



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**



JOSÉ LUIZ CARNEIRO DA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS *in vitro* E *in silico* DE *Asemeia ovata*
(POLYGALACEAE)**

Feira de Santana - BA
2016

JOSÉ LUIZ CARNEIRO DA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS *in vitro* E *in silico* DE *Asemeia ovata*
(POLYGALACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Neves Brandão

Co-Orientadores: Prof. Dr. Clayton Queiroz Alves

Prof. Dr. Manoelito Coelho Santos Júnior

Feira de Santana, BA
2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

Prof. Dr. Alex Gutterres Taranto

Prof. Dr. Ademir Evangelista do Vale

Prof^a. Dr^a. Vanderlúcia Fonseca de Paula

Prof. Dr. Hugo Neves Brandão

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela proteção e saúde, por iluminar meus caminhos em busca do conhecimento e da realização pessoal.

À minha família, em especial a minha mãe Marta e minha irmã Débora, pelo amor e incentivo durante toda minha vida, e por estarem presentes no decorrer de toda esta jornada.

A Gil, pelo companheirismo, paciência, ajuda e apoio durante todo o processo de realização deste trabalho.

Ao meu orientador Hugo Neves Brandão que vem me acompanhado desde a monografia e continua, em mais uma etapa da minha carreira acadêmica, contribuindo com ensinamentos transmitidos, paciência, confiança e incentivo.

Aos co-orientadores Clayton Queiroz Alvez e Manoelito Coelho Santos Júnior por todos os conhecimentos transmitidos e pela ajuda durante toda a realização do trabalho.

Aos meus colegas de laboratório que contribuíram muito na realização deste trabalho e o tornaram muito mais divertido.

A todos os meus amigos que sempre me deram apoio e acreditaram em mim durante toda essa jornada.

Às outras pessoas que direta ou indiretamente participaram deste projeto, seja ajudando ou dando apoio e incentivo.

À FAPESB e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos colegas e docentes do curso de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da UEFS, pelo respeito, amizade e conhecimento transmitidos.

RESUMO

Espécies da família Polygalaceae são utilizadas tradicionalmente em muitas regiões do mundo e, devido a isso, pesquisas estão sendo realizadas para avaliar as atividades biológicas, como também os aspectos fitoquímicos desses vegetais. Desta forma, o presente trabalho teve como proposta realizar a caracterização química e avaliação de atividades biológicas *in vitro* de extratos da planta inteira e predição *in silico* de novas atividades biológicas das substâncias identificadas de *Asemeia ovata* (Polygalaceae). A caracterização química foi feita através de testes de triagem fitoquímica prévia e *fingerprint* por CLAE-DAD. O isolamento e identificação de substâncias foi realizado por técnicas de cromatografia clássica, CLAE-DAD e RMN de ^1H e ^{13}C . A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* foi feita pelo método de sequestro de radical livre DPPH, atividade anticolinesterásica pela adaptação do método de Ellman e letalidade frente *Artemia salina*. A predição de atividades *in silico* foi feita por métodos de Triagem Virtual Inversa (TVI), seguido de reacoplamento pelo programa DOCK 6.7 e avaliação dos perfis de interação pelo servidor *Protein-Ligand Interaction Profiler*. A caracterização química mostrou que os extratos são ricos em ácidos fenólicos e flavonoides. Foi possível identificar e quantificar, através de CLAE-DAD, as substâncias: rutina, luteolina-7-*O*-glicosídeo, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico e ácido *trans*-ferúlico. Além disso, foi possível isolar as substâncias rutina, poligaleno e um possível novo alcaloide. O extrato acetato de etila mostrou-se superior na avaliação das atividades *in vitro*, com $\text{CE}_{50} = 5,46$ mg/mL para atividade antioxidante, e $\text{CL}_{50} = 71,91$ $\mu\text{g/mL}$ para letalidade frente a *A. salina*. Para a atividade anticolinesterásica não obteve-se resultados significativos ($\% \text{IChE} < 20\%$). A TVI permitiu selecionar, através dos servidores ChemProt 2.0 e DRAR-CPI, os alvos moleculares Anidrase carbônica 12 e Receptor de fator de crescimento epidérmico para a rutina; para a luteolina-7-*O*-glicosídeo os alvos Cotransportador 2 de sódio/glicose e Proteína quinase CDC42 ativada 1; para o poligaleno o alvo Proteína tirosina quinase JAK2; e para os ácidos cafeico, *p*-cumárico e *trans*-ferúlico os melhores alvos foram Receptor de fator de crescimento epidérmico e Ras-relacionada ao substrato C3 da Toxina botulínica 1, Anidrase carbônica 12 e Ornitina carbamoiltransferase, mitocondrial. Esse trabalho fornece resultados inéditos para a espécie, tanto do ponto de vista químico, como biológico, apresentando boas perspectivas de estudo, com interessante potencial a ser descoberto.

Palavras-chave: Cromatografia. Acoplamento molecular. Triagem Virtual Inversa. Rutina. Poligaleno. Flavonoides.

ABSTRACT

Polygalaceae family species are traditionally used in many regions of the world and because of this, research is being conducted to evaluate the biological activities, as well as phytochemicals aspects of these plants. In this way, the present study was to carry out the proposed chemical characterization and evaluation of biological activity *in vitro* of the extract and prediction of new biological activities *in silico* of the substances identified in *Asemeia ovata* (Polygalaceae). The chemical characterization was made through previous phytochemical screening tests and fingerprint by HPLC-DAD. The isolation and identification of compounds was performed by classical chromatography techniques, HPLC-DAD and ^1H and ^{13}C NMR. The evaluation of the antioxidant activity *in vitro* was taken by Scavenging of DPPH free radical method, acetylcholinesterase activity by adapting the method of Ellman and *Artemia salina* lethality. The prediction of activity was made by tools for *in silico* target fishing, followed by docking the DOCK 6.7 program and evaluation of interaction profiles by Protein-Ligand Interaction server profiler. The chemical characterization showed that the extracts are rich in flavonoids and phenolic acids. It was possible to identify and quantify using HPLC-DAD substances: rutin, luteolin-7-*O*-glucoside, caffeic acid, *p*-coumaric acid and *trans*-ferulic acid. Moreover, it was possible to isolate the rutin substance, poligalen and a possible new alkaloid. The ethyl acetate extract was superior in the evaluation of *in vitro* activity with $\text{EC}_{50} = 5.46$ mg/mL for antioxidant activity, and $\text{LC}_{50} = 71.91$ mg/mL *A. salina* lethality. Acetylcholinesterase activity did not yield significant results (AChEIs% <20%). Tools for *in silico* target fishing allowed, through the ChemProt 2.0 and DRAR- CPI-servers, to select the molecular targets carbonic anhydrase 12 and epidermal growth factor receptor for routine; for luteolin-7-*O*-glucoside targets cotransporter 2 sodium / glucose and CDC42-activated protein kinase 1; poligalen to the target protein tyrosine kinase JAK2; and for caffeic acid, *p*-coumaric acid and *trans*-ferulic the best targets were epidermal growth factor receptor and Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, carbonic anhydrase 12 and Ornithine carbamoyltransferase, mitochondrial. This work provides new results for the species, both from a chemical and biological point of view, there is good prospects of study with interesting potential to be discovered.

Keywords: Chromatography. Molecular docking. Target Fishing. Rutin. Poligalen. Flavonoids.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELA	18
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	20
1 INTRODUÇÃO	24
2 REFERENCIAL TEÓRICO	27
2.1 Família Polygalaceae	27
2.2 Técnicas para identificação e isolamento de componentes em produtos naturais	34
2.3 Ensaio Biológicos	38
2.3.1 Atividade antioxidante	39
2.3.2 Atividade anticolinesterásica	40
2.3.3 Avaliação de letalidade frente a <i>Artemia salina</i>	42
2.4 Métodos <i>in silico</i>	43
2.4.1 Triagem Virtual Inversa	45
2.4.1.1 Método de similaridade molecular	48
2.4.1.2 Extração de dados	49
2.4.1.3 Espectro de bioatividades	49
2.4.1.4 Acoplamento molecular	50
2.4.1.5 Servidores de TVI	51
3 MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1 Análise Fitoquímica	55
3.1.1 Coleta e identificação do material vegetal	55
3.1.2 Preparação do extrato e frações	55
3.1.2.1 Purificação das frações	58
3.1.3 Triagem fitoquímica	58
3.1.4 Análise do perfil cromatográfico por CLAE-DAD	61
3.1.5 Quantificação dos compostos identificados	62
3.1.6 Determinação de fenólicos e flavonoides totais	63
3.2 Estudos biológicos	66
3.2.1 Avaliação da atividade antioxidante	66
3.2.2 Atividade anticolinesterásica	67
3.2.3 Letalidade frente à <i>Artemia salina</i>	68
3.3 Triagem Virtual Inversa	69
3.3.1 Identificação dos alvos moleculares	69
3.3.2 Acomplamento Molecular	71
3.3.2.1 Busca e seleção por complexos cristalográficos	71

3.3.2.2	Análise das interações intermoleculares	72
3.3.3	Predição da toxicidade aguda das moléculas	72
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1	Análise Fitoquímica	73
4.1.1	Elucidação Estrutural	73
4.1.2	<i>Fingerprint</i> e triagem fitoquímica	95
4.1.3	Validação e Quantificação das substâncias identificadas por CLAE-DAD	98
4.1.4	Fenólicos e flavonoides totais	103
4.2	Atividades biológicas	105
4.2.1	Atividade antioxidante	105
4.2.2	Atividade anticolinesterásica	108
4.2.3	Avaliação da letalidade frente à <i>A. salina</i>	109
4.3	Triagem virtual inversa	111
4.3.1	Chemprot 2.0	112
4.3.1.1	Seleção dos alvos	113
4.3.1.2	Acomplamento molecular	119
4.3.1.2.1	Receptor de estrogênio	121
4.3.1.2.2	Anidrase carbônica 12	124
4.3.1.2.3	Anidrase carbônica 9	131
4.3.1.2.4	Anidrase carbônica 1	137
4.3.1.2.5	Cotransportador 2 de sódio/glicose	141
4.3.1.2.6	Aldose redutase	145
4.3.1.2.7	Receptor de fator de crescimento epidérmico	149
4.3.1.2.8	Enzima conversora de angiotensina	153
4.3.1.2.9	Succinato-semialdeído desidrogenase	156
4.3.1.2.10	Anidrase carbônica 13	159
4.3.1.2.11	Anidrase carbônica 2	161
4.3.2	DRAR-CPI	164
4.3.2.1	Seleção dos alvos	164
4.3.2.2	Acoplamento molecular	165
4.3.2.2.1	Receptor do fator de crescimento epidérmico (RFCE)	168
4.3.2.2.2	Proteína quinase dependente de 3-fosfoinositídeo (CD3F)	172
4.3.2.2.3	Glicogênio sintase quinase 3 β (GSQ3 β)	175
4.3.2.2.4	Fator de coagulação VII (FC VII)	178
4.3.2.2.5	Receptor do fator de crescimento do fibroblasto 2 (RFCF2)	182
4.3.2.2.6	Proteína quinase s6 ribossomal alfa 1 (CS6)	185
4.3.2.2.8	Proteína 1 da triáde de histidina de ligação do nucleotídeo (P1TH)	193

4.3.2.2.9 Beta-1,4-galactosiltransferase 1	196
4.3.2.2.10 Receptor glicocorticoide	199
4.3.2.2.11 Ras-relacionada ao substrato C3 da Toxina botulínica 1 (RAC-1)	202
4.3.2.2.12 Ornitina carbamoiltransferase, mitocondrial (ORN)	206
4.3.2.2.13 2-oxoisovalerato deidrogenase subunidade alfa, mitocondrial (2OD)	210
4.3.2.2.14 Carbonil redutase [NADPH] 3 (CBR3)	214
4.3.2.2.15 Fator inibitório de migração de macrófago (FIMM)	219
4.3.2.2.16 Maleilacetoacetato isomerase (MAAI)	222
4.3.2.2.17 Malato desidrogenase, mitocondrial (MDH)	226
4.3.2.2.18 Albumina de soro humano (ASH)	228
4.3.2.2.19 Proteína quinase de divisão celular 2 (CDC2)	231
4.3.2.2.20 Proteína tirosina quinase JAK2	233
4.3.2.2.21 MAP quinase - ativada por proteína quinase 2 (MQ2)	236
4.3.3 Avaliação dos alvos	239
4.3.4 GUSAR <i>Antitarget/Toxicity Prediction</i>	242
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	244
REFERÊNCIAS	246

