pouco seletivo, inibindo todas as enzimas testadas.

Segundo a literatura, os ácidos anacárdicos são inibidores de várias enzimas, entre elas prostaglandina sintase (GRAZZINI *et al.*, 1991), tirosinase (KUBO *et al.*, 1994), lipoxigenase (SHOBHA *et al.*, 1994) e GAPDH de *T. cruzi* (PEREIRA *et al.*, 2008).

TABELA 8.9 - Porcentagem de inibição de alguns ácidos e derivados quando testados na concentração de 25 μ M.

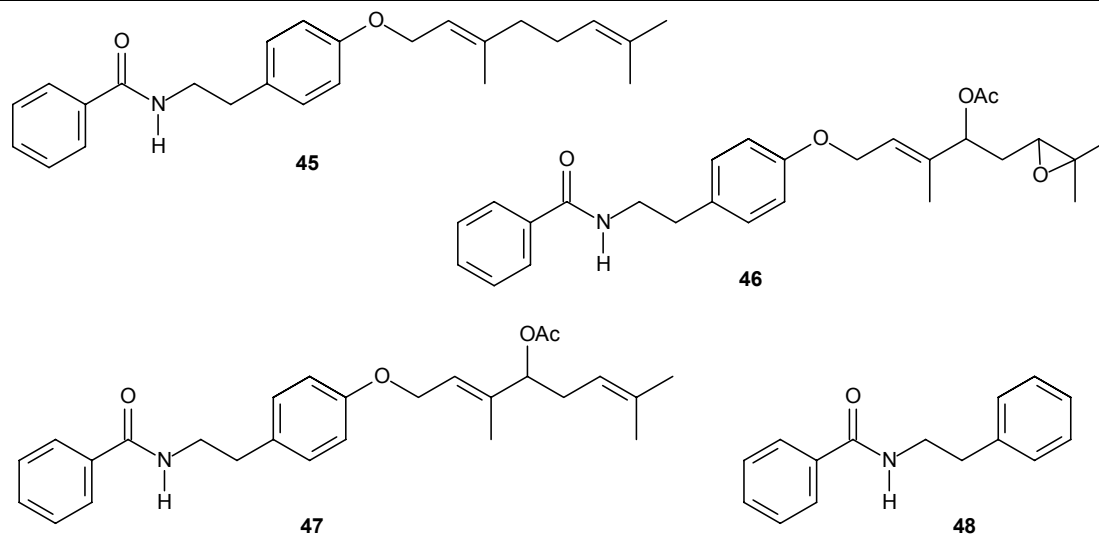
		
39	40	41
		
42	43	44

Composto	Inibição (%) <i>Cat K</i>	Inibição (%) <i>Cat V</i>	Inibição (%) <i>Cat L</i>	Inibição (%) <i>Cat S</i>
39	0	0	0	9
40	0	41	0	0
41	0	27	0	0
42	0	24	0	0
43	95	78	61	92
44	0	38	0	0

8.5.6 - Amidas

A TABELA 8.10 apresenta os resultados obtidos com algumas amidas naturais que possuem o mesmo esqueleto principal, sendo diferenciadas apenas pelos substituintes. De acordo com os resultados obtidos para a catepsina K, pôde-se concluir que a diferença de substituinte na cadeia lateral é fundamental para a atividade. A presença de um grupo acetato no carbono 4'' da amida **47** (70%) aumenta significativamente a atividade quando comparada com a amida **45** (1%). Já a presença de um epóxido no carbono 6'' (**46**) diminui a atividade pela metade (35%). A ausência de substituinte (**48**) deixa o composto inativo (0%).

TABELA 8.10 - Porcentagem de inibição das amidas naturais testadas na concentração de 25 μ M.

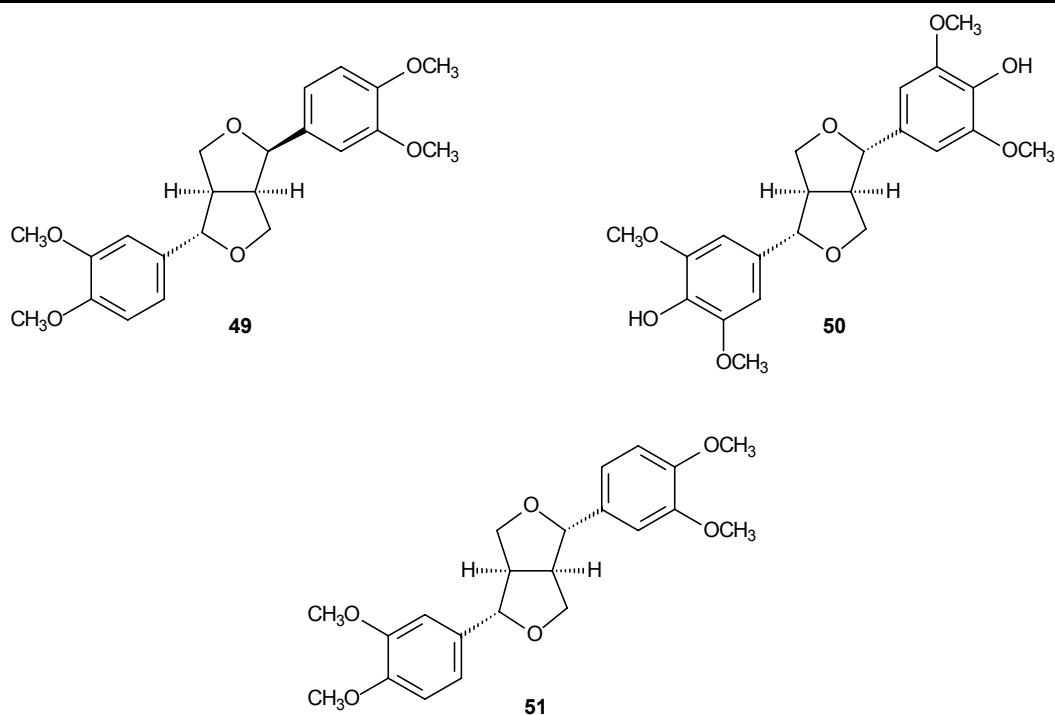


Composto	Inibição (%) <small>Cat K</small>	Inibição (%) <small>Cat V</small>	Inibição (%) <small>Cat L</small>	Inibição (%) <small>Cat S</small>
45	1	38	0	0
46	35	0	0	12
47	70	43	35	12
48	0	0	0	0

8.5.7 - Lignanas

Dentre as lignanas (TABELA 8.11), nenhuma apresentou atividade significativa frente às enzimas testadas.

TABELA 8.11 - Porcentagem de inibição das lignanas testadas na concentração de 25 µM.



Composto	Inibição (%) Cat K	Inibição (%) Cat V	Inibição (%) Cat L	Inibição (%) Cat S
49	0	0	0	0
50	10	0	6	0
51	0	0	0	0

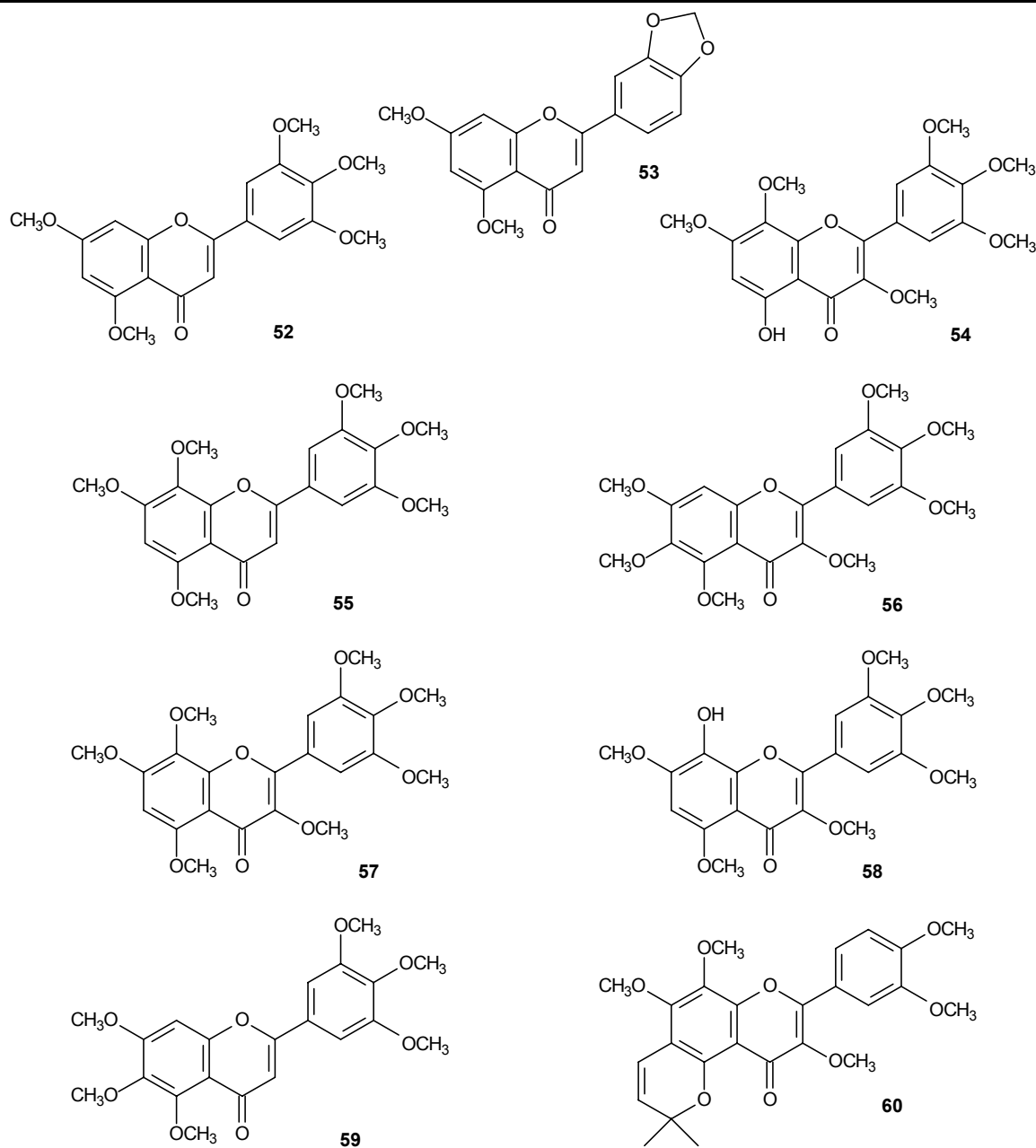
8.5.8 - Flavonóides e derivados

Os flavonóides e derivados testados frente às catepsinas K, V, L e S apresentaram alguns resultados bastante interessantes, mostrando-se como uma classe promissora na busca de inibidores específicos para essas enzimas.

Trabalhos da literatura mostram três biflavonas isoladas de *Taxodium mucronatum* com atividade inibitória frente à catepsina B (IC_{50} de 1,75, 1,68 e 0,55 µM) (PAN *et al.*, 2005). Na busca de inibidores de cisteíno peptidases parasitárias, Li e colaboradores descrevem chalconas e derivados sendo desenhados para o desenvolvimento de inibidores não peptídicos (LI *et al.*, 1996).

As flavonas polimetoxiladas (TABELA 8.12) não apresentaram atividade frente às enzimas testadas. Estas flavonas possuem apenas metoxilas como substituintes, com exceção à flavona **53** que apresenta um anel metilenodioxila como substituinte do anel B.

TABELA 8.12 - Porcentagem de inibição das flavonas polimetoxiladas testadas na concentração de 25 μ M.



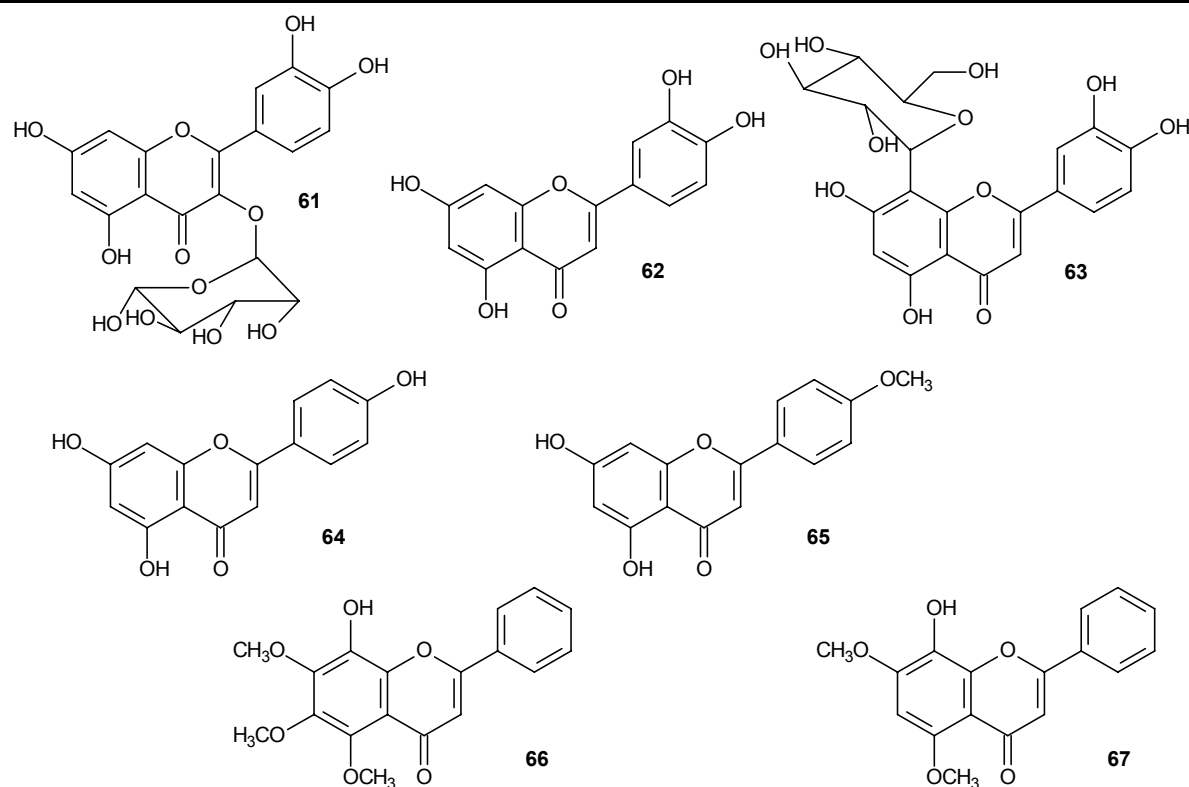
Composto	Inibição (%) Cat K	Inibição (%) Cat V	Inibição (%) Cat L	Inibição (%) Cat S
52	0	0	0	12
53	0	22	8	26
54	0	0	0	17
55	0	0	0	11
56	0	0	0	10
57	0	0	0	21
58	0	0	0	0
59	0	0	0	0
60	0	11	0	21

A TABELA 8.13 apresenta flavonas com diferentes substituintes e que algumas delas inibiram seletivamente a catepsina V. As flavonas **63** e **65** apresentaram cerca de 60% de inibição. Ressalta-se que a diferença entre a flavona **64** (0%) e **65** (63%) é apenas o substituinte na posição 4', hidroxila e metoxila respectivamente. Já a flavona **62** (89%), quando comparada à flavona **64** apresenta apenas uma hidroxila a mais na posição 3', diferenciando significativamente sua atividade frente à catepsina V.

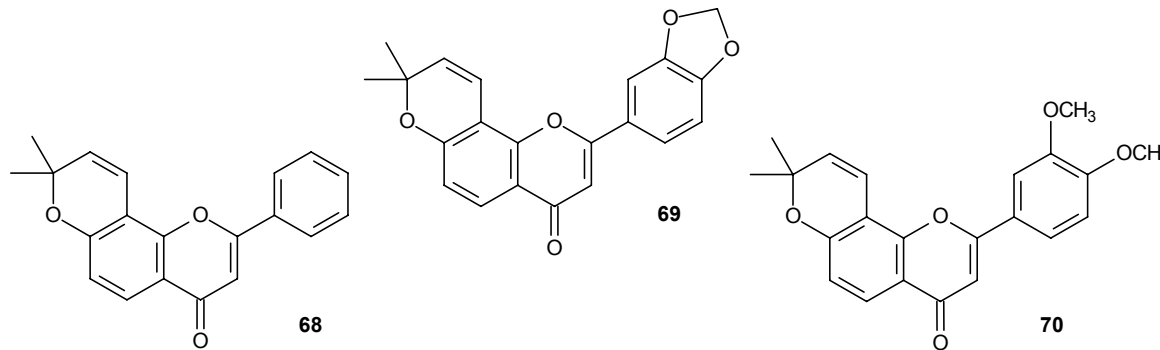
Dentre as flavonas com anel pirano (TABELA 8.14), destaca-se a flavona **68** como um promissor inibidor, exceto para catepsina S. Já a flavona **69** apresentou atividade significativa frente às catepsinas V (70%) e L (85%). Vale salientar que a diferença entre as flavonas **69** e **70** (0%) é a troca de um padrão de substituição dimetoxila por metileno dioxila.

As flavonas da TABELA 8.15 apresentam em suas estruturas um anel furano entre C-7 e C-8, sendo a flavona **72** (64%) mais ativa frente à catepsina V que a flavona **71** (35%), sendo a diferença entre elas uma metoxila na posição 3.

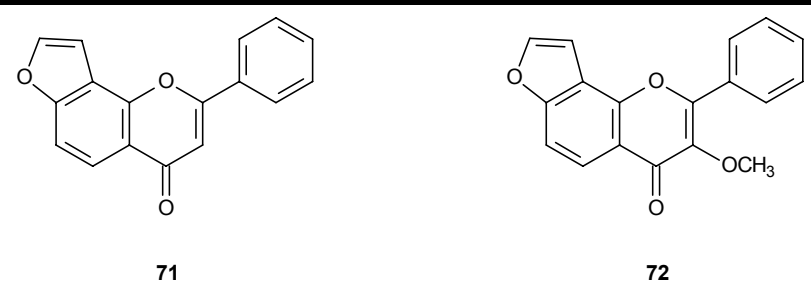
TABELA 8.13 - Porcentagem de inibição das flavonas com diferentes substituintes testadas na concentração de 25 μ M.



Composto	Inibição (%) _{Cat K}	Inibição (%) _{Cat V}	Inibição (%) _{Cat L}	Inibição (%) _{Cat S}
61	0	30	23	22
62	0	89	37	0
63	0	61	20	13
64	0	0	0	0
65	0	63	16	9
66	14	11	0	11
67	3	6	5	21

TABELA 8.14 - Porcentagem de inibição das flavonas substituídas com anel pirano testadas na concentração de 25 μ M.


Composto	Inibição (%) Cat K	Inibição (%) Cat V	Inibição (%) Cat L	Inibição (%) Cat S
68	67	84	98	31
69	22	70	85	20
70	0	46	29	21

TABELA 8.15 - Porcentagem de inibição das flavonas substituídas com anel furano testadas na concentração de 25 μ M.


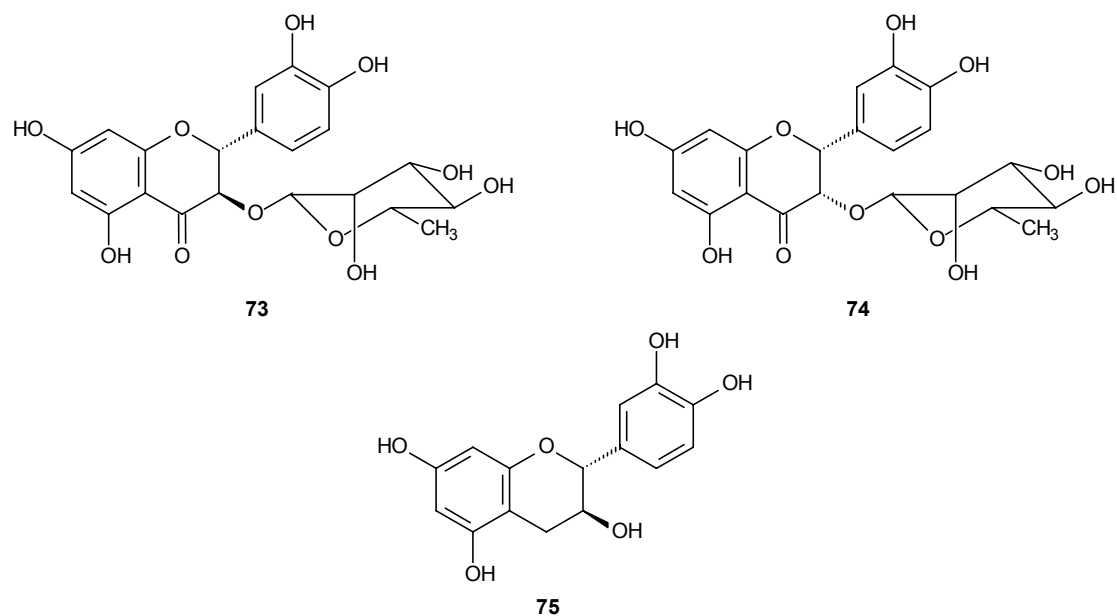
Composto	Inibição (%) Cat K	Inibição (%) Cat V	Inibição (%) Cat L	Inibição (%) Cat S
71	0	35	26	34
72	0	64	8	14

Os resultados descritos na TABELA 8.16 mostram que apenas a catequina **75** mostrou-se ativa frente à catepsina V. Já os flavanonóis **73** e **74** não apresentaram atividade significativa. Estes compostos apresentam diferenças na substituição da posição 3 e no caso do composto **75** redução da carbonila na posição 4.

Na busca de inibidores específicos de caspases (cisteíno peptidases) e na prevenção de apoptoses, Katunuma e colaboradores estudaram derivados da catequina com inibição frente às caspases-3, 7 e 2, além de testes *in vitro* com células. Neste estudo, encontraram-se derivados da catequina com excelente atividade frente às caspases-3, 7 e 2 (50% de inibição frente à caspase-3 com 10 nM

– testes *in vitro*), mas que não foram capazes de inibir a caspase-8 e as catepsinas B e L. Já a catequina (**75**) não apresentou atividade em nenhuma das caspases e catepsinas avaliadas (KATUNUMA *et al.*, 2006), confirmando os dados obtidos nos nossos testes com a catepsina L.

TABELA 8.16 - Porcentagem de inibição para flavanonas substituídas na posição 3 testadas na concentração de 25 μ M.



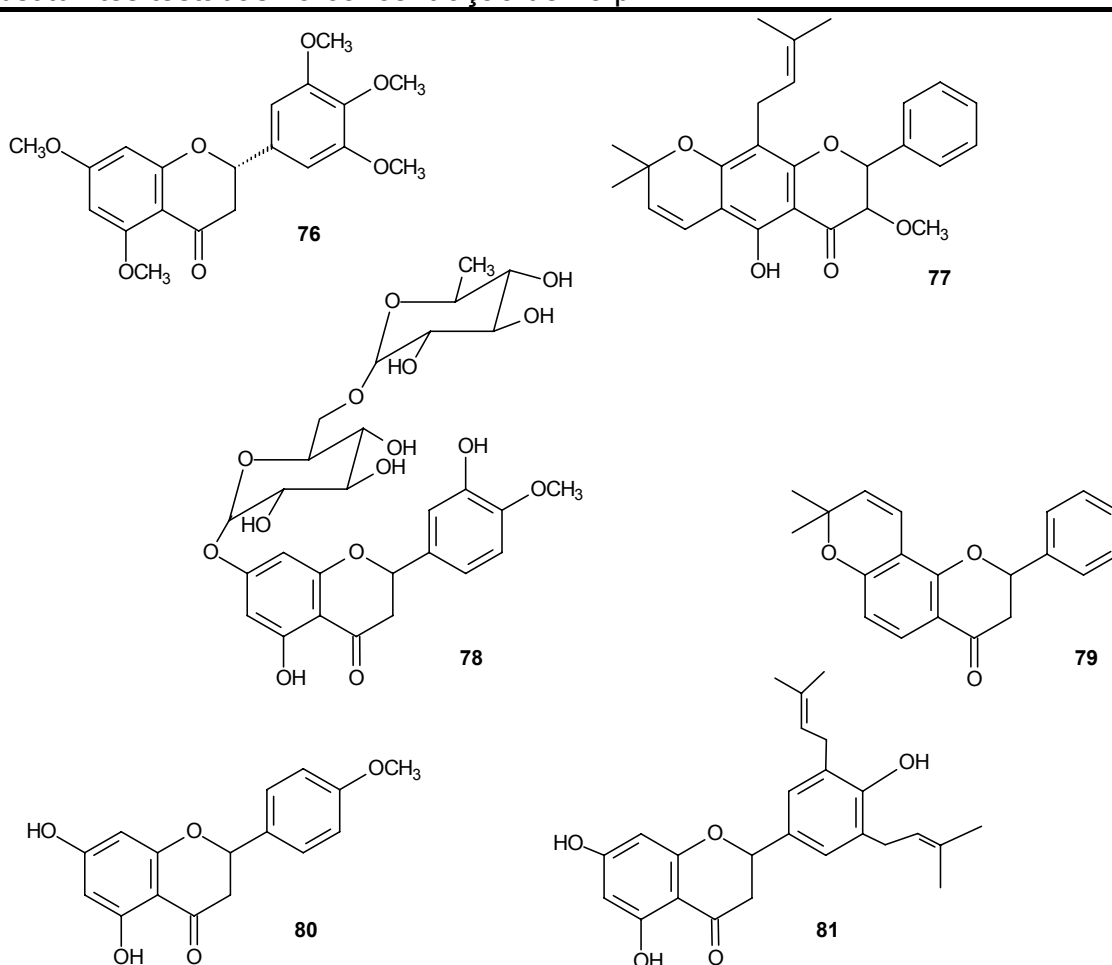
Composto	Inibição (%) Cat K	Inibição (%) Cat V	Inibição (%) Cat L	Inibição (%) Cat S
73	0	0	0	14
74	0	0	0	0
75	0	83	26	20

A TABELA 8.17 apresenta flavanonas com diferentes substituintes. As flavanonas preniladas (**77** e **81**) são as mais ativas, sendo **77** ativa frente às catepsinas V (92%) e L (99%), e **81** ativa somente frente à catepsina V (74%). Já a flavanona **79** foi ativa somente frente à catepsina V (60%). Vale ressaltar que a flavanona **79** e a flavona **68** (inibição: 67% catepsina K; 84% catepsina V; 98% catepsina L) apresentam estruturas bastante semelhantes, diferenciando apenas na dupla ligação entre os carbonos 2 e 3. No entanto os resultados de atividade inibitória são bem distintos, o que nos leva a correlacionar a importância da dupla ligação no mecanismo de inibição dessas enzimas. Um resultado bastante interessante foi com a flavanona **78** que foi ativa somente frente à catepsina S (55%), sendo este um dos poucos produtos naturais inibidor desta enzima.

Estudos com uma espécie de Moraceae mostram flavanonas preniladas como potentes inibidores da catepsina K (estruturas na FIGURA 5.14), com IC₅₀ de 840 nM (PATIL, *et al.*, 2002b).

A falta de um maior número de estruturas impossibilita maiores conclusões, mas os resultados obtidos corroboram os dados já descritos na literatura, fazendo das flavanonas preniladas um alvo interessante para o desenvolvimento de inibidores de cisteíno peptidases lisossomais.

TABELA 8.17 - Porcentagem de inibição para flavanonas com diferentes substituintes testadas na concentração de 25 µM.

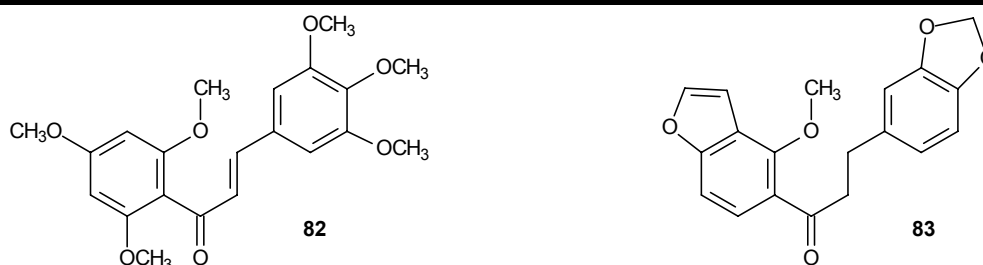


Composto	Inibição (%) Cat K	Inibição (%) Cat V	Inibição (%) Cat L	Inibição (%) Cat S
76	0	0	0	13
77	34	92	99	0
78	0	0	0	55
79	0	60	36	0
80	0	0	0	19
81	0	74	26	10

A TABELA 8.18 descreve as atividades inibitórias da chalcona **82** e da diidrochalcona **83**, sendo a segunda mais ativa frente à catepsina V (64%).

