



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



ISABELLA MARY ALVES REIS

**Avaliação da atividade antiproliferativa e
antiparasitária de constituintes isolados de *Persea
fulva* (Lauraceae)**

ISABELLA MARY ALVES REIS

**Avaliação da atividade antiproliferativa e antiparasitária de
constituintes isolados de *Persea fulva* (Lauraceae)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da
Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aleksandro Branco

Feira de Santana, BA
2019

Ficha catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

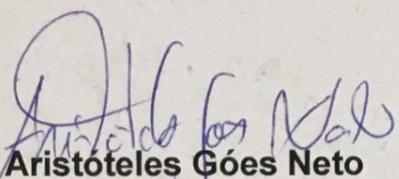
R299a Reis, Isabella Mary Alves
Avaliação da atividade antiploriferativa e antiparasitária de
constituintes isolados de *Persea fulva* (Lauraceae) / Isabella Mary Alves
Reis. - 2019.
125 f.: il.

Orientador: Alexsandro Branco.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Feira de Santana,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.

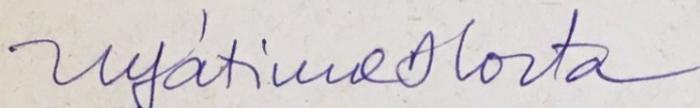
1. Lauraceae. 2. *Persea fulva* - Atividade antiploriferativa. 3. *Persea
fulva* - Atividade antiparasitária. I. Branco, Alexsandro, orient.
II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 582.678.1

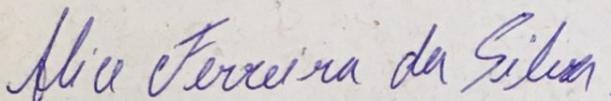
BANCA EXAMINADORA



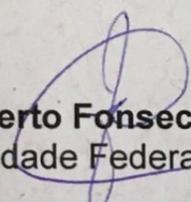
Dr. Aristoteles Góes Neto
(Universidade Federal de Minas Gerais)



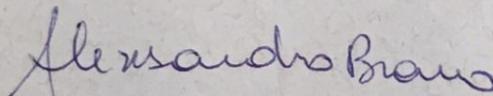
Dr.ª Maria de Fátima Dias Costa
(Universidade Federal da Bahia)



Dr.ª Alice Ferreira da Silva Hughes
(Universidade Estadual de Feira de Santana)



Dr. Humberto Fonseca de Freitas
(Universidade Federal da Bahia)



Dr. Alexandro Branco
(Universidade Estadual de Feira de Santana)

Feira de Santana – BA
2019

Aos meus pais, com amor!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida!

Aos meus pais, Klever e Regina, pois forneceram toda a estrutura para que me tornasse a pessoa que sou hoje, sempre apoiando as minhas decisões, pelo amor incondicional, dedicação e esforço. Aos meus irmãos, Leo e Lu, por estarem sempre presentes e nunca deixarem de me apoiar. Ao meu sobrinho, Leonardo, por ser luz nas nossas vidas! E a todos da minha família, pelo carinho e palavras de incentivo. Ao Fabio, por todo seu amor e paciência, durante todo o percurso, sendo seu apoio fundamental para concluir esta jornada.

Ao Prof. Dr. Alessandro Branco, por ser um exemplo de pesquisador. Por toda orientação, dedicação e paciência durante esses dez anos de caminhada, desde a iniciação científica, sempre compreendendo as minhas opções e me incentivando na busca pelo conhecimento. Estendo meus agradecimentos à professora Carla Branco, por sempre ter uma palavra amiga e um abraço de conforto para ajudar nesta caminhada.

Aos professores Mariana Botura e Manoelito Coelho por estarem sempre dispostos a me ajudar, grata pelas parcerias e confiança. À professora Tânia Maria Sarmiento por ter me recebido em seu laboratório e ajudado no isolamento dos compostos aqui apresentados. Aos professores Ivo José Curcino Vieira e Raimundo Braz-Filho pela parceria nos experimentos de identificação dos compostos. Aos professores Victor Diogenes Amaral e Silvia Lima Costa, que me receberam no ICS-UFBA. Aos colegas Rafael Short e Annyta Frota, por terem me acolhido e ensinado o cultivo celular. À Larissa Matos por ter me feito entender o mundo abstrato da modelagem molecular e me ajudado nos estudos de *Docking*. Ao professor João Lago sempre tão solícito e gentil, agradeço a parceria na realização dos estudos antiparasitários.

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica pelos ensinamentos, convivências, experiências compartilhadas e pela amizade. Em especial, Patrícia, Renata, Saraí, Alana, Rose, Matheus e Rodrigo agradeço pela amizade, parceria, almoços, cafés, pizzas, bolos e experimentos (bem ou mal sucedidos!), momentos de descontração diante das situações mais adversas vivenciadas por um estudante de pós-graduação!

À minha amiga desde a graduação, Danielle Figuerêdo, que agora compartilha comigo as loucuras dessa vida que juntas escolhemos! À Sônia Carine, cuja amizade se tornou um presente fruto desse processo. Às amigas do CPO para a vida Marina, Mariana, Maviniê e Acça por acreditarem mais em mim do que eu mesma.

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia UEFS/FIOCRUZ-Ba pelos incentivos dados para a construção deste trabalho.

A Fundação de Amparo a Pesquisa da Bahia (FAPESB), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos incentivos financeiros para o desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, agradeço à todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho desse certo: Meus sinceros agradecimentos!

“Construí amigos, enfrentei derrotas, venci obstáculos, bati na porta da vida e disse-
lhe: Não tenho medo de vivê-la”
(Augusto Cury)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo fitoquímico e atividades biológicas dos extratos de *Persea fulva* (Lauraceae). Foram isolados o composto inédito (3*E*)-5,6-di-hidro-5-(hidroximetil)-3-docdecilidenefuran-3(4H)-ona, denominado majoranolideo B, três γ -lactonas conhecidas como majorenolideo, o majoranolideo e o majorinolideo e uma lignana, o metilpiperitol. As estruturas foram elucidadas através de análises espectroscópicas, incluindo 1D, 2D RMN (^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H -COSY, HMBC e HSQC) e LC-EM/EM. Estes compostos foram investigados quanto às atividades *in vitro* antiproliferativa em glioma C6 de rato e astrócitos, anti-*Leishmania* e anti- *T. cruzi*, ensaios de acoplamento molecular foram realizados. O majoranolideo foi o composto mais ativo em todos os ensaios e apresentou CE_{50} 6,69 μM contra células de glioma C6, CE_{50} de $2,9 \pm 0,24 \mu\text{M}$ contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, CE_{50} de $36,7 \pm 0,6 \mu\text{M}$ contra as formas promastigotas de *L. infantum*. O metilpiperitol apresentou CE_{50} de $4,5 \pm 1,1 \mu\text{M}$ contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi* e CE_{50} de $4,1 \pm 0,5 \mu\text{M}$ frente às formas intracelulares amastigotas de *L. infantum*. Nestes ensaios, o índice de seletividade (IS) foi estabelecido para todos os compostos e os resultados demonstram alta seletividade para os parasitos. Os ensaios *in silico* confirmam o majoranolideo como compostos mais ativo baseando-se nos valores de energia de afinidade encontrados. Assim, a partir dos resultados alcançados tanto *in vitro*, quanto *in silico* para os compostos isolados de *P. fulva*, pode concluir-se que a espécie é uma fonte de metabolitos de interesse com ações citotóxicas e antiparasitárias.

Palavras-chave: *Persea fulva*. Majoranolideo B. γ -lactonas. Atividade antiproliferativa. Anti-*T. cruzi*; Anti-*Leishmania*.

ABSTRACT

The objective of this work was to carry out the phytochemical study and to evaluate the biological activities of *Persea fulva* (Lauraceae) extracts. Were isolated the unpublished compound (3E)-5,6-dihydro-5-(hydroxymethyl)-3-dodecylidenefuran-3(4H)-one, called majoranolide B, three γ -lactones known as majorenolide, majoranolide and majorynolide and a lignan, methylpiperitol. The structures were elucidated by spectroscopic analysis including 1D, 2D NMR (^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H -COZY, HMBC and HSQC) and LC-MS / MS. These compounds were screened for *in vitro* and *in silico* assays: antiproliferative in rat C6 glioma, anti-*Leishmania* and anti-*T. cruzi* activities. Majoranolide was the most active compound in all assays and showed an EC_{50} 6.69 μM against cells of glioma C6, EC_{50} of $2.9 \pm 0.24 \mu\text{M}$ against trypomastigote forms of *T. cruzi*, EC_{50} of $36.7 \pm 0.6 \mu\text{M}$ against promastigote forms of *L. infantum*. Methylpiperitol presented EC_{50} of $4.5 \pm 1.1 \mu\text{M}$ against the trypomastigote forms of *T. cruzi* and EC_{50} of $4.1 \pm 0.5 \mu\text{M}$ against the amastigote intracellular forms of *L. infantum*. In these assays, the selectivity index (SI) was established for all compounds and the results demonstrate that the compounds showed low toxicity to human cells and high selectivity to parasites. *In silico* assays confirm majoranolide as the most active compound based on the affinity energy values found. Thus, based on both *in vitro* and *in silico* results obtained for the isolated *P. fulva* compounds, it can be concluded that the species is a source of metabolites of interest with cytotoxic and antiparasitic activities.

Keywords: *Persea fulva*. Majoranolide B. γ -lactones. Antiproliferative activity. Anti- *T. cruzi*; Anti *Leishmania*.

LISTA DE SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
CE ₅₀	Concentração Eficiente para 50%
CLAE-DAD	Cromatografia à Líquidos de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjos Diodos
CLAE-EM	Cromatografia à Líquidos de Alta Eficiência acoplada Espectrômetro de Massas
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
Hex	Hexano
m/z	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
MTT	3-(dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio
PBS	Tampão fosfato salino
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
P.A.	Padrão Analítico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CC ₅₀	Concentração Citotóxica para 50%
IS	Índice de Seletividade
GBM	Glioblastoma

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Constituintes químicos de espécies do gênero <i>Persea</i>	23
Tabela 2.1. Dados de RMN de ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) obtidos das γ -lactona (1-4). Deslocamentos químicos em δ (ppm), constantes de acoplamento (J em Hz, entre parênteses), MeOD como solvente e TMS como padrão interno.....	51
Tabela 2.2. Alvos moleculares utilizados nos estudos de acoplamento molecular	55
Tabela 2.3. Resultados do acoplamento molecular para os compostos isolados frente a cada alvo molecular	56
Tabela 3.1. Alvos moleculares de <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizados nos estudos de acoplamento molecular	69
Tabela 3.2. Alvos moleculares para <i>Leishmania spp.</i> utilizados nos estudos de acoplamento molecular	69
Tabela 3.3. Atividade antiparasitária dos compostos 1-4 contra as formas tripomastigotas/amastigotas de <i>T. cruzi</i> e as formas promastigotas/amastigotas de <i>L. infantum</i>	71
Tabela 3.4. Valores de RMSD para cada alvo.....	73
Tabela 3.5. Energias de afinidade encontradas para os compostos isolados frente a cada alvo molecular de <i>T. cruzi</i>	73
Tabela 3.6. Energia de afinidades encontradas para os compostos isolados frente a cada alvo molecular de <i>Leishmania</i>	75
Tabela 4.1. Alvos moleculares utilizados nos estudos de acoplamento molecular para <i>Trypanosoma cruzi</i>	89
Tabela 4.2. Alvos moleculares utilizados nos estudos de acoplamento molecular para <i>Leishmania sp.</i>	89
Tabela 4.3. Dados de RMN (CDCl ₃) em ppm, J em Hz do Composto 1e comparação com os dados da literatura para o Metilpiperitol.....	92
Tabela 4.4. Atividade antiparasitária do Metilpiperitol contra as formas tripomastigotas/amastigotas de <i>T. cruzi</i> e as formas promastigotas/amastigotas de <i>L. infantum</i>	95
Tabela 4.5. Valores de RMSD para cada alvo.....	96
Tabela 4.6. Energias de afinidade encontradas para os compostos isolados frente a cada alvo molecular de <i>T. cruzi</i> e <i>Leishmania</i>	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Principais monoterpênos detectados em espécies de <i>Persea</i>	27
Figura 1.2. Principais sesquiterpenos detectados em espécies de <i>Persea</i>	28
Figura 1.3. Estrutura química dos diterpenos detectados em espécies de <i>Persea</i>	29
Figura 1.4. Estrutura química dos esteroides detectados em espécies de <i>Persea</i>	30
Figura 1.5. Estruturas químicas dos alcaloides descritos em espécies de <i>Persea</i>	31
Figura 1.6. Estruturas químicas das lignanas descritas em espécies de <i>Persea</i>	32
Figura 1.7. Estruturas químicas das neolignanas descritas em <i>Persea lingue</i>	32
Figura 1.8. Estruturas químicas dos flavonoides descritos no gênero <i>Persea</i>	33
Figura 1.9. Estruturas químicas das γ -lactonas descritas no gênero <i>Persea</i>	34
Figura 1.10. Estruturas dos butanolídeos e cumarinas descritos no gênero <i>Persea</i>	35
Figura 2.1. γ -Lactonas (1-4) isoladas de <i>P. fulva</i> majoranolideo B (1), majorenolideo (2), majoranolideo (3) e majorinolideo (4).....	48
Figura 2.2. Correlações do experimento de HMBC para o majoranolideo B (1). Setas azuis (setas azuis, de ^1H a ^{13}C)	49
Figura 2.3. Propostas de fragmentação para γ -lactonas 1-4	50
Figura 2.4. Campo visual de células C6 tratadas com o controle (DMSO 0,05%) e os compostos majoranolideo B (1), majorenolideo (2), majoranolideo (3) e majorinolideo (4) após 24 h após exposição a 10, 12, 7 e 40 μM , respectivamente.....	52
Figura 2.5. Viabilidade celular de C6 calculada através do MTT depois de 24h. Resultados expressos em média \pm desvio padrão e EC_{50} calculado usando o Graph Pad Prism 5 para os compostos Majoranolideo B (1), majorenolideo (2), majoranolideo (3) e majorinolideo (4) ..	53
Figura 2.6. Viabilidade celular de astrócitos após 24 h, utilizando-se ensaios de atividade MTT. As barras de erro indicam médias \pm DP dos compostos majoranolideo B (1), majorenolideo (2), majoranolideo (3) e majorinolideo (4).....	54
Figura 2.7. Comparação do posicionamento dos ligantes acoplados em relação aos cristalográficos de COX-2 (A), S6K1 (B), FAK (C) e ERK1/2 (D). Os ligantes co-cristalizados são mostrados em linhas vermelhas, enquanto as poses ancoradas são mostradas em linhas verdes. RMSD: 0,82 Å (A), 0,95 Å (B), 0,18 Å (C) e 0,36 Å (D).....	56
Figura 2.8. Resultados do acoplamento molecular para FAK (A) S6K1 (B), COX-2 (C) e ERK1/2 (D). Os carbonos são representados em ciano ou laranja, nitrogênios em azul e oxigênios em vermelho. Linha tracejada azul: ligação de hidrogênio; Linha tracejada cinza: interação hidrofóbica.	58
Figura 3. 1. γ -Lactonas (1-4) isoladas de <i>P. fulva</i> majoranolideo B (1), majorenolideo (2), majoranolideo (3) e majorinolideo (4).....	70
Figura 3.2. Resultados do acoplamento molecular para 1TC1. Os carbonos são representados em azul claro (enzima) e magenta (ligante), nitrogênios em azul escuro e oxigênios em vermelho. Linhas azuis: ligação de hidrogênio; Linha tracejada cinza: interação hidrofóbica.	74
Figura 3. 3. Resultados do acoplamento molecular para 5L42. Os carbonos são representados em amarelo (enzima) e magenta (ligante), nitrogênios em azul escuro e oxigênios em	

vermelho. Ligação de hidrogênio: linha azul; interação hidrofóbica: linha tracejada cinza; interação π -stacking: linha tracejada verde.	76
Figura 4.1. Lignana Metilpiperitol (1) isolada de <i>P. fulva</i>	91
Figura 4.2. Proposta de fragmentação para os íons com m/z 353, 335, 323 e 304.....	93
Figura 4.3. Proposta de fragmentação para os íons com m/z 231.....	93
Figura 4.4. Resultados do acoplamento molecular para 1TC1. Os carbonos são representados em azul claro (enzima) e laranja (ligante), nitrogênios em azul escuro e oxigênios em vermelho. Linhas azuis: ligação de hidrogênio; Linha tracejada cinza: interação hidrofóbica	97
Figura 4. 5. Resultados do acoplamento molecular para 5L42. Os carbonos são representados em ciano (enzima) e laranja (ligante), nitrogênios em azul escuro e oxigênios em vermelho. Ligação de hidrogênio: linha azul; interação hidrofóbica: linha tracejada cinza; interação π - π : linha tracejada verde.	98

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	14
REFERÊNCIAS.....	17
CAPÍTULO 1- METABOLITOS SECUNDÁRIOS NO GÊNERO <i>Persea</i> (LAURACEAE) 19	
RESUMO.....	20
1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 METABOLITOS SECUNDÁRIOS DO GÊNERO <i>Persea</i>	22
1.1.1 MONOTERPENOS E SESQUITERPENOS.....	27
1.1.2 DITERPENOS.....	28
1.1.3 ESTEROIDES.....	29
1.1.4 ALCALOIDES.....	30
1.1.5 LIGNANAS E NEOLIGNANAS.....	31
1.1.6 FLAVONOIDES.....	33
1.1.7 LACTONAS.....	34
1.1.8 OUTROS COMPOSTOS.....	35
2. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
REFERÊNCIAS.....	36
CAPÍTULO 2- Alquil- γ -lactonas de <i>Persea fulva</i> (Lauraceae): avaliação de seus efeitos no crescimento de células tumorais <i>in vitro</i> e estudos de acoplamento molecular.....	40
Alquil- γ -lactonas de <i>Persea fulva</i> (Lauraceae): avaliação de seus efeitos no crescimento de células tumorais <i>in vitro</i> e estudos de acoplamento molecular.....	41
RESUMO.....	41
1. INTRODUÇÃO.....	42
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
2.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS.....	42
2.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	44
2.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS E FRACIONAMENTO.....	44
2.4 DADOS ESPECTRAIS.....	44
2.5 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA.....	45
2.5.1 Cultura Celular.....	45
2.5.2 Tratamento e avaliação da viabilidade celular.....	46
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
2.7 MODELAGEM MOLECULAR.....	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.1 ISOLAMENTO DAS γ -LACTONAS DE <i>P. fulva</i>	48
3.2 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA.....	52
3.3 ACOPLAMENTO MOLECULAR.....	55
4. CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
CAPÍTULO 3 - Avaliação <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> da atividade anti- <i>Leishmania</i> e anti- <i>T. cruzi</i> de γ -lactonas isoladas de <i>Persa fulva</i> (Lauraceae).....	62
RESUMO.....	63
1. INTRODUÇÃO.....	64
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
2.1 OBTENÇÃO DAS γ -LACTONAS.....	65
2.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA.....	65
2.2.1 Animais.....	65
2.2.2 Cultura de parasitas e células de mamíferos.....	66

2.1.2.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	66
2.1.2.2 <i>Leishmania (L.) infantum</i>	66
2.1.2.3 NCTC.....	66
2.3 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES EFETIVAS A 50% (CE ₅₀) <i>in vitro</i>	66
2.4 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	67
2.5 ACOPLAMENTO MOLECULAR.....	68
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
3.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA	70
3.2 ACOPLAMENTO MOLECULAR.....	72
4. CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS.....	77
CAPÍTULO 4- Atividade anti- <i>T. cruzi</i> e anti- <i>Leishmania in vitro e in silico</i> do Metilpiperitol, uma lignana, isolada de <i>Persa fulva</i> (Lauraceae)	81
RESUMO.....	82
1. INTRODUÇÃO	83
2. MATERIAIS E MÉTODOS	84
2.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS	84
2.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL	85
2.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS E FRACIONAMENTO	85
2.4 DADOS ESPECTRAIS	86
2.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA	86
2.5.1 Animais.....	86
2.5.1 Cultura de parasitas e células de mamíferos.....	86
2.5.1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	86
2.5.1.2 <i>Leishmania (L.) infantum</i>	86
2.5.1.2 NCTC.....	87
2.6 DETERMINAÇÃO <i>in vitro</i> DAS CONCENTRAÇÕES EFETIVAS A 50% (CE ₅₀)	87
2.7 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	88
2.8 ACOPLAMENTO MOLECULAR.....	88
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
3.1 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES DE <i>P. fulva</i>	90
3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA	94
3.2 ACOPLAMENTO MOLECULAR.....	95
3 CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS.....	100
CONCLUSÃO GERAL.....	105
ANEXOS	106

INTRODUÇÃO GERAL

A busca por metabolitos secundários em espécies vegetais desponta como uma alternativa no desenvolvimento de novos fármacos, por apresentarem vantagens como a facilidade de coleta, a condição ambiental favorável para desenvolvimento sustentável, a diversidade estrutural de substâncias orgânicas naturais e a possibilidade de descoberta de novos princípios ativos (VEIGA-JUNIOR, 2008; DEVIENNE; RADDI; POZETTI, 2004). Desta maneira, o câncer e as doenças parasitárias são importantes alvos na busca por novas alternativas terapêuticas.

Os gliomas são um grupo diversificado de neoplasias gliais e são responsáveis pela grande maioria dos tumores originados no parênquima do sistema nervoso central (SNC) (YANG *et al.*, 2018). O glioblastoma (GBM) é o tipo mais comum de tumor maligno no sistema nervoso central, e o seu prognóstico continua ruim, apesar dos esforços feitos em décadas anteriores. Os prognósticos dos GBM são igualmente desanimadores, variando de 5 a 15 meses após o diagnóstico de GBM primário e 8-31 meses para tumores secundários (DROPCHO; SOONG, 1996; LOUIS *et al.*, 2016), o que faz com que sejam classificados entre os cânceres humanos mais letais.

A abordagem padrão atual para GBM, consiste de ressecção máxima segura seguida de radioterapia e quimioterapia concomitante e adjuvante com temozolamida (TMZ) (OHGAKI; KLEIHUES, 2005; WEN; KESARI, 2008). A razão pela qual os glioblastomas são difíceis de tratar está relacionada não apenas a restrição na quantidade total de massa tumoral que pode ser removida com segurança, mas também a resistência à terapia adjuvante após a ressecção cirúrgica (TOMIYAMA, ICHIMURA, 2019).

Assim como os diferentes tipos de câncer promovem a busca por novas opções de tratamento, as doenças parasitárias, também denominadas “doenças negligenciadas”, acometem milhões de pessoas no mundo, principalmente nos países em desenvolvimento e apesar disto poucas drogas estão disponíveis para seu tratamento, e em maioria são pouco eficazes e consideravelmente tóxicas (ANDREWS *et al.*, 2014). A família Trypanosomatidae é constituída por protozoários responsáveis por importantes doenças parasitárias como a doença de Chagas (*Trypanosoma*) e a leishmaniose visceral (*Leishmania*) (VARELA *et al.*, 2017).

A doença de Chagas afeta cerca de 8 milhões de pessoas na América Latina e estima-se que entre 2016 e 2021 mais de 20000 pessoas correm o risco de contraí-la. Esta doença é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, e é caracterizada por duas fases:

aguda e crônica. A terapia disponível para o tratamento da doença de chagas é limitada e existem dois medicamentos disponíveis para o seu tratamento, o benznidazol e o nifurtimox, que exibem eficácia reduzida a fase crônica da doença e efeitos colaterais graves (BRITO *et al.*, 2019; SCARIM *et al.*, 2018).

A Leishmaniose é uma doença infecciosa causada por várias espécies de parasitas protozoários conhecidos como *Leishmania*, transmitida ao seu hospedeiro mamífero através da picada de um flebotomíneo infectado. Clinicamente, a leishmaniose aparece da seguinte maneira: Leishmaniose cutânea, Leishmaniose mucocutânea, Leishmaniose visceral, Leishmaniose dérmica pós-vascular. As terapias atuais incluem antimoniais pentavalentes, Anfotericina B, Paromomicina, Miltefosina, Pentamidina, Sitamaquina. Globalmente, estima-se que 500.000 novos casos dessa doença ocorrem anualmente, o subcontinente indiano e a África Oriental carregam mais de 70% da carga de LV (KAPIL; SINGH; SILAKARI, 2018; GRIENSVEN; DIRO, 2019; GRIENSVEN; DIRO, 2012).

Na busca por novas alternativas terapêuticas para doenças como as supracitadas as espécies da família Lauraceae despontam como uma importante fonte de novas substâncias. A família Lauraceae é composta de 52 gêneros e cerca de 3000 espécies distribuídas pelos trópicos, especialmente no Sudeste Asiático e Brasil, juntamente com um menor número em regiões temperadas (MARQUES, 2001). Dentre as espécies de Lauraceae pode-se destacar espécies utilizadas na culinária como a *Persea americana* Mill., com nome popular abacateiro, que é uma espécie arbórea, procedente da América Central, muito estimada pelo alto valor comestível da polpa dos seus frutos, o abacate; *Laurus nobilis* L., que possui folhas que são usadas como tempero, popularmente conhecida como “folha de louro”; existem ainda as “canelas” são elas, *Cinnamomum zeylanicum* Breyne e *C. cassia* (Nees) NEES & EBERT ex Blume, que são espécies arbóreas das quais se extrai a casca (MARQUES, 2001).

O gênero *Persea* compreende 200 espécies distribuídas na América do Sul, Sudeste Asiático e Mesoamérica. No Brasil são descritas 22 espécies deste gênero, das quais nove são encontradas na região nordeste, oito na Bahia (QUINET *et al.*, 2012). Os dados químicos a respeito das espécies de *Persea* ainda são escassos. Em espécies desse gênero já foram relatados metabólitos secundários, como terpenos, lactonas, lignanas e flavonoides (SCORA; BERGH; HOPFINGER, 1975; GONZALEZ-COLOMA *et al.*, 2002; SEPULVEDA-BOZA; DELHVI; CASSELS, 1990; WOFFORD, 1974; TSAI *et al.*, 1996).

O presente estudo objetivou realizar o estudo fitoquímico e atividades biológicas dos extratos de *P. fulva* (Lauraceae). A tese está dividida em quatro capítulos: o primeiro descreve

uma revisão bibliográfica a respeito dos metabolitos secundários encontrados em espécies do gênero *Persea*; o segundo capítulo tem como título Alquil- γ -lactonas de *Persea fulva* (Lauraceae): avaliação de seus efeitos no crescimento de células tumorais *in vitro* e estudos de acoplamento molecular; o terceiro capítulo trata da avaliação *in vitro* e *in silico* da atividade anti-*Leishmania* e anti- *T. cruzi* de γ -lactonas isoladas de *Persa fulva* (Lauraceae); e o quarto capítulo intitulado atividade anti-*T. cruzi* e anti-*Leishmania in vitro* e *in silico* do Metilpiperitol, uma lignana, isolada de *Persa fulva* (lauraceae).

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, D.W. *et al.* The somatic genomic landscape of glioblastoma. **Cell**, v. 155, p. 462-477, 2013.
- BRITO, J. R. *et al.* Dibenzylbutane neolignans from *Saururus cernuus* L. (Saururaceae) displayed anti-*Trypanosoma cruzi* activity via alterations in the mitochondrial membrane potential. **Fitoterapia**, v. 137, p. 104251, set. 2019.
- DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; POZETTI, G. L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, p. 11-14, 2004.
- GONZALEZ-COLOMA, A.; REINA, M.; GUTIERREZ, C.; FRAGA, B.M. Natural insecticides: structure diversity, effects and structure-activity relationships. A case study. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 2, p. 849-879, 2002.
- KAPIL, S.; SINGH, P.K.; SILAKARI, O. An update on small molecule strategies targeting leishmaniasis. **Eur J Med Chem**. v. 157, p. 339-367, 2018.
- MARQUES, C.A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e ambiente**, v. 8, p.195 – 206, 2001.
- QUINET, A. Sinopse taxonômica da família Lauraceae no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**. v. 19, p. 563-572, 2005.
- SCARIM, C. B. *et al.* Current advances in drug discovery for Chagas disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 155, p. 824-838, 2018.
- SCORA, R.W.; BERGH, B.O.; HOPFINGER, J.A. Leaf Alkanes in *Persea* and Related Taxa. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 3, p. 215-218, 1975.
- SEPULVEDA-BOZA, S.; DELHVI, S.; CASSELS, B.K. An aryltetralin lignan from *Persea lingue*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2357-2358, 1990.
- TOMIYAMA, A.; ICHIMURA, K. Signal transduction pathways and resistance to targeted therapies in glioma. **Seminars in Cancer Biology**, p. S1044579X18300981, jan. 2019.
- TSAI, I. L. *et al.* Cytotoxic neolignans from *persea obovatifolia*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1261-1263, 1996.
- VAN GRIENSVEN J; DIRO E. Visceral leishmaniasis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 26, p. 309-322, 2012.
- VAN GRIENSVEN J; DIRO E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. **Infect Dis Clin North Am**, v. 33, p. 79-99, 2019.
- VARELA, M. T. *et al.* New alkenyl derivative from *Piper malacophyllum* and analogues: Antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 90, n. 5, p. 1007–1011, nov. 2017.

VEIGA-JUNIOR, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 18, p.308-313, 2008.

WOFFORD, B.E. The Systematic Significance of Flavonoids in *Persea* of the Southeastern United States. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 2, p. 89-91, 1974.

YANG, K. *et al.* Histopathologic and Clinical Correlation of Aberrant Neuromagnetic Activities with Low to High Frequency of Gliomas. **World Neurosurgery**, v. 123, p. e609–e620, mar. 2019.

**CAPÍTULO 1- METABOLITOS SECUNDÁRIOS NO GÊNERO *Persea*
(LAURACEAE)**

METABOLITOS SECUNDÁRIOS NO GÊNERO *Persea* (LAURACEAE)

RESUMO

O gênero *Persea* é composto por aproximadamente 200 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da América, África, Ásia e Oceania, pertence à família Lauraceae. Neste estudo, são descritos os compostos isolados de diferentes espécies do gênero *Persea*, juntamente com suas principais atividades biológicas. Quimicamente, o gênero *Persea* contém diferentes tipos de metabólitos secundários, como terpenos, alcaloides, lignanas, neolignanas e flavonoides. Nesta revisão, fornecemos uma visão abrangente da química do gênero *Persea* e são descritos aproximadamente 90 compostos isolados de diferentes espécies, juntamente com seu potencial terapêutico.

PALAVRAS-CHAVE: Lauraceae. *Persea*. Metabólitos secundários. Flavonoides. Lignanas.

1. INTRODUÇÃO

A família Lauraceae, pertence à ordem Laurales, compreende cerca de 70 gêneros e aproximadamente 2500 espécies, amplamente distribuídas através das regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo bem representada nos trópicos e subtropicais da América e Ásia, com poucas representatividades de espécies na Austrália, Madagascar e África (WERFF; RICHTER, 1996; REIS-AVILA; OLIVEIRA, 2017; TELES *et al.*, 2019).

Os primeiros registros do uso das espécies desta família datam de 2800 a.C., na Grécia antiga, por isso os muitos dos nomes atribuídos aos gêneros dessa família fazem alusão aquela época, como o gênero *Laurus* L. que faz referência ao nome Celta “*Lauer*” e significa verde, e então este gênero estabeleceu o nome da família devido as suas características botânicas (TELES *et al.*, 2019; MARQUES, 2001; GRANADOS-ECHEGOYEN *et al.*, 2015).

As espécies de Lauraceae destacam-se devido à relevante importância econômica apresentada por suas espécies (MARQUES, 2001; REIS-AVILA, 2017). Podem-se destacar espécies utilizadas na culinária como a *Persea americana*, muito estimada pelo alto valor comercial da polpa comestível dos seus frutos, o abacate (ALKHALF, *et al.*, 2018); *Laurus nobilis*, cujas folhas que são usadas como tempero, popularmente conhecida como “folha de louro” (DUC DAT *et al.*, 2019); existem ainda as “canelas” são elas, *Cinnamomum zeylanicum* e *Cinnamomum cassia*, que são espécies arbóreas das quais se extrai a casca. Dentre as espécies aromáticas merece destaque a *Cinnamomum camphora*, popularmente conhecida como cânfora, empregada na indústria de perfumaria e medicamentos, devido ao odor agradável produzido pelo linalol (PHAM *et al.*, 2019). Em remanescentes de Floresta Atlântica, a família Lauraceae vem sendo apontada como uma das mais representativas, tanto em número de indivíduos quanto em riqueza de táxons (QUINET; ANDREATA, 2002).

As espécies de Lauraceae são, predominantemente, árvores e, em geral, aromáticas. As folhas são alternas e simples, raro opostas a subopostas ou lobadas. As flores são unissexuadas ou bissexuadas, actinomorfas. Os estames apresentam antera com deiscência valvar e são dispostos em quatro verticilos. O ovário é súpero, uni- carpelar, unilocular e uniovulado. Os frutos são do tipo bacáceo ou núcula, em geral com o hipanto modificado em cúpula, de margem simples ou dupla (SANTOS; ALVES, 2013).

O gênero *Persea*, pertencente à família Lauraceae, possui cerca de 200 espécies distribuídas na América tropical e subtropical e Ásia. No Brasil, ocorrem 22 espécies, das quais oito são registradas no Nordeste brasileiro. As árvores são monoicas, com folhas alternas, peninérveas, sem papilas na epiderme abaxial, inflorescência tirsopaniculada, flores

monoclinas, hipanto curto, achatado, não comprimido abaixo das tépalas, seis tépalas, eretas, iguais ou desiguais, as externas menores que as internas, face interna raro densamente papilosas (QUINET *et al.*, 2005).

Os membros do gênero *Persea* tem sido usado na medicina tradicional para o tratamento de hipertensão (WRIGHT *et al.*, 2007), diarreia (MOHAGHEGHZADEH *et al.*, 2006), doenças infecciosas (SCHLEMPER *et al.*, 2001), anti-inflamatória (CECHINEL-FILHO *et al.*, 2007) e gastro-analgésica (NOVAIS *et al.*, 2004).

Dentre as atividades biológicas descritas para espécies do gênero *Persea* podem ser citados atividade antiespasmódica (CECHINEL-FILHO *et al.*, 2007), antioxidante (CHANDRA *et al.*, 2012; LÓPEZ-YERENA *et al.*, 2018), gastroprotetora (COSMO *et al.*, 2007), citotóxica (TSAI *et al.*, 1998; TSAI *et al.*, 2000; NASCIMENTO *et al.*, 2004; FUZI *et al.*, 2013; SANTA-ROSA *et al.*, 2017), anti-helmíntica (SANTA-ROSA *et al.*, 2017), inseticida (FRAGA *et al.*, 1997; FRAGA *et al.*, 2001; GONZALEZ-COLOMA *et al.*, 1992; GONZALEZ-COLOMA *et al.*, 1993; GONZALEZ-COLOMA *et al.*, 1996; GONZALEZ-COLOMA *et al.*, 1999).

Diante da importância do gênero e da necessidade de novos compostos químicos com atividades biológicas faz-se necessária a revisão dos metabolitos secundários descritos até o momento neste gênero. Neste estudo foi possível realizar uma compilação abrangente da química do gênero *Persea*, dos compostos isolados de diferentes espécies juntamente com suas principais atividades biológicas. A espécie *Persea americana* foi retirada desta revisão por possuir uma série de estudos que revisam seus dados químicos e biológicos (YASIR *et al.*, 2010; LU *et al.*, 2012; ABUBAKAR *et al.*, 2017).

1.1 METABOLITOS SECUNDÁRIOS DO GÊNERO *Persea*

As estruturas dos compostos 1-88, identificados e isolados em 31 espécies do gênero *Persea* são subdivididas em classes demonstradas abaixo. Na Tabela 1.1, estão compilados os compostos isolados e as partes da planta estudadas de cada espécie. Nos estudos fitoquímicos das espécies de *Persea* as seguintes classes de metabólitos são predominantes: terpenos, flavonoides, alcaloides, lignanas, neolignanas e lactonas. Os estudos associam aspectos biológicos aos compostos isolados e nas seções seguintes esses dados serão discutidos (SCORA; BERGH; HOPFINGER, 1975; GONZALEZ-COLOMA *et al.*, 2002; SEPULVEDA-BOZA; DELHVI; CASSELS, 1990; WOFFORD, 1974; TSAI *et al.*, 1996).

Tabela 1.1 Constituintes químicos de espécies do gênero *Persea*

Nº	Nome do composto	Parte da planta	Espécie	Referência
Monoterpenos				
1	α -Pineno	Folhas	<i>P. duthiei</i>	PALADIA <i>et al.</i> , 2009
		Folhas	<i>P. odoratissima</i>	JOSHI <i>et al.</i> , 2010
		Folhas	<i>P. lingue</i>	CÉSPEDES <i>et al.</i> , 2006
		Folhas	<i>P. thunbergii</i>	KOMAE; HAYASHI, 1972
2	β -Pineno	Folhas	<i>P. duthiei</i>	PALADIA <i>et al.</i> , 2009
		Folhas	<i>P. lingue</i>	CÉSPEDES <i>et al.</i> , 2006
		Folhas	<i>P. japonica</i>	KOMAE; HAYASHI, 1971
3	β -mirceno	Folhas	<i>P. lingue</i>	SCORA <i>et al.</i> , 1970
4	Sabineno	Folhas	<i>P. odoratissima</i>	JOSHI <i>et al.</i> , 2010
		Folhas	<i>P. caerulea</i>	SCORA <i>et al.</i> , 1970
		Folhas	<i>P. borbonia</i>	SCORA <i>et al.</i> , 1970
		Folhas	<i>P. lingue</i>	SCORA <i>et al.</i> , 1970
5	β -ocimeno	Folhas	<i>P. schiedeana</i>	SCORA <i>et al.</i> , 1970
6	Limoneno	Folhas	<i>P. duthiei</i>	PALADIA <i>et al.</i> , 2009
		Folhas	<i>P. humilis</i>	TUCKER <i>et al.</i> , 1997
		Folhas	<i>P. palustres</i>	TUCKER <i>et al.</i> , 1997
		Folhas	<i>P. borbonia</i>	TUCKER <i>et al.</i> , 1997
		Folhas	<i>P. lingue</i>	CÉSPEDES <i>et al.</i> , 2006
Sesquiterpenos				
7	Farnesol	Folhas	<i>P. borbonia</i>	SCORA <i>et al.</i> , 1970
		Folhas	<i>P. caerulea</i>	SCORA <i>et al.</i> , 1970
		Folhas	<i>P. pachypoda</i>	SCORA <i>et al.</i> , 1970
8	Cariofileno	Folhas	<i>P. duthiei</i>	PALADIA <i>et al.</i> , 2009
		Flores		
		Caule	<i>P. indica</i>	PINO <i>et al.</i> , 2004
		Folhas		WEYERSTAHL; MARSCHAL; SCORA, 1993
				SCORA <i>et al.</i> , 1970
		Folhas	<i>P. odoratissima</i>	JOSHI <i>et al.</i> , 2010
		Folhas	<i>P. lingue</i>	CÉSPEDES <i>et al.</i> , 2006
				SCORA <i>et al.</i> , 1970
		Folhas	<i>P. caerulea</i>	SCORA <i>et al.</i> , 1970
		Folhas	<i>P. skutchii</i>	SCORA <i>et al.</i> , 1970
9	α -Humuleno	Folhas	<i>P. donnell-smithii</i>	SCORA <i>et al.</i> , 1970
		Folhas	<i>P. schiedeana</i>	SCORA <i>et al.</i> , 1970
		Folhas	<i>P. gamblei</i>	JOSHI <i>et al.</i> , 2010
		Folhas	<i>P. pachypoda</i>	SCORA <i>et al.</i> , 1970
		Folhas	<i>P. japonica</i>	KOMAE; HAYASHI, 1971
		Folhas	<i>P. caerulea</i>	SCORA <i>et al.</i> , 1970
		Folhas	<i>P. skutchii</i>	SCORA <i>et al.</i> , 1970
		Folhas	<i>P. donnell-smithii</i>	SCORA <i>et al.</i> , 1970
		Folhas	<i>P. schiedeana</i>	SCORA <i>et al.</i> , 1970
		Folhas	<i>P. indica</i>	SCORA <i>et al.</i> , 1970
10	δ -Cadineno	Folhas	<i>P. pachypoda</i>	SCORA <i>et al.</i> , 1970
		Folhas	<i>P. odoratissima</i>	JOSHI <i>et al.</i> , 2009
11	γ -Muuroleno	Folhas	<i>P. indica</i>	WEYERSTAHL; MARSCHAL; SCORA, 1993
		Folhas	<i>P. duthiei</i>	PALADIA <i>et al.</i> , 2009
		Frutos		
12	epi-Cubebol	Flores		
		Folhas	<i>P. duthiei</i>	PALADIA <i>et al.</i> , 2009

13	Elemene	Frutos	<i>P. duthiei</i>	PALADIA <i>et al.</i> , 2009
14	Nerolidol	Folhas Frutos Flores	<i>Flores</i> <i>P. duthiei</i> <i>P. bombycina</i> (<i>King ex Hook. f.</i>)	PALADIA <i>et al.</i> , 2009 CHOUDHURY <i>et al.</i> , 1997
15	epi- α -Cadinol	Flores	<i>P. duthiei</i>	PALADIA <i>et al.</i> , 2009
16	β -eudesmol	Frutos Flores	<i>P. duthiei</i>	PALADIA <i>et al.</i> , 2009
17	γ -Eudesmol	Folhas	<i>P. japonica</i>	WANG; KUOH; WU, 1996
18	óxido de cariofileno	Folhas	<i>P. japonica</i>	WANG; KUOH; WU, 1996
19	Selin-11-en-4 α -ol	Frutos	<i>P. duthiei</i>	PALADIA <i>et al.</i> , 2009
20	Germacreno D	Caule Folhas	<i>P. indica</i>	PINO <i>et al.</i> , 2004

Diterpenos

21	Rianodol	Partes aéreas	<i>P. indica</i>	FRAGA <i>et al.</i> , 1997 GONZALEZ-COLOMA <i>et al.</i> , 1999
22	Rianodol-14-monoacetato	Partes aéreas	<i>P. indica</i>	FRAGA <i>et al.</i> , 1997
23	Cinnzeilanol	Partes aéreas	<i>P. indica</i>	FRAGA <i>et al.</i> , 1997 GONZALEZ-COLOMA <i>et al.</i> , 1999
24	Cinnzeilanina	Partes aéreas	<i>P. indica</i>	FRAGA <i>et al.</i> , 1997 GONZALEZ-COLOMA <i>et al.</i> , 1999
25	epi-cinnzeilanol	Partes aéreas	<i>P. indica</i>	FRAGA <i>et al.</i> , 1997 GONZALEZ-COLOMA <i>et al.</i> , 1999
26	Cinnzeilanona	Partes aéreas	<i>P. indica</i>	FRAGA <i>et al.</i> , 1997
27	Indicol	Partes aéreas	<i>P. indica</i>	FRAGA <i>et al.</i> , 1997
28	Vignaticol	Partes aéreas	<i>P. indica</i>	FRAGA <i>et al.</i> , 1997 GONZALEZ-COLOMA <i>et al.</i> , 1999
29	Perseanol	Partes aéreas	<i>P. indica</i>	FRAGA <i>et al.</i> , 1997 GONZALEZ-COLOMA <i>et al.</i> , 1999
30	Cinncassiol E	Partes aéreas	<i>P. indica</i>	FRAGA <i>et al.</i> , 2017
31	Perseaindicol	Partes aéreas	<i>P. indica</i>	FRAGA <i>et al.</i> , 2017
32	Secoperseanol	Partes aéreas	<i>P. indica</i>	FRAGA <i>et al.</i> , 2017

Esteroides

33	β -sitosterol	Folhas	<i>P. japonica</i>	WANG; KUOH; WU, 1996
34	Estigmasterol	Folhas	<i>P. caerulea</i>	ALVÁREZ <i>et al.</i> , 2016
		Folhas	<i>P. japonica</i>	WANG; KUOH; WU, 1996
35	β -sitosterol glucosídeo	Folhas	<i>P. japonica</i>	WANG; KUOH; WU, 1996
		Folhas	<i>P. caerulea</i>	ALVÁREZ <i>et al.</i> , 2016
36	β -estigmasterol glucosídeo	Folhas	<i>P. japonica</i>	WANG; KUOH; WU, 1996
37	<i>Campesterol</i>	Folhas	<i>P. caerulea</i>	ALVÁREZ <i>et al.</i> , 2016

Alcaloides

38	Reticulina	Cascas do caule	<i>P. kurzzi</i>	DENRUNGRUANG; PRASITPAN; KODAMA, 1996
			<i>P. japonica</i> <i>P. zuihoensis</i>	WANG; KUOH; WU, WANG; KUOH; WU, 1996
39	<i>N</i> -norarmepavina	Cascas do caule	<i>P. kurzzi</i>	DENRUNGRUANG; PRASITPAN; KODAMA, 1996
			<i>P. obovatifolia</i>	RALPH; BICK; SINCHAI, 1978
			<i>P. zuihoensis</i>	RALPH; BICK; SINCHAI, 1978
			<i>P. thunbergii</i>	RALPH; BICK; SINCHAI, 1978
40	Coclaurina	Folhas	<i>P. kusanoi</i>	RALPH; BICK; SINCHAI, 1978
		Folhas	<i>P. macrantha</i>	RALPH; BICK; SINCHAI, 1978

	Folhas	<i>P. philippinensis</i>	RALPH; BICK; SINCHAI, 1978
41	5-hidroxitriptamina	Folhas	<i>P. gratissima</i> WILLAMAN; LI, 1970
42	Isoboldina	Folhas	<i>P. japonica</i> WANG; KUOH; WU, 1996
43	Corituberina	Folhas	<i>P. japonica</i> WANG; KUOH; WU, 1996
44	Laudanidina	Folhas	<i>P. thunbergii</i> RALPH; BICK; SINCHAI, 1978