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Compostos isolados de espécies de Polygalaceae	28
Figura 2 - (A) <i>A. floribunda</i> ; (B) <i>A. glabra</i> ; (C) <i>A. lindmaniana</i> ; (D) <i>A. monninooides</i> ; (E) <i>A. monticola</i> ; (F) <i>A. pohliana</i> ; (G) <i>A. violacea</i>	31
Figura 3 - Asemeia ovata	32
Figura 4 - Distribuição da espécie <i>A. ovata</i> pelo Brasil (estados coloridos representam regiões de distribuição da espécie no país)	33
Figura 5 - <i>P. decumbens</i> A. W. Benn coletada no Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil, (a) Planta inteira, (b) detalhes da inflorescência (Título extraído de Frasson et al (2012); (c) <i>P. trichosperma</i> (d) <i>A. ovata</i> (<i>P. decumbens</i>)	34
Figura 6 - Redução do radical livre DPPH pelo flavonoide antioxidante quercetina	40
Figura 7 - Microcrustáceo <i>Artemia salina</i>	42
Figura 8 - Um fluxo de trabalho de predição alvo <i>in silico</i> .	47
Figura 9 - Etapas de preparo dos extratos de <i>A. ovata</i> (à esquerda concentração do EBAO, à direita partição)	56
Figura 10 - Coluna Cromatográfica do ECAO (à esquerda visualização em UV a 365 nm, à direita visualização em luz visível)	57
Figura 11 - Estrutura do ácido gálico	64
Figura 12 - Estrutura química da quercetina	65
Figura 13 - Padrão de quercetina após reação de 10 min com AlCl ₃ (aumento da coloração indica complexação com alumínio)	66
Figura 14 - Ilustração de amostras após 15 min de reação com DPPH (coloração variando de roxa para amarela indica aumento da atividade antioxidante)	66
Figura 15 - Ilustração da reação de Ellman em amostras (diminuição da coloração indica inibição de AchE)	68
Figura 16 - Teste de <i>Artemia salina</i>	69
Figura 17 - Estrutura química da SFA6-J31	73
Figura 18 - Espectro de RMN de ¹ H da SFA6-J31 [500 MHz, Clorofórmio, δ (ppm)]	75
Figura 19 - Espectro de RMN de ¹³ C da SFA6-J31 [500 MHz, Clorofórmio, δ (ppm)]	76
Figura 20 - Principais correlações observadas no espectro de HMBC da SFA6-J31	77
Figura 21 - Espectro de HMQC da SFA6-J31	78
Figura 22 - Espectro de HMQC da SFA6-J31 (ampliação)	79
Figura 23 - Espectro de HMBC da SFA6-J31	80
Figura 24 - Espectro de HMBC da SFA6-J31 (ampliação)	81
Figura 25 - Cromatograma e espectro no UV da subfração SFA6-J58	82
Figura 26 - Cromatograma e espectro no UV da subfração SFA11-A	83
Figura 27 - Estrutura química da SFA11-A (poligaleno)	83
Figura 28 - Espectro de Massas SFA11-A	84
Figura 29 - Espectro de RMN de ¹ H da SFA11-A [500 MHz, Piridina, δ (ppm)] – ampliação 1	85
Figura 30 - Espectro de RMN de ¹ H da SFA11-A [500 MHz, Piridina, δ (ppm)] – ampliação 2	86
	86
Figura 31 - Integração do espectro de RMN de ¹ H da SFA11-A [500 MHz, Piridina, δ (ppm)]	87
	87
Figura 32 - Espectro de RMN de ¹³ C da SFA11-A [125 MHz, Piridina, δ (ppm)] – ampliação 1	88
	88
Figura 33 - Espectro de RMN de ¹³ C da SFA11-A [125 MHz, Piridina, δ (ppm)] – ampliação 2	89
	89
Figura 34 - Espectro de DEPT 135° da SFA11-A [125 MHz, Piridina, δ (ppm)]	90

Figura 35 - Principais correlações observadas no espectro de HMBC da SFA11-A	91
Figura 36 - Espectro de HMQC da SFA11-A	92
Figura 37 - Espectro de HMBC da SFA11-A – ampliação 1	93
Figura 38 - Espectro de HMBC da SFA11-A – ampliação 2	94
Figura 39 - Comparação dos cromatogramas em diferentes comprimentos de onda de (A) EBAO, (B) ECAO, (C) EAAO e (D) EHAO	96
Figura 40 - Cromatograma e Espectros no UV ilustrativo do EBAO	97
Figura 41 - Cromatograma (1) dos padrões e (2) extratos analisados em CLAE-DAD. (A) Ácido gálico, (B) Catequina, (C) Procianidina, (D) Ácido cafeico, (E) Epicatequina, (F) Rutina, (G) Ácido <i>trans</i> -ferúlico, (H) Quercetina, (I) Ácido <i>trans</i> -cinâmico, (J) Canferol, (K) Formononetina, (L) Canferide, (M) Propilgalato, (N) Ácido <i>p</i> -cumárico, (O) Luteolina-7- <i>O</i> -glicosídeo, (P) Emetina, (Q) Luteolina e (R) Artepelin.	99
Figura 42 - Estrutura do ácido cafeico (1), ácido <i>p</i> -cumárico (2), ácido <i>trans</i> -ferúlico (3), rutina (4) e luteolina-7- <i>O</i> -glicosídeo (5)	100
Figura 43 - Curvas de calibração das 5 substâncias identificadas	101
Figura 44 - Curva-padrão Ácido gálico	103
Figura 45 - Curva-padrão Quercetina	104
Figura 46 - Curvas analíticas para determinação de CE ₅₀ dos extratos <i>A. ovata</i>	105
Figura 47 - Curvas analíticas para determinação de CL ₅₀ dos extratos <i>A. ovata</i>	109
Figura 48 - Valores de RMSD (Å) após o reacoplamento de cada alvo selecionado pelo ChemProt 2.0. Configuração cristalográfica em vermelho e ligante após reacoplamento em verde	120
Figura 49 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da luteolina-7- <i>O</i> -glicosídeo com RE. Proteína: azul, luteolina-7- <i>O</i> -glicosídeo: laranja, ligações hidrofóbicas: barra cinza, interações de hidrogênio: barra azul	122
Figura 50 - Perfil de interação do ligante 369 com RE. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações de hidrogênio: barras azuis, interações π -paralelas: barras tracejadas verdes	123
Figura 51 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação dos ácidos cafeico (1) e <i>p</i> -cumárico (2) com AC 12. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações de hidrogênio: barras azuis, pontes salinas: barras pontilhadas amarelas, interações π -cátion: barras tracejadas laranja	125
Figura 52 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido <i>trans</i> -ferúlico com AC 12. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações de hidrogênio: barras azuis, interações π -cátion: barras tracejadas laranja	125
Figura 53 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da rutina com AC 12. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações de hidrogênio: barras azuis, interações π -cátion: barras tracejadas laranja	126
Figura 54 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da luteolina-7- <i>O</i> -glicosídeo com AC 12. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações de hidrogênio: barras azuis, interações π -paralelas: barras tracejadas verde	127
Figura 55 - Perfil de interação do ligante E1G com AC 12. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações de hidrogênio: barras azuis, interações de hidrogênio mediada por água: barras cinza, complexo com metal: barra pontilhada magenta	128
Figura 56 - Estrutura do (A) ligante E1G, (B) ácido cafeico, (C) ácido <i>p</i> -cumárico, (D) ácido <i>trans</i> -ferúlico, (E) rutina e (F) luteolina-7- <i>O</i> -glicosídeo	129
Figura 57 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido cafeico com AC 9. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações de	

hidrogênio: barras azuis, interações π -cátion: barras tracejadas laranja, pontes salinas: barras pontilhadas amarela	132
Figura 58 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido <i>p</i> -cumárico com AC 9. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações de hidrogênio: barras azuis, interações π -paralela: barras tracejadas verde, pontes salinas: barras pontilhadas amarela	133
Figura 59 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da rutina com AC 9. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações de hidrogênio: barras azuis, interações π -cátion: barras tracejadas laranja	133
Figura 60 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da luteolina-7- <i>O</i> -glicosídeo com AC 9. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações de hidrogênio: barras azuis, interações π -paralela	134
Figura 61 - Perfil de interação do ligante AZM com AC 9. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, interações de hidrogênio: barras azul, interações de hidrogênio mediada por água: barras cinza	135
Figura 62 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido <i>trans</i> -ferúlico com AC 1. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza	137
Figura 63 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da rutina com AC 1. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, interações π -cátion: barras tracejadas laranja, pontes salina: barras pontilhadas amarela	138
Figura 64 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da luteolina-7- <i>O</i> -glicosídeo com AC 1. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, interações π -cátion: barras tracejadas laranja, pontes salina: barras pontilhadas amarela	138
Figura 65 - Perfil de interação do ligante M29 com AC 1. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, interações π -cátion: barras tracejadas laranja, pontes salina: barras pontilhadas amarela	139
Figura 66 - Estruturas de inibidores de CSGL	141
Figura 67 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da rutina com CSGL. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, interações π -paralela: barras tracejadas verde	142
Figura 68 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da luteolina-7- <i>O</i> -glicosídeo com CSGL. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis	143
Figura 69 - Perfil de interação do ligante GAL com CSGL. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barras azuis	144
Figura 70 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido cafeico com AR. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, interações π -paralela: barras tracejadas verde	146
Figura 71 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido <i>trans</i> -ferúlico com AR. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, interações π -paralela: barras tracejadas verde	147
Figura 72 - Perfil de interação do ligante PAC com AR. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, ponte salina: barras pontilhadas amarela	148
Figura 73 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido cafeico com RFCE. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis	150

- Figura 74** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *p*-cumárico com RFCE. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis 150
- Figura 75** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *trans*-ferúlico com RFCE. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, interações π -paralela: barras tracejadas verde 151
- Figura 76** - Perfil de interação do ligante TAK-285 com RFCE. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, interações π -paralela: barras tracejadas verde, ligação com halogênio: barras ciano 152
- Figura 77** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido cafeico com ECA. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela 154
- Figura 78** - Perfil de interação do ligante Captopril com ECA. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela; complexo com metal: barras pontilhadas magenta 155
- Figura 79** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *p*-cumárico com SSADH. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela; interações π -paralelas: barras tracejadas verde 157
- Figura 80** - Perfil de interação do ligante ADP com SSADH. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis 158
- Figura 81** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *p*-cumárico com AC 13. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela; interações π -cátion: barras tracejadas laranja 159
- Figura 82** - Perfil de interação do ligante V13 com AC 13. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barras azuis, ligações de hidrogênio mediada por água: barras cinza, complexos com metal: barras pontilhadas magenta 160
- Figura 83** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *trans*-ferúlico com AC 2. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela 162
- Figura 84** - Grid score e perfil de interação do ligante 5RD com AC 2. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis 163
- Figura 85** - Valores de RMSD (Å) após o reacoplamento molecular de cada alvo selecionado pelo DRAR-CPI. Configuração cristalográfica em vermelho e ligante após reacoplamento em verde 166
- Figura 86** - Acoplamento da rutina com o alvo 1M17 pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1. 169
- Figura 87** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da rutina com RFCE. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela 170
- Figura 88** - Perfil de interação do ligante Erlotinib com RFCE. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, interações de hidrogênio mediada por água 171
- Figura 89** - Acoplamento da rutina com o alvo 2BIY pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1. 172