Trabalhos descritos na literatura utilizam cisteíno peptidases de *Plasmodium falciparum* como modelo para estudo de modelagem molecular de chalconas, onde obteve-se IC₅₀ de 200 nM em testes *in vitro* com parasitas (LI *et al.*, 1995). Em outro trabalho com uma espécie de Moraceae, foram isoladas duas diidrochalconas com boa atividade frente à catepsina K, com IC₅₀ de 170 e 98 nM (PATIL *et al.*, 2002b).

TABELA 8.18 - Porcentagem de inibição para a chalcona e a diidrochalcona testadas na concentração de 25 µM.



Composto	Inibição (%) Cat K	Inibição (%) Cat V	Inibição (%) Cat L	Inibição (%) Cat S
82	0	26	0	20
83	0	64	35	11

8.5.9 - Alcalóides

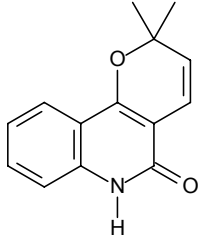
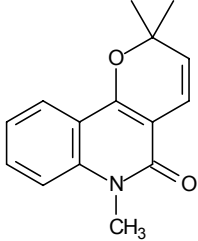
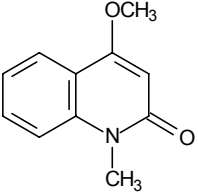
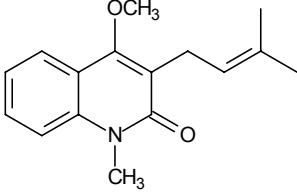
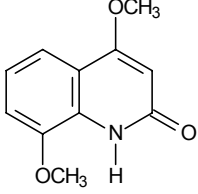
Estudos de extratos metanólicos de esponjas marinhas, *Theonella aff. mirabilis* (FUSETANI *et al.*, 1999) levou ao isolamento de compostos nitrogenados (peptídeos) com IC₅₀ de 0,02 e 0,06 µM frente à catepsina B. Já em estudos com Micronesian (PAL93-055) (PATIL *et al.*, 2002a), isolou-se um alcalóide derivado da triptamina, com IC₅₀ de 26 µM, enquanto que a triptamina apresenta IC₅₀ de 15 µM, ambos determinados para catepsina K.

Os alcalóides avaliados neste trabalho foram divididos em cinco subclasses para uma melhor discussão dos resultados. De um modo geral, seus resultados foram bastante expressivos, visto que há poucos relatos na literatura estudando esta classe de compostos como inibidores de catepsinas lisossomais.

A TABELA 8.19 apresenta os resultados obtidos com alcalóides quinolínicos, mostrando que esses compostos não apresentaram atividade inibitória

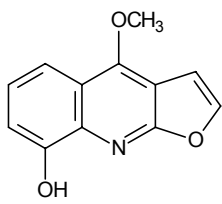
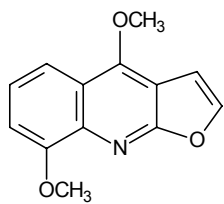
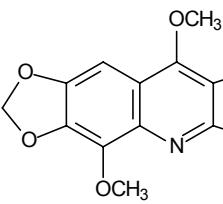
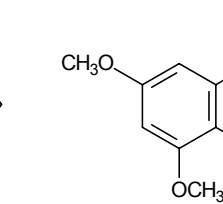
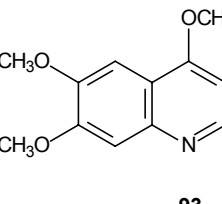
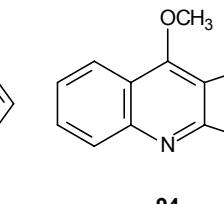
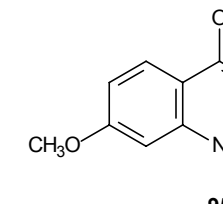
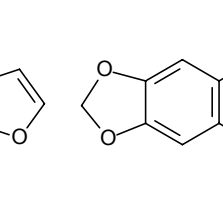
significativa. O número restrito de compostos testados também impossibilita maiores informações quanto à potencialidade desta classe.

TABELA 8.19 - Porcentagem de inibição dos alcalóides quinolínicos testados na concentração de 25 μ M.

Composto	Inibição (%) <small>Cat K</small>	Inibição (%) <small>Cat V</small>	Inibição (%) <small>Cat L</small>	Inibição (%) <small>Cat S</small>
	0	26	11	6
	0	16	0	0
	0	0	0	0
	19	0	1	11
	0	2	0	9

Os resultados obtidos com os alcalóides furoquinolínicos estão descritos na TABELA 8.20. Dentre os compostos testados, destaca-se apenas a atividade inibitória do alcalóide **89** (51%) frente à catepsina V. Embora uma atividade pouco expressiva, mas significativa, pois as demais catepsinas não foram inibidas. Uma importante observação pode ser feita quando se comparam os resultados obtidos frente à catepsina V para os compostos **89**, **90** e **94**. Estes compostos diferem entre si pelos substituintes da posição 8: o composto **89** (51%) apresenta uma hidroxila, o composto **90** (0%) uma metoxila e o composto **94** (0%) não apresenta substituinte. Esses dados mostram como a atividade é influenciada pela diferença de substituintes.

TABELA 8.20 - Porcentagem de inibição dos alcalóides furoquinolínicos testados na concentração de 25 μ M.

Composto	Inibição (%) <i>Cat K</i>	Inibição (%) <i>Cat V</i>	Inibição (%) <i>Cat L</i>	Inibição (%) <i>Cat S</i>
	0	51	0	10
	0	0	0	29
	0	3	0	11
	0	3	0	0
	0	0	7	0
	0	0	42	0
	0	5	17	4
	0	2	8	0

A TABELA 8.21 mostra os resultados obtidos com os alcalóides indolpiridoquinazolínicos. Estes alcalóides apresentaram excelente atividade principalmente frente à catepsina V. Analisando as estruturas desses alcalóides, a diferença entre eles é o substituinte da posição 10 (anel E). Os compostos **97** e **98** apresentaram significativa atividade inibitória frente às catepsinas V e L (cerca de 100%). O composto **98** foi igualmente ativo frente a ambas as enzimas, enquanto que **97** foi menos ativo frente à catepsina L (52%).

TABELA 8.21 - Porcentagem de inibição dos alcalóides indolpiridoquinazolínicos testados na concentração de 25 μ M.

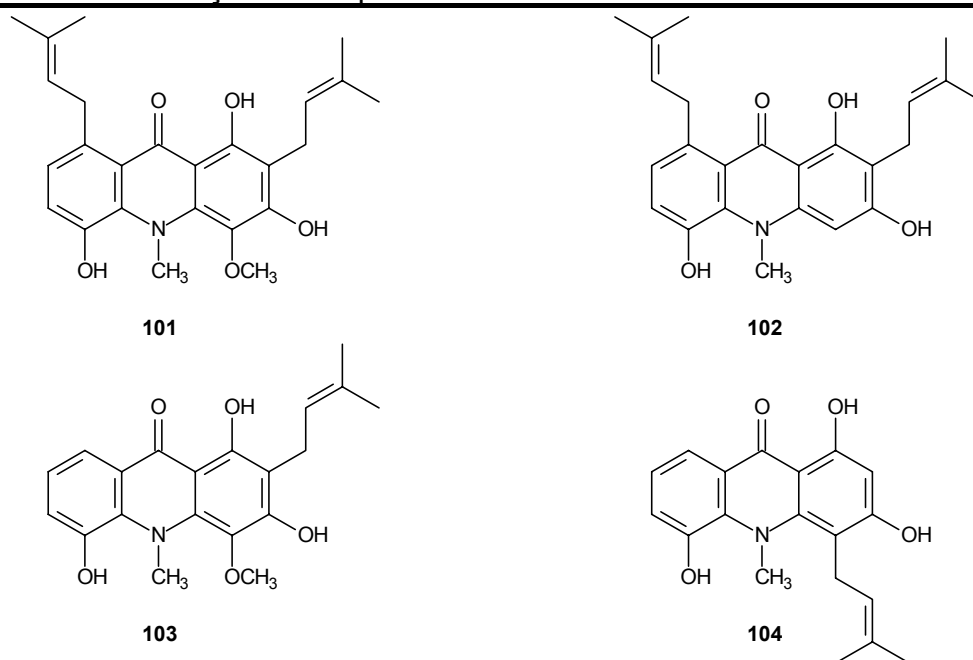
Composto	Inibição (%) Cat K	Inibição (%) Cat V	Inibição (%) Cat L	Inibição (%) Cat S
97	43	93	52	0
98	25	98	90	25

Já o alcalóide cantinônico **99** (TABELA 8.22) apresentou atividade significativa frente às catepsinas K e V, com 50% e 59% de inibição, respectivamente. Entretanto seu análogo **100** não mostrou nenhuma atividade, sendo a diferença entre eles apenas uma metoxila na posição 3'.

TABELA 8.22 - Porcentagem de inibição dos alcalóides cantinônicos testados na concentração de 25 μ M.

Composto	Inibição (%) Cat K	Inibição (%) Cat V	Inibição (%) Cat L	Inibição (%) Cat S
99	50	59	27	30
100	0	0	10	0

Na TABELA 8.23 são apresentados os resultados obtidos com alguns alcalóides acridônicos prenilados. Os alcalóides **101** e **102** foram ativos frente à catepsina V (cerca de 85%), sendo o último também ativo frente à catepsina L (83%). A diferença estrutural entre os alcalóides **101** e **102** está na posição 4. A presença da metoxila nesta posição (**101**) diminui significativamente a atividade inibitória frente à catepsina L (24%). Já a ausência da unidade prenila na posição 8 (**103** e **104**) e na posição 2 (**104**), diminui drasticamente a atividade destes compostos, tornando-os praticamente inativos.

TABELA 8.23 - Porcentagem de inibição dos alcalóides acridônicos prenilados testados na concentração de 25 μ M.

Composto	Inibição (%) Cat K	Inibição (%) Cat V	Inibição (%) Cat L	Inibição (%) Cat S
101	0	83	24	3
102	0	89	83	4
103	0	22	10	16
104	0	39	6	0

Os alcalóides acridônicos com diferentes substituintes mostraram ser mais ativos frente à catepsina V (TABELA 8.24). Os compostos **105**, **106** e **107** não apresentaram diferença significativa de atividade, quando analisados frente à catepsina V. Já quando analisados frente à catepsina L, apenas o composto **107** mostrou atividade expressiva (82%), sendo a diferença estrutural entre eles o padrão de substituição do anel A. A diferença entre os compostos **106** (16%) e **107** é a metoxila presente na posição 2.

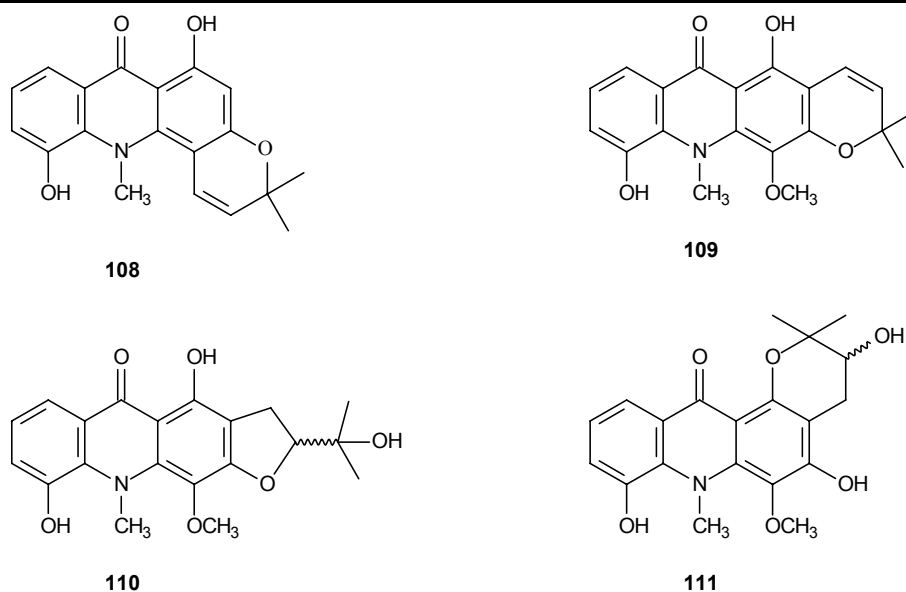
TABELA 8.24 - Porcentagem de inibição dos alcalóides acridônicos testados na concentração de 25 μ M.

Composto	Inibição (%) _{Cat K}	Inibição (%) _{Cat V}	Inibição (%) _{Cat L}	Inibição (%) _{Cat S}
105	0	60	9	0
106	0	58	16	18
107	0	76	82	0

Os alcalóides acridônicos tetracíclicos (TABELA 8.25) mostraram resultados interessantes na busca de inibidores para essas catepsinas. Destacam-se os resultados obtidos com as catepsinas K, V e L.

Os resultados obtidos frente à catepsina V mostram que de um modo geral, a presença de um anel cromeno (**108** e **109**) diminui significativamente a atividade destes compostos. O fato de **108** (12%) ser angular diminui em cinco vezes a capacidade de inibição quando comparado com seu análogo **109** (61%) que é linear, embora uma comparação direta não possa ser feita, pois o composto **109** possui um grupo metoxila na posição 4. O composto **109** também se mostrou mais potente que o composto **103** (22%), sendo a diferença entre eles a ciclização do grupo prenila na posição 2 (**103**), formando o anel cromeno (**109**).

Já os alcalóides **110** e **111** mostraram-se mais potentes, principalmente frente às catepsinas V e L, com cerca de 90% de inibição, sendo **110** também ativo frente à catepsina K (50%). Para este modelo pôde-se observar que a troca de um grupo benzocromeno entre as posições 2 e 3 (**108** e **109**) por um grupo 2-hidro-isopropil-diidrobenzofurano nesta mesma posição (**110** e **111**) trouxe um aumento significativo na atividade inibitória destes compostos.

TABELA 8.25 - Porcentagem de inibição dos alcalóides acridônicos tetracíclicos testados na concentração de 25 μM .

Composto	Inibição (%) Cat K	Inibição (%) Cat V	Inibição (%) Cat L	Inibição (%) Cat S
108	0	12	0	0
109	0	61	30	14
110	50	95	95	14
111	0	94	83	11

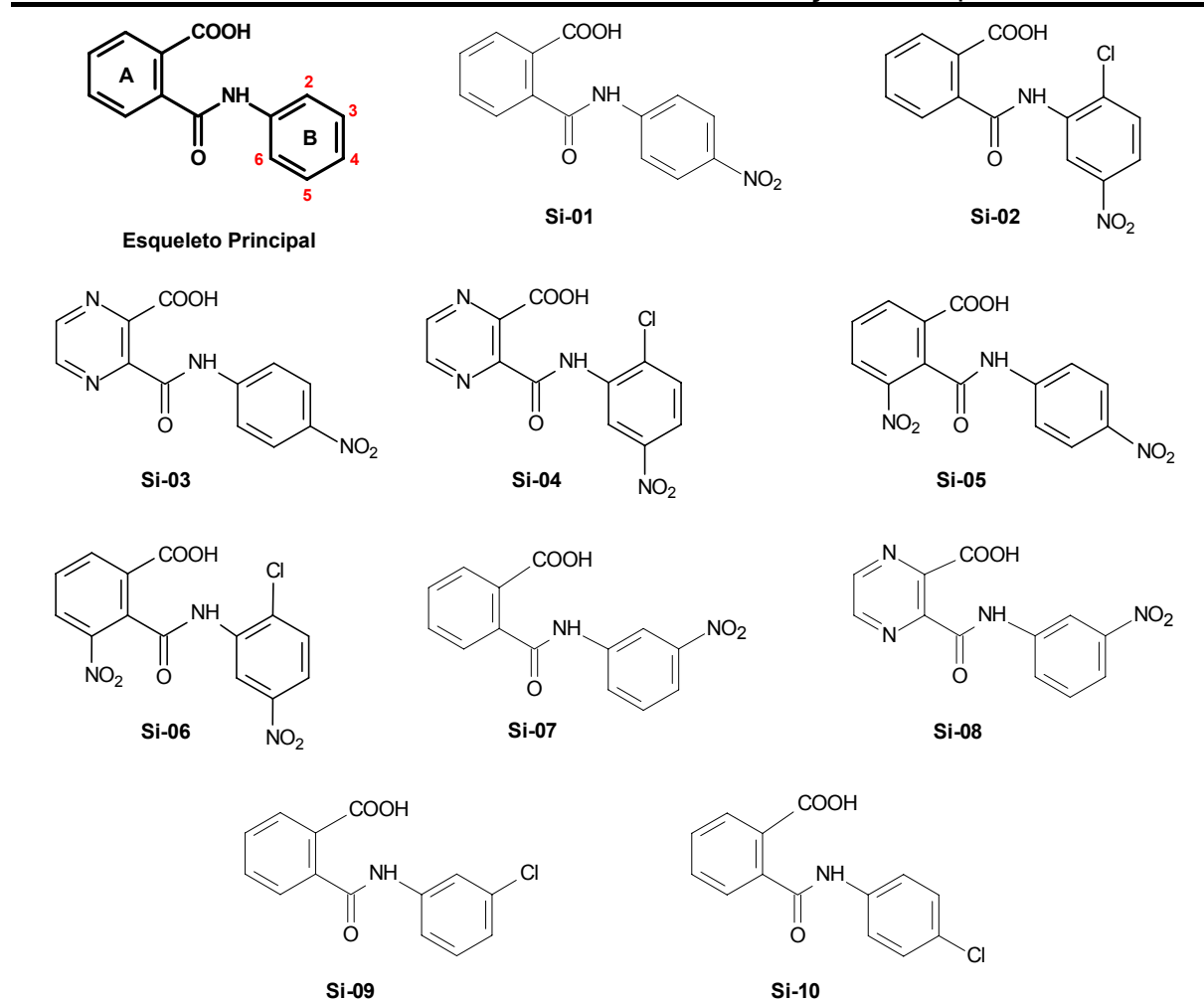
8.5.10 - Amidas sintéticas

As amidas descritas nas TABELAS 8.26 e 8.27 apresentam em comum o esqueleto principal variando somente os substituintes do anel B, com exceção dos compostos **Si-03**, **Si-04** e **Si-08** que possuem como anel A um anel pirazina.

Na TABELA 8.26 estão descritas as amidas que possuem Cl e/ou NO_2 como substituintes do anel B. Somente o composto **Si-08** apresentou resultado significativo frente à catepsina V. Uma análise interessante pode ser feita quando se correlacionam as estruturas dos compostos com núcleo pirazínídico e as atividades frente à catepsina V. Os compostos **Si-04** (13%) e **Si-08** (66%) são *meta* substituídos com um grupo NO_2 , sendo que composto **Si-04** também possui um Cl em *orto*, modificando totalmente a atividade. Já o composto **Si-03** (0%), possui um grupo NO_2 como substituinte em *para*, sendo também inativo. Comparando os resultados obtidos com os compostos **Si-07** (18%) e **Si-08**, observa-se que quando se tem o anel benzênico ao invés do anel pirazina, o composto não apresenta atividade significativa. Pelo número limitado de estruturas contendo o núcleo

pirazinídico fica difícil afirmar a potencialidade desse tipo de esqueleto na busca de inibidores da catepsina V.

TABELA 8.26 - Porcentagem de inibição para amidas sintéticas que possuem Cl e NO₂ como substituintes do anel B testadas na concentração de 25 µM.



Composto	Inibição (%) Cat K	Inibição (%) Cat V	Inibição (%) Cat L	Inibição (%) Cat S
Si-01	0	0	0	0
Si-02	0	11	0	0
Si-03	0	0	0	0
Si-04	0	13	0	0
Si-05	0	0	0	0
Si-06	0	0	0	0
Si-07	0	18	0	0
Si-08	0	66	0	0
Si-09	0	3	0	0
Si-10	0	27	22	0

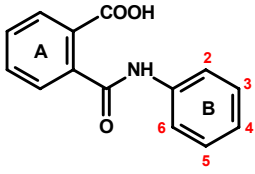
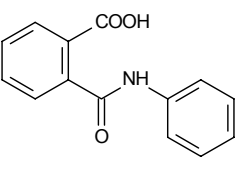
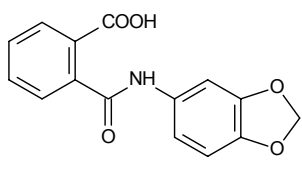
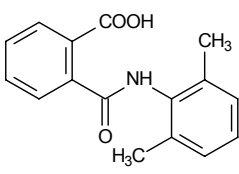
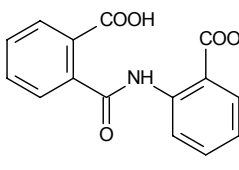
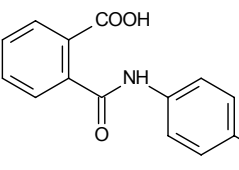
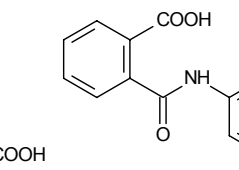
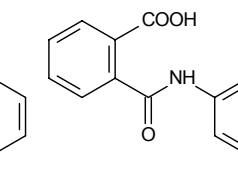
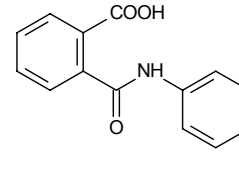
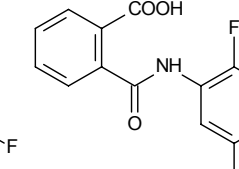
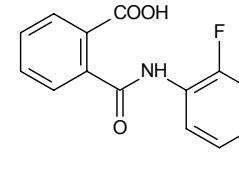
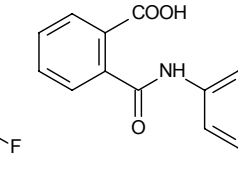
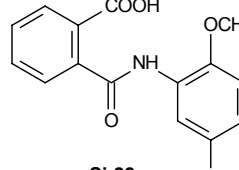
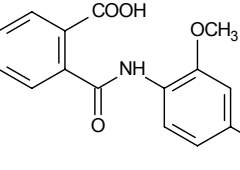
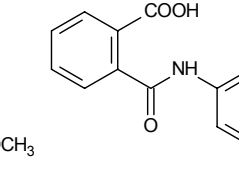
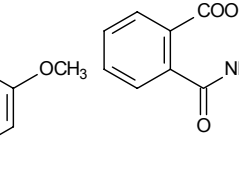
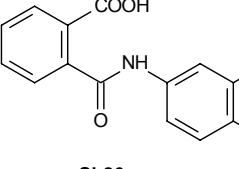
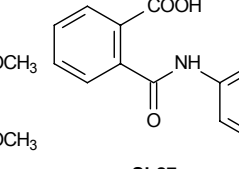
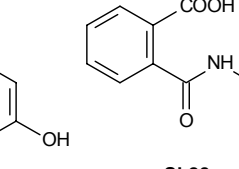
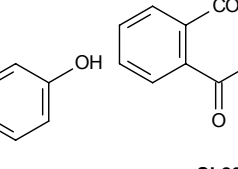
Os compostos descritos na TABELA 8.27 são amidas que possuem diferentes substituintes no anel B.

As amidas **Si-12** e **Si-13** apresentaram uma excelente atividade e seletividade, sendo ativa somente frente à catepsina L. A amida **Si-12** apresentou 97% de inibição, enquanto que a amida **Si-26** foi inativa, sendo a diferença entre elas a presença de duas metoxilas no anel B, e um anel metilenodioxila nas posições 3 e 4. Já a amida **Si-13** (90%) apresenta duas metilas como substituinte do anel B, ambas na posição *orto*. O composto **Si-27** apresentou boa atividade frente às catepsinas L (96%) e V (77%), enquanto que o composto **Si-28** foi ativo somente frente à catepsina V (82%). Destaca-se que a diferença na posição da hidroxila do anel B em **Si-27** (*para*-substituído) e **Si-28** (*meta*-substituído) provocou diferença significativa de atividade frente à catepsina L, mas não frente à catepsina V. No entanto, a amida **Si-29** que é hidroxilada na posição *orto* não foi ativa em nenhuma das enzimas testadas. Esses dados sugerem que o posicionamento da hidroxila do anel B é fundamental para a atividade desses compostos. Já o composto **Si-11** que não possui substituinte no anel B não apresentou atividade inibitória. Vale ressaltar que a diferença entre os compostos **Si-01** (inativo) e **Si-27** é o substituinte do anel B, sendo que **Si-27** inibiu em 77% a catepsina V e em 96% a catepsina L.

Um dado interessante é observado quando a hidroxila é trocada por outro substituinte. Embora os substituintes estejam na mesma posição, a atividade inibitória é nula (**Si-15**, **Si-18** e **Si-25**). Todos são *para* substituídos, mas nenhum possui atividade como o composto **Si-27** que é hidroxilado. O mesmo ocorre quando se analisa os resultados obtidos com **Si-17** e **Si-24**, ambos são *meta* substituídos, mas nenhum possui atividade como o composto **Si-28**.

Com esses dados fica evidente a influência dos substituintes neste tipo de estrutura e a potencialidade que eles representam.

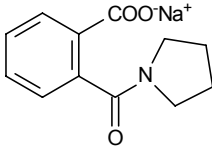
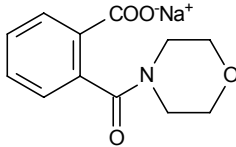
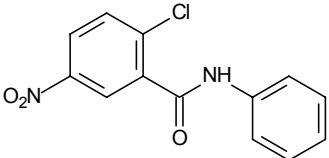
TABELA 8.27 - Porcentagem de inibição para amidas sintéticas, com diferentes substituintes no anel B, testadas na concentração de 25 μ M.

				
Esqueleto Principal	Si-11	Si-12	Si-13	
				
Si-14	Si-15	Si-16	Si-17	
				
Si-18	Si-19	Si-20	Si-21	
				
Si-22	Si-23	Si-24	Si-25	
				
Si-26	Si-27	Si-28	Si-29	
Composto	Inibição (%) _{Cat K}	Inibição (%) _{Cat V}	Inibição (%) _{Cat L}	Inibição (%) _{Cat S}
Si-11	0	0	*	0
Si-12	0	11	97	0
Si-13	0	30	90	4
Si-14	0	26	0	0
Si-15	0	0	0	0
Si-16	0	0	0	3
Si-17	0	0	0	4
Si-18	0	0	0	4
Si-19	0	0	0	0
Si-20	0	0	0	0
Si-21	0	0	0	0
Si-22	8	0	0	0
Si-23	0	0	0	0
Si-24	0	0	0	0

Si-25	0	0	0	0
Si-26	0	0	0	0
Si-27	38	77	96	9
Si-28	0	82	0	0
Si-29	0	0	0	0

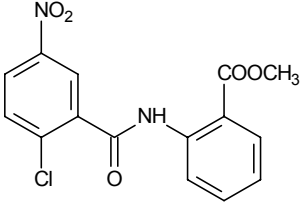
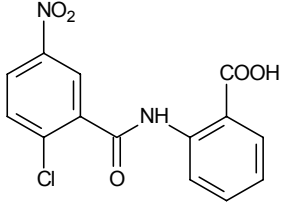
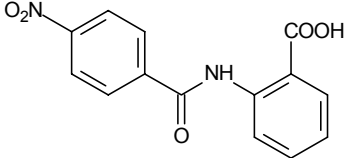
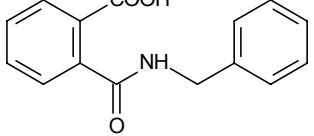
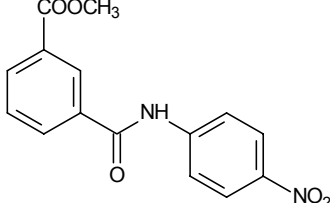
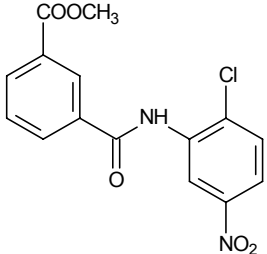
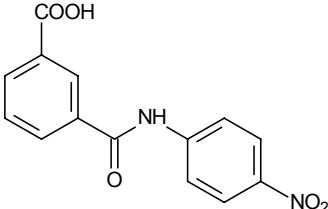
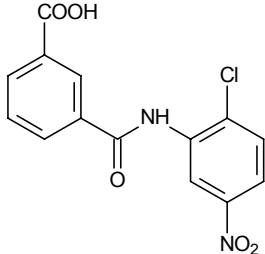
Dos compostos descritos na TABELA 8.28, apenas a amida **Si-32** apresentou inibição frente às catepsinas V (68%) e L (88%). A falta de derivados impossibilita maiores conclusões a respeito desse tipo de estrutura.

TABELA 8.28 - Porcentagem de inibição para diferentes amidas testadas na concentração de 25 μ M.