Lignanas

45	Lingueresionol	Casca do caule	<i>P. lingue</i>	SEPULVEDA-BOZA, DELHVI, CASSELS, 1990
46	Sesamina	Folhas	<i>P. kurzzi</i>	DENRUNGRUANG; PRASITPAN; KODAMA, 1996
		Casca do caule	<i>P. thunbergii</i>	MA, SUNG, KIM, 2003
		Folhas	<i>P. pirifolia</i>	BATISTA <i>et al.</i> , 2010
47	Metilpiperitol	Folhas	<i>P. pirifolia</i>	BATISTA <i>et al.</i> , 2010
48	Eudesmina	Folhas	<i>P. pirifolia</i>	BATISTA <i>et al.</i> , 2010
		Cascas do caule	<i>P. kurzzi</i>	DENRUNGRUANG; PRASITPAN; KODAMA, 1996
49	Magnolina	Folhas	<i>P. pirifolia</i>	BATISTA <i>et al.</i> , 2010
50	epi-eudesmina	Cascas do caule	<i>P. kurzzi</i>	DENRUNGRUANG; PRASITPAN; KODAMA, 1996
51	Piligenina	Cascas do caule	<i>P. kurzzi</i>	DENRUNGRUANG; PRASITPAN; KODAMA, 1996
52	Kobusina	Cascas do caule	<i>P. kurzzi</i>	DENRUNGRUANG; PRASITPAN; KODAMA, 1996
53	(+)-Machilina F	Casca do caule	<i>P. membranacea</i>	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2004
54	Obovatinal	Folhas	<i>P. obovatifolia</i>	TSAI <i>et al.</i> , 1996
55	Obovatifol	Folhas	<i>P. obovatifolia</i>	TSAI <i>et al.</i> , 1998
56	Obovaten	Folhas	<i>P. obovatifolia</i>	TSAI <i>et al.</i> , 1998
57	Perseal A	Folhas	<i>P. obovatifolia</i>	TSAI <i>et al.</i> , 1996
58	Perseal B	Folhas	<i>P. obovatifolia</i>	TSAI <i>et al.</i> , 1996
59	Perseal C	Folhas	<i>P. obovatifolia</i>	TSAI <i>et al.</i> , 1998
60	Perseal D	Folhas	<i>P. obovatifolia</i>	TSAI <i>et al.</i> , 1998

Flavonoides

61	Orientina	Folhas	<i>P. borbonia</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. littoralis</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. humilis</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
62	Isorientina	Folhas	<i>P. borbonia</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. littoralis</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. humilis</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
63	Vitexina	Folhas	<i>P. borbonia</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. littoralis</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. humilis</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. palustres</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
64	Isovitexina	Folhas	<i>P. borbonia</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. littoralis</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. humilis</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. palustres</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
65	Canferol-3-O-ramnosídeo	Folhas	<i>P. borbonia</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. littoralis</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. humilis</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. palustris</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
66	Canferol-3-O-glucosídeo	Folhas	<i>P. borbonia</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. littoralis</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. humilis</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. palustris</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
67	Quercetina-3-O-	Folhas	<i>P. borbonia</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974

	ramnosídeo	Folhas	<i>P. littoralis</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. humilis</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. palustris</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Flores	<i>P. gratissima</i>	KRUTHIVENTI; KRISHNASWAMY, 2000
68	Quercetina-3- <i>O</i> -xilósídeo	Folhas	<i>P. borbonia</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. littoralis</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. humilis</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. palustris</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
69	Quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo	Folhas	<i>P. caerulea</i>	ALVÁREZ <i>et al.</i> , 2016
		Folhas	<i>P. borbonia</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. littoralis</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. humilis</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. palustris</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
70	Rutina	Folhas	<i>P. borbonia</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. littoralis</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. humilis</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
		Folhas	<i>P. palustris</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
71	Quercetina-3- <i>O</i> -galactosídeo	Folhas	<i>P. humilis</i>	WOFFORD <i>et al.</i> , 1974
72	Canferol-3- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil	Flores	<i>P. gratissima</i>	KRUTHIVENTI; KRISHNASWAMY, 2000
73	Isoramnetina-3- <i>O</i> -glucosídeo	Flores	<i>P. gratissima</i>	KRUTHIVENTI; KRISHNASWAMY, 2000
74	Kaempferol-3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -(2,4-bis- <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroil)ramnosídeo	Folhas	<i>P. lingue</i>	HOLLER <i>et al.</i> , 2012
75	Quercetina	Folhas	<i>P. caerulea</i>	ALVÁREZ <i>et al.</i> , 2016
76	Canferide-3- <i>O</i> -ramnosídeo	Folhas	<i>P. caerulea</i>	ALVÁREZ <i>et al.</i> , 2016
77	Canferol-3- <i>O</i> -arabinosídeo	Folhas	<i>P. caerulea</i>	ALVÁREZ <i>et al.</i> , 2016

Lactonas

78	Majorenolideo	Caule	<i>P. major</i>	MA <i>et al.</i> , 1990
		Folhas	<i>P. fulva</i>	REIS <i>et al.</i> , 2019
		Frutos	<i>P. indica</i>	FRAGA; TERRERO, 1996
79	Majorinolideo	Caule	<i>P. major</i>	MA <i>et al.</i> , 1989
		Folhas	<i>P. fulva</i>	REIS <i>et al.</i> , 2019
		Frutos	<i>P. indica</i>	FRAGA; TERRERO, 1996
80	Majoranolideo	Caule	<i>P. major</i>	MA <i>et al.</i> , 1989
		Folhas	<i>P. fulva</i>	REIS <i>et al.</i> , 2019
		Frutos	<i>P. indica</i>	FRAGA; TERRERO, 1996
81	Majoranolideo B	Folhas	<i>P. fulva</i>	REIS <i>et al.</i> , 2019
82	Isoobtusilactona A	Raiz	<i>P. borbonia</i>	ZAKI <i>et al.</i> , 1980
		Caule		
		Caule	<i>P. pachypoda</i>	ZAKI <i>et al.</i> , 1980
		Caule	<i>P. steyermarkii</i>	ZAKI <i>et al.</i> , 1980
		Caule	<i>P. schiedeana</i>	ZAKI <i>et al.</i> , 1980
		Caule	<i>P. caerulea</i>	ZAKI <i>et al.</i> , 1980
		Caule	<i>P. donnell-smithii</i>	ZAKI <i>et al.</i> , 1980

Outros compostos

83	Avocadenofurano	Caule	<i>P. indica</i>	PINO <i>et al.</i> , 2004
84	Avocadinofurano	Caule	<i>P. indica</i>	PINO <i>et al.</i> , 2004
85	Avocadienofurano	Caule	<i>P. indica</i>	PINO <i>et al.</i> , 2004

86	Avocadeninofurano	Caule	<i>P. indica</i>	PINO <i>et al.</i> , 2004
87	Escopoletina	Folhas	<i>P. caerulea</i>	ALVÁREZ <i>et al.</i> , 2016
88	Isofraxidina	Folhas	<i>P. caerulea</i>	ALVÁREZ <i>et al.</i> , 2016

1.1.1 MONOTERPENOS E SESQUITERPENOS

O estudo dos óleos essenciais de espécies de *Persea* permitiu caracterizar os compostos terpênicos majoritários nas espécies deste gênero. Dentre os compostos terpênicos podem ser citados os monoterpenos: α -pineno (1), β -pineno (2), β -mirceno (3), sabineno (4), β -ocimeno (5), limoneno (6) (Figura 1.1); os sesquiterpenos: farnesol (7), cariofileno (8), α -humuleno (9), δ -cadineno (10), γ -muuroleno (11), epi-cubebol (12), elemene (13), nerolidol (14), epi- α -cadinol (15), β -eudesmol (16), γ -eudesmol (17), óxido de cariofileno (18), selin-11-en-4 α -ol (19) e germacreno D (20) (Figura 1.2). As espécies estudadas foram *P. borbonia*, *P. caerulea*, *P. donnell-smithii*, *P. indica*, *P. lingue*, *P. schiedeana*, *P. duthiei*, *P. bombycina* (King ex Hook. f.), *P. japonica*, *P. odoratissima*, *P. gamblei* e *P. skutchii* (PALADIA *et al.*, 2009; WANG; KUOH; WU, 1996; KOMAE; HAYASHI, 1971; CÉSPEDES *et al.*, 2006; TUCKER *et al.*, 1997; JOSHI *et al.*, 2010; PALADIA *et al.*, 2009).

Figura 1.1 Principais monoterpenos detectados em espécies de *Persea*

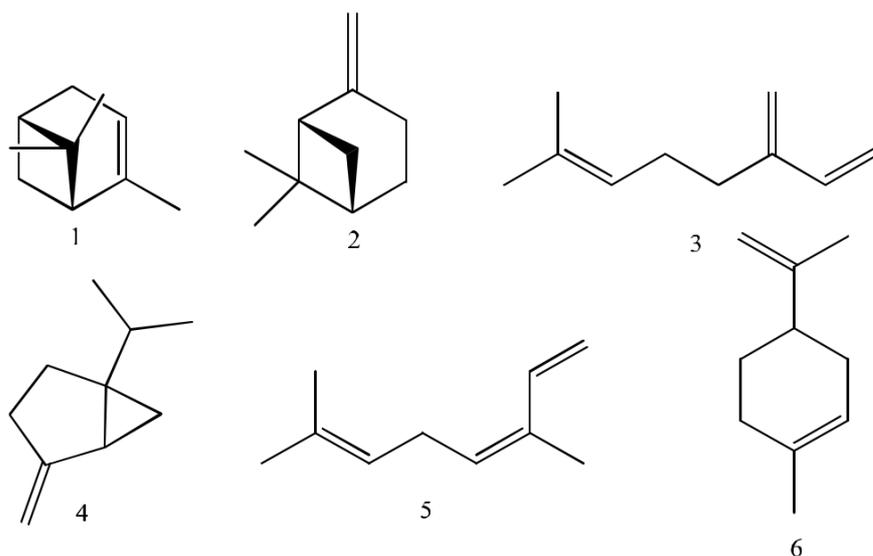
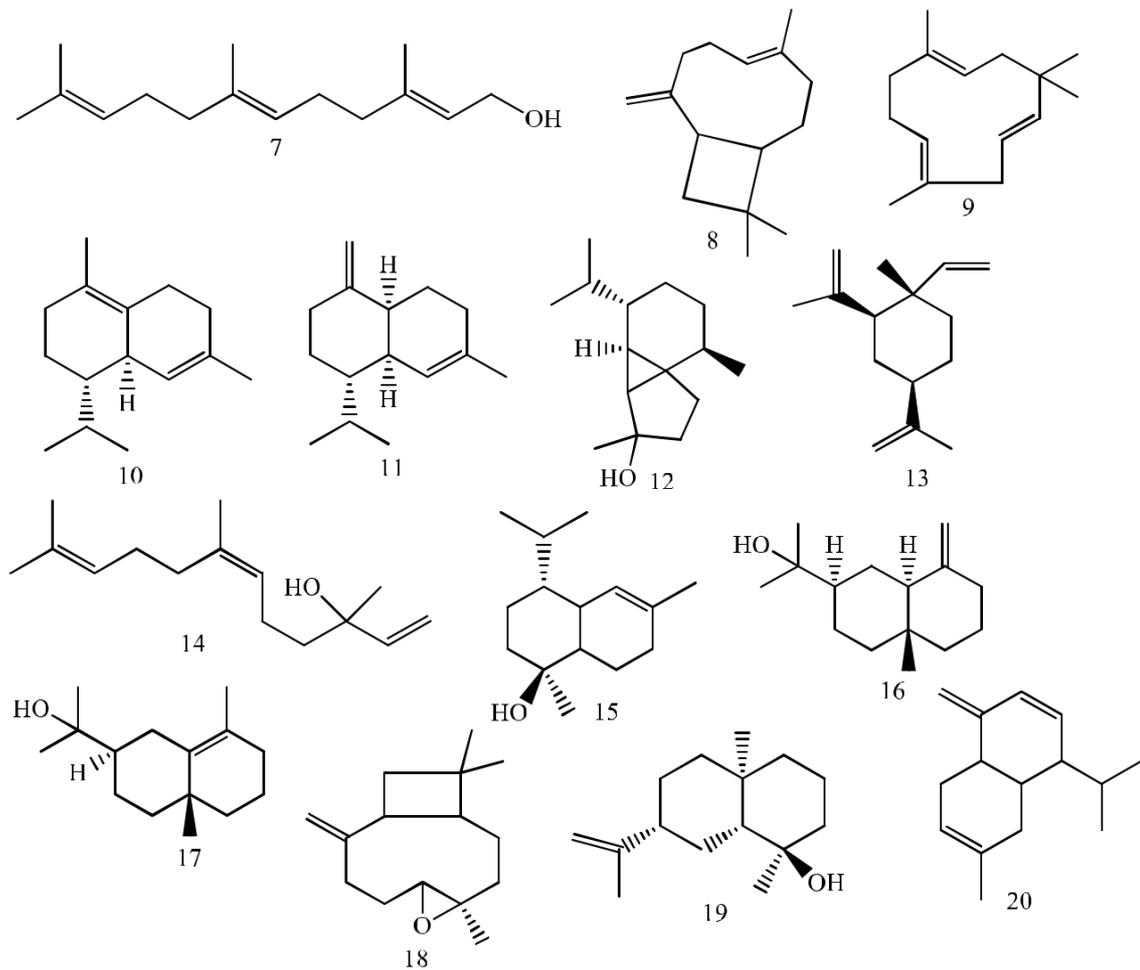
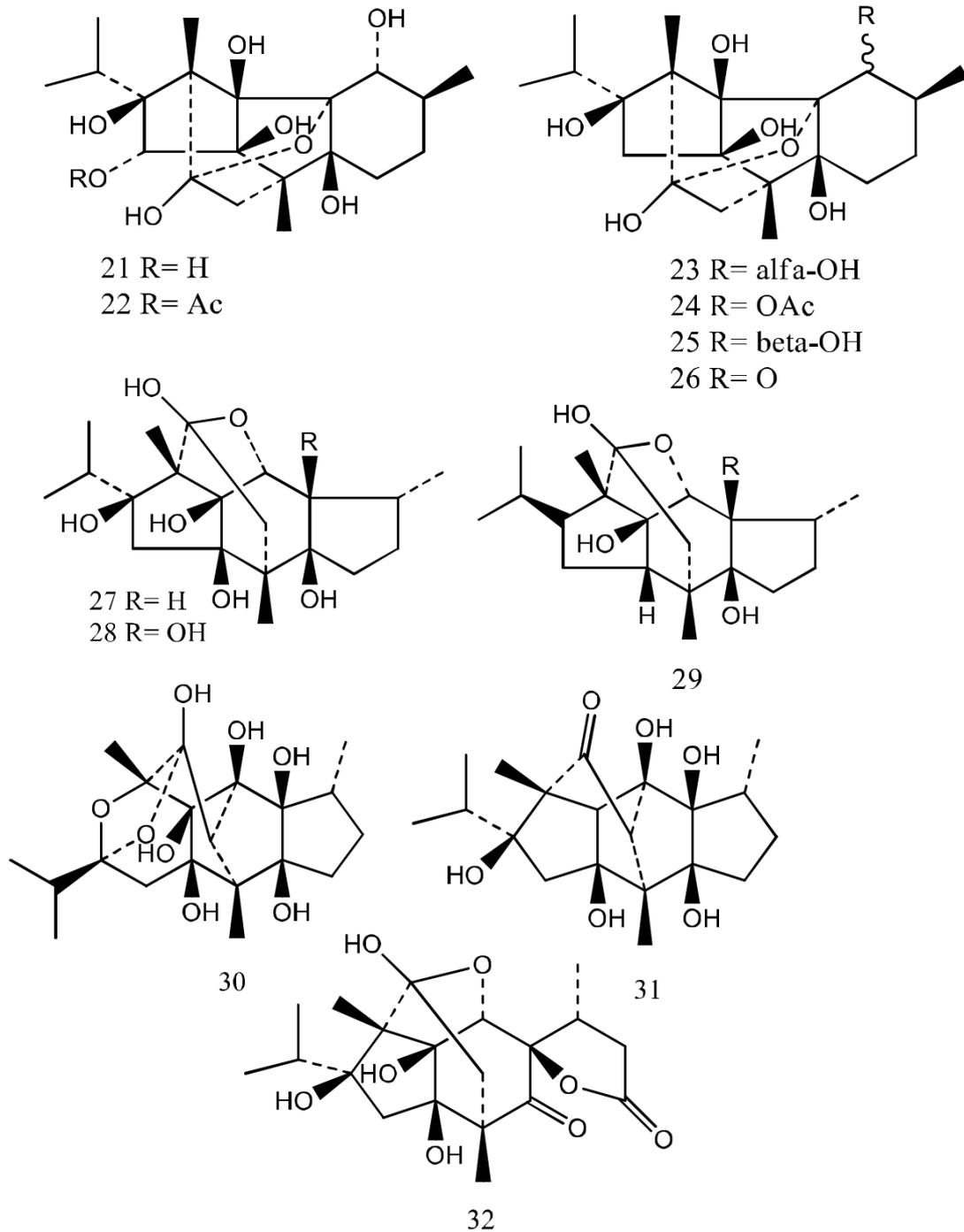


Figura 1.2. Principais sesquiterpenos detectados em espécies de *Persea*

1.1.2 DITERPENOS

A espécie *P. indica* é uma fonte de diterpenos neste gênero, o rianodol (21) foi isolado pela primeira vez como um produto natural nesta espécie (GONZALEZ-COLOMA *et al.*, 1990; GONZALEZ-COLOMA *et al.*, 1992; GONZALEZ-COLOMA *et al.*, 1993). Também foram encontrados o rianodol-14-monoacetato (22), cinnzeilanol (23), cinnzeilanina (24), epi-cinnzeilanol (25) e cinnzeilanona (26) (GONZALEZ-COLOMA *et al.*, 1996). Também foram isolados o indicol (27), vignaticol (28) e perseanol (29) (Figura 1.3) (GONZALEZ-COLOMA *et al.*, 2002). Os compostos cinncassiol E (30), perseaindicol (31) e secoperseanol (32) foram recentemente isolados das partes aéreas de *P. indica* (Figura 1.3) (FRAGA *et al.*, 2017).

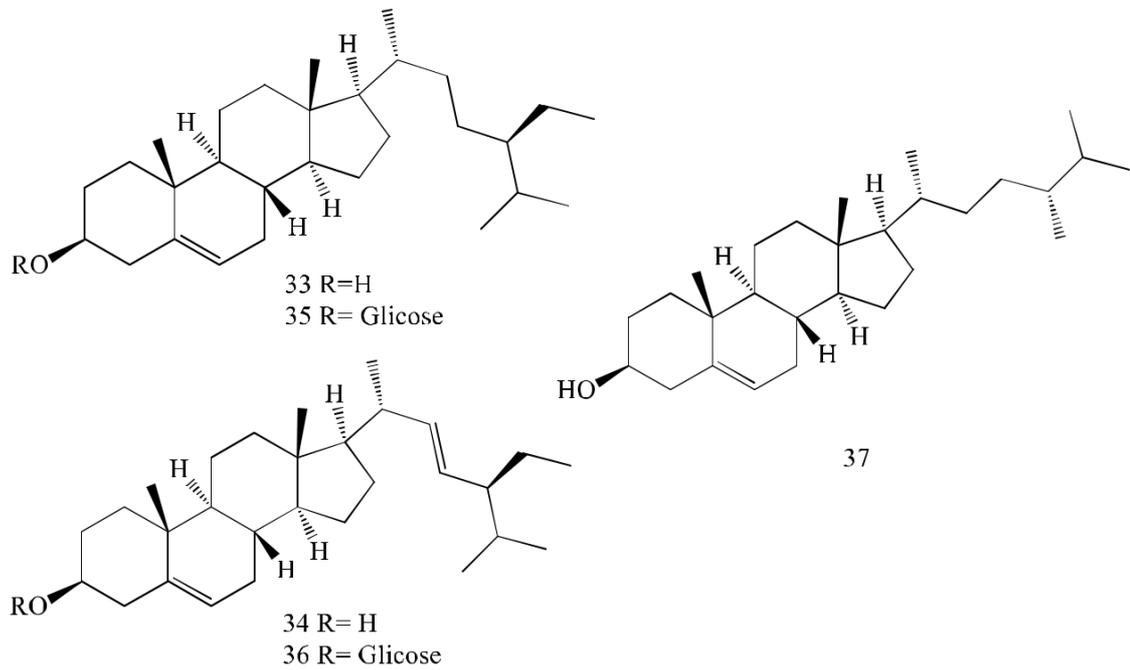
Figura 1.3. Estrutura química dos diterpenos detectados em espécies de *Persea*



1.1.3 ESTEROIDES

Os esteroides β -sitosterol (33), estigmasterol (34), β -sitosterol glucosídeo (35), β -estigmasterol glucosídeo (36) foram isolados em *Persea japonica* (WANG; KUOH; WU, 1996), o campesterol (37), o β -sitosterol (33) e estigmasterol (34) foram isolados e identificados em *Persea caerulea* (Figura 1.4) (ÁLVAREZ *et al.*, 2016).

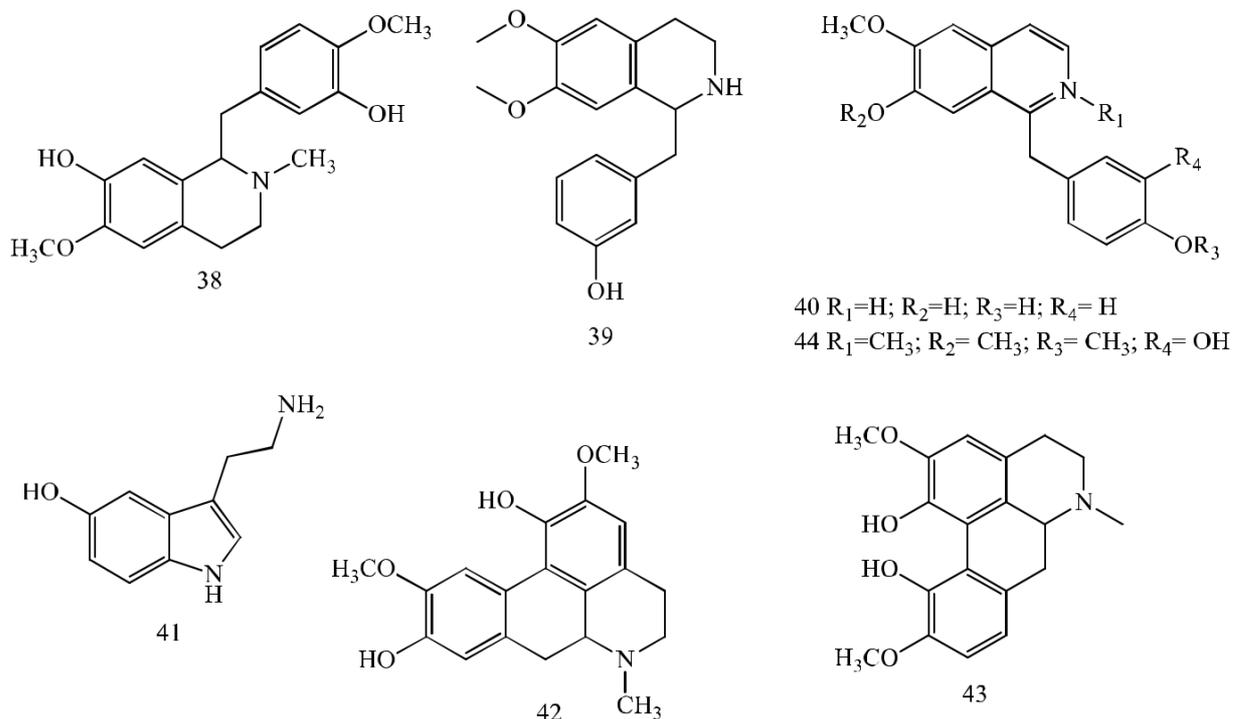
Figura 1.4. Estrutura química dos esteroides detectados em espécies de *Persea*



1.1.4 ALCALOIDES

Sete alcaloides foram isolados das folhas e cascas dos caules deste gênero (Figura 1.5). Os alcaloides reticulina (38) e *N*-norarmepavina (39) foram isolados do extrato metanólico das cascas do caule de *P. Kurzii* (DENRUNGRUANG; PRASITPAN; KODAMA, 1996). *N*-Norarmepavina (39) também foi isolado das espécies *P. obovatifolia*, *P. zuihoensis* e *P. thunbergii* (RALPH; BICK; SINCHAI, 1978). A coclaurina (40) foi obtida de *P. philippinensis*, *P. kusanoie* e *P. macrantha* (RALPH; BICK; SINCHAI, 1978). A espécie *P. gratissima* rendeu o alcaloide 5-hidroxitriptamina (41) (WILLAMAN; LI, 1970), enquanto que a reticulina (38) foi isolada de *P. zuihoensis* e de *P. japonica* foram obtidos os alcaloides isoboldina (42) e a corituberina (43) (WANG; KUOH; WU, 1996). O metabolito laudanidina (44) foi isolado a partir de *P. thunbergii* (RALPH; BICK; SINCHAI, 1978).

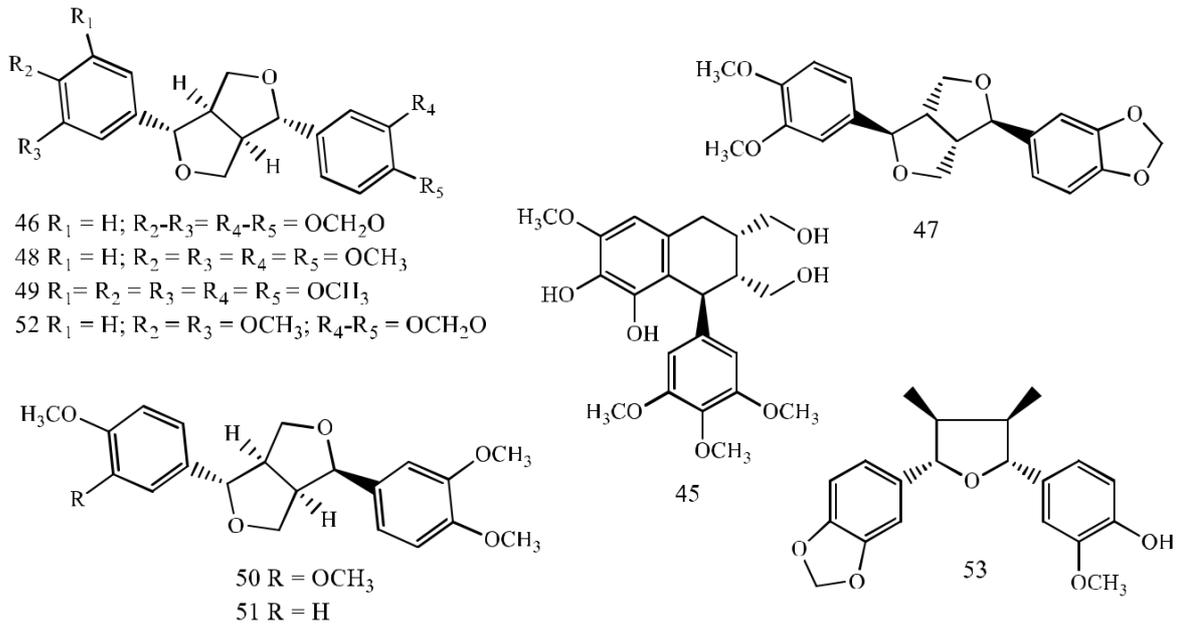
Figura 1.5. Estruturas químicas dos alcaloides descritos em espécies de *Persea*



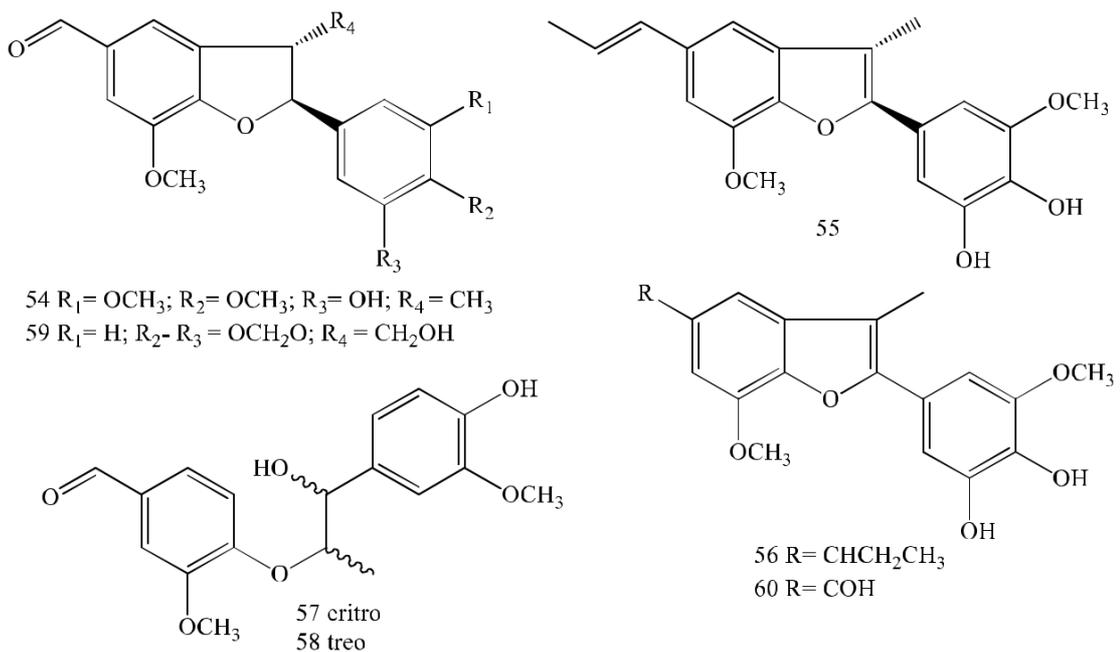
1.1.5 LIGNANAS E NEOLIGNANAS

Em *Persea* são referidas nove lignanas e sete neolignanas (Figura 1.6). Em *P. lingue* é relatada a presença de uma lignana ariltetralina, denominada Lingueresionol (45) (SEPULVEDA-BOZA; DELHVI; CASSELS, 1990). Lignanas furofurânicas foram descritas por Batista *et al.* (2010) em *P. pyrifolia*: sesamina (46), metilpiperitol (47), eudesmina (48) e magnolina (49) estes metabolitos foram previamente identificados em espécies de *Nectandra*, *Licaria* e *Litsea*, demonstrando a importância química das lignanas em Lauraceae.

Cinco lignanas sesamina (46), eudesmina (48), epi-eudesmina (50), piligenina (51) e kobusina (52) foram isoladas das cascas do caule de *P. kurzii* (PRASITPAN *et al.*, 1996; DENRUNGRUANG, PRASITPAN, KODAMA, 1996). O composto (+)-Machilina F (53) foi isolado da casca de *Persea membranacea* Kosterm e apresentou atividade imunomoduladora e antitumoral (NASCIMENTO *et al.*, 2004).

Figura 1.6. Estruturas químicas das lignanas descritas em espécies de *Persea*

Neolignanas com atividade citotóxica foram isoladas da fração solúvel em clorofórmio das folhas de *P. obovatifolia*, sendo elas obovatinal (54), obovatifol (55), obovaten (56), perseal A (57), perseal B (58), perseal C (59) e D (60) (Figura 1.7). Estes compostos mostraram significativa atividade frente às linhagens de células tumorais P-388, KB16, A549, and HT-29 (TSAI *et al.*, 1996; TSAI *et al.*, 1998).

Figura 1.7. Estruturas químicas das neolignanas descritas em *Persea lingue*

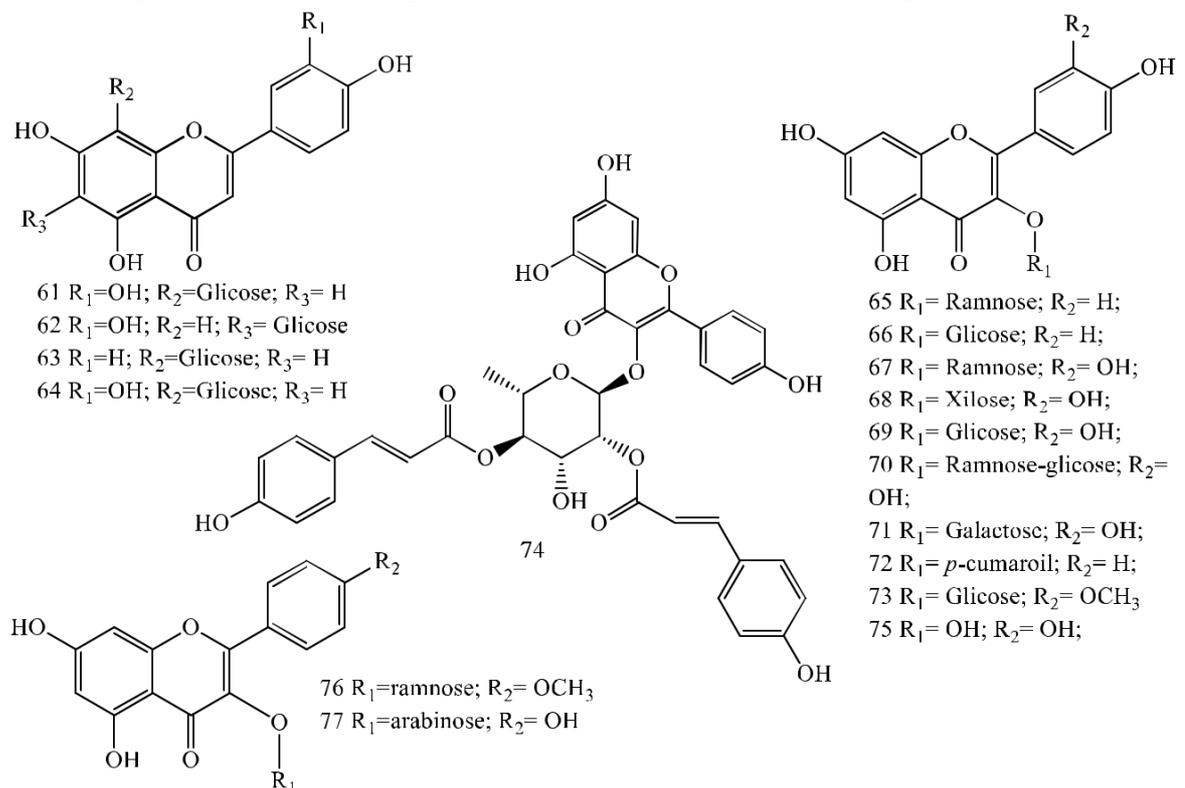
1.1.6 FLAVONOIDES

Flavonoides são comuns em espécies de *Persea* e 16 destes compostos são descritos neste gênero (Figura 1.8). Os flavonoides foram relatados pela primeira vez por Wofford (1974) em diferentes populações das espécies *P. borbonia* (L.) Spreng, *P. humilis* Nash, *P. palustris* (Raf.) Sarg. e *P. littoralis* destacando-se principalmente a ocorrência de C-heterosídeos de luteolina e apigenina, como orientina (61), isorientina (62), vitexina (63), isovitexina (64), e dos heterosídeos de quercetina e canferol como canferol-3-*O*-ramnosídeo (65), canferol-3-*O*-glucosídeo (66), quercetina-3-*O*-ramnosídeo (67), quercetina-3-*O*-xilósídeo (68), quercetina-3-*O*-glucosídeo (69), rutina (70) e o composto quercetina-3-*O*-galactosídeo (71).

Kruthiventi e Krishnaswamy (2000) descreveram a presença do flavonoide acilado, canferol-3-*O*-*p*-cumaroil (72) e Isoramnetina-3-*O*-glucosídeo (73), além do já citado flavonoide glicosilado quercetina-3-*O*-ramnosídeo (67) na espécie *Persea gratissima*.

O extrato etanólico de *Persea lingue* foi submetido a fracionamento guiado por bioensaio e proporcionou o isolamento do canferol-3-*O*- α -L-(2,4-bis-*E*-*p*-coumaroil) ramnosídeo (74), composto com atividade inibitória frente à *Staphylococcus aureus* NorA (HOLLER *et al.*, 2012).

Figura 1.8. Estruturas químicas dos flavonoides descritos no gênero *Persea*



Dentre os metabolitos secundários isolados e identificados de *Persea caerulea* Ruiz & Pav podem ser citados quercetina (75), canferide-3-*O*-ramnosídeo (76), canferol-3-*O*-arabinosídeo (77), quercetina-3-*O*-ramnosídeo (67) e quercetina-3-*O*-glucosídeo (69). (Álvarez *et al.*, 2016).

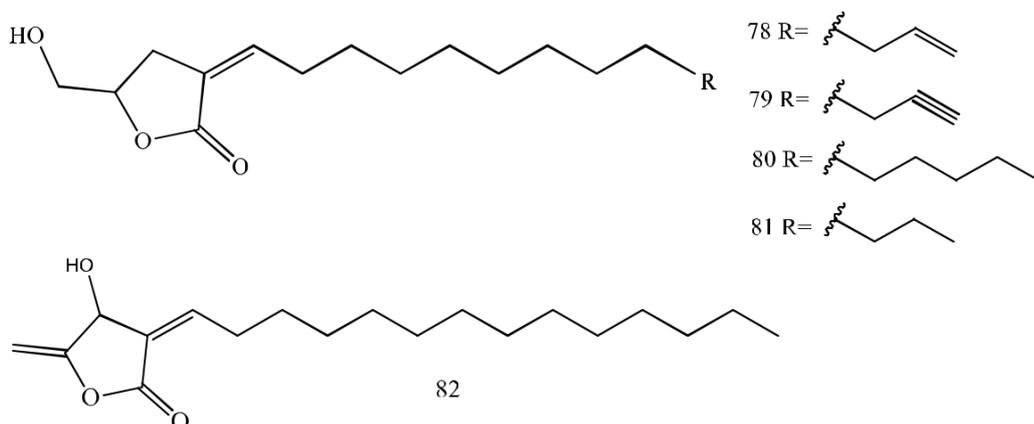
1.1.7 LACTONAS

γ -Lactonas são comuns em Lauraceae, e também no gênero *Persea* (Figura 1.9). Os primeiros desses compostos identificados no gênero *Persea* são dos compostos majorenolideo (78), majorinolideo (79) e majoranolideo (80) isolados das cascas do caule de *P. major* (Figura 9) (MA *et al.*, 1989; MA *et al.*, 1990). Inicialmente esses compostos foram elucidados como sendo δ -lactonas, embora suas estruturas tenham sido revisadas por Fraga e Terrero (1996) como sendo γ -lactonas, após isolamento dos mesmos compostos a partir dos frutos de *P. indica*. Chang e colaboradores (2008) reportam a atividade antimicrobiana contra *M. tuberculosis* H37Rv, bem como atividade citotóxica e pesticida para estes metabolitos.

Reis e colaboradores (2019) descreveram o isolamento de uma nova γ -lactona, o majoranolideo B (81), os compostos majorenolideo (78), majorinolideo (79) e majoranolideo (80) também foram obtidos e todos apresentaram atividade antiproliferativa contra células de glioma C6.

O composto isoobtusilactona A (borbonol) (83) foi isolado a partir de espécies de *Persea*, como *P. borbonia*, *P. pachypoda*, *P. steyermarkii*, *P. schiedeana*, *P. caerulea*, *P. donnell-smithii*, esse composto apresentou diferentes graus de resistência a *Phytophthora cinnamomi*. O Borbonol (82) inibiu significativamente o crescimento vegetativo de *Phytophthora cinnamomi* a uma concentração mínima de 1 μ g/mL (ZAKI *et al.*, 1980).

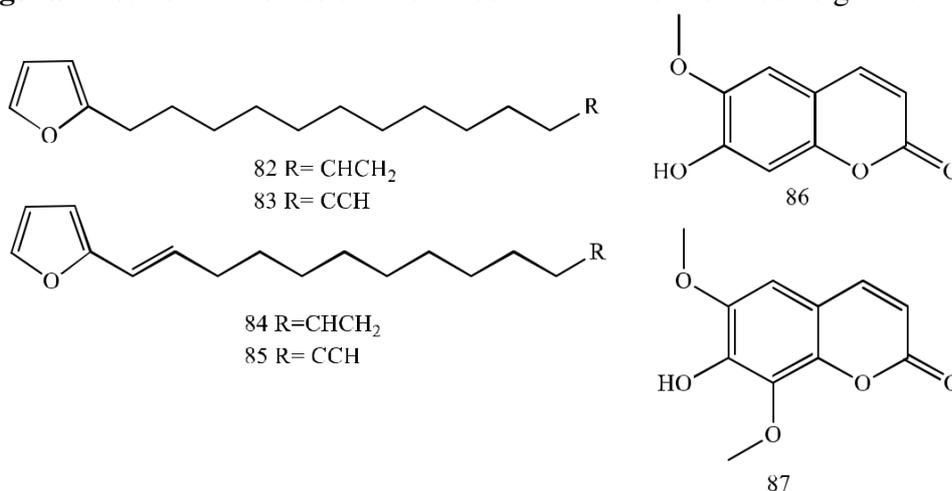
Figura 1.9. Estruturas químicas das γ -lactonas descritas no gênero *Persea*



1.1.8 OUTROS COMPOSTOS

Metabolitos secundários menos representativos foram isolados e identificados em espécies de *Persea*. Em *P. indica* foram obtidos os butanolídeos avocadenofurano (82), avocadinofurano (83), avocadienofurano (84) e avocadeninofurano (85) (PINO *et al.*, 2004). As cumarinas escopoletina (86) e isofraxidina (87) foram isoladas das folhas de *P. caerulea* (Figura 1.10) (ALVARÉZ *et al.*, 2016).

Figura 1.10. Estruturas dos butanolídeos e cumarinas descritos no gênero *Persea*



2. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apenas 31 espécies do gênero foram estudadas até o momento, e os dados disponíveis ainda são insuficientes e fragmentários. Dentre as classes de metabolitos secundários os flavonoides são os mais descritos neste gênero, estudos fitoquímicos em outras espécies desta família permitirão apontar os marcadores quimiotaxonomicos para as espécies deste gênero. Neste sentido, esta revisão resume a fitoquímica de espécies do gênero *Persea* e confirma que este gênero é uma fonte de compostos de interesse que merecem ser investigados tanto do ponto de vista químico, quanto farmacológico.

REFERÊNCIAS

- ABUBAKAR, A.N.F. *et al.* Triterpenoid of avocado (*Persea americana*) seed and its cytotoxic activity toward breast MCF-7 and liver HepG2 cancer cells. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p. 397-400, 2017.
- ALKHALF, M. I. *et al.* Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activities of avocado (*Persea americana*) fruit and seed extract. **Journal of King Saud University - Science**, p. S1018364718315714, out. 2018.
- ALVÁREZ, J.M. *et al.* Phenolic constituents of leaves from *Persea caerulea* Ruiz & Pav; Mez (Lauraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 67, p. 53-57, 2016.
- BATISTA, A. N. DE L. *et al.* Aromatic compounds from three Brazilian Lauraceae species. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 321-323, 2010.
- CECHINEL-FILHO, V. *et al.* Antispasmodic effects of *Persea cordata* bark fractions on guinea pig ileum. **Fitoterapia**, v. 78, n. 2, p. 125-128, fev. 2007.
- CÉSPEDES, C. L. *et al.* Plant growth inhibitory activities by secondary metabolites isolated from Latin American flora. In: **Advances in Phytomedicine**. [s.l.] Elsevier, 2006. v. 2p. 373-410.
- CHOUDHURY, S. N. *et al.* Constituents of the Flower and Fruit Oils of *Persea bombycina* (King ex Hook, f.) Kost from India. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, n. 2, p. 177-180, mar. 1997.
- COSMO, S. A. *et al.* Gastroprotective effect of hydroalcoholic extract from barks of *Persea major* Kopp (Lauraceae) in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 4, p. 533-537, dez. 2007.
- DENRUNGRUANG, P.; PRASITPAN, N.; KODAMA, O. Chemical Constituents from the Stem Bark of *Persea kurzii* Kosterm. *Nat. Sci.*, v. 30, n.4, p. 493-505, 1996.
- DUC DAT, L. *et al.* Megastigmane and abscisic acid glycosides from the leaves of *Laurus nobilis* L. **Phytochemistry Letters**, v. 33, p. 1-5, out. 2019.
- FRAGA, B. M. *et al.* Diterpenes with new isoryanodane derived skeletons from *Persea indica*. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 23, p. 2261-2263, jun. 2017.
- FRAGA, B. M. *et al.* Insect Antifeedant Isoryanodane Diterpenes from *Persea indica*. *Journal of Natural Products*, v. 60, n. 9, p. 880-883, set. 1997.
- FRAGA, B. M. *et al.* Minor diterpenes from *Persea indica*: their antifeedant activity. **Phytochemistry**, v. 56, n. 4, p. 315-320, fev. 2001.
- FRAGA, B.M; TERRERO, D. Alkene-lactones and avocadofurans from *Persea indica*: a revision of the structure majorenolide of and related lactones. **Phytochemistry**, v. 41, p. 229-232, 1996.
- GONZÁLEZ-COLOMA, A. *et al.* Insect Antifeedant Ryanodane Diterpenes from *Persea indica*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 296-300, jan. 1996.

GONZÁLEZ-COLOMA, A. *et al.* Insecticidal activity and diterpene content of *Persea indica*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1549–1552, maio 1992.

GONZÁLEZ-COLOMA, A. *et al.* Natural insecticides: Structure diversity, effects and structure-activity relationships. A case study. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. [s.l.] Elsevier, v. 26, p. 849–879, 2002.

GONZÁLEZ-COLOMA, A. *et al.* Selective Insect Antifeedant and Toxic Action of Ryanoid Diterpenes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 4419–4424, out. 1999.

GONZÁLEZ-COLOMA, A. *et al.* *Persea indica* as a natural source of the insecticide ryanodol. **Phytochemistry**, v. 34, n. 2, p. 397–400, set. 1993.