- Figura 90** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da rutina com CD3F. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela 173
- Figura 91** - Perfil de interação do ligante ATP com CD3F. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela 174
- Figura 92** - Acoplamento da rutina com o alvo 1J1B pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1. 175
- Figura 93** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da rutina com GSQ3 β . Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela, interações π -cátion: barras tracejadas laranja 176
- Figura 94** - Perfil de interação do ligante AMPPNP com GSQ3 β . Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barras azuis, ligações de hidrogênio mediadas por água: barras cinza, pontes salina: barras pontilhadas amarela 177
- Figura 95** - Acoplamento da rutina com o alvo 1Z6J pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1. 179
- Figura 96** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da rutina com FC VII. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela, interações π -cátion: barras tracejadas laranja 180
- Figura 97** - Grid score e perfil de interação do ligante PY3 com FC VII. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, ligações de hidrogênio mediadas por água, interações π -paralelas: barras tracejadas verde, interações π -cátion: barras tracejadas laranja 181
- Figura 98** - Acoplamento da rutina com o alvo 2PVY pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1. 182
- Figura 99** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da rutina com RFCF2. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela 183
- Figura 100** - Perfil de interação do ligante ACP com RFCF2. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barras azuis, ligações de hidrogênio mediadas por água 184
- Figura 101** - Acoplamento da luteolina-7-*O*-glicosídeo (A) e do poligaleno (B) com o alvo 2Z7R pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1. 185
- Figura 102** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da luteolina-7-*O*-glicosídeo com CS6. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis 186
- Figura 103** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do poligaleno com CS6. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis 187
- Figura 104** - Perfil de interação do ligante STU com CS6. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis 188
- Figura 105** - Acoplamento da luteolina-7-*O*-glicosídeo (A) e do poligaleno (B) com o alvo 1U54 pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1. 190

- Figura 106** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da luteolina-7-*O*-glicosídeo com CDC42. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul 191
- Figura 107** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do poligaleno com CDC42. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela 191
- Figura 108** - Perfil de interação do ligante ACP com CDC42. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela 192
- Figura 109** - Acoplamento da luteolina-7-*O*-glicosídeo com o alvo 1KPF pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1. 193
- Figura 110** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da luteolina-7-*O*-glicosídeo com P1TH. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, interações π -paralela: barra tracejada verde 194
- Figura 111** - Perfil de interação do ligante AMP com P1TH. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barra azul, interações π -paralela: barra tracejada verde, pontes salina: barra pontilhada amarela 195
- Figura 112** - Acoplamento da luteolina-7-*O*-glicosídeo com o alvo 2FYB pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1. 196
- Figura 113** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da luteolina-7-*O*-glicosídeo com Beta-1,4-galactosiltransferase 1. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, interações π -paralela: barra tracejada verde, interações π -cátion: barra tracejada laranja, pontes salina: barra pontilhada amarela 197
- Figura 114** - Perfil de interação do ligante UDP com Beta-1,4-galactosiltransferase 1. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barra azul, ligações de hidrogênio mediadas por água: barra cinza, interações π -paralela: barra tracejada verde, interações π -cátion: barra tracejada laranja, pontes salina: barra pontilhada amarela, complexo com metal: barra pontilhada magenta 198
- Figura 115** - Acoplamento da luteolina-7-*O*-glicosídeo com o alvo 1NHZ pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1. 199
- Figura 116** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da luteolina-7-*O*-glicosídeo com Receptor de glicocorticóide. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, interações π -paralela: barra tracejada verde 200
- Figura 117** - Perfil de interação do ligante 486 com Receptor de glicocorticoide. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, ligações de hidrogênio mediadas por água: barra cinza 201
- Figura 118** - Acoplamento dos ácidos cafeico e *p*-cumárico com o alvo 1E96 pelo servidor DRAR-CP. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1. 202
- Figura 119** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido cafeico com RAC-1. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, interações π -paralela: barra tracejada verde 203

- Figura 120** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *p*-cumárico com RAC-1. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, interações π -paralela: barra tracejada verde 204
- Figura 121** - Perfil de interação do ligante GTP com RAC-1. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barra azul, ligações de hidrogênio mediadas por água: barra cinza, interações π -paralela: barra tracejada verde, pontes salina: barra pontilhada amarela, complexo com metal: barra pontilhada magenta 204
- Figura 122** - Acoplamento do ácido *trans*-ferúlico (A), cafeico (B) e *p*-cumárico (C) com o alvo 1OTH pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1. 206
- Figura 123** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido cafeico com ORN. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barra azul 207
- Figura 124** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação dos ácidos *p*-cumárico e *trans*-ferúlico com ORN. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela 208
- Figura 125** - Perfil de interação do ligante NFLO com ORN. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul 209
- Figura 126** - Acoplamento do ácido cafeico (A) e do ácido *p*-cumárico (B) com o alvo 1OLS pelo servidor DRAR-CP. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1. 210
- Figura 127** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido cafeico com 2OD. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela, interações π -cátion: barra tracejada laranja 211
- Figura 128** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *p*-cumárico com 2OD. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela 212
- Figura 129** - Perfil de interação do ligante TDP com 2OD. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, ligações de hidrogênio mediadas por água, pontes salina: barra pontilhada amarela, complexo com metal: barra pontilhada magenta 213
- Figura 130** - Acoplamento do ácido *trans*-ferúlico (A), *p*-cumárico (B) e cafeico (C) com o alvo 2HRB pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1. 215
- Figura 131** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido cafeico com CBR3. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela 216
- Figura 132** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação dos ácidos *p*-cumárico e *trans*-ferúlico com CBR3. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela, interações π -cátion: barra tracejada laranja 217
- Figura 133** - Perfil de interação do ligante NADP⁺ com CBR3. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, ligações de hidrogênio mediadas por água: barra cinza, pontes salina: barra pontilhada amarela, interações π -cátion: barra tracejada laranja 217

- Figura 134** - Acoplamento do ácido cafeico com o alvo 1GCZ pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1. 219
- Figura 135** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido cafeico com FIMM. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela 220
- Figura 136** - Perfil de interação do ligante YZ9 com FIMM. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela, interações π -paralela: barra tracejada verde 221
- Figura 137** - Acoplamento do ácido *trans*-ferúlico (A) e do ácido *p*-cumárico (B) com o alvo 1FW1 pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1. 222
- Figura 138** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *p*-cumárico com MAAI. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul 223
- Figura 139** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *trans*-ferúlico com MAAI. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul 224
- Figura 140** - Perfil de interação do ligante GSH com MAAI. Proteína: azul, ligante: laranja, água: esfera cinza, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, ligações de hidrogênio mediadas por água: barra cinza, pontes salina: barra pontilhada amarela 225
- Figura 141** - Acoplamento do ácido *trans*-ferúlico com o alvo 2DFD pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1. 226
- Figura 142** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *trans*-ferúlico com MDH. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela 227
- Figura 143** - Perfil de interação do ligante D-malato com MDH. Proteína: azul, ligante: laranja, água: esfera cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, ligações de hidrogênio mediadas por água: barra cinza, pontes salina: barra pontilhada amarela 227
- Figura 144** - Acoplamento do ácido *trans*-ferúlico com o alvo 2BX8 pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1. 229
- Figura 145** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *trans*-ferúlico com ASH. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela 229
- Figura 146** - Perfil de interação do ligante AZQ com ASH. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, interação π -paralela: barra tracejada verde 230
- Figura 147** - Acoplamento do poligaleno com o alvo 1OIQ pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1. 231
- Figura 148** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do poligaleno com CDC2. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, pontes salina: barra pontilhada amarela 232

- Figura 149** - Perfil de interação do ligante HDU com CDC2. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul 233
- Figura 150** - Acoplamento do poligaleno com o alvo 2B7A pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1. 234
- Figura 151** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do poligaleno com JAK2. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul 235
- Figura 152** - Grid score e perfil de interação do ligante IZA com JAK2. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul 236
- Figura 153** - Acoplamento do poligaleno com o alvo 1NY3 pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1. 237
- Figura 154** - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do poligaleno com MQ2. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela 237
- Figura 155** - Grid score e perfil de interação do poligaleno com MQ2. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela 238

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Atividades biológicas atribuídas à espécies de Polygalaceae	29
Tabela 2 - Classificação da cromatografia	35
Tabela 3 – Informação sobre alguns dos principais recursos de dados de bioatividade pública	46
Tabela 4 - Comparação das tecnologias para Triagem Virtual Inversa	47
Tabela 5 - Servidores da Web que podem ser empregados para a triagem inversa <i>in silico</i>	51
Tabela 6 - Indicativos da presença de antocianinas	60
Tabela 7 - Gradiente de eluição	62
Tabela 8 - Servidores levantado para etapa de Triagem Virtual Inversa	70
Tabela 9 - Correlações observadas nos espectros de HMQC e HMBC da SFA6-J31	77
Tabela 10 - Correlações observadas nos espectros de HMQC e HMBC da SFA11-A	90
Tabela 11 - Dados da regressão linear, limite de detecção e limite de quantificação das 5 substâncias identificadas	101
Tabela 12 - Precisão das 5 substâncias	102
Tabela 13 - Recuperação das 5 substâncias	102
Tabela 14 - Conteúdo das substâncias nos 4 extratos de <i>A. ovata</i>	103
Tabela 15 - Resultados da quantificação de flavonoides, fenólicos e atividade antioxidante em <i>Asemeia ovata</i>	107
Tabela 16 - Resultado da atividade anticolinesterásica dos extratos de <i>A. ovata</i>	108
Tabela 17 - CL ₅₀ dos extratos de <i>A. ovata</i>	110
Tabela 18 - Quantidade de alvos moleculares por servidor	111
Tabela 19 - Exemplos de atividades encontradas para os ligantes avaliados	112
Tabela 20 - Potenciais alvos para a rutina e luteolina-7- <i>O</i> -glicosídeo obtidos pelo servidor ChemProt 2.0	113
Tabela 21 - Potenciais alvos para os ácidos cafeico, <i>p</i> -cumárico e <i>trans</i> -ferúlico obtidos pelo servidor ChemProt 2.0. Ki (nM)	116
Tabela 22 - Proteínas selecionadas no PDB	119
Tabela 23 - Perfil de interação com o alvo Receptor de estrogênio	123
Tabela 24 - Perfil de interação com o alvo Anidrase carbônica 12	130
Tabela 25 - Perfil de interação com o alvo Anidrase carbônica 9	136
Tabela 26 - Perfil de interação com o alvo Anidrase carbônica 1	140
Tabela 27 - Perfil de interação com o alvo Cotransportador de sódio/glicose	144
Tabela 28 - Perfil de interação com o alvo Aldose redutase	148
Tabela 29 - Perfil de interação com o alvo Receptor de fator de crescimento epidérmico	152
Tabela 30 - Perfil de interação com o alvo Enzima Conversora de Angiotensina	155
Tabela 31 - Perfil de interação com o alvo Succinato-semialdeído desidrogenase	158
Tabela 32 - Perfil de interação com o alvo Anidrase carbônica 13	161
Tabela 33 - Perfil de interação com o alvo Anidrase carbônica 2	163
Tabela 34 - Alvos com melhores pontuações obtidos no servidor DRAR-CPI	164
Tabela 35 - Perfil de interação com o alvo receptor do fator de crescimento epidérmico	171
Tabela 36 - Perfil de interação com o alvo proteína quinase dependente de 3-fosfoinositídeo	174
Tabela 37 - Perfil de interação com o alvo Glicogênio sintase quinase 3 β	177
Tabela 38 - Perfil de interação com o alvo Fator de coagulação VII	181
Tabela 39 - Perfil de interação com o alvo receptor do fator de crescimento do fibroblasto 2	184
Tabela 40 - Perfil de interação com o alvo proteína quinase s6 ribossomal alfa 1	188
Tabela 41 - Perfil de interação com o alvo proteína quinase CDC42 ativada 1	192
Tabela 42 - Perfil de interação com o alvo Proteína 1 da tríade de histidina	195