				
Si-30	Si-31	Si-32		
Composto	Inibição (%) Cat K	Inibição (%) Cat V	Inibição (%) Cat L	Inibição (%) Cat S
Si-30	0	0	0	5
Si-31	0	0	0	0
Si-32	6	68	88	0

Os compostos apresentados nas TABELAS 8.29 não apresentaram atividade significativa frente às enzimas testadas, somente o composto Si-40 apresentou inibição próxima de 50% para a catepsina V.

TABELA 8.29 - Porcentagem de inibição para amidas com diferentes padrões de substituição testadas na concentração de 25 μM .

				
Si-33	Si-34	Si-35		
				
Si-36	Si-37			
				
Si-38	Si-39	Si-40		
Composto	Inibição (%) <small>Cat K</small>	Inibição (%) <small>Cat V</small>	Inibição (%) <small>Cat L</small>	Inibição (%) <small>Cat S</small>
Si-33	0	0	0	0
Si-34	0	0	0	0
Si-35	0	0	0	3
Si-36	0	0	0	5
Si-37	0	26	0	8
Si-38	0	0	0	0
Si-39	0	9	0	6
Si-40	0	46	3	0

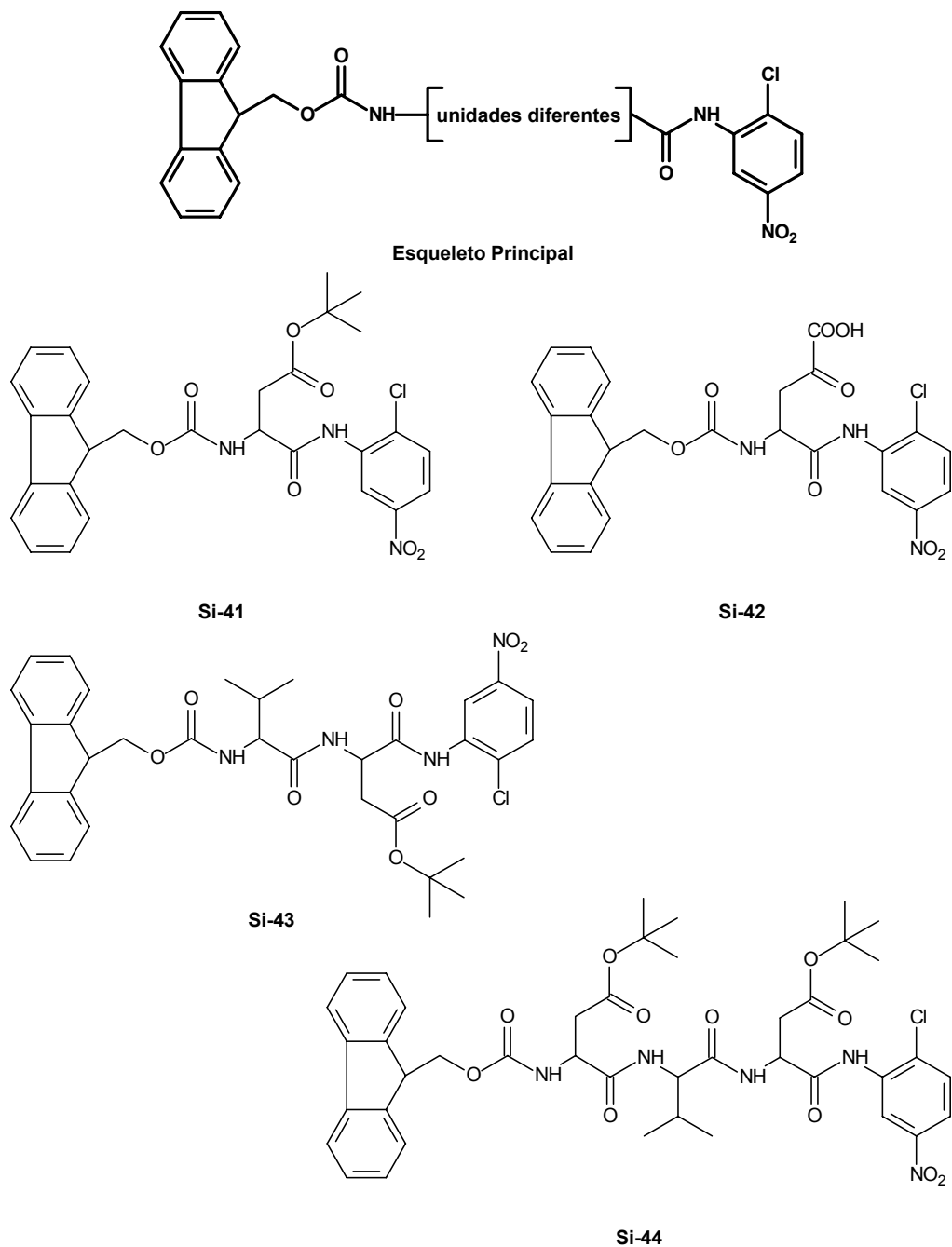
8.5.11 - Peptídeos

A TABELA 8.30 apresenta os resultados obtidos com pequenos peptídeos frente às diferentes catepsinas. A diferença estrutural destes compostos está nos espaçadores do esqueleto principal.

Uma comparação direta pode ser feita entre os compostos **Si-41** e **Si-42**, que se diferenciam pela presença de um éster isobutílico e uma função ácida, respectivamente. Ambos os compostos apresentaram inibição frente às catepsinas K (aproximadamente 50%) e V (aproximadamente 90%). Já frente à catepsina L a inibição do composto **Si-41** foi de 96% enquanto que de **Si-42** foi de 24%, sendo o primeiro quatro vezes mais potente que o segundo. Entretanto para a catepsina S os resultados foram opostos, sendo o composto **Si-42** (67%) mais ativo que o **Si-41** (0%).

O composto **Si-44**, que pode ser comparado com **Si-43** (praticamente sem atividade), foi ativo frente às catepsina K (78%) e L (52%), sendo a diferença entre eles uma ligação peptídica com um éster isobutílico.

TABELA 8.30 - Porcentagem de inibição para peptídeos com diferentes espaçadores testados na concentração de 25 μM .



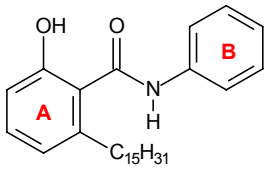
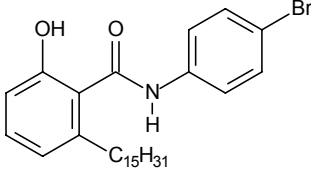
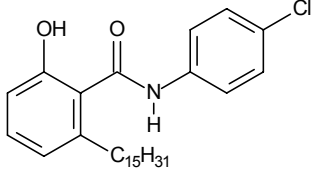
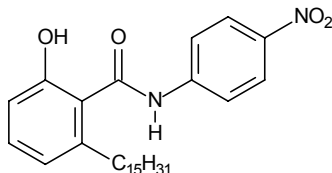
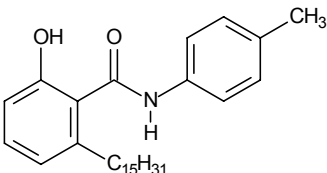
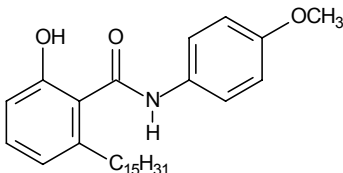
Composto	Inibição (%) <small>Cat K</small>	Inibição (%) <small>Cat V</small>	Inibição (%) <small>Cat L</small>	Inibição (%) <small>Cat S</small>
Si-41	54	90	96	0
Si-42	50	94	24	67
Si-43	0	19	24	4
Si-44	78	2	52	5

8.5.12 - Ácido anacárdico e derivados

Os derivados fenólicos sintéticos que foram avaliados neste trabalho estão divididos em oito grupos para facilitar as discussões.

A TABELA 8.31 mostra os resultados obtidos com os derivados fenólicos que apresentam diferentes substituintes no anel B. Todos os compostos apresentaram inibição significativa frente às catepsinas K, V e L, com exceção dos compostos **Si-45** e **Si-50**, sendo este último ativo somente frente à catepsina L (96%). Destaca-se o fato que o composto **Si-45** que não apresenta nenhum substituinte no anel B foi praticamente inativo. Esta classe de compostos apresentou resultados bastante expressivos e que valem à pena serem investigados mais detalhadamente.

TABELA 8.31 - Porcentagem de inibição para o grupo (I) dos derivados fenólicos testados na concentração de 25 μ M.

				
Si-45	Si-46	Si-47		
				
Si-48	Si-49	Si-50		
Composto	Inibição (%) Cat K	Inibição (%) Cat V	Inibição (%) Cat L	Inibição (%) Cat S
Si-45	25	9	12	5
Si-46	68	84	97	0
Si-47	66	78	98	0
Si-48	68	95	97	3
Si-49	50	94	97	8
Si-50	34	42	96	3

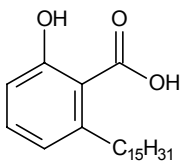
Os derivados fenólicos apresentados na TABELA 8.32 apresentam diferentes substituintes no anel C. O composto **Si-51** que não possui nenhum substituinte, foi ativo somente frente à catepsina L (74%). Já os compostos que apresentam halogênios como substituintes (**Si-52** e **Si-53**), foram ativos frente às catepsinas V e L. Nos resultados obtidos com a catepsina V, a diferença de substituinte não influenciou significativamente na atividade, ambos com aproximadamente 75% de inibição. Já para a catepsina L, o composto **Si-52** (96%) que apresenta um átomo de Br como substituinte, foi cerca duas vezes mais ativo que seu análogo **Si-53** (41%), substituído por um átomo de Cl no anel C. O composto **Si-54** que apresenta um grupo NO₂ como substituinte foi praticamente inativo.

TABELA 8.32 - Porcentagem de inibição para o grupo (II) dos derivados fenólicos testados na concentração de 25 µM.

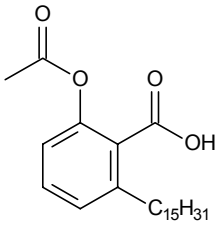
Composto	Inibição (%) Cat K	Inibição (%) Cat V	Inibição (%) Cat L	Inibição (%) Cat S
Si-51	0	0	74	3
Si-52	0	73	96	3
Si-53	8	76	41	1
Si-54	0	9	8	0

A TABELA 8.33 apresenta os resultados obtidos com os compostos **Si-55** e **Si-56**, ambos ativos frente a todas as enzimas, portanto não apresentaram seletividade. O composto sintético **Si-55** também foi testado em sua forma natural (**43**) e os resultados mostraram que o mecanismo pelo qual este composto age parece ser bastante complexo, necessitando de estudos mais detalhados, mas que não foram explorados neste trabalho.

TABELA 8.33 - Porcentagem de inibição para o grupo (III) dos derivados fenólicos testados na concentração de 25 μ M.



Si-55

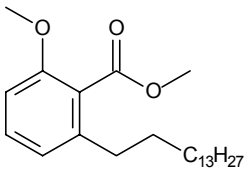


Si-56

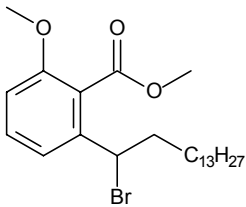
Composto	Inibição (%) <small>Cat K</small>	Inibição (%) <small>Cat V</small>	Inibição (%) <small>Cat L</small>	Inibição (%) <small>Cat S</small>
Si-55	80	81	57	60
Si-56	65	62	48	61

Os resultados mostrados na TABELA 8.34 apontam que somente o composto **Si-57** foi ativo frente à catepsina K (81%). A diferença entre os compostos **Si-57** e **Si-58** está na presença de um átomo de Br na cadeia alquílica lateral. Os demais resultados não foram significativos.

TABELA 8.34 - Porcentagem de inibição para o grupo (IV) dos derivados fenólicos testados na concentração de 25 μ M.



Si-57

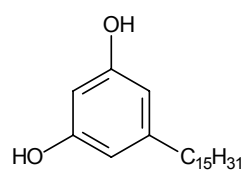


Si-58

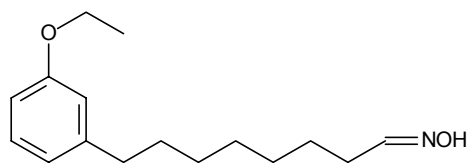
Composto	Inibição (%) <small>Cat K</small>	Inibição (%) <small>Cat V</small>	Inibição (%) <small>Cat L</small>	Inibição (%) <small>Cat S</small>
Si-57	81	0	34	3
Si-58	20	13	0	3

Na TABELA 8.35 estão descritos os resultados obtidos com diferentes derivados fenólicos, sendo dois deles (**Si-59** e **Si-60**) ativos frente à catepsina V. As estruturas destes dois compostos não apresentam correlações diretas, impossibilitando maiores conclusões. Observa-se que o composto **Si-61** (mono-hidroxilado) é praticamente inativo frente à catepsina V enquanto que seu análogo **Si-59** (di-hidroxilado) apresenta 75% de inibição.

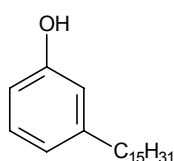
TABELA 8.35 - Porcentagem de inibição para o grupo (V) dos derivados fenólicos testados na concentração de 25 μ M.



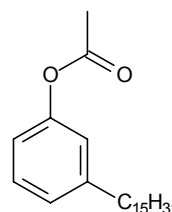
Si-59



Si-60



Si-61

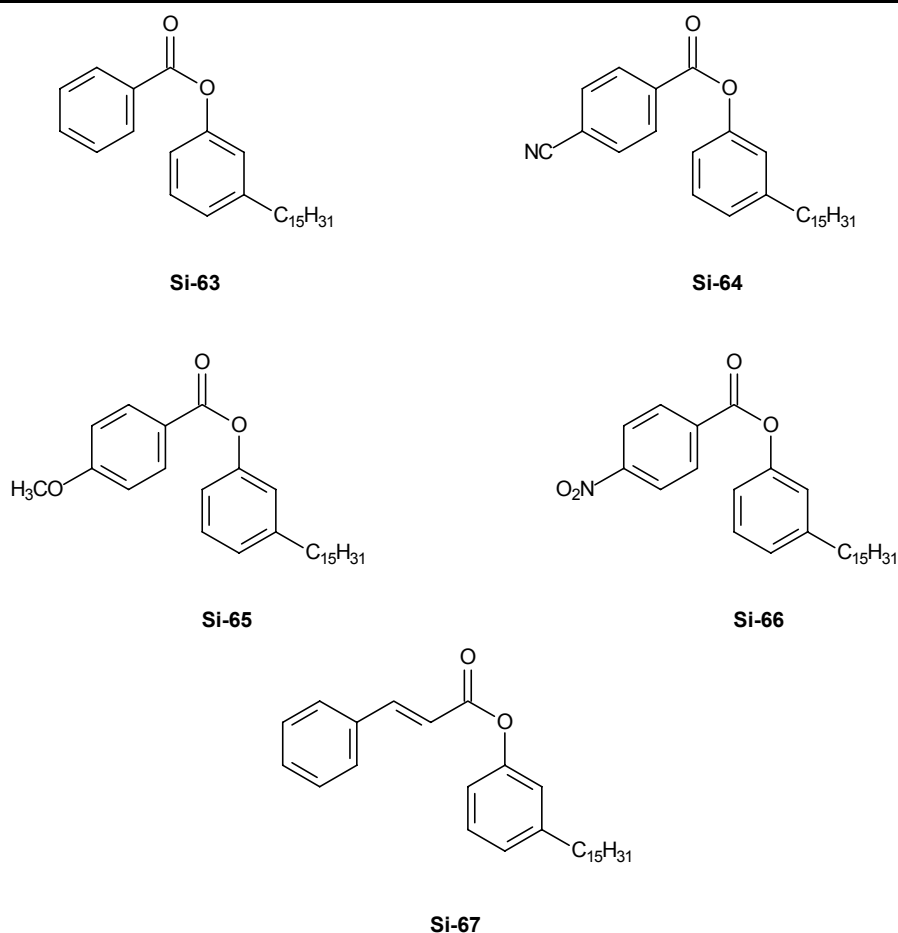


Si-62

Composto	Inibição (%) _{Cat K}	Inibição (%) _{Cat V}	Inibição (%) _{Cat L}	Inibição (%) _{Cat S}
Si-59	0	75	20	0
Si-60	0	50	6	8
Si-61	0	0	0	0
Si-62	8	0	0	0

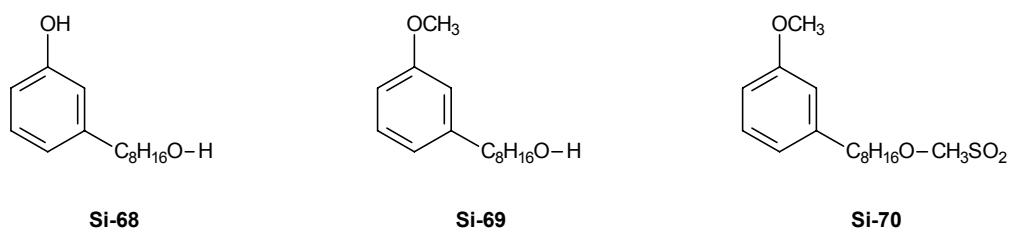
Os resultados descritos com os derivados fenólicos nas TABELAS 8.36 e 8.37 não foram significativos, pois nenhum dos compostos apresentou inibição superior a 50% na catepsinas testadas. Estes dados, embora negativos, são interessantes para estudos de estrutura x atividade.

TABELA 8.36 - Porcentagem de inibição para o grupo (VI) dos derivados fenólicos testados na concentração de 25 μ M.



Composto	Inibição (%) <small>Cat K</small>	Inibição (%) <small>Cat V</small>	Inibição (%) <small>Cat L</small>	Inibição (%) <small>Cat S</small>
Si-63	7	0	0	0
Si-64	0	32	0	0
Si-65	2	0	0	0
Si-66	0	0	0	0
Si-67	0	4	0	0

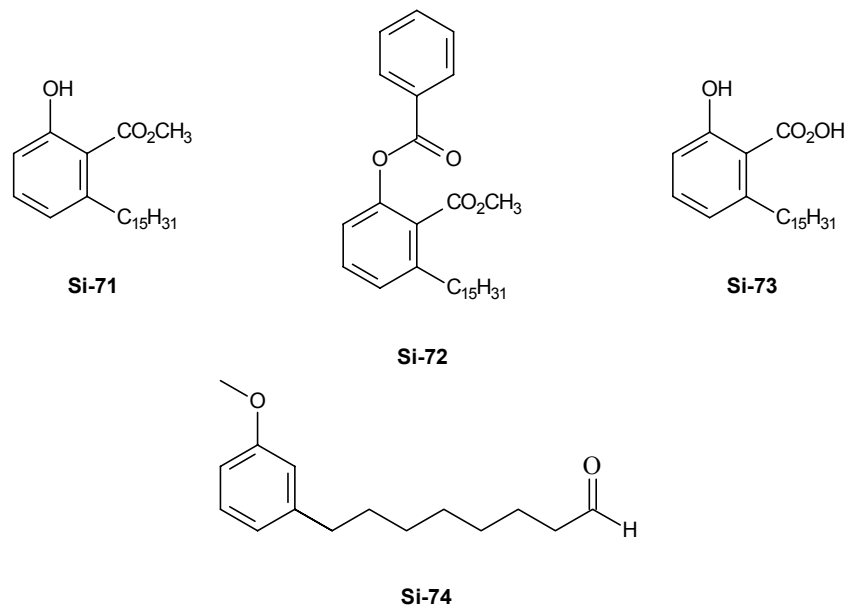
TABELA 8.37 - Porcentagem de inibição para o grupo (VII) dos derivados fenólicos testados na concentração de 25 μ M.



Composto	Inibição (%) <small>Cat K</small>	Inibição (%) <small>Cat V</small>	Inibição (%) <small>Cat L</small>	Inibição (%) <small>Cat S</small>
Si-68	4	34	0	0
Si-69	0	40	0	0
Si-70	10	2	0	0

Dos compostos apresentados na TABELA 8.38, apenas o composto **Si-73** apresentou 64% de inibição frente à catepsina V. Já seu análogo esterificado (**Si-71**) não foi ativo.

TABELA 8.38 - Porcentagem de inibição para o grupo (VIII) dos derivados fenólicos testados na concentração de 25 μ M.



Composto	Inibição (%) Cat K	Inibição (%) Cat V	Inibição (%) Cat L	Inibição (%) Cat S
Si-71	15	13	0	0
Si-72	12	27	0	0
Si-73	0	64	0	0
Si-74	8	30	0	0

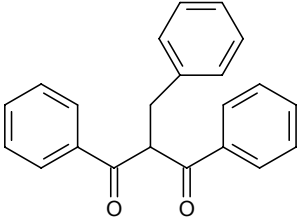
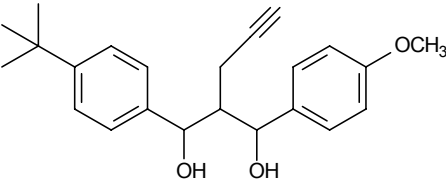
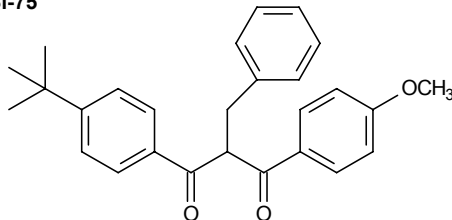
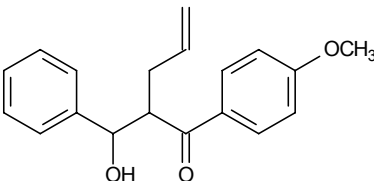
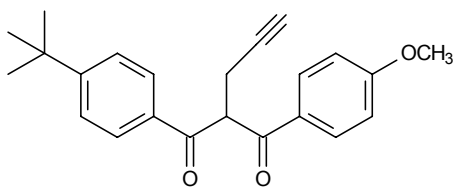
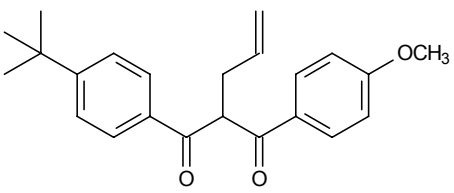
8.5.13 - Retro-chalconas sintéticas

As retro-chalconas ou dibenzoilmetanos mostraram interessantes atividades frente às catepsinas testadas (TABELA 8.39). Os compostos **Si-76** e **Si-78** não foram ativos frente a nenhuma das enzimas. Este fato pode estar correlacionado com a redução dos grupos benzoíla (de cetona para álcool), pois quando comparadas com as formas oxidadas (**Si-75** e **Si-79**), estas foram mais ativas.

Os compostos **Si-79** e **Si-80** apresentaram resultados muito semelhantes frente às catepsinas V e L, cerca de 80% e 90% respectivamente. Isto mostra que a diferença de substituinte entre as carbonilas (propargila para **Si-79** e alila para **Si-80**) não influencia na atividade. Já quando comparados com o composto

Si-77, que apresenta um grupo fenil como substituinte, este foi mais ativo frente às catepsinas K e L, com 50% e 95% de inibição respectivamente.

TABELA 8.39 - Porcentagem de inibição para retro-chalconas testadas na concentração de 25 μ M.

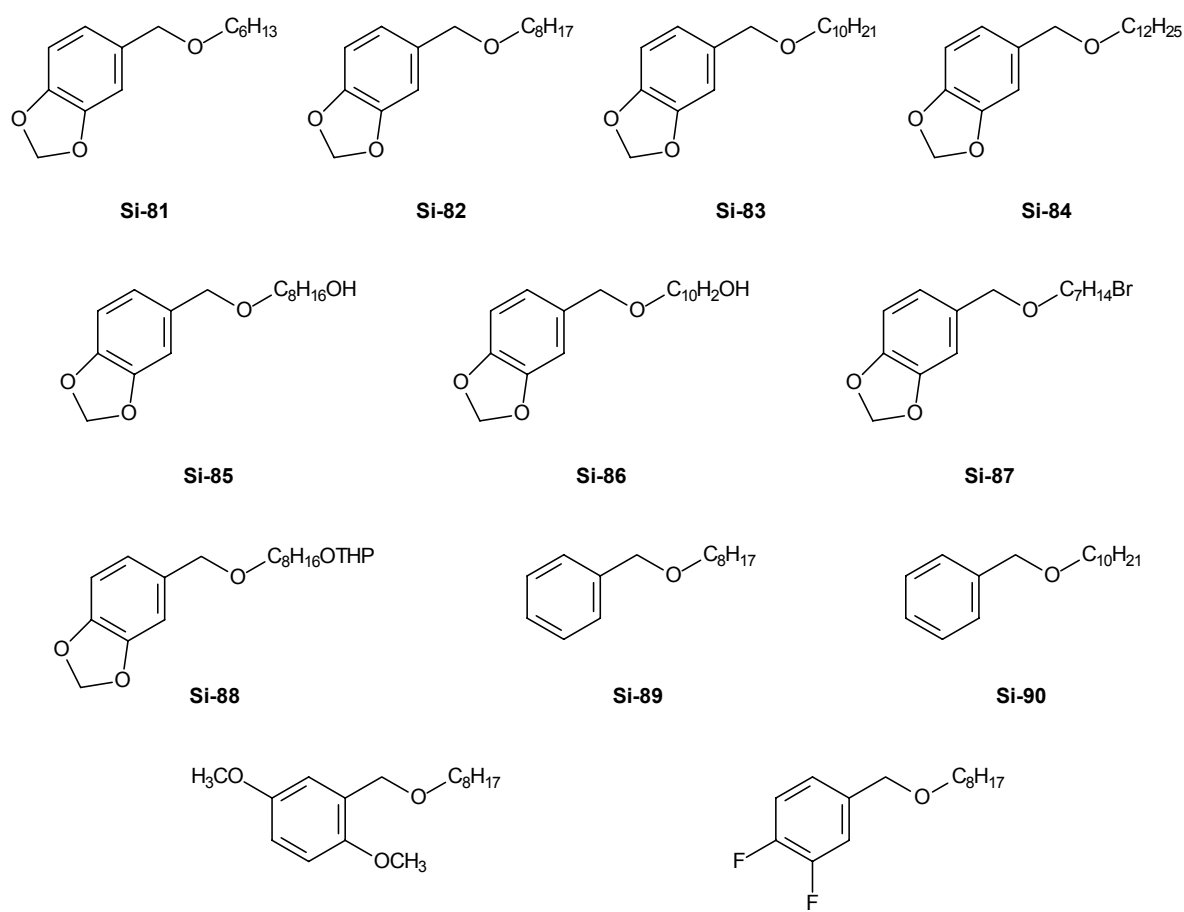
	
Si-75	Si-76
	
Si-77	Si-78
	
Si-79	Si-80

Composto	Inibição (%) _{Cat K}	Inibição (%) _{Cat V}	Inibição (%) _{Cat L}	Inibição (%) _{Cat S}
Si-75	25	38	58	9
Si-76	0	25	0	0
Si-77	50	28	95	14
Si-78	0	15	0	0
Si-79	27	82	94	0
Si-80	29	76	92	29

8.5.14 - Éteres sintéticos

Os éteres descritos na TABELA 8.40, apenas os compostos **Si-89** e **Si-90** foram ativos frente à catepsina L. A diferença entre eles são dois carbonos na cadeia lateral, sendo o composto **Si-89** mais ativo (86%) que **Si-90** (56%). Uma estratégia interessante seria a síntese de derivados com diferentes cadeias laterais para avaliação da influência do tamanho e dos substituintes.

TABELA 8.40 - Porcentagem de inibição para éteres sintéticos testados na concentração de 25 μ M.



Composto	Si-91		Si-92	
	Inibição (%) <small>Cat K</small>	Inibição (%) <small>Cat V</small>	Inibição (%) <small>Cat L</small>	Inibição (%) <small>Cat S</small>
Si-81	0	5	0	0
Si-82	0	36	0	0
Si-83	0	38	0	0
Si-84	0	20	0	6
Si-85	0	0	0	0
Si-86	0	39	0	0
Si-87	0	44	0	11
Si-88	0	26	18	9
Si-89	0	5	86	0
Si-90	0	22	56	0
Si-91	0	47	0	0
Si-92	0	45	0	0

8.6 - Busca de novos inibidores da catepsina V

Depois de realizada a triagem inicial, observou-se que os compostos testados foram mais ativos frente às catepsinas V e L. Considerando que a catepsina V é uma enzima recente e ainda pouco estudada, optou-se em realizar alguns estudos mais detalhados na busca de inibidores específicos para esta enzima. Dentre os produtos naturais testados, merecem destaque os flavonóides, cumarinas e alcalóides que apresentaram expressivas atividades frente à catepsina V. A seleção dos compostos para esta nova triagem foi baseada nos resultados obtidos anteriormente e na disponibilidade de alguns derivados sintéticos cedidos pela Profa. Dra. Arlene Gonçalves Correa do Laboratório de Síntese de Produtos Naturais, da UFSCar. Todos os compostos foram testados na concentração de 25 μ M, seguindo o protocolo padrão já estabelecido.