GRANADOS-ECHEGOYEN, C. *et al.* Chemical characterization and mosquito larvicidal activity of essential oil from leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae) against *Culex quinquefasciatus* (Say). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 6, p. 463–467, jun. 2015.

HOLLER, J. G. *et al.* Novel inhibitory activity of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump by a kaempferol rhamnoside isolated from *Persea lingue* Nees. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 5, p. 1138–1144, 1 maio 2012.

JOSHI, S. C.; VERMA, A. R.; MATHELA, C. S. Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oils of Himalayan Lauraceae species. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 37–40, jan. 2010.

KRUTHIVENTI, A. K.; KRISHNASWAMY, N. R. Constituents of the flowers of *Persea gratissima*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 1, p. 94–96, fev. 2000.

LU, Y.-C. *et al.* Secondary metabolites from the unripe pulp of *Persea americana* and their antimycobacterial activities. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2904–2909.

MA, C. J.; SUNG, S. H.; CHOONG KIM, Y. New neuroprotective dibenzylbutane lignans isolated from *Machilus thunbergii*. **Natural Product Research**, v. 24, n. 6, p. 562–568, 10 abr. 2010.

MARQUES, C.A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e ambiente**, v. 8, p. 195 – 206, 2001.

MOHAGHEGHZADEH, A. *et al.* Medicinal smokes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 2, p. 161–184, 2006.

NASCIMENTO, M. S. J. *et al.* Effect of Natural 2,5-Diaryl-3,4-dimethyltetrahydrofuran Lignans on Complement Activation, Lymphocyte Proliferation, and Growth of Tumor Cell Lines. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, n. 6, p. 449–453, jan. 2004.

NOVAIS *et al.* Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 2–3, p. 183–195, 2004.

PHAM, V. C. *et al.* Five new diterpenoids from the barks of *Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl. **Phytochemistry Letters**, v. 32, p. 23–28, ago. 2019.

- PINO, J. A. *et al.* Leaf Oils of *Helichrysum melaleucum* Rchb. ex Holl., *Oenanthe divaricata* (R. Br.) Mabb. and *Persea indica* (L.) Spreng. from Madeira. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 5, p. 487–489, set. 2004.
- QUINET, A. Sinopse taxonômica da família Lauraceae no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**. v. 19, p. 563-572, 2005.
- QUINET, A.; ANDREATA, R.H.P. Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 53, n. 82, p. 59-121, 2002.
- RALPH, I.; BICK, C.; SINCHAI, W. Alkaloids of the Lauraceae. **Heterocycles**, v. 9, p. 903-945, 1978.
- REIS, I. M. A. *et al.* Alkene lactones from *Persea fulva* (Lauraceae): Evaluation of their effects on tumor cell growth in vitro and molecular docking studie. **Bioorganic Chemistry**. v. 86, p. 665-673, maio 2019.
- REIS-AVILA, G.; OLIVEIRA, J. M. Lauraceae: A promising family for the advance of neotropical dendrochronology. **Dendrochronologia**, v. 44, p. 103–116, jun. 2017.
- SANTOS, S.O.; ALVES, M. 2012. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Lauraceae. **Rodriguésia**, v. 63(3): 689-703.
- SCHLEMPER, S. R. DE M. *et al.* Antibacterial activity of *Persea cordata* stem barks. **Fitoterapia**, v. 72, n. 1, p. 73–75, jan. 2001.
- SCORA, R. W. *et al.* Three factor analysis of essential leaf oils in selected *Persea* species. **Phytochemistry**, v. 9, n. 12, p. 2503–2507, dez. 1970.
- SCORA, R. W.; BERGH, B. O.; ANTHONY HOPFINGER, J. Leaf alkanes in *Persea* and related taxa. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 3, n. 4, p. 215–218, dez. 1975.
- SEPULVEDA-BOZA, S.; DELHVI, S.; CASSELS, B. K. An aryltetralin lignan from *Persea lingue*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2357–2358, jan. 1990.
- TELES, M. M. R S. *et al.* Alkaloids of the Lauraceae. In: **The Alkaloids: Chemistry and Biology**. [s.l.] Elsevier, v. 82, p. 147–304, 2019.
- TSAI, I. L. *et al.* Cytotoxic neolignans from *persea obovatifolia*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1261-1263, 1996.
- TSAI, I.-L. *et al.* Cytotoxic Neolignans from the Stem Wood of *Machilus obovatifolia*. **Planta Medica**, v. 66, n. 5, p. 403–407, jun. 2000.
- TSAI, I.-L.; HSIEH, C.-F.; DUH, C.-Y. Additional cytotoxic neolignans from *Persea obovatifolia*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 8, p. 1371–1375, ago. 1998.
- TUCKER, A. O. *et al.* Volatile Leaf Oils of *Persea borbonia* (L.) Spreng., *P. humilis* Nash, and *P. palustris* (Raf.) Sarg. (Lauraceae) of North America. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, n. 2, p. 209–211, mar. 1997.
- WANG, C.-C.; KUOH, C.-S.; WU, T.-S. Constituents of *Persea japonica*. **Journal of**

Natural Products, v. 59, n. 4, p. 409–411, jan. 1996.

WEYERSTAHL, P.; MARSCHALL, H.; SCORA, R. W. Constituents of the leaf essential oil of *Persea indica* (L.) K. Spreng. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 8, n. 4, p. 201–207, jul. 1993.

WOFFORD, B. E. The systematic significance of flavonoids in *Persea* of the Southeastern United States. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 2, n. 2, p. 89–91, ago. 1974.

WRIGHT, C.I. *et al.* Herbal medicines as diuretics: a review of the scientific evidence. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 1, p. 1-31, 2007.

YASIR, M.; DAS, S., KHARYA, M.D. The phytochemical and pharmacological profile of *Persea americana* Mill. **Pharmacogn Ver**, v. 4, n. 7, p. 77-84, 2010.

ZAKI, A. I. *et al.* Borbonol from *Persea* spp.-chemical properties and antifungal activity against *Phytophthora cinnamomi*. **Physiological Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 205–212, mar. 1980.

CAPÍTULO 2- Alquil- γ -lactonas de *Persea fulva* (Lauraceae): avaliação de seus efeitos no crescimento de células tumorais *in vitro* e estudos de acoplamento molecular

Alquil- γ -lactonas de *Persea fulva* (Lauraceae): avaliação de seus efeitos no crescimento de células tumorais *in vitro* e estudos de acoplamento molecular

RESUMO

O composto inédito (3*E*)-5,6-di-hidro-5-(hidroximetil)-3-docdecilidenefuran-3(4H)-ona (**1**), denominada majoranolideo B, e três alqueno lactonas conhecidas como majoranolideo (**2**), o majoranolideo (**3**) e o majorinolideo (**4**) foram obtidos das partes aéreas de *Persea fulva* (Lauraceae). As estruturas químicas destes compostos foram elucidadas através de análises espectroscópicas, incluindo 1D, 2D RMN (^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H -COSY, HMBC e HSQC) e CLAE-EM/EM. Estes compostos foram rastreados quanto sua atividade antiproliferativa *in vitro* em glioma C6 de rato e células de astrócitos utilizando ensaio de MTT e *in silico* por acoplamento molecular contra alvos que desempenham um papel central no controle da progressão do ciclo celular de glioma. O composto majoranolideo (**3**) foi mais ativo com CE_{50} 6,69 μM contra células de glioma C6, seguido pelos compostos **1** (CE_{50} 9,06 μM), **2** (CE_{50} 12,04 μM) e **4** (CE_{50} 41,90 μM). As alquil- γ -lactonas **1-3** apresentaram menor toxicidade em células não tumorais quando em comparação com células de glioma. Os resultados de acoplamento molecular mostraram que o majoranolideo estabelece ligações de hidrogênio com todos os alvos através de sua fração α , β -insaturada- γ -lactona, enquanto o grupo alqueno de cadeia longa realiza de várias interações hidrofóbicas. Assim, a partir da atividade antiproliferativa dos compostos isolados contra células de glioma C6 é possível concluir que as γ -lactonas isoladas de *P. fulva* podem ter um grande potencial para o controle celular de glioma.

PALAVRAS-CHAVE: Lauraceae. *Persea fulva*. γ -lactones. Atividade antiproliferativa. Acoplamento molecular.

1. INTRODUÇÃO

Os gliomas são os tumores intracranianos mais frequentes, representando mais de 50% de todos os tumores cerebrais primários, dentre os quais o glioblastoma multiforme (GBM) é o mais comum e agressivo. Os GBMs e seus prognósticos são igualmente desanimadores, variando de 5 a 15 meses de sobrevida após o diagnóstico de GBM primário e 8-31 meses para tumores secundários (YIN *et al.*, 2018; ROY *et al.*, 2015; LOUIS *et al.*, 2016), o que faz com que sejam classificados entre os cânceres humanos mais letais.

A abordagem padrão atual para GBM, consiste de ressecção máxima segura seguida de radioterapia e quimioterapia concomitante e adjuvante com temozolamida (TMZ) (WEN; KESARI, 2008). Devido à alta letalidade e as poucas alternativas terapêuticas, existe cada vez mais a necessidade de novos agentes terapêuticos para o tratamento de GBM. Nesse sentido, é possível destacar as espécies vegetais e seus metabolitos secundários como importante fonte renovável para o surgimento e desenvolvimento de novos fármacos antitumorais (IQBAL *et al.*, 2017).

O gênero *Persea*, pertencente à família Lauraceae, compreendendo cerca de 190 espécies, e é amplamente distribuído na Mesoamérica, América do Sul e Sudeste da Ásia. A investigação fitoquímica do gênero *Persea* revelou a presença de terpenos, flavonoides, lignanas, alcaloides e esteroides (SCORA; BERGH; HOPFINGER, 1975; GONZALEZ-COLOMA *et al.*, 2002; SEPULVEDA-BOZA; DELHVI; CASSELS, 1990; WOFFORD, 1974; TSAI *et al.*, 1996). Alquil- γ -lactonas foram relatadas em espécies de *Persea* e mostraram atividades antitumoral e citotóxica (MA *et al.*, 1989; MA *et al.*, 1990; CHANG *et al.*, 2008).

Devido à importância medicinal tradicional do gênero e as poucas investigações com *Persea fulva* L.E. Koop., as partes aéreas desta espécie foram investigadas, e proporcionaram o isolamento de quatro alquil- γ -lactonas (**1-4**) (Figura 2.1). No presente estudo são descritos o isolamento, a elucidação estrutural e a avaliação dos efeitos desses compostos no crescimento de glioma C6 e astrócitos (*in vitro* e *in silico*).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Os solventes etanol P.A., metanol P.A., acetato de etila P.A., butanol P.A., hexano P.A. foram adquiridos da VETEC e o metanol grau HPLC foi adquirido da Sigma Aldrich[®]. Para colunas cromatográficas (CC) foram utilizados sílica gel 60 (70-230 mesh, VETEC),

sílica tipo flash (35-75 μm , Fluka[®] Analytical) e as análises cromatográficas em cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatofolhas de alumínio (Merck).

As separações por cromatografia em coluna aberta foram realizadas em gel de sílica 60 (70-230 mesh, VETEC) e sílica flash (35-75 μm , Fluka[®] Analytical). As análises comparativas, para determinar a composição de cada fração, foram feitas em CCD, utilizando cromatofolha de gel de sílica 60 F254, que foram reveladas através da irradiação de luz na região do ultravioleta em comprimento de onda 254 e 365 nm e/ou com reveladores cromogênicos: $-\text{H}_2\text{SO}_4$ (solução de H_2SO_4 em metanol 10%), seguido de aquecimento.

As análises por Cromatografia à Líquidos de Alta Eficiência acoplado a Detector de Arranjos Diodos (CLAE-DAD) foram realizadas em Cromatógrafo à Líquidos Dionex Ultimate 3000 com Detector de Arranjo Diodos (DAD) (Thermo Scientific), coluna ACE RP 18 (150 x 4,6 mm, 5 μm). A fase móvel foi composta por um gradiente de $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_3\text{PO}_4$ 0,1% (A) e MeOH (B), sendo de 0-19 min A:B (75:25), de 20-24 min A:B (0:100) e de 25-35 min (75:25). O fluxo da fase móvel foi mantido em 1 mL/min e a temperatura da coluna a 30°C. Os espectros no UV foram monitorados na faixa de 200 a 400 nm, sendo que para registro dos cromatogramas, os comprimentos de onda foram escolhidos após as análises dos espectros. Os espectros de CLAE-EM foram obtidos no modo positivo por eletrospray usando o equipamento Quattro LC-Micromass device (Waters).

Para separação pelo método semipreparativo foi utilizado um Cromatógrafo à Líquidos de Alta Eficiência acoplado a Detector de Arranjos Diodos (CLAE-DAD), cujo sistema consistiu em duas bombas de solvente modelo LC-6AD, equipado com um detector de arranjo de diodos SPD-M20A (Shimadzu, Corp., Kyoto, Japan). As amostras foram injetadas em um injetor Rheodyne 7125i com um loop de 20 μL (Coluna analítica) e 500 μL (Coluna semipreparativa). Para determinar o perfil cromatográfico foi usado uma coluna analítica Luna 5u C-18 80A (150 x 4.6 mm x 5 μm , Phenomedex) e a separação dos constituintes em coluna semipreparativa Luna 5u C-18 100A (250 x 21,20 mm x 5 μm , Phenomedex), pré-coluna C-18 Luna 21 mm, solvente MeOH (Tedia, Brasil) grau HPLC/Espectro UV-visível, água miliQ e ácido fórmico (Tedia, Brasil).

O Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) Bruker Ascend Bruker DRX-500 (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz) foi utilizado para obtenção dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C . Nestas análises foram utilizados metanol- D_4 e tetrametilsilano (TMS) como

referência interna. As análises espectroscópicas foram realizadas em parceria no Laboratório de Ciências Químicas da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

2.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal, constituído folhas da espécie *Persea fulva*, foi coletado no município de Rio de Contas (13°22'26,9"S e 41°53'27,5"W), Bahia, em Agosto de 2012. O material vegetal foi identificado pelo Dr. Francisco Haroldo Feitosa do Nascimento e a exsicata encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS) sob o código 201.418.

2.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS E FRACIONAMENTO

As folhas de *P. fulva* (1050 g) foram secas à temperatura ambiente e moídas em moinho de facas (tipo Wiley). O pó seco pulverizado das folhas foi submetido à extração por maceração com EtOH-H₂O (3000 mL, 80:20 v/v) em erlenmeyer por 5 dias, e posteriormente filtrado. O extrato bruto etanólico (193 g) foi concentrado em rotaevaporador e ressuspenso em água e submetido à partição líquido-líquido com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e butanol). Em seguida, foram concentrados em rotaevaporador para obtenção dos extratos hexânico (7 g), acetato de etila (62 g), butanólico (34 g), respectivamente.

O extrato acetato de etila (62 g) foi fracionado por cromatografia em coluna aberta contendo sílica gel. Foram utilizados solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila, metanol e água) sendo obtidas 15 frações (Fr 1-15). As frações 9-10 foram reunidas e submetidas a técnica de CLAE-semipreparativo para obtenção dos compostos purificados **1** (t_R . 11.5 min; 146 mg, pureza >78% por CLAE-DAD), **2** (t_R . 10.8 min; 1900 mg, pureza >95% por CLAE-DAD) e **3** (t_R . 12.7 min; 223 mg, pureza >95% por CLAE-DAD). A fração 8 foi purificada por cromatografia em coluna aberta (hexano:EtOAc, 9:1/7:3) para render o composto **4** (35 mg, pureza >95% por CLAE-DAD).

2.4 DADOS ESPECTRAIS

Majoranolideo B (1): cristais incolores (146 mg); IR (KBr) λ_{max} : 3441, 2924, 2853, 1751, 1678, 1643, 1464 e 1213 cm^{-1} ; RMN de ¹H (metanol-*d*₄, 500 MHz) e RMN de ¹³C NMR (metanol-*d*₄, 125 MHz) dados espectroscópicos: ver tabela 1. HR-ESI-EM: m/z 283.2290 [M+H]⁺ (calc. C₁₇H₃₂O₃ [M+H]⁺: 283.2267).

Majorenolideo (2): óleo verde (1900 mg); IR (KBr) λ_{\max} : 3397, 2926, 2855, 1751, 1641, 1462, 1439 e 1200 cm^{-1} ; RMN de ^1H (metanol-*d*₄, 500 MHz) e RMN de ^{13}C NMR (metanol-*d*₄, 125 MHz) dados espectroscópicos: ver tabela 1. HR-ESI-EM: m/z 281.2119 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 281.2111).

Majoranolideo (3): cristais incolores (223 mg); IR (KBr) λ_{\max} : 3736, 3610, 2920, 2850, 1743, 1678, 1523 e 1211 cm^{-1} ; RMN de ^1H (metanol-*d*₄, 500 MHz) e RMN de ^{13}C NMR (metanol-*d*₄, 125 MHz) dados espectroscópicos: ver tabela 1. HR-ESI-EM: m/z 311.2599 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 311.2580).

Majorinolideo (4): óleo incolor (35 mg); IR (KBr) λ_{\max} : 3443, 3308, 2928, 2854, 1745, 1680, 1643, 1462 e 1205 cm^{-1} ; RMN de ^1H (metanol-*d*₄, 500 MHz) e RMN de ^{13}C NMR (metanol-*d*₄, 125 MHz) dados espectroscópicos: ver tabela 1. HR-ESI-EM: m/z 279.1966 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 279.1954).

2.5 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

2.5.1 Cultura Celular

As células de glioma C6 de rato foram cultivadas até confluência em placas de poliestireno de 10 mm (TPP, Trasadingen, Suia), em seguida tratada com tripsina e replaqueadas em placas de cultura de poliestireno de 40 mm ($1,5 \times 10^5$ células/placa) ou em placas de 96 poços (5×10^3 células/ cm^2) (TPP). Estas culturas foram cultivadas em meio meio Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM, Cultilab, Campinas, Brasil) suplementado com 100 UI/mL de penicilina G, 100 mg/mL de estreptomicina, 7 mmol/L de glicose, 2 mmol/L de L-glutamina, 0,011 g/L de ácido pirúvico e 10% de soro fetal bovino e mantidos em atmosfera umidificada composta por 5% de CO_2 a 37 °C (COELHO et al., 2016).

As células de astrócitos foram obtidas do córtex de ratos Wistar recém-nascidos (0-2 dias de idade) na Unidade de Animais da Universidade Federal da Bahia (Salvador, Brasil) e realizadas de acordo com as diretrizes brasileiras de produção, manutenção e uso de animais para atividades de ensino e pesquisa científica e o Comitê de Ética para Experimentação Animal local, número de protocolo (0272012 ICS-UFBA). Em resumo, após decapitação, os prosencéfalos de ratos Wistar recém-nascidos foram dissociados mecanicamente e ressuspensos em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), 10% soro equino (HS), 4 mM L-glutamina, 100U/mL penicilina e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina. As células foram cultivadas em frascos revestidos com poli-D-lisina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ao atingir a

confluência (7 a 10 dias), as células microgliciais aderentes foram coletadas por agitação a 165 rpm a 37°C por 3 h. Após a agitação para remover a microglia, as culturas enriquecidas em astrócitos foram mantidas no incubadora por 48 horas. Após esse período, eles foram tripsinizados e semeados em placas de 96 poços em uma densidade de $3 \times 10^4/\text{cm}^2$ e os experimentos foram realizados após 24 h. Em todos os casos, as células foram cultivadas a 37 ° C em 5% CO₂ (SILVA ET AL., 2008).

2.5.2 Tratamento e avaliação da viabilidade celular

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada através de um ensaio MTT (YUE *et al.*, 2008). As células de linhagem C6 confluentes cultivadas em placas de 96 poços (TPP) (1×10^4 células/mL, 100 µL cada poço) foram expostas aos compostos **1-4** (1-50 µM) por 24 h. Duas horas antes do final do tempo de exposição, o meio de cultura foi substituído por uma solução de MTT diluído em DMEM (5 mg/mL) e em seguida a placa foi incubada por 2 h em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente, as células foram lisadas com 20% (p/v) de dodecilsulfato de sódio (SDS), 50% (v/v) de ácido acético e 2,5% (v/v) de 1 mol/L de HCl. As placas foram mantidas durante a noite a 37°C para permitir a dissolução dos cristais de formazan. A citotoxicidade celular foi quantificada medindo a conversão de MTT amarelo em cristais de formazan púrpura por desidrogenases mitocondriais de células vivas. A absorção de cada amostra foi medida a 540 nm usando um Espectrofotômetro Bio-Rad 550 PLUS (Bio-Rad, Santo Amaro, Brasil). As células de controle foram tratadas com o mesmo volume de DMSO (0,1%) diluído em DMEM, que foi utilizado como veículo para os compostos **1-4**. Três experimentos independentes foram conduzidos e oito poços replicados foram usados para cada condição experimental.

As células de astrócitos foram conservadas em uma solução de 90% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 10% dimetilsulfóxido (DMSO) à razão de $1,5-2 \times 10^6$ células/mL e estocadas em criotubos no nitrogênio líquido a -70°C. Culturas de células confluentes, cultivadas em placas de 100 mm φ foram dissociadas utilizando-se uma solução de tripsina 0,05% diluída em PBS, e replaqueadas em placas 96 poços, a uma densidade inicial de 10^4 células/poço em meio Dulbecco modificado (DMEM, Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,011 g/L de ácido pirúvico, 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina G e 7 mM de glicose, e incubadas a 37°C em atmosfera úmida e controlada, contendo 5% de CO₂. Todos os experimentos foram realizados até a décima passagem de células.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e analisados com ANOVA seguido do teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. A CE_{50} (concentração efetiva para 50%) dos compostos foi calculada através de análise de regressão não linear. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico Graphprism (versão 5.0, GraphPad Software Inc., La Jolla, Califórnia, EUA).

2.7 MODELAGEM MOLECULAR

As estruturas químicas 2D das γ -lactonas foram desenhadas no software Marvin Sketch 6.0.1, 2013, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>) e as coordenadas 2D foram convertidas para o formato 3D com a ajuda do SYBYL-Software X 2.0 (Tripos Associates, St. Louis, MO, EUA) (TRIPOS INTERNATIONAL, 2012). As cargas Gasteiger-Huckel foram calculadas com o método FF12SB (GASTEIGER; MARSILI, 1980), conforme disponível no programa Chimera 1.10.1.

Os alvos moleculares foram obtidos do servidor Protein Data Bank (PDB) e a seleção foi baseada na menor valor de resolução ($R < 2\text{\AA}$). As estruturas 3D das proteínas selecionadas estão descritas na Tabela 2.2. Os ligantes co-cristalizados foram utilizados para localizar o sítio ativo nos alvos moleculares. Os alvos moleculares foram preparados através do módulo DockPrep no software Chimera 1.10.1 (PETTERSEN *et al.*, 2004) para a remoção de moléculas de água e a adição de hidrogênios polares para otimizar as ligações de hidrogênio. Os íons e cofatores foram mantidos para os alvos moleculares (4PH9 e 4L3J).

O acoplamento molecular foi realizado no software DOCK 6.8 (ALLEN *et al.*, 2015). Inicialmente, a imagem negativa da superfície molecular do sítio ortostérico foi construída através da superfície molecular de acesso ao solvente do receptor gerada pelo programa acessório DMS (do inglês, Display Midas System) (FERRIN *et al.*, 1988). Um conjunto de esferas com raio de $1,4\text{\AA}$ foi gerado através do programa acessório SPHGEN e a seleção das esferas próximas ao ligante cristalográfico ($8,0\text{\AA}$) foram consideradas para o acoplamento molecular através do programa SPHERE_SELECTOR (KUNTZ *et al.*, 1982), o espaço de acoplamento foi definido usando o ligante co-cristalizado para cada alvo molecular.

As propriedades moleculares (potencial atração e repulsão, efeitos de solvatação e contatos estéricos) para a região foram calculadas usando o software GRID na configuração padrão (SHOICHET *et al.*, 1992). O acoplamento molecular foi realizado usando a função de pontuação GridScore (MENG *et al.*, 1992). Um processo de reacoplamento foi realizado para

verificar a precisão do método de encaixe ao reproduzir a orientação cristalográfica dos ligantes complexados para os alvos selecionados. Os resultados foram analisados usando o desvio médio-quadrático (RMSD) calculado no software DOCK6.8. Em seguida, um conjunto de γ -lactonas (**1-4**) foi acoplado contra todas as proteínas.

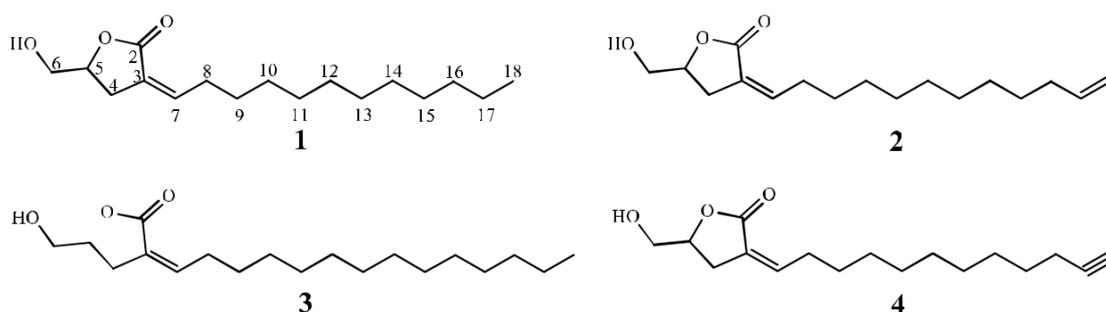
As análises das interações intermoleculares para a molécula mais bem classificada para cada alvo foi realizada no software Protein-Ligand Interaction Profiler (SALENTIN *et al.*, 2015) e os mapas de interação foram projetados no PyMOL v0.99.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ISOLAMENTO DAS γ -LACTONAS DE *P. fulva*

As folhas de *P. fulva* foram coletadas na região semiárida brasileira e os principais constituintes polares foram extraídos. O fracionamento do extrato acetato de etila resultou em 15 frações, das quais as frações 9-10 foram unidas e submetidas a purificação por CLAE semi-preparativo proporcionando o isolamento do novo metabolito secundário (3*E*)-5,6-dihidro-5-(hidroximetil)-3- docdecilidenefuran-3(4H)-ona, denominado majoranolideo B (**1**), juntamente com outras duas conhecidas γ -lactonas: majorenolideo (**2**) e majoranolideo (**3**). Adicionalmente, a fração 8 foi submetida a cromatografia em coluna aberta proporcionando a purificação de outra γ -lactona conhecida, majorinolideo (**4**) (Figura 2.1).

Figura 2.1. γ -Lactonas (1-4) isoladas de *P. fulva* majoranolideo B (**1**), majorenolideo (**2**), majoranolideo (**3**) e majorinolideo (**4**)

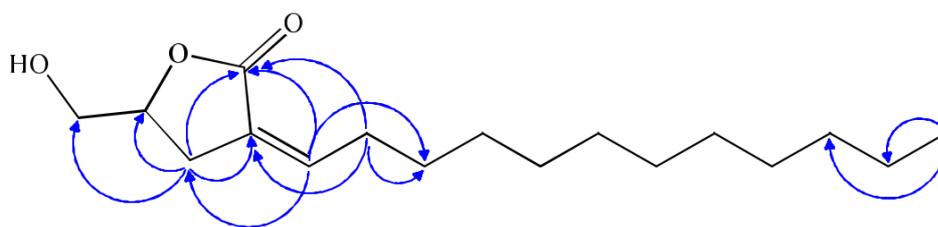


A elucidação das estruturas dos compostos **1-4** foi realizada por técnicas de RMN 1D e 2D (^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, ^1H - ^1H -COSY) (Tabela 2.1), bem como infravermelho (IV), Cromatografia à Líquidos de Alta Eficiência acoplado a Espectrômetro de Massas (CLAE-EM) e comparação com dados da literatura (os espectros de massas e RMN de ^1H e ^{13}C constam no ANEXO II). O Composto (**1**) foi obtido como um óleo verde, cuja fórmula molecular ($\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{O}_3$) foi determinada por CLAE-EM (m/z 283.2204, $[\text{M}+\text{H}]^+$) com um grau

de insaturação de 3. Os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 mostraram 17 carbonos, incluindo doze metilênicos com δ_{C} 26,3 (C-4), 63,2 (C-6), 29,6 (C-8), 27,8 (C-9), 29,4-29,0 (C-10 a C-15), 31,7 (C-16) e 22,3 (C-17), dois carbonos quaternários com δ_{C} 171,9 (C-2) e 126,8 (C-3), dois sinais de carbonos metínicos com δ_{C} 78,2 (C-5) e 140,2 (C-7) e um grupo metila com δ_{C} 13,0 (C-18).

Um hidrogênio olefínico foi atribuído ao sinal em δ_{H} 6,67 (m, CH(7)) e três sinais de grupos metilênicos foram observados em δ_{H} 2,25 (q, J=7,4, CH₂(8)), 1,53 (qu, J=7,4, CH₂(9)), 1,30-1,45 (m, CH₂(10-17)). O sinal em δ_{H} 0,92 (t, J=6,8, CH₃ (18)) confirma a presença de uma metila terminal. Um conjunto de hidrogênios vicinais foi detectado em δ_{H} 2,93 (m), 2,74 (m), para CH₂(4), 4,66 (m) para H-C(5) e 3,78 (dd, J=12,3, 3,2) e 3,60 (dd, J=12,3, 4,5) para CH₂(6). Além disso, a porção α -alquildieno- γ -(hidroximetil)- γ -lactona foi deduzida pelas correlações HMBC entre H-7 e os sinais C-2 e C-4; H-8 e os sinais C-2, C-3 e C-7 e entre H-4 e os sinais C-2, C-3, C-5, C-6 e C-7 (Figura 2.2). Além disso, os hidrogênios metilênicos na posição CH₂(4) acoplam com C-8 devido a um acoplamento alílico J⁴, confirmam que o composto **1** contém uma porção α -alquildieno- γ -(hidroximetil)- γ -lactona (Figura 2.2). Outros dados espectrais (UV, HRESIMS, RMN de ^1H e ^{13}C) confirmaram a estrutura de **1** como (3E)-5,6-di-hidro-5-(hidroximetil)-3-dodecilidenefuran-3(4H)-ona, uma nova γ -lactona, denominada majoranolideo B (**1**) (MA *et al.*, 1989; FRAGA, TERRERO, 1996; CHANG *et al.*, 2008).

Figura 2.2. Correlações do experimento de HMBC para o majoranolideo B (**1**). Setas azuis (setas azuis, de ^1H a ^{13}C)



O composto **2** difere do **1** nos carbonos terminais C-17 e C-18, que em **2** mostram sinais de ligação dupla e foram atribuídos três hidrogênios olefínicos adicionais. Assim, de acordo com os dados da literatura, a estrutura do composto **2** foi elucidada como o majorenolideo. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para o composto **3** foram semelhantes aos do composto **1**, exceto por dois carbonos adicionais presentes na cadeia lateral de **3**. Os outros dados espectrais confirmaram a estrutura do composto **3** como o majoranolideo. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **4** foram semelhantes aos do majorenolideo (**2**) e possui a

mesma porção α -alquildieno- γ -(hidroximetil)- γ -lactona. Sendo que a principal diferença entre o composto **4** e o composto **2** é a presença de um grupo acetileno terminal em **4**. Assim, todos os dados espectrais confirmaram a estrutura do composto **4** como o majorinolideo (MA *et al.*, 1989; MA *et al.*, 1990; FRAGA, TERRERO, 1996; CHANG *et al.*, 2008).

A análise dos dados obtidos por espectrometria de massas possibilitou o estudo da fragmentação dos compostos permitindo propor um perfil de fragmentação para os compostos **1-4**, que apresentaram íon pseudomolecular 283,2204, 281,2142, 311,2612 e 279,1966, respectivamente. A fragmentação MS² do [M+H]⁺ resultou na formação de íons produto da desidratação (**1a**, **2a**, **3a** e **4a**) e da perda neutra de ácido fórmico (**1b**, **2b**, **3b** e **4b**), respectivamente. A Figura 2.3 apresenta uma proposta de rota de fragmentação desses compostos.

Figura 2.3. Propostas de fragmentação para γ -lactonas 1-4

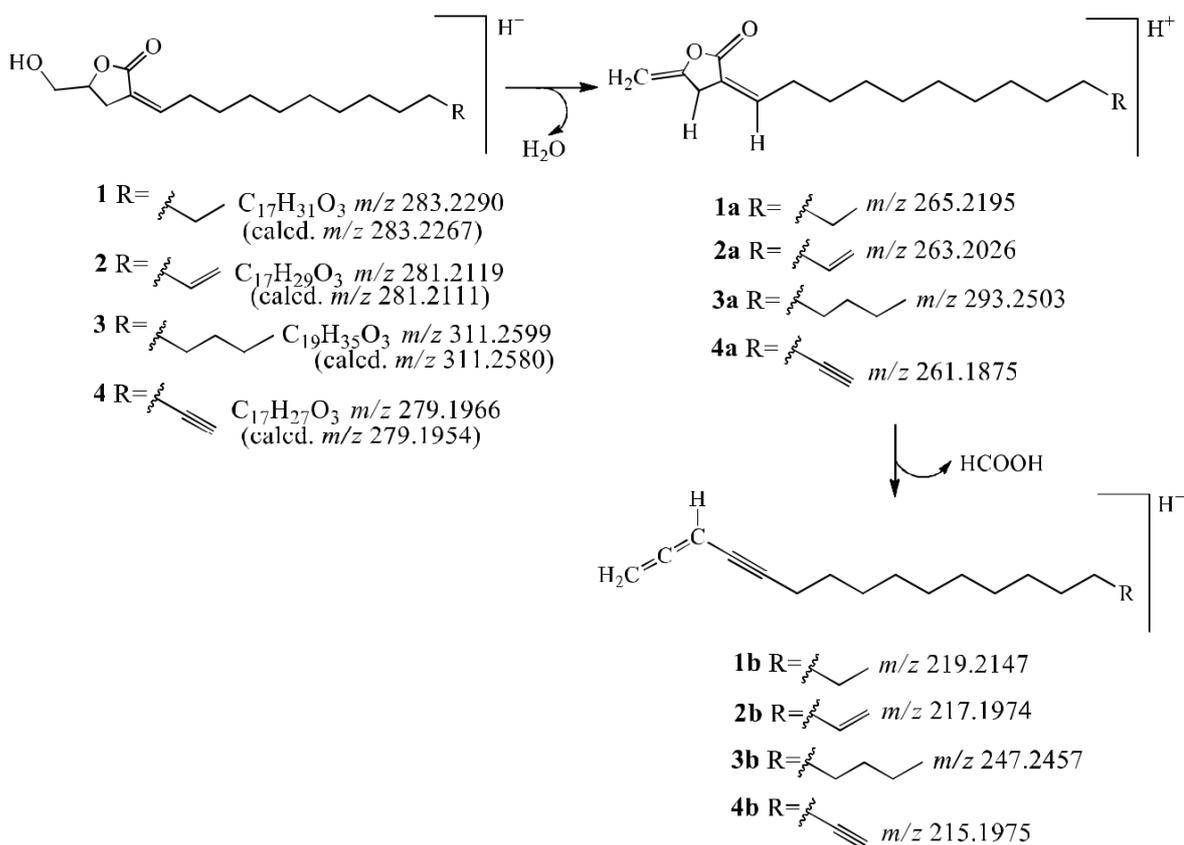


Tabela 2.1. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) obtidos das γ -lactona (1-4). Deslocamentos químicos em δ (ppm), constantes de acoplamento (J em Hz, entre parênteses), MeOD como solvente e TMS como padrão interno

	1		2		3		4	
C/H	δ (^{13}C)	δ (^1H)	δ (^{13}C)	δ (^1H)	δ (^{13}C)	δ (^1H)	δ (^{13}C)	δ (^1H)
C								
2	171.9	-	171.9	-	171.9	-	171.9	-
3	126.8	-	126.8	-	126.8	-	126.8	-
17	-	-	-	-	-	-	82.8	-
CH								
5	78.2	4.66 (m)	78.2	4.66 (m)	78.2	4.66 (m)	78.2	4.65 (m)
7	140.2	6.67 (m)						
17	-	-	138.7	5.82 (m)	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	67.9	2.17 (m)
CH₂								
4	26.3	2.93 (m), 2.74 (m)	26.3	2.95 (m), 2.74 (m)	26.3	2.94 (m), 2.74 (m)	27.8	2.94 (m), 2.74 (m)
6	63.2	3.78 (dd, 12.4, 3.3) 3.60 (dd, 12.4, 4.4)	63.2	3.78 (dd, 12.3, 3.3) 3.60 (dd, 12.4, 4.5)	63.2	3.78 (dd, 12.3, 3.3) 3.60 (dd, 12.4, 4.4)	63.2	3.78 (dd, 12.3, 3.2) 3.59 (dd, 12.3, 4.6)
8	29.6	2.25 (~q, 7.4)	29.6	2.25 (q, 7.4)	29.6	2.25 (~q, 7.4)	29.6	1.50 (m)
9	27.8	1.53 (qu, 7.4)	27.8	1.52 (qu, 7.4)	27.8	1.53 (qu, 7.4)	28.2	1.54 – 1.25
10	29.4 ^a	1.45- 1.30	29.2 ^b	1.40- 1.30	29.4 ^c	1.40- 1.30	29.1 ^d	1.54 – 1.25
11	29.4 ^a	1.45- 1.30	29.1 ^b	1.40- 1.30	29.4 ^c	1.40- 1.30	29.0 ^d	1.54 – 1.25
12	29.2 ^a	1.45- 1.30	29.1 ^b	1.40- 1.30	29.4 ^c	1.40- 1.30	29.0 ^d	1.54 – 1.25
13	29.1 ^a	1.45- 1.30	29.0 ^b	1.40- 1.30	29.4 ^c	1.40- 1.30	28.7 ^d	1.54 – 1.25
14	29.0 ^a	1.45- 1.30	28.8	1.40- 1.30	29.2 ^c	1.40- 1.30	28.3 ^d	1.54 – 1.25
15	29.0 ^a	1.45- 1.30	28.7	1.40- 1.30	29.1 ^c	1.40- 1.30	28.2 ^d	1.54 – 1.25
16	31.7	1.45- 1.30	33.4	2.06 (qu, 6.9)	29.0 ^c	1.40- 1.30	17.5	2.24 (m)
17	22.3	1.45- 1.30	-	-	29.0 ^c	1.40- 1.30	-	-
18	-	-	113.3	4.98 (dq, 17.1, 1.6) 4.93 (dm, 10.1)	31.7	1.40- 1.30	-	-
19	-	-	-	-	22.0	1.40- 1.30	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-
CH₃								
18	13.0	0.92 (t, 6.8)	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	13.0	0.92 (t, 6.8)	-	-

*Número de hidrogênios ligados a átomos de carbono deduzidos pelos espectros de RMN ^{13}C -DEPT. Deslocamentos

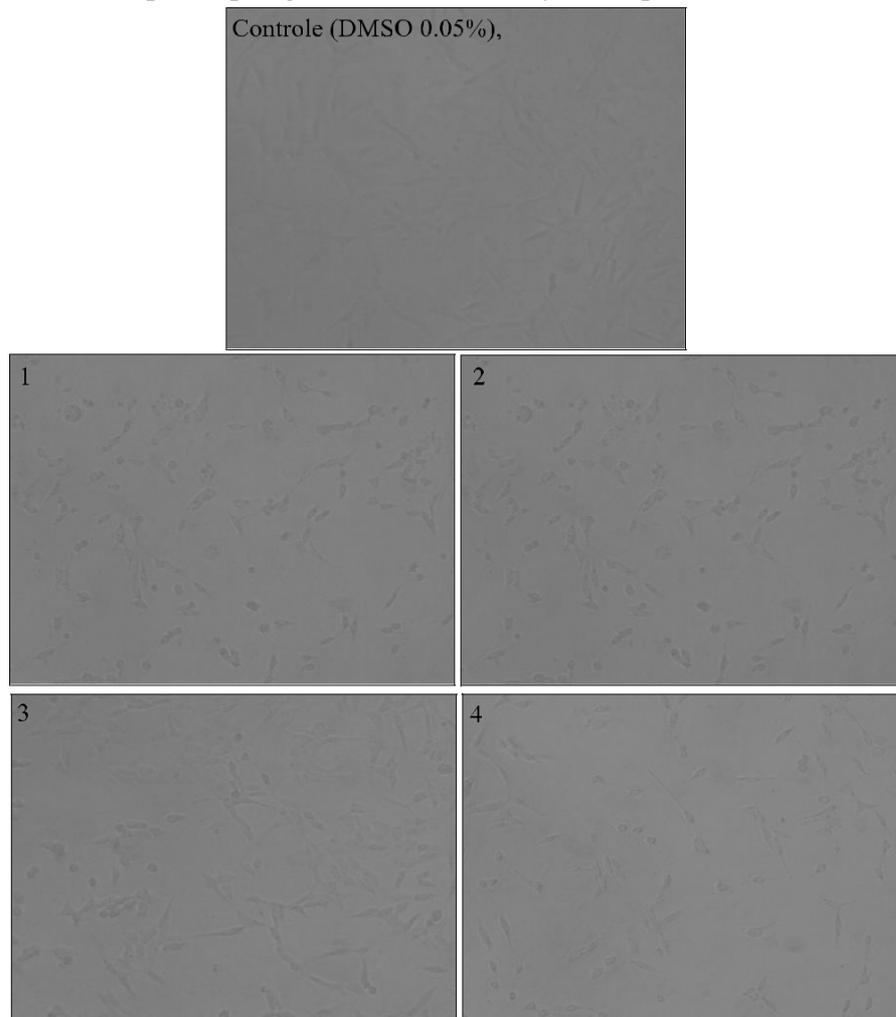
químicos e constantes de acoplamento (J) obtidos de espectros de RMN de ^1H . Os sinais ^1H sobrepostos são descritos sem multiplicidade e os desvios químicos foram deduzidos pelos espectros HSQC, HMBC e 1H-1H-COSY.

a,b,c,d Os valores δ (^{13}C) com a mesma letra podem ser trocados entre si.

3.2 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

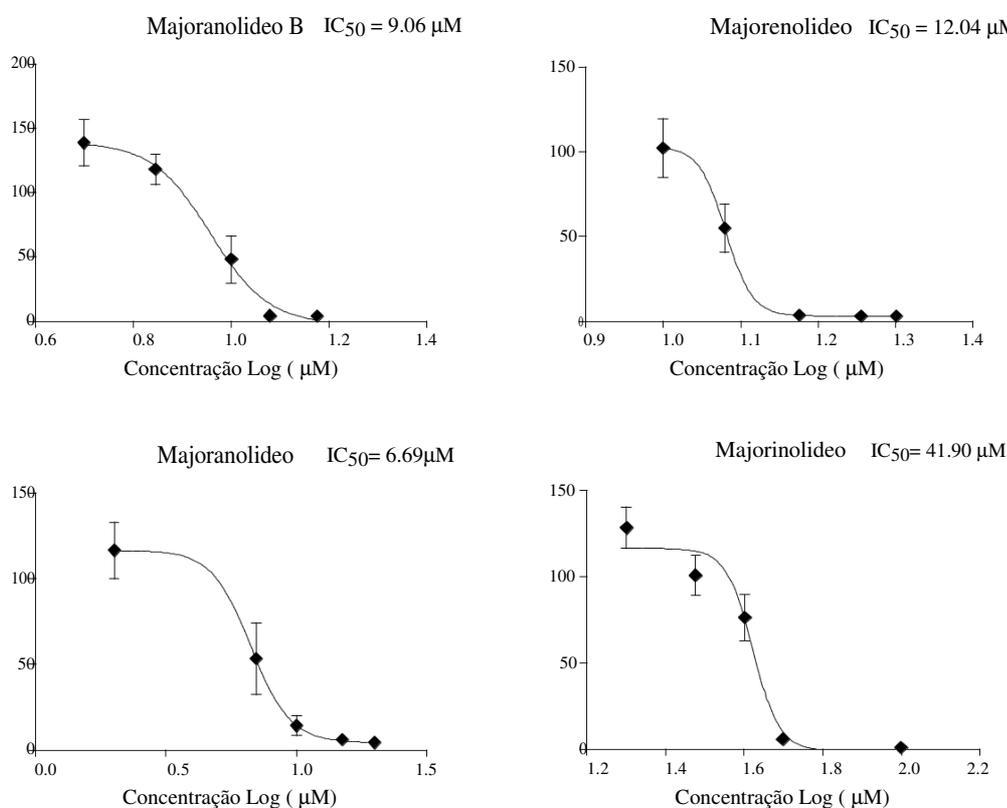
O crescimento celular irrestrito e a resistência à morte celular são características típicas das células tumorais (HANAHAN, WEINBERG, 2011). Todas as γ -lactonas isoladas foram avaliadas quanto aos seus efeitos no crescimento de células de glioma C6 de rato. O efeito de γ -lactonas na atividade metabólica de células de glioma C6 de rato após 24 horas de tratamento foi testado utilizando o ensaio de redução de MTT, que avalia a função da enzima desidrogenase no metabolismo mitocondrial. Para calcular os valores de CE₅₀ (concentração efetiva que causa 50% de inibição do crescimento), as células foram incubadas com concentrações crescentes dos compostos isolados durante 24 horas. Quando comparado ao controle (DMSO 0,05%), observou-se que todas as γ -lactonas eram citotóxicas ($p < 0,05$) para as células C6, induzindo decréscimos significativos nas atividades mitocondriais (Figura 2.4).

Figura 2.4. Campo visual de células C6 tratadas com o controle (DMSO 0,05%) e os compostos majoranolide B (1), majorenolide (2), majoranolide (3) e majorinolide (4) após 24 h após exposição a 10, 12, 7 e 40 μ M, respectivamente



A proliferação de células C6 foi significativamente inibida por γ -lactonas de uma maneira dependente da concentração (Figura 2.5), com mais de 90% de supressão. Majoranolideo (**3**) foi o composto mais ativo com CE_{50} de 6,69 μ M contra células de glioma C6, seguido pelos compostos **1** (CE_{50} 9,06 μ M), **2** (CE_{50} 12,04 μ M) e **4** (CE_{50} 41,90 μ M), respectivamente.