Tabela 43 - Perfil de interação com o alvo Beta-1,4-galactosiltransferase 1	198
Tabela 44 - Perfil de interação com o alvo receptor de glicocorticoide	201
Tabela 45 - Perfil de interação com o alvo Ras-relacionada ao substrato C3 da Toxina botulínica 1	205
Tabela 46 - Perfil de interação com o alvo ornitina carbamoiltransferase, mitocondrial	209
Tabela 47 - Perfil de interação com o alvo 2-oxoisovalerato desidrogenase subunidade alfa	213
Tabela 48 - Perfil de interação com o alvo Carbonil redutase [NADPH] 3	218
Tabela 49 - Perfil de interação com o alvo fator inibitório de migração de macrófago	221
Tabela 50 - Perfil de interação com o alvo maleilacetoacetato isomerase	225
Tabela 51 - Perfil de interação com o alvo malato desidrogenase	228
Tabela 52 - Perfil de interação com o alvo albumina de soro humano	230
Tabela 53 - Perfil de interação com o alvo proteína quinase de divisão celular 2	233
Tabela 54 - Perfil de interação com o alvo Proteína tirosina quinase JAK2	236
Tabela 55 - Perfil de interação com o alvo MAP quinase - ativada por proteína quinase 2	238
Tabela 56 - Energias de acoplamento dos alvos selecionados	240
Tabela 57 - Toxicidade aguda em camundongos predita pelo GUSAR	242

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%IAChE	% de inibição da AChE
%SRL	Porcentagem sequestradora de radical livre
2OD	2-oxoisovalerato deidrogenase subunidade alfa, mitocondrial
5RD	4-(butilaminometil)-benzenossulfonamida
AC	Anidrase carbônica
Acetil CoA	Acetil Coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ACP	Adenosina-5'-[β , γ -metileno]-trifosfato
ADP	Adenosina-5'-difosfato
AGE	Ácido gálcio equivalente
AMP	Adenosina monofosfato
AMPPNP	Adenilil-imidodifosfato
AR	Aldose redutase
ASH	Albumina de soro humano
ATP	Trifosfato de adenosina
AZM	Acetazolamida
AZQ	Azapropazona
CBR3	Carbonil redutase 3
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CD3F	Proteína quinase dependente de 3-fosfoinosítideo
CDC	Cinase dependente de ciclina
CDC2	Proteína quinase de divisão celular 2
CE ₅₀	Concentração efetiva média
CG	Cromatografia Gasosa
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CL	Cromatografia a líquido
CL ₅₀	Concentração letal média
CLAE	Cromatografia a Líquidos de Alta Eficiência
COSY	Correlation spectroscopy
CS6	Proteína quinase s6 ribossomal alfa 1

CSGL	Cotransportador de sódio/glicose
CT	Coeficiente de Tanimoto
DA	Doença de Alzheimer
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
DL ₅₀	Dose letal média
DMS	Display Midas System
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DPR	Desvio padrão relativo
DST1-3	Estiril-2-pironas
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
E1G	3-[(piridin-2-il -sulfonil) acetil] benzenossulfonamida
EAAO	Extrato acetato de etila de <i>Asemeia ovata</i>
EBAO	Extrato metanólico bruto de <i>A. ovata</i>
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECAO	Extrato clorofórmio de <i>A. ovata</i>
EGb761	Extrato padronizado de <i>Ginkgo biloba</i>
EHAO	Extrato hexânico de <i>A. ovata</i>
EM	Espectrômetro de Massas ou Espectrometria de Massas
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ESI-EM	Espectrometria de massas de electrospray
FC	Folin Ciocalteau
FC VII	Fator de coagulação VII
FDA	Food and Drug Administration
FIMM	Fator inibitório de migração de macrófago
GABA	Ácido 4-aminobutírico
GAL	Galactose
GSH	Glutathiona
GSQ3β	Glicogênio sintase quinase 3 β
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
HDU	N-[4-(2-metilimidazo [1,2-a] piridin-3-il)-2-pirimidinil] acetamida
HMQC/HMBC	Heteronuclear multiple-quantum correlation spectroscopy e heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy

HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
HUEFS	Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana
ICH	International Conference of Harmonization
IL	Interleucina
IP	Intraperitoneal
IV	Infravermelho
Ki	Constante inibitória
IV	Intravenosa
IZA	2- (1,1-dimetiletil) 9-fluoro-3,6-di-hidro- 7H-benz [H] -imidazo [4,5-f] isoquinolin-7-ona
JAK2	Proteína tirosina quinase JAK2
LABAREMN	Laboratório Baiano de Ressonância Magnética Nuclear
LAEX	Laboratório de extração
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
M29	Éster etílico de 4-propil benzenossulfonamida
MAAI	Maleilacetoacetato isomerase
MDH	Malato desidrogenase
MQ2	MAP quinase - ativada por proteína quinase 2
MSREs	Moduladores seletivos do receptor de estrogênio
NADP+	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NFLO	N-fosfonacetil-L-ornitina
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORN	Ornitina carbamoiltransferase, mitocondrial
P1TH	Proteína 1 da tríade de histidina de ligação do nucleotídeo
PAC	Ácido fenilacético
PDB	Protein Data Bank
PLIP	Protein-Ligand Interaction Profiler
PTQ	Proteína tirosina quinases
PY3	5-[amino (imino) metil]-2-[[[6-[3-amino-5- ({[(1R)-1-metilpropil] amino} carbonil) fenil]-3-(isopropilamino)-2-oxopirazin-1(2H)-il] acetil} amino) metil]-N-piridin-4-il-benzamida
QE	Quercetina equivalente
QSAR	Quantitative structure–activity relationship

R ²	Coefficiente de correlação
RAC-1	Ras-relacionada ao substrato C3 da Toxina botulínica 1
RE	Receptor de estrogênio
RFCE	Receptor de fator de crescimento epidérmico
RFCE2	Receptor do fator de crescimento do fibroblasto 2
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMSD	Root Mean Square Deviation
SC	Subcutânea
SEA	Similarity Ensemble Approach
SMILES	Simplified Molecular-Input Line-Entry System
SSADH	Succinato-semialdeído desidrogenase
STU	Estaurosporina
STY4-7	Dihidrostiril-2-pironas
TAK-285	(N-{2-[4-({3-cloro-4-[3-(trifluorometil) fenoxi] fenil} amino)-5H-pirrolo [3,2-d] pirimidin-5-il] etil}-3-hidroxi-3-metilbutanamida)
TAS	Teste de letalidade frente à <i>Artemia salina</i>
TDP	Tiamina difosfato
TMS	Tetrametilsilano
TNF- α	Fatores de necrose tumoral α
TSH	Terapia de substituição hormonal
TVI	Triagem Virtual Inversa
UDP	Uridina-5'-difosfato
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultra violeta e visível
V13	2,3,5,6-tetrafluoro-4 - [(2-hidroxietil) sulfonil] benzenossulfonamida
VO	Via oral
YZ9	Ácido 7-hidroxi-2-oxo-cromeno-3-carboxílico

1 INTRODUÇÃO

A natureza provou ser uma das mais ricas fontes de compostos terapeuticamente úteis. Historicamente, os produtos naturais provenientes de plantas têm sido a base para sistemas de medicina tradicional durante milhares de anos e de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) ainda são invocados para atenção primária à saúde em cerca de 80% dos residentes de países em desenvolvimento no mundo. Os produtos naturais têm continuado a entrar e/ou fornecer moléculas para ensaios clínicos, particularmente como anticancerígenos e agentes antimicrobianos. Uma análise detalhada dos novos medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), entre 1981 e 2010 revelou que 34% dos medicamentos que foram baseados em pequenas moléculas eram provindos de produtos naturais ou derivados diretos de produtos naturais. Um exemplo do papel dominante de produtos naturais pode ser visto nos últimos 25 anos, onde na área terapêutica do câncer 77,8% dos medicamentos aprovados são de produtos naturais, baseados em produtos naturais, ou derivados de produtos naturais. (KELLENBERGER; HOFMANN; QUINN, 2011; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; CRAGG; NEWMAN, 2013).

A partir de 2001, o número de fármacos utilizados globalmente derivados de plantas foi estimado como 122, com 80% destes tendo a mesma utilização ou relacionada com as plantas a partir dos quais eles foram obtidos. Estes números indicam que apenas 20% dos fármacos derivados de plantas não advém de informações folclórico medicinal. Em face da necessidade de identificar novas moléculas, a exploração de bibliotecas de moléculas oriundas de produtos naturais ganhou destaque na indústria farmacêutica. Técnicas de rastreamento são amplamente empregues para descobrir novas pistas sobre a base da função alvo terapêutico. Além do isolamento e identificação de novos compostos, é observado o surgimento de técnicas de computação para resolver, em escala genômica, a questão do reconhecimento alvo-ligante (KELLENBERGER; HOFMANN; QUINN, 2011).

Assim, o potencial natural encontrado nos países latino-americanos, principalmente no Brasil, aliado à diversidade de compostos bioativos encontrados, especialmente nas plantas superiores, atrai a atenção da comunidade científica e das indústrias farmacêuticas, uma vez que a utilização de plantas medicinais atinge um público cada vez maior (CALIXTO, 2005).

Entre as várias espécies utilizadas pela população estão as plantas da família Polygalaceae que são amplamente distribuídas no litoral brasileiro, sendo encontradas principalmente em zonas costeiras de solos arenosos, da Bahia ao Rio Grande do Sul. Seus representantes contêm altas concentrações de salicilato de metila, que confere odor

característico em suas raízes. Nos estados acima da Bahia, são conhecidas popularmente pelo nome de erva-iodex e é utilizada, na forma de aplicações locais, em entorses, machucados ou artropatias crônicas (LORENZI; MATOS, 2002). Já na região da Bahia são chamadas popularmente por gelol ou vick.

Essas espécies vegetais são utilizadas tradicionalmente em muitas regiões do mundo. Atividades como expectorante, sedativa, antipsicótica, antídotos para venenos de cobras, antifúngicas e analgésicas são atribuídas a essas espécies, o que as torna fonte de interesse para estudos de desenvolvimentos de novos produtos fitoterapêuticos. Estudos anteriores mostram que a atividade analgésica destas espécies deve-se à presença de metabólitos da classe dos salicilatos, incluindo salicilato de metila. Outros estudos com plantas da família Polygalaceae, como *Polygala paniculata*, *P. cyparissias* e *P. sabulosa*, demonstram a presença de compostos incluindo cumarinas, xantonas, esteroides e flavonoides (LORENZI; MATOS, 2002; NOGUEIRA et al, 2005; ROCHA et al, 2012; CAMPOS et al, 1997; MEOTTI et al, 2006; LAPA, 2006). Além disso, outro estudo também apresenta salicilato de metila em diferentes espécies dessa família, sendo um possível contribuidor para a atividade antinociceptiva apresentada por algumas espécies (ROCHA et al, 2012).

Dessa forma, destaca-se o grande interesse na família Polygalaceae, visto que sua importância medicinal ainda é economicamente pouco explorada, além do interesse taxonômico, com espécies de ocorrência em praticamente todas as formações vegetais, ideal para estudos comparativos (AGUIAR; ARANHA-FILHO, 2008). Junta-se a isso, a escassez de estudos químicos e biológicos de algumas espécies dessa família encontradas na região do semiárido, como ocorre para a *Asemeia ovata*.

Diante disto, o presente estudo visou caracterizar quimicamente a espécie *Asemeia ovata*, ocorrente no semiárido, avaliar *in vitro* as atividades biológicas da mesma e prever *in silico* novos alvos biológicos para os constituintes químicos identificados e/ou isolados dessa espécie vegetal. Para isso, buscou-se isolar, através de métodos cromatográficos, os constituintes químicos provenientes do metabolismo especial presentes nos extratos da espécie; determinar a estrutura das substâncias isoladas através de métodos espectrométricos como Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono 13 (RMN de ^1H , de ^{13}C) (uni e bidimensionais), além de Espectroscopia de Ultravioleta (UV) e comparação com dados da literatura; avaliar a letalidade frente à *Artemia salina*, bem como atividade antioxidante e anticolinesterásica *in vitro* dos extratos e das substâncias isoladas (quando possível); e prever as atividades biológicas dos compostos identificados/isolados de *A. ovata* através de

técnicas de triagens virtuais baseadas na estrutura do ligante e receptor, embasando, dessa forma, trabalhos que visem uma aplicação comercial de derivados de Polygalaceae.