8.6.1 - Flavonóides sintéticos

Algumas considerações gerais devem ser feitas quanto ao potencial dos flavonóides como possíveis inibidores de catepsinas lisossomais. Extensos trabalhos sintetizando derivados de flavonóides foram publicados buscando inibidores específicos de diferentes cisteíno peptidases, sendo em sua maioria peptidases de parasitas. Em 1996, Li e colaboradores descrevera estudos de chalconas e derivados, sendo desenhados para o desenvolvimento de inibidores de cisteíno peptidases parasitárias (LI, *et al.*, 1996). Estudos com uma espécie de Moraceae mostram flavanonas preniladas como potentes inibidores da catepsina K, com IC_{50} de 840 nM. Foram isoladas ainda, duas diidrochalconas com IC_{50} de 170 e 98 nM (PATIL, *et al.*, 2002b). Os estudos descritos anteriormente utilizaram cisteíno peptidases de *Plasmodium falciparum* como modelo para modelagem molecular de chalconas, onde obteve-se um IC_{50} 200 nM em testes *in vitro* com parasitas (LI, *et al.*, 1995). Trabalhos recentes mostram ainda três biflavonas isoladas de *Taxodium mucronatum* com atividade inibitória frente à catepsina B (IC_{50} de 1,75, 1,68 e 0,55 μ M) (PAN, *et al.*, 2005) e posteriormente Zeng e colaboradores descrevem biflavonas de *Taxodium mucronatum* e *Cycas guizhouensis* com atividades frente às catepsinas B e K (ZENG, *et al.*, 2006). Estes trabalhos sugerem a potencialidade

desta classe de compostos na busca de inibidores específicos para cisteína peptidases.

Os flavonóides sintéticos testados frente à catepsina V pertencem a duas subclasses: flavonas e chalconas (FIGURA 8.1).

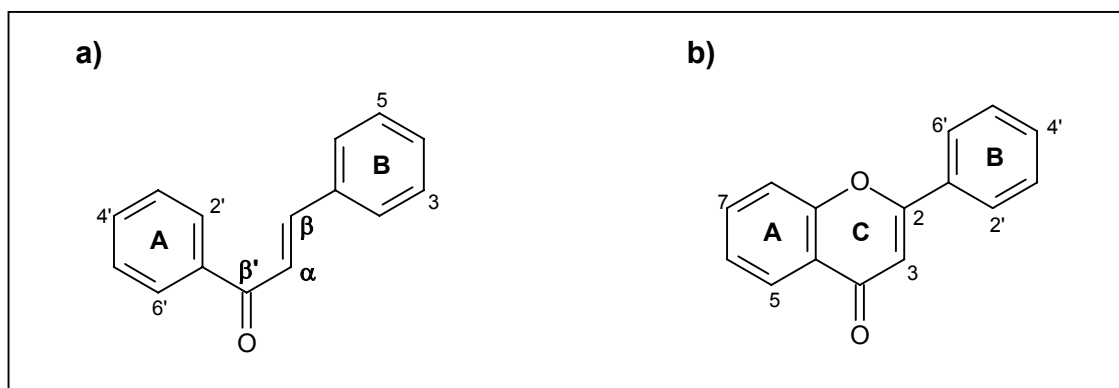


FIGURA 8.1 - Esqueleto principal de uma chalcona (a) e uma flavona (b).

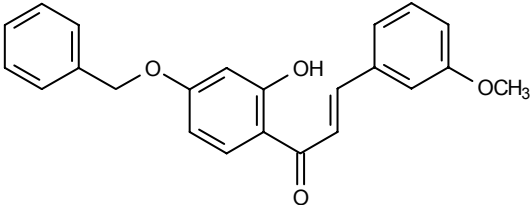
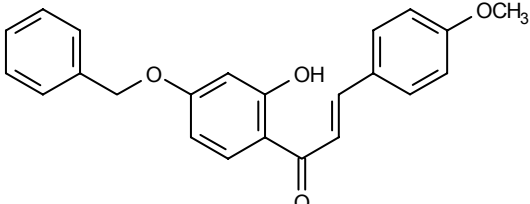
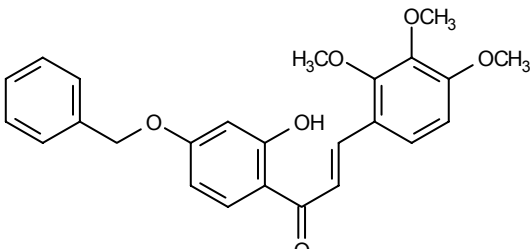
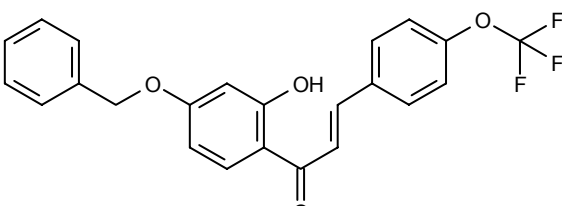
A TABELA 8.41 apresenta algumas chalconas com diferentes substituintes no anel A e B, sendo que nenhuma delas apresentou atividade inibitória significativa.

TABELA 8.41 - Porcentagem de inibição das chalconas com diferentes substituintes testadas na concentração de 25 μ M.

Composto	Estrutura	Inibição (%) <i>Cat V</i>
Si-93		36
Si-94		14
Si-95		7

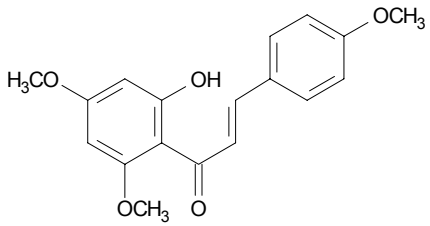
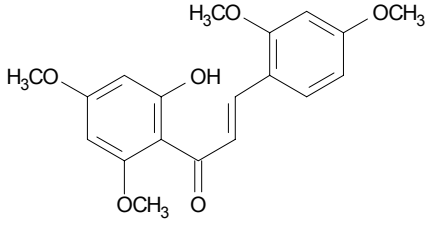
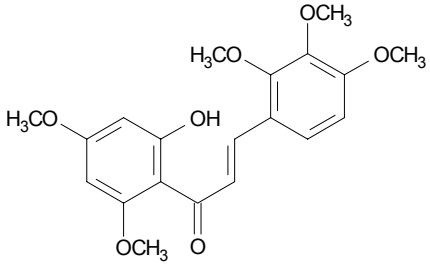
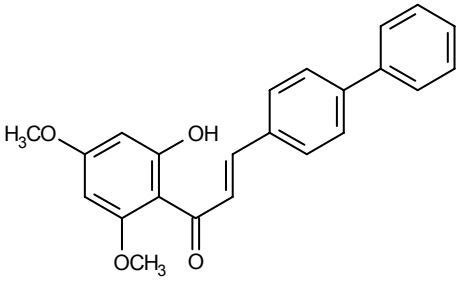
A TABELA 8.42 mostra algumas chalconas com baixo potencial de inibição, com exceção da chalcona **Si-96**, que apresentou 64% de inibição. Estes resultados sugerem que o padrão de substituição do anel A difere nas atividades, sendo o composto ativo substituído na posição 3 por um grupo metoxila.

TABELA 8.42 - Porcentagem de inibição de chalconas com diferentes substituintes no anel B, testadas na concentração de 25 μ M.

Composto	Estrutura	Inibição (%) <small>cat V</small>
Si-96		64
Si-97		21
Si-98		35
Si-99		22

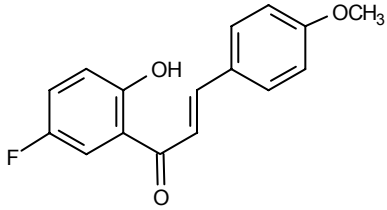
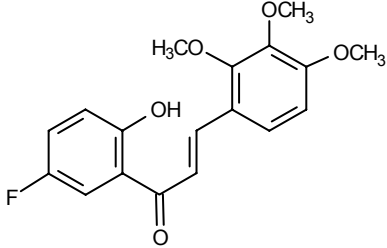
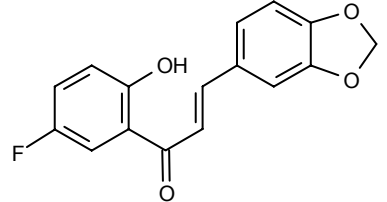
As chalconas descritas na TABELA 8.43, apresentam o mesmo padrão de substituição do anel B, sendo hidroxiladas na posição 2' e dimetoxiladas em 4' e 6'. As chalconas metoxiladas no anel A não apresentaram atividade inibitória, já a chalcona substituída na posição 4 por um grupo fenil (**Si-103**) apresentou 57% de inibição. As chalconas **Si-103** e **Si-95** podem ser comparadas diretamente, pois **Si-103** (57%) apresenta duas metoxilas no anel B (posições 4' e 6') enquanto que **Si-95** (7%) apresenta uma única metoxila na posição 5'.

TABELA 8.43 - Porcentagem de inibição de chalconas dimetoxiladas no anel B e com diferentes substituintes do anel A, testadas na concentração de 25 μ M.

Composto	Estrutura	Inibição (%) <small>Cat V</small>
Si-100		24
Si-101		22
Si-102		1
Si-103		57

As chalconas **Si-104** e **Si-106** apresentaram cerca de 50% de inibição (TABELA 8.44). Os dados desta tabela podem ser correlacionados com os dados das TABELAS 8.42 e 8.43. No caso das chalconas **Si-104** (53%), **Si-100** (24%) e **Si-97** (21%), a substituição na posição 5' por um átomo de flúor, potencializou a atividade inibitória. Já as chalconas trimeoxiladas no anel B (**Si-105**, **Si-102** e **Si-98**) não apresentaram atividade significativa, mostrando que a diferença dos substituintes do anel A não potencializa a atividade.

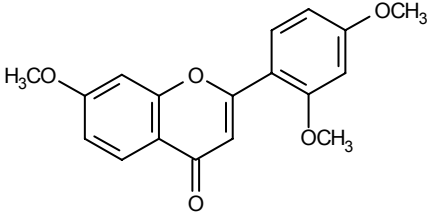
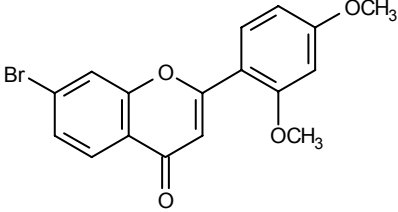
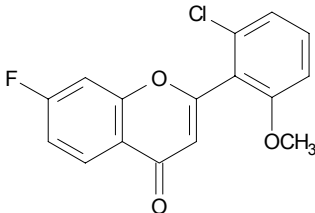
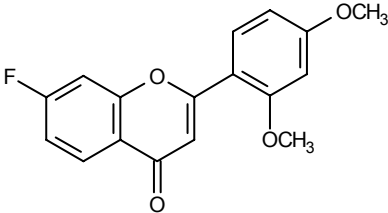
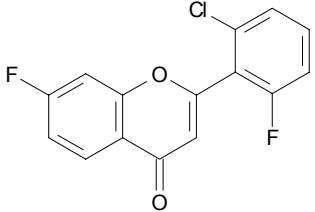
TABELA 8.44 - Porcentagem de inibição das chalconas substituídas por metoxilas no anel A, testadas na concentração de 25 μ M.

Composto	Estrutura	Inibição (%) <small>Cat V</small>
Si-104		53
Si-105		26
Si-106		48

A TABELA 8.45 apresenta flavonas com diferentes substituintes. Todas as substituições do anel A são no carbono 7, enquanto que as substituições do anel B são em posições variadas. Os compostos **Si-107**, **Si-108** e **Si-110** apresentam o mesmo padrão de substituição no anel B, sendo metoxilados na posição 2' e 4', todos com 100% de inibição. Vale ressaltar que as chalconas **Si-93** apresenta 36% de inibição enquanto que a respectiva flavona (**Si-107**) apresenta 100%, sendo a diferença entre elas apenas a ciclização do anel C.

A importância dos substituintes do anel B pode ser observada nas flavonas **Si-110** (100%), **Si-111** (19%) e **Si-109** (18%), onde somente a flavona dimetoxilada foi ativa.

TABELA 8.45 - Porcentagem de inibição de flavonas com diferentes substituintes no anel A e B, testadas na concentração de 25 μ M.

Composto	Estrutura	Inibição (%) Cat V
Si-107		100
Si-108		100
Si-109		18
Si-110		100
Si-111		19

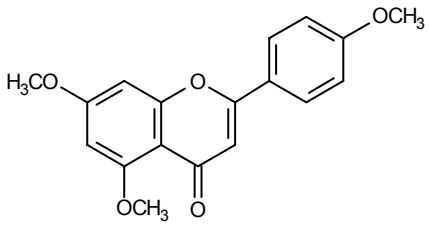
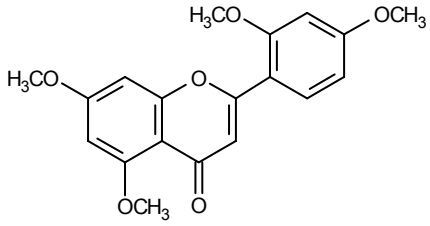
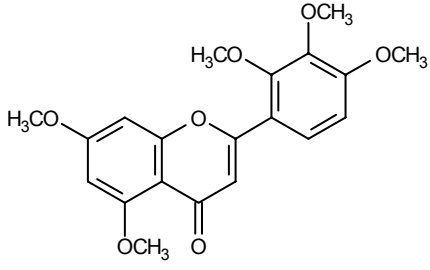
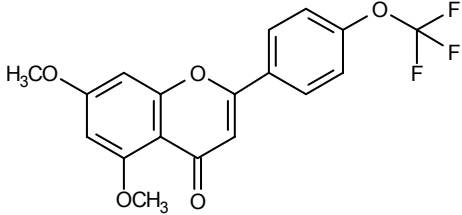
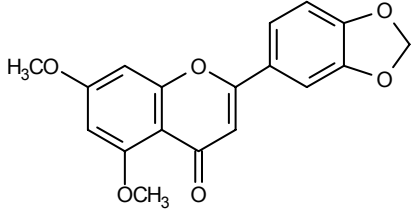
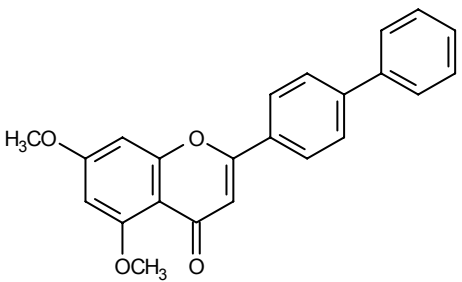
A TABELA 8.46 apresenta algumas flavonas com diferentes substituintes no anel B e com considerável potencial inibitório. As flavonas **Si-113** e **Si-117** apresentaram 100% de inibição, enquanto que as **Si-118** e **Si-112** apresentaram 85% e 72% de atividade, respectivamente. Já as flavonas **Si-115** e **Si-116** apresentaram cerca de 50% de atividade. A atividade inibitória da flavona **Si-114** não pode ser quantificada pelo fato deste composto apresentar fluorescência intrínseca, ou seja, sua fluorescência foi maior que a do controle. As flavonas descritas na TABELA 8.46 possuem maior atividade inibitória que suas respectivas chalconas (TABELA 8.42), com exceção da flavona **Si-112**.

TABELA 8.46 - Porcentagem de inibição de flavonas testadas na concentração de 25 μ M.

Composto	Estrutura	Inibição (%) <small>Cat V</small>
Si-112		72
Si-113		100
Si-114		ND
Si-115		52
Si-116		56
Si-117		100
Si-118		85

Os compostos apresentados na TABELA 8.47 são flavonas com diferentes substituintes no anel B. Destacam-se desse grupo os compostos **Si-119** (100%), **Si-120** e **Si-123** (ambos com cerca de 50%). Observa-se que suas respectivas chalconas, **Si-100** (24%) e **Si-102** (1%), não apresentaram potencial inibitório significativo. A atividade da flavona **Si-122** não pôde ser quantificada, pois a fluorescência detectada para este composto foi maior que a fluorescência do controle.

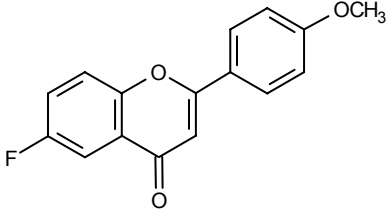
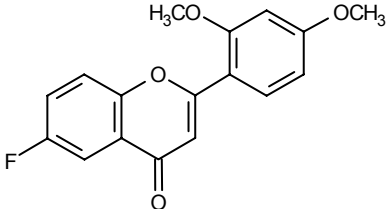
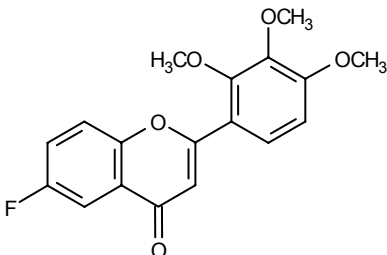
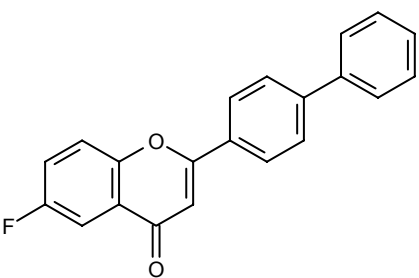
TABELA 8.47 - Porcentagem de inibição de flavonas dimetoxiladas no anel A testadas na concentração de 25 μ M.

Composto	Estrutura	Inibição (%) Cat V
Si-119		100
Si-120		56
Si-121		6
Si-122		ND
Si-123		51
Si-124		26

A TABELA 8.48 apresenta flavonas substituídas com um átomo de flúor na posição 6 do anel A e com significativo potencial inibitório. Os compostos **Si-125** e **Si-126** apresentaram 100% de inibição enquanto que **Si-127** e **Si-128** apresentaram 84% e 74% de inibição, respectivamente. As flavonas da TABELA

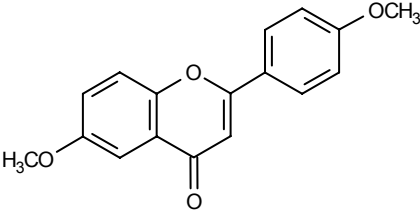
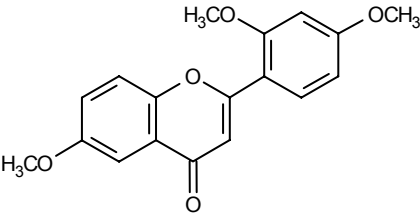
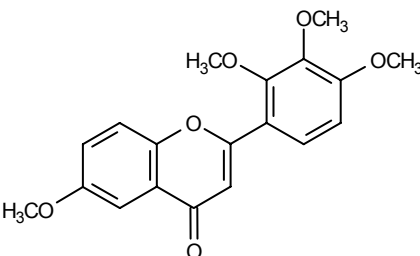
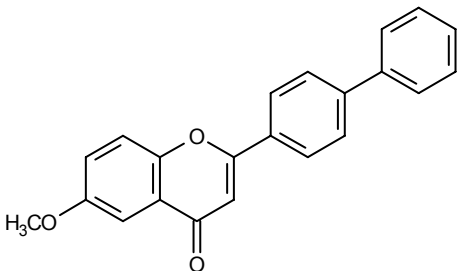
8.48 apresentam um melhor potencial inibitório, que suas respectivas chalconas da TABELA 8.44.

TABELA 8.48 - Porcentagem de inibição de flavonas substituídas na posição 6 do anel A por um átomo de flúor, testadas na concentração de 25 μ M.

Composto	Estrutura	Inibição (%) <small>Cat V</small>
Si-125		100
Si-126		100
Si-127		84
Si-128		74

Na TABELA 8.49 estão descritas flavonas metoxiladas na posição 6 do anel A. No anel B encontram-se diferentes substituintes. As flavonas **Si-129** e **Si-132** apresentaram inibição significativa, 100% e 65% de inibição, respectivamente. Já as flavonas **Si-130** e **Si-131** apresentaram aproximadamente 35% de atividade inibitória. As chalconas análogas as flavonas **Si-130** e **Si-132** não apresentaram atividade inibitória expressiva, 36% e 7% respectivamente.

TABELA 8.49 - Porcentagem de inibição de flavonas substituídas na posição 6 do anel A com um grupo metoxila, testadas na concentração de 25 µM.

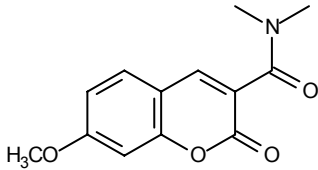
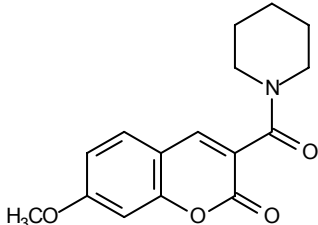
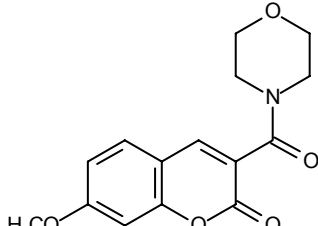
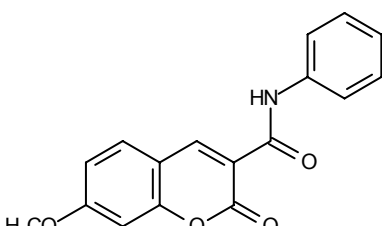
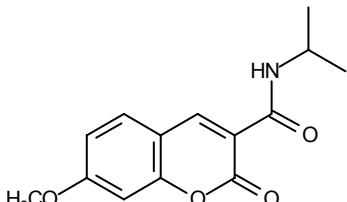
Composto	Estrutura	Inibição (%) <small>Cat V</small>
Si-129		100
Si-130		30
Si-131		35
Si-132		65

De um modo geral as flavonas foram mais ativas que suas respectivas chalconas. As flavonas mais ativas foram aquelas que apresentaram metoxilas como substituintes no anel B, especialmente na posição 4'. Quanto a influência dos substituintes do anel A, nada pode ser afirmado com precisão, pois a atividade inibitória parece estar mais associada ao anel B.

8.6.2 - Cumarinas sintéticas

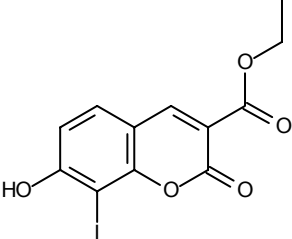
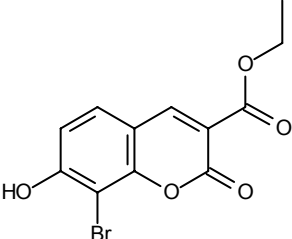
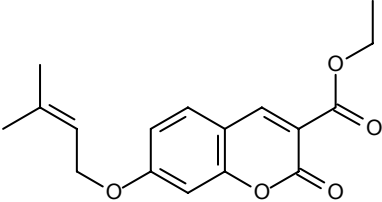
As cumarinas sintéticas metoxiladas na posição 7 (TABELA 8.50) não mostraram ser promissoras como inibidores da catepsina V.

TABELA 8.50 - Porcentagem de inibição de cumarinas metoxiladas na posição 7, testadas na concentração de 25 μ M.

Composto	Estrutura	Inibição (%) Cat V
Si-133		10
Si-134		21
Si-135		26
Si-136		16
Si-137		2

A TABELA 8.51 mostra algumas cumarinas com potencial atividade inibitória. As cumarinas **Si-138** e **Si-139** (substituídas na posição 7 por uma hidroxila e na posição 8 por um átomo de halogênio) apresentaram 100% de inibição, mostrando que a mudança de halogênio não alterou a atividade. Já a cumarina **Si-140** (substituída somente na posição 7) apresentou 70% de inibição.

TABELA 8.51 - Porcentagem de inibição de cumarinas testadas na concentração de 25 μM .

Composto	Estrutura	Inibição (%) <small>Cat V</small>
Si-138		100
Si-139		100
Si-140		70

8.6.3 - Alcalóides e intermediários sintéticos

As estruturas dos intermediários sintéticos foram numeradas de acordo com a numeração utilizada para os alcalóides acridônicos aos quais eles precedem.

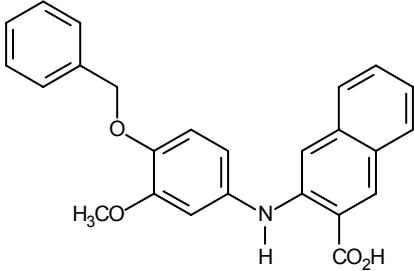
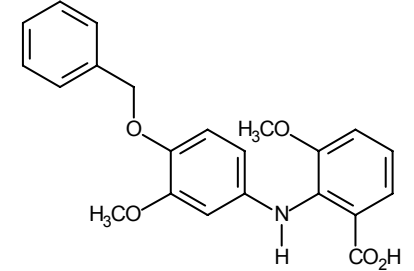
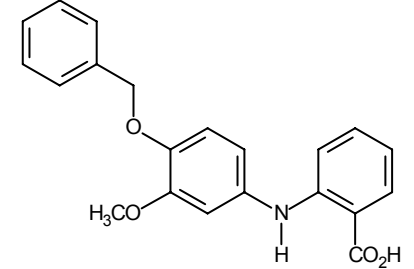
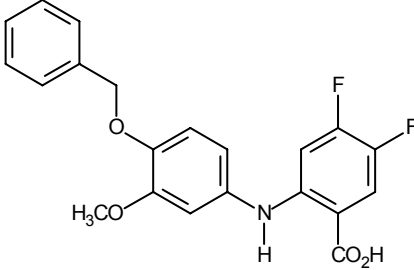
A TABELA 8.52 apresenta alguns intermediários que apresentaram inibição superior a 50%, merecendo destaque os compostos **Si-143** e **Si-144**, ambos com aproximadamente 90% de inibição, sugerindo que a diferença de posição do substituinte no anel B não altera a atividade. Já o composto **Si-145** apresentou 97% de atividade inibitória, mostrando que a ausência de substituinte na posição 2 do anel A melhora a atividade.

TABELA 8.52 - Porcentagem de inibição dos intermediários sintéticos com diferentes substituintes no anel A e B, testados na concentração de 25 μ M.

Composto	Estrutura	Inibição (%) Cat V
Si-141		59
Si-142		75
Si-143		88
Si-144		89
Si-145		97

Os intermediários sintéticos mostrados na TABELA 8.53 apresentam diferentes substituintes do anel A. Os compostos **Si-146** e **Si-149** apresentaram cerca de 100% de inibição, mostrando que as substituições nas posições 1 e 2, potencializaram a atividade destes compostos. Já a substituição na posição 9 não influenciou significativamente (**Si-147** e **Si-148**).

TABELA 8.53 - Porcentagem de inibição dos intermediários sintéticos com diferentes substituintes no anel A e metoxilados na posição 6, testados na concentração de 25 μM .

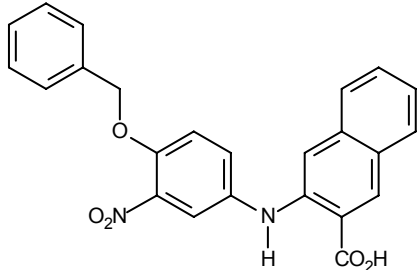
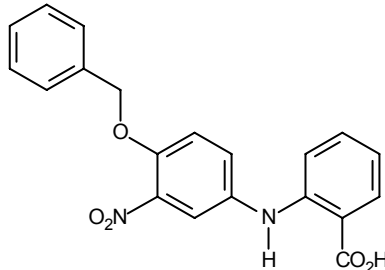
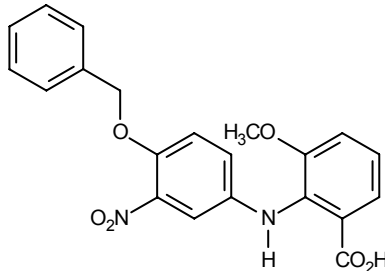
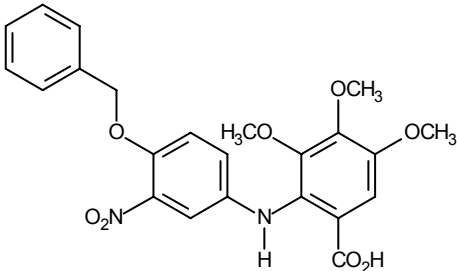
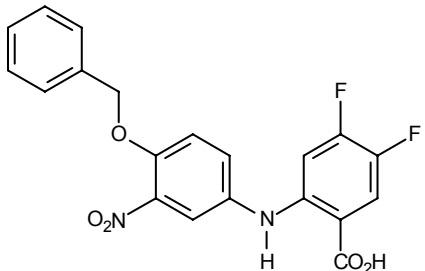
Composto	Estrutura	Inibição (%) <small>Cat V</small>
Si-146		94
Si-147		50
Si-148		40
Si-149		98

Todos os compostos descritos na TABELA 8.54 apresentaram atividade inibitória bastante expressiva, mostrando que a diferença de substituintes no anel A não influenciou nos resultados.