Figura 2.5. Viabilidade celular de C6 calculada através do MTT depois de 24h. Resultados expressos em média \pm desvio padrão e EC_{50} calculado usando o Graph Pad Prism 5 para os compostos Majoranolideo B (**1**), majorenolideo (**2**), majoranolideo (**3**) e majorinolideo (**4**)

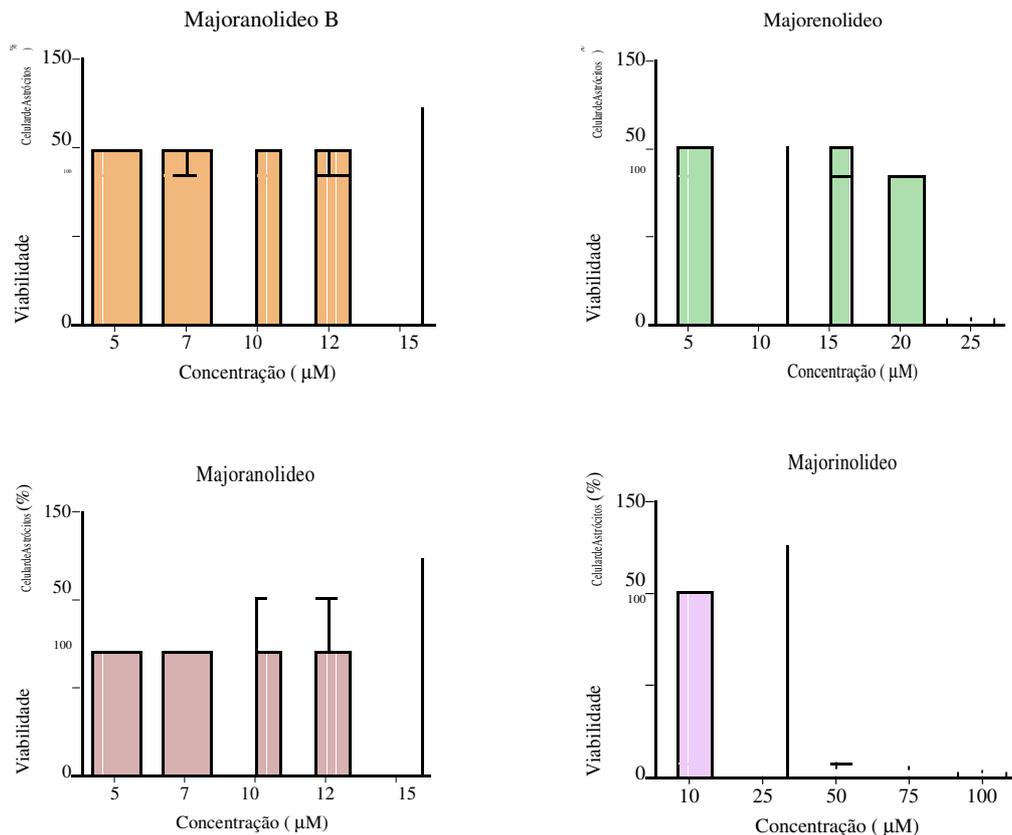


As células C6 ainda são amplamente utilizadas em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* para desenvolver novas estratégias de tratamento para glioblastoma. Assim, alguns autores consideram que os resultados obtidos a partir de estudos utilizando células C6 seriam semelhantes às respostas observadas em humanos (IGNARRO *et al.*, 2017).

Uma vez que a toxicidade dos agentes anticancerígenos nos tecidos normais reduz a possibilidades de uso dos agentes na quimioterapia, foi avaliada a influência das γ -lactonas (**1-4**) na viabilidade de astrócitos normais. Os resultados (Figura 2.6) mostraram que as γ -lactonas **1-3** não produziram toxicidade nas células de astrócitos em concentrações maiores do

que os valores de CE_{50} para células tumorais. Portanto, os resultados obtidos para γ -lactonas são promissores na busca de novos compostos com atividade antitumoral.

Figura 2.6. Viabilidade celular de astrócitos após 24 h, utilizando-se ensaios de atividade MTT. As barras de erro indicam médias \pm DP dos compostos majoranolideo B (1), majorenolideo (2), majoranolideo (3) e majorinolideo (4)



Majorenolideo (2), majoranolideo (3) e majorinolideo (4) foram isolados pela primeira vez do extrato EtOH das cascas de *Persea major* e foram todas ativas em bioensaios de citotoxicidade contra células tumorais humanas (carcinoma de pulmão- A-549, carcinoma de mama- MCF-7, adenocarcinoma de cólon- HT-29) (MA *et al.*, 1989; MA *et al.*, 1990). Falodun *et al.* 2013 descreveram o isolamento de uma nova γ -lactona (4-hidroxi-5-metileno-3-undeciclidenedihidrofuran-2(3H)-ona) da casca da raiz de *P. americana* e relataram um efeito estimulador sobre células MCF-12A não tumorigênicas em relação à adesão celular enquanto células MCF-7 tumorigênicas se destacaram continuamente. Estes resultados corroboram com os resultados acima mencionados para as γ -lactonas isoladas de *P. fulva*.

3.3 ACOPLAMENTO MOLECULAR

Uma abordagem de acoplamento molecular pode explicar a interação entre moléculas e proteínas, o que permite a caracterização do comportamento das moléculas no local de ligação das proteínas alvo (WARD *et al.*, 2017). Neste estudo investigamos as vias que desempenham um papel central no controle da progressão do ciclo celular de gliomas. Quatro alvos foram selecionados, sendo eles: Quinase de Adesão Focal (FAK) e Proteína Ribossômica S6 Quinase 1 (S6K1), pois esses alvos estão envolvidos em múltiplas funções celulares, como proliferação celular (LIETHA *et al.*, 2008; THIYAGARAJAN *et al.*, 2013; THIYAGARAJAN *et al.*, 2016), sobrevivência e metástase; Cicloxigenase-2 (COX-2), porque vem sendo relatada como sendo superexpressa em várias células tumorais diferentes e, portanto, desempenha um papel crucial na carcinogênese e na progressão da doença (SERVER *et al.*, 2016); e Quinase Extracelular Sinal Regulada 1 e 2 (ERK1/2), porque controla a saída da via MAPK, que desempenha um papel central no controle do ciclo celular de mamíferos (Tabela 2.2) (WARD *et al.*, 2017).

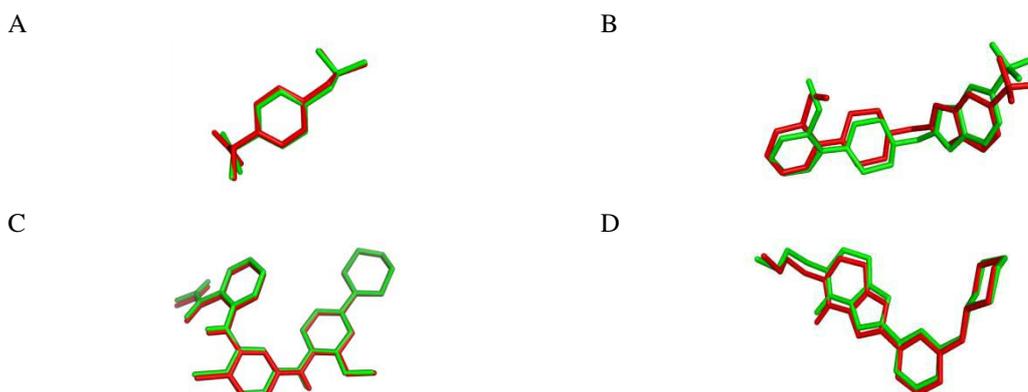
Tabela 2.2. Alvos moleculares utilizados nos estudos de acoplamento molecular

Alvo	Ligante	GridScore (kcal.mol ⁻¹)	PDB ID	Resolução (Å)	Ref.
Quinase de Adesão Focal (FAK)	2-({5-chloro-2-[(2-methoxy-4-morpholin-4-ylphenyl)amino]pyrimidin-4-yl}amino)-n-methylbenzamide	-57.59	2JKK	2.0	Lietha <i>et al.</i> , 2008
Quinase Regulada por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2)	5-(2-methoxyethyl)-2-[2-(oxan-4-ylamino)pyrimidin-4-yl]-6,7-dihydro-1-{H}-pyrrolo[3,2-c]pyridin-4-one	-78.99	5NHH	1.94	Ward <i>et al.</i> , 2017
Cicloxigenase-2 (COX-2)	Ibuprofeno	-53.63	4PH9	1.81	Orlando <i>et al.</i> , 2015
Ribossomal S6 Quinase 1 (S6K1)	2-{{[4-(5-ethylpyrimidin-4-yl)piperazin-1-yl]methyl}-5-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole	-64.87	4L3J	2.1	Wang <i>et al.</i> , 2013

A eficiência e a reprodutibilidade do protocolo de acoplamento molecular foram verificadas por meio reacoplamento que é capaz de medir, através do RMSD, a capacidade do algoritmo de busca/função de pontuação em identificar uma pose com as coordenadas próximas/idênticas à do ligante cristalográfico em sua provável conformação cristalográfica. Resultados de $\text{RMSD} \leq 2 \text{ \AA}$ são considerados aceitáveis na avaliação de um método de acoplamento (BROZELL *et al.*, 2012). Os valores de RMSD encontrados entre a pose cristalográfica e a pose mais bem ranqueada obtida pelas funções de pontuação foram: $0,95 \text{ \AA}$

para o S6K1, 0,18 Å para o FAK, 0,82 Å para o COX-2 e 0,36 Å para o ERK1/2 (Figura 2.7). Os resultados indicam que o software DOCK 6.8 foi capaz de se aproximar da estrutura experimentalmente determinada.

Figura 2.7. Comparação do posicionamento dos ligantes acoplados em relação aos cristalográficos de COX-2 (A), S6K1 (B), FAK (C) e ERK1/2 (D). Os ligantes co-cristalizados são mostrados em linhas vermelhas, enquanto as poses ancoradas são mostradas em linhas verdes. RMSD: 0,82 Å (A), 0,95 Å (B), 0,18 Å (C) e 0,36 Å (D)



O majoranolideo (**3**) mostrou uma maior afinidade de ligação com todos os alvos em comparação com as outras γ -lactonas testadas (Tabela 2.3). Para o alvo FAK, a cadeia alquílica do majoranolideo (**3**) estabelece interações hidrofóbicas com a cadeia lateral dos resíduos Leu567, Leu553, Ala452 e Glu506, enquanto ligações de hidrogênio foram formadas a partir dos oxigênios do anel lactônico do majoranolideo e o resíduo *N*-terminal do Asp564 e o oxigênio do resíduo *C*-terminal de Glu500 (Figura 2.8-A). Thiagarajan e colaboradores (2013) sugerem que os compostos quirais e contendo anéis lactônicos podem ter uma forte interação com esta proteína, porque lactonas foram responsáveis por ligações de hidrogênio com os resíduos do sítio ativo (THIYAGARAJAN *et al.*, 2013).

Tabela 2.3. Resultados do acoplamento molecular para os compostos isolados frente a cada alvo molecular

Compostos	Alvos (GridScore - kcal.mol ⁻¹)			
	FAK	S6K1	COX-2	ERK1/2
Majoranolideo B (1)	-40.22	- 61.66	- 56.89	- 61.99
Majorenolideo (2)	-39.72	- 60.98	- 56.37	- 62.41
Majoranolideo (3)	-42.41	- 65.41	- 62.10	- 65.40
Majorinolideo (4)	-39.35	- 60.55	- 55.53	- 62.80

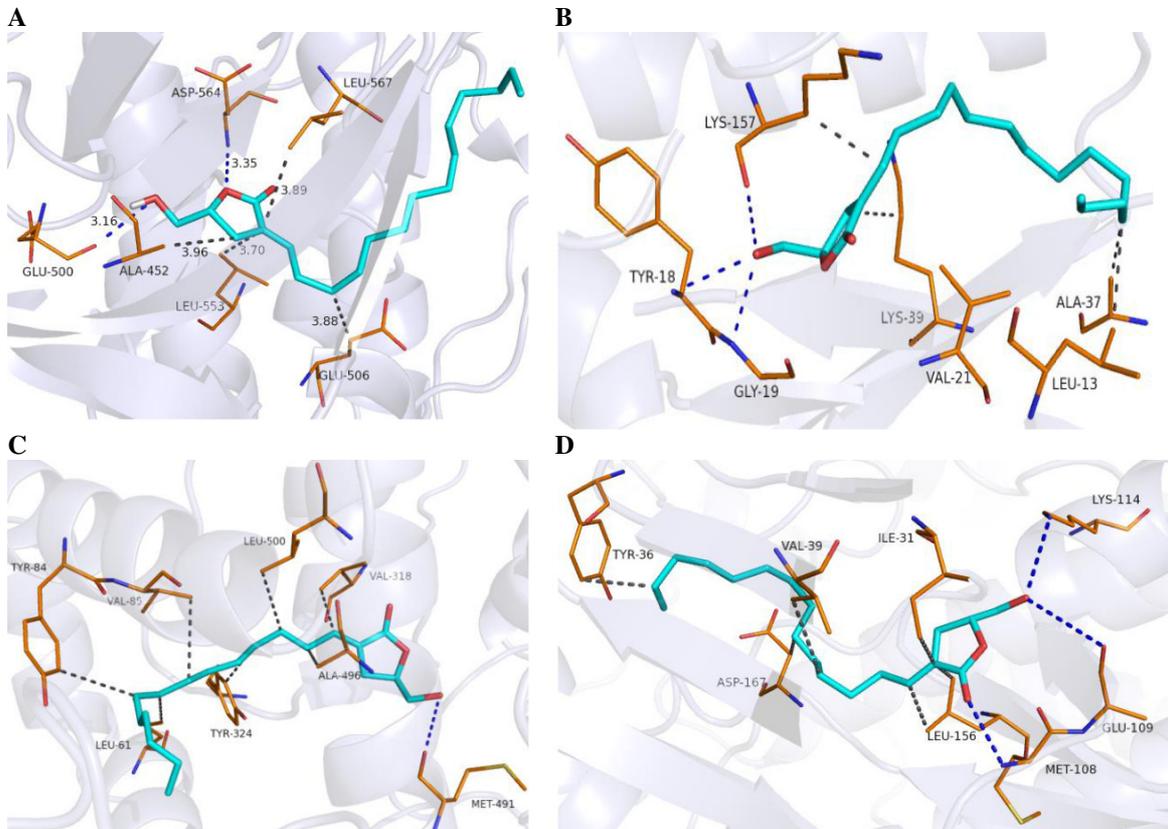
No acoplamento com S6K1, o majoranolideo estabeleceu interações hidrofóbicas com a cadeia lateral de Leu13, Ala37, Val21, Lys39 e Lys157 e ligações de hidrogênio com o átomo de oxigênio do resíduo *C*-terminal de Lys-157 e os resíduos *N*-terminais de Gly19 e Tyr18 (Figura 2.8-B). Thiyagarajan e colaboradores (2016) descreveram que os ligantes formam ligações de hidrogênio, interação π -cátion e hidrofóbica com S1K6, estes resultados confirmam as interações acima mencionadas entre o majoranolideo e o sítio ativo S1K6.

Para COX-2, o majoranolideo (**3**) formou interações hidrofóbicas com a cadeia lateral de Tyr84, Val85, Leu61, Tyr324, Leu500, Ala496 e Val318. O grupo hidroxila do majoranolideo (**3**) formou uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio do resíduo Met491 (Figura 2.8-C). As interações hidrofóbicas são responsáveis pelas principais interações formadas entre o ibuprofeno (ligante co-cristalizado) e os resíduos do sítio ativo da COX-2 (ORLANDO *et al.*, 2015).

Por fim, para o alvo ERK1/2, o majoranolideo (**3**) estabeleceu interações hidrofóbicas com o anel benzênico de Tyr36 e a cadeia lateral de Asp167, Val39, Ile31 e Leu156. Além disso, uma ligação de hidrogênio entre os grupos hidroxila do ligante e Met108, Lys114 e Glu109 (Figura 2.8-D).

Para as interações acima mencionadas, o majoranolideo forma ligações de hidrogênio através da sua porção do anel lactônico, enquanto o grupo alquil da cadeia lateral se coordena com o alvo por meio de várias ligações hidrofóbicas. Assim, os resultados da bioavaliação indicaram o majoranolideo como o composto com o CE₅₀ mais baixo e estes resultados foram confirmados através de estudos de acoplamento molecular.

Figura 2.8. Resultados do acoplamento molecular para FAK (A) S6K1 (B), COX-2 (C) e ERK1/2 (D). Os carbonos são representados em ciano ou laranja, nitrogênios em azul e oxigênios em vermelho. Linha tracejada azul: ligação de hidrogênio; Linha tracejada cinza: interação hidrofóbica.



4. CONCLUSÃO

O novo composto Majoranolideo B (**2**) e três γ -lactonas já conhecidas foram isoladas de *P. fulva* e rastreadas quanto ao seu potencial antiproliferativo contra células de glioma C6. Entre todos os compostos avaliados contra células de glioma C6, o majoranolideo (**3**) apresentou maior a atividade, seguido do majoranolideo B (**1**), majorenolideo (**2**) e majorinolideo (**4**). O estudo de acoplamento molecular confirmou o majoranolideo (**3**) como o mais ativo, através de suas interações com o sítio ativo de quatro possíveis alvos envolvidos na atividade antitumoral. Assim, a partir da atividade antiproliferativa de isolados contra células de glioma C6, é possível concluir que as γ -lactonas de *P. fulva* podem ter um grande potencial para o controle de células de glioma C6.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, W. J.; BALIUS, T. E.; MUKHERJEE, S.; BROZELL, S. R.; MOUSTAKAS, D. T.; LANG, P. T.; CASE, D. A.; KUNTZ, I. D.; RIZZO, R. C. DOCK 6: Impact of new features and current docking performance. **J. Comput. Chem.** v. 36, p. 1132-1156, 2015.
- BROZELL, S.R.; MUKHERJEE S.; BALIUS, T.E.; ROE, D.R.; CASE, D.A.; RIZZO, R.C. Evaluation of DOCK 6 as a pose generation and database enrichment tool. **J Comput Aided Mol Des**, v. 26, p. 749-773, 2012.
- CHANG, S-Y.; CHENG, M-J.; PENG, C-F.; CHANG, H-S.; CHEN, I-S. Antimycobacterial Butanolides from the Root of *Lindera akoensis*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, p. 2690-2698, 2008.
- COELHO, P. L. et al. The flavonoid apigenin from *Croton betulaster* Mull inhibits proliferation, induces differentiation and regulates the inflammatory profile of glioma cells. **Anticancer Drugs**, v. 27, p. 960-969, 2016.
- FALODUN, A.; ENGEL, N.; KRAGL, U.; NEBE, B; LANGER, P. Novel anticancer alkene lactone from *Persea americana*. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, p. 700-706, 2013.
- FERRIN, T.E.; HUANG, C.C.; JARVIS, L.E.; LANGRIDGE, R. The Midas display system, **J. Mol. Graf.**, v. 6, p. 13-27, 1988.
- FRAGA, B.M; TERRERO, D. Alkene-lactones and avocadofurans from *Persea indica*: a revision of the structure majorenolide of and related lactones. **Phytochemistry**, v. 41, p. 229-232, 1996.
- GONZALEZ-COLOMA, A.; REINA, M.; GUTIERREZ, C.; FRAGA, B.M. Natural insecticides: structure diversity, effects and structure-activity relationships. A case study. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 2, p. 849-879, 2002.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. v. 144, p. 646-674, 2011.
- IGNARRO, R. S; FACCHINI, G.; MELO, D. R.; PELIZZARO-ROCHA, K. J.; FERREIRA, C. V.; CASTILHO, R.F.; ROGERIO, F. Characteristics of sulfasalazine-induced cytotoxicity in C6 rat glioma cells. **Neurosci. Lett.** v. 638, p. 189-195, 2017.
- IQBAL, J.; ABBASI, B. A.; MAHMOOD, T.; KANWAL, S.; ALI, B.; SHAH, S.A.; KHALIL, A. T. Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach. **Asian Pac. J. Trop. Biomed.** v. 7, p. 1129-1150, 2017.
- KUNTZ, I.D.; BLANEY, J.M.; OATLEY, S.J.; LANGRIDGE, R.; FERRIN, T.E. A geometric approach to macromolecule–ligand interactions. **J. Mol. Biol.**, v.161 p. 269-288, 1982.
- LIETHA, D.; ECK, M. J. Crystal Structures of the FAK Kinase in Complex with TAE226 and Related Bis-Anilino Pyrimidine Inhibitors Reveal a Helical Dfg Conformation. **Plos One**. v. 3, p. 1-7, 2008.

LOUIS, D. N.; PERRY, A.; REIFENBERGER, G.; VON DEIMLING, A.; FIGARELLA-BRANGER, D.; CAVENEE, W. K.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; KLEIHUES, P.; ELLISON, D. W. The 2016 World Health Organization classification of tumours of the central nervous system: a summary. **Acta Neuropathol.** v. 131 (6), p. 803-820, 2016.

MA, W.; ANDERSON, J. E.; CHANG, C.; SMITH, D. L.; MCLAUGHLIN, J. L. Majoranolide and majorynolide: a new pair of cytotoxic and pesticidal alkene-alkyne & lactones from *Persea major*. **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 1263-1266, 1989.

MA, W.; ANDERSON, J. E.; CHANG, C.; SMITH, D. L.; MCLAUGHLIN, J.L. Majoranolide: a lactone from *Persea major*. **Phytochemistry**, v. 29, 2698-2699, 1990.

MENG, E. C., SHOICHET, B. K. KUNTZ, I. D. Automated docking with grid-based energy evaluation. **J. Comp. Chem.**, v. 13; p. 505-524, 1992.

ORLANDO, B. J.; LUCIDO, M. J.; MALKOWSKI, M. G. The structure of ibuprofen bound to cyclooxygenase-2. **J. Struct. Biol.** v. 189, p. 62-66, 2015.

ORLANDO, B. J.; LUCIDO, M. J.; MALKOWSKI, M. G. The structure of ibuprofen bound to cyclooxygenase-2. **J. Struct. Biol.** .v. 189, p. 62-66, 2015.

PETTERSEN, E.F.; GODDARD, T.D.; HUANG, C.C.; COUCH, G.S.; GREENBLATT, D.M.; MENG, E.C.; FERRIN, T.E. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comput. Chem.**, v. 25, p. 1605-1612, 2004.

ROY, S.; LAHIRI, D.; MAJI, T.; BISWAS, J. Recurrent glioblastoma: where we stand. **South Asian J. Cancer**. v. 4, p. 163-173, 2015.

Salentin, S.; Schreiber, S.; Haupt, V. J.; Adasme, M. F.; Schroeder, M. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. **Nucl. Acids Res.** v. 43 p. W443- W447, 2015.

SCORA, R.W.; BERGH, B.O.; HOPFINGER, J.A. Leaf Alkanes in *Persea* and Related Taxa. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 3, p. 215-218, 1975.

SEPULVEDA-BOZA, S.; DELHVI, S.; CASSELS, B.K. An aryltetralin lignan from *Persea lingue*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2357-2358, 1990.

Sever, B.; Altıntop, M. D.; Kus, G.; Ozkurt, M.; Ozdemir, A.; Kaplancıklı, Z. A. Indomethacin based new triazolothiadiazine derivatives: Synthesis, evaluation of their anticancer effects on T98 human glioma cell line related to COX-2 inhibition and docking studies. **Eur. J. Med. Chem.** v. 113, p. 179-186, 2016.

SHOICHET, B.K. KUNTZ, I.D. BODIAN, D.L. Molecular docking using shape descriptors, **J. Comput. Chem.**, v. 13 p. 380-397, 1992.

SILVA, A.R. et al. The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF- α and NO release in primary glial cell cultures. **Cell Biol Toxicol.**, v. 24, p. 75-86, 2008.

THIYAGARAJAN, V.; LIN, S. H.; CHANG, Y. C.; WENG, C. F. Identification of novel FAK and S6K1 dual inhibitors from natural compounds via ADMET screening and molecular docking. **Biomed. Pharmacother.** v. 80, p. 52-62, 2016.

THIYAGARAJAN, V.; LIN, S. H.; CHIA, Y. C.; WENG, C.F. A novel inhibitor, 16-hydroxycyclohexa-3,13-dien-16,15-olide, blocks the autophosphorylation site of focal adhesion kinase (Y397) by molecular docking. **Biochim Biophys Acta**. v. 1830, p. 4091-101, 2013.

TSAI, I. L.; HSIEH, C. F.; DUH, C. Y.; IH-SHENG CHEN, I. S. Cytotoxic neolignans from *Persea obovatifolia*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1261-1263, 1996.

WANG, J.; ZHONG, C.; WANG, F.; QU, F.; DING, J. Crystal structures of S6K1 provide insights into the regulation mechanism of S6K1 by the hydrophobic motif. **Biochem. J.** v. 454, p. 39-47, 2013.

WARD, R. A.; BETHEL, P.; COOK, C.; DAVIES, E.; DEBRECZENI, J.E.; FAIRLEY, G.; FERON, L.; FLEMINGTON, V.; GRAHAM, M.A.; GREENWOOD, R.; GRIFFIN, N.; HANSON, L.; HOPCROFT, P.; HOWARD, T. D.; HUDSON, J., JAMES, M.; JONES, C.D.; JONES, C.R.; LAMONT, S.; LEWIS, R.; LINDSAY, N.; ROBERTS, K.; SIMPSON, I.; ST-GALLAY, S.; SWALLOW, S.; TANG, J.; TONGE, M.; WANG, Z.; ZHAI, B. Structure-Guided Discovery of Potent and Selective Inhibitors of ERK1/2 from a Modestly Active and Promiscuous Chemical Start Point. **J Med Chem**. v. 60, p. 3438-3450, 2017.

WEN, P. Y.; KESARI, S. Malignant gliomas in adults. **N. Engl. J. Med.** v. 359, p. 492-507, 2008.

WOFFORD, B.E. The Systematic Significance of Flavonoids in *Persea* of the Southeastern United States. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 2, p. 89-91, 1974.

YIN, L.; LI, H.; LIU, W.; YAO, Z.; CHENG, Z.; ZHANG, H.; ZOU, H. A highly potent CDK4/6 inhibitor was rationally designed to overcome blood brain barrier in glioblastoma therapy. **Eur. J. Med. Chem.** v. 144, p. 1-28, 2018.

YUE, Q. X.; CAO, Z. W.; GUAN, S. H.; LIU, X. H.; TAO, L.; WU, W. Y.; LI, Y. X.; YANG, P. Y.; LIU, X.; GUO, D. A. Proteomics characterization of the cytotoxicity mechanism of ganoderic acid D and computer-automated estimation of the possible drug target. **Mol. Cell. Proteom.** v. 7, p. 949-961, 2008.

CAPÍTULO 3 - Avaliação *in vitro* e *in silico* da atividade anti-*Leishmania* e anti- *T. cruzi* de γ -lactonas isoladas de *Persa fulva* (Lauraceae)

Avaliação *in vitro* e *in silico* da atividade anti- *Leishmania* e anti- *T. cruzi* de γ -lactonas isoladas de *Persea fulva*

RESUMO

Doenças Tropicais Negligenciadas (DNT) são consideradas problemas de saúde pública por representarem um risco potencialmente fatal se não diagnosticadas e tratadas a tempo, por isso, novas alternativas terapêuticas para estas doenças, como a doença de Chagas (DC) e a leishmaniose, merecem destaque. Nesse sentido, este estudo tem como objetivo avaliar quatro γ -lactonas (**1-4**) anteriormente isoladas de *Persea fulva* (Lauraceae) quanto às atividades anti-*Leishmania* e anti- *T. cruzi* (*in vitro* e *in silico*). A atividade dos compostos **1-4** foi determinada *in vitro* tanto contra as formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, quanto contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum*. Todos os compostos foram ativos contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, correspondentes à fase aguda da doença de Chagas. O majoranolideo (**3**) foi o mais ativo, com CE₅₀ de $2,9 \pm 0,24 \mu\text{M}$, seguido dos compostos majorenolideo (**2**) (CE₅₀ $4,8 \pm 0,7 \mu\text{M}$), majoranolideo B (**1**) (CE₅₀ $15,8 \pm 2,3 \mu\text{M}$) e majorinolideo (**4**) (CE₅₀ $19,8 \pm 1,4 \mu\text{M}$). O composto **3** também apresentou melhor atividade contra as formas promastigotas de *L. infantum* com CE₅₀ de $36,7 \pm 0,6 \mu\text{M}$. O índice de seletividade (IS) foi estabelecido para todos os compostos e os resultados demonstram que as γ -lactonas apresentaram baixa toxicidade para células humanas e alta seletividade para os parasitos. O estudo de acoplamento molecular foi realizado para seis alvos de *T. cruzi* e quatro alvos de *Leishmania*, os valores de energia de afinidade encontrados reafirmam os estudos *in vitro* e demonstram que o majoranolideo (**3**) é o composto mais ativo para todos os alvos em análise. Diante disto, as γ -lactonas (**1-4**) isoladas de *P. fulva* apresentam um potencial para o controle de Doenças Tropicais Negligenciadas, para alvos como a doença de Chagas e a leishmaniose, a partir de ensaios *in vitro* e *in silico*.

PALAVRAS-CHAVE: Lauraceae. *Persea fulva*. γ -lactonas. Majoranolideo. Anti-*Leishmania*. Anti- *T. cruzi*.

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) e a leishmaniose são causadas por protozoários parasitários hemoflagelados pertencentes à família Trypanosomadeae, gêneros *Trypanosoma* sp. e *Leishmania* sp., respectivamente. Essas doenças são classificadas como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN). As DNT ocorrem, principalmente, em países em desenvolvimento e estão associadas a condições de pobreza. Além disso, são consideradas problemas de saúde pública por representarem um risco potencialmente fatal se não diagnosticadas e tratadas a tempo (WHO, 2018; ROMERO, LÓPEZ, 2017; TEMPONE *et al.*, 2017).

A DC possui duas fases: uma aguda, que pode ser assintomática ou incluir erupções de pele e nódulos inflamatórios, febre, dor de cabeça, gânglios linfáticos aumentados, náuseas, diarreia, vômitos e dificuldade para respirar; e uma crônica, sendo essa última potencialmente mortal por apresentar comprometimento cardíaco, digestivo ou neurológico (ROMERO, LÓPEZ, 2017; BRASIL, 2018; PAIXÃO *et al.*, 2019). Estima-se que 8 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi* e que a cada ano a doença provoque 10 mil óbitos em todo o mundo (WHO, 2019). A terapia atual é restrita e inclui apenas dois medicamentos: benznidazol e nifurtimox; esses dois fármacos são altamente tóxicos e incluem efeitos adversos como parestesias, artralgias, intolerância gastrointestinal, alopecia, dermatites, *rash* cutâneo e neutropenia (BRASIL, 2018; ALMEIDA *et al.*, 2018).

Por sua vez, a leishmaniose inclui um grupo de doenças complexas causadas por mais de 20 espécies do gênero *Leishmania* (ARAÚJO *et al.*, 2019), dois agentes etiológicos podem causar a Leishmaniose Visceral (LV), são as espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019). Segundos dados da Organização das Nações Unidas (ONU), 12 milhões de pessoas são afetadas e 500.000 novos casos de LV ocorrem anualmente em todo o mundo (WHO, 2019). Os fármacos de primeira escolha para o tratamento de LV são os antimoniais pentavalentes (SOUZA *et al.*, 2017; TEMPONE *et al.*, 2017; ARAÚJO *et al.*, 2019).

Devido à vasta abrangência epidemiológica dessas parasitoses, as alternativas terapêuticas restritas, aos efeitos adversos associados aos fármacos disponíveis e a resistência dos parasitos surge à necessidade da investigação de novos agentes terapêuticos (ROSA *et al.*, 2017). Nesse sentido, os produtos naturais são considerados fontes promissoras de novos compostos e também podem inspirar o desenvolvimento de análogos bioativos para combater essas parasitoses (ARAÚJO *et al.*, 2019). Diversas classes de metabólitos de plantas têm sido investigadas por suas atividades anti-*Leishmania* e anti- *T. cruzi*, dentre elas flavonoides,

alcaloides, terpenos e outros polifenóis (SOUZA *et al.*, 2017; VARELA *et al.*, 2017; KHADEM VATAN *et al.*, 2019; CLEMENTINO *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2013; ARAUJO *et al.*, 2019; SANDJO *et al.*, 2016).

O gênero *Persea*, pertencente à família Lauraceae, compreendendo cerca de 190 espécies, e é amplamente distribuído na Mesoamérica, América do Sul e Sudeste da Ásia. A investigação fitoquímica do gênero *Persea* revelou a presença de terpenos, flavonoides, lignanas, alcaloides, esteroides e γ -lactonas (SCORA; BERGH; HOPFINGER, 1975; GONZALEZ-COLOMA *et al.*, 2002; SEPULVEDA-BOZA; DELHVI; CASSELS, 1990; WOFFORD, 1974; TSAI *et al.*, 1998; REIS *et al.*, 2019).

Em estudos anteriores, quatro γ -lactonas (**1-4**) foram isoladas da espécie de *Persea fulva* L.E. Koop, estes compostos apresentaram atividade antiproliferativa frente a células tumorais *in vitro* e *in silico*. Neste trabalho, as γ -lactonas, majoranolideo B (**1**), majorenolideo (**2**), majoranolideo (**3**) e majorinolideo (**4**), anteriormente isoladas de *P. fulva*, foram avaliadas quanto às atividades anti-*Leishmania* e anti- *T. cruzi in vitro* e seus alvos moleculares foram investigados por estratégias *in silico*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DAS γ -LACTONAS

O isolamento dos compostos majoranolideo B **1** (t_R . 11.5 min; 146 mg, pureza >78% por CLAE-DAD), majorenolideo **2** (t_R . 10.8 min; 1900 mg, pureza > 95% por CLAE-DAD), majoranolideo **3** (t_R . 12.7 min; 223 mg, pureza >95% por CLAE-DAD) e majorinolideo **4** (35 mg, pureza >95% por CLAE-DAD) foi previamente reportado por Reis *et al.*, 2019 (ver Capítulo 2).

2.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

2.2.1 Animais

Camundongos BALB/c e *Mesocricetus auratus* (hamsters dourados) foram fornecidos pelo biotério do Instituto Adolfo Lutz, mantidos em gaiolas esterilizadas em ambiente controlado e recebendo água e comida à vontade (*ad libitum*). Todos os procedimentos utilizando os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de

Animais do Instituto Adolfo Lutz/Instituto Pasteur (CEUA-IAL – Pasteur 02/2011), de acordo com o guia “*Care and Use of Laboratory Animals*” da *National Academy of Sciences*.

2.1.2 Cultura de parasitas e células de mamíferos

2.1.2.1 *Trypanosoma cruzi*

As formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) foram mantidas em células LLC-MK2 (CCL-7, ATCC) em meio RPMI-1640, suplementado com 2% de soro fetal bovino, à temperatura de 37°C em estufa com 5% CO₂ (KESPER JR. *et al.*, 2000). Enquanto que as formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* foram obtidas através da adição de suas formas tripomastigotas à macrófagos em uma proporção de 5:1 (parasitas/macrófagos), incubadas por 4 horas.

2.1.2.2 *Leishmania (L.) infantum*

As formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD), foram cultivadas em meio M-199 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,25% de hemina, sem adição de antibióticos em estufa a 24°C.

As formas amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum* foram purificadas de baço de *Mesocricetus auratus* (hamsters dourados) por meio de centrifugação diferencial. Os animais foram previamente infectados para manutenção da cepa e o número de parasitas foi determinado pelo método de Stauber (1958) 60 a 70 dias após a infecção.

2.1.2.3 NCTC

As células NCTC (clone 929, ATCC) foram mantidas em meio RPMI-1640 sem vermelho de fenol, suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37°C em estufa umidificada com 5% de CO₂ (BETTIOL *et al.*, 2009).

2.3 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES EFETIVAS A 50% (CE₅₀) *in vitro*

Para os ensaios *in vitro* com amastigotas de *L. (L.) infantum* (= *L. chagasi*), foram adicionados macrófagos peritoneais de camundongos BALB/C a lamínulas de vidro (13 mm) em placas de 24 poços, permanecendo em estufa a 37°C por 24 horas. As formas amastigotas foram extraídas do baço e separadas por centrifugação foram adicionadas aos macrófagos na

proporção de 10:1 (amastigotas/macrófago), e incubadas com os compostos **1-4**, isolados de *P. fulva*, em diferentes concentrações (diluição seriada), a 37°C por um período de 120 horas.

Ao final do ensaio, as lâminas foram coradas por Giemsa e observadas em microscópio óptico. A CE₅₀ foi determinada através da contagem de 200 macrófagos/poço, avaliando-se o número de macrófagos infectados, utilizando-se como controle (100% infectado) macrófagos não tratados.

O efeito das substâncias isoladas frente às formas amastigotas de *T. cruzi* foi verificado utilizando macrófagos previamente infectados com cultura de tripomastigotas. As substâncias foram incubadas com os parasitas por 48 horas a 37°C em estufa umidificada com 5% CO₂. Ao final do ensaio, as placas foram fixadas com metanol, coradas com giemsa e observadas em microscópio. A carga parasitária foi definida através do número de macrófagos infectados a partir de 500 células.

Os CE₅₀ frente às formas de ambos os parasitas foram definidas seguindo o mesmo protocolo descrito para a avaliação dos potenciais antiparasitários, porém, neste momento, avaliados frente a diferentes concentrações das substâncias isoladas.

O potencial antiparasitário das substâncias isoladas frente às formas livres, (promastigotas de *Leishmania infantum* e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*) foram determinados através da porcentagem de morte dos parasitas nas mesmas concentrações utilizadas para as formas amastigotas. Os analítos, dissolvidos em metanol e diluídos em meio de cultura, até atingir a concentração pré-estabelecida, foram incubados com 1x10⁶ parasitas/poço em placas de 96 poços por 24 horas, em estufa de BOD à 24°C para os ensaios anti-*Leishmania* e em estufa de CO₂ (5%) à 37°C para os ensaios anti- *T. cruzi*.

A viabilidade, de ambos os parasitas, foi determinada através de suas atividades mitocondriais, utilizando o ensaio colorimétrico com MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) à 570 nm, após 48 horas (Tada *et al.*, 1986, Lane *et al.*, 1996).

2.4 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Com o objetivo de determinar a toxicidade das substâncias com comprovada atividade antiparasitária, foram determinados os Índices de Seletividade (I.S.) das mesmas, através da seguinte expressão:

$$IS = \frac{\text{Toxicidade (CC}_{50} \text{ em NCTC)}}{\text{CE}_{50} \text{ contra os parasitos}}$$

Foram utilizadas células NCTC clone 929, aplicadas a 6×10^4 em meio M-199 e mantidas em estufa com 5% CO₂ a 37°C. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio colorimétrico do MTT após 48 horas de incubação.

2.5 ACOPLAMENTO MOLECULAR

As estruturas químicas 2D das substâncias isoladas de *P. fulva* foram desenhadas no software Marvin Sketch 6.0.1, 2013, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>) e as coordenadas 2D foram convertidas para o formato 3D com a ajuda do SYBYL-Software X 2.0 (Tripos Associates, St. Louis, MO, EUA) (TRIPOS INTERNATIONAL, 2012). As cargas de Gasteiger-Huckel foram calculadas com o método FF12SB (GASTEIGER; MARSILI, 1980), conforme disponível no Chimera 1.10.1.

Os alvos moleculares foram obtidos do servidor Protein Data Bank (PDB) e a seleção foi baseada no menor valor de resolução ($R < 2.0 \text{ \AA}$). As estruturas 3D das proteínas selecionadas para *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* sp. estão descritas nas Tabelas 3.1 e 3.2, respectivamente. Os ligantes co-cristalizados foram utilizados para localizar o sítio ativo nos alvos moleculares, e estes foram preparados através do módulo DockPrep no software Chimera 1.10.1 (PETTERSEN *et al.*, 2004) para a remoção de moléculas de água e a adição de hidrogênios polares para otimizar as ligações de hidrogênio. Os íons importantes para o reconhecimento molecular e cofatores foram mantidos nos sistemas analisados.

O acoplamento molecular foi realizado no software DOCK 6.8 (ALLEN *et al.*, 2015). Inicialmente, a imagem negativa da superfície molecular do sítio ortostérico foi construída através da superfície molecular de acesso ao solvente do receptor gerada pelo programa acessório DMS (do inglês, Display Midas System) (FERRIN *et al.*, 1988). Um conjunto de esferas com raio de $1,4 \text{ \AA}$ foi gerado através do programa acessório SPHGEN e a seleção das esferas próximas ao ligante cristalográfico ($8,0 \text{ \AA}$) foram consideradas para o acoplamento molecular através do programa SPHERE_SELECTOR (KUNTZ *et al.*, 1982). O espaço de busca foi definido usando o ligante co-cristalizado para cada alvo molecular.

As propriedades moleculares (potencial atração e repulsão, efeitos de solvatação e contatos estéricos) para a região foram calculadas usando o software GRID na configuração padrão (SHOICHET *et al.*, 1992). O acoplamento molecular foi realizado usando a função de pontuação GridScore (MENG *et al.*, 1992). Um processo de reacoplamento foi realizado para verificar a precisão do método de encaixe em reproduzir a orientação cristalográfica dos ligantes complexados para os alvos selecionados. Os resultados foram analisados usando o

desvio médio-quadrático (RMSD) calculado no software DOCK6.8. Em seguida, os compostos (1-4) foram acoplados nos sítios ortostéricos dos alvos analisados.

Tabela 3.1. Alvos moleculares de *Trypanosoma cruzi* utilizados nos estudos de acoplamento molecular

Alvo	Ligante	GridScore (kcal.mol ⁻¹)	PDB ID	Resolução (Å)	Ref.
Hipoxantina fosforribosil transferase	Formycin B/ 2-(N-Morpholino)-Ethanesulfonic Acid	-32.64	1TC1	1.41	FOCIA <i>et al.</i> , 1998
14 α -desmetilase (CYP 51) de <i>Trypanosoma cruzi</i>	Nalpha-(2-fluoro-4-{4-[4-(trifluoromethyl)phenyl]piperazin-1-yl}benzoyl)-N-pyridin-4-yl-D-tryptophanamide	-67.34	4C27	1.95	VIEIRA <i>et al.</i> , 2014
<i>Trypanosoma cruzi</i> dihidroorotate dehydrogenase	Oxonic Acid/Flavin Mononucleotide	-77.92	2E6F	1.26	INAOKA <i>et al.</i> , 2008
Farnesil Difosfato Sintase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	Risedronate	-168.65	1YHL	1.95	GABELLI <i>et al.</i> , 2005
Diidrofolato Redutase-Timidilato Sintase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	(6S)-5,6,7,8-Tetrahydrofolate	-78.62	5T7O	1.80	PISA <i>et al.</i> (não publicado)
Cruzaina	(3S)-3-(4-((1S)-1,2-Dimethyl-1-[(quinolin-6-ylmethyl)amino]propyl)-1H-1,2,3-Triazol-1-yl)Heptan-2-one	-55.67	3IUT	1.2	BRAK <i>et al.</i> , 2010

Tabela 3.2. Alvos moleculares para *Leishmania spp.* utilizados nos estudos de acoplamento molecular

Alvo	Ligante	GridScore (kcal.mol ⁻¹)	PDB ID	Resolução (Å)	Ref.
Pteridina Redutase 1 de <i>L. major</i> (PTR1)	(2~{R})-2-[3,4-bis(oxidanyl)phenyl]-6-Oxidanyl-2,3-Dihydrochromen-4-one	-38.73	5L42	2.10	PISA <i>et al.</i> , 2017
Triose-fosfato isomerase de <i>L. mexicana</i> mutante E65Q	Phosphoglycolohydroxamic Acid	-49.35	2VXN	0.82	ALAHUHTA, WIERENGA, 2010
<i>N</i> -Miristoiltransferase de <i>L. major</i>	5-chloranyl-N-[2-(3-methoxyphenyl)ethanimidoyl]-2-piperidin-4-yloxy-benzamide	-66.68	5A27	1.37	BRANNIGAN <i>et al.</i> , 2010
Farnesil difosfato sintase de <i>L. major</i>	3-butyl-1-(2,2-diphosphonoethyl)pyridinium	-165.46	4JZX	1.80	ARIPIRALA <i>et al.</i> , 2014

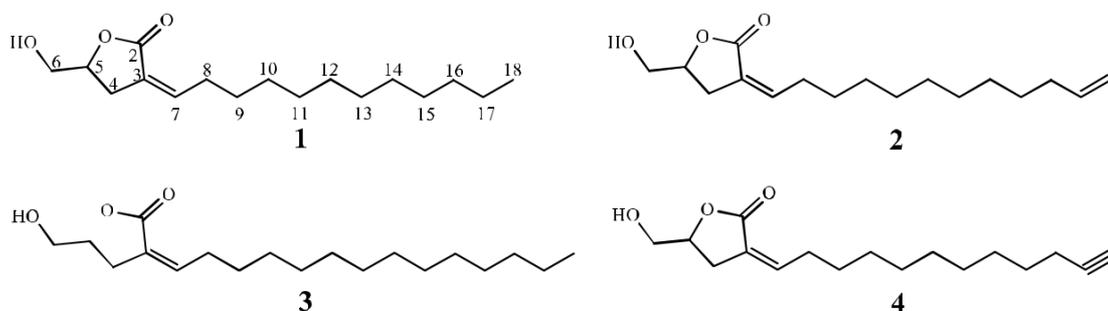
As análises das interações intermoleculares para a molécula mais bem pontuada para cada alvo foi realizada no software Protein-Ligand Interaction Profiler (SALENTIN *et al.*, 2015) e os mapas de interação foram projetados no PyMOL v2.4.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

A atividade antiprotozoaria dos compostos **1-4** (Figura 3.1) foi determinada *in vitro* tanto contra as formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, quanto contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum*. A atividade citotóxica foi avaliada frente a linhagem celular NCTC clone 929. Os resultados para determinação da atividade antiparasitária, atividade citotóxica e índice de seletividade foram descritos na Tabela 3.3.