Vale ressaltar que o presente trabalho fez parte do projeto financiado pelo CNPq (edital Universal 2011) intitulado “Estudo fitoquímico e análise quantitativa de salicilatos em *Polygala* spp. (Polygalaceae) ocorrentes no semiárido nordestino e cultivadas”, e do projeto financiado pela UEFS (edital interno 2009) intitulado “Análise quantitativa por CLAE-DAD de salicilatos em espécies do gênero *Polygala* (Polygalaceae) ocorrentes no semiárido e cultivadas”, de resolução CONSEPE N° 040/2010.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Família Polygalaceae

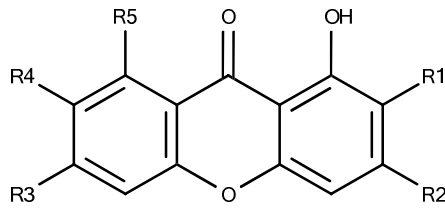
Diversas espécies da família Polygalaceae Hoffmannseg & Link são conhecidas por conter grande diversidade de substâncias químicas, muitos dos quais exibem atividade biológicas, como atividade analgésica, expectorante, sedativa, antifúngica entre outras. (LAPA, 2006).

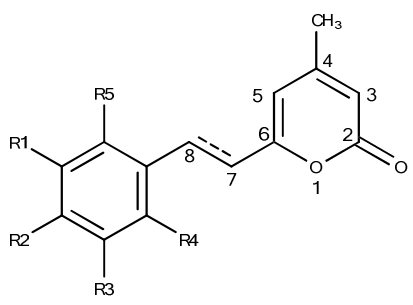
A família compreende 22 gêneros e cerca de 1.300 espécies com ampla distribuição no mundo (MARQUES; PEIXOTO, 2007), sendo as regiões temperadas quentes e tropicais seus principais centros de diversidade. (FURNESS; STAFFORD, 1995). No Brasil, está representada por 11 gêneros (1 endêmico), 197 espécies (123 endêmicas), 1 subespécie endêmica e 33 variedades (28 endêmicas).

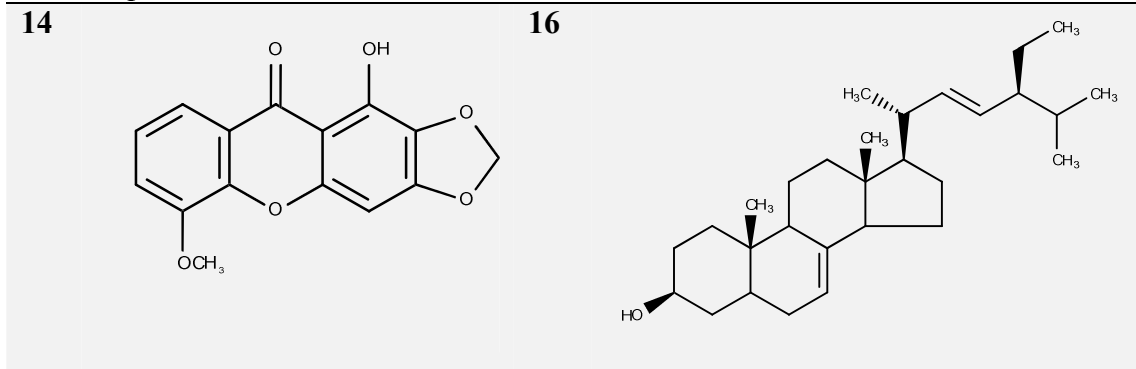
As espécies da família Polygalaceae que ocorrem no território brasileiro já foram alvos de muitos estudos taxonômicos (MARQUES; PEIXOTO, 2007), os quais servem como base para os diversos trabalhos que vem sendo realizados com biologia floral, fitoquímica, palinotaxonomia, sistemática molecular e citogenética nas últimas décadas. (LÜDTKE; AGUIAR, 2008).

A família também tem sido alvo de diversos estudos fitoquímicos, nos quais algumas classes de compostos já foram detectadas, tais como: saponinas, xantonas, derivados de pironas, cumarinas, ácidos graxos, fenóis e alcaloides (HAMBURGER; GUPTA; HOSTETTMANN, 1985; PINHEIRO et al, 1998; PIZZOLATTI et al. 2004; SILVEIRA et al 1995 apud LUDTKE; MIOTO, 2008; OLIVEIRA et al. 2000 apud LUDTKE; MIOTO, 2008). Alguns compostos já foram isolados (Figura 1) como: 1,3-dihidroxi-7-metoxixantona (**1**), 1,7-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (**2**), 1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (**3**), 1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona (**4**), 1,3,6,8-tetrahidroxi-2,7-dimetoxixantona (**5**) e 1,3,7-trihidroxi-2-metoxixantona (**6**) da *Polygala cyparissias* (PINHEIRO et al, 1998); estiril-2-pironas (**7-9**) e dihidrostiril-2-pironas (**10-13**) da *P. sabulosa* (PIZZOLATTI et al, 2008); 1-hidroxi-5-metoxi-2,3-metilenodioxixantona (**14**), 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (**15**), espinasterol (**16**) e rutina (**17**), por exemplo, da *P. paniculata*. (LAPA et al, 2006; LAPA et al, 2011; SOARES, 2008; CRISTIANO et al, 2003). As espécies da família caracterizam-se também pela presença de salicilato de metila, encontrado principalmente em suas raízes. (MATOS, 2000 apud COELHO; AGRA; BARACHO, 2008).

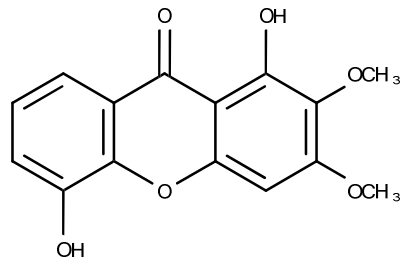
Figura 1 - Compostos isolados de espécies de Polygalaceae

<i>P. cyparissias</i>		R1	R2	R3	R4	R5
	1	H	OH	H	OMe	H
	2	OCH ₂ O		H	OH	H
	3	OMe	OMe	H	H	H
	4	OMe	OH	OH	OMe	OH
	5	OMe	OH	H	H	H
	6	OMe	OH	OH	OMe	H

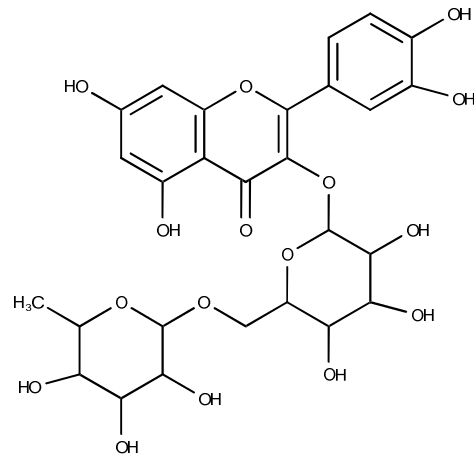
<i>P. sabulosa</i>		R1	R2	R3	R4	R5	C7-C8
	7	OCH ₂ O	H	H	H		
	8	OCH ₂ O		H	OCH ₃	H	
	9	OCH ₂ O		H	OCH ₃	OCH ₃	
	10	OCH ₂ O		H	H	H	C=C
	11	OCH ₂ O		H	OCH ₃	H	C=C
	12	OCH ₂ O		H	OCH ₃	OCH ₃	C=C
	13	OCH ₂ O		H	H	H	OCH ₃

P. paniculata

15



17



Fonte: PINHEIRO et al, 1998; PIZZOLATTI et al, 2004; LAPA et al, 2006; CRISTIANO et al, 2003 (adaptada)

Investigações com espécies de Polygalaceae mostram também interessantes propriedades biológicas, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Atividades biológicas atribuídas à espécies de Polygalaceae

Espécie	Atividades	Referência
<i>P. paniculata</i>	Antinociceptivo opióide, anti-inflamatória, protetora gástrica, vasodilatadora Antifúngica	Lapa, 2006 Johann et al, 2011
<i>P. japônica</i>	Neuroprotetor	Li et al., 2012a
<i>P. karensium</i>	Antiviral	Dao et al., 2012
<i>P. sabulosa</i>	Antidepressiva Antifúngica Tripanocida	Capra et al., 2010 Johann et al, 2011 Pizolatti et al., 2008
<i>P. tenuifolia</i>	Tratamento de amnésia, ansiedade, insônia, asma, bronquite Anti-inflamatória	Fang et al, 2012 Cheong et al, 2011
<i>P. fruticosa</i>	Tratamento crônico de úlceras, má circulação e inflamações intestinais	Mukinda; Eagles, 2010
<i>P. senega</i>	Anticâncer	Paul et al, 2010
<i>P. tricornis</i>	Anti-neuroinflamatória	Li et al, 2012b
<i>P. cyparissias</i>	Antihiperalgésica	Klein-Junior, 2012

	Antifúngica	Johann et al, 2011
<i>P. campestris</i>	Antifúngica	Johann et al, 2011
<i>P. pulchella</i>	Antifúngica	Johann et al, 2011

Algumas destas espécies, como *P. cyparissias* e *P. paniculata* são usadas na medicina tradicional como anestésico de uso tópico devido à alta concentração de salicilato de metila encontrado nas raízes, o qual é o responsável pelo cheiro característico do óleo essencial (LAPA, 2006).

Algumas espécies encontradas no norte do Brasil são usadas com os mesmos fins, especialmente o uso tópico do extrato alcoólico em torções, machucados por traumatismo e nas articulações para o alívio das dores reumáticas. Seus usos terapêuticos são descritos na medicina tradicional de longa data, e embora a eficácia e a segurança do uso de suas preparações não tenham sido ainda comprovadas cientificamente, sua utilização popular é notória (LORENZI; MATOS, 2002).

Os gêneros encontrados no país são *Acanthocladus* Klotzsch ex Hassk., *Asemeia* Raf. emend. Small, *Barnhartia* Gleason, *Bredemeyera* Willd., *Caamembeca* J.F.B.Pastore, *Diclidanthera* Mart., *Gymnospora* (Chodat) J.F.B.Pastore, *Monnina* Ruiz & Pav., *Moutabea* Aubl., *Polygala* L., *Securidaca* L (Figura 1). Apresentam-se como arbustos, árvores, trepadeiras ou subarbustos. (PASTORE et al, 2014).

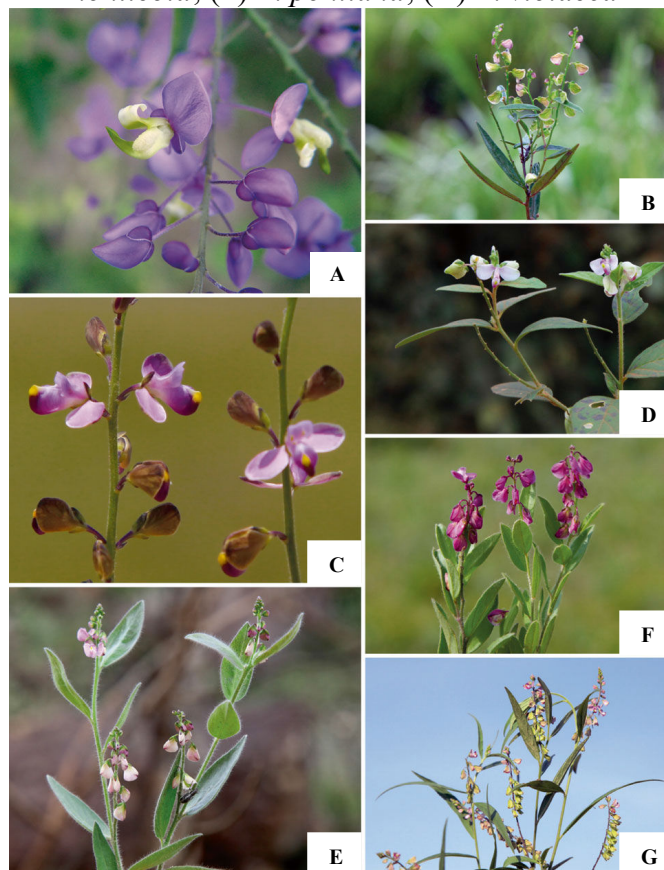
O gênero pan-tropical *Polygala* L. tem sido tradicionalmente definido para incluir vários grupos heterogeneos, a maioria deles delimitado por Chodat (1891) como secções e depois elevada a classificação secundária por Blake (1924) e Paiva (1998). No entanto, esta classificação não tem sido apoiada por estudos filogenéticos. Todos os dados filogenéticos apoiam que subgêneros tradicionais de *Polygala* representam várias linhagens distintas de *Polygalaceae*. Estes estudos filogenéticos e a distinção morfológica desses grupos levaram à segregação recente, ou re-segregação em alguns casos, de *Polygala* de *Acanthocladus* Klotzsch ex Hassk., *Asemeia* Raf. emend. Small, *Badiera* DC., *Hebecarpa* (Chodat) J. R. Abbott, *Heterosamara* Kuntze, *Polygaloides* Haller e *Rhinotropis* (S. F. Blake) J. R. Abbott (Paiva, 1998; Pastore, Cardoso, Aymard et al 2010; Abbott 2011).