Os compostos substituídos na posição 6 por um grupo NO_2 (TABELA 8.54) podem ser diretamente comparados com seus análogos substituídos por um grupo OCH_3 (TABELA 8.53). Os compostos Si-150 e Si-154 e seus análogos (**Si-146** e **Si-149**, respectivamente) apresentaram atividade equivalentes (aproximadamente 100% de inibição). Já os análogos dos compostos **Si-151** e **Si-152** (ambos com

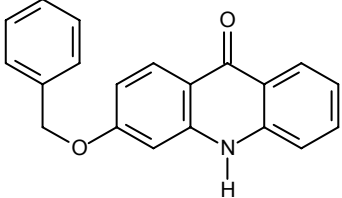
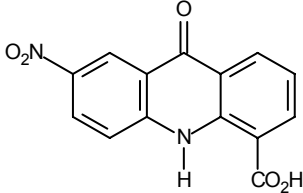
aproximadamente 100% de inibição) tiveram a atividade reduzida pela metade (**Si-148** (40%) e **Si-147** (50%).

TABELA 8.54 - Porcentagem de inibição dos intermediários sintéticos com diferentes substituintes no anel A e substituídos na posição 6 por um grupo NO₂, testados na concentração de 25 μM.

Composto	Estrutura	Inibição (%) _{cat V}
Si-150		95
Si-151		98
Si-152		97
Si-153		94
Si-154		100

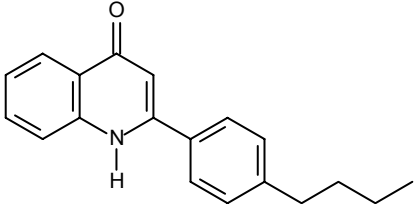
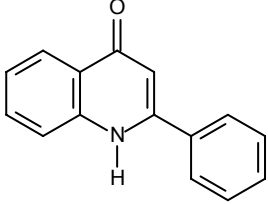
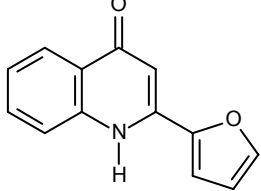
Os alcalóides acridônicos descritos na TABELA 8.55 apresentaram 100% de inibição, evidenciando a potencialidade desta classe de compostos. A falta de um maior número de estruturas impossibilitou maiores conclusões.

TABELA 8.55 - Porcentagem de inibição dos alcalóides acridônicos testados na concentração de 25 μ M.

Composto	Estrutura	Inibição (%) <small>cat V</small>
Si-155		99
Si-156		98

Os alcalóides descritos na TABELA 8.56 são do tipo 4-quinolínico, substituídos na posição 2. Os compostos **Si-157** (100%) e Si-158 (31%) são substituídos na posição 2 por um grupo fenil. No entanto o composto **Si-147** apresenta um grupo fenil *para*-substituído, o que o torna mais ativo que seu análogo sem substituinte (**Si-158**). Já o composto substituído na posição 2 por um anel furano, apresentou atividade inibitória moderada (58%).

TABELA 8.56 - Porcentagem de inibição dos alcalóides 4-quinolínicos-2-substituídos, testados na concentração de 25 μ M.

Composto	Estrutura	Inibição (%) <small>Cat V</small>
Si-157		100
Si-158		31
Si-159		58

8.7 - Determinação do valor de K_m para Z-FR-MCA frente à catepsina V

Conforme citado anteriormente, para a realização dos ensaios cinéticos, inicialmente foi determinado o valor de K_m para o Z-FR-MCA frente às catepsinas K, V, L e S. Considerando que os compostos avaliados foram mais promissores frente à catepsina V, por questão meramente ilustrativa, optou-se em realizar o detalhamento do cálculo do valor de K_m para esta enzima. Experimentalmente isto foi possível através de medidas da velocidade inicial de reação para diferentes concentrações crescentes de substrato. Os dados obtidos foram submetidos ao método de regressão não-linear de melhor ajuste, originando o gráfico mostrado na FIGURA 8.1.

De acordo com a equação de Michaelis-Menten, a velocidade de reação varia em função de V_{max} , da concentração de substrato e do K_m .

$$V = V_{max} \times [S] / K_m + [S] \quad (2)$$

Através dos dados experimentais, determinou-se o valor de K_m para o Z-FR-MCA de 6,2 μM . Por conveniência, foi estabelecida uma concentração padrão de Z-FR-MCA de 10 μM para a realização dos ensaios cinéticos, obtendo-se a relação $[S]/K_m$ igual a 1,6 para a catepsina V.

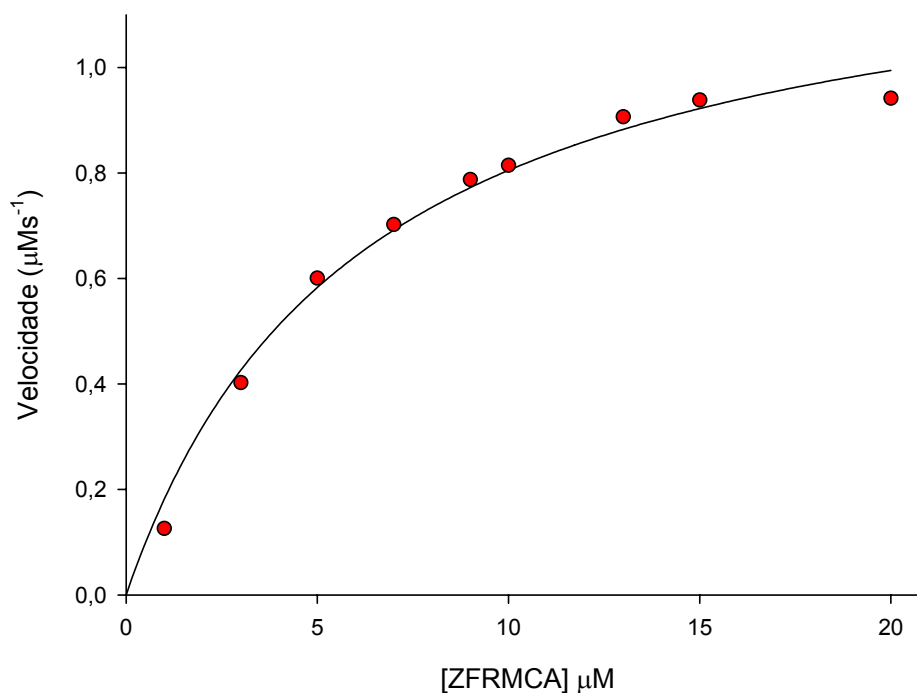


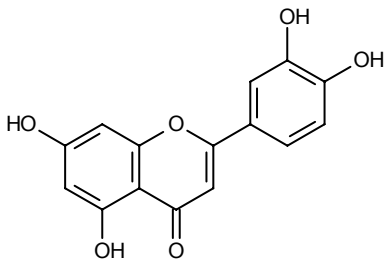
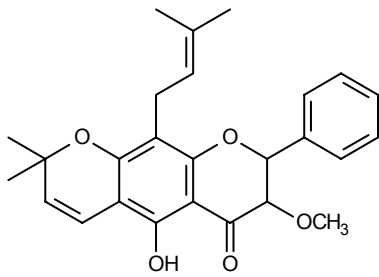
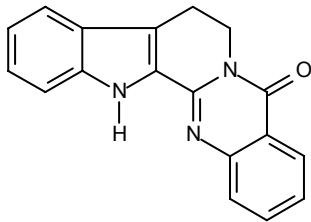
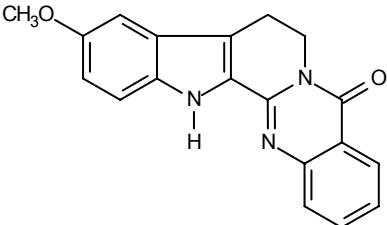
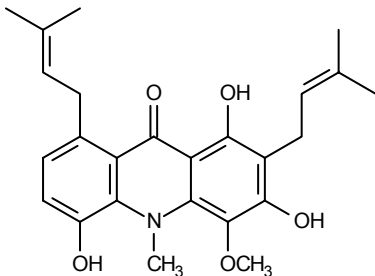
FIGURA 8.1 - Curva para determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) do substrato Z-FR-MCA frente à catepsina V.

Quando se avaliam candidatos a inibidores através de ensaios de cinética enzimática, é importante que se trabalhe com concentrações de substrato próximas ao valor de K_m , pois a utilização indevida de altas ou baixas concentrações de substrato pode levar a problemas experimentais para a identificação de inibidores competitivos.

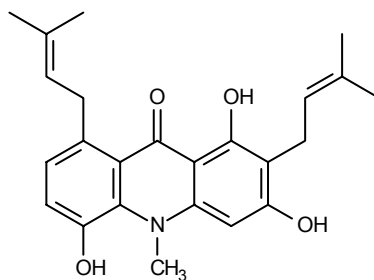
8.8 - Determinação da potência (IC_{50}) para os melhores inibidores da catepsina V

A triagem bioquímica inicial tinha como objetivo identificar a faixa de potência dos compostos a serem estudados como inibidores. Dentre os compostos testados merecem destaque alguns alcalóides e flavonóides que tiveram seus valores de IC_{50} determinados (TABELA 8.57).

TABELA 8.57 - Avaliação da potência da série de produtos naturais frente à catepsinaV.

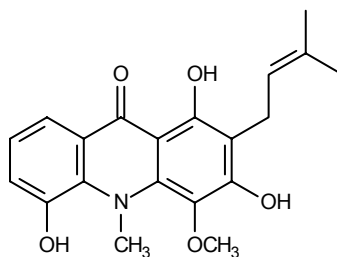
Inibidor	Estrutura	IC ₅₀ (μM)
62		2,5 ± 0,5
77		13,5 ± 5,3
97		4,8 ± 0,6
98		1,8 ± 0,2
101		24,0 ± 10,7

102



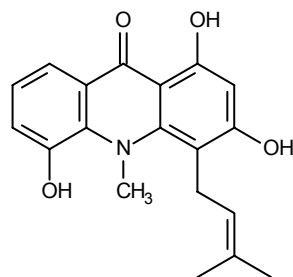
$3,9 \pm 0,9$

103



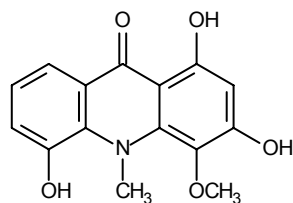
200 ± 18

104



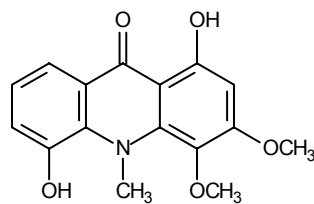
$25,7 \pm 4,9$

105



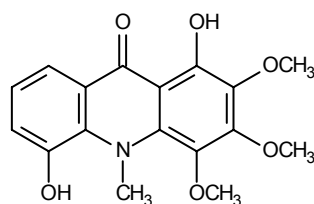
$9,8 \pm 2,5$

106

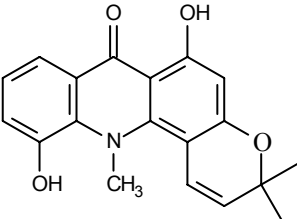
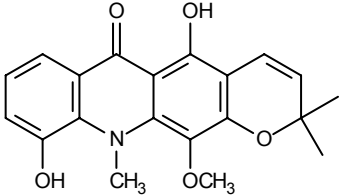
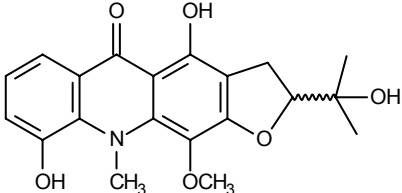
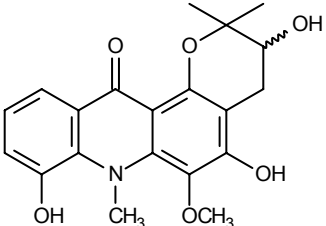


$2,2 \pm 0,6$

107



$1,2 \pm 0,6$

108		48,2 ± 5,0
109		56,4 ± 18,3
110		5,2 ± 1,3
111		2,8 ± 0,7

O fator de potência desta série de produtos naturais é representado pela razão entre os compostos de maior (**103**, $IC_{50} = 200 \mu M$) e menor (**107**, $IC_{50} = 1,2 \mu M$) potência ($IC_{50}^{>potência} / IC_{50}^{<potência}$). O fator de potência deste conjunto é da ordem de 166,67, sendo considerado um conjunto de moderada atividade, mas de grande valia, visto que são estruturas naturais, sem modificações planejadas e quimicamente inéditas para a enzima alvo estudada. Os dados obtidos também foram importantes para identificar os compostos mais ativos que posteriormente foram estudados por modelagem molecular.

8.9 - Determinação do mecanismo de ação e do valor de K_i

A determinação da afinidade do inibidor pela enzima alvo na formação do complexo E•I é de grande interesse no processo para descoberta de candidatos a novos fármacos. Esta afinidade é definida pelo valor de K_i e pode ser determinada através de dados cinéticos obtidos em experimentos específicos para determinação do mecanismo de ação.

Dentre os compostos que tiveram os valores de IC_{50} determinados, selecionaram-se os inibidores mais potentes para determinação do mecanismo de inibição e dos valores de K_i . Na TABELA 8.58 estão apresentados os valores de K_i para os inibidores estudados.

TABELA 8.58 - Determinação da afinidade para uma série de alcalóides frente à catepsina V.

Inibidor	IC_{50} (μM)	K_i (μM)	IC_{50}/K_i
97	4,8	2,97	1,6
98	1,8	0,62	2,9
102	3,9	1,16	3,4
104	25,7	10,31	2,5
105	9,8	4,22	2,3
106	2,2	1,03	2,1
107	1,2	0,24	5,0
110	5,2	4,36	1,2
111	2,8	1,68	1,7

A determinação da afinidade para esta série de alcalóides apresenta uma boa consistência, evidenciada pela razão IC_{50}/K_i que varia entre 1,2 e 5,0 (um fator 4,17) dentro da série. Considerando que a série possui inibidores de alta afinidade (**107**, $K_i = 0,24 \mu M$) e média afinidade (**104**, $K_i = 10,31 \mu M$), a variação da razão IC_{50}/K_i foi bastante pequena.

Os experimentos para determinação do mecanismo de inibição foram realizados de acordo com os procedimentos descritos anteriormente, gerando para

cada inibidor um gráfico de duplo-recíproco, que é também chamado de gráfico de Lineweaver-Burk (FIGURA 8.2 a 8.10). Todos os gráficos apresentam quatro curvas, sendo uma delas referente ao controle e as demais a diferentes concentrações de inibidor. A curva de menor inclinação refere-se à ausência de inibidor e as demais a concentrações crescentes do mesmo.

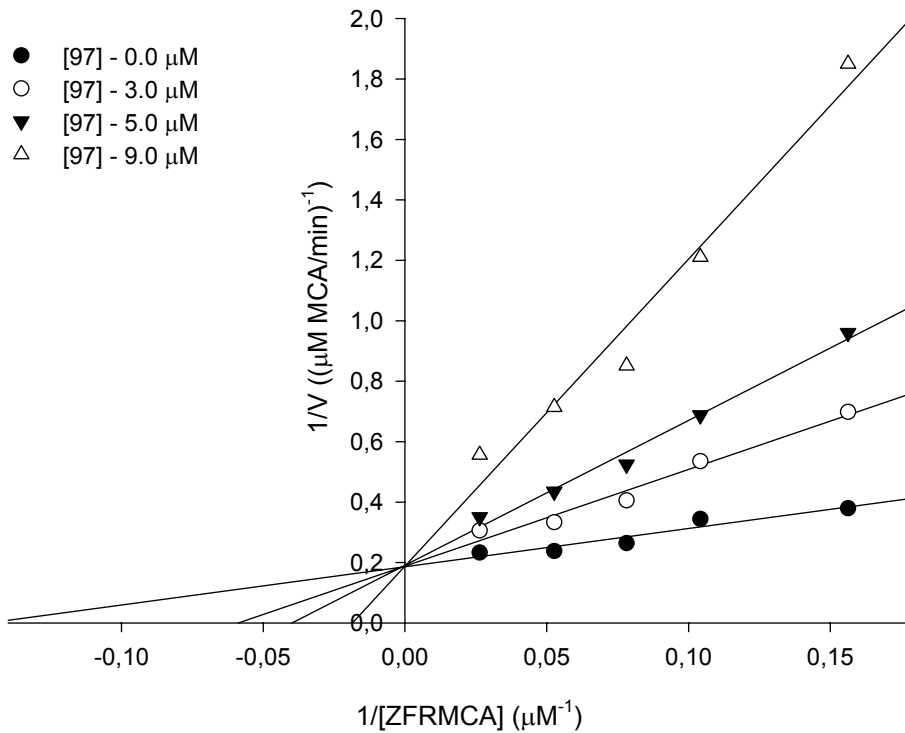


FIGURA 8.2 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o inibidor **97**.

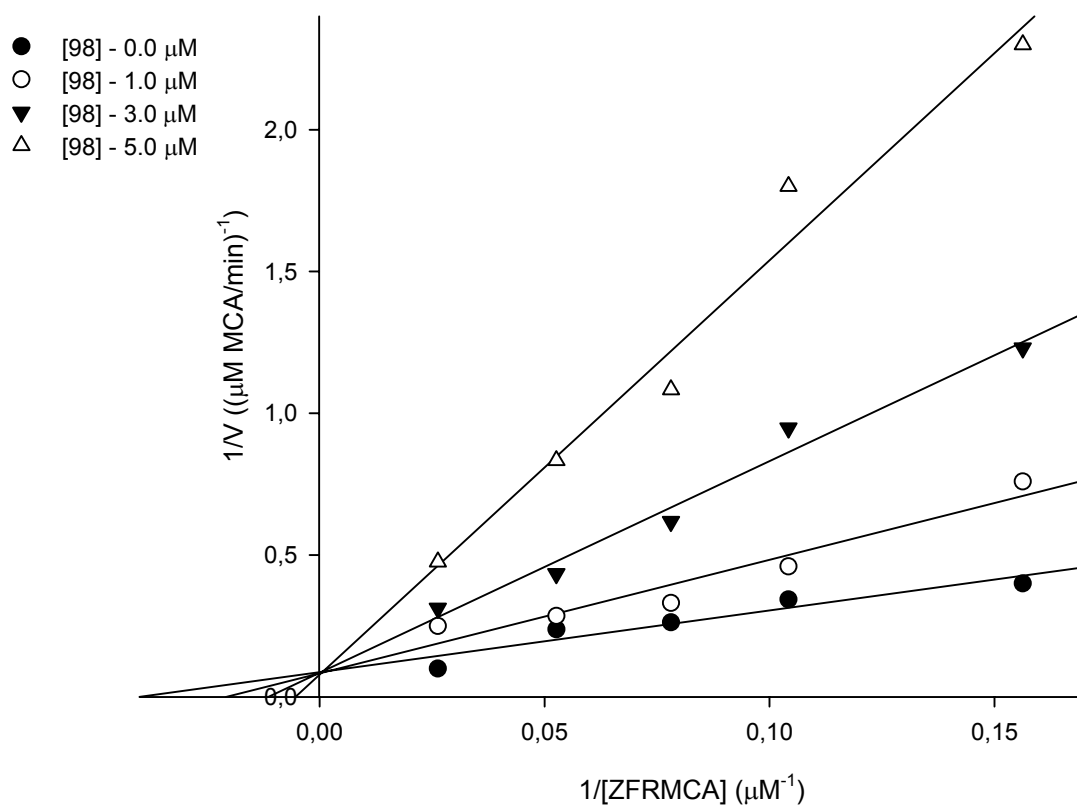


FIGURA 8.3 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o inibidor **98**.

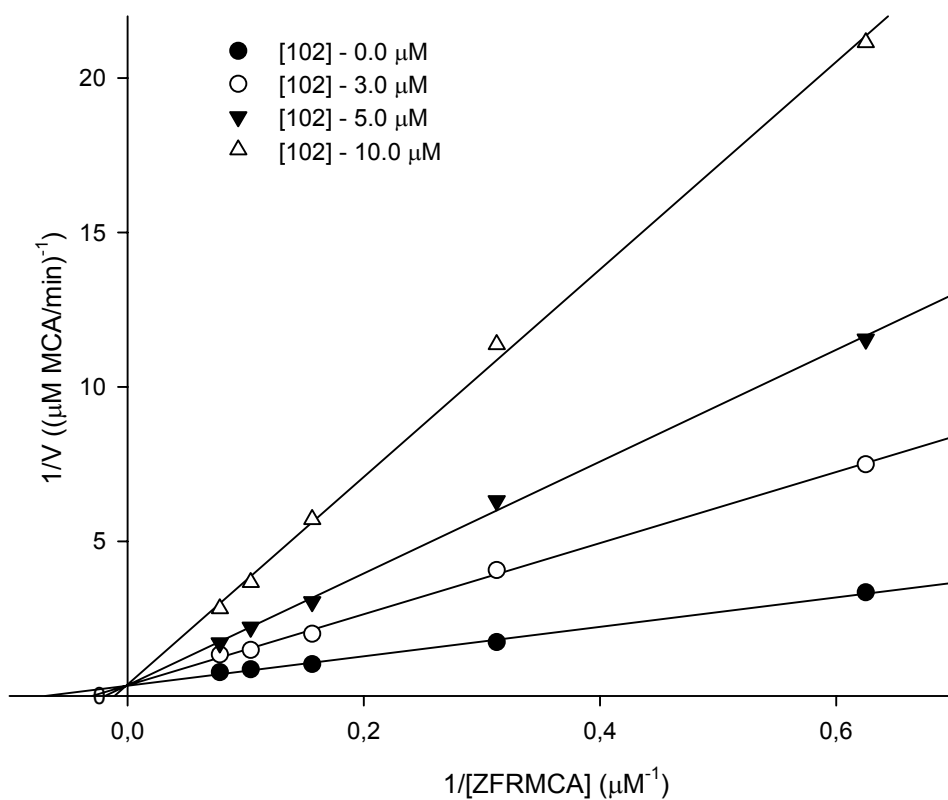


FIGURA 8.4 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o inibidor **102**.

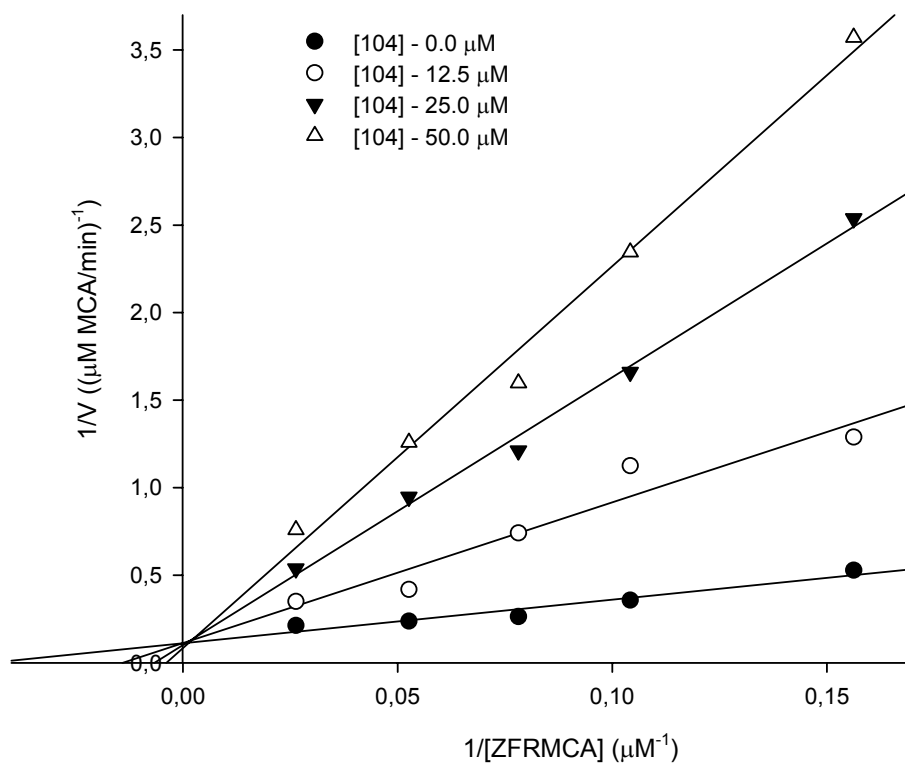


FIGURA 8.5 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o inibidor **104**.

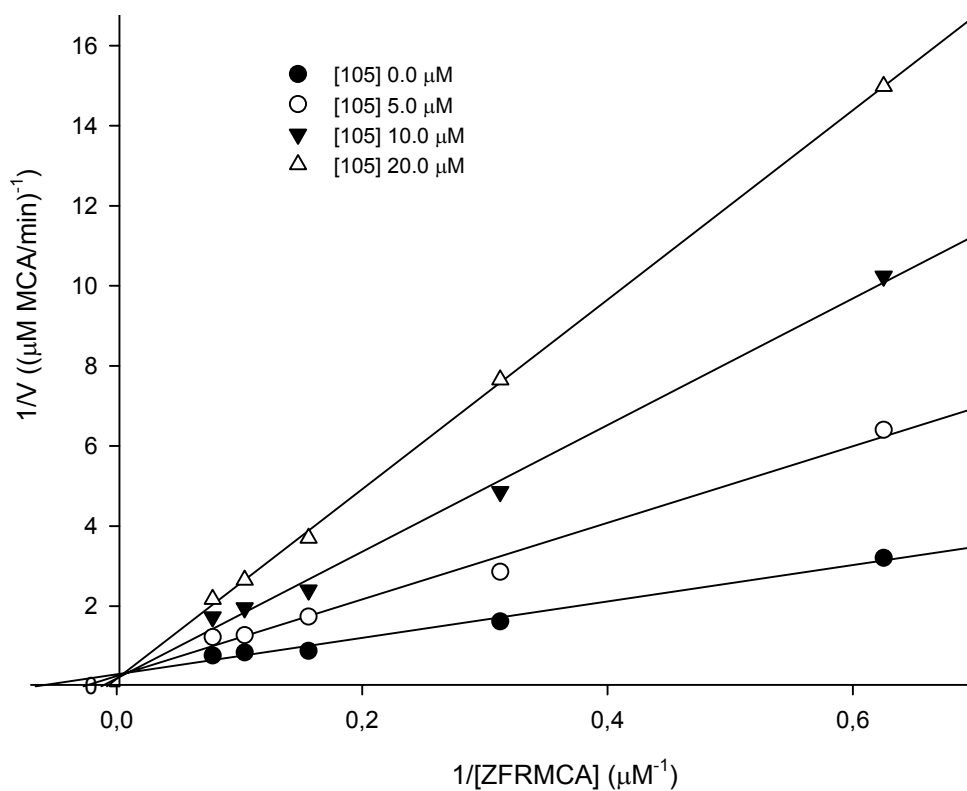


FIGURA 8.6 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o inibidor **105**.

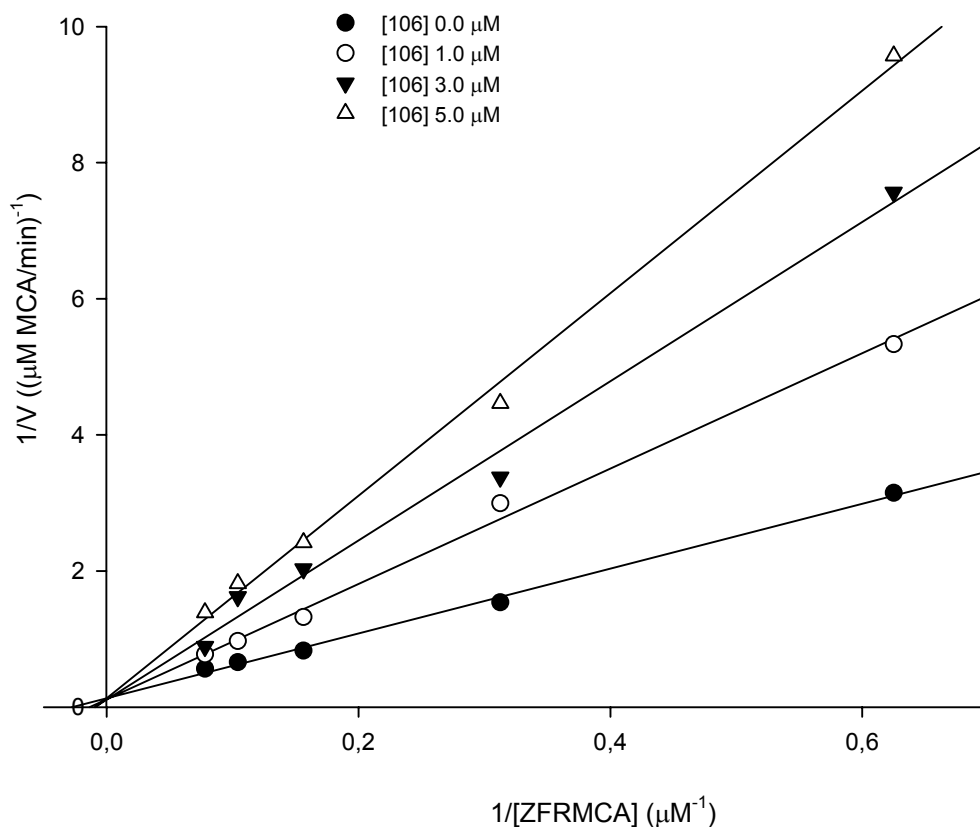


FIGURA 8.7 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o inibidor **106**.