Figura 3. 1. γ -Lactonas (**1-4**) isoladas de *P. fulva* majoranolideo B (**1**), majorenolideo (**2**), majoranolideo (**3**) e majorinolideo (**4**)



Todos os compostos foram ativos contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, correspondentes à fase aguda da doença de Chagas. O composto **3** foi o mais ativo, com CE_{50} de $2,9 \pm 0,24 \mu\text{M}$, seguido dos compostos **2** (CE_{50} $4,8 \pm 0,7 \mu\text{M}$), **1** (CE_{50} $15,8 \pm 2,3 \mu\text{M}$) e **4** (CE_{50} $19,8 \pm 1,4 \mu\text{M}$). Nenhum dos compostos apresentou atividade contra as formas intracelulares amastigotas de *T. cruzi*, estes resultados indicam que os compostos podem apresentar alta atividade contra a fase aguda da doença em detrimento a fase crônica.

O benzonidazol (Bz) é o medicamento mais comumente usado contra o *T. cruzi* no Brasil devido a seus efeitos biológicos e desempenho biofarmacêutico aceitável (CARNEIRO *et al.*, 2019). O Bz foi utilizado no ensaio como controle positivo para as formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*. Os compostos **2** (CE_{50} $4,8 \pm 0,7 \mu\text{M}$) e **3** (CE_{50} de $2,9 \pm 0,24 \mu\text{M}$) foram mais ativos do que o padrão Benzonidazol ($5,5 \pm 2,2 \mu\text{M}$) para as formas tripomastigotas de *T. cruzi*. As γ -lactonas não mostraram atividade contra as formas amastigotas de *T. cruzi*, enquanto o padrão apresentou CE_{50} de $18,7 \pm 4,1 \mu\text{M}$.

O composto **3** apresentou maior atividade contra as formas promastigotas de *L. infantum* com CE_{50} de $36,7 \pm 0,6 \mu\text{M}$. O composto **2** (CE_{50} $80,8 \pm 9,2 \mu\text{M}$) juntamente com os compostos **1** e **4** ($CE_{50} > 100 \mu\text{M}$) apresentaram menor potência. Nenhuma das γ -lactonas

mostrou atividade contra as formas amastigotas de *L. infantum*. O padrão positivo utilizado neste ensaio foi a miltefosina, a único fármaco oral usado no tratamento da leishmaniose (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2019), este composto apresentou CE₅₀ de 16,7 ± 3,5 µM para as formas promastigotas e 17,8 ± 1,4 µM para as formas amastigotas de *L. infantum*.

Todos os compostos apresentaram baixa citotoxicidade frente a linhagem de células normais NCTC. Os compostos **1** e **3** apresentaram concentração citotóxica para 50% (CC₅₀) das células superiores a 200 µM, enquanto que os compostos **2** e **4** apresentaram CC₅₀ de 85,3 ± 2,1 µM e 140,9 ± 41,8 µM, respectivamente.

Tabela 3.3. Atividade antiparasitária dos compostos 1-4 contra as formas tripomastigotas/amastigotas de *T. cruzi* e as formas promastigotas/amastigotas de *L. infantum*

Compostos	CE ₅₀ µM (95% CI)				CC ₅₀ µM (95% CI) Células NCTC ^a	IS ^b			
	TCT	TCA	LIP	LIA		TCT	TCA	LIP	LIA
1	15,8 ± 2,3	NA	>100	NA	>200	12,7	ND	ND	ND
2	4,8 ± 0,7	NA	80,8 ± 9,2	NA	85,3 ± 2,1	17,7	ND	1,05	ND
3	2,9 ± 0,24	NA	36,7 ± 0,6	NA	>200	68,9	ND	5,44	ND
4	19,8 ± 1,4	NA	>100	NA	140,9 ± 41,8	7,11	ND	ND	ND
Benzonidazol	5,5 ± 2,2	18,7 ± 4,1	ND	ND	>200	36,3	10,7	ND	ND
Miltefosina	ND	ND	16,7 ± 3,5	17,8 ± 1,4	>200	ND	ND	12,00	11,2

CE₅₀: Concentração Efetiva 50%

NA: Não Ativo

ND: Não Determinado

^aCC₅₀: Concentração Citotóxica 50%

^bÍndice de Seletividade Calculado de CC₅₀/CE₅₀ (TTC: *T. cruzi* tripomastigotes, TCA: *T. cruzi* amastigotes, LIP: *L. (L.) infantum* promastigotes, LIA: *L. (L.) infantum* amastigotes)

O índice de seletividade (IS) foi estabelecido para todos os compostos. O composto **3** apresentou maior IS (68,9), seguido dos compostos **2** (17,7), **1** (12,7) e **4** (7,11) para as formas tripomastigotas de *T. cruzi*. O IS calculado para o BZ foi de 36,3 para as formas tripomastigotas e 10,7 para as formas amastigotas. Estudos apontam que os potenciais agentes anti-*T. cruzi* devem atender a certos critérios: a) CE₅₀ < 10 µM e IS > 10 (DON; IOSET, 2014); b) CE₅₀ < 5 µM, SI > 10 (CHATELAIN, 2014); c) SI > 50 (NWAKA *et al.*, 2011). Os compostos **2** e **3** atendem aos critérios de CE₅₀ < 5 µM, todas as γ-lactonas apresentaram IS superior a 10 (exceto a **4**), destacando-se o composto **3** com IS > 50, o IS desse composto é superior ao do padrão BZ. Os valores dos índices de seletividade demonstram que os compostos apresentaram baixa toxicidade para células humanas e alta seletividade para as formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

Para as formas promastigotas de *L. infantum* o IS foi de 5,44 para o composto **3** e 1,05 para o composto **2**. A miltefosina apresentou IS de 12,00, para as formas promastigotas, e de

11,2 para as formas amastigotas de *L. infantum*, estes dados sugere que as γ -lactonas são menos seletivas do que a droga padrão de escolha.

Os compostos majorenolideo (**2**), majoranolideo (**3**) e majorinolideo (**4**) foram isolados pela primeira vez do extrato EtOH das cascas de *Persea major* e foram todos ativos em bioensaios de citotoxicidade contra células tumorais humanas (carcinoma de pulmão- A-549, carcinoma de mama- MCF-7, adenocarcinoma de cólon- HT-29) (MA *et al.*, 1989; MA *et al.*, 1990). Reis *et al.*, 2019 descreveram o isolamento, a partir das folhas de *Persea fulva*, de uma nova γ -lactona, o majoranolideo B (**1**), que apresentou juntamente com as γ -lactonas já conhecidas promissora atividade antitumoral contra células C6 de glioma de rato, sendo todas isoladas de *Persea fulva*.

Não existem, até o momento, relatos de atividade antiparasitária para as γ -lactonas (**1-4**) aqui descritas. Os butenolideos isolinderanolideo D, isolinderanolideo E e secosubamolideo A, com estrutura quimicamente semelhante γ -lactonas (**1-4**), foram isolados de *Nectandra oppositifolia* (Lauraceae) e apresentaram atividade contra *T. cruzi* com CE₅₀ de 12,9, 29,9 e 12,5 μ M para as formas tripomastigotas e CE₅₀ de 25,3, 10,1 e 12,3 μ M para as formas amastigotas intracelulares (CONSERVA *et al.*, 2019). Estes dados corroboram com os dados aqui descritos para as γ -lactonas isoladas de *P. fulva*.

3.2 ACOPLAMENTO MOLECULAR

Diante dos resultados para as atividades *in vitro* foram realizados estudos de acoplamento molecular com proteínas importantes para a *Leishmania sp.* e de *T. cruzi* a fim de estimar a afinidade desses compostos, o potencial padrão de reconhecimento molecular e assim obter informações sobre o possível mecanismo de ação das γ -lactonas isoladas de *P. fulva*.

A triagem de potenciais alvos foi explorada através da base de dados TDR Targets (<http://tdrtargets.org>), a fim de selecionar de acordo com critérios de essencialidade, validação e ligantes alvos terapêuticos para *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*. Esse banco de dados é considerado como um recurso *on-line* valioso para facilitar a rápida identificação e priorização de alvos moleculares para o desenvolvimento de fármacos, com foco em patógenos responsáveis por doenças humanas negligenciadas (BELLERA *et al.*, 2015).

Os resultados permitiram definir seis alvos para *T. cruzi*, sendo eles: Hipoxantina fosforribosil transferase (PDB 1TC1), 14 α -desmetilase (CYP 51/PDB 4C27), Dihidroorotato desidrogenase (PDB 2E6F), Farnesil Difosfato Sintase (PDB 1YHL), Diidrofolato Redutase-

Timidilato Sintase (PDB 5T7O) e a Cruzaina (PDB 3IUT) (Tabela 3.1), e quatro alvos para *Leishmania* são eles: Pteridina Redutase 1 de *L. major* (PTR1) (PDB 5L42), Triose-fosfato isomerase de *L. mexicana* mutante E65Q (PDB 2VXN), *N*-Miristoiltransferase de *L. major* (PDB 5A27) e Farnesil difosfato sintase de *L. major* (PDB 4JZX) (Tabela 3.2).

O reacoplamento permitiu a verificação da eficiência e a reprodutibilidade do protocolo de acoplamento molecular, através do cálculo do RMSD entre a pose do ligante cristalográfico e a obtida após o acoplamento molecular. Assim, resultados de RMSD ≤ 2 Å foram considerados aceitáveis na avaliação do método de acoplamento (Brozell *et al.*, 2012). Os valores de RMSD encontrados foram descritos na Tabela 3.4. Os resultados indicam que o software DOCK 6.8 foi capaz de se aproximar da estrutura experimentalmente determinada.

Tabela 3.4. Valores de RMSD para cada alvo

Código PDB	<i>T. cruzi</i>						<i>Leishmania</i>			
	1TC1	4C27	2E6F	1YHL	5T7O	3IUT	5L42	2VXN	5A27	4JZX
Valores de RMSD (Å)	0,79	1,09	1,12	0,77	1,40	1,01	0,47	1,50	0,70	0,73

O majoranolideo (**3**) mostrou uma maior afinidade de ligação em comparação às outras γ -lactonas (**1**, **2** e **4**) para todos os alvos de *T. cruzi* (Tabela 3.5). Considerando os alvos para *T. cruzi*, no acoplamento molecular para a enzima Hipoxantina fosforribosil transferase de *T. cruzi* (PDB ID 1TC1) todas as γ -lactonas testadas apresentaram melhor energia de afinidade com o alvo quando comparadas ao ligante cristalográfico.

Tabela 3.5. Energias de afinidade encontradas para os compostos isolados frente a cada alvo molecular de *T. cruzi*

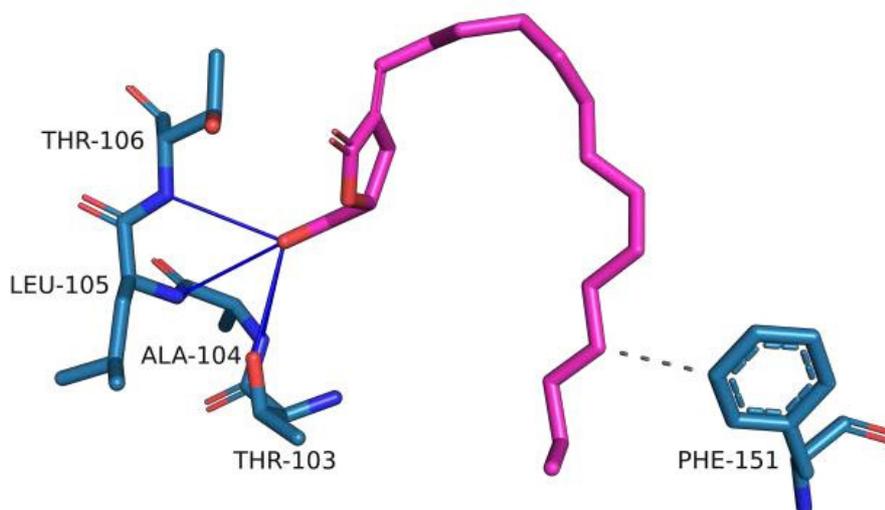
Compostos	Alvos <i>T. cruzi</i> (GridScore - kcal.mol ⁻¹)					
	1TC1	4C27	2E6F	1YHL	5T7O	3IUT
Majoranolideo B (1)	-41.62	-49.48	-49.90	-58.49	-45.01	-39.34
Majorenolideo (2)	-41.16	-47.56	-47.22	-57.83	-44.71	-39.49
Majoranolideo (3)	-44.62	-53.68	-55.02	-64.25	-46.29	-45.32
Majorinolideo (4)	-40.88	-48.85	-49.48	-57.76	-44.99	-39.28
Ligante	-32.64	-67.34	-77.92	-168.65	-78.62	-55.67

A Hipoxantina fosforribosil transferase de *T. cruzi* (PDB 1TC1) faz parte do metabolismo de nucleotídeos purínicos, e é essencial para a síntese de ácidos nucléicos, proteínas e outros metabólitos e, por isso, a inibição do metabolismo de purinas, através da inibição dessa enzima, constitui um alvo potencial para o desenho racional de antiparasitários

(BUTTERWORTH *et al.*, 2004; WENCK *et al.*, 2004). Na análise da representação das interações intermoleculares, a hidroxila adjacente ao anel lactônico do composto **3** estabeleceu ligações de hidrogênio com o resíduo *N*-terminal dos aminoácidos Thr106, Leu105 e Ala104 e oxigênio do resíduo *C*-terminal de Thr103. A cadeia lateral do majoranolideo formou interações hidrofóbicas com o anel aromático do aminoácido Phe151 (Figura 3.2).

Focia e colaboradores (1998) descreveram que as principais interações entre os ligantes e o sítio ativo da enzima Hipoxantina fosforribosil transferase de *Trypanosoma cruzi* são ligações de hidrogênio e, estes resultados corroboram com as análises *in vitro* realizadas neste estudo e demonstram que as γ -lactonas isoladas de *P. fulva* são bons candidatos a agentes anti- *T. cruzi* com ação frente à enzima Hipoxantina fosforribosil transferase.

Figura 3.2. Resultados do acoplamento molecular para ITC1. Os carbonos são representados em azul claro (enzima) e magenta (ligante), nitrogênios em azul escuro e oxigênios em vermelho. Linhas azuis: ligação de hidrogênio; Linha tracejada cinza: interação hidrofóbica.



Para todos os alvos de *Leishmania* o composto majoranolideo (**3**) mostrou uma maior afinidade de ligação em comparação às outras γ -lactonas (**1**, **2** e **4**), com exceção do alvo Farnesil difosfato sintase de *L. major* (PDB 4JZX), cujo composto com melhor afinidade de ligação foi o majorinolideo (**4**) (Tabela 3.6). Comparando-se a energia de afinidade das γ -lactonas testadas com os ligantes cristalográficos dos alvos para *Leishmania*, apenas no acoplamento molecular para a enzima Pteridina Redutase 1 (PDB ID 5L42) todas as γ -lactonas testadas apresentaram melhor energia de afinidade com o alvo quando comparadas ao ligante cristalográfico.

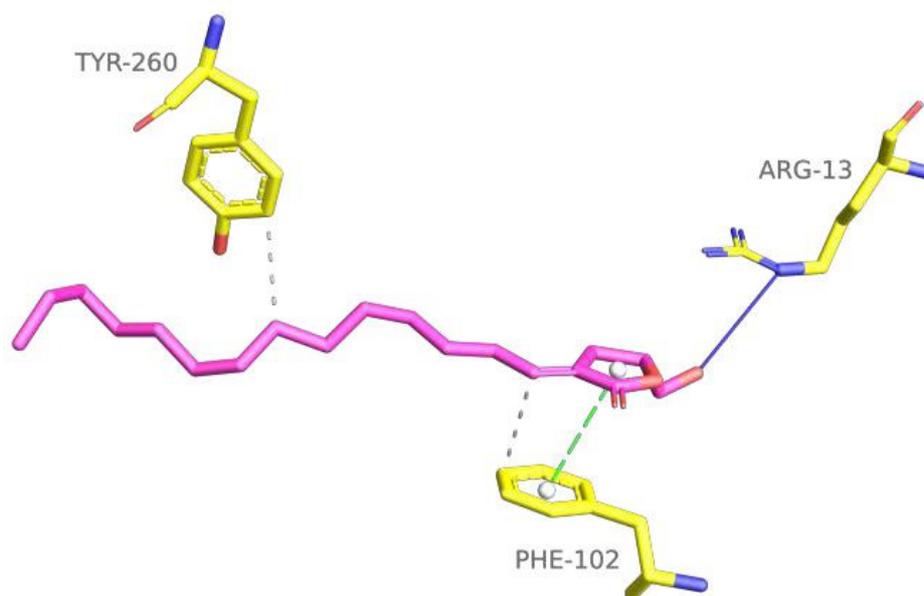
Tabela 3.6. Energia de afinidades encontradas para os compostos isolados frente a cada alvo molecular de *Leishmania*

Compostos	Alvos <i>Leishmania</i> (GridScore - kcal.mol ⁻¹)			
	5L42	2VXN	5A27	4JZX
Majoranolideo B (1)	-45.27	-39.67	-49.33	-39.48
Majorenolideo (2)	-43.83	-40.96	-48.00	-41.26
Majoranolideo (3)	-49.34	-42.96	-54.60	-16.17
Majorinolideo (4)	-43.83	-39.47	-47.32	-43.64
Ligante	-38.73	-49.35	-66.68	-165.46

A enzima Pteridina Redutase 1 tem sido considerada um promissor alvo para doenças pararitárias, como a *Leishmania*, visto que essa enzima possibilita um caminho molecular alternativo para o metabolismo da pteridina/folato, principalmente quando a enzima dihidrofolato redutase está inibida (LEITE *et al.*, 2017; PISA *et al.*, 2017). As interações estabelecidas com o ligante cristalográfico para o alvo de código PDB 5L42 foram hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e do tipo π -stacking (PISA *et al.*, 2017). Para o majoranolideo, a natureza dessas interações foi mantida, de modo que as interações hidrofóbicas ocorrem entre a cadeia lateral da γ -lactona e os resíduos de aminoácidos Tyr260 e Phe102, uma ligação de hidrogênio foi estabelecida entre a hidroxila adjacente ao anel lactônico e a cadeia lateral do resíduo de Arg13 e uma interação do tipo π -stacking formou-se entre o anel aromático da cadeia lateral do resíduo de Phe102 e o anel da γ -lactona (Figura 3.3).

Estes resultados corroboram com os estudos *in vitro* realizados e demonstram que as γ -lactonas isoladas de *P. fulva* são candidatos a agentes anti-*Leishmania*, com ação frente à enzima Pteridina Redutase 1.

Figura 3. 3. Resultados do acoplamento molecular para 5L42. Os carbonos são representados em amarelo (enzima) e magenta (ligante), nitrogênios em azul escuro e oxigênios em vermelho. Ligação de hidrogênio: linha azul; interação hidrofóbica: linha tracejada cinza; interação π -stacking: linha tracejada verde.



4. CONCLUSÃO

As quatro γ -lactonas previamente isoladas de *P. fulva* foram rastreadas quanto ao seu potencial anti- *Leishmania* e anti- *T. cruzi*. Entre todos os compostos avaliados frente as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, o composto **3** (CE_{50} $2,9 \pm 0,24 \mu\text{M}$) foi o mais ativo, sendo que nenhum dos compostos (**1-4**) apresentou atividade contra as formas intracelulares amastigotas de *T. cruzi*. Para as formas promastigotas de *L. infantum* o composto **3** (CE_{50} $36,7 \pm 0,6 \mu\text{M}$) foi o mais ativo. O índice de seletividade (IS) foi estabelecido para todos os compostos e os valores demonstram que os compostos apresentaram baixa toxicidade para células humanas e alta seletividade para os parasitos. Através do estudo de acoplamento molecular o majoranolideo (**3**) foi confirmado como composto mais ativo, através de suas interações com o sítio ativo de alvos para *T. cruzi* e *Leishmania*. Assim, a partir dos resultados alcançados tanto *in vitro*, quanto *in silico* para os compostos isolados de *P. fulva*, pode concluir-se que as γ -lactonas (**1-4**) isoladas de *P. fulva* apresentam potencial para o controle de Doenças Tropicais Negligenciadas, como a doença de Chagas e a leishmaniose.

REFERÊNCIAS

- ALAHUHTA, M.; WIERENGA, R.K. Atomic Resolution Crystallography of a Complex of Triosephosphate Isomerase with a Reaction-Intermediate Analog: New Insight in the Proton Transfer Reaction Mechanism. **Proteins**, v. 78, p. 1878-1888, 2010.
- ALLEN, W.J. *et al.* DOCK 6: Impact of new features and current docking performance. **Journal of Computational Chemistry**, v. 36, p. 1132-1156, 2015.
- ARAÚJO, I. A. C. *et al.* Efficacy of lapachol on treatment of cutaneous and visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 199, p. 67-73, abr. 2019.
- ARIPIRALA, S. *et al.* Structural and thermodynamic basis of the inhibition of Leishmania major farnesyl diphosphate synthase by nitrogen-containing bisphosphonates. **Acta Crystallographica Section D**, v. 70, p. 802-810, 2010.
- BELLERA, C.L. *et al.* High-throughput drug repositioning for the discovery of new treatments for Chagas disease. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 182-193, 2015.
- BETTIOL, E. *et al.* Identification of Three Classes of Heteroaromatic Compounds with Activity against Intracellular Trypanosoma cruzi by Chemical Library Screening. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 2, p. e384, 2009.
- BRAK, K. *et al.* Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for chagas disease chemotherapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 1763-1773, 2010.
- BROZELL, S.R. *et al.* Evaluation of DOCK 6 as a pose generation and database enrichment tool. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, p. 749-773, 2012.
- BUTTERWORTH, A.C. *et al.* Saturation mutagenesis, complement selection, and steady-state kinetic studies illuminate the roles of invariant residues in active site loop I of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase from Trypanosoma cruzi. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1699, p. 87-94, 2004.
- CARNEIRO, A.C.A. *et al.* Combination therapy with benznidazole and doxycycline shows no additive effect to monotherapy with benznidazole in mice infected with the VL-10 strain of the Trypanosoma cruzi. **International Journal of Cardiology**, jul. 2019.
- CASTELO-BRANCO, P.V. Ascorbic acid reduces the genetic damage caused by miltefosine (hexadecylphosphocholine) in animals infected by Leishmania (Leishmania) infantum without decreasing its antileishmanial activity. **International Journal for Parasitology-Drugs and Drug Resistance**, v. 9, p. 8-15, 2019.
- CHATELAIN, E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. **Journal of Biomolecular Screening**, v.20, p. 22-35, jan. 2015.
- CLEMENTINO, L. DA C. *et al.* In vitro activities of glycoalkaloids from the Solanum lycocarpum against Leishmania infantum. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 6, p. 673-677, nov. 2018.
- CUNHA ALMEIDA, T. *et al.* Synthesis, in vitro and in vivo anti-Trypanosoma cruzi and toxicological activities of nitroaromatic Schiff bases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.

108, p. 1703–1711, dez. 2018.

DA ROSA, R. *et al.* Design and synthesis of a new series of 3,5-disubstituted isoxazoles active against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 128, p. 25–35, mar. 2017.

DE SOUZA, C. E. S. *et al.* Anti- *Trypanosoma* , anti- *Leishmania* and cytotoxic activities of natural products from *Psidium brownianum* Mart. ex DC. and *Psidium guajava* var. *Pomifera* analysed by LC–MS. **Acta Tropica**, v. 176, p. 380–384, dez. 2017.

DI PISA, F. *et al.* Chroman-4-One Derivatives Targeting Pteridine Reductase 1 and Showing Anti-Parasitic Activity. **Molecules**, v. 22, n. 3, 426-442, 2017.

DON, R.; IOSET, J.R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**, v. 141, p. 140-146, jan, 2014.

FERRIN, T.E. *et al.* The Midas display system. **Journal of Molecular Graphics**, v. 6, p. 13-27, 1988.

FOCIA, P.J. *et al.* A 1.4 Å crystal structure for the hypoxanthine phosphoribosyltransferase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemistry**, v. 37, p. 15066-15075, 1998.

GABELLI, S.B. *et al.* Structure and mechanism of the farnesyl diphosphate synthase from *Trypanosoma cruzi*: Implications for drug design. **Proteins**, v. 62, p. 80-88, 2005.

GARCÍA-HUERTAS, P. *et al.* Activity in vitro and in vivo against *Trypanosoma cruzi* of a furofuran lignan isolated from *Piper jericense*. **Experimental Parasitology**, v. 189, p. 34-42, 2018.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity – a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, p. 3219-3228, 1980.

GONZÁLEZ-COLOMA, A. *et al.* Natural insecticides: Structure diversity, effects and structure-activity relationships. A case study. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2002. v. 26, p. 849–879.

HARTMANN, A.P. *et al.* Synthesis and 2D-QSAR studies of neolignan-based diaryl-tetrahydrofuran and -furan analogues with remarkable activity against *Trypanosoma cruzi* and assessment of the trypanothione reductase activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 140, p. 187-199, 2017.

INAOKA, D.K. *et al.* Structures of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase complexed with substrates and products: atomic resolution insights into mechanisms of dihydroorotate oxidation and fumarate reduction. **Biochemistry**, v. 47, p. 10881-10891, 2008.

KESPER JR., N.; ALMEIDA, K.A.; STOLF, A.M.; UMEZAWA, E.S. Immunoblot analysis of trypomastigote excreted-secreted antigens as a tool for the characterization of *Trypanosoma cruzi* strains and isolates. **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 862-867, 2000.

KHADEM VATAN, S. *et al.* In silico and in vitro comparative activity of green tea components against *Leishmania infantum*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 18, p. 187–194, set. 2019.

- KUNTZ, I.D. *et al.* A geometric approach to macromolecule–ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 161, p. 269-288, 1982.
- LANE, J.E.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; SUAREZ, C.C.; BOGITSH, B.J.; JONES, M.M.; SINGH, P.K.; CARTER, C.E. In vitro trypanocidal activity of tetraethylthiuram disulfide and sodium diethylamine-N-carbodithioate on *Trypanosoma cruzi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 3, p. 263–266, 1996.
- LEITE, F.H. A. An integrated approach towards the discovery of novel non-nucleoside *Leishmania major* pteridine reductase 1 inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 132, p. 322-332, 2017.
- MENG, E.C.; SHOICHET, B.K.; KUNTZ, I.D. Automated docking with grid-based energy evaluation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, p. 505-524, 1992.
- NWAKA, S. *et al.* D. Integrated dataset of screening hits against multiple neglected disease pathogens. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, p. e1412, 2011.
- PAIXÃO, D. A. *et al.* In vitro anti-*Trypanosoma cruzi* activity of ternary copper(II) complexes and in vivo evaluation of the most promising complex. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 157–166, jan. 2019.
- PETTERSEN, E.F. *et al.* UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, p. 1605-1612, 2004.
- PINTO, E. G. *et al.* Antimicrobial peptides isolated from *Phyllomedusa nordestina* (Amphibia) alter the permeability of plasma membrane of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 4, p. 655–660, dez. 2013.
- RACKHAM, M.D. *et al.* Discovery of High Affinity Inhibitors of *Leishmania Donovanii* N-Myristoyltransferase. **Medchemcomm**, v. 6, p. 1761-1766, 2015.
- REIS, I.M.A. *et al.* Alkene lactones from *Persea fulva* (Lauraceae): Evaluation of their effects on tumor cell growth in vitro and molecular docking studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 86, p. 665-673, maio. 2019.
- ROMERO, A. H.; LÓPEZ, S. E. In silico molecular docking studies of new potential 4-phthalazinyl-hydrazones on selected *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* enzyme targets. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 76, p. 313–329, set. 2017.
- ROSA R. *et al.* Design and synthesis of a new series of 3,5-disubstituted isoxazoles active against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonenses*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 128, p. 25-35, 2017.
- SALENTIN, S. *et al.* PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. W443-W447, 2015.
- SANDJO, L. P. *et al.* Individual and combined antiparasitic effect of six plant metabolites against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 7, p. 1772–1775, abr. 2016.
- SCORA, R. W.; BERGH, B. O.; HOPFINGER, J. A. Leaf alkanes in *Persea* and related taxa. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 3, n. 4, p. 215–218, dez. 1975.

SEPULVEDA-BOZA, S.; DELHVI, S.; CASSELS, B. K. An aryltetralin lignan from *Persea lingue*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2357–2358, jan. 1990.

SHOICHET, B.K *et al.* Molecular docking using shape descriptors. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, p. 380-397, 1992.

STAUBER, L.A. Host resistance to the Kharthoum strain of *Leishmania donovani*. **Rice Institute Pamphlet**, v. 45, p.80-96, 1956.

TADA, H.; SHIHO, O.; KUROSHIMA, K.; KOYAMA, M.; TSUKAMOTO, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **Journal of Immunological Methods**, v. 93, p. 157-165, 1986.

TEMPONE, A. G. *et al.* Efficacy of a series of alpha-pyrone derivatives against *Leishmania (L.) infantum* and *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 139, p. 947–960, out. 2017.

TSAI, I.-L.; HSIEH, C.-F.; DUH, C.-Y. Additional cytotoxic neolignans from *Persea obovatifolia*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 8, p. 1371–1375, ago. 1998.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309–322, jun. 2012.

VARELA, M. T. *et al.* New alkenyl derivative from *Piper malacophyllum* and analogues: Antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 90, n. 5, p. 1007–1011, nov. 2017.

VIEIRA, D.F. *et al.* Binding Mode and Potency of N-Indolyl-Oxopyridinyl-4-Amino-Propanyl-Based Inhibitors Targeting *Trypanosoma Cruzi* Cyp51. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 23, p. 10162–10175, 2014.

WENCK, M. A. *et al.* Steady-state kinetics of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase from *Trypanosoma cruzi*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1700, p. 11-18, 2004.

WOFFORD, B. E. The systematic significance of flavonoids in *Persea* of the Southeastern United States. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 2, n. 2, p. 89–91, ago. 1974.

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

CONSERVA, G. A. A. *et al.* Butenolides from *Nectandra oppositifolia* (Lauraceae) displayed anti-*Trypanosoma cruzi* activity via deregulation of mitochondria. **Phytomedicine**, v. 54, p. 302-307, 2019.

**CAPÍTULO 4- Atividade anti-*T. cruzi* e anti-*Leishmania in vitro e in silico* do
Metilpiperitol, uma lignana, isolada de *Persa fulva* (Lauraceae)**

Atividade anti-*T. cruzi* e anti-*Leishmania* in vitro e in silico do Metilpiperitol, uma lignana, isolada de *Persea fulva* (lauraceae)

RESUMO

A Doença de Chagas e a leishmaniose visceral são consideradas Doenças Tropicais Negligenciadas e merecem destaque por atingirem bilhões de pessoas em 149 países pelo mundo. Os medicamentos disponíveis para tratamento dessas doenças são escassos e possuem diversos efeitos adversos conhecidos, por isso a necessidade de novos medicamentos, principalmente os que atuem na fase crônica destas doenças. Nesse sentido, as lignanas têm sido descritas como uma classe de metabolitos secundários com diversas atividades biológicas. O objetivo deste estudo foi isolar a lignana, metilpiperitol (**1**) de *Persea fulva* L.E. Koop e avaliar este composto quanto às atividades anti-*Leishmania* e anti- *T. cruzi* (*in vitro* e *in silico*). O composto foi isolado e identificado por técnicas espectroscópicas e a atividade foi determinada *in vitro* tanto contra as formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, quanto contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum*. O composto **1** foi ativo contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi* (CE₅₀ de 4,5 ± 1,1 µM) e as formas intracelulares amastigotas de *L. infantum* (CE₅₀ de 4,1 ± 0,5 µM). O índice de seletividade (IS) foi estabelecido e demonstrou que a lignana apresentou alta seletividade para os parasitos. O estudo de acoplamento molecular foi realizado para seis alvos de *T. cruzi* e quatro alvos de *Leishmania*, os valores de energia de afinidade encontrados reafirmam os estudos *in vitro* e estabelecem um possível mecanismo de ação via Hipoxantina fosforribosil transferase, para ação anti-*T. cruzi* e Pteridina Redutase 1, para ação anti-*Leishmania*. Assim, a partir dos resultados alcançados tanto *in vitro*, quanto *in silico* o metilpiperitol apresentou um potencial de ação contra a fase aguda da doença de Chagas e a fase crônica da leishmaniose.

PALAVRAS-CHAVE: Lauraceae. *Persea fulva*. Lignanas. Metilpiperitol. Anti- *T. cruzi*. Anti-*Leishmania*

1. INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) merecem destaque por corresponderem a um conjunto de 17 patologias causadas por agentes infecciosos ou parasitas que se desenvolvem principalmente nos trópicos (MACHADO *et al.*, 2018). Dentre as DTN a Doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, e a leishmaniose visceral, cujo agente etiológico é *Leishmania infatum*, merecem destaque por atingirem bilhões de pessoas em 149 países pelo mundo (REIGADA *et al.*, 2019; TEMPONE *et al.*, 2017; FANDZLOCH *et al.*, 2017).

Os medicamentos utilizados no tratamento dessas doenças são escassos e possuem diversos efeitos adversos conhecidos, por isso o interesse a busca por novos agentes candidatos a novos fármacos para as DTN (YALUFF; VEGA; ALVARENGA, 2017). Esta busca por novos ativos desperta o interesse nos metabolitos secundários obtidos a partir de espécies vegetais, que devido as diversidades estruturais são considerados uma vasta fonte de novos compostos na busca por novas alternativas terapêuticas.

As lignanas são uma classe de metabolitos secundários bem distribuídos nas espécies vegetais, e apresentam diversas propriedades farmacológicas e um grande número de possibilidades estruturais (LI *et al.*, 2018). A família Lauraceae é uma rica fonte de lignanas e neolignanas, principalmente em gêneros como *Ocotea* (LÓPEZ, VALERA, TRUJILLO, 1995; DAVID, YOSHIDA, GOTTLIEB, 1994; MONTE-NETO *et al.*, 2011), *Persea* (SHIMOMURA, SASHIDA, OOHARA, 1987; YU *et al.*, 2000, MA *et al.*, 2004) e *Nectandra* (MORO *et al.*, 1987; MACÍAS-VILLAMIZAR *et al.*, 2014; MACÍAS-VILLAMIZAR *et al.*, 2016; SOUSA *et al.*, 2017; GRECCO *et al.*, 2019).

As lignanas e neolignanas presentes em espécies de Lauraceae apresentam diversas atividades biológicas tais como atividade anti-HIV *in vitro* (LI *et al.*, 2011), antioxidante (YU *et al.*, 2000; HOANG *et al.*, 2002), anti-inflamatória (COYBARRERA; CUCASUAREZ, 2011; CHOI *et al.*, 2014) e citotóxica (TSAI *et al.*, 1996; TSAI *et al.*, 1998; TSAI *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2004). Em continuação aos nossos estudos com *Persea fulva* L.E. Koop, neste trabalho a lignana, metilpiperitol (**1**), foi isolada e avaliada quanto às atividades anti-*Leishmania* e anti- *T. cruzi* (*in vitro* e *in silico*).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Os solventes etanol P.A., metanol P.A., acetato de etila P.A., butanol P.A., hexano P.A. foram adquiridos da VETEC e o metanol grau HPLC foi adquirido da Sigma Aldrich[®]. Para colunas cromatográficas (CC) foram utilizados sílica gel 60 (70-230 mesh, VETEC), sílica tipo flash (35-75 μm , Fluka[®] Analytical) e as análises cromatográficas em cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatofolhas de alumínio (Merck).

As separações por cromatografia em coluna aberta foram realizadas em gel de sílica 60 (70-230 mesh, VETEC) e sílica flash (35-75 μm , Fluka[®] Analytical). As análises comparativas, para determinar a composição de cada fração, foram feitas em CCD, utilizando cromatofolha de gel de sílica 60 F254, que foram reveladas através da irradiação de luz na região do ultravioleta em comprimento de onda 254 e 365 nm e/ou com reveladores cromogênicos: $-\text{H}_2\text{SO}_4$ (solução de H_2SO_4 em metanol 10%), seguido de aquecimento.

As análises por Cromatografia à Líquidos de Alta Eficiência acoplado a Detector de Arranjos Diodos (CLAE-DAD) foram realizadas em Cromatógrafo à Líquidos Dionex Ultimate 3000 com Detector de Arranjo Diodos (DAD) (Thermo Scientific), coluna ACE RP 18 (150 x 4,6 mm, 5 μm). A fase móvel foi composta por um gradiente de $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_3\text{PO}_4$ 0,1% (A) e MeOH (B), sendo de 0-19 min A:B (75:25), de 20-24 min A:B (0:100) e de 25-35 min (75:25). O fluxo da fase móvel foi mantido em 1 mL/min e a temperatura da coluna a 30°C. Os espectros no UV foram monitorados na faixa de 200 a 400 nm, sendo que para registro dos cromatogramas, os comprimentos de onda foram escolhidos após as análises dos espectros. Os espectros de CLAE-EM foram obtidos no modo positivo por eletrospray usando o equipamento Quattro LC-Micromass device (Waters).

Para separação pelo método semipreparativo foi utilizado um Cromatógrafo à Líquidos de Alta Eficiência acoplado a Detector de Arranjos Diodos (CLAE-DAD), cujo sistema consistiu em duas bombas de solvente modelo LC-6AD, equipado com um detector de arranjo de diodos SPD-M20A (Shimadzu, Corp., Kyoto, Japan). As amostras foram injetadas em um injetor Rheodyne 7125i com um loop de 20 μL (Coluna analítica) e 500 μL (Coluna semipreparativa). Para determinar o perfil cromatográfico foi usado uma coluna analítica Luna 5u C-18 80A (150 x 4.6 mm x 5 μm , Phenomedex) e a separação dos constituintes em coluna semipreparativa Luna 5u C-18 100A (250 x 21,20 mm x 5 μm ,

Phenomedex), pré-coluna C-18 Luna 21 mm, solvente MeOH (Tedia, Brasil) grau HPLC/Espectro UV-visível, água miliQ e ácido fórmico (Tedia, Brasil).

O Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) Bruker Ascend Bruker DRX-500 (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz) foi utilizado para obtenção dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C . Nestas análises foram utilizados metanol- D_4 e tetrametilsilano (TMS) como referência interna. As análises espectroscópicas foram realizadas em parceria no Laboratório de Ciências Químicas da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

2.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal, constituído folhas da espécie *Persea fulva*, foi coletado no município de Rio de Contas (13°22'26,9"S e 41°53'27,5"W), Bahia, em Agosto de 2012. O material vegetal foi identificado pelo Dr. Francisco Haroldo Feitosa do Nascimento e a exsiccata encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS) sob o código 201.418.

2.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS E FRACIONAMENTO

As folhas de *P. fulva* (1050 g) foram secas à temperatura ambiente e moídas em moinho de facas (tipo Wiley). O pó seco pulverizado das folhas foi submetido à extração por maceração com EtOH- H_2O (3000 mL, 80:20 v/v) em erlenmeyer por 5 dias, e posteriormente filtrado. O extrato bruto etanólico (193 g) foi concentrado em rotaevaporador, diluído em água e submetido à partição líquido-líquido com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e butanol). Em seguida, foram concentrados em rotaevaporador para obtenção dos extratos hexânico (7 g), acetato de etila (62 g), butanólico (34 g), respectivamente.

O extrato acetato de etila foi fracionado por cromatografia em coluna aberta recheada com sílica gel, foram utilizados solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila, metanol e água) sendo obtidas 15 frações (Fr 1-15). As frações 9-10 foram unidas e submetidas a técnica de CLAE-semipreparativo para obtenção do composto purificado **1** (t_{R} : 9.5 min; 906 mg, pureza >96% por CLAE-DAD).

2.4 DADOS ESPECTRAIS

Metilpiperitol (**1**): óleo sem cor (906 mg); RMN de ^1H (metanol- d_4 , 500 MHz) e RMN de ^{13}C (metanol- d_4 , 125 MHz): ver tabela 3, dados espectroscópicos: HR-ESI-EM: m/z 371.1429 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 371.1416).

2.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

2.5.1 Animais

Camundongos BALB/c e *Mesocricetus auratus* (hamsters dourados) foram fornecidos pelo biotério do Instituto Adolfo Lutz, mantidos em gaiolas esterilizadas em ambiente controlado e recebendo água e comida à vontade (*ad libitum*). Todos os procedimentos utilizando os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz/Instituto Pasteur (CEUA-IAL – Pasteur 02/2011), de acordo com o guia “*Care and Use of Laboratory Animals*” da *National Academy of Sciences*.

2.5.1 Cultura de parasitas e células de mamíferos

2.5.1.1 *Trypanosoma cruzi*

As formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) foram mantidas em células LLC-MK2 (CCL-7, ATCC) em meio RPMI-1640, suplementado com 2% de soro fetal bovino, à temperatura de 37°C em estufa com 5% CO_2 (KESPER *et al.*, 2000). Enquanto que as formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* foram obtidas através da adição de suas formas tripomastigotas à macrófagos em uma proporção de 5:1 (parasitas/macrófagos), incubadas por 4 horas.

2.5.1.2 *Leishmania (L.) infantum*

As formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD), foram cultivadas em meio M-199 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,25% de hemina, sem adição de antibióticos em estufa a 24°C.

As formas amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum* foram purificadas de baço de *Mesocricetus auratus* (hamsters dourados) por meio de centrifugação diferencial. Os animais foram previamente infectados para manutenção da cepa e o número de parasitas foi determinado pelo método de Stauber (1958) 60 a 70 dias após a infecção.

2.5.1.2 NCTC

As células NCTC (clone 929, ATCC) foram mantidas em meio RPMI-1640 sem vermelho de fenol, suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37°C em estufa umidificada com 5% de CO₂ (BETTIOL *et al.*, 2009).

2.6 DETERMINAÇÃO *in vitro* DAS CONCENTRAÇÕES EFETIVAS A 50% (CE₅₀)

Para os ensaios *in vitro* com amastigotas de *L. (L.) infantum* (= *L. chagasi*), foram adicionados macrófagos peritoneais de camundongos BALB/C a lamínulas de vidro (13 mm) em placas de 24 poços, permanecendo em estufa a 37°C por 24 horas. As formas amastigotas foram extraídas do baço e separadas por centrifugação, então foram adicionadas aos macrófagos na proporção de 10:1 (amastigotas/macrófago), e incubadas com o composto isolado de *P. fulva* (1) em diferentes concentrações (diluição seriada), a 37°C por um período de 120 horas.

Ao final do ensaio, as lâminas foram coradas por Giemsa e observadas em microscópio óptico. A CE₅₀ foi determinada através da contagem de 200 macrófagos/poço, avaliando-se o número de macrófagos infectados, utilizando-se como controle (100% infectado) macrófagos não tratados (PINTO *et al.*, 2013).

O efeito das substâncias isoladas frente às formas amastigotas de *T. cruzi* foi verificado utilizando macrófagos previamente infectados com cultura de tripomastigotas. As substâncias foram incubadas com os parasitas por 48 horas a 37°C em estufa umidificada com 5% CO₂. Ao final do ensaio, as placas foram fixadas com metanol, coradas com giemsa e observadas em microscópio. A carga parasitária foi definida através do número de macrófagos infectados a partir de 500 células.

A CE₅₀ frente às formas livres de ambos os parasitas foram definidas seguindo o mesmo protocolo descrito para a avaliação dos potenciais antiparasitários, porém, neste momento, avaliados frente a diferentes concentrações das substâncias isoladas.

Os potenciais antiparasitários das substâncias isoladas frente às formas livres, promastigotas de *Leishmania infantum* e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, foram determinados através da porcentagem de morte dos parasitas nas mesmas concentrações utilizadas para as formas amastigotas. Os análitos, dissolvidos em metanol e diluídos em meio de cultura, até atingir a concentração pré-estabelecida, foram incubados com 1x10⁶ parasitas/poço em placas de 96 poços por 24 horas, em estufa de BOD à 24°C para os ensaios antileishmania e em estufa de CO₂ (5%) à 37°C para os ensaios antitripanosoma.

A viabilidade, de ambos os parasitas, foi determinada através de suas atividades mitocondriais, utilizando o ensaio colorimétrico com MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) à 570 nm, após 48 horas (TADA *et al.*, 1986, LANE *et al.*, 1996).

2.7 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Com o objetivo de determinar a toxicidade do composto testado com comprovada atividade antiparasitária, foram determinados os Índices de Seletividade (I.S.) das mesmas, através da seguinte expressão:

$$IS = \frac{\text{Toxicidade (CC}_{50} \text{ em NCTC)}}{\text{CE}_{50} \text{ contra os parasitos}}$$

Foram utilizadas células NCTC clone 929, aplicadas a 6×10^4 às substâncias em meio M-199 e mantidas em estufa com 5% CO₂ a 37°C. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio colorimétrico do MTT após 48 horas de incubação.

2.8 ACOPLAMENTO MOLECULAR

A estrutura química 2D do composto isolado de *P. fulva* foi desenhada no software Marvin Sketch 6.0.1, 2013, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>) e as coordenadas 2D foram convertidas para o formato 3D com a ajuda do SYBYL-Software X 2.0 (Tripos Associates, St. Louis, MO, EUA) (TRIPOS INTERNATIONAL, 2012). As cargas Gasteiger-Huckel foram calculadas com o método FF12SB (GASTEIGER; MARSILI, 1980), conforme disponível programa Chimera 1.10.1.

Os alvos moleculares foram obtidos no servidor Protein Data Bank (PDB) e a seleção foi baseada no menor valor de resolução ($R < 2\text{Å}$). As estruturas 3D das proteínas selecionadas para *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* sp. estão descritas nas Tabelas 4.1 e 4.2, respectivamente. Os ligantes co-cristalizados foram utilizados para localizar o sítio ativo nos alvos moleculares. Os alvos moleculares foram preparados através do módulo DockPrep no software Chimera 1.10.1 (PETTERSEN *et al.*, 2004) para a remoção de moléculas de água e a adição de hidrogênios polares para otimizar as ligações de hidrogênio. Os íons e cofatores foram mantidos para os alvos moleculares.