O gênero *Asemeia* compreende 28 espécies americanas (e uma variedade), de ocorrência sazonal, em períodos secos, e encontrado em savanas abertas (ou vegetação comparável), ou com menor frequência associado a vegetação florestal. No Brasil, o gênero apresenta 19 espécies (12 endêmicas) e 2 variedades (ambas endêmicas). Dentre as espécies encontradas no país estão: *A. acuminata* (Willd.) J.F.B.Pastore & J.R.Abbott, *A. extraaxillaris*

(Chodat) J.F.B.Pastore & J.R.Abbott, *A. glabra* (A.W.Benn.) J.F.B.Pastore & J.R.Abbott, *A. hebeclada* (DC.) J.F.B.Pastore & J.R.Abbott, *A. hirsuta* (A.St.-Hil. & Moq.) J.F.B.Pastore & J.R.Abbott, *A. ignatii* (Chodat) J.F.B.Pastore & J.R.Abbott, *A. ilheotica* (Wawra) J.F.B.Pastore & J.R.Abbott, *A. lindmaniana* (Chodat) J.F.B.Pastore & J.R.Abbott, *A. marquesiana* (JFB.Pastore & TB.Cavalc.) JFB.Pastore & JR.Abbott, *A. martiana* (A.W.Benn.) J.F.B.Pastore & J.R.Abbott, *A. mollis* (Kunth) J.F.B.Pastore & J.R.Abbott, *A. monninooides* (Kunth) J.F.B.Pastore & J.R.Abbott, *A. monticola* (Kunth) J.F.B.Pastore & J.R.Abbott, *A. ovata* (Poir.) J.F.B.Pastore & J.R.Abbott, *A. parietaria* (Chodat) J.F.B.Pastore & J.R.Abbott, *A. pohliana* (A.St.-Hil. Moq.) J.F.B.Pastore & J.R.Abbott, *A. pseudohebeclada* (Chodat) J.F.B.Pastore & J.R.Abbott, *A. rhodoptera* (Mart. ex A.W.Benn.) J.F.B.Pastore & J.R.Abbott, *A. violacea* (Aubl.) J.F.B.Pastore & J.R.Abbott.

As flores das espécies desse gênero estão morfológicamente bem caracterizadas pelas duas sépalas abaxiais. As flores são geralmente de cor roxo pálido com a ponta quilha amarelada, variando sutilmente em tamanho e cor (Figura 2 e 3) (PASTORE; ABBOTT, 2012; PASTORE et al, 2014).

Figura 2 - (A) *A. floribunda*; (B) *A. glabra*; (C) *A. lindmaniana*; (D) *A. monninooides*; (E) *A. monticola*; (F) *A. pohliana*; (G) *A. violacea*



Fonte: PASTORE; ABBOTT, 2012 (adaptada)

Figura 3 - *Asemeia ovata*



Fonte: Flickr –EOL Images (adaptada)

A espécie *Asemeia ovata* é uma erva terrícola distribuída pelas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (Figura 4). Como sinônimos relevantes possui basônimo *Polygala ovata* Poir.; heterotípico *Polygala decumbens* A.W.Benn.; heterotípico *Polygala marajoara* Huber; heterotípico *Polygala martiana* var. *decumbens* (A.W. Benn.) A.C.A.Aguiar et al; heterotípico *Polygala orobus* Chodat; e heterotípico *Polygala planellasi* Molinet (PASTORE et al, 2014).

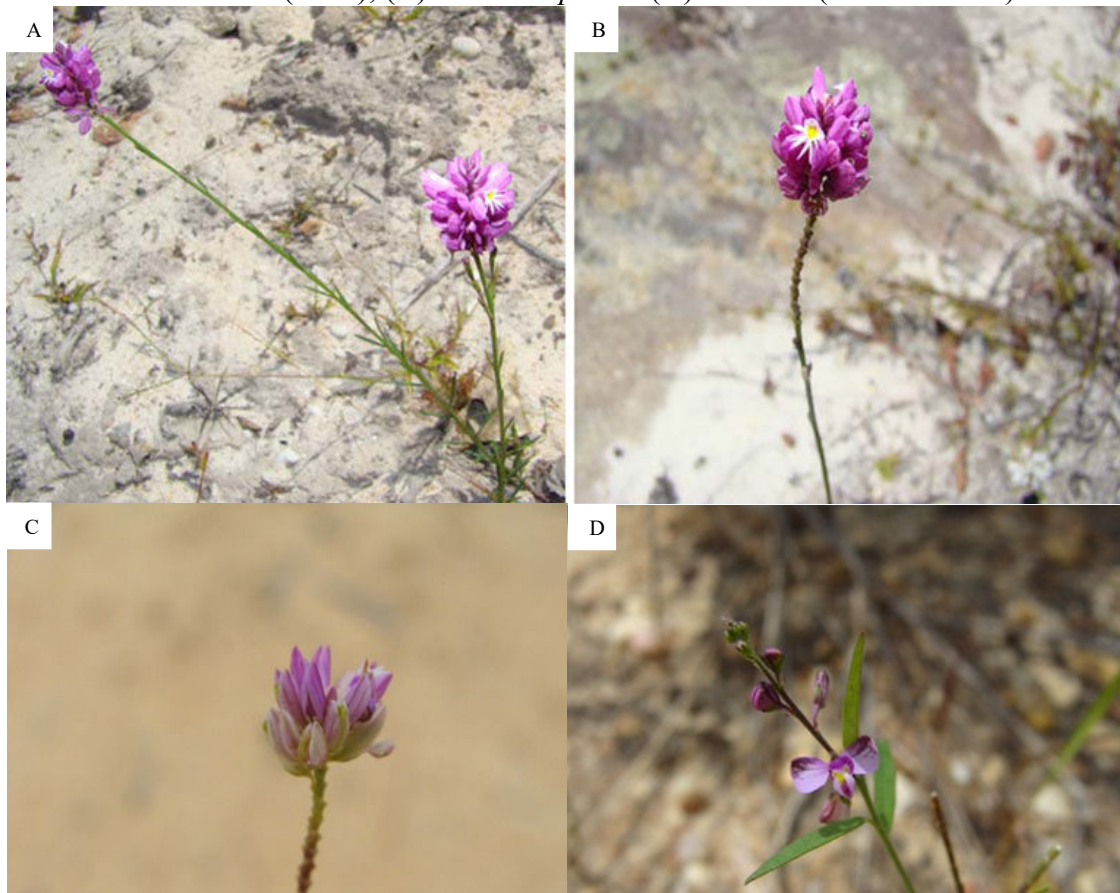
Figura 4 - Distribuição da espécie *A. ovata* pelo Brasil (estados coloridos representam regiões de distribuição da espécie no país)



Fonte: PASTORE et al, 2015 (adaptada)

Na literatura são encontrados principalmente estudos botânicos sobre essa espécie. Estudos fitoquímicos e biológicos já foram realizados pelo Grupo de Pesquisa Estudos Químicos e Atividades Biológicas em Produtos Naturais, da Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS. Rocha e colaboradores (2012) quantificaram salicilato de metila nas partes aéreas e raízes de *A. ovata*, encontrando valores de $49,33 \pm 5,41$ e $97,72 \pm 6,30$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente, de planta fresca. Peixoto Neto (2011) avaliou as atividades citotóxica e antioxidante do extrato bruto da planta inteira, chegando a valores de $CL_{50} = 167,1$ $\mu\text{g/mL}$ e $CE_{50} = 15,93$ mg/mL . O suposto único estudo de avaliação de atividade biológica referente a espécie *A. ovata*, não realizado pelo grupo de pesquisa citado, encontrado na literatura, foi realizado por Frasson e colaboradores (2012). No referido trabalho, a espécie ainda sob nome de *Polygala decumbens*, foi avaliada quanto a atividade anti-*Trichomonas vaginalis*. Entretanto, ao avaliar tal trabalho, constata-se que a espécie estudada não se trata da *A. ovata* (*P. decumbens*), e sim da *P. trichosperma*, como mostra a figura extraída do referente artigo (Figura 5). Portanto, mantem-se a informação de que não existem outros trabalhos que mostrem dados de atividade biológica da espécie em questão.

Figura 5 - *P. decumbens* A. W. Benn coletada no Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil, (A) Planta inteira, (B) detalhes da inflorescência (Título extraído de Frasson et al (2012); (C) *P. trichosperma* (D) *A. ovata* (*P. decumbens*)



Fonte: (a) e (b) FRASSON et al (2012); (c) e (d) PASTORE et al, 2015 (adapada)

2.2 Técnicas para identificação e isolamento de componentes em produtos naturais

Extratos com solventes orgânicos são preparados a partir da seleção de espécies vegetais para o estudo. Estes podem ser avaliados em ensaios biológicos *in vitro* e submetidos a fracionamento biomonitorado. Para o fracionamento empregam-se técnicas cromatográficas, em que os compostos de determinada mistura são separados dependendo da velocidade com que são transportados através de fase estacionária, por líquido ou gás (fase móvel). Essas técnicas são variadas, com diferentes graus de inovação tecnológicas, desde colunas abertas com suportes cromatográficos diversos até técnicas instrumentais, como cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) (ANVISA, 2010) e cromatografia em contracorrente de alta velocidade, seja em escala preparativa ou semipreparativa (Tabela 2) (MATOS, 2015, BRAGA, 2009).

Tabela 2 - Classificação da cromatografia

Tipo de suporte	Coluna Planar (papel, placa)
Modo de separação	Adsorção Partição Permuta iônica Exclusão de tamanhos Afinidade
Natureza da fase móvel	Cromatografia gasosa (CG) Cromatografia a líquido (CL) Cromatografia supercrítica
Objetivo da separação	Analítica Preparativa
Composição da fase móvel	Isocrática Gradiente
Modo de operação	Análise frontal Análise por deslocamento Eluição

Fonte: MATOS, 2015 (adaptada)

Após o isolamento das substâncias constituintes do extrato vegetal, o trabalho fitoquímico prossegue com a elucidação da estrutura química das moléculas, no qual o pesquisador precisa saber se o composto em estudo já é conhecido ou não. Caso o composto já tenha sido descrito, será necessário realizar apenas a identificação através de comparação com padrão ou pela similaridade de propriedades já descritas. No entanto, se a substância for inédita, deve-se realizar a determinação estrutural, cuja dificuldade normalmente se encontra na complexidade da estrutura, tornando-se necessária a utilização de diferentes técnicas espectroscópicas e espectrométricas (FELICIANO et al, 2014).

Assim, são empregados métodos espectroscópicos e espectrométricos, incluindo Ultravioleta (UV), Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) e Carbono 13 (RMN de ^{13}C) e Espectrometria de Massas (EM). Além de estudos que estabelecem a configuração absoluta dos compostos, como o Dicroísmo Circular e a Difração de Raios-X (FELICIANO et al, 2014).

A espectroscopia na região do UV-VIS está associada às transições eletrônicas, nas quais elétrons são promovidos de um estado de mais baixa energia para outro mais energético. A transição mais provável ocorre entre o elétron do orbital ocupado de maior energia (HOMO) para o orbital desocupado de menor energia (LUMO). Entre as possíveis transições estão $n \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $\sigma \rightarrow \pi^*$ e $\sigma \rightarrow \sigma^*$ (CONCEIÇÃO et al, 2014).

De acordo com Leite (2009), para que uma substância possa ser analisada por espectrofotometria UV-VIS, faz-se necessário que apresente grupos cromóforos e que haja especificidade na absorção do comprimento de onda apenas para as substâncias que se deseja analisar. Na determinação estrutural o espectro de absorção de uma substância no UV-VIS indica a presença de certos grupos funcionais, bem como a posição de substituintes no esqueleto da molécula (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2007).