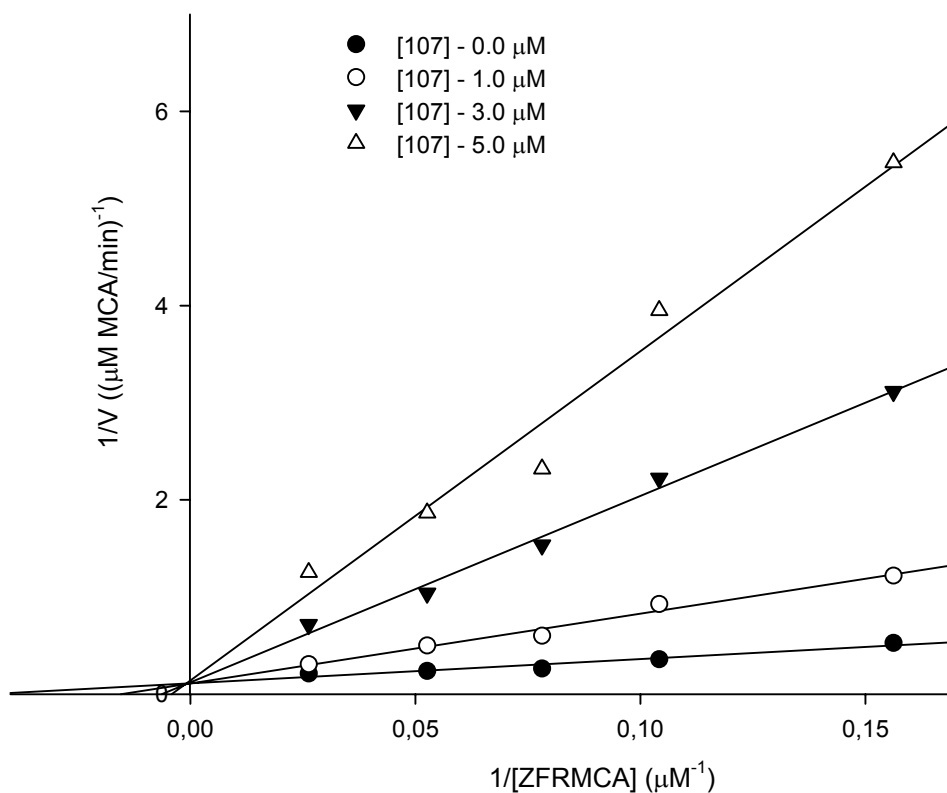


FIGURA 8.8 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o inibidor **107**.

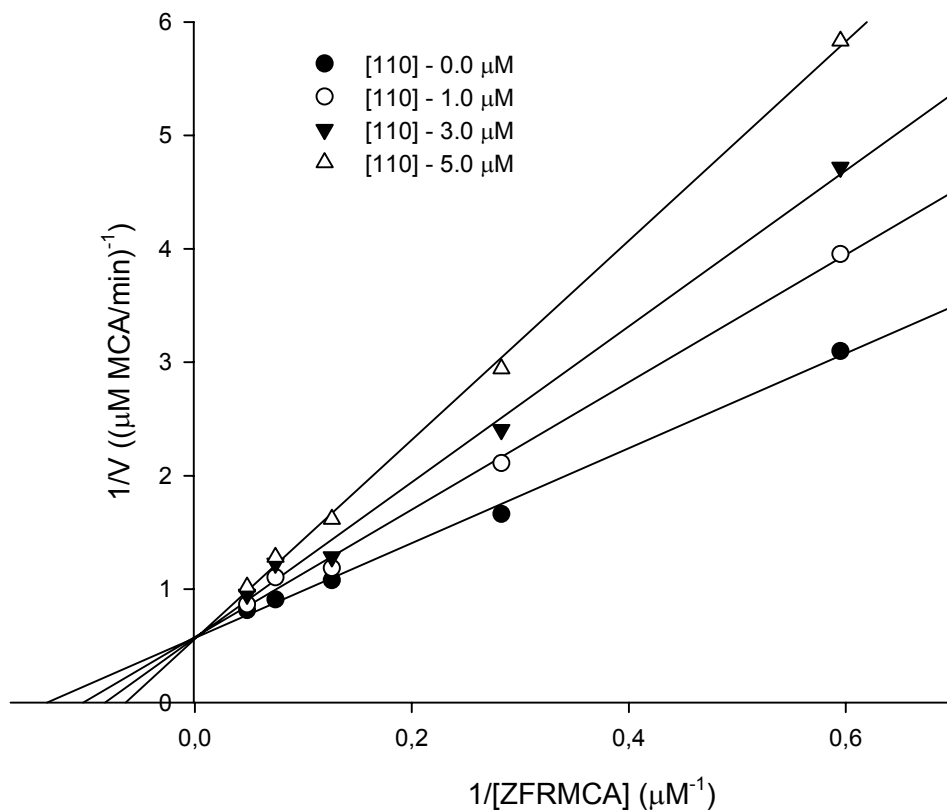


FIGURA 8.9 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o inibidor **110**.

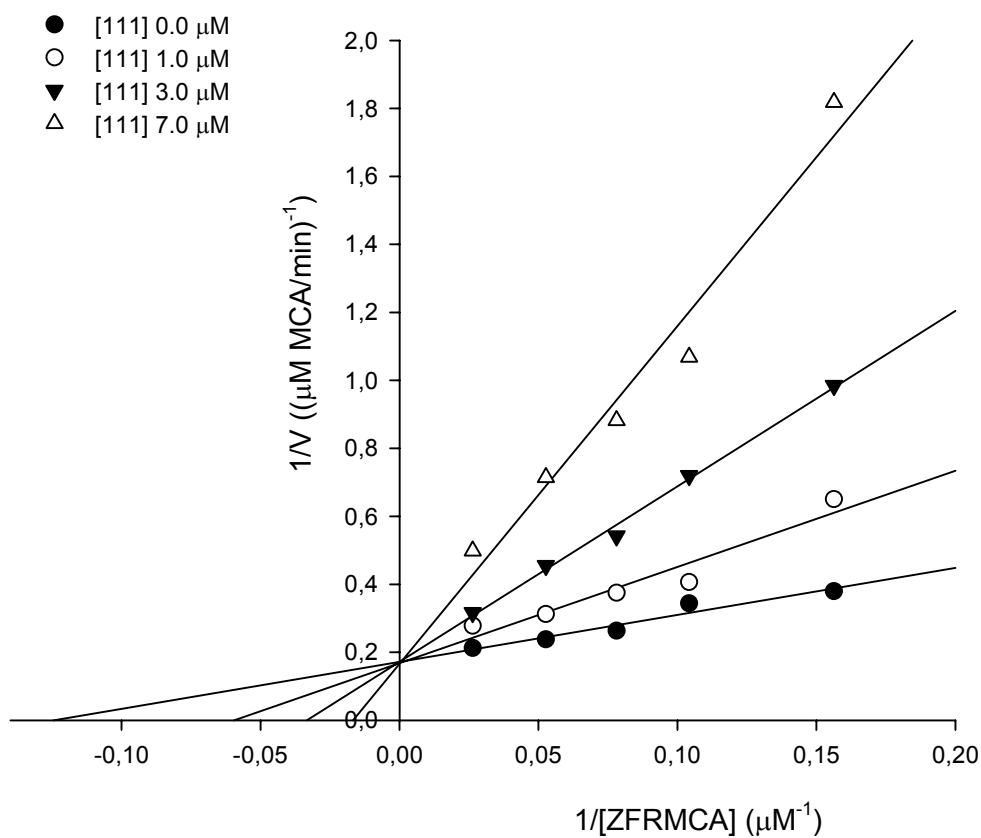


FIGURA 8.10 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o inibidor **111**.

Analisando os gráficos de duplo-recíproco ($1/V$ vs $1/[Z\text{-FR-MCA}]$), observa-se que tanto os alcalóides indolpiridoquinazolínicos quanto os acridônicos apresentaram comportamento característico de mecanismo competitivo em relação ao substrato Z-FR-MCA. A determinação do mecanismo de ação desses inibidores proporcionou o entendimento do modo de ligação e dos padrões de reconhecimento molecular na enzima alvo. Considerando que estes compostos pertencem a uma nova classe química de inibidores para a catepsina V, o conhecimento do mecanismo de ação tornou-se de suma importância.

8.10 - Estudos de docagem molecular e modelos de interação

A determinação experimental do mecanismo de ação enzimático permite o estabelecimento racional de estudos de modelagem molecular, empregando-se, por exemplo, técnicas avançadas de docagem molecular (do inglês, *molecular docking*). Esta técnica consiste na predição da conformação bioativa de uma pequena molécula (ligante) no sítio de ligação de uma macromolécula (que pode ser enzima, receptor, DNA ou RNA) seguido de avaliação (pontuação) e classificação do modo de ligação proposto (GUIDO *et al.*, 2008).

8.10.1 - Modelo farmacofórico baseado na estrutura dos complexos cristalográficos

A combinação das informações obtidas através dos diferentes complexos cristalográficos e o conhecimento do modo de interação entre proteína e ligantes conhecidos (complexos cristalográficos), determina um conjunto de características físico-químicas essenciais que devem estar presentes na molécula do ligante em potencial, resultando assim numa hipótese farmacofórica (ALVARES & SHOICHET, 2005). Assim, para a melhor compreensão e avaliação do modo de ligação proposto pelos programas de docagem molecular, um estudo de hipótese farmacofórica foi realizado.

Atualmente, no banco de dados de proteínas (PDB) (BERMAN *et al.*, 2000) estão depositados mais de 30 complexos cristalográficos de catepsina K com ligantes diversos. Entretanto, apenas um complexo da catepsina V encontra-se disponível. Apesar da identidade seqüencial de aproximadamente 60%, essas

enzimas apresentam um alto grau de conservação dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio de ligação (FIGURA 8.11). Assim, os diversos complexos cristalográficos da catepsina K foram utilizados para a criação de um modelo farmacofórico que auxiliasse na identificação da conformação bioativa das moléculas em estudo no presente trabalho.

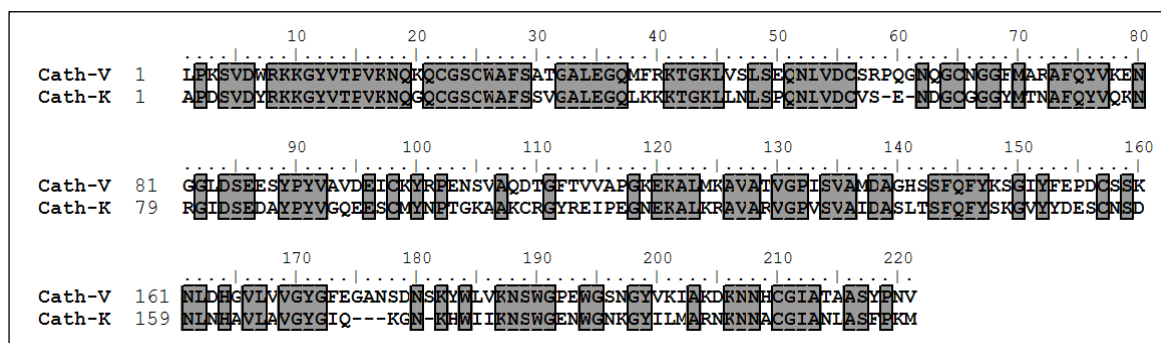


FIGURA 8.11 - Alinhamento das estruturas primárias das enzimas catepsina V e catepsina K. Os números acima das seqüências são referentes à seqüência de aminoácidos da catepsina V.

As coordenadas cristalográficas dos 30 complexos da catepsina K foram sobrepostas (FIGURA 8.12) e em seguida uma análise do modo de interação de cada um dos ligantes foi realizada para identificação das principais características físico-químicas comum entre as moléculas dos inibidores. Finalmente, para a obtenção do modelo farmacofórico, foram geradas esferas de 2,5 Å e 2,0 Å de raio delimitando as posições espaciais favoráveis para a presença de substituintes hidrofóbicos e doadores/aceptores de ligação de hidrogênio, respectivamente (FIGURA 8.13).

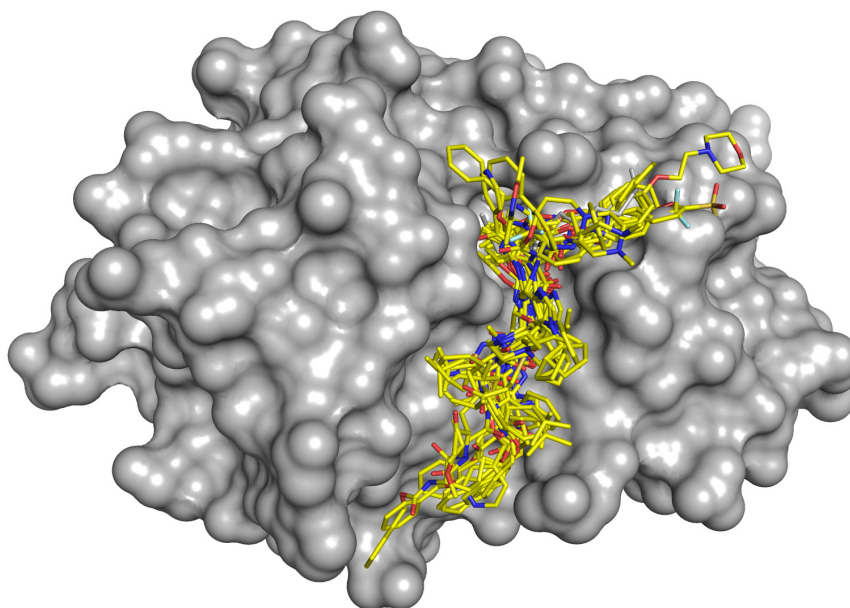


FIGURA 8.12 - Sobreposição dos C α de 30 complexos cristalográficos da catepsina K. As estruturas dos 30 ligantes (amarelo) estão sobrepostas na conformação bioativa (cristalográfica).

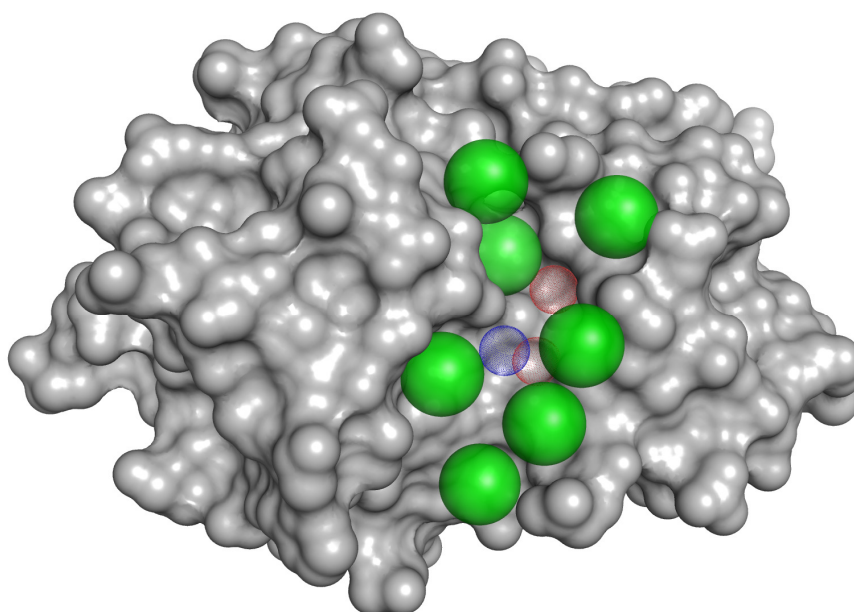


FIGURA 8.13 - Modelo farmacofórico derivado dos complexos cristalográficos. Esferas verdes delimitam as posições espaciais no sítio ativo favoráveis para presença de grupos hidrofóbicos. Esferas vermelhas delimitam as posições espaciais no sítio ativo favoráveis para presença de grupos aceptores de ligação de hidrogênio e a esfera azul delimita a posição espacial no sítio ativo favorável para presença de grupos doadores de ligação de hidrogênio.

8.10.2 - Análise dos resultados de docagem molecular

A análise do modo de interação proposto pelos programas FlexX e GOLD dos inibidores derivados de produtos naturais foi realizada com base:

- Na concordância entre as soluções encontradas pelos diferentes métodos de docagem molecular;
- Na concordância com as propriedades físico-químicas indicadas pelo modelo farmacofórico;
- Na complementaridade estérea com o sítio de ligação.

A análise dos resultados obtidos com os alcalóides indolpiridoquinazolínicos (**97** e **98**) sugere as interações apresentadas na FIGURA 8.14. O modo de ligação proposto pela docagem molecular apresenta boa complementaridade com a cavidade da proteína, satisfazendo tanto as características topológicas impostas pelo sítio de ligação, quanto as propriedades físico-químicas identificadas pelo modelo farmacofórico.

Este modo de ligação sugere que a maior potência observada para composto **98** (IC_{50} 1,8 μ M; K_i = 0,62 μ M) em relação ao composto **97** (IC_{50} 4,8 μ M; K_i = 2,97 μ M) estaria relacionada à formação de uma ligação de hidrogênio extra com a cadeia lateral do resíduo Asn18. Assim, o substituinte (metoxila) do anel E atuaria como átomo receptor de ligação de hidrogênio enquanto o NH_2 da cadeia lateral da Asn18 atuaria como átomo doador de ligação de hidrogênio. Além disso, pode-se observar que os anéis aromáticos A, D e E estão localizados nas regiões previamente identificadas pelo modelo farmacofórico como bolsões hidrofóbicos presentes no sítio de ligação da catepsina V, sugerindo que interações hidrofóbicas e de van der Waals são componentes importantes para o reconhecimento molecular e potência desta classe promissora de moléculas inibidoras da catepsina V.

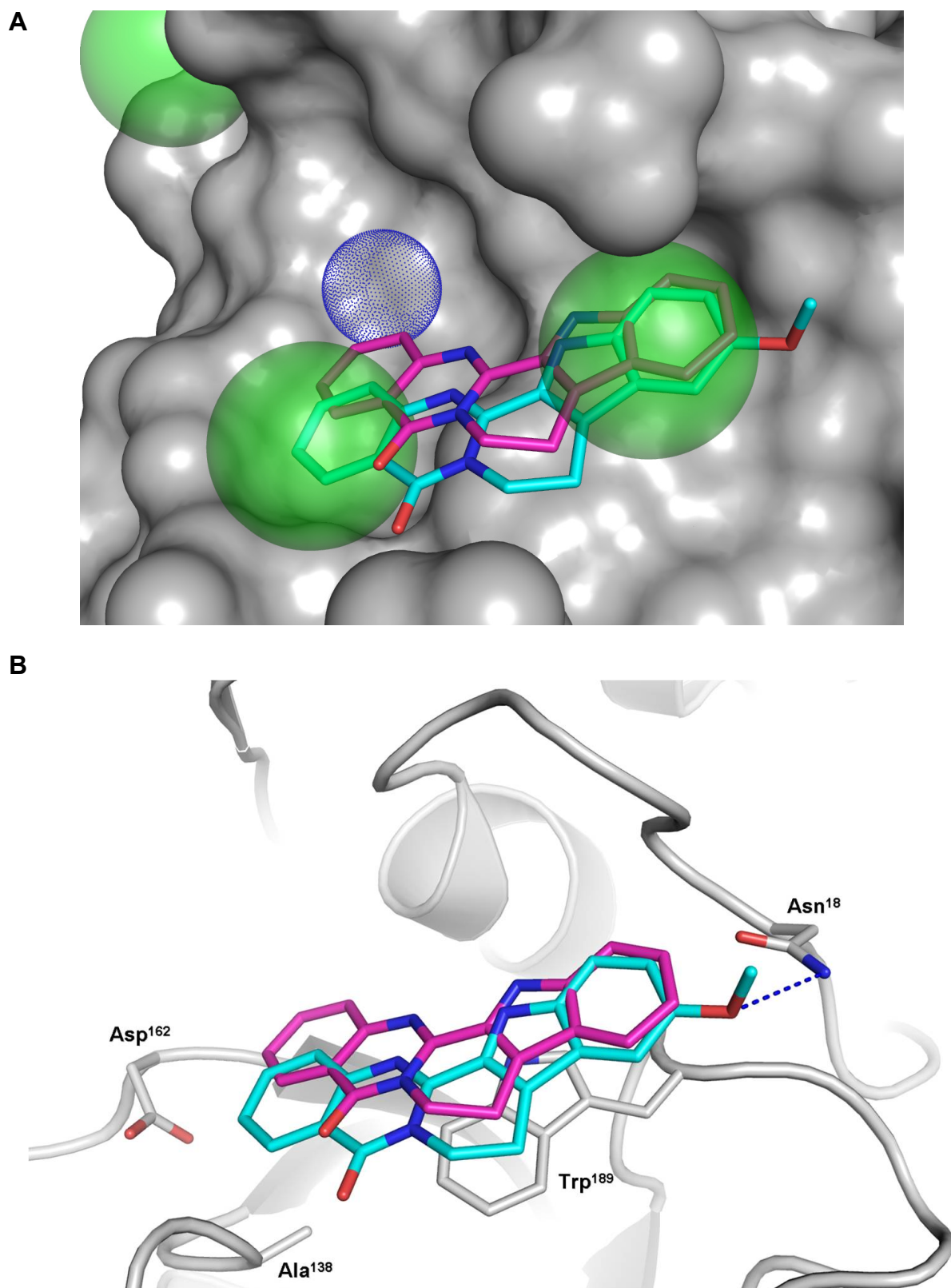


FIGURA 8.14 - Modo de interação proposto pela docagem molecular com o programa GOLD para dois compostos testados frente à catepsina V (composto **97** e **98**, magenta e ciano, respectivamente). (A) Modo de ligação apresentado simultaneamente com o modelo farmacofórico. (B) Detalhes do modo de ligação dos compostos com os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação.

A FIGURA 8.15 mostra o alinhamento obtido para as estruturas de alguns alcalóides acridônicos para os quais foi realizado o estudo de modelagem molecular. Através do alinhamento obtido, é possível concluir que todos os compostos se posicionam satisfatoriamente no modelo farmacofórico sugerido e que as distâncias encontradas entre as moléculas de inibidores e os resíduos do sítio catalítico sugerem a existência de interações intermoleculares importantes para o reconhecimento molecular. Além disso, pode-se observar que em todos os casos os anéis aromáticos A e B estão localizados nas regiões previamente identificadas como bolsões hidrofóbicos, sugerindo que interações hidrofóbicas e de van der Waals são componentes importantes para o reconhecimento molecular e potência destes compostos. Este efeito é menos pronunciado no caso dos alcalóides acridônicos tetracíclicos (**110** e **111**).

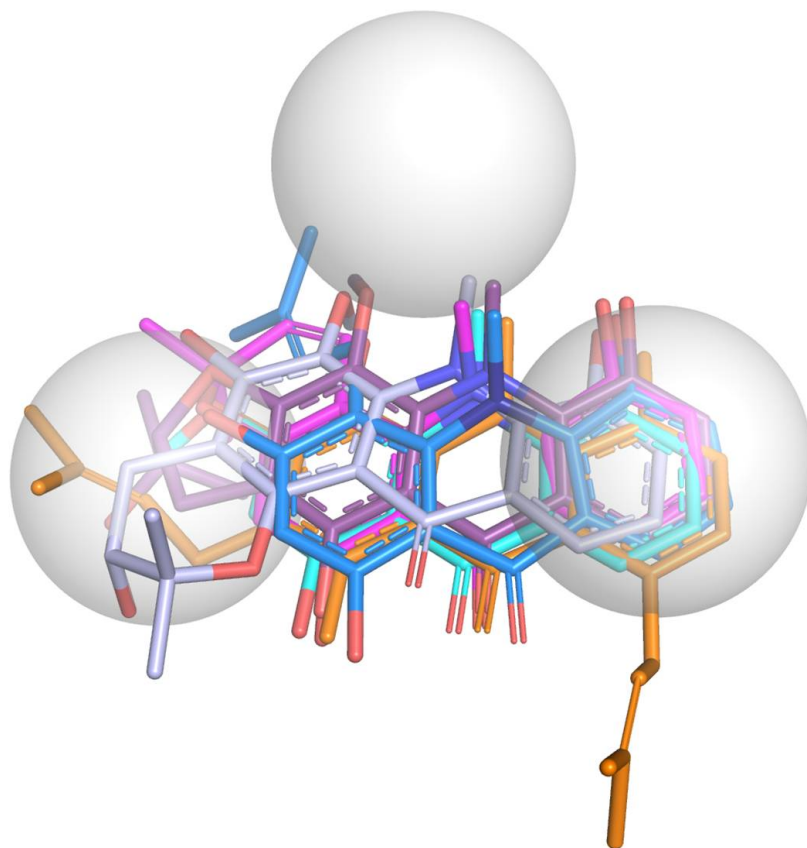


FIGURA 8.15 - Alinhamento obtido para os alcalóides acridônicos, **102** (alaranjado), **104** (azul), **106** (ciano), **108** (magenta), **110** (lilás) e **111** (cinza), simultaneamente com o modelo farmacofórico (esferas hidrofóbicas).

O composto **102** (IC_{50} 3,9 μ M; K_i = 1,16 μ M) é cerca de 10 vezes mais potente que o composto **104** (IC_{50} 25,7 μ M; K_i = 10,31 μ M). Segundo os dados de modelagem (FIGURA 8.16) essa atividade pode estar associada a dois fatores

principais: (i) em ambos os compostos há formação de uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio da hidroxila na posição 5 com o resíduo Gln19, que é doador de átomos de hidrogênio; (ii) o composto **102** ocupa simultaneamente os dois sítios hidrofóbicos do sítio ativo, estando a prenila da posição 2 acomodada, evento que não ocorre com o composto **104** devido à ausência deste substituinte.

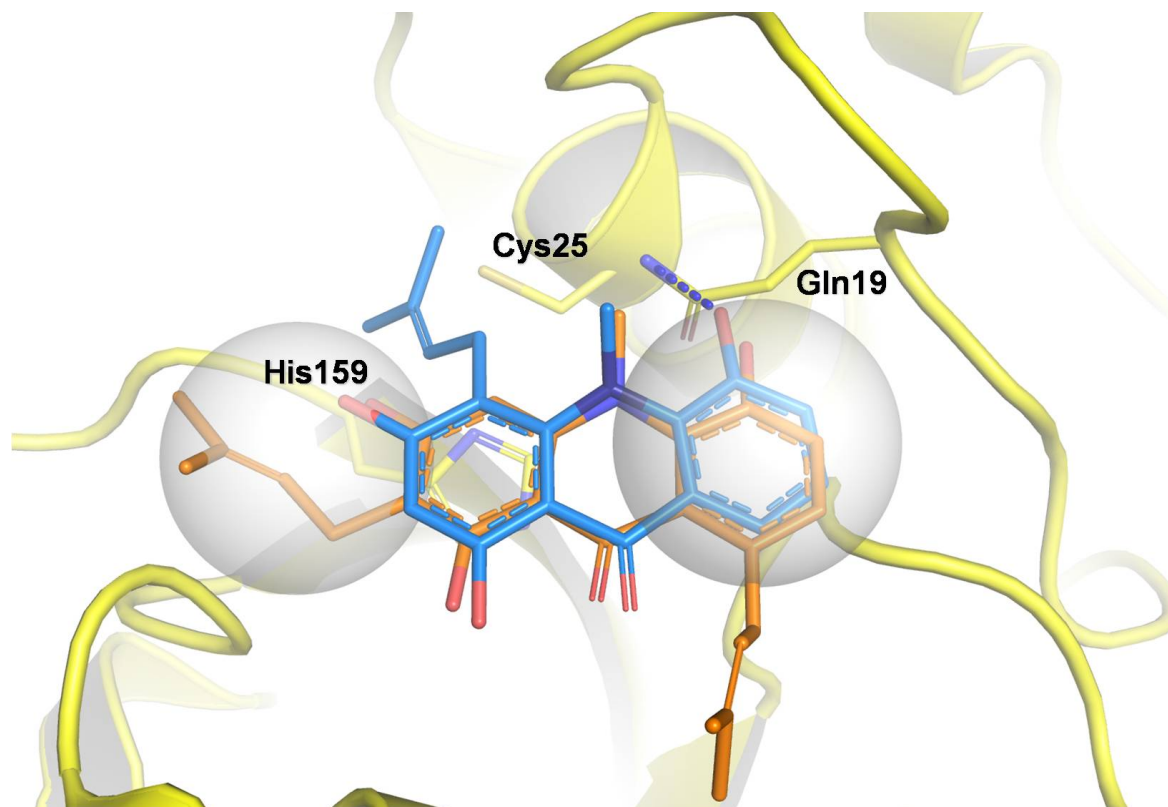


FIGURA 8.16 - Modo de interação proposto pela docagem molecular com o programa GOLD para os compostos **102** (alaranjado) e **104** (azul), testados frente à catepsina V.