Tabela 4.1. Alvos moleculares utilizados nos estudos de acoplamento molecular para *Trypanosoma cruzi*

Alvo	Ligante	GridScore (kcal.mol ⁻¹)	PDB ID	Resolução (Å)	Ref.
Hipoxantina fosforribosil transferase	Formycin B/ 2-(N-Morpholino)-Ethanesulfonic Acid	-32.64	1TC1	1.41	FOCIA <i>et al.</i> , 1998
14 α -desmetilase (CYP 51) de <i>T. cruzi</i>	Nalpha-(2-fluoro-4-{4-[4-(trifluoromethyl)phenyl]piperazin-1-yl}benzoyl)-N-pyridin-4-yl-D-tryptophanamide	-67.34	4C27	1.95	VIEIRA <i>et al.</i> , 2014
Dihidroorotato desidrogenase de <i>T. cruzi</i>	Oxonic Acid/Flavin Mononucleotide	-77.92	2E6F	1.26	INAOKA <i>et al.</i> , 2008
Farnesil Difosfato Sintase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	Risedronate	-168.65	1YHL	1.95	GABELLI <i>et al.</i> , 2005
Diidrofolato Redutase-Timidilato Sintase de <i>T. cruzi</i>	(6S)-5,6,7,8-Tetrahydrofolate	-78.62	5T7O	1.80	PISA <i>et al.</i> (não publicado)
Cruzaina	(3S)-3-(4-((1S)-1,2-Dimethyl-1-[(quinolin-6-ylmethyl)amino]propyl)-1H-1,2,3-Triazol-1-yl)Heptan-2-one	-55.67	3IUT	1.2	BRAK <i>et al.</i> , 2010

Tabela 4.2. Alvos moleculares utilizados nos estudos de acoplamento molecular para *Leishmania sp.*

Alvo	Ligante	GridScore (kcal.mol ⁻¹)	PDB ID	Resolução (Å)	Ref.
Pteridina Redutase 1 de <i>L. major</i> (PTR1)	(2~{R})-2-[3,4-bis(oxidanyl)phenyl]-6-Oxidanyl-2,3-Dihydrochromen-4-one	-38.73	5L42	2.10	PISA <i>et al.</i> , 2017
Triose-fosfato isomerase de <i>L. mexicana</i> mutante E65Q	Phosphoglycolohydroxamic Acid	-49.35	2VXN	0.82	ALAHUHTA, WIERENGA, 2010
<i>N</i> -Miristoiltransferase de <i>L. major</i>	5-chloranyl-N-[2-(3-methoxyphenyl)ethanimidoyl]-2-piperidin-4-yloxy-benzamide	-66.68	5A27	1.37	BRANNIGAN <i>et al.</i> , 2010
Farnesil difosfato sintase de <i>L. major</i>	3-butyl-1-(2,2-diphosphonoethyl)pyridinium	-165.46	4JZX	1.80	ARIPIRALA <i>et al.</i> , 2014

O acoplamento molecular foi realizado no software DOCK 6.8 (ALLEN *et al.*, 2015). Inicialmente, a imagem negativa da superfície molecular do sítio ortostérico foi construída através da superfície molecular de acesso ao solvente do receptor gerada pelo programa

acessório DMS (do inglês, Display Midas System) (FERRIN *et al.*, 1988). Um conjunto de esferas com raio de 1,4 Å foi gerado através do programa acessório SPHGEN e a seleção das

esferas próximas ao ligante cristalográfico (8,0 Å) foram consideradas para o acoplamento molecular através do programa SPHERE_SELECTOR (KUNTZ *et al.*, 1982), o espaço de acoplamento foi definido usando o ligante co-cristalizado para cada alvo molecular.

As propriedades moleculares (potencial atração e repulsão, efeitos de solvatação e contatos estéricos) para a região foram calculadas usando o software GRID na configuração padrão (SHOICHET *et al.*, 1992). O docking molecular foi realizado usando a função de pontuação GridScore (MENG *et al.*, 1992). Um processo de reacoplamento foi realizado para verificar a precisão do método de encaixe ao reproduzir a orientação cristalográfica dos ligantes complexados para os alvos selecionados. Os resultados foram analisados usando o desvio médio-quadrático (RMSD) calculado no software DOCK6.8. Em seguida, o composto **1** foi acoplado contra todas as proteínas.

As análises das interações intermoleculares para a molécula mais bem classificada para cada alvo foi realizada no software Protein-Ligand Interaction Profiler (SALENTIN *et al.*, 2015) e os mapas de interação foram projetados no PyMOL v0.99.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES DE *P. fulva*

O extrato acetato de etila das folhas de *P. fulva* foi fracionado por cromatografia em coluna aberta fornecendo 15 frações (Fr1-Fr15). As frações 9-10 foram unidas e submetidas a purificação por CLAE semi-preparativo e métodos de purificação adicionais resultando no isolamento do composto **1**.

A elucidação da estrutura do composto **1** foi realizada por técnicas de RMN 1D e 2D (^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, ^1H - ^1H -COSY) (Tabela 4.3), bem como Cromatografia à Líquidos de Alta Eficiência acoplado a Espectrômetro de Massas (CLAE-EM) e comparação com dados da literatura (os espectros de massas e RMN de ^1H e ^{13}C constam no ANEXO II). No espectro de RMN ^{13}C foram detectados 21 sinais de carbono, através do experimento DEPT-135 foi possível confirmar a presença de dez carbonos metínicos em δ_{C} 107.68 (C-2), 109.13 (C-5), 120.78 (C-6), 87.47 (C-7), 55.53 (C-8), 111.28 (C-2'), 112.99 (C-5'), 119.94 (C-6'), 87.35 (C-7'), 55.72 (C-8'), três carbonos metilênicos em 72.80 (C-9), 72.84 (C-9') e 102.54 (OCH₂O), duas metilas em δ_{C} e seis carbonos quaternários em δ_{C} 136.65 (C-1), 149.54 (C-3), 148.73 (C-4), 135.37 (C-1'), 150.77 (C-3') e 150.28 (C-4').

No espectro de RMN de ^1H de **1** foram observados sinais que sugerem a presença de dois anéis aromáticos em δ_{H} 6.87 (sl, H-C(2)), 6.77 (d, J= 8.0 Hz, H-C(5)), 6.84 (dd, J= 8.0,

1.4, H-C(6)), 6.97 (d, J= 1.4, H-C(2')) e 6.92 (sl, H-C(5'), H-C(6')). Os sinais em δ_H 4.70 (d, J= 5.0, H-C(7)) e 4.72 (d, J= 5.1, H-C(7')) indicam hidrogênios carbonílicos benzílicos em posições pseudo-axiais. Um singlete em δ_H 5.92 (s, OCH₂O) é atribuído a dois hidrogênios metilênicos dioxílicos. Dois duplos dubletos em δ_H 4.23 (dd, J= 8.9, 6.8, CH₂(9a), CH₂(9'a)) e 3.85 (dd, J= 8.9, 4.1, CH₂(9b), CH₂(9'b)) são atribuídos aos hidrogênios metilênicos carbinólicos, além de dois multipletos em δ_H 3.12 (m, H-C(8)) e 3.10 (m, H-C(8')) referente aos dois hidrogênios metínicos em posições pseudo-axiais.

Os dados de RMN ¹³C, ¹H, HSQC, HMBC e comparação destes com a literatura permitiu a identificação como metilpiperitol C₂₁H₂₃O₆ (calc. *m/z* 370.1416), figura 4.1 (INAI *et al.*, 2015). Em espécies de Lauraceae o isolamento do metilpiperitol foi descrito em *Nectandra amazonum* (BARBOSA-FILHO, YOSHIDA, GOTTLIEB, 1989) e *Persea pirifolia* (BATISTA *et al.*, 2010), este é o primeiro relato deste composto na espécie *P. fulva*.

Figura 4.1. Lignana Metilpiperitol (1) isolada de *P. fulva*

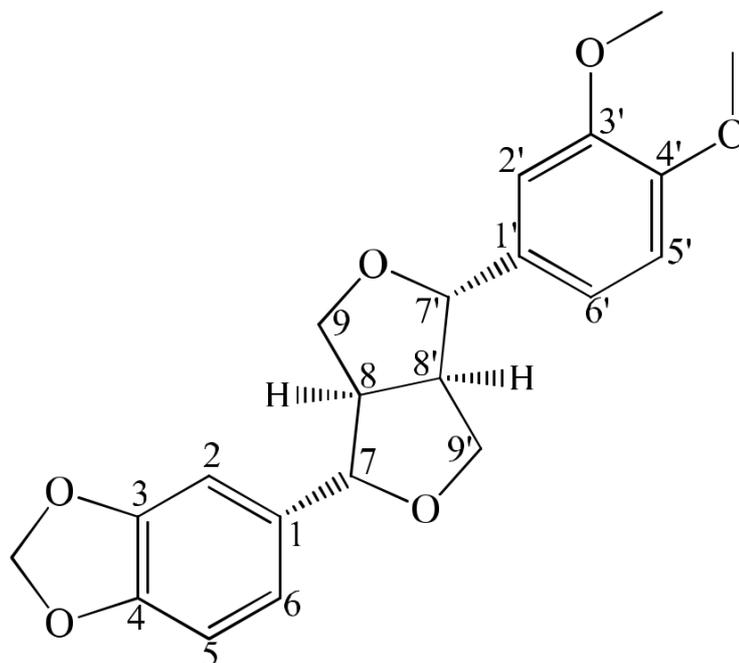


Tabela 4.3. Dados de RMN (CDCl₃) em ppm, *J* em Hz do Composto 1e e comparação com os dados da literatura para o Metilpiperitol

Composto 1					(+) -Metilpiperitol (Inai <i>et al.</i> , 2015)	
C	HSQC		HMBC		δ_C	δ_H
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$		
1	136.65	-	H-7	H-5	135.0	-
3	149.54	-		H-5	148.0	-
4	148.73	-		H-2; H-6	147.1	-
1'	135.37	-	H-7'	H-5'	133.4	-
3'	150.77	-		H-5'; MeO-3'	149.2	-
4'	150.28	-		H-2'; MeO-4'	148.6	-
CH						
2	107.68	6.87 (sl)		H-6; H-7	106.5	6.86 (d, <i>J</i> = 1.7)
5	109.13	6.77 (d, 8.0)			108.2	6.85 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz)
6	120.78	6.84 (dd, 8.0, 1.4)		H-2; H-7	119.4	6.87 (dd, <i>J</i> = 8.5, 1.7)
7	87.47	4.70 (d, 5.0)		H-2; H-6; 2H-9	85.80	4.74 (t, <i>J</i> = 5.1)
8	55.53	3.12 (m)	H-7; 2H-9		54.1.	3.03–3.13 (m)
2'	111.28	6.97 (d, 1.4)		H-6'; H-7'	109.1	6.90 (d, <i>J</i> = 1.7)
5'	112.99	6.92 (sl)			111.0	6.81 (dd, <i>J</i> = 7.9, 1.7)
6'	119.94	6.92 (sl)		H-2'; H-7'	118.2	6.78 (d, <i>J</i> = 7.9)
7'	87.35	4.72 (d, 5.1)		H-2'; H-6'; 2H-9'	85.75	4.74 (t, <i>J</i> = 5.1)
8'	55.72	3.10 (m)	H-7'; 2H-9'		54.3	3.03–3.13 (m)
CH₂						
9	72.80	4.23 (dd, 8.9, 6.8) 3.85 (dd, 8.9, 4.1)		H-7	71.66	4.25 (dt, <i>J</i> = 9.1, 6.8) 3.87 (dd, <i>J</i> = 9.1, 4.5)
9'	72.84	4.23 (dd, 8.9, 6.8) 3.85 (dd, 8.9, 4.1)		H-7'	71.73	4.25 (dt, <i>J</i> = 9.1, 6.8) 3.87 (dd, <i>J</i> = 9.1, 4.5)
OCH ₂ O	102.54	5.92 (s)			101.1	5.95 (s)
MeO						
3'	56.61	3.83 (s)			55.90	3.90 (s)
4	56.65	3.81 (s)			55.93	3.88 (s)

A análise por espectrometria de massas de alta resolução em modo positivo demonstrou que o composto apresenta íon pseudomolecular com m/z 371.1429 [M+H]⁺. Os fragmentos com m/z 353.1414 [M+H-18]⁺ e 335.1306 [M+H-36]⁺ indicam sucessivas perdas de H₂O através da abertura dos anéis furânicos. O fragmento com m/z 323.1302 [M+H-18-30]⁺ indica a perda de H₂O e H₂CO, respectivamente. Enquanto que, o fragmento em 304.1094 [M+H-36-31]⁺ revela a perda de uma metoxila (-OCH₃), após as sucessivas perdas de duas unidades de H₂O (Figura 4.2). O fragmento com m/z 231.1035 [M+H-122-18]⁺ pode ser originado após quebra da ligação entre um anel furânico e anel benzílico contendo o núcleo metilenodioxi (m/z 371 \rightarrow 249, não detectado), essa proposta de fragmentação é demonstrada na figura 4.3.

Figura 4.2. Proposta de fragmentação para os íons com m/z 353, 335, 323 e 304

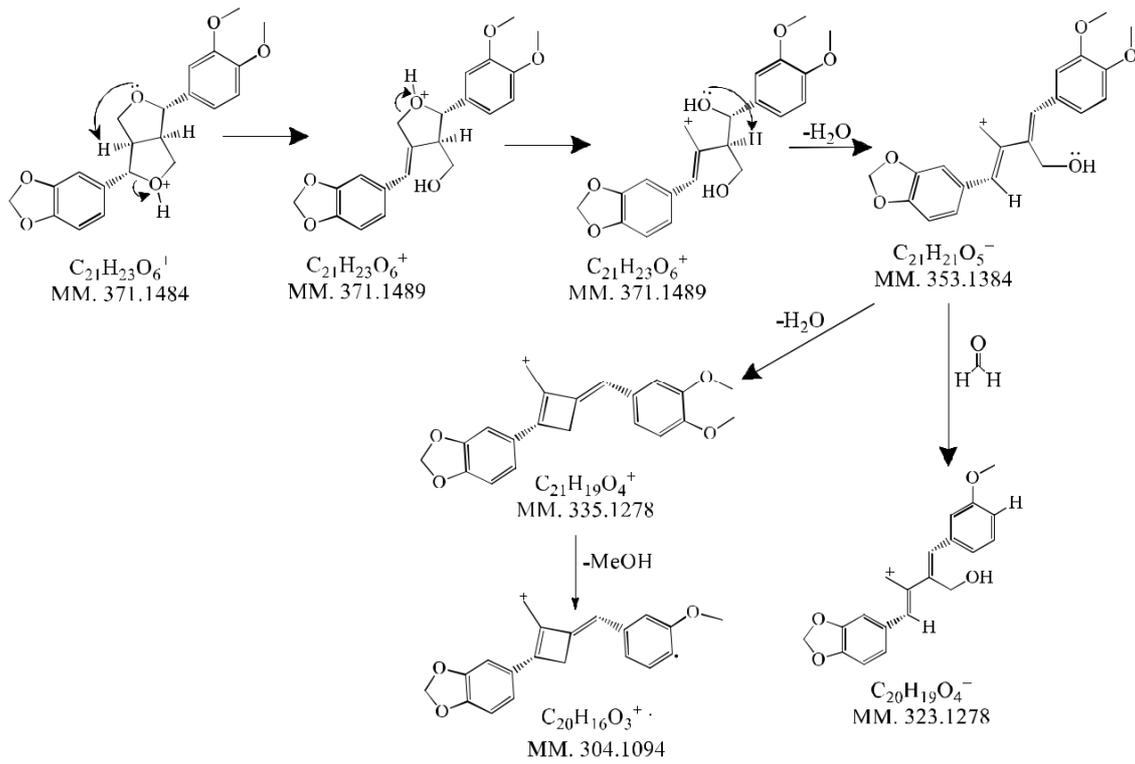
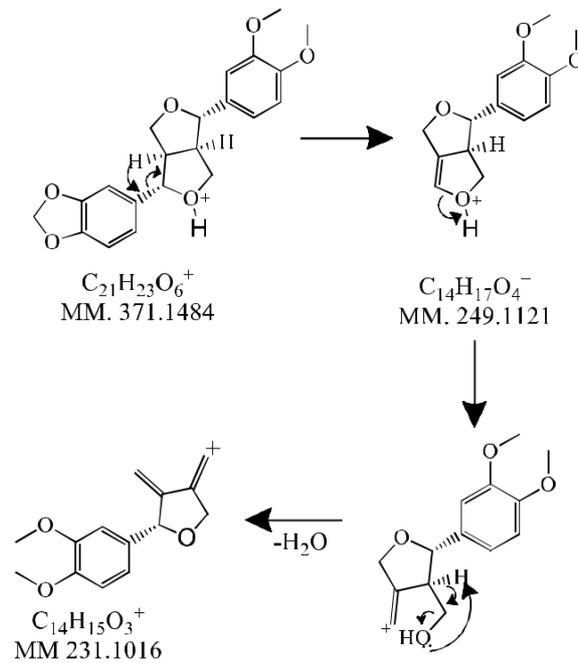


Figura 4.3. Proposta de fragmentação para os íons com m/z 231



3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

A atividade antiprotozoaria do composto **1** foi determinada *in vitro* tanto contra as formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, quanto contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum*. A atividade citotóxica foi avaliada frente à linhagem celular NCTC clone 929. Os resultados para determinação da atividade antiparasitária, atividade citotóxica e índice de seletividade foram descritos na Tabela 4.4.

O composto **1** apresentou CE₅₀ de $4,5 \pm 1,1 \mu\text{M}$ contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, correspondentes à fase aguda da doença de Chagas, porém este composto não apresentou atividade contra as formas intracelulares amastigotas de *T. cruzi*. O padrão benzonidazol apresentou CE₅₀ de $5,5 \pm 2,2 \mu\text{M}$ e de $18,7 \pm 4,1 \mu\text{M}$ para as formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, respectivamente. A atividade descrita acima sugere uma ação efetiva da lignana frente à fase aguda da doença, com CE₅₀ inferior ao do padrão para as formas tripomastigotas, embora a falta de atividade frente às formas amastigotas indique baixa efetividade para a fase crônica da doença.

Quando testado frente às formas promastigotas de *L. infantum* o composto **1** apresentou baixa potência de atividade com CE₅₀ > 100 μM . Enquanto que, para as formas intracelulares amastigotas de *L. infantum* o composto foi ativo e apresentou CE₅₀ de $4,1 \pm 0,5 \mu\text{M}$. O padrão miltefosina apresentou CE₅₀ de $16,7 \pm 3,5 \mu\text{M}$ e de $17,8 \pm 1,4 \mu\text{M}$ para as formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum*, respectivamente. Esses dados demonstram que o composto **1** apresentou maior atividade que o padrão testado para as formas amastigotas de *L. infantum*. Como apresentou significativa atividade frente as formas amastigotas este composto pode ser efetivo para a fase crônica da doença. A maioria dos fármacos disponíveis no mercado apresenta ação frente à fase aguda, por isso a necessidade de busca por novos fármacos com ação frente à fase crônica dessa doença.

A lignana (**1**) apresentou baixa citotoxicidade frente a linhagem de células normais NCTC, com concentração citotóxica para 50% (CC₅₀) das células superior a 200 μM . O índice de seletividade (IS) foi estabelecido em 44,5 para as formas tripomastigotas de *T. cruzi* e de 48,8 para a forma amastigota de *L. infantum*. Os valores dos índices de seletividade calculados demonstram que o composto apresenta baixa toxicidade para células mamárias e alta seletividade para os parasitos. Quando comparado com os índices de seletividade apresentados pelos padrões testados o metilpiperitol (**1**) revelou ser mais seletivo do que estes para os parasitos, esta seletividade indica maior segurança do que os medicamentos padrões testados, para o modelo de toxicidade investigado.

Tabela 4.4. Atividade antiparasitária do Metilpiperitol contra as formas tripomastigotas/amastigotas de *T. cruzi* e as formas promastigotas/amastigotas de *L. infantum*

Compostos	CE ₅₀ μM (95% CE)				CC ₅₀ μM (95% CI)	IS ^b			
	TCT	TCA	LIP	LIA	Células NCTC ^a	TCT	TCA	LIP	LIA
Metilpiperitol	4,5 ± 1,1	NA	>100	4,1 ± 0,5	>200	44,5	ND	ND	48,8
Benzonidazol	5,5 ± 2,2	18,7 ± 4,1	ND	ND	>200	36,3	10,7	ND	ND
Miltefosina	ND	ND	16,7 ± 3,5	17,8 ± 1,4	>200	ND	ND	12,00	11,2

CE₅₀: Concentração efetiva 50%

NA: Não Ativo

ND: Não Determinado

^aCC₅₀: Concentração Citotóxica 50%

^bÍndice de Seletividade Calculado de CC₅₀/CE₅₀ (TTC: *T. cruzi* tripomastigotes, TCA: *T. cruzi* amastigotes, LIP: *L. (L.) infantum* promastigotes, LIA: *L. (L.) infantum* amastigotes)

Diversos estudos reportam atividade antiparasitária de lignanas e neolignanas (SILVA *et al.*, 2014; FELIPPE *et al.*, 2008; ROSA *et al.*, 2017; BRITO *et al.*, 2019; LATIF *et al.*, 2017; GARCÍA-HUERTAS *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2017; SACO *et al.*, 2017; BASHYAL *et al.*, 2017; KOMLAGA *et al.*, 2017). Entretanto não existem, até o momento, relatos de atividade antiparasitária para o metilpiperitol (1). A família Lauraceae se destaca por apresentar lignanas com atividade anti-*T. cruzi* e anti-*Leishmania*. Monte-Neto e colaboradores (2011) descreveram ação citotóxica e citostática *in vitro* frente a *Leishmania* da lignana yangabina isolada de *Ocotea duckei*. Em *Nectandra leucantha* o dehidrodieugenol e outras quatro neolignanas com atividade antiparasitária foram isolados (GRECCO *et al.*, 2017a; GRECCO *et al.*, 2017b).

3.2 ACOPLAMENTO MOLECULAR

A triagem de potenciais alvos foi explorada através da base de dados TDR Targets (<http://tdrtargets.org>), a fim de selecionar de acordo com critérios de essencialidade, validação e ligantes alvos terapêuticos para *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*. Esse banco de dados pode ser considerado como um recurso *on-line* valioso para facilitar a rápida identificação e priorização de alvos moleculares para o desenvolvimento de medicamentos, com foco em patógenos responsáveis por doenças humanas negligenciadas (BELLERA *et al.*, 2019). Os resultados permitiram selecionar no PDB os alvos obtidos no TDR targets de acordo com resolução cristalográfica inferior a 2 Å.

Os critérios de seleção tornaram possível definir seis alvos para *T. cruzi*, sendo eles: Hipoxantina fosforribosil transferase (PDB 1TC1), 14α-desmetilase (CYP 51/PDB 4C27), Dihidroorotato desidrogenase (PDB 2E6F), Farnesil Difosfato Sintase (PDB 1YHL),

Diidrofolato Redutase-Timidilato Sintase (PDB 5T7O) e a Cruzaina (PDB 3IUT) (Tabela 4.6), e quatro alvos para *Leishmania* são eles: Pteridina Redutase 1 de *L. major* (PTR1) (PDB 5L42), Triose-fosfato isomerase de *L. mexicana* mutante E65Q (PDB 2VXN), *N*-Miristoiltransferase de *L. major* (PDB 5A27) e Farnesil difosfato sintase de *L. major* (PDB 4JZX) (Tabela 4.7).

O redocking permitiu a verificação da eficiência e a reprodutibilidade do protocolo de acoplamento molecular, através do RMSD, com ele o do algoritmo de busca/função de pontuação identifica uma pose com as coordenadas próximas/idênticas à do ligante cristalográfico em sua provável conformação bioativa. Assim, resultados de $\text{RMSD} \leq 2 \text{ \AA}$ são considerados aceitáveis na avaliação de um método de acoplamento (BROZELL *et al.*, 2012). Os valores de RMSD encontrados entre a pose cristalográfica e a melhor pose obtida pelas funções de pontuação foram descritas na Tabela 4.5. Os resultados indicam que o software DOCK 6.8 foi capaz de se aproximar da estrutura experimentalmente determinada.

Tabela 4.5. Valores de RMSD para cada alvo

Código PDB	<i>T. cruzi</i>						<i>Leishmania</i>			
	1TC1	4C27	2E6F	1YHL	5T7O	3IUT	5L42	2VXN	5A27	4JZX
Valores de RMSD (Å)	0.79	1.09	1.12	0.77	1.40	1.01	0.47	1.50	0.70	0.73

As energias de afinidades encontradas para o metilpiperitol e os ligantes cristalográficos são descritos na Tabela 4.6 tanto para os alvos de *T. cruzi*, quanto para o de *Leishmania*. A lignana isolada apresentou melhor energia de afinidade que o ligante cristalográfico para as enzimas Hipoxantina fosforribosil transferase de *T. cruzi* (PDB ID 1TC1) e Pteridina Redutase 1 de *L. major* (PTR1) (PDB 5L42).

Tabela 4.6. Energias de afinidade encontradas para os compostos isolados frente a cada alvo molecular de *T. cruzi* e *Leishmania*

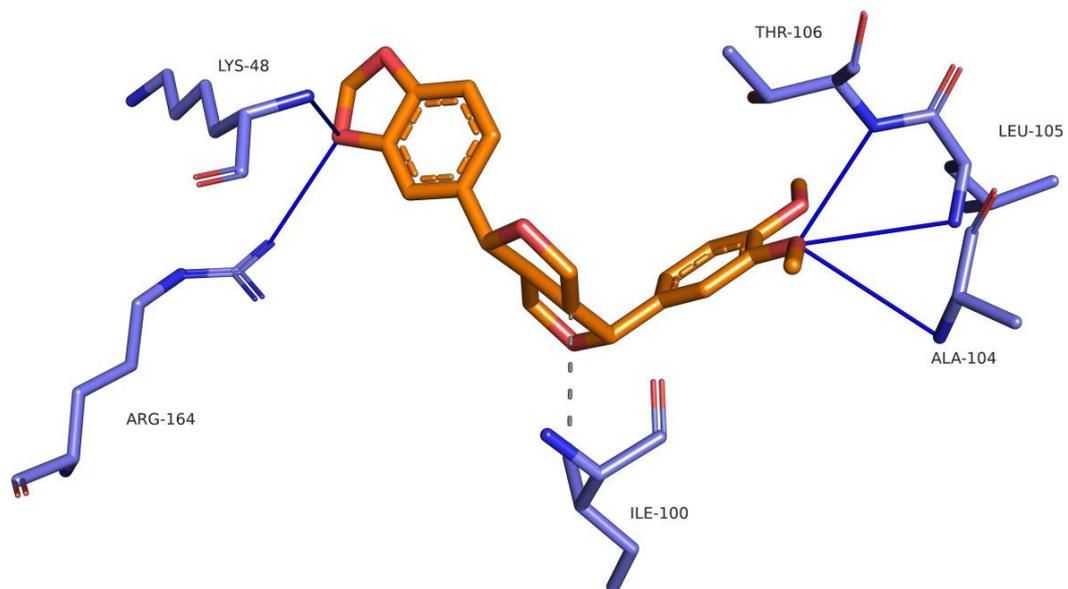
	Alvos <i>T. cruzi</i> (GridScore - kcal.mol ⁻¹)					
	1TC1	4C27	2E6F	1YHL	5T7O	3IUT
Metilpiperitol (1)	-41.63	-44.20	-33.92	-35.80	-43.39	-38.93
Ligante cristalográfico	-32.64	-67.34	-77.92	-168.65	-78.62	-55.67
	Alvos <i>Leishmania</i> (GridScore - kcal.mol ⁻¹)					
	5L42	2VXN	5A27	4JZX		
Metilpiperitol (1)	-43.67	-35.79	-40.67	-34.60		
Ligante cristalográfico	-38.73	-49.35	-66.68	-165.46		

Para identificar novos fármacos para o tratamento desta doença, podem ser exploradas diferenças entre o metabolismo do hospedeiro e do parasita (WENCK *et al.*, 2004). Muitos parasitas não possuem as enzimas necessárias para a síntese *de novo* de nucleotídeos de

purina e, portanto, são forçados a confiar nas vias de salvamento para obter os nucleotídeos de purina necessários para o metabolismo celular. Por esse motivo, enzimas nessas vias, incluindo Hipoxantina Fosforibosiltransferases (HPRTs; EC 2.4.2.8), têm sido propostas como alvos potenciais para agentes quimioterapêuticos no tratamento de doenças causadas por parasitas (NIEVES-ALICEA; FOCIA, 1998; MEDRANO *et al.*, 2003).

O metilpiperitol (1) estabeleceu com a Hipoxantina Fosforibosiltransferase de *T. cruzi* apenas ligações de Hidrogênio e interações hidrofóbicas. As ligações de hidrogênios foram estabelecidas entre um hidrogênio do anel metilenodioxi (OCH₂O) e resíduo *N*-terminal dos aminoácidos Lys48 e Arg164. Um oxigênio de uma das metoxilas da lignana estabelece ligações de hidrogênio com o resíduo *N*-terminal dos aminoácidos Thr106, Leu105 e Ala104. Uma interação hidrofóbica ocorre entre a cadeia lateral de Ile100 e o carbono na posição 8 no anel furânico do metilpiperitol. Focia e colaboradores (1998) descreveram que as principais interações entre os ligantes e o sítio ativo da enzima Hipoxantina fosforribosil transferase de *Trypanosoma cruzi* são ligações de hidrogênio e, estes resultados corroboram com os resultados do acoplamento molecular entre a lignana e o alvo (Figura 4.4).

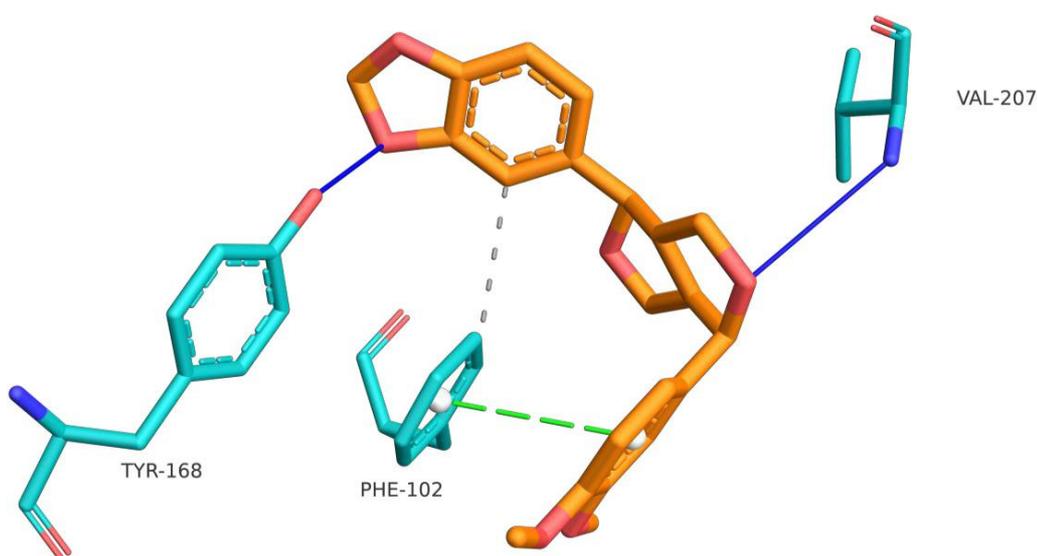
Figura 4.4. Resultados do acoplamento molecular para ITC1. Os carbonos são representados em azul claro (enzima) e laranja (ligante), nitrogênios em azul escuro e oxigênios em vermelho. Linhas azuis: ligação de hidrogênio; Linha tracejada cinza: interação hidrofóbica



A enzima Pteridina Redutase 1 tem sido considerada um promissor alvo para doenças parasitárias. Consiste numa redutase dependente de NADPH, que participa da recuperação de pteridinas (folato e biopterina), essenciais para manter o crescimento do parasito. Essa enzima catalisa a redução de folato e biopterina em suas formas biologicamente ativas tetra-

hidrofolato e tetra-hidrobiopterina, respectivamente, que atuam como co-fatores. Estudos demonstraram que pteridinas reduzidas em *Leishmania* tem a capacidade de lidar com espécies oxidantes e nitrossativas, e uma capacidade reduzida de fornecer pteridinas reduzidas leva a uma sobrevivência intracelular reduzida (MOREIRA; FERREIRA; MURTA, 2016; LEITE *et al.*, 2017).

Figura 4. 5. Resultados do acoplamento molecular para 5L42. Os carbonos são representados em ciano (enzima) e laranja (ligante), nitrogênios em azul escuro e oxigênios em vermelho. Ligação de hidrogênio: linha azul; interação hidrofóbica: linha tracejada cinza; interação π - π : linha tracejada verde.



As interações estabelecidas com o ligante cristalográfico para o alvo de código PDB 5L42 foram hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e do tipo π - π (PISA *et al.*, 2017). Para o metilpiperitol (**1**), a natureza dessas interações foi mantida, de modo que a interação hidrofóbica ocorre entre o resíduo de Phe102, duas ligações de hidrogênio foram estabelecidas, uma entre o resíduo de Tyr168 e o oxigênio do anel metilenodioxo (OCH₂O) e outra entre o oxigênio do anel furânico e a porção *N*-terminal do resíduo Val207. Uma interação do tipo π - π paralela formou-se entre o anel aromático da cadeia lateral do resíduo de Phe102 e o anel aromático que carrega as metoxilas (Figura 4.5). A manutenção das interações e melhor energia de afinidade do metilpiperitol para este alvo é condizente com os resultados *in vitro* obtidos, isto porque a lignana foi ativa contra as formas intracelulares amastigotas de *L. infantum*, como supracitado um mecanismo de ação por inibição desta enzima justifica a maior atividade a nível intracelular.

3 CONCLUSÃO

A lignana metilpiperitol (**1**) foi isolada pela primeira vez de *P. fulva*. Este composto foi rastreado quanto ao seu potencial anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma*. Os resultados demonstram que a lignana isolada é ativa frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi* com CE₅₀ de $4,5 \pm 1,1 \mu\text{M}$, sendo que contra as formas intracelulares amastigotas de *T. cruzi* o composto não demonstrou atividade. Para as formas promastigotas de *L. infantum* o composto não apresentou atividade, sendo ativo apenas contra as formas amastigotas com CE₅₀ de $4,1 \pm 0,5 \mu\text{M}$. O índice de seletividade (IS) foi estabelecido e os valores demonstram que o composto apresenta baixa toxicidade para células humanas e alta seletividade para os parasitos. Através do estudo de acoplamento molecular o mecanismo de ação foi sugerido e ensaios adicionais são necessários para confirmá-lo. Assim, a partir dos resultados alcançados tanto *in vitro*, quanto *in silico* pode-se concluir que a lignana (**1**) isolada de *P. fulva* apresentam um potencial para o controle de Doenças Tropicais Negligenciadas, como a doença de Chagas e a leishmaniose.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, W.J. *et al.* DOCK 6: Impact of new features and current docking performance. **Journal of Computational Chemistry**, v. 36, p. 1132-1156, 2015.
- BASHYAL, B.; LI, L.; BAINS, T.; DEBNATH, A; LABARBERA, D.V. *Larrea tridentata*: a novel source for anti-parasitic agents active against *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* and *Naegleria fowleri*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 11, n. 8, p. e0005832, 2017.
- BELLERA, C.L. *et al.* High-throughput drug repositioning for the discovery of new treatments for Chagas disease. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 182-193, 2015.
- BETTIOL, E. *et al.* Identification of Three Classes of Heteroaromatic Compounds with Activity against Intracellular *Trypanosoma cruzi* by Chemical Library Screening. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 2, p. e384, 2009.
- BRITO, J. R. *et al.* Dibenzylbutane neolignans from *Saururus cernuus* L. (Saururaceae) displayed anti-*Trypanosoma cruzi* activity via alterations in the mitochondrial membrane potential. **Fitoterapia**, v. 137, p. 104251, set. 2019.
- BROZELL, S.R. *et al.* Evaluation of DOCK 6 as a pose generation and database enrichment tool. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, p. 749-773, 2012.
- CHENG, W. *et al.* Chemical Constituents of the Bark of *Machilus wangchiana* and Their Biological Activities. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 12, p. 2145–2152, 28 dez. 2009.
- CHOI, H.G.; CHOI, Y.H.; JI, H.K.; KIM, H.H.; KIM, S.H.; KIM, J.A.; SANG, M.L.; NA, M.K.; LEE, S.H. A new neolignan and lignans from the stems of *Lindera obtusiloba* Blume and their anti-allergic inflammatory effects. **Arch. Pharm. Res.**, v. 37, p. 467-472, 2014.
- COYBARRERA, E.D.; CUCASUÁREZ, L.E.; SEFKOW, M. PAF-antagonistic bicyclo octanoid neolignans from leaves of *Ocotea macrophylla* Kunth (Lauraceae). **Phytochemistry**, v. 70, p. 1309-1314, 2009.
- DAVID, J.M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. Neolignans from bark and leaves of *Ocotea porosa*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 491-499, 1994.
- FANDZLOCH, M. *et al.* Strategies for overcoming tropical disease by ruthenium complexes with purine analog: Application against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 176, p. 144–155, nov. 2017.
- FELIPPE, L. G. *et al.* Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 2, p. 445–450, jan. 2008.
- FELIPPE, L. G. *et al.* Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 2, p. 445–450, jan. 2008.
- FERRIN, T.E. *et al.* The Midas display system. **Journal of Molecular Graphics**, v. 6, p. 13-27, 1988.
- FOCIA, P.J. *et al.* A 1.4 Å crystal structure for the hypoxanthine phosphoribosyltransferase of

Trypanosoma cruzi. **Biochemistry**, v. 37, p. 15066-15075, 1998.

GARCÍA-HUERTAS, P.; OLMO, F.; SÁNCHEZ-MORENO, M.; DOMINGUEZ, J.; CHAHBOUN, R.; TRIANA-CHÁVEZ, O. Activity in vitro and in vivo against Trypanosoma cruzi of a furofuran lignan isolated from Piper jericense. **Exp. Parasitol**, v. 189, p. 34-42, 2018.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity – a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, p. 3219-3228, 1980.

GRECCO, S. S. *et al.* Antitrypanosomal activity and evaluation of the mechanism of action of dehydrodieugenol isolated from Nectandra leucantha (Lauraceae) and its methylated derivative against Trypanosoma cruzi. **Phytomedicine**, v. 24, p. 62–67, jan. 2017a.

GRECCO, S. S. *et al.* Neolignans from leaves of Nectandra leucantha (Lauraceae) display in vitro antitrypanosomal activity via plasma membrane and mitochondrial damages. **Chemico-Biological Interactions**, v. 277, p. 55–61, nov. 2017b.

HOANG, V.D.; TAN, G.T.; ZHANG, H.J.; TAMEZ, P.A.; HUNG, N.V.; CUONG, N.M.; SOEJARTO, D.D.; FONG, H.H.; PEZZUTO, J.M. Natural anti-HIV agents- Part I: (+)-demethoxyepiexcelsin and verticillatol from Litsea verticillata. **Phytochemistry**, v. 59, p. 325-329, 2002.

INAI, M.; ISHIKAWA, R.; YOSHIDA, N.; SHIRAKAWA, N.; AKAO Y.; KAWABE, Y.; ASAKAWA, T.; EGLI, M.; HAMASHIMA, Y.; KAN, T. Stereocontrolled Total Syntheses of Optically Active Furofuran Lignans. *Synthesis*, v. 47, p. 3513–3521, 2015.

KESPER JR., N.; ALMEIDA, K.A.; STOLF, A.M.; UMEZAWA, E.S. Immunoblot analysis of trypomastigote excreted-secreted antigens as a tool for the characterization of Trypanosoma cruzi strains and isolates. **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 862-867, 2000.

KOMLAGA, G.; GENTA-JOUVE, G.; COJEAN, S.; DICKSON, R.A.; MENSAH, M. L. K.; LOISEAU, P. M.; CHAMPY, P.; BENIDDIR, M. A. Antiplasmodial Securinega alkaloids from Phyllanthus fraternus: Discovery of natural (+)-allonorsecurinine. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 38, p. 3754–3756, 2017.

KUNTZ, I.D. *et al.* A geometric approach to macromolecule–ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 161, p. 269-288, 1982.

LANE, J.E.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; SUAREZ, C.C.; BOGITSH, B.J.; JONES, M.M.; SINGH, P.K.; CARTER, C.E. In vitro trypanocidal activity of tetraethylthiuram disulfide and sodium diethylamine-N-carbodithioate on Trypanosoma cruzi. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 3, p. 263–266, 1996.

LATIF, A.; DU, Y.; DALAL, S.R.; FERNÁNDEZ-MURGA, M.L.; MERINO, E.F.; CASSERA, M.B.; GOETZ, M.; KINGSTON, D.G.I. Bioactive neolignans and other compounds from Magnolia grandiflora L.: isolation and antiplasmodial activity. **Chem. Biodivers**, v.14, n. 9, e1700209, 2017.

LI, G. *et al.* Lignans from the Bark of Machilus thunbergii and Their DNA Topoisomerases I and II Inhibition and Cytotoxicity. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 7, p.

1147–1150, 2004.

LI, Y. *et al.* Bioactive Neolignans and Lignans from the Bark of *Machilus robusta*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 6, p. 1444–1452, 24 jun. 2011.

LI, Y. *et al.* Chemical Structures of Lignans and Neolignans Isolated from Lauraceae. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 3164, 30 nov. 2018.

LÓPEZ, H.; VALERA, A.; TRUJILLO, J. Lignans from *Ocotea foetens*. **J. Nat. Prod.**, v. 58, p. 782–785, 1995.

MA, C.J.; SUNG, S.H.; KIM, Y.C. Neuroprotective lignans from the bark of *Machilus thunbergii*. **Planta Med**, v. 70, p. 79–80, 2004.

MACHADO, A. J. T. *et al.* Antiparasitic effect of the *Psidium guajava* L. (guava) and *Psidium brownianum* MART. EX DC. (araçá-de-veado) extracts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 119, p. 275–280, set. 2018.

MACÍAS-VILLAMIZAR, V.; CUCA-SUÁREZ, L. Diaryldimethylbutane lignans and other constituents isolated from *Nectandra turbacensis* (Kunth) Nees (Lauraceae). **Rev. Colomb. Quim.**, v. 43, p. 12–16, 2014.

MACÍAS-VILLAMIZAR, V.; CUCA-SUÁREZ, L.; GONZÁLEZ, F.V.; RODRÍGUEZ, S. Lignoids isolated from *Nectandra turbacensis* (Kunth) Nees (Lauraceae). **Rec. Nat. Prod.**, v. 10, p. 654–658, 2016.

MEDRANO, F. J. *et al.* Functional roles for amino acids in active site loop II of a hypoxanthine phosphoribosyltransferase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1650, n. 1–2, p. 105–116, ago. 2003.

MENG, E.C.; SHOICHET, B.K.; KUNTZ, I.D. Automated docking with grid-based energy evaluation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, p. 505–524, 1992.

MONTE-NETO, R. L. *et al.* Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 215–221, jan. 2011.

MOREIRA, D. S.; FERREIRA, R. F.; MURTA, S. M. F. Molecular characterization and functional analysis of pteridine reductase in wild-type and antimony-resistant *Leishmania* lines. **Experimental Parasitology**, v. 160, p. 60–66, jan. 2016.

MORO, J.C.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, H.E. Neolignans from *Nectandra puberula*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 269–272, 1987.

NASCIMENTO, M. S. J. *et al.* Effect of Natural 2,5-Diaryl-3,4-dimethyltetrahydrofuran Lignans on Complement Activation, Lymphocyte Proliferation, and Growth of Tumor Cell Lines. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, n. 6, p. 449–453, jan. 2004.

NIEVES-ALICEA, R.; FOCIA, P. J. Limited proteolysis of a trypanosomal hypoxanthine phosphoribosyltransferase yields crystals that diffract X-rays to near atomic resolution. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 6, 1998.

PEREIRA, M.D.P.; SILVA, T.; AGUIAR, A.C.C.; OLIVA, G. ; GUIDO, R.V.C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J.K.U.; ULIANA, S.R.B.; LOPES, L.M.X. Chemical Composition, Antiprotozoal and cytotoxic activities of indole alkaloids and benzofuran neolignan of *Aristolochia cordigera*, **Planta Med.**, v. 83, n. 11, p. 912–920, 2017.

PETTERSEN, E.F. *et al.* UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, p. 1605-1612, 2004.

PISA, F. D. *et al.* Chroman-4-One Derivatives Targeting Pteridine Reductase 1 and Showing Anti-Parasitic Activity. **Molecules**, v. 22, n. 3, 426-442, 2017.

REIGADA, C.; SAYÉ, M.; VALERA-VERA, E.; MIRANDA, M. R.; PEREIRA, C. A. Repurposing of terconazole as an anti *Trypanosoma cruzi* agente. **Heliyon**, v. 5, p. 01947, 2019.

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

SACO, L.C.; DIAS, M. M; ZAQUINE, P.M.; GUSMÃO, M.A.N.; EMÍDIO, N.B.; MARCONATO, D.G.; NASCIMENTO, J.W.L.; MORAES, J.D.; PINTO, P.L.S.; COELHO, P.M.Z.; VASCONCELOS, E.G.; FILHO, A.A.D.S.; FARIA-PINTO, P.D. In vivo and in vitro of arctiin schistosomicidal Activity. **Clin. Exp. Pharmacol**, v. 7, n. 1, p. 224, 2017.

SALENTIN, S. *et al.* PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. W443-W447, 2015.

SHIMOMURA, H.; SASHIDA, Y.; OOHARA, M. Lignans from *Machilus thunbergii*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 1513–1515, 1987.