A espectroscopia no IV é uma técnica de inestimável importância na análise orgânica qualitativa, sendo amplamente utilizada nas áreas de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas (LOPES; FASCIO, 2004). Ela se baseia na energia vibracional exibida pelos compostos que ocorre devido a alterações transitórias nas ligações interatômicas, podendo sofrer estiramentos ou deformações nos ângulos de ligação, gerando espectros com um conjunto de bandas de absorção. A frequência das ligações depende da natureza das ligações, mas também são afetadas pela sua vizinhança e pela molécula como um todo (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2007).

A espectrometria de RMN é outra forma de espectroscopia de absorção. Atualmente é uma das técnicas mais importantes para a determinação estrutural de compostos orgânicos, apresentando a grande vantagem de que é possível analisar pequenas quantidades de compostos puros, geralmente em escala de miligramas, com grande precisão (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2007; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

A amostra é submetida a campo magnético externo e, por conter átomos com núcleos que apresentam momento magnético nuclear, estes podem entrar em ressonância com a radiofrequência aplicada, absorvendo energia magnética específica para cada tipo de núcleo, conforme sua vizinhança química (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2007). Nesse sentido, espectro de RMN é um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

Técnicas de RMN de ^1H e de ^{13}C são amplamente utilizadas. RMN de ^1H possui fácil consecução, pois quando os núcleos de hidrogênio são abundantes a análise pode ser feita em 10 minutos. Já a obtenção do espectro de RMN de ^{13}C -DEPT (da sigla em inglês *Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer*) é utilizado na determinação do número

de átomos de hidrogênio ligados a ^{13}C . Todos estes são espectros de ressonância magnética nuclear em uma dimensão (1D) (ARAÚJO, 2011).

No entanto, muitas vezes é necessário usar técnicas para obtenção de espectros em duas dimensões (2D), como COSY (do inglês *correlation spectroscopy* – espectroscopia de correlação homonuclear – correlações entre hidrogênios que estão acoplados por $J_{\text{H,H}}$), NOESY (do inglês *nuclear Overhauser effect spectroscopy* – espectroscopia bidimensional do efeito nuclear de *Overhauser* – correlação entre hidrogênios espacialmente próximos), HMQC/HMBC (do inglês *heteronuclear multiple-quantum correlation spectroscopy* e *heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy* – espectroscopia bidimensional de correlação heteronuclear múltiplo-Quantum e múltipla-ligação) e HSQC (do inglês *heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy* – espectroscopia bidimensional envolvendo transições quânticas heteronucleares simples (C,H) a uma ligação), dentre outras técnicas, para elucidar as estruturas das substâncias. A obtenção de todos esses espectros resulta geralmente em consumo de tempo do instrumento, bem como do especialista para a interpretação dos espectros (ARAÚJO, 2011).

A obtenção de espectro de RMN de ^{13}C e técnicas em 2D como HSQC e HMBC podem exigir, em função da baixa sensibilidade inerente do núcleo de ^{13}C e, via de regra, a pequena quantidade de amostra disponível (muitas vezes inferior a 20 mg), um tempo de análise às vezes superior a 24 horas. Deve ser registrado, entretanto, que avanços nas técnicas espectroscópicas em microescala, como RMN *microcryoprobe*, permitem a elucidação estrutural de nova molécula com apenas alguns miligramas (MOLINSKI, 2009; ARAÚJO, 2011).

A EM é baseada na ionização do composto em análise, em que os íons são separados na base massa/carga (m/z) e o número de íons que correspondem a cada unidade dessa base geram espectro. Esse espectro pode fornecer informações importantes, como a massa molecular, permitindo o estabelecimento da fórmula molecular do composto, bem como as fragmentações, que possibilitam caracterizar a presença e localização de grupos funcionais e cadeias laterais (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2007; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

Comumente a elucidação estrutural é realizada após o isolamento das substâncias. Contudo, atualmente, a possibilidade do emprego de técnicas hifenadas ou técnicas acopladas pode ajudar, em parte, os estudos em produtos naturais. Apesar de extratos vegetais serem misturas complexas de diferentes metabólitos, a análise de frações voláteis ou materiais polares de superfícies foliares já é, há muito tempo realizada, não sendo necessário muitas

vezes, nenhum fracionamento para a total caracterização química do material em estudo. O grande avanço na análise destas misturas decorreu do desenvolvimento de aparelhos de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). (BRAGA, 2009; RODRIGUES et al, 2006).

A principal vantagem das técnicas hifenadas em comparação com as técnicas espectroscópicas sem hifenação deve-se ao fato de não necessitar de grande quantidade de amostra na sua forma purificada, o que acontece com as técnicas sem hifenação, que só são válidas após tedioso protocolo de purificação (RODRIGUES et al, 2006).

Desta forma, técnicas hifenadas vem surgindo devido ao avanço tecnológico, permitindo acoplamentos mais sofisticados, através de interfaces modernas e otimizadas, aliando métodos de separação altamente eficientes e de amplo domínio, como a cromatografia, com um ou mais detectores espectroscópicos (RODRIGUES et al, 2006).

2.3 Ensaios Biológicos

O interesse pela elucidação dos constituintes do metabolismo especial das plantas tem aumentado a cada dia e estimulado a busca nos vegetais, de novos compostos com atividades biológicas. A fitoquímica então, ganha espaço aliada a outros ramos da ciência, colaborando para o conhecimento da constituição química dos vegetais e suas respectivas propriedades e funções, direcionando assim a utilização destes produtos seja como alimentos ou fármacos, justificando ou não seu uso medicinal pela população (BEZERRA, 2008).

Para direcionar essa busca por atividades, os fitoquímicos costumam conectar o fracionamento com testes de atividades biológicas, tentando, assim, chegar a composto ativo. Contudo, realizar testes com extratos e frações em animais tem algumas limitações, do ponto de vista da quantidade de material e de animais necessários, uma vez que um demasiado número de amostras levaria, conseqüentemente, a um elevado número de indivíduos a serem sacrificados (NUNES *et al.*, 2008).

Sendo assim, alguns ensaios baseados em reações químicas que simulam o ambiente dos organismos vivos ou que utilizam organismos mais simples, como bactérias, fungos, algas e crustáceos, além de frações subcelulares presentes no sistema biológico como suspensões celulares, cultivo de tecidos, cultivos celulares, enzimas e proteínas, podem ser utilizados. O objetivo desses ensaios é de promover estudos preliminares aos ensaios com animais, complementando e melhorando a sensibilidade e especificidade desses estudos (BEDNARCZUK et al, 2010).

2.3.1 Atividade antioxidante

Atualmente uma quantidade substancial de evidências tem demonstrado que o envelhecimento e as doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (SOUSA *et al*, 2007), estão claramente relacionadas com o estresse oxidativo. As oxidações biológicas geram espécies reativas de oxigênio (ERO) e radicais livres que podem provocar lesões celulares, muitas vezes irreparáveis (GOUVÊA, 2004).

Para combater os radicais livres, existe um sistema de defesa antioxidante que tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não radicalares. Usualmente, esse sistema é dividido em enzimático e não enzimático (AHMAD; MUNI'IM; ELYA, 2012; BARBOSA *et al*, 2010). O sistema antioxidante enzimático é formado por uma série de enzimas como a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e outras peroxidases produzidas pelo próprio organismo (FINKEL; HOLBROOK, 2000). Já o sistema não enzimático, é formado por compostos antioxidantes provenientes da dieta alimentar, como tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), compostos fenólicos, minerais (zinco, cobre, selênio e magnésio) e carotenoides (SOUSA *et al*, 2007).

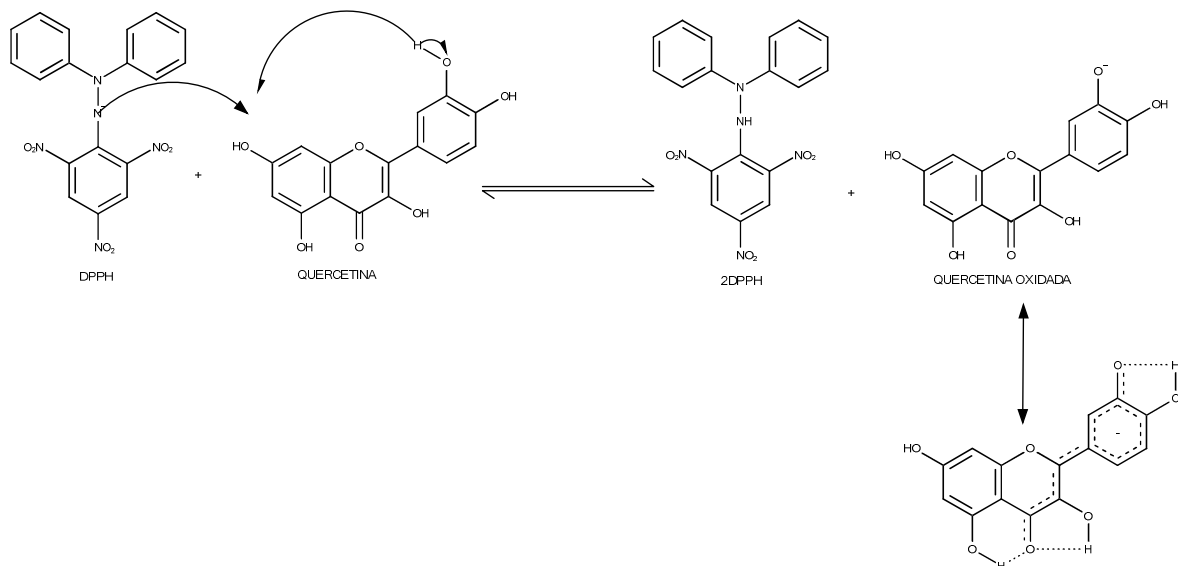
Os antioxidantes naturais são bem conhecidos por atenuarem os efeitos deletérios do estresse oxidativo celular. As substâncias fenólicas são um dos mais importantes grupos de substâncias que ocorrem nas plantas e que contribuem para as propriedades antioxidantes. (FERREIRA, 2010; JABERIAN; PIRI; NAZIRI, 2013). A atividade antioxidante desses compostos se deve principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Essas características desempenham papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação, como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOUSA *et al*, 2007; SOUSA, VIEIRA, LIMA, 2011). A intensidade da ação antioxidante exibida por estes compostos é diferenciada, uma vez que depende, fundamentalmente, do número e posição de hidroxilas presentes na molécula (MELO *et al.*, 2008).

Os métodos mais comumente empregados em laboratório, para avaliação da atividade antioxidante, envolvem a geração de espécies oxidantes, geralmente radicais, e a concentração destes é monitorada na presença de antioxidantes que possam sequestrá-lo, como é o caso do

teste do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (KUÇUK, 2007). O DPPH é radical estável altamente colorido devido à deslocalização dos elétrons e apresenta uma forte banda de absorção na faixa de 517 nm. A absorção diminui como resultado da quebra da deslocalização dos elétrons devido à presença de substâncias (antioxidantes) que possam doar hidrogênio radicalar. Essa reação pode ser monitorada pela mudança na coloração da solução do violeta (DPPH) para o amarelo (DPPH-H) (Figura 6) (CHANDRASEKAR, 2006).

O teste do sequestro de radical livre DPPH é um método econômico, simples, rápido, sendo amplamente utilizado para determinar a atividade antioxidante dos compostos fenólicos (RAFAEL *et al*, 2007).

Figura 6 - Redução do radical livre DPPH pelo flavonoide antioxidante quercetina



Fonte: <http://qnint.s bq.org.br/> (adaptada)

A avaliação da atividade antioxidante já foi realizada para algumas espécies da família Polygalaceae. O extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* apresentou $CE_{50} = 61,2$ mg/mL (LAPA *et al*, 2007), enquanto que o mesmo tipo de extrato da *P. sabulosa* apresentou $CE_{50} = 63,76$ µg/mL e o extrato acetato de etila apresentou $CE_{50} = 110,50$ µg/mL (MENDES, 2008).