Os compostos **106** (IC_{50} 2,2 μ M) e **108** (IC_{50} 48,2 μ M) possuem uma diferença de IC_{50} de 22 vezes e segundo os dados de modelagem molecular (FIGURA 8.17) essa diferença pode estar associada a dois fatores principais: (i) formação de uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio da metoxila na posição 4 (composto **106**) com o resíduo Gln19, que é supostamente o resíduo que estabilizaria o intermediário de transição, ou seja, esse resíduo possui uma função biológica importante e, portanto, outras moléculas que interajam com ele podem influenciar significativamente na atividade biológica da enzima; (ii) o composto **106** ocupa simultaneamente os dois sítios hidrofóbicos do sítio ativo (com o anel fenólico

e o substituinte 4-metoxila), evento que não ocorre com o composto **108** devido à ausência do substituinte 4-metoxila.

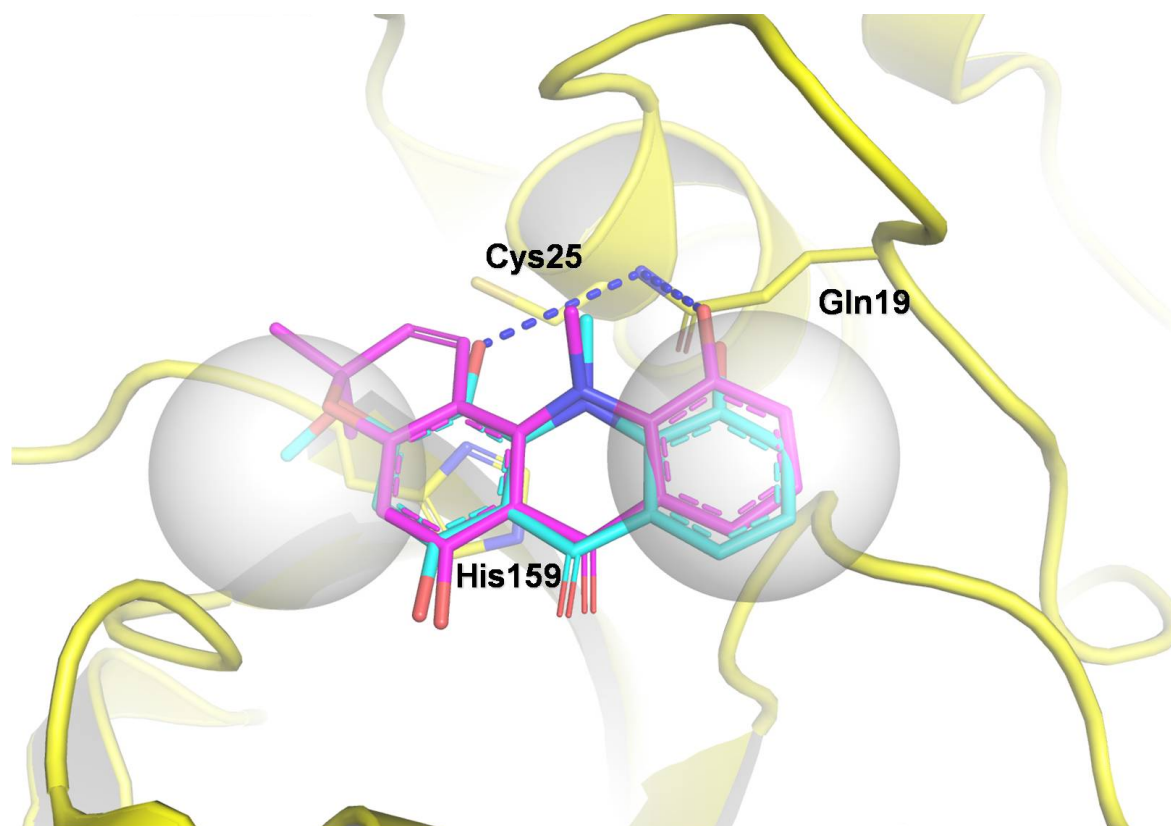


FIGURA 8.17 - Modo de interação proposto pela docagem molecular com o programa GOLD para os compostos **106** (ciano) e **108** (magenta), testados frente à catepsina V.

Considerando a semelhança estrutural que os compostos **105** (IC_{50} 9,8 μ M; K_i = 4,22 μ M), **106** (IC_{50} 2,2 μ M; K_i = 1,03 μ M) e **107** (IC_{50} 1,2 μ M; K_i = 0,24 μ M) apresentam, a diferença de atividade deve estar associada a diferença de substituintes no anel A. De acordo com os resultados de modelagem molecular, os substituintes deste anel influenciam significativamente na atividade dos compostos. Sugere-se que a maior potência do composto **107** é em função das duas metoxilas existentes nas posições 2 e 3.

A análise dos resultados obtidos com os compostos **110** (IC_{50} 5,2 μ M; K_i = 4,36 μ M) e **111** (IC_{50} 2,8 μ M; K_i = 1,68 μ M) está apresentada na FIGURA 8.18. A atividade destes compostos pode estar associada a dois fatores principais: (i) formação de ligação de hidrogênio entre o oxigênio das metoxilas (posição 4) e das hidroxilas (posição 5) com o resíduo Gln19; (ii) quanto às interações hidrofóbicas do anel A, o composto **111** apresenta uma melhor acomodação dos seus substituintes

no sítio hidrofóbico que o composto **110**, sendo a diferença entre eles a posição substituição (posições 2 e 3 para **110** e 1e 2 para **111**).

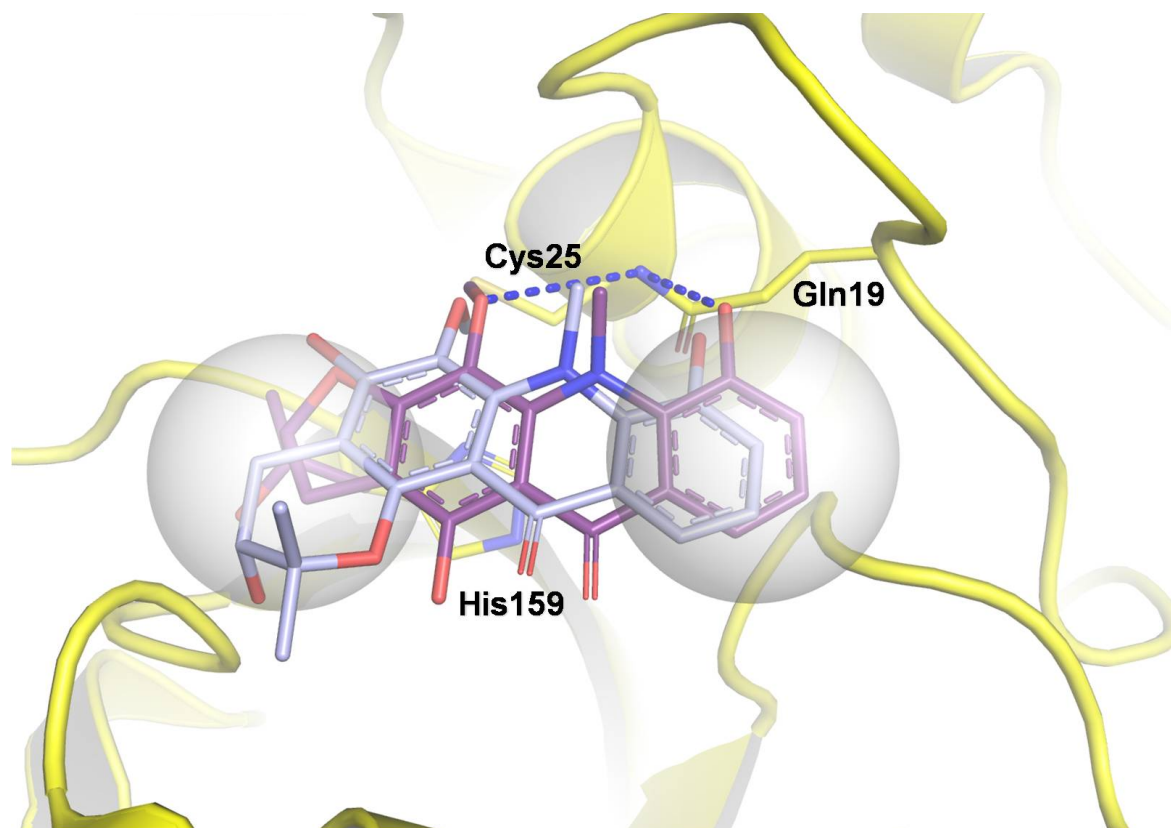


FIGURA 8.18 - Modo de interação proposto pela docagem molecular com o programa GOLD para os compostos **110** (lilás) e **111** (cinza), testados frente à catepsina V.

O composto **107** (IC_{50} 1,2 μ M; K_i 0,24 μ M) foi o inibidor mais potente da série estudada e possui o valor de IC_{50} 167 vezes maior que do composto **103** (IC_{50} 200 μ M). Segundo os dados de modelagem molecular (FIGURA 8.19) essa potência pode estar associada a três fatores principais: (i) formação de uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio da hidroxila na posição 5 com o resíduo Gln19, que é supostamente o resíduo que estabilizaria o intermediário de transição; (ii) o composto **107** ocupa simultaneamente os dois sítios hidrofóbicos (A e B) do sítio ativo, com os substituintes do anel A e B; (iii) ocupação parcial do sítio hidrofóbico C pelo grupo $N-CH_3$. Diante dos resultados obtidos para o composto **107**, uma sugestão interessante seria a modificação estrutural do substituinte CH_3 para um substituinte capaz de interagir mais efetivamente com o sítio hidrofóbico C.

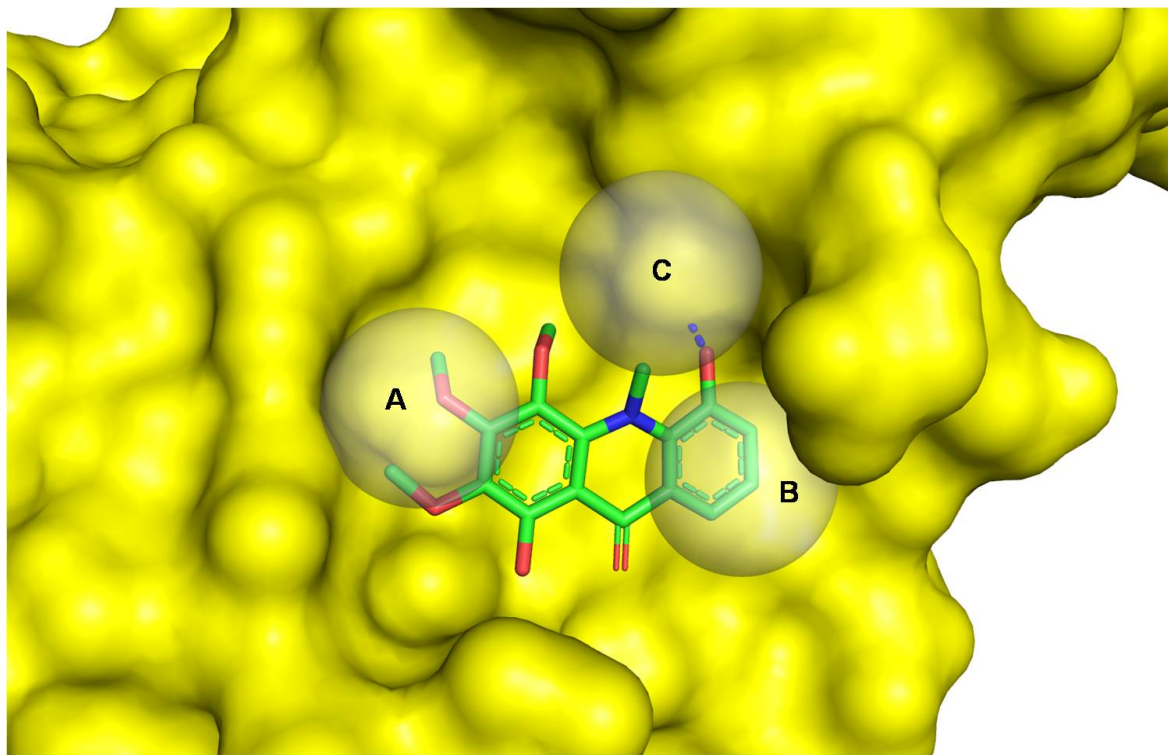


FIGURA 8.19 - Modo de interação proposto pela docagem molecular com o programa GOLD para o composto **107** (verde), testado frente à catepsina V. O modelo farmacofórico está representado pelas esferas A, B e C e a ligação de hidrogênio está ilustrada em azul. O sítio de ligação está representado contornado pela superfície de Connolly (amarelo).

Os estudos de modelagem molecular com a catepsina V ajudaram a elucidar as bases predominantes no processo de reconhecimento molecular e afinidade dos inibidores estudados. Do ponto de vista qualitativo, a boa ocupação do sítio ativo por estes inibidores, juntamente com as interações intermoleculares (forças eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio), forneceu uma boa compreensão da potencia relativa desta série de compostos como inibidores da catepsina V.

PARTÉ III

PARTÉ III
Conclusões

9 - CONCLUSÕES

Este trabalho mostrou que os produtos naturais e os derivados sintéticos são promissoras substâncias na busca de inibidores específicos de enzimas.

Com o estudo do óleo das cascas das castanhas de *Anacardium occidentale*, foi possível identificar uma nova classe de inibidores da enzima gGAPDH de *Trypanosoma cruzi*. Através de estudos cinéticos determinou-se que o ácido anacárdico saturado (**AC1**) é um inibidor do tipo não-competitivo, ligando preferencialmente a enzima livre. Este estudo permitiu o desenvolvimento de uma técnica de baixo custo capaz de separar as diferentes classes dos constituintes fenólicos. Considerando que este óleo é um subproduto da indústria castanheira do Brasil e que é de baixo valor comercial, sua utilização como matéria prima para o desenvolvimento de inibidores enzimáticos passa a ser um desafio. As atividades biológicas descritas neste trabalho para estes compostos contribuem com os dados de atividade já descritos na literatura.

A padronização e validação dos bioensaios permitiram a avaliação de um grande número de compostos através da triagem bioquímica, resultando na identificação e seleção de novos inibidores para as catepsinas K, V, L e S. A triagem deixou clara a potencialidade de alguns produtos naturais, merecendo destaque aqueles pertencentes às classes das flavonas, alcalóides acridônicos e indolpiroquinazolínicos. Já entre os derivados sintéticos destacam-se as amidas, flavonas, cumarinas, alcalóides e derivados dos ácidos anacárdicos.

Os novos inibidores da catepsina V tiveram sua potência, afinidade e mecanismo de ação determinados, originando uma nova base de dados cinéticos para um conjunto de produtos naturais. Os alcalóides que tiveram seus mecanismos de ação determinados apresentaram-se como inibidores do tipo competitivo em relação ao substrato Z-FR-MCA. O alcalóide acridônico **107** foi o inibidor mais potente frente à catepsina V, sendo o valor de K_i igual a 0,24 μM . Em relação às demais enzimas estudadas, o composto **107** não foi ativo frente às catepsinas K e S. Os estudos de modelagem molecular foram de grande utilidade no entendimento das interações intermoleculares predominantes nos complexos E•I. Estes dados contribuem no processo de planejamento de inibidores da catepsina V e conseqüentemente na identificação de sua real função.

As informações geradas neste trabalho são inéditas para todas as enzimas-alvo estudadas, constituindo uma grande contribuição na busca de inibidores específicos destas enzimas.

PARTÉ III
Referências
Bibliográficas

10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, W.; KAWAMOTO, S.; OHNO, I.; NISHIDA, K.; KINOSHITA, S.; MATSUBARA, K.; OKUBO, K.; "Isolation and characterization of human cathepsin V: a major proteinase in corneal epithelium". *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **39**: 1789-1796, 1998.

ALVAREZ, J.C & SHOICHET, B.; "Virtual screening in drug discovery". Taylor & Francis, 3-20, 2005.

ALVIM-JR, J.; DIAS, R.L.A.; CASTILHO, S.M.; OLIVA, G.; CORREA, A.G.; "Preparation and evaluation of coumarin library towards the inhibitory activity of the enzyme gGAPDH from *Trypanosoma cruzi*". *J. Braz. Chem. Soc.*, **16** (4): 763-733, 2005.

ARAÚJO, J.P.P. & SILVA, V.V. DA; "Cajucultura: modernas técnicas de produção". EMBRAPA/CNPAT: Fortaleza, 1995.

BAKER, D.D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V.; "The value of natural products to future pharmaceutical discovery". *Nat. Prod. Rep.*, **24**: 1225-1244, 2007.

BARREIRO, E. J. & FRAGA, C. A. M. "Química medicinal. As bases moleculares da ação dos fármacos". Porto Alegre, Artmed Editora, 2001.

BARRETT, A. & KIRSCHKE, H.; "Cathepsin-B, cathepsin-H and cathepsin-L". *Methods Enzymol.*, **80**, 535-561, 1981.

BARRETT, A.J.; KEMHAVI, A.A.; BROWN, M.A.; KIRSCHKE, H.; KNIGHT, C.G.; TAMAI, M.; HANADA, K.; "L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino) butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L". *Biochem. J.*, **201**: 189-198, 1982.

BELTRAME, F.L.; FILHO-RODRIGUES, E.; BARROS, F.A.P.; CORTEZ, D.A.G.; CASS, Q.B.; "A validated higher-performance liquid chromatography method for quantification of cinchonain Ib in bark and phytopharmaceuticals of *Trichilia catigua* used as Catuaba", *J. Chromatography A*, **1119**: 257-263, 2006.

BERMAN, H.M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T.N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I.N.; BOURNE, P.E.; *Nucleic Acids Res.* **28**: 235-242, 2000.

BEYNON, R.J. & BOND, J.S.; "Proteolytic enzymes: a practical approach". Second edition, 1990.

BOHLEY, P. & SEGLEN P.O.; "Proteases and proteolysis in the lysosome". *Experientia*, **48**: 151-157, 1992.

BOZA-SEPÚLVEDA, S.; CASSELS, B.K.; "Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi*". *Planta Medica*, **62**: 98-104, 1996.

BRENER, Z. "Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*". *Rev. Inst. Med. São Paulo*, **4**: 389-396, 1962.

- BROMME, D. & KALETA, J.; "Thiol-Dependent Cathepsins: Pathophysiological Implications and Recent Advances in Inhibitor Design". *Current Pharmaceutical Desing*, **8**: 99-110, 2002.
- BRÖMME, D. & MCGRATH, M.E.; "High level expression and crystallization of recombinant human cathepsin S". *Protein Sci.*, **5**: 789-791, 1996b.
- BRÖMME, D. & OKAMOTO, K.; "Human cathepsin O2, a novel cysteine protease highly expressed in osteoclastomas and ovary molecular cloning, sequencing and tissue distribution". *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **376**: 379-384, 1995.
- BRÖMME, D.; LI, Z.; BARNES, M.; MEHLER, E.; "Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potential, enzymatic characterization, and chromosomal localization". *Biochemistry*, **38**: 2377-2385, 1999.
- BRÖMME, D.; OKAMOTO, K.; WANG, B.B.; BIROC, S.; "Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts". *The Journal of Biological Chemistry*, **271** (4): 2126-2132, 1996a.
- BUCK, M.R.; KARUSTIS, D.G; DAY, N. A.; HONN, K. V.; SLOANE, B.F.; "Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumor tissues". *Biochem J.*, **282** (Pt1), 273-278, 1992.
- BUHLING, F.; FENGLER, A.; BRANDT, W.; WELTE, T.; ANSORGE, S.; NAGLER, D.K.; "Novel cysteine proteases of the papain family". *Adv. Exp. Med. Biol.*, **477**: 241-254, 2000.
- CATALDO, A.M. & NIXON, R.A.; "Enzimatically activity lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**: 3861-3865, 1990.
- COATES, N. J.; GILPIN, M.L.; GWYNN, M. N.; LEWIS, D. E.; MILNER, P. H.; SPEAR, S. R.; TYLER, J. W. "A novel β -lactamase inhibitor isolated from *Spondias mombin*". *J. Nat. Prod.*, **57**: 654-659, 1994.
- COPELAND, R. A. "Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis". New York, Wiley, 2000.
- COPELAND, R. A. "Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery". New Jersey, Wiley, 2005.
- COURA, J. R.; CASTRO, S. L. "A critical review on Chagas disease chemotherapy". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **97** (1): 3-24, 2002.
- CUNHA, R.L.O.R.; URANO, M.E.; CHAGAS, J.R.; ALMEIDA, P.C.; BINCOLETTO, C.; TERSARIOL, I.L.S.; COMASSETO, J.V.; "Tellurium-based cysteine protease inhibitors: evaluation of novel organotellurium (IV) compounds as inhibitors of human cathepsin B". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **15**: 755-760, 2005.
- DA SILVA, V. C.; "Estudos Iniciais para a Utilização dos Constituintes do Líquido da Castanha de Caju (LCC) como Filtros Solares". Programa de Pós-Graduação em Química - UnB, 2003. Dissertação de Mestrado.

DEWICK, P.M.; "Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach". Second Edition. England, John Wiley & Sons, 2002.

DIAS, J. C. P. & SCHOFIELD, C. J. "The evolution of Chaga's disease (American trypanosomiasis). Control after 90 years since Carlos Chagas discovery". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **94** (supl.I): 103-121, 1999.

DOS SANTOS, M. L. & DE MAGALHÃES, G. C.; "Utilization of cashew nut shell liquide from *Anacardium occidentale* as starting material for organic synthesis: A novel route to lasiodiplodin from cardols". *J. Braz. Chem. Soc.*, **10** (1): 13-20, 1999.

EISENTHAL, R. & DANSON, M. J. "Enzyme Assays. A Practical Aproach". Second Edition. Oxford, Oxford University Press, 2002.

EL SISSI, H.I.; SALEH, N.A.M; EL NEGOUMY, S.I.; "Prunin-O-6"-gallat, aus *Acacia farnesiana*". *Phytochemistry*, **13**: 2843-2844, 1974.

FERRÃO, J. E. M.; "O Cajueiro", Instituto de Investigação Científica Tropical: Lisboa, 1995.

FUSETANI, N.; FUJITA, M.; NAKAO, Y.; MATSUNAGA, S.; Tokaramide A, a New Cathepsin B Inhibitor from the Marine Sponge *Theonella* aff. *mirabilis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **9**: 3397-3402, 1999.

GARNERO, P.; BOREL, O.; BYRJALSEN, I.; FERRERAS, M.; DRAKE, F.H.; MC QUENEY, M.S.; FOGED, N.T.; DELMAS, P.D.; DELAISSE, J.M.; "The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases". *J. Biol. Chem.*, **273**: 32347-32352, 1998.

GEETHA, T. & VARALAKSHMI, P.; "Effect of lupeol and lupeol linoleate on lysosomal enzymes and collagen in adjuvant-induced arthritis in rats". *Molecular and Cellular Biochemistry*, **201**: 83-87, 1999.

GELB, B.D.; SHI, G.P.; CHAPMAN, H.A.; DESNICK, R.J.; "Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency". *Science*, **273**: 1236-1268, 1996.

GRAZZINI, R., HESK, D., HEININGER, E., HILDENBRANDT, G., REDDY, C. C., COX-FOSTER, D., MEDFERD, J., CRAIG, R., MUMMA, R. O.; "Inhibition of Lipoxygenase and Prostaglandin Endoperoxide Synthase by Anacardic Acids". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**: 775-780, 1991.

GUIDO, R.V.C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D.; "Virtual screening and its integration with modern drug design technologies". *Current Medicinal Chemistry (Hilversum)*, **15**: 37-46, 2008.

GUIDO, R.V.C; "Planejamento de inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*: biologia estrutural e química medicinal". Programa de Pós-Graduação em Física - USP, 2008. Tese de Doutorado.

HARVEY, A.L.; "Natural products as a screening resource". *Current Opinion in Chemical Biology*, **11**: 480-484, 2007.

HEIDTMANN, H.H.; SALGE, U.; ABRAHAMSON, M.; BENCINA, M.; KASTELIC, L.; KOPITAR-JERALA, N.; "Cathepsin B and cysteine proteinase inhibitors in human lung cancer cell lines". *Clin Exp Metastasis*, **15**: 368-381, 1997.

HIMEJIMA, M. & KUBO, I.; "Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil". *J. Agric. Food Chem.*, **39** (2): 418, 1991.

HOANG, V.L.T.; LI, Y.; KIM, S.; "Cathepsin B inhibitory activities of phthalates isolated from marine *Pseudomonas strain*". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **18**: 2083-2088, 2008.

HOLLOSY, F.; IDEI, M.; CSORBA, G.; SZABO, E.; BOKONYI, G.; SEPRODI, A.; MESZAROS, G.; SZENDE, B.; KERI, G.; "Activation of caspase-3 protease during the process of ursolic acid and its derivative-induced apoptosis". *Anticancer Res.*, **21** (5): 3485-3491, 2001.

HOSTETTMANN, K.; QUEÍROZ, E.F.; VIEIRA, P.C.; Princípios Ativos de Plantas Superiores, Editora da UFSCar, 2003.

<http://www.brasilrepublica.com/ceara.htm>. Acesso em: setembro 2008.

http://www.merck.com/newsroom/press_releases/research_and_development/2008_0916.html). Acesso em: outubro 2008.

IRIE, J.; MURATA, M.; HOMMA, S. "Glycerol-3-phosphate dehydrogenase inhibitors, anacardic acids from *Ginkgo biloba*". *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**: 240-243, 1996.

JONES, G.; WILLETT P.; GLEN R.C.; LEACH A.R.; TAYLOR R.; "Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking". *J. Mol. Biol.*, **267**: 727-748, 1997.

JOYCE, J.A; BARUCH, A.; CHEHADE, K.; MEYER-MORSE, N.; GIRAUDO, E.; TSAI, F.Y.; "Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis". *Cancer Cell*, **5**: 443-453, 2004.

JULIANO, M.A.; CARMONA, A.K.; JULIANO, L.; Revisão: Uso de peptídeos sintéticos para dosagem de enzimas clinicamente importante. *Folha Médica*, **121** (4): 211-220, 2002.

KATUNUMA, N.; OHASHIA, A.; SANO, E.; ISHIMARUB, N.; HAYASHIB, Y.; MURATA, E.; "Catechin derivatives: Specific inhibitor for caspases-3, 7 and 2, and the prevention of apoptosis at the cell and animal levels". *FEBS Letters*, **580**: 741-746, 2006.

KIONG, L.S. & TYMAN, J.H.P.; "Long-chain phenols. 18. conversion of anacardic acid into urushiol". *J. Chemical Society-Perkin Transactions 1*, **7**: 1942-1952, 1981.

KIRSCHKE, H.; SCHMIDT, I.; WIEDERANDERS, B.; "Cathepsin S. The cysteine proteinase from bovine lymphoid tissue is distinct from cathepsin L". *Biochem. J.*, **240**: 455-459, 1986.

KIRSCHKE, H.; WIEDERANDERS, B.; BRÖMME, D.; RINNE, A.; “Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins”. *Biochem. J.*, **264**: 467-473, 1989.

KITCHEN, D.B.; DECORNEZ, H.; FURR, J.R.; BAJORATH, J.; “Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications”. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**: 935-949, 2004.

KLEBE, G.; “Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations”. *Drug Discov. Today*, **11**: 580-594, 2006.

KOMINAMI, E.; KUNIO, I.; KATUNUMA, N.; “Activation of the intramyofibrillar autophagic-lysosomal system in muscular-dystrophy”. *Am. J. Pathol.*, **127**: 461-466, 1997.

KOS, J. & LAH, T.T.; “Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer”. *Oncol. Rep.* **5**: 1349-1361, 1998.

KUBO, I., KINST-HORI, I., YOKOKAWA, Y.; “Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits”. *J. Nat. Prod.*, **57**: 545-551, 1994a.

KUBO, I., MUROI, H., HIMEJIMA, M., YAMIGIWA, Y., MERA, H., TOKUSHIMA, K., OHTA, S., KAMIKAWA, T.; “Structure-antibacterial activity relationship of anacardic acids”. *J. Agric. Food Chem.*, **41**: 1016-1019, 1993a.

KUBO, I., MUROI, H., KUBO, A.; “Naturally occurring anti acne agents”. *J. Nat. Prod.*, **57**: 9-17, 1994b.