SHOICHET, B.K. *et al.* Molecular docking using shape descriptors. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, p. 380-397, 1992.

SILVA, M. L. A. *et al.* Furofuran lignans display schistosomicidal and trypanocidal activities. **Phytochemistry**, v. 107, p. 119–125, nov. 2014.

SOUSA, F.S.; GRECCO, S.S.; GIROLA, N.; AZEVEDO, R.A.; FIGUEIREDO, C.R.; LAGO, J.H.G. Neolignans isolated from *Nectandra leucantha* induce apoptosis in melanoma cells by disturbance in mitochondrial integrity and redox homeostasis. **Phytochemistry**, v. 140, p. 108-117, 2017

STAUBER, L.A. Host resistance to the Kharthoum strain of *Leishmania donovani*. **Rice Institute Pamphlet**, v. 45, p.80-96, 1956.

TADA, H.; SHIHO, O.; KUROSHIMA, K.; KOYAMA, M.; TSUKAMOTO, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **Journal of Immunological Methods**, v. 93, p. 157-165, 1986.

TEMPONE, A. G. *et al.* Efficacy of a series of alpha-pyrone derivatives against *Leishmania (L.) infantum* and *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 139, p. 947–960, out. 2017.

TSAI, I.L.; CHEN, J.H.; DUH, C.Y.; CHEN, I.S. Cytotoxic neolignans from the stem wood of *Machilus obovatifolia*. **Planta Med.**, v. 66, p. 403-407, 2000.

TSAI, I.L.; HSIEH, C.F.; DUH, C.Y. Additional cytotoxic neolignans from *Persea obovatifolia*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 1371-1375, 1998

TSAI, I.L.; HSIEH, C.F.; DUH, C.-Y.; IH-SHENG, C. Cytotoxic neolignans from *Persea obovatifolia*. **Phytochemistry**, v. 43, p. 1261-1263, 1996.

WENCK, M. A. *et al.* Steady-state kinetics of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase from *Trypanosoma cruzi*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1700, n. 1, p. 11–18, jul. 2004.

YALUFF, G.; VEGA, C.; ALVARENGA, N. In vitro antiprotozoal activity of (S)-cis-Verbenol against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 168, p. 41–44, abr. 2017.

YU, Y.U.; KANG, S.Y.; PARK, H.Y.; SUNG, S.H.; LEE, E.J.; KIM, S.Y.; KIM, Y.C. Antioxidant lignans from *Machilus thunbergii* protect CCl₄-injured primary cultures of rat hepatocytes. **J. Pharm. Pharmacol**, v. 52, p. 1163-1169, 2000.

CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho contribuiu cientificamente para o estudo químico e biológico do gênero *Persea*, pertencente à Família Lauraceae. A espécie *Persea fulva* foi estudada pela primeira vez do ponto de vista químico. Desta maneira, este estudo relatou o isolamento de uma nova alquil- γ -lactona, denominada majoranolideo B e quatro compostos previamente descritos em espécies do gênero *Persea*, sendo estes três alquil- γ -lactonas majorenolideo, majorenolideo e majorinolideo e uma lignana, denominada metilpiperitol.

Estas substâncias foram investigadas quanto às atividades *in vitro* antiproliferativa em glioma C6 de rato, anti-*Leishmania* e anti- *T. cruzi*, ensaios de acoplamento molecular foram realizados. O majoranolideo foi o composto mais ativo em todos os ensaios e apresentou CE₅₀ 6,69 μ M contra células de glioma C6, CE₅₀ de $2,9 \pm 0,24$ μ M contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, CE₅₀ de $36,7 \pm 0,6$ μ M contra as formas promastigotas de *L. infantum*. O metilpiperitol apresentou CE₅₀ de $4,5 \pm 1,1$ μ M contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi* e CE₅₀ de $4,1 \pm 0,5$ μ M frente às formas intracelulares amastigotas de *L. infantum*. Os estudos de acoplamento molecular permitiram determinar as interações entre os compostos isolados de *P. fulva* e os possíveis alvos das atividades biológicas investigadas, o majoranolideo apresentou menor energia de afinidade para os alvos analisados.

Nesse sentido, futuros estudos *in vivo* permitirão confirmar as atividades e os alvos moleculares para os compostos aqui apresentados. Em conclusão, a espécie *Persea fulva*, coletada no semiárido nordestino, desponta como uma fonte de metabolitos secundários de interesse.

ANEXOS

ANEXO I

Artigo Publicado

Alkene lactones from *Persea fulva* (Lauraceae): Evaluation of their effects on tumor cell growth *in vitro* and molecular docking studies



Alkene lactones from *Persea fulva* (Lauraceae): Evaluation of their effects on Tumor cell growth *in vitro* and molecular docking studies

Isabella Mary Alves Reis^a, Rodrigo Souza Conceição^a, Rafael Short Ferreira^b, Cleonice Creusa dos Santos^b, Gírlane Regina da Silva^c, Larissa de Mattos Oliveira^a, Dayse Santos Almeida Cassiano^a, Manoelito Coelho dos Santos Junior^a, Mariana Borges Botura^a, Victor Diogenes Amaral da Silva^b, Silvia Lima Costa^b, Tania Maria Sarmiento da Silva^c, Ivo José Curcino Vieira^d, Raimundo Braz-Filho^{e,f}, Alexsandro Branco^a

^a Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina s/n, 44036-900 Feira de Santana, BA, Brazil

^b Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, 41100-100 Salvador, BA, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Departamento de Ciências Molecular, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Campus Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brazil

^d Laboratório de Ciências Químicas, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense-Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000-Parque Califórnia, 28013-602 Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil

^e PVE-FAPERJ/DEQUIM-ICE-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), CP 74541, 23894-374 Seropédica, RJ, Brazil

^f LCQUI-CCT-Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 28013-600 Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Persea fulva
Lauraceae
Alkene lactones
Molecular docking

ABSTRACT

The new alkene lactone, (3E)-5,6-dihydro-5-(hydroxymethyl)-3-docdecylidene-furan-3(4H)-one (**1**), named majoranolide B, and three alkene lactones known as majoranolide (**2**), majoranolide (**3**) and majoranolide (**4**) were obtained from the aerial parts of *Persea fulva* (Lauraceae). The structures were elucidated in light of extensive spectroscopic analysis, including 1D, 2D NMR (¹H, ¹³C, ¹H-¹H-COSY, HMBC and HSQC) and HR-ESI-MS. These compounds were screened for their *in vitro* antiproliferative activity in rat C6 glioma and astrocyte cells using MTT assay and *in silico* by molecular docking against targets that play a central role in controlling glioma cell cycle progression. Majoranolide (**3**) is the most active compound with IC₅₀ 6.69 μM against C6 glioma cells, followed by the compounds **1** (IC₅₀ 9.06 μM), **2** (IC₅₀ 12.04 μM) and **4** (IC₅₀ 41.90 μM). The alkene lactones **1–3** exhibited lower toxicity in non-tumor cells when compared to glioma cells. Molecular docking results showed that majoranolide establishes hydrogen bonds with all targets through its α,β-unsaturated-γ-lactone moiety, whereas the long-chain alkyl group binds by means of several hydrophobic bonds. In the present study, it can be concluded from the anti-proliferative activity of isolates against C6 glioma cells that lactone constituents from *P. fulva* could have a great potential for the control of C6 glioma cells.

1. Introduction

Malignant gliomas are the most common and aggressive central nervous system tumors. Currently, the standard procedure for malignant gliomas consists of surgical resection followed by adjuvant chemotherapy [1,2]. Considering the lack of recent progress in the treatment, the development of new agents able to reactivate cell cycle or cell death programs is important for the new therapies focusing on

malignant gliomas [3,4]. In this scenario, medicinal plant species and their secondary metabolites inhibit the progression and development of tumor cells [5].

The genus *Persea* of the family Lauraceae, comprising about 190 species, is widely distributed throughout Mesoamerica, South America and Southeastern Asia [6]. Previous phytochemical investigation of the genus *Persea* revealed the presence of terpenoids, flavonoids, lignans, alkaloids and steroids [7–16]. Alkene lactones also have been reported

Abbreviations: FAK, focal adhesion kinase; ERK1/2, Extracellular signal Regulated Kinase 1 and 2; S6K1, ribosomal protein S6 Kinase 1; COX-2, cyclooxygenase-2; MTT, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide

Corresponding author.

E-mail address: branco@uefs.br (A. Branco).

<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.023>

Received 22 September 2018; Received in revised form 14 January 2019; Accepted 9 February 2019

Available online 14 February 2019

0045-2068/ © 2019 Published by Elsevier Inc.

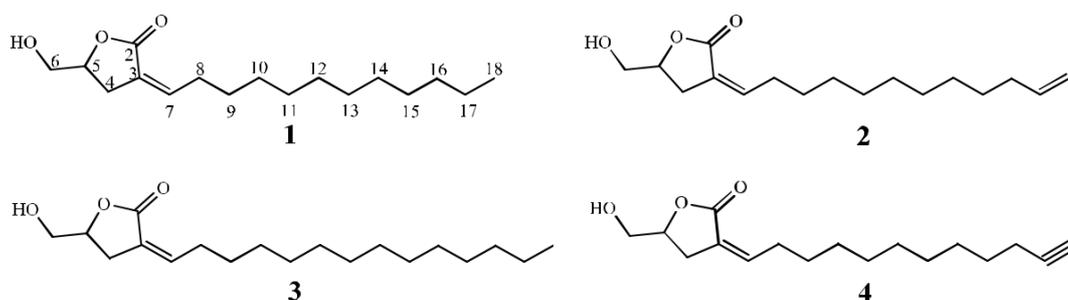


Fig. 1. Alkene Lactones (1–4) isolated from *P. fulva*: majoranolide B (1), majorenolide (2), majoranolide (3) and majorynolide (4).

in *Persea* species and have showed antitumoral and cytotoxic activities [17–20].

Due to the traditional medicinal importance of the genus and the few investigations with *Persea fulva* L.E. Koop., the aerial parts of this species were investigated, what yielded four alkene lactones (1–4) (Fig. 1). Herein, we described the isolation, structural elucidation and evaluation of the effects of these compounds on C6 glioma cell growth (*in vitro* and *in silico*).

2. Results and discussion

2.1. Isolation of alkene lactones

The leaves of *P. fulva* were collected from the Brazilian semiarid region and extracted with 80% ethanol. The EtOH extract was suspended in H₂O and partitioned successively with hexane, EtOAc and *n*-ButOH. The EtOAc fraction was subjected to column chromatography to yield 15 fractions (Fr1–Fr15). The Fr 9–10 was subjected to purification by semi-preparative HPLC with DAD detection to afford the new natural compound (3*E*)-5,6-dihydro-5-(hydroxymethyl)-3-dodecylidene-furan-3(4*H*)-one, named majoranolide B (1), together with two other known alkene lactones: majorenolide (2) and majoranolide (3). Additionally, the Fr 8 was subjected to further column chromatography to afford another known alkene lactone, majorynolide (4). The elucidation of the compound structures was performed by 1D- and 2D-NMR techniques (¹H, ¹³C, HSQC, HMBC, ¹H-¹H-COSY) (Table 1) as well as IR, HRESIMS and comparison with literature data.

Compound (1) was obtained as a green oil, whose molecular formula was determined to be C₁₇H₃₀O₃ by HRESIMS (*m/z* 283.2204, [M + H]⁺) with a degree of unsaturation of 3. The ¹³C NMR and DEPT-135° spectra showed 17 carbons, including twelve methylenes at δ_c 26.3 (C-4), 63.2 (C-6), 29.6 (C-8), 27.8 (C-9), 29.4–29.0 (C-10 to C-15), 31.7 (C-16) and 22.3 (C-17), two quaternary carbons at δ_c 171.9 (C-2) and 126.8 (C-3), two methines at δ_c 78.2 (C-5) and 140.2 (C-7) and one methyl group at δ_c 13.0 (C-18).

One olefinic hydrogen was assigned the signal at δ 6.67 (m, H-C(7)) and three CH₂-group signals were observed δ 2.25 (q, *J* = 7.4, CH₂(8)), 1.53 (qu, *J* = 7.4, CH₂(9)), 1.30–1.45 (m, CH₂(10–17)). The presence of the signal at δ 0.92 (t, *J* = 6.8 CH₃(18)) confirms the presence of a terminal methyl. One set of contiguous hydrogens was detected at δ 2.93 (m), 2.74 (m), for CH₂(4), 4.66 (m) for H-C(5) and 3.78 (dd, *J* = 12.3, 3.2) and 3.60 (dd, *J* = 12.3, 4.5) for CH₂(6). In addition, the α-alkylidene-γ-(hydroxymethyl)-γ-lactone moiety was deduced by the HMBC correlations of H-7 to C-2 and C-4; H-8 to C-2, C-3 and C-7 and H-4 to C-2, C-3, C-5, C-6 and C-7 (Fig. 2). The CH₂(4) hydrogens were also coupled to H-C(8) due to an allylic ⁴*J*-coupling, what suggested that 1 contains an α-alkylidene-γ-(hydroxymethyl)-γ-lactone moiety. Further spectral data (UV, HRESIMS, ¹H and ¹³C NMR) confirmed the structure of 1 as (3*E*)-5,6-dihydro-5-(hydroxymethyl)-3-dodecylidene-furan-3(4*H*)-one, a new alkene lactone, named majoranolide B [17,19,21].

Compound 2 differs from 1 in the C-17 and C-18 terminal carbons,

which in 2 show double bond signals and three additional olefinic hydrogens were assigned. Thus, according to the literature data, the structure of 2 was elucidated as majorenolide. The ¹H and ¹³C NMR spectra for compound 3 were similar to those of 1, except for the two additional carbons present in the side chain of 3. Further spectral data confirmed the structure of 3 as majoranolide. The ¹H and ¹³C NMR spectra of 4 were similar to those of majorenolide 2 and have the same α-alkylidene-γ-(hydroxymethyl)-γ-lactone moiety. The major difference was the presence of a terminal acetylene group. All spectral data confirmed the structure of 4 as majorynolide [17–19,21].

The High-Resolution Mass spectrometry multistage analysis (HR-ESI-MS/MS) of the alkene lactones 1–4 showed pseudo-molecular ion peak [M+H]⁺ at *m/z* 283.2204, 281.2142, 311.2612 and 279.1966, respectively. MS² fragmentation of [M+H]⁺ resulted in the formation of product ions from dehydration (1a, 2a, 3a and 4a), and neutral loss of formic acid (1b, 2b, 3b and 4b), respectively. The Fig. S1 showed a proposal of fragmentation route of these compounds.

2.2. Antiproliferative activity

Unrestricted cell growth and resistance to cell death are typical hallmarks of tumor cells [22]. All isolated alkene lactones were evaluated for their effects on rat C6 glioma cell growth. The effect of alkene lactones on the metabolic activity of rat C6 glioma cells after 24 h of treatment was tested using the MTT reduction assay, which measures the dehydrogenase function in the mitochondrial metabolism. In order to calculate IC₅₀ values (concentration that causes 50% growth inhibition), the cells were incubated with increasing concentrations of the isolated compounds for 24 h.

When compared to control (DMSO 0.05%), it was observed that all the alkene lactones were cytotoxic (*p* < 0.05) to C6 cells, inducing significant decreases on mitochondrial activities (Fig. 3). Proliferation of C6 cells was significantly inhibited by alkene lactones in a concentration-dependent manner (Fig. 4), with more than 90% suppression. Majoranolide (3) is the most active compound with IC₅₀ 6.69 μM against C6 glioma cells, followed by the 1 (IC₅₀ 9.06 μM), 2 (IC₅₀ 12.04 μM) and 4 (IC₅₀ 41.90 μM) compounds.

C6 cells are still largely used *in vitro* and *in vivo* experimental models to develop new glioblastoma treatment strategies. Thus, some authors consider that results obtained from studies using C6 cells would be similar to responses observed in human glioblastomas [23].

Since the toxicity of the anticancer agents in the normal tissues reduces the possibilities of chemotherapy, the influence of the alkene lactones (1–4) on the viability of normal astrocytes was assessed. The results (Fig. 5) showed that alkene lactones 1–3 did not produce toxicity in astrocyte cells at concentrations greater than the IC₅₀ values for tumoral cells. Therefore, the results obtained for alkene lactones are promising in the search for new compounds with antitumor activity.

Majorenolide, majoranolide and majorynolide were isolated for the first time from the EtOH extract of the bark of *Persea major* and were all active in bioassays showing brine shrimp lethality inhibition of crown gall tumors on potato discs and cytotoxicity to human tumor cells (A-

Table 1

^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectral data for alkene lactones (1–4) including results obtained by heteronuclear 2D shift-correlated HSQC ($^1\text{J}_{\text{CH}}$) and HMBC ($^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n = 2$ and 3), in methanol- d_4 as solvent. Chemical shifts in δ (ppm), coupling constants (J in Hz, in parenthesis) and TMS as internal standard.

C/H	1		2		3		4	
	δ (^{13}C)	δ (^1H)	δ (^{13}C)	δ (^1H)	δ (^{13}C)	δ (^1H)	δ (^{13}C)	δ (^1H)
C								
2	171.9	–	171.9	–	171.9	–	171.9	–
3	126.8	–	126.8	–	126.8	–	126.8	–
17	–	–	–	–	–	–	82.8	–
CH								
5	78.2	4.66 (m)	78.2	4.66 (m)	78.2	4.66 (m)	78.2	4.65 (m)
7	140.2	6.67 (m)						
17	–	–	138.7	5.82 (m)	–	–	–	–
18	–	–	–	–	–	–	67.9	2.17 (m)
CH₂								
4	26.3	2.93 (m), 2.74 (m)	26.3	2.95 (m), 2.74 (m)	26.3	2.94 (m), 2.74 (m)	27.8	2.94 (m), 2.74 (m)
6	63.2	3.78 (dd, 12.4, 3.3) 3.60 (dd, 12.4, 4.4)	63.2	3.78 (dd, 12.3, 3.3) 3.60 (dd, 12.4, 4.5)	63.2	3.78 (dd, 12.3, 3.3) 3.60 (dd, 12.4, 4.4)	63.2	3.78 (dd, 12.3, 3.2) 3.59 (dd, 12.3, 4.6)
8	29.6	2.25 (q, 7.4)	29.6	2.25 (q, 7.4)	29.6	2.25 (q, 7.4)	29.6	1.50 (m)
9	27.8	1.53 (qu, 7.4)	27.8	1.52 (qu, 7.4)	27.8	1.53 (qu, 7.4)	28.2	1.54–1.25
10	29.4 ^a	1.45–1.30	29.2 ^b	1.40–1.30	29.4 ^c	1.40–1.30	29.1 ^d	1.54–1.25
11	29.4 ^a	1.45–1.30	29.1 ^b	1.40–1.30	29.4 ^c	1.40–1.30	29.0 ^d	1.54–1.25
12	29.2 ^a	1.45–1.30	29.1 ^b	1.40–1.30	29.4 ^c	1.40–1.30	29.0 ^d	1.54–1.25
13	29.1 ^a	1.45–1.30	29.0 ^b	1.40–1.30	29.4 ^c	1.40–1.30	28.7 ^d	1.54–1.25
14	29.0 ^a	1.45–1.30	28.8	1.40–1.30	29.2 ^c	1.40–1.30	28.3 ^d	1.54–1.25
15	29.0 ^a	1.45–1.30	28.7	1.40–1.30	29.1 ^c	1.40–1.30	28.2 ^d	1.54–1.25
16	31.7	1.45–1.30	33.4	2.06 (qu, 6.9)	29.0 ^c	1.40–1.30	17.5	2.24 (m)
17	22.3	1.45–1.30	–	–	29.0 ^c	1.40–1.30	–	–
18	–	–	113.3	4.98 (dq, 17.1, 1.6) 4.93 (dm, 10.1)	31.7	1.40–1.30	–	–
19	–	–	–	–	22.0	1.40–1.30	–	–
20	–	–	–	–	–	–	–	–
CH₃								
18	13.0	0.92 (t, 6.8)	–	–	–	–	–	–
19	–	–	–	–	–	–	–	–
20	–	–	–	–	13.0	0.92 (t, 6.8)	–	–

Number of hydrogens bound to carbon atoms deduced by ^{13}C -DEPTQ NMR spectra. Chemical shifts and coupling constants (J) obtained of 1D ^1H NMR spectra. Superimposed ^1H signals are described without multiplicity and chemical shifts deduced by HSQC, HMBC and ^1H - ^1H -COSY spectra.

a,b,c,d The δ (^{13}C) values with the same letter can be interchanged.

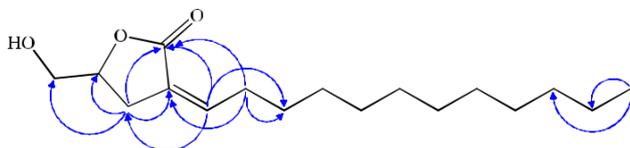


Fig. 2. HMBC correlations (blue arrows, from ^1H to ^{13}C) of Majoranolide B (1).

549 lung carcinoma, MCF-7 breast carcinoma, HT-29 colon adenocarcinoma) [17,18]. Falodun et al. [20] described the isolation of one novel alkene lactone (4-hydroxy-5-methylene-3-undecyclidenedihydrofuran-2(3H)-one) from the root bark of *P. americana* and reported a stimulatory effect on non-tumorigenic MCF-12A cells regarding cell adhesion while tumorigenic MCF-7 cells detached continuously. These results corroborate with the abovementioned results for the alkene lactones isolated from *P. fulva*.

2.3. Molecular docking

A molecular docking approach can explain the interaction between molecules and proteins, which allows the characterization of the behavior of molecules at the binding site of target proteins [24]. In this study, we investigated pathways that play a central role in controlling glioma cell cycle progression. Four targets were selected, which are: Focal Adhesion Kinase (FAK) and Ribosomal protein S6 Kinase 1 (S6K1) because these targets are involved in multiple cellular functions such as cell proliferation, survival and metastasis [25–27]; Cyclooxygenase-2 (COX-2), because it has been reported to be overexpressed in several different tumor cells and hence has a crucial role in carcinogenesis and

in the progress of disease [28]; and Extracellular signal Regulated Kinase 1 and 2 (ERK1/2) because they control the output of the MAPK pathway, which plays a central role in controlling mammalian cell cycle [24]. The crystallographic proteins used in the molecular docking studies are presented in the Table 2.

The efficiency and reproducibility of the docking protocol was checked by re-docking the native ligands in the active site of three enzymes. Docking success is observed when the pose is within 2 Å RMSD of the crystal ligand [29]. The RMSD of the predicted con-formation was 0.95 Å for the S6K1, 0.18 Å for the FAK, 0.82 Å for the COX-2 and 0.36 Å for the ERK1/2 (Fig. S2). The results indicate that the DOCK 6.8 software was able to approach the structure experimentally determined.

Majoranolide (3) has shown the highest binding affinity with all targets in comparison to other alkene lactones tested (Table 3). For the FAK target, majoranolide (3) long-chain alkyl group forms hydrophobic interactions with the side chain of Leu567, Leu553, Ala452 and Glu506 residues, while hydrogen bonds were made from the oxygen of the majoranolide α,β -unsaturated- γ -lactone moiety and the N-terminal residue of the Asp564 and the oxygen atom of C-terminal residue of Glu500 (Fig. 6A). Literature data suggest that chiral and lactone ring compounds may have a strong interaction with this protein because lactone rings were responsible for hydrogen bonds with the binding pocket residues [26].

In the S6K1 docking, majoranolide forms hydrophobic interactions with the side chain of Leu13, Ala37, Val21, Lys39 and Lys157 and hydrogen bonds with the oxygen atom of the C-terminal residue of Lys-157 and the N-terminal residues of the Gly19 and Tyr18 (Fig. 6B). Thiyagarajan et al. [27] described that ligands form hydrogen bonds,

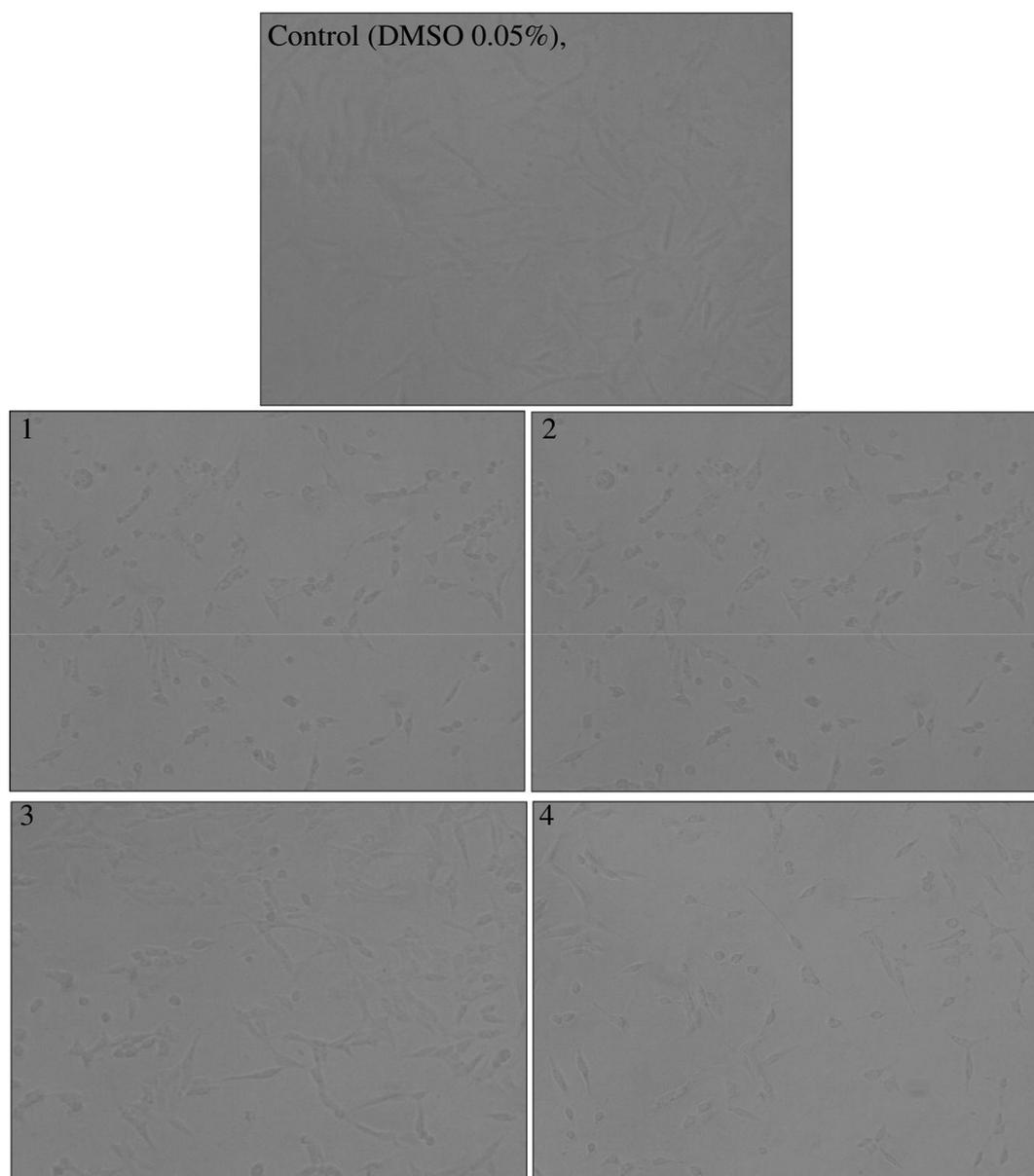


Fig. 3. Visual field of C6 cells treated with control (DMSO 0.05%), majoranolide B (1), majorenolide (2), majoranolide (3) and majorynolide (4) after 24 h after exposure with 10, 12, 7 and 40 μM , respectively.

Pi-cation and hydrophobic interactions with S1K6; these results confirm the abovementioned interactions between majoranolide and the S1K6 active site.

For COX-2, majoranolide (3) forms hydrophobic interactions with the side chain of Tyr84, Val85, Leu61, Tyr324, Leu500, Ala496 and Val318. The majoranolide (3) hydroxyl group forms a hydrogen bond with the oxygen atom of Met491 residue (Fig. 6C). Hydrophobic interactions account for the main interactions formed between ibuprofen (co-crystallized ligand) and the active site residues of COX-2 [30].

At last, for the ERK1/2 target, majoranolide (3) forms hydrophobic interactions with the benzene ring of Tyr36 and the side chain of Asp167, Val39, Ile31 and Leu156. A hydrogen bond was observed between the ligand hydroxyl groups and Met108, Lys114 and Glu109 (Fig. 6D).

For the all abovementioned interactions, majoranolide forms hydrogen bonds through its α,β -unsaturated- γ -lactone moiety, whereas the long-chain alkyl group coordinates with the target by means of several hydrophobic bonds. Hence, the bio-evaluation results indicated

majoranolide as the compound with the lowest IC_{50} and these results were further confirmed through docking studies. This compound showed the best affinity energy for all the targets.

3. Conclusion

One new and three already-known alkene lactones from *Persea fulva* were isolated and screened for their antitumor potential against C6 glioma cells. Among all compounds screened against C6 glioma cells, majoranolide (3) portrayed the potent activity followed by majoranolide B (1), majorenolide (2) and majorynolide (4). The molecular docking confirms majoranolide (3) as the most active and its interactions with the active site in four possible targets involved in antitumoral activity. Hence, from the anti-proliferative activity of isolates against C6 glioma cells, it can be concluded that lactone constituents from *P. fulva* could have a great potential for the control of C6 glioma cells.

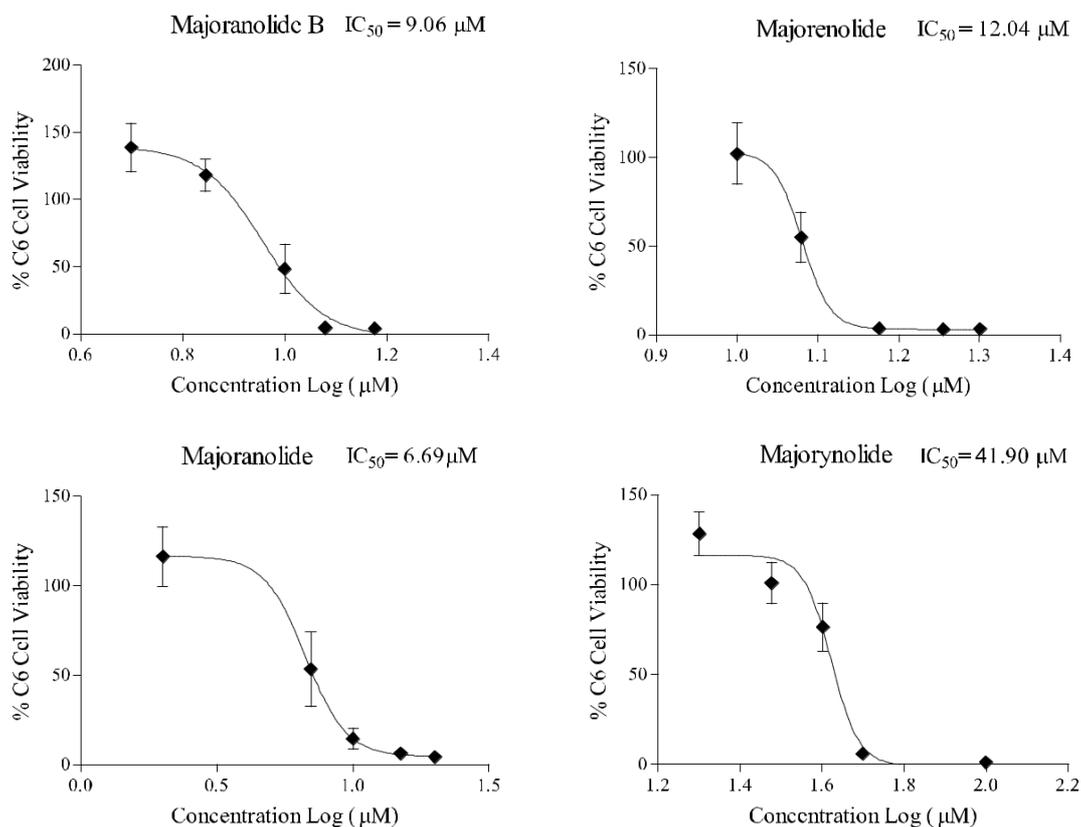


Fig. 4. C6 Cell viability was measured after 24 h using MTT activity assays. Error bars indicate means \pm SD and IC_{50} values were calculated using Graph Pad Prism 5. majoranolide B (1), majorenolide (2), majoranolide (3) and majorynolide (4).

4. Experimental section

4.1. General experimental procedures

Methanol was obtained from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands). Milli-Q water was used for high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis. HPLC was conducted using a Shimadzu Prominence Chromatograph, CMB-20A model (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a UV–vis detector (SPD-20A), column oven (CTO-20A), solvent pump (LC-20AD) and Luna Phenomenex C-18 column (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) (250 \times 4.6 mm; 5 μm). The solvents H₂O (A) and methanol (B) were used as the mobile phase in the following gradient elution: 0–4 min, 80–100% B; 4–10 min, 100% B; 10–12 min, 90% B. A semi-preparative HPLC system with DAD was used for the isolation of pure compounds and comprised a Luna Phenomenex C-18 column (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) (250 mm \times 21.2 mm \times 4 μm) with a 16-mL/min flow rate, with a binary gradient phase of H₂O and methanol in the same conditions.

The XEVO-G2XSQTOF mass spectrometer (Waters, Manchester, UK) was connected to the ACQUITY UPLC system (Waters, Milford, MA, USA) via an electrospray ionization (ESI) interface. The analytical detector was a Waters Acquity PDA detector, which was set to a wave-length range of 200–400 nm. Chromatographic separation of compounds was performed on the ACQUITY UPLC with a conditioned autosampler at 4 $^{\circ}\text{C}$, using an Acquity BEH C18 column (50 mm \times 2.1 mm i.d., 1.7- μm particle size) (Waters, Milford, MA, USA). The column temperature was kept at 40 $^{\circ}\text{C}$. The mobile phase consisting of 0.1% formic acid in water (solvent A) and methanol (solvent B) was pumped at a flow rate of 0.4 mL min⁻¹. The gradient elution program was as follows: 0–4 min, 80–100% B; 4–10 min, 100% B; 10–11 min, 90% B. The injection volume was 10 μL . MS analysis was performed on a Xevo G2 QTOF (Waters MS Technologies, Manchester,

UK), a quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer coupled with an electrospray ionization source in positive ion mode. The scan range was from 50 to 1200 m/z for data acquisition. Source conditions were as follows: capillary voltage, 2.0 kV; sample cone, source temperature, 100 $^{\circ}\text{C}$; desolvation temperature 250 $^{\circ}\text{C}$; cone gas flow rate 20 Lh⁻¹; desolvation gas (N₂) flow rate 600 L h⁻¹. All analyses were performed using the lockspray (10 $\mu\text{L min}^{-1}$), which ensured accuracy and reproducibility.

¹H (500 MHz) and ¹³C (125 MHz) NMR data were obtained on a Bruker Advance II 9.4 T instrument (Centro de Ciências e Tecnologia, UENF) using methanol-*d*₄ as solvent. Data are reported as follows: chemical shift (δ), multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, br = broad, m = multiplet), integration, coupling constants (J = Hz) and assignment. Measure of IR data was on Shimadzu IRAffinity-1.

4.2. Plant material

Leaves of *P. fulva* (1050 g) were collected in Rio de Contas (Latitude 13 $^{\circ}$ 22'26.9"S; Longitude 41 $^{\circ}$ 53'27.5"W), Bahia, Brazil, in August 2012. The plant material was identified by PhD Francisco Haroldo Feitosa do Nascimento (State University of Feira de Santana). A voucher specimen (n. 201.418) was deposited in the Herbarium of State University of Feira de Santana.

4.3. Extraction and isolation

Leaves of *P. fulva* (1050 g) were ground into a powder, then extracted with EtOH-H₂O (3000 mL, 80:20 v/v, 5 days each time) at room temperature for three times. After removal of the combined solvents, a crude extract (193 g) was obtained. The crude extract was suspended in H₂O and partitioned with hexane, EtOAc and *n*-ButOH (each 900 mL) in succession. The resulting three fractions were evaporated in vacuum

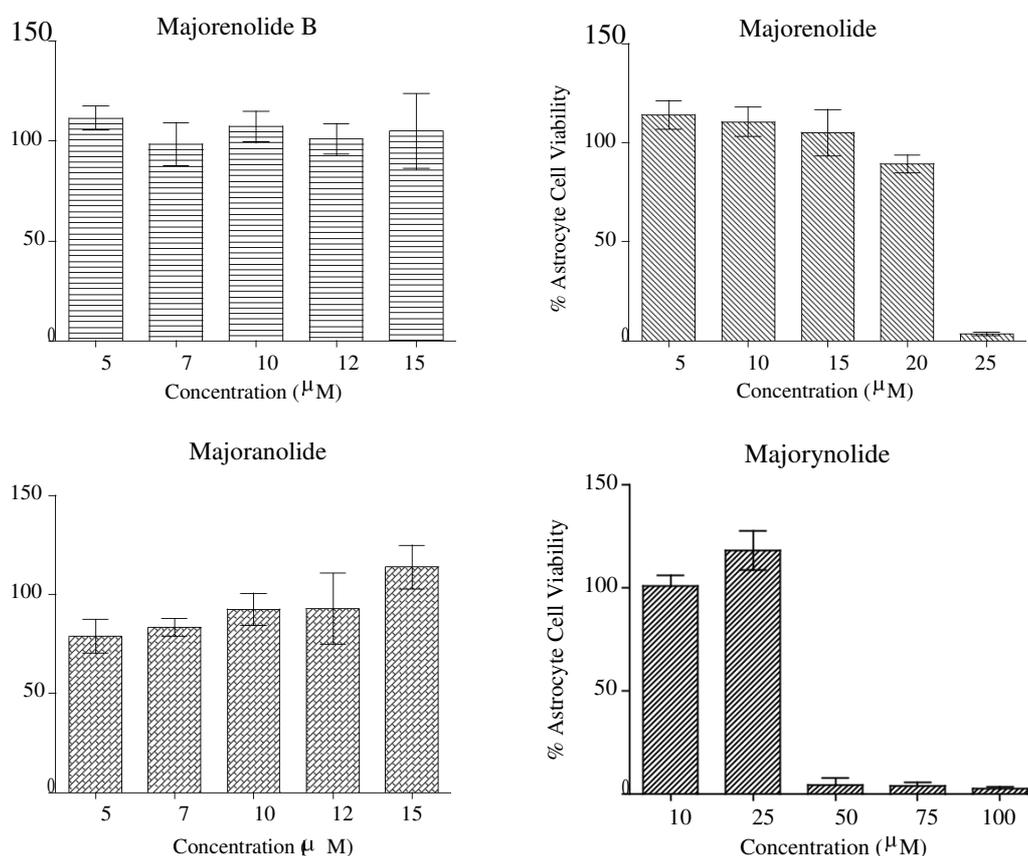


Fig. 5. Astrocyte cell viability was measured after 24 h using MTT activity assays. Error bars indicate means \pm SD of compounds majoranolide B (1), majorenolide (2), majoranolide (3) and majorynolide (4).

drying to yield hexane (7 g), EtOAc (62 g) and *n*-ButOH (34 g). Subsequently, the EtOAc fraction was subjected to silica gel CC using as mobile phase, solvents of increasing polarity (hexane, EtOAc, MeOH and H₂O) to yield subfractions 1–15.

The fractions 9–10 (2.9 g) were submitted to semi-preparative HPLC-DAD analysis for the isolation of compounds **1** (*t_R*: 11.5 min; 146 mg, purity > 78% by HPLC), **2** (*t_R*: 10.8 min; 1900 mg, purity > 95% by HPLC), **3** (*t_R*: 12.7 min; 223 mg, purity > 95% by HPLC). The fraction 8 was purified by silica gel column chromatography (hexane: EtOAc, 9:1/7:3) to yield compound **4** (35 mg, purity > 95% by HPLC).

4.4. Spectral data

Majoranolide B (1): Colorless crystals (146 mg); IR (KBr) λ_{max} : 3441, 2924, 2853, 1751, 1678, 1643, 1464 and 1213 cm^{-1} ; ¹H NMR (methanol-*d*₄, 500 MHz) and ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 125 MHz) spectroscopic data: see Table 1. HR-ESI-MS: *m/z* 283.2290 [M+H]⁺ (calcd. for C₁₇H₃₂O₃ [M+H]⁺: 283.2267).

Majorenolide (2): Green oil (1900 mg); IR (KBr) λ_{max} : 3397, 2926, 2855, 1751, 1641, 1462, 1439 and 1200 cm^{-1} ; ¹H NMR (methanol-*d*₄, 500 MHz) and ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 125 MHz) spectroscopic data: see Table 1. HR-ESI-MS: *m/z* 281.2119 [M+H]⁺ (calcd. for C₁₇H₃₀O₃ [M+H]⁺: 281.2111).

Majoranolide (3): Colorless crystals (223 mg); IR (KBr) λ_{max} : 3736, 3610, 2920, 2850, 1743, 1678, 1523 and 1211 cm^{-1} ; ¹H NMR (methanol-*d*₄, 500 MHz) and ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 125 MHz) spectroscopic data: see Table 1. HR-ESI-MS: *m/z* 311.2599 [M+H]⁺ (calcd. for C₁₉H₃₆O₃ [M+H]⁺: 311.2580).

Majorynolide (4): Colorless oil (35 mg); IR (KBr) λ_{max} : 3443, 3308, 2928, 2854, 1745, 1680, 1643, 1462 and 1205 cm^{-1} ; ¹H NMR (methanol-*d*₄, 500 MHz) and ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 125 MHz)

spectroscopic data: see Table 1. HR-ESI-MS: *m/z* 279.1966 [M+H]⁺ (calcd. for C₁₇H₂₈O₃ [M+H]⁺: 279.1954).

4.5. Antiproliferative activity

4.5.1. Cell cultures

Rat C6 glioma cells were cultured until confluence in 10-mm polystyrene plates (TPP, Trasadingen, Switzerland), trypsinized and replated on 40-mm (1.5 \times 10⁵ cells/plate) or in 96-well (5 \times 10³ cells/cm²) polystyrene culture dishes (TPP). These cultures were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Cultilab, Campinas, Brazil) supplemented with 100 U/ml penicillin G, 100 mg/ml streptomycin, 7 mmol/L glucose, 2 mmol/L L-glutamine, 0.011 g/L pyruvic acid and 10% fetal calf serum and maintained in a humidified atmosphere composed of 95% air and 5% CO₂ at 37 °C.

Astrocyte cells were obtained from the cortex of Wistar newborn rats (0–2 days old) from the Animal Facility of the Federal University of Bahia (Salvador, Brazil) and performed according to Brazilian guide-lines for production, maintenance and use of animals for teaching activities and scientific research and the local Ethical Committee for Animal Experimentation, protocol number (0272012, ICS - UFBA). In brief, after decapitation, the forebrains of newborn Wistar rats were dissociated mechanically and resuspended in DMEM supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 10% Serum equine (HS), 4 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. The cells were cultured on poly-D-lysine (25 µg/ml) -coated flasks. Upon reaching confluence (7–10 days), adherent microglial cells were harvested by shaking at 165 rpm at 37 °C for 3 h. After agitation to remove microglia, the cultures enriched in astrocytes will be kept in the oven for 48 h. After that period, they were trypsinized and seeded in 96-well plates at a density of 3 \times 10⁴/cm² and experiments were performed

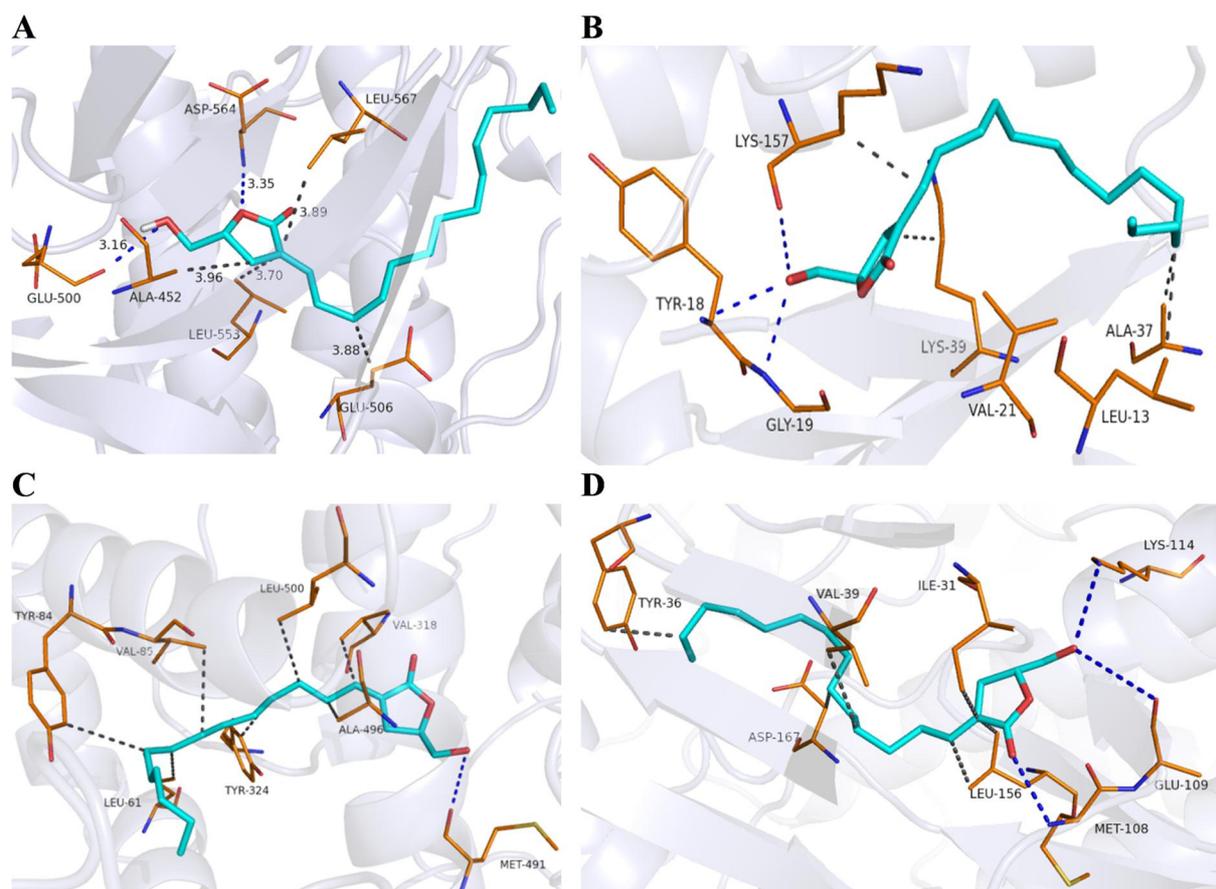


Fig. 6. Docking results for FAK (A) S6K1 (B), COX-2 (C) and ERK1/2 (D). Carbons are represented in cyan or orange, nitrogen in blue and oxygens in red. Blue dashed line: hydrogen bond; Grey dashed line: hydrophobic interaction.

(potential attraction and repulsion, solvation effects and steric contacts) for the region were calculated using the GRID software in default set-ting [37,38]. The molecular docking was performed using the GridScore scoring function [39]. A redocking process was performed to verify the accuracy of the docking method to reproduce the crystallographic or-ientation of the complexed ligands to the selected targets. The results were analyzed using Root-Mean-Square Deviation (RMSD) calculated on the DOCK6.8 software. Next, a set of alkene lactones (1–4) were docked against all the proteins.

The analysis of the intermolecular interactions for the top-ranked molecule for each target was performed in the Protein-Ligand Interaction Profiler software [40] and the interaction maps were designed on PyMOL v0.99.

Acknowledgments

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the grants and fellowship. We also thank teacher Abilio Borghi for the grammar review of the manuscript.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.023>.

References

- [1] L. Yin, H. Li, W. Liu, Z. Yao, Z. Cheng, H. Zhang, H. Zou, A highly potent CDK4/6 inhibitor was rationally designed to overcome blood brain barrier in glioblastoma therapy, *Eur. J. Med. Chem.* 144 (2018) 1–28.
- [2] S. Roy, D. Lahiri, T. Maji, J. Biswas, Recurrent glioblastoma: where we stand, *South Asian J. Cancer* 4 (2015) 163–173.
- [3] M. Zielińska-Przyjemka, M. Kaczmarek, V. Krajka-Kuźniak, M. Łuczak, W. Baer-Dubowska, The effect of resveratrol, its naturally occurring derivatives and tannic acid on the induction of cell cycle arrest and apoptosis in rat C6 and human T98G glioma cell lines, *Toxicol. In Vitro* 43 (2017) 69–75.
- [4] Y. Dagistan, I. Karaca, E.R. Bozkurt, E. Ozar, K. Yagmurlu, A. Toklu, A. Bilir, Combination hyperbaric oxygen and temozolomide therapy in C6 rat glioma model, *Acta Cir. Bras.* 27 (2012) 383–387.
- [5] J. Iqbal, B.A. Abbasi, T. Mahmood, S. Kanwal, B. Ali, S.A. Shah, A.T. Khail, Plant-derived anticancer agents: a green anticancer approach, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 7 (2017) 1129–1150.
- [6] R. Scora, B. Bergh, The origin and taxonomy of avocado (*Persea americana* Mill. Lauraceae), *Acta Hort.* 275 (1990) 387–394.
- [7] A.K. Kruthiventi, N. Krishnaswamy, Constituents of the flowers of *Persea gratissima*, *Fitoterapia* 71 (2000) 94–96.
- [8] H. Ding, Y.-W. Chin, A.D. Kinghorn, S.M. D'Ambrosio, Chemopreventive characteristics of avocado fruit, *Semin. Cancer Biol.* 17 (2007) 386–394.
- [9] B.E. Wofford, The systematic significance of flavonoids in *Persea* of the Southeastern United States, *Biochem. Syst. Ecol.* 2 (1974) 89–91.
- [10] A. Gonzalez-Coloma, R. Cabrera, P. Castarera, C. Gutierrez, B.M. Fraga, Insecticidal activity and diterpene content of *Persea indica*, *Phytochemistry* 31 (1992) 1549–1552.
- [11] I.-L. Tsai, C.-F. Hsieh, C.-Y. Duh, I.-S. Chen, Cytotoxic neolignans from *Persea obovatifolia*, *Phytochemistry* 43 (1996) 1261–1263.
- [12] A.N.L. Batista, J.M. Batista Junior, S.N. Lopez, M. Furlan, A.J. Cavalheiro, D.H.S. Silva, V.S. Bolzani, S.M. Nunomura, M. Yoshida, Aromatic compounds from three Brazilian Lauraceae species, *Quim. Nova* 33 (2010) 321–323.
- [13] C.-C. Wang, C.-S. Kuoh, T.-S. Wu, Constituents of *Persea japonica*, *J. Nat. Prod.* 59 (1996) 409–411.
- [14] S. Sepulveda-Boza, S. Delhvi, B.K. Cassels, An aryltetralin lignan from *Persea lingue*, *Phytochemistry* 29 (1990) 2357–2358.
- [15] N. Prasitpan, T. Patharakorn, P. Sutthivaiyakit, P. Denrungruang, Lignans from the bark of *Persea kurzii* Kosterm, *Nat. Sci.* 30 (1996) 493–505.

- [16] M.R. Ramos, G. Jerz, S. Villanueva, F. Lopez-Dellamary, R. Waibel, P. Winterhalter, Two glucosylated abscisic acid derivatives from avocado seeds (*Persea americana* Mill. Lauraceae cv. Hass), *Phytochemistry* 65 (2004) 955–962.
- [17] W. Ma, J.E. Anderson, C. Chang, D.L. Smith, J.L. McLaughlin, Majoranolide and majorynolide: a new pair of cytotoxic and pesticidal alkene alkyne & lactones from *Persea major*, *J. Nat. Prod.* 52 (1989) 1263–1266.
- [18] W. Ma, J.E. Anderson, C. Chang, D.L. Smith, J.L. McLaughlin, Majoranolide: a lactone from *Persea major*, *Phytochemistry* 29 (1990) 2698–2699.
- [19] S.Y. Chang, M.J. Cheng, C.F. Peng, H.S. Chang, I.S. Chen, Antimycobacterial butanolides from the root of *Lindera akoensis*, *Chem. Biodivers.* 5 (2008) 2690–2698.
- [20] A. Falodun, N. Engel, U. Kragl, B. Nebe, P. Langer, Novel anticancer alkene lactone from *Persea americana*, *Pharm. Biol.* 51 (2013) 700–706.
- [21] B.M. Fraga, D. Terrero, Alkene lactones and avocadofurans from *Persea indica*: a revision of the structure majorenolide of and related lactones, *Phytochemistry* 41 (1996) 229–232.
- [22] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144 (2011) 646–674.
- [23] R.S. Ignarro, G. Facchini, D.R. Melo, K.J. Pelizzaro-Rocha, C.V. Ferreira, R.F. Castilho, F. Rogerio, Characteristics of sulfasalazine-induced cytotoxicity in C6 rat glioma cells, *Neurosci. Lett.* 638 (2017) 189–195.
- [24] R.A. Ward, P. Bethel, C. Cook, E. Davies, J.E. Debreczeni, G. Fairley, L. Feron, V. Flemington, M.A. Graham, R. Greenwood, N. Griffin, L. Hanson, P. Hopcroft, T.D. Howard, J. Hudson, M. James, C.D. Jones, C.R. Jones, S. Lamont, R. Lewis, N. Lindsay, K. Roberts, I. Simpson, S. St-Gallay, S. Swallow, J. Tang, M. Tonge, Z. Wang, B. Zhai, Structure-guided discovery of potent and selective inhibitors of ERK1/2 from a modestly active and promiscuous chemical start point, *J. Med. Chem.* 60 (2017) 3438–3450.
- [25] D. Lietha, M.J. Eck, Crystal structures of the FAK kinase in complex with TAE226 and related bis-anilino pyrimidine inhibitors reveal a helical Dfg conformation, *Plos One* 3 (2008) 1–7.
- [26] V. Thiagarajan, S.H. Lin, Y.C. Chia, C.F. Weng, A novel inhibitor, 16-hydroxy-cleroda-3,13-dien-16,15-olide, blocks the autophosphorylation site of focal adhesion kinase (Y397) by molecular docking, *Biochim. Biophys. Acta* 2013 (1830) 4091–4101.
- [27] V. Thiagarajan, S.H. Lin, Y.C. Chang, C.F. Weng, Identification of novel FAK and S6K1 dual inhibitors from natural compounds via ADMET screening and molecular docking, *Biomed. Pharmacother.* 80 (2016) 52–62.
- [28] B. Sever, M.D. Altıntop, G. Kus, M. Ozkurt, A. Ozdemir, Z.A. Kaplancıklı, Indomethacin based new triazolothiadiazine derivatives: synthesis, evaluation of their anticancer effects on T98 human glioma cell line related to COX-2 inhibition and docking studies, *Eur. J. Med. Chem.* 113 (2016) 179–186.
- [29] S.R. Brozell, S. Mukherjee, T.E. Balias, D.R. Roe, D.A. Case, R.C. Rizzo, Evaluation of DOCK 6 as a pose generation and database enrichment tool, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 26 (2012) 749–773.
- [30] B.J. Orlando, M.J. Lucido, M.G. Malkowski, The structure of ibuprofen bound to cyclooxygenase-2, *J. Struct. Biol.* 189 (2015) 62–66.
- [31] Q.-X. Yue, Z.-W. Cao, S.-H. Guan, X.-H. Liu, L. Tao, W.-Y. Wu, Y.-X. Li, P.-Y. Yang, X. Liu, D.-A. Guo, Proteomics characterization of the cytotoxicity mechanism of ganoderic acid D and computer-automated estimation of the possible drug target, *Mol. Cell. Proteom.* 7 (2008) 949–961.
- [32] Tripos International, 2012. Sybyl-X 2.0, Tripos International, St. Louis, MO, USA.
- [33] J. Gasteiger, M. Marsili, Iterative partial equalization of orbital electronegativity – a rapid access to atomic charges, *Tetrahedron* 36 (1980) 3219–3228.
- [34] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605–1612.
- [35] W.J. Allen, T.E. Balias, S. Mukherjee, S.R. Brozell, D.T. Moustakas, P.T. Lang, L. Jiang, T.D. McGee Jr., S. Mukherjee, Y. Zhou, R. Rizzo, D. Case, B. Shoichet, I. Kuntz, DOCK 6: impact of new features and current docking performance, *J. Comput. Chem.* 36 (2015) 1132–1156.
- [36] T.E. Ferrin, C.C. Huang, L.E. Jarvis, R. Langridge, The Midas display system, *J. Mol. Graf.* 6 (1988) 13–27.
- [37] I.D. Kuntz, J.M. Blaney, S.J. Oatley, R. Langridge, T.E. Ferrin, A geometric approach to macromolecule–ligand interactions, *J. Mol. Biol.* 161 (1982) 269–288.
- [38] B.K. Shoichet, I.D. Kuntz, D.L. Bodian, Molecular docking using shape descriptors, *J. Comput. Chem.* 13 (1992) 380–397.
- [39] E.C. Meng, B.K. Shoichet, I.D. Kuntz, Automated docking with grid-based energy evaluation, *J. Comp. Chem.* 13 (1992) 505–524.
- [40] S. Salentin, S. Schreiber, V.J. Haupt, M.F. Adasme, M. Schroeder, PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler, *Nucl. Acids Res.* 43 (2015) W443–W447.
- [41] J. Wang, C. Zhong, F. Wang, F. Qu, J. Ding, Crystal structures of S6K1 provide insights into the regulation mechanism of S6K1 by the hydrophobic motif, *Biochem. J.* 454 (2013) 39–47.

ANEXO II
Espectos de RMN e CLAE-DAD; EM dos compostos isolados de *Persea fulva*

Figura 1: Espectro de RMN de ^1H do composto Majoranolideo B (metanol- d_4 , 500 MHz)

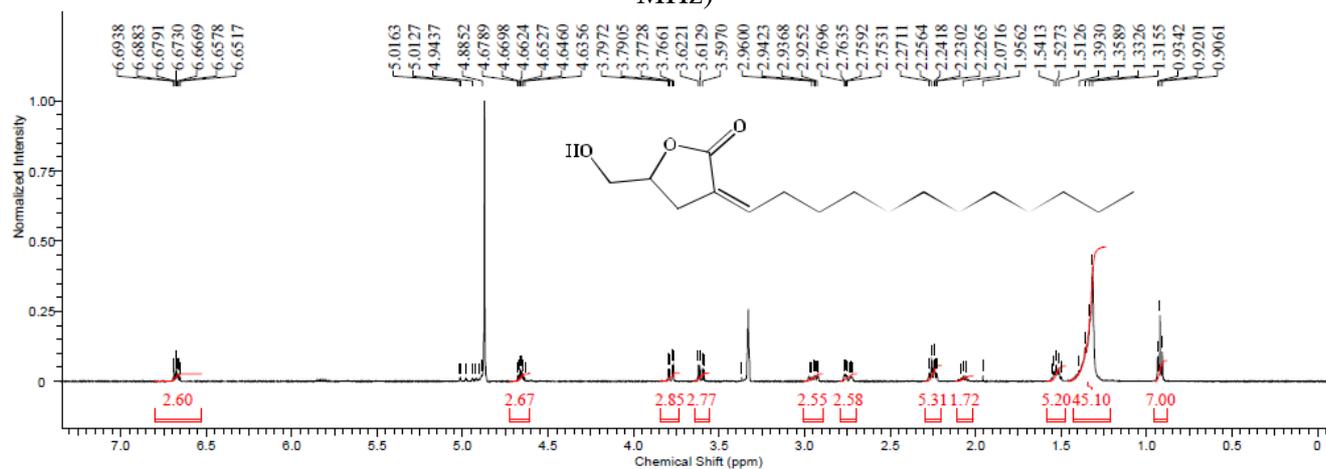


Figura 2: Espectro de RMN de ^{13}C do composto Majoranolideo B (metanol- d_4 , 125 MHz)

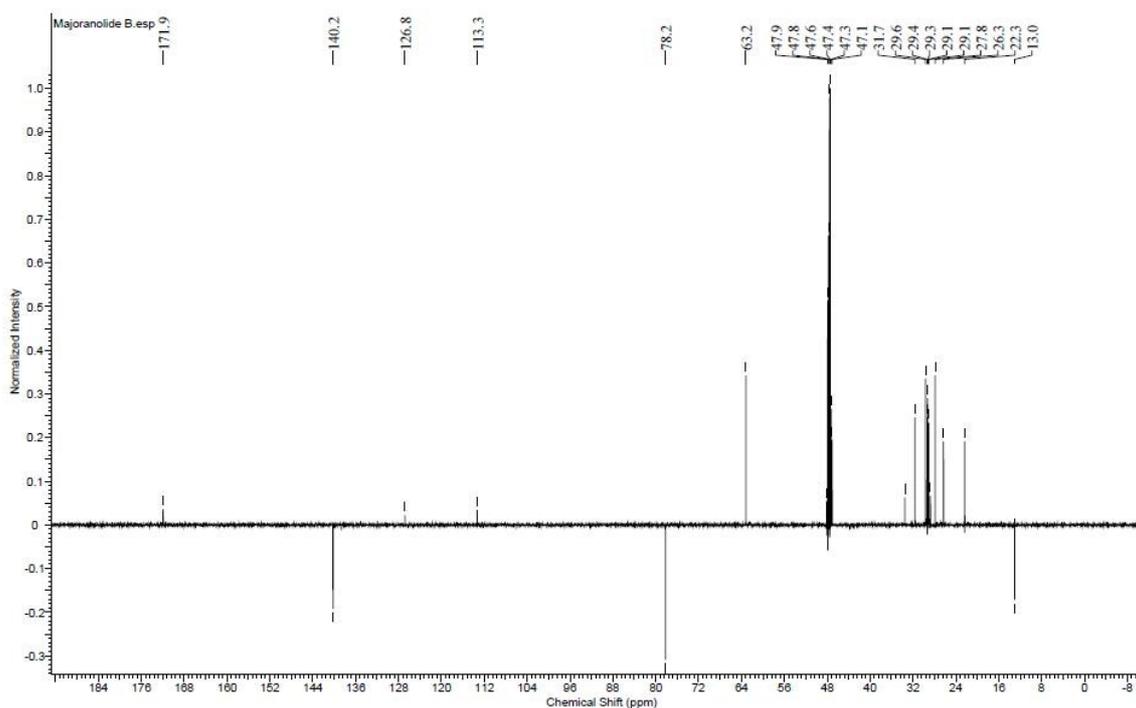


Figura 3: Espectros de massas do composto Majoranolideo B (acima) e expansão do espectro de massas (abaixo)

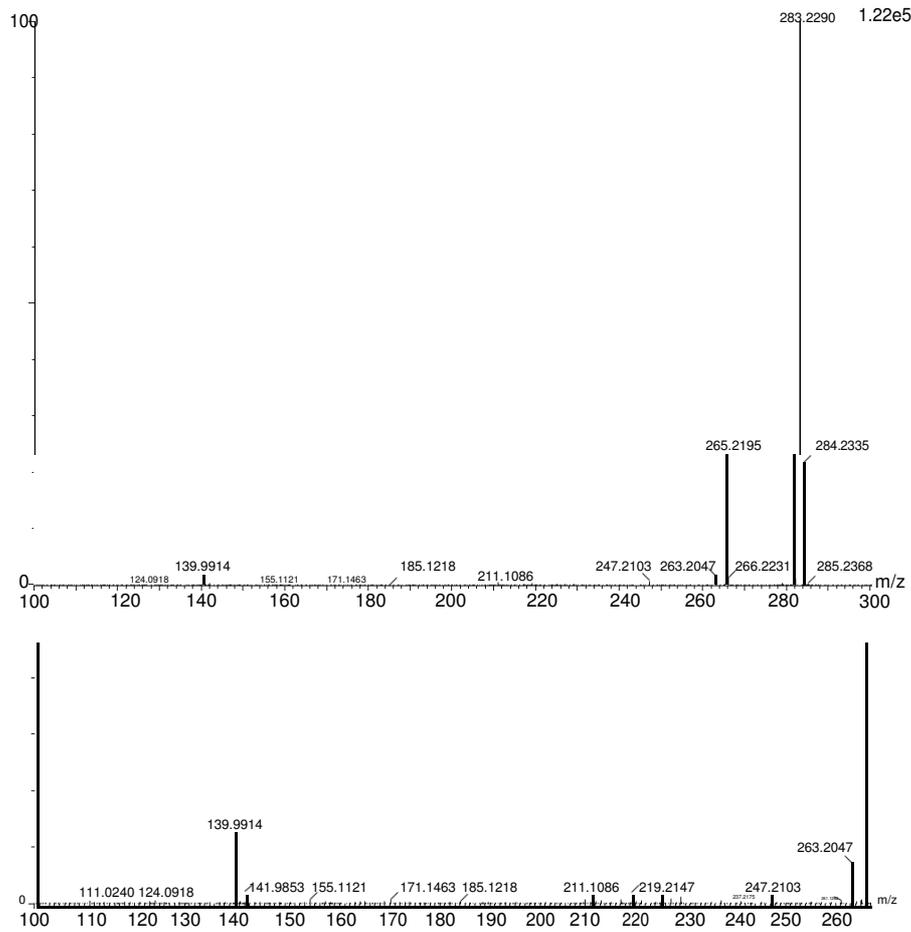


Figura 4: Espectro de RMN de ^1H do composto Majoranolideo (metanol- d_4 , 500 MHz)

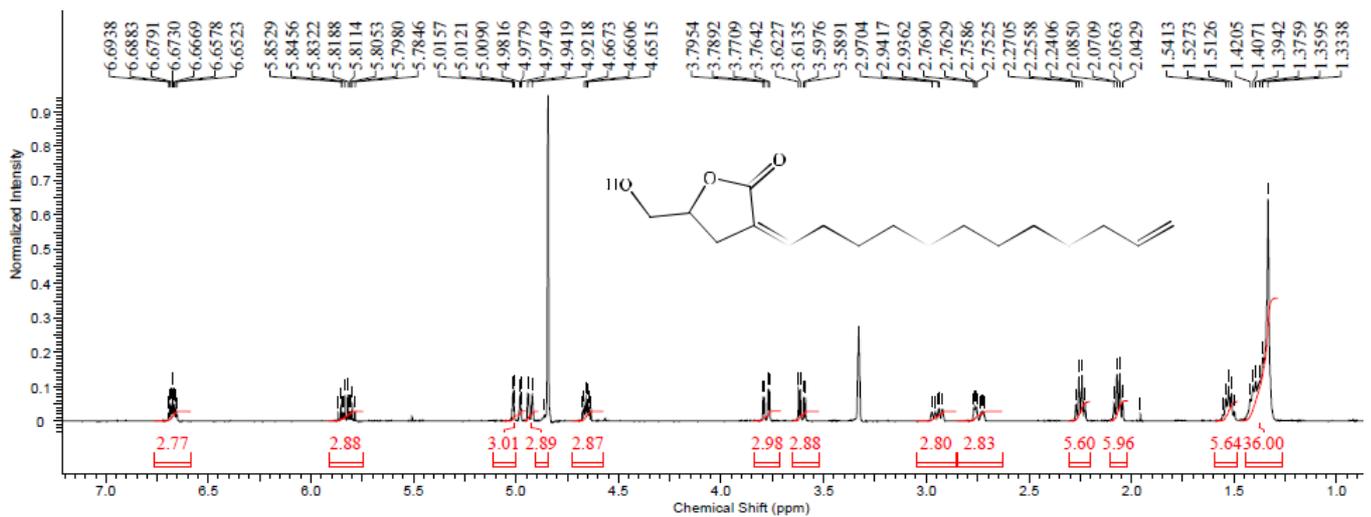


Figura 5: Espectro de RMN de ^{13}C do composto Majorenolideo (metanol- d_4 , 125 MHz)

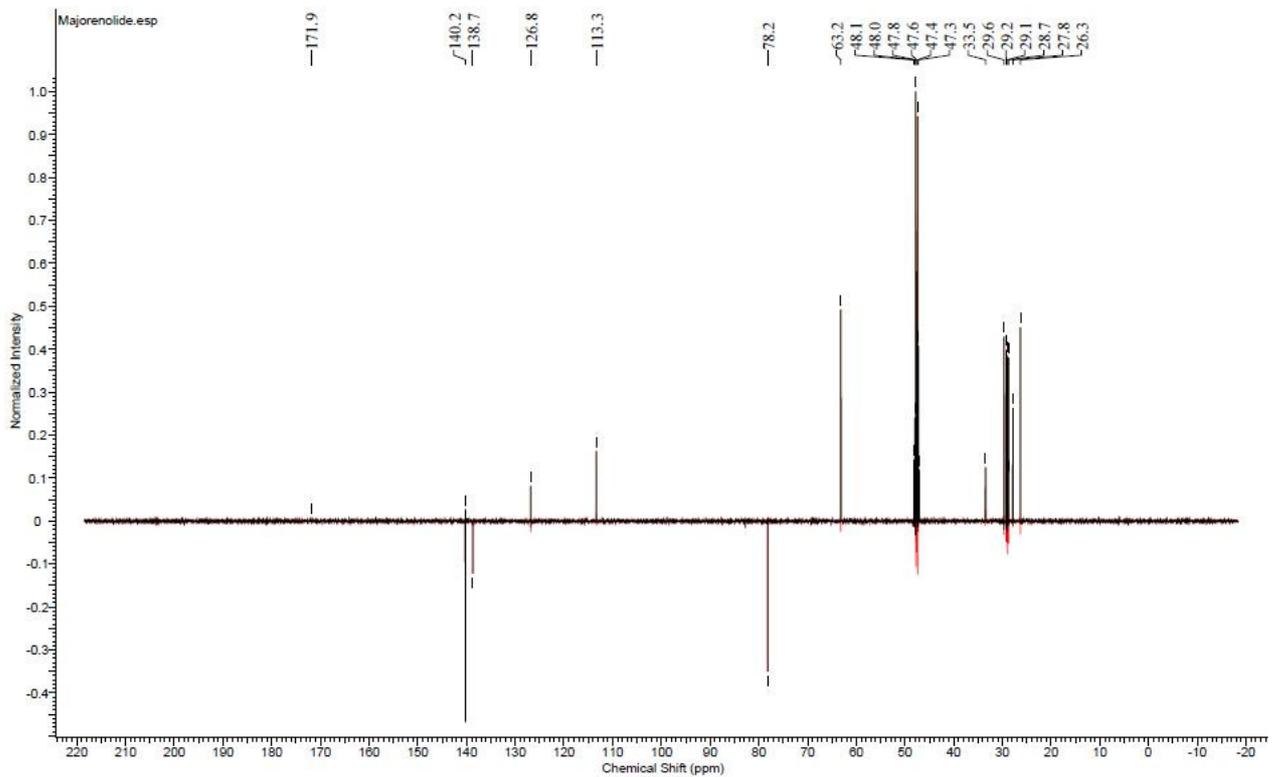


Figura 6: Espectro de massas do composto Majorenolideo

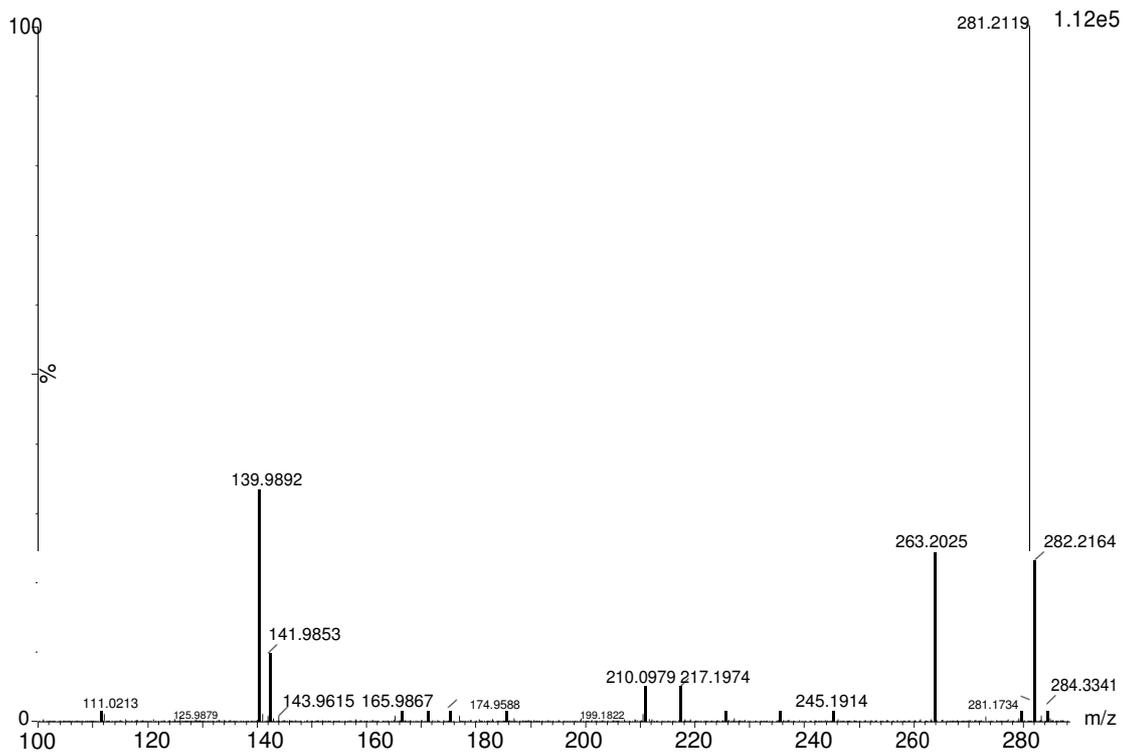


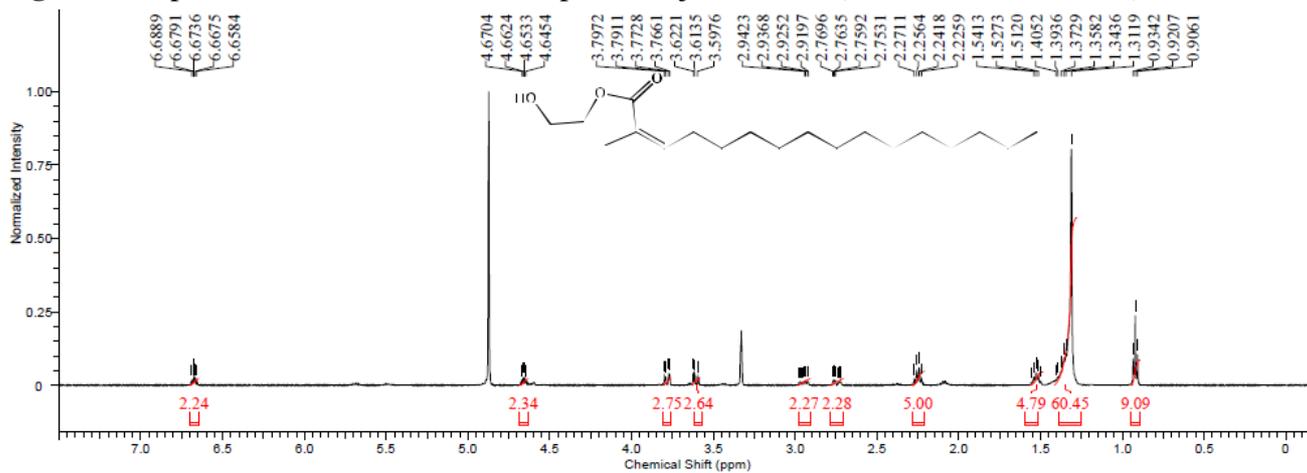
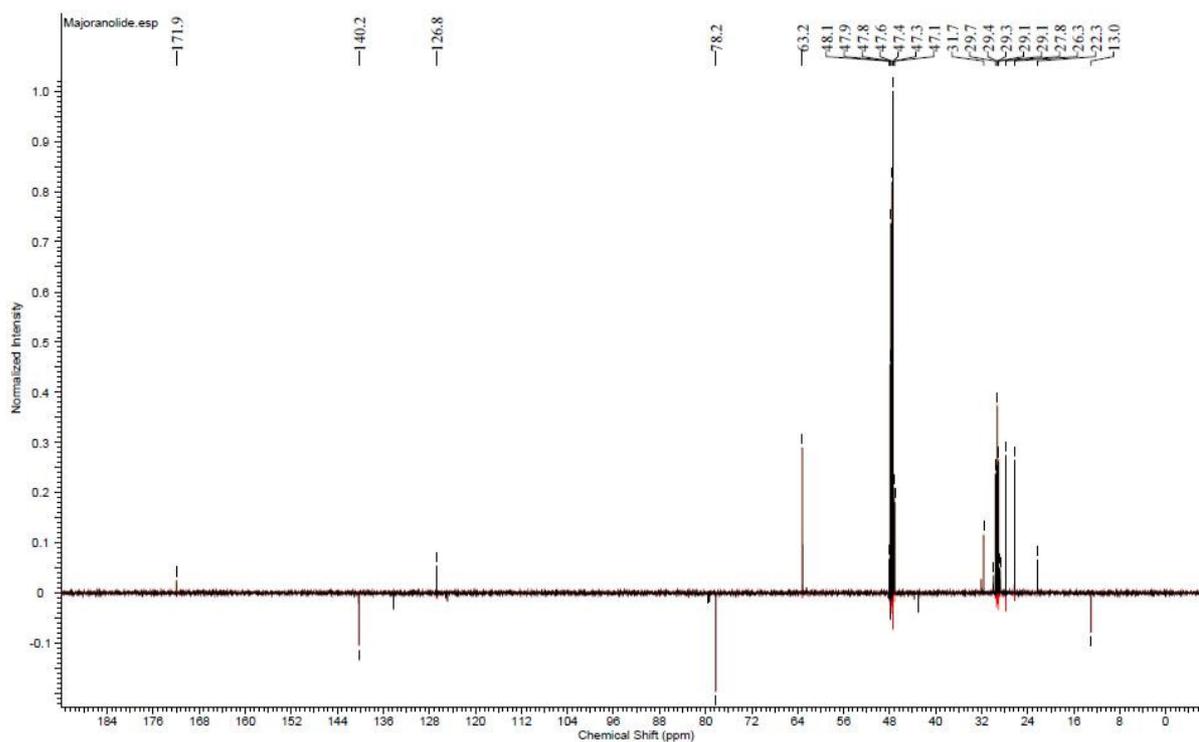
Figura 7: Espectro de RMN de ^1H do composto Majoranolideo (metanol- d_4 , 500 MHz)**Figura 8:** Espectro de RMN de ^{13}C do composto Majoranolideo (metanol- d_4 , 125 MHz)

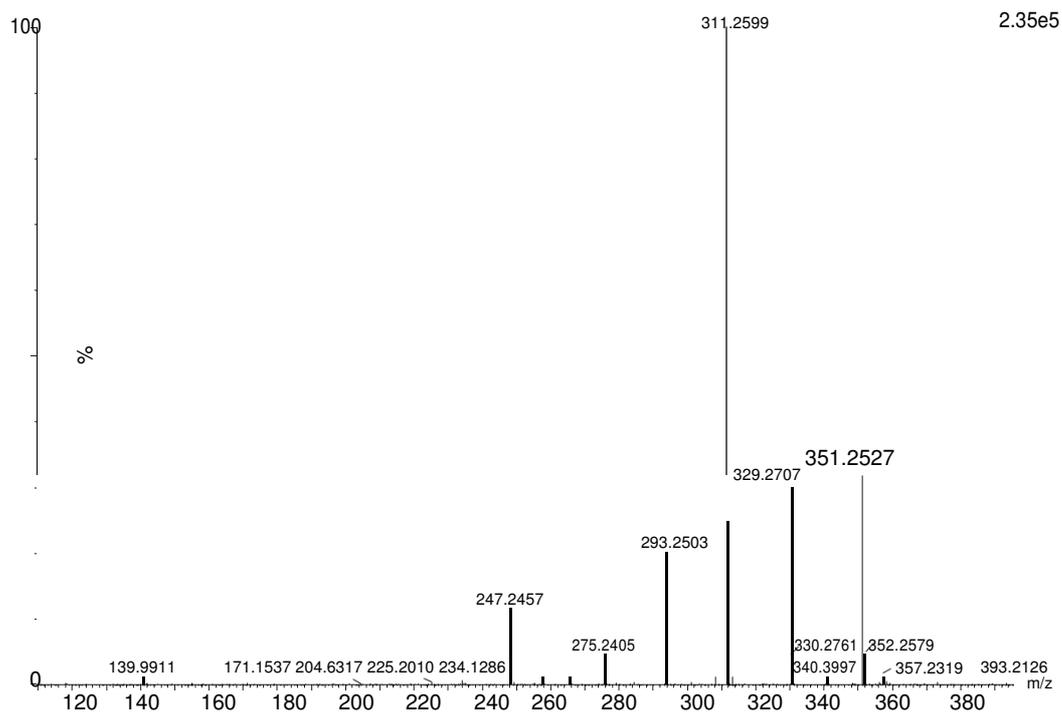
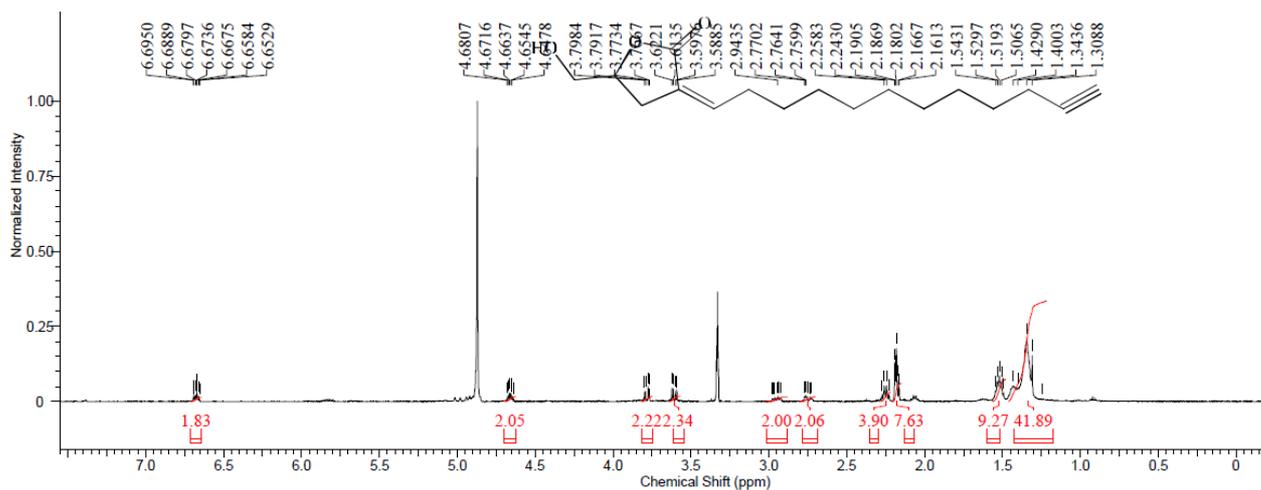
Figura 9: Espectro de massas do composto Majoranolideo**Figura 10:** Espectro de RMN de ^1H do composto Majorinolideo (metanol- d_4 , 500 MHz)

Figura 11: Espectro de RMN de ^{13}C do composto Majorinolideo (metanol- d_4 , 125 MHz)

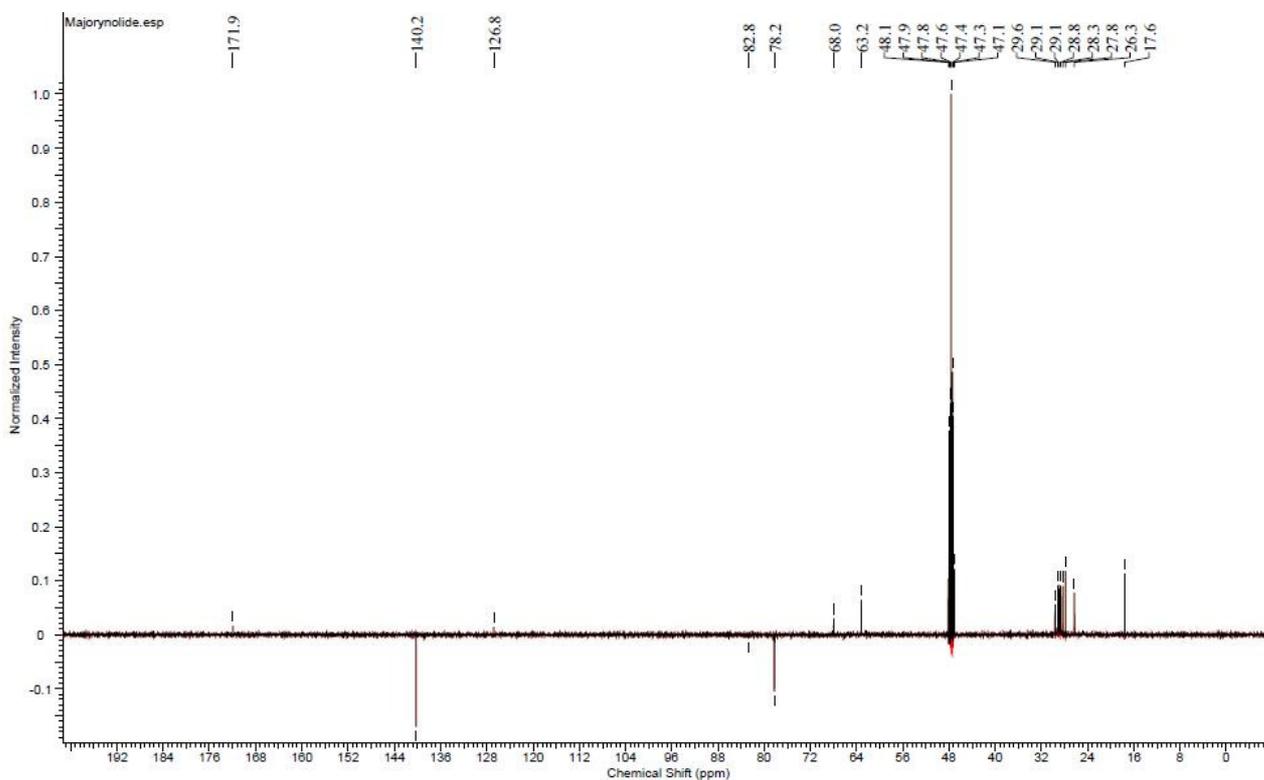


Figura 12: Espectro de massas do composto Majorinolideo

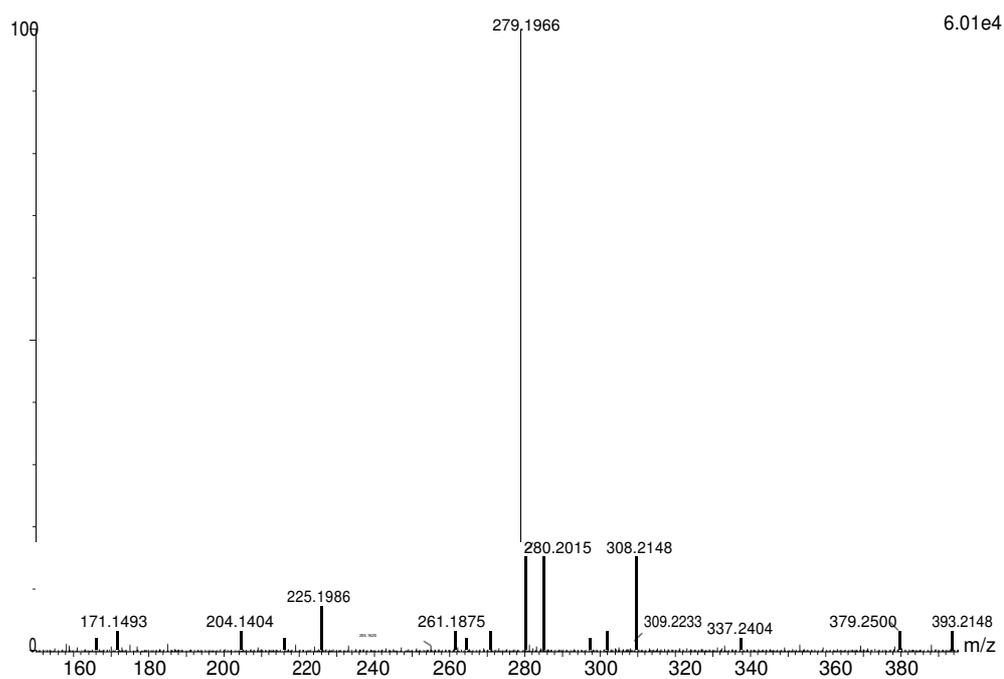


Figura 13: HMBC da lignana, metilpiperitol isolada de *Persea fulva*

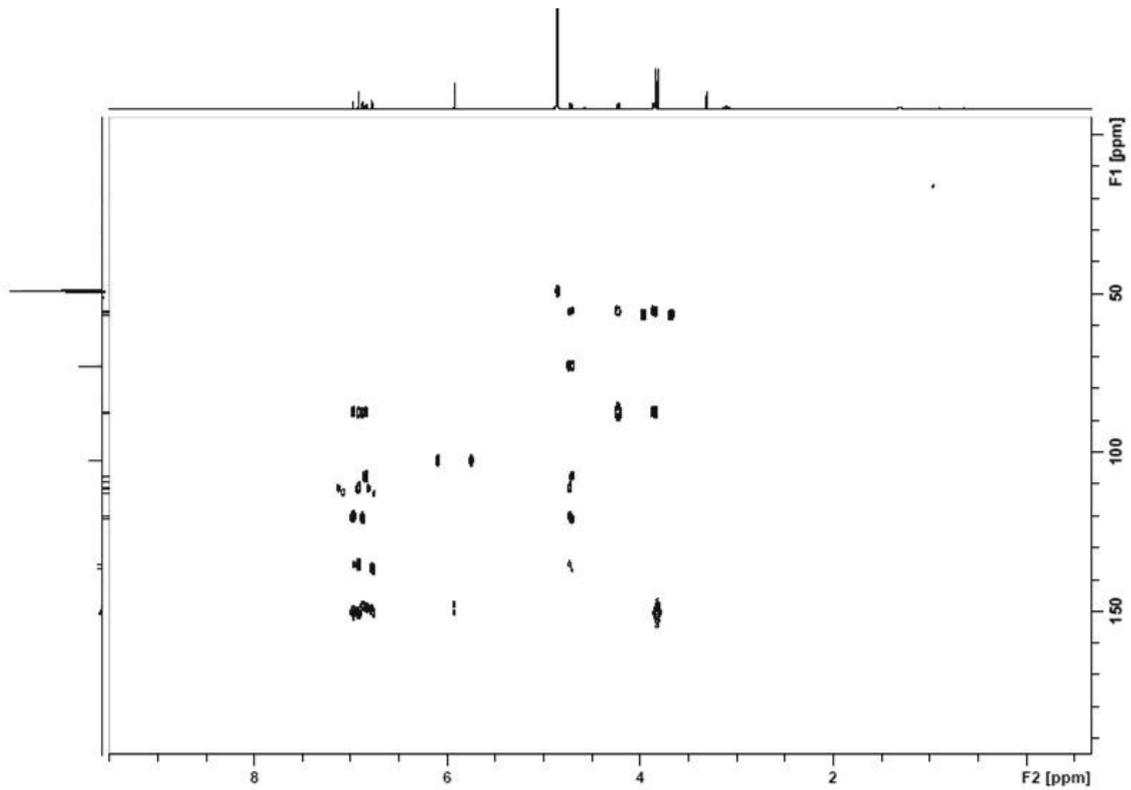


Figura 14: Espectro de massas da lignana, metilpiperitol isolada de *Persea fulva*