KUBO, I., OCHI, M., VIEIRA, P. C., KOMATSU, S.; “Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) aple juice”. *J. Agric. Food Chem.*, **41**: 1012-1015, 1993b.

KUBO, I.; KOMATSU, S.; OCHI, M.; J.; “Molluscicides from the cashew *Anacardium occidentale* and their large-scale isolation”. *Agric. Food Chem.*, **34** (6): 970, 1986.

KUMAR, P. P.; PARAMASHIVAPPA, R.; VITHAYATHIL, P. J.; SUBBA RAO, P.V. RAO, A. S.; “Process for isolation of cardanol from technical cashew (*Anacardium occidentale* L) nut shell liquid”. *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 4705-4708, 2002.

LAM, K.S.; “New aspects of natural products in drug discovery”. *TRENDS in Microbiology*, **15** (6): 279-288, 2007.

LECAILLE, F.; KALETA, J.; BROMME, D.; “Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design”. *Chem. Rev.*, **102**: 4459-88, 2002.

LEITE, A.C.; CABRAL, E.C.; DOS SANTOS, D.A.P.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; DA SILVA, M.F.G.F.; “Isolamento do alcalóide ricinina das folhas de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) através de cromatografia em contracorrente”. *Química Nova*, **28** (6): 983-985, 2005.

LEMERE, C.A.; MUNGER, J.S.; SHI, G.P.; NATKIN, L.; HAASS, C.; CHAPMAN, H.A.; SELKOE, D.J.; "The lysosomal cysteine protease, cathepsin S, is increased in Alzheimer's disease and Down syndrome brain. An immunocytochemical study". *Am. J. Pathol.*, **146**: 848-860, 1995.

LI, R.; CHEN, X.; GONG, B.; SEIZER, P.M.; LI, Z.; DAVIDSON, E.; KURZBAN, G.; MILLER, R.E.; NUZUM, E.O.; MCKERROW, J.H.; , R.J.; GILLMOR, S.A.; CRAIK, C.S.; KUNTZ, I.D.; COHEN, F.E.; KENYON, G.L.; "Structure-based design of parasitic protease inhibitors". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **4** (9): 1421-1427, 1996.

LI, R.; KENYON, G.L.; COHEN, F.E.; CHEN, X.; GONG, B.; DOMINGUEZ, J.N.; DAVIDSON, E.; KURZBAN, G.; MILLER, R.E.; NUZUM, E.O.; ROSENTHAL, P.J.; MCKERROW, J.H.; "In vitro antimalarial activity of chalcones and their derivatives". *J. Med. Chem.*, **38**: 5031-5037, 1995.

LIM, I.T.; MEROUEH, S.O.; LEE, M.; HEEG, M.J.; MOBASHERY, S.; "Strategy in inhibition of cathepsin B, a target in tumor invasion and metastasis". *J. Am. Chem. Soc.*, **126** (33), 10271-10277, 2004.

LORENZI, H.; "Árvores Brasileira: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil", Editora Plantarum, 1992.

LUTGENS, S.P.M.; CLEUTJENS, K.B.J.M.; DAEMEN, M.J.A.P.; HEENEMAN, S.; "Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease". *FABES J.*, **21**: 3029-3041, 2007.

MACIEWICZ, R.A.; WARDALE, R.J.; ETHERINGTON, D.J.; PARASKEVA, C.; "Immunodetection of cathepsins B and L present in and secreted from human pre-malignant and malignant colorectal tumor cell lines". *Int J Cancer.*, **43**: 478-486, 1989.

MAI, J.; SAMENI, M.; MIKKELSEN, T.; SLOANE, B.F.; "Degradation of extracellular matrix protein tenascin-C by cathepsin B: an interaction involved in the progression of gliomas". *Biol Chem.*, **383**: 1407-1413, 2002

MARSTON, A. & HOSTETTMANN, K.; "Counter-current chromatography as a preparative tool: applications and perspectives". *J. Chrom. A*, **658**: 315-341, 1994.

MASON, R.W.; GREEN, D.J.; BARRETT, A.; "Human liver cathepsin L". *Biochem. J.*, **226**: 233-241, 1985.

MCGRATH, M.E.; "The lysosomal cysteine proteases". *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **28**: 181-204, 1999.

MCGRATH, M.E.; PALMER, J.T.; BRÖMME, D.; SOMOZA, J.R.; "Crystal structure of human cathepsin S". *Protein Sci.*, **7**:1294-302, 1998.

MERCK, 2008

MICHELS, P.A.M.; "Compartmentation of glycolysis in trypanosomes: a potential target for new trypanocidal drugs". *Biol. Cell.*, **64**: 157-164, 1988.

MONCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M. I. "An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis)". *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **100**: 663-677, 2006.

MUNGER, J.S.; HAASS, C.; LEMERE, C.A.; SHI, G.P.; WONG, W.S.F.; TEPLow, D.B.; SELKOE, D.J.; CHAPMAN, H.A.; "Lysosomal processing of amyloid precursor protein to A peptides: a distinct role for cathepsin S". *Biochem. J.*, **311**: 299-305, 1995.

MY LESSON, 2008. <http://www.cbu.edu/~seisen/ParasitesOnParade.htm>. Acesso em: julho 2008.

NEWMAN D.J. & CRAGG G.M.; "Natural products as sources of new drugs over the last 25 years". *J. Nat. Prod.*, **70**: 461-477, 2007.

OTTO, H. & SCHIRMEISTER, T.; "Cysteine proteases and their inhibitors". *Chem. Rev.*, **97**: 133-171, 1997.

PALERMO, C. & JOYCE, J.A.; "Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer". *TRENDS in Pharmacological Sciences*, **29** (1): 22-28, 2007.

PAN, X; TAN, N.; ZENG, G.; ZHANGA, Y.; JIAA, R.; "Amentoflavone and its derivatives as novel natural inhibitors of human cathepsin B". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **13**: 5819-5825, 2005.

PARAMASHIVAPPA, R.; KUMAR, P. P.; VITHAYATHIL, P. J.; RAO, A. S.; "Novel method for isolation of major phenolic constituents from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid". *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 2548-2551, 2001.

PATIL, A.D.; FREYER, A.J.; CARTE, B.; TAYLOR, P.B.; JOHNSON, R.K.; FAULKNER, D.J.; "Haploscleridamine, a novel tryptamine-derived alkaloid from a sponge of the order haplosclerida: a inhibitor of cathepsin K". *J. Nat. Prod.*, **65**: 628-629, 2002a.

PATIL, A.D.; FREYER, A.J.; LILLMER, L.; OFFEN, P.; TAYLOR, P.B.; VOTTA, B.J.; JOHNSON, R.K.; "A new dimeric dihydrochalcone and a new prenylated flavone from the bud covers of *Artocarpus attilis*: potent inhibitor of cathepsin K". *J. Nat. Prod.*, **65**: 628-629, 2002b.

PATOČKA, J.; "Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification". *Journal of Applied Biomedicine*, **1**: 7-12, 2003.

PAVÃO, F.; CASTILHO, M.S.; PUPO, M.T.; DIAS, R.L.A.; CORREA, A.G.; FERNANDES, J.B.; DA SILVA, M.F.G.F.; MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P.C.; OLIVA, G.; "Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution". *FEBS Letters*, **520**: 13-17, 2002.

PEREIRA, J.M.; "Síntese de ácidos anacárdicos e análogos, candidatos a inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal de *Trypanosoma cruzi*". Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2007. Dissertação de Mestrado.

PEREIRA, J.M.; SEVERINO, R.P.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; DA SILVA, M.F.G.F.; ZOTTIS, A.; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVA, G.; CORRÊA, A.G.; "Anacardic acid derivatives as inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**: 8889-8895, 2008.

POSTIGO, M.P.; "Planejamento racional de inibidores da purina nucleosídeo fosforilase de *Schistosoma mansoni*". Programa de Pós-Graduação em Física - USP, 2008. Dissertação de Mestrado.

PUZER, I.; COTRIN, S.S.; ALVES, M.F.M.; EGBORGE, T.; ARAUJO, M.S.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; BRÖMME, D.; CARMONA, A.K.; "Comparative substrate specificity analysis of recombinant human cathepsin V and cathepsin L". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **430**: 274-283, 2004.

PUZER, I.; VERCESI, J.; ALVES, M.F.M.; BARROS, N.M.T.; ARAUJO, M.S.; JULIANO, M.A.; REIS, M.L.; JULIANO, L.; CARMONA, A.K.; "A possible alternative mechanism of kinin generation *in vivo* by cathepsin L". *Biol. Chem.*, **386**: 699-704, 2005.

RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M. I.; THOMSEN, W. J. "Bioassay Techniques for Drug Development". Amsterdam, Taylor & Francis Group, 2001.

RAHMAN, W.; ISHRATULLAH, K.; WAGNER, H.; SELIGMANN, O.; CHARI, V.M.; ÖSTERDAHL, B.; "Prunin-6"-O-p-coumarate, a new acylated flavone glycoside from *Anacardium occidentale*". *Phytochemistry*, **17**: 1064-1065, 1978.

RAREY, M.; KRAMER, B.; LENGAUER, T.; "Multiple automatic base selection: protein-ligand docking based on incremental construction without manual intervention". *J. Comput. Aided Mol. Des.* **11**: 369-84, 1997.

RAREY, M.; KRAMER, B.; LENGAUER, T.; KLEBE, G.; "A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm". *J. Mol. Biol.* **261**: 470-489, 1996.

REDDY, V.Y.; ZHANG, Q.Y.; WEISS, S.J.; "Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 3849-3853, 1995.

REY, L. "Bases da parasitologia Médica". 2ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002.

ROBICHAUD, J.; OBALLA, R.; PRASIT, P.; FALGUEYRET, J.; PERCIVAL, M.D.; WESOLOWSKI, G.; RODAN, S.B.; KIMMEL, D.; JOHNSON, C.; BRYANT, C.; VENKATRAMAN, S.; SETTI, E.; MENDOCA, R.; PALMER, J.; "A novel class of nonpeptidic biaryl inhibitors of human cathepsin K". *J. Med. Chem.*, **46**: 3709-3727, 2003.

ROUHJ, A.M.; "Redescovering natural products". *Chem. Engin. News*, **13**: 77-107, 2003.

SANTAMARIA, I.; VELASCO, G.; CAZORLA, M.; FUEYO, A.; CAMPO, E.; LOPEZ-OTIN, C.; "Cathepsin L2, a novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas". *Cancer Res.*, **58**: 1624-1630, 1998.

SCHIRMEISTER, T. & KAEPLER, U.; “Non-peptidic inhibitors of cysteine proteases”. *Mini Review in Medicinal Chemistry*, **3**: 361-373, 2003.

SCHOFIELD, C.J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. “The future of Chagas disease control”. *Trends Parasitol.*, **22**: 583-588, 2006.

SHOBHA, S.V. & RAVINDRANATH, B.; “Supercritical carbon dioxide and solvent extraction of phenolic lipids of cashew nut (*Anacardium occidentale*) shells”. *J. Agric. Food Chem.*, **39**: 2214-2217, 1991.

SHOBHA, S.V.; RAMADOSS, C.S.; RAVINDRANATH, B.; “Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by anacardic acids, cardols and cardanols”. *J. Nat. Prod.*, **57**: 1755-1757, 1994.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.; “Farmacognosia: da planta ao medicamento”. Editora da UFSC e UFRGS Editora, 5ª edição, 2003.

SLOANE, B.F., MOIN, K., LAH, T.; “Biochemical and molecular aspects of selected cancers”. *Academic Press*, San Diego, p 411-466, 1994.

SOMOZA, J.R.; ZHAN, H.; BOWMAN, K.K.; YU, L.; MORTARA, K.D.; PALMER, J.T.; CLARK, J.; MCGRATH, M.E.; “Crystal structure of human cathepsin V”. *Biochemistry*, **39**: 12543-12551, 2000.

SOUZA, D.H.F.; GARRATT, R.C.; ARAÚJO, A .P.U.; JESUS, W.D.P.; MICHELS, P.A.M., HANNAERT, V.; OLIVA, G.; “*Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design”. *FEBS Letters*, **424**: 131-135, 1998.

SURESH, M. & KALEYSA RAJ, R.; “Cardol: the antifilarial principle from *Anacardium occidentale*”. *Curr. Sci.*, **59**: 477-479, 1990.

SYBYL Molecular Modeling Software, Version 7.x. St. Louis, MO: Tripos Associates, Inc.; 2004.

TALEB, S.; CANCELLO, R.; CLEMENT, K.; LACASA, D.; “Cathepsin S promotes human preadipocyte differentiation: possible involvement of fibronectin degradation”. *Endocrinology*, **147** (10): 4950-4959, 2006b.

TALEB, S.; CANCELLO, R.; POITOU, C.; ROUAULT, C.; SELLAM, P.; LEVY, P.; BOUILLOT, J-L.; COUSSIEU, C.; BASDEVANT, A.; GUERRE-MILLO, M.; LACASA, D.; CLEMENT, K.; “Weight loss reduces adipose tissue cathepsin S and its circulating levels in morbidly obese women”. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **91**(3):1042-1047, 2006a.

TALEB, S.; LACASA, D.; BASTARD, J-P.; POITOU, C.; CANCELLO, R.; PELLOUX, V.; VIGUERIE, N.; BENIS, A.; ZUCKER, J-D.; BOUILLOT, J-L.; COUSSIEU, C.; BASDEVANT, A.; LANGIN, D.; CLEMENT, K.; “Cathepsin S, a novel biomarker of adiposity: relevance to atherogenesis”. *The FASEB Journal* express article 10.1096/fj.05-3673fje. Published online June 28, 2005.

TOLOSA, E.; LI, W.; YASUDA, Y.; WIENHOLD, W.; DENZIN, L.K.; LAUTWEIN, A.; DRIESSEN, C.; SCHNORRER, P.; WEBER, E.; STEVANOVIC, S.; KUREK, R.; MELMS, A.; BRÖMME, D.; "Cathepsin V is involved in the degradation of invariant chain in human thymus and is overexpressed in myasthenia gravis". *J. Clin. Invest.*, **112**: 517-526, 2003.

TOMAZELA, D.M.; PUPO, M.T.; PASSADOR, E.P.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; FERNADES, J.B.; FILHO, E.R.; OLIVA, G.; PIRANI, J.R.; "Pyrano chalcones and flavone from *Neoraputia magnifica* and their *Trypanossoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehidrogenase- inhibitory activities". *Phytochemistry*, **55**: 643-651, 2000.

TURK, B.; TURK, D.; TURK, V.; "Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers". *Biochem. Biophys. Acta*, **1477**: 98-111, 2000.

TURK, D. & GUNCAR, G.; "Lysosomal cysteine protease (cathepsinas): promising drug targets". *Acta Crys.*, (D59), 203-213, 2003.

TURK, V.; TURK, B.; GUNCAR, G.; TURK, D.; KOS, J.; "Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen presentation and cancer". *Adv. Enzyme Regul.*, **42**: 285-303, 2002.

TURNSEK, T.; KREGAR, I.; LEBEZ, D.; "Acid sulphhydryl protease from calf lymphonodes". *Biochim Biophys Acta*, **403**: 514-520, 1975.

TYMAN, J. H. P.; "Cultivation, processing and utilization of the cashew". *Chem. Ind.* (London), 59-62, 1980.

TYMAN, J. H. P.; "The chemistry of non-isoprenoid phenolic lipids in studies in natural products chemistry". ed. Atta-ur-Raham, Elsevier Science Publisher: Amsterdam, **9**: p. 313-381, 1991.

TYMAN, J.H.P.; TYCHOPOULOS, V.; CHAN, P.; "Long-chain phenols. Quantitative-analysis of natural cashew nut-shell liquid (*Anacardium occidentale*) by high-performance liquid-chromatography". *J. Chromatogr.*, **303**: 137, 1984.

VERLINDE, C.L.M.J.; CALLENS, M.; VAN CALENBERG, S.; VAN AERSCHOT, A.; HERDEWIJIN, P.; HANNAERT, V; MICHELS, P.A.M., OPPERDOES, F.R.; HOL, W.G.J.J.; "Selective-inhibition of trypanosomal glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase by protein structure-based desing – toward new drugs for the treatment of sleeping sickness". *Med. Chem.*, **37** (2): 3605-3613, 1994.

VERONESI, R. "Doenças infecciosas e parasitárias". 8ª edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. p. 675-679.

VIEIRA, P.C.; MAFEZOLI, J.; PUPO, M.T.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M.F.G.; ALBUQUERQUE, S.; OLIVA, G.; PAVÃO, F. "Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from the Rutales". *Pure App. Chem.*, **73**: 617-622, 2001.

VILLADANGOS, J.A.; BRYANT, R.A.R.; DEUSSING, J.; DRIESSEN, C.; LENNON-DUMÉNIL, A.M.; RIESE, R.J.; ROTH, W.; SAFTIG, P.; SHI, G.P.; CHAPMAN, H.A.;

PETERS, C.; PLOEGH, H.L.; "Proteases involved in MHC class II antigen presentation". *Immunol. Rev.*, **172**: 109-120, 1999.

WASSERMANN, D. & DAWSON, C.R.; "Cashew nut shell liquid. III. the cardol component of indian cashew nut shell liquid with reference to the liquid's vesicant activity". *J. Am. Chem. Soc.*, **70**: 3675-3679, 1948.

XIN, X.Q.; GUNESEKERA, B.; MASON, R.W.; "The specificity and elastolytic activities of bovine cathepsins S and H". *Arch. Biochem. Biophys.*, **299**: 334-339, 1992.

YAMAGIWA, Y.; OHASHI, K.; SAKAMOTO, Y.; HIRAKAWA, S.; KAMIKAWA, T.; KUBO, I.; "Synthesis of anacardic acids and ginkgoic acid". *Tetrahedron*, **43** (15): 3387-3394, 1987.

YASUDA, Y.; KALETA, J.; BROMME, D.; "The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: rationale for design of new therapeutics". *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**: 973-993, 2005.

YASUDA, Y.; LI, Z.; GREENBAUM, D.; BOGYO, M.; WEBER, E.; BROMME, D.; "Cathepsin V, a novel and potent elastolytic activity expressed in activated macrophages". *J. Biol. Chem.*, **279**: 36761-36770, 2004.

ZENG, G.-Z.; PAN, X.-L.; TAN, N.-H.; XIONG, J.; ZHANG, Y.-M.; "Natural biflavones as novel inhibitors of cathepsin B and K". *European Journal Medicinal Chemistry*, **41**: 1247-1252, 2006.

PARTÉ III
Anexo

11 – ANEXO

Relação das substâncias naturais com suas respectivas espécies e famílias de onde foram isoladas.

COMPOSTO	NOME	ESPÉCIE	FAMÍLIA
1	3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3',4'-o:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila	<i>Hortia oreadica</i>	Rutaceae
2	*	*	Rutaceae
3	3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3',4'-o:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propiónico	<i>Hortia oreadica</i>	Rutaceae
4	3-fenil-[2',5'-dimetoxi-(3',4'-o:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila	<i>Hortia oreadica</i>	Rutaceae
5	3-fenil-[2'-metoxi-(3',4'-o:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila	<i>Hortia oreadica</i>	Rutaceae
6	ácido 3-fenil-[4'-metoxi-(2',3'-o:6'',5'')-2'',2''-dimetilpirano]propiónico	<i>Hortia brasiliana</i>	Rutaceae
7	ácido 3-fenil-{2'',2''-dimetil-4''h-2'',4''-dioxina-[4''-(2''',3''-diidroxí-1''-metil-propil)]}	<i>Hortia brasiliana</i>	Rutaceae
8	*	*	Rutaceae
9	*	*	Rutaceae
10	*	*	Rutaceae
11	murrangatina	<i>Ruia</i> sp	Rutaceae
12	*	*	Rutaceae
13	munomicrolina	<i>Ruia</i> sp	Rutaceae
14	umbeliferona	<i>Ruia</i> sp	Rutaceae
15	escoparona	<i>Swinglea glutinosa</i>	Rutaceae
16	xantiletina	Enxerto <i>Citrus sinensis</i> sobre <i>Citrus limonia</i>	Rutaceae
17	rauiantina	<i>Ruia</i> sp	Rutaceae
18	5-metoxiseselina	<i>Hortia oreadica</i>	Rutaceae
19	*	*	Rutaceae
20	6-prenil-seselina	<i>Swinglea glutinosa</i>	Rutaceae
21	*	*	Rutaceae
22	braialina	<i>Hortia oreadica</i>	Rutaceae

23	5-metoxi-furanocumarina (bergapteno)	<i>Hortia oreadica</i>	Rutaceae
24	8-metoxi-furanocumarina (xantotoxina)	<i>Hortia oreadica</i>	Rutaceae
25	5- <i>o</i> -prenil furanocumarina (prangol)	<i>Hortia superba</i>	Rutaceae
26	8- <i>o</i> -prenil furanocumarina (heraclenol)	<i>Hortia superba</i>	Rutaceae
27	limonina	<i>Raulinoa echinata</i>	Rutaceae
28	cipadesina a	<i>Cipadessa fruticosa</i>	Meliaceae
29	11 β ,19 α -dihidroxi-7deoxo-7acetoxi-ichangina	<i>Raputia praetermissa</i>	Rutaceae
30	ácido 2 α ,3 α ,19 α -triidroxiurs-12-en-28-óico	<i>Vitex polygama</i>	Verbenaceae
31	6 β -hidroximaslinato de β -d-glucopiranosila	<i>Siphoneugena densiflora</i>	Myrtaceae
32	ácido ursólico	<i>Vitex polygama</i>	Verbenaceae
33	ácido 2 α ,3 α -diidroxiolean-12-en-28-óico	<i>Vitex polygama</i>	Verbenaceae
34	ácido oleanólico	<i>Vitex polygama</i>	Verbenaceae
35	ácido oleanônico	<i>Cedrela fissilis</i>	Meliaceae
36	hispidol a	<i>Cedrela fissilis</i>	Meliaceae
37	piscidinol	<i>Cedrela fissilis</i>	Meliaceae
38	lupeol	<i>Siphoneugena densiflora</i>	Myrtaceae
39	modificado a partir do ácido anacárdico	-	-
40	ácido protocatéico	<i>Vitex polygama</i>	Verbenaceae
41	ácido siríngico	<i>Siphoneugena densiflora</i>	Myrtaceae
42	modificado a partir do ácido anacárdico	-	-
43	6-pentadecil-ácido salicílico (ácido anacárdico)	<i>Anacardium occidentale</i>	Anacardiaceae
44	modificado a partir do ácido anacárdico	-	-
45	<i>n</i> -benzoil- <i>o</i> -geraniltiramina	<i>Swinglea glutinosa</i>	Rutaceae
46	4''-acetilseverina	<i>Swinglea glutinosa</i>	Rutaceae
47	<i>n</i> -benzoil-4''-acetoxi- <i>o</i> -geraniltiramina	<i>Swinglea glutinosa</i>	Rutaceae
48	<i>n</i> -(1'-feniletil)amida	<i>Balfourodendron riedelianum</i>	Rutaceae
49	epieudesmina	<i>Helietta apiculata</i>	Rutaceae
50	seringaresinol	<i>Balfourodendron riedelianum</i>	Rutaceae

51	eudesmina	<i>Helietta apiculata</i>	Rutaceae
52	3',4',5',5,7-pentametoxiflavona	<i>Neoraputia magnifica</i>	Rutaceae
53	3',4'-metilenodioxo-5,7-dimetoxiflavona	<i>Neoraputia magnifica</i>	Rutaceae
54	5-hidroxi-3',4',5',3,7,8-hexametoxiflavonol	<i>Murraya paniculata</i>	Rutaceae
55	3',4',5',5,7,8-hexametoxiflavona	<i>Murraya paniculata</i>	Rutaceae
56	3',4',5',3,5,6,7-heptametoxiflavonol	<i>Murraya paniculata</i>	Rutaceae
57	3',4',5',3,5,7,8-heptametoxiflavonol	<i>Murraya paniculata</i>	Rutaceae
58	8-hidroxi-3',4',5',5,7-pentametoxiflavona	<i>Murraya paniculata</i>	Rutaceae
59	3',4',5',5,6,7-hexametoxiflavona	<i>Murraya paniculata</i>	Rutaceae
60	3',4',7,8-tetrametoxi-5,6-(2",2"-dimetilpirano)-flavona	<i>Neoraputia alba</i>	Rutaceae
61	3- α - β - <i>D</i> -rhamnopiranosideo (quercitrina)	<i>Siphoneugena densiflora</i>	Myrtaceae
62	luteolina	<i>Vitex polygama</i>	Verbenaceae
63	isoorientina	<i>Vitex polygama</i>	Verbenaceae
64	schaftosídeo	<i>Vitex polygama</i>	Verbenaceae
66	8-hidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona	<i>Zeyhera montana</i>	Bignoniaceae
67	8-hidroxi-5,7-dimetoxiflavona	*	Leguminosae
68	7,8-(2",2"-dimetilpirano)-flavona	<i>Lonchocarpus subglaucescens</i>	Leguminosae
69	3',4'-metilenodioxo-7,8-(2",2"-dimetilpirano)-flavona	<i>Lonchocarpus subglaucescens</i>	Leguminosae
70	7,8-(2",2"-dimetilpirano)-flavona	<i>Lonchocarpus subglaucescens</i>	Leguminosae
71	lanceolatin b	<i>Lonchocarpus latifolius</i>	Leguminosae
72	karanjin	<i>Lonchocarpus latifolius</i>	Leguminosae
76	3',4',5',5,7-pentametoxiflavanona	<i>Neoraputia magnifica</i>	Rutaceae
77	5,4'-dihidroxi-6-(3,3-dimetilalil)-7-metoxi-flavanona	<i>Deguelia hatschbachii</i>	Leguminosae
79	isolonchocarpina	<i>Lonchocarpus campestris</i>	Leguminosae
82	2'-hidroxi-3,4,4',5,6'-pentametoxichalcona	<i>Neoraputia magnifica</i>	Rutaceae
83	3,4-metilenodioxo-2'-metoxi-[2",3":4',3']-furanodihidrochalcona	<i>Lonchocarpus subglaucescens</i>	Leguminosae
84	flindersina	<i>Hortia superba</i>	Rutaceae
85	<i>n</i> -metil-flindersina	<i>Hortia superba</i>	Rutaceae

86	<i>n</i> -metil-4-metoxi-2-quinolona	<i>Hortia superba</i>	Rutaceae
87	<i>n</i> -metilantanina	<i>Hortia oreadica</i>	Rutaceae
88	edulitina	<i>Hortia superba</i>	Rutaceae
89	robustina	<i>Hortia oreadica</i>	Rutaceae
90	γ -fagarina	<i>Hortia oreadica</i>	Rutaceae
91	evoltrina	<i>Balfourodendron riedelianum</i>	Rutaceae
92	maculosidina	<i>Balfourodendron riedelianum</i>	Rutaceae
93	kokusaginina	<i>Balfourodendron riedelianum</i>	Rutaceae
94	dictamina	<i>Hortia oreadica</i>	Rutaceae
95	flindersiamina	<i>Helietta apiculata</i>	Rutaceae
96	maculina	<i>Helietta apiculata</i>	Rutaceae
97	rutecarpina	<i>Hortia brasiliana</i>	Rutaceae
98	hortiacina	<i>Hortia brasiliana</i>	Rutaceae
99	4,5-dimetoxicantin-6-ona	<i>Simarouba versicolor</i>	Simaroubaceae
100	5-metoxicantin-6-ona	<i>Simarouba versicolor</i>	Simaroubaceae
101	1,3,5-triidroxi-2,8-di-(3-metil-butenil-2)-4-metoxi-10-metil-9-acridona	<i>Swinglea glutinosa</i>	Rutaceae
102	1,3,5-triidroxi-2,8-di-(3-metil-butenil-2)-10-metil-9-acridona	<i>Swinglea glutinosa</i>	Rutaceae
103	glicocitrina-IV	<i>Swinglea glutinosa</i>	Rutaceae
104	1,3,5-triidroxi-4-prenil-9-acridônica	<i>Swinglea glutinosa</i>	Rutaceae
105	citrusinina-II	<i>Swinglea glutinosa</i>	Rutaceae
106	citrusinina-I	<i>Swinglea glutinosa</i>	Rutaceae
107	citbrasine	<i>Swinglea glutinosa</i>	Rutaceae
108	5-hidroxi-acronicina	<i>Swinglea glutinosa</i>	Rutaceae
109	piranofolina	<i>Swinglea glutinosa</i>	Rutaceae
110	1,5-diidroxi-4-metoxi-2,3-diidrofurano-10-metil-2'-hidroxiisopropil-acridona	<i>Swinglea glutinosa</i>	Rutaceae
111	3,5-diidroxi-1-(2'-hidroxi-3',3'-dimetilcromeno)-4-metoxi-10-metil-9-acridona	<i>Swinglea glutinosa</i>	Rutaceae

(*) dados não disponíveis.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)