2.3.2 Atividade anticolinesterásica

Inibidores da acetilcolinesterase são amplamente usados no tratamento de doenças como a doença de Alzheimer (DA), que se baseia na hipótese colinérgica. A galantamina, um alcaloide isolado de plantas da família Amaryllidaceae, apresenta uma longa ação seletiva, reversível e competitiva para inibir a acetilcolinesterase. A galantamina é considerada mais efetiva no tratamento da doença de Alzheimer que a fisostigmina e a tacrina, que são as

substâncias atualmente utilizadas. Esses medicamentos estão disponíveis no mercado a um preço relativamente oneroso, o que torna a busca de novos inibidores de origem vegetal uma alternativa interessante, na medida em que estes seriam economicamente mais viáveis (TREVISAN et al, 2006; RHEE et al, 2001).

Atualmente, existe uma crescente busca por extratos ou compostos oriundos de plantas que sejam capazes de inibir a enzima acetilcolinesterase (AChE), com especial interesse no isolamento e na identificação desses novos inibidores (RHEE et al, 2001; TREVISAN et al, 2003). A AChE é uma serina hidrolase que catalisa a hidrólise da acetilcolina (ACh) na transmissão do impulso nervoso na sinapse dos neurônios colinérgicos. A enzima está ligada à membrana basal entre as membranas pré e pós-sinápticas, desempenhando seu papel fisiológico. Vale ressaltar que essa reação de degradação da ACh é bastante rápida, sendo sua meia-vida na fenda sináptica de 1 a 2 milissegundos (BERTÉ, 2009; FARZA, 2007).

Nesse sentido, os mais modernos medicamentos utilizados para tratar os sintomas da DA elevam os níveis de acetilcolina pela inibição da enzima AChE, melhorando a função cognitiva dos pacientes por potencializar a atividade colinérgica central (VIEIRA, 2011).

A procura por substâncias com um grau de toxicidade baixo, tem sido intensificada cada vez mais, investigando-se plantas utilizadas na medicina tradicional, como fonte de obtenção de compostos inibidores da AChE. Estes inibidores de origem vegetal, como a galantamina, se ligam ao sítio ativo da enzima de forma reversível por ligações fracas intermoleculares, permitindo, deste modo, a recuperação do centro ativo da enzima (PEDRO, 2008).

Estão sendo desenvolvidos ensaios para detectar esta atividade, em que grande número de plantas estão sendo avaliadas (GIORDANI *et al*, 2008). Os testes para a avaliação de atividade inibitória da AChE centralizam-se em adaptações do método desenvolvido por Ellmann, em 1961, e na reação com acetato de 1-naftil desenvolvido por Marston, em 2002. Este teste consta de método fotométrico de detecção da ação inibitória da enzima AChE, utilizando-se como substrato a acetiltiocolina, um análogo do substrato natural ACh, sendo a atividade enzimática avaliada através do aumento da coloração amarela decorrente da hidrólise de acetiltiocolina a acetato e tiocolina. Este último, após reagir com íon 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoato] (DTNB), chamado também de reagente de Ellmann, produz o íon colorido 5-tio-2-nitro-benzoato, cuja formação pode ser medida em 405 nm em um espectrofotômetro comum (ALVES, 2012).

2.3.3 Avaliação de letalidade frente a *Artemia salina*

As plantas são capazes de produzir variedade de substâncias em diferentes quantidades, aparentemente para sua defesa contra vírus, bactérias, fungos e animais predadores. Muitas dessas substâncias são responsáveis pelas suas propriedades medicinais e aromáticas, são utilizadas pela população como plantas medicinais e despertam interesse científico pelas suas atividades biológicas (LAPA et al, 2006), porém existem muitas substâncias resultantes da sua biotransformação que são consideradas potencialmente tóxicas.

A toxicidade de uma planta pode ser avaliada através de testes *in vivo* ou *in vitro*, contudo este último tipo não é aceito para fins regulatórios de produtos fitoterapêuticos. Por outro lado, eles podem servir como uma triagem prévia para avaliação da toxicidade do material vegetal, seguido, então, de testes *in vivo* (SIQUEIRA et al, 1998).

Para estabelecer a toxicidade dos produtos naturais, muitos testes podem ser empregados como o ensaio de letalidade utilizando o microcrustáceo de água salgada *Artemia salina* Leach (Figura 7), desenvolvido para detectar compostos bioativos em extratos vegetais (MEYER et al, 1982), mas que também pode ser utilizado para expressar a toxicidade de produtos naturais, como extratos de plantas e de produtos marinhos (SHOEB et al, 2007; MOTA et al, 2008). Este bioensaio é considerado eficiente, economicamente viável e não exige técnicas assépticas, nem grandes quantidades de amostra. Esse teste de letalidade é utilizado em centros de pesquisa visando minimizar a utilização de animais de laboratório para estabelecer a segurança de produtos naturais (RUIZ et al, 2005).

Figura 7 - Microcrustáceo *Artemia salina*



Fonte: BOHDAL (2010) (adaptada)

Artemia salina Leach é um microcrustáceo inserido na divisão de Arthropoda, classe Crustáceos, subfamília Branchiopoda e ordem Anostraca. Tem um comprimento de 8 a 10 mm, com coloração vermelho claro, rosa ou marrom dourado, que varia de acordo com o seu habitat (LEITE et al, 2009). É amplamente conhecido como indicador de toxicidade em um

bioensaio que utiliza a concentração letal média (CL₅₀) como parâmetro de avaliação da atividade biológica. O procedimento determina valores de CL₅₀, em µg/mL, de compostos e extratos, sendo que inúmeras substâncias ativas conhecidas apresentam toxicidade por este teste (NUNES et al, 2008; MEYER et al, 1982).

A letalidade da *Artemia salina* pode ser considerada como primeiro indicativo de toxicidade do extrato testado. De acordo com a classificação descrita por Meyer (1982 apud RIBEIRO et al, 2014), são considerados tóxicos extratos que apresentam CL₅₀ inferior a 1000 µg/ml. Por outro lado, segundo David e colaboradores (2001) a substância que apresentar um CL₅₀ no intervalo de 100 a 900µg/ml pode ser comparada ao ácido hipúrico e considerada medianamente ativa, ou seja, ter atividade citotóxica moderada. Já Anderson (1991), sugere que a substância que apresentar CL₅₀ < 100 µg/ml pode ser comparável com a camptecina e sulfato de vincristina, que são duas substâncias consideradas muito ativas.

Além da atividade citotóxica, há estudos que mostram correlação positiva da toxicidade sobre a *Artemia salina* com atividades como antifúngica, viruscida e antimicrobiana, parasiticida, tripanossomicida, entre outras (SIQUEIRA et al, 1998). McLaughlin e colaboradores (1998) afirmam que esse bioensaio apresenta boa correlação com atividade citotóxica em alguns tumores humanos sólidos.

Sabe-se que muitos dos agentes anticancerígenos utilizados clinicamente no tratamento de neoplasias humanas são derivados dos vegetais, a exemplo dos chamados alcaloides da vinca, vimblastina e vincristina, isolados da *Catharanthus roseus*, o paclitaxel, isolado de *Taxus brevifolia*, o etoposídeo e teniposídeo, derivados semissintéticos da podofilotoxina isolada da *Podophyllum peltatum*, entre outros (CRAGG; NEWMAN, 2009).

Diante dessas informações, há estudos realizados por Meyer e colaboradores (1982) e Anderson e colaboradores (1991) com substâncias com atividade antitumoral comprovada, comparando-se o teste de letalidade da *Artemia salina* com outros testes, em que se empregaram linhagens de células cancerígenas, observando uma boa correlação entre a letalidade em *A. salina* e os testes *in vitro* em células. Além disso, a partir do ensaio de toxicidade sobre a *A. salina*, foi descoberta uma nova classe de agentes antitumorais ativos, as acetogeninas, encontrada em plantas da família Annonaceae.

2.4 Métodos *in silico*

O elevado custo de experimentação e falta de técnica específica, estão entre os principais empecilhos que levam determinadas pesquisas a não serem iniciadas ou finalizadas

antes do tempo. Desta forma, o desenvolvimento de fármacos por técnicas de simulações computacionais (*in silico*), tem ganhado destaque, pois possibilita ao pesquisador sugerir a eficácia, atividade, toxicidade e bioavaliabilidade, antes do composto ser submetido aos ensaios *in vitro*, possibilitando assim maior planejamento e direcionamento, que pode reduzir bastante o custo e tempo empregado na pesquisa de novos fármacos (YOUNG, 2009).

A disponibilidade de programas computacionais de química e os bancos de dados em rede são, atualmente, ferramentas fundamentais para a descoberta e planejamento de fármacos. Estas informações permitem análise rápida da atividade biológica *versus* propriedades físico-químicas de série de moléculas de interesse. Novos agentes terapêuticos podem ser desenvolvidos pela análise de dados teóricos de estrutura-atividade de forma tridimensional, obtidos por técnicas de modelagem molecular (CARVALHO et al, 2003).

Com o desenvolvimento de poderosos computadores e *clusters*, os químicos e matemáticos computacionais tem ampliado, cada vez mais, os programas e algoritmos, que possam ser utilizados para resolver série de problemas químicos e equações matemáticas. Isto tem possibilitado a predição de estruturas e de valores de propriedades físico-químicas conhecidas ou não (THOMAS, 2007).

Com esses avanços, o químico medicinal tem a possibilidade de visualizar tridimensionalmente formas exógenas e endógenas de compostos, comumente chamados de ligantes, assim como seu alvo de ligação, referido simplesmente como receptor. Além disso, programas de química medicinal permitem a avaliação da interação de ligantes com seus alvos biológicos, desenvolvimento de estudos entre a estrutura química e sua atividade, predição de atividade biológica, busca por novos alvos de ação e a elucidação estrutural de receptores. Com isso, há um claro direcionamento nos estudos (THOMAS, 2007).

A descoberta de fármacos é um dos principais focos das ciências farmacêuticas e, em particular, da química medicinal. Há cerca de meio século atrás, a química medicinal, expressão moderna para química farmacêutica, desenvolveu-se como ciência voltada para projetar, desenvolver e descobrir substâncias com atividade biológica. Atualmente os químicos medicinais possuem as ferramentas computacionais para auxiliar na descoberta e otimização de novas estruturas. Os métodos *in silico* possibilitam a simulação de muitos processos químicos, o que tem sido para a indústria farmacêutica uma forma de otimizar os custos para a pesquisa de novos compostos (OHLSTEIN et al, 2006; LEWARS, 2006).

2.4.1 Triagem Virtual Inversa

A Triagem Virtual Inversa (TVI), ou Triagem Inversa, consiste em busca em banco de dados de estruturas proteicas de relevância farmacológica, de maneira a evidenciar *in silico*, os receptores farmacológicos de atuação para determinado ligante de interesse (ROGNAN, 2006).

A triagem virtual é utilizada para procurar substâncias que têm mais probabilidade de se ligarem a alvo específico, em grande bibliotecas de moléculas. Por outro lado, o objetivo da triagem virtual inversa é o de identificar os alvos mais prováveis de determinada molécula de consulta (CERETO-MASSAGUÉ et al, 2014; KOUTSOUKAS et al, 2011; WANG; XIE, 2014). Esta abordagem permite a previsão da bioatividade da molécula de consulta ou o seu mecanismo de ação. Além disso, estas técnicas podem ser utilizadas para prever os efeitos adversos da molécula, para detectar polifarmacologia do fármaco, ou para reposicionar fármacos (CERETO-MASSAGUÉ et al, 2014; LIU et al, 2013).

A Polifarmacologia pode ser conceituada como a capacidade das pequenas moléculas de interagir com várias proteínas, é de particular interesse para projetar fármacos mais eficazes. O Reposicionamento de fármacos, o processo de encontrar novos usos para moléculas já conhecidas, é um caminho promissor para explorar indicações alternativas para medicamentos existentes, ainda mais baseando-se na premissa que em média um fármaco pode possuir seis alvos moleculares (MESTRES et al, 2009; LIU et al, 2013).

Tendo em conta as bases de dados, tais como ChEMBL, que contém milhões de moléculas e informações sobre a sua bioatividade, agora está se tornando viável mesclar o conhecido “espaço químico” e “espaço biológico” em modelos que permitem gerar “espectros” biológicos para prever a atividade fenotípica de novas moléculas com base nas suas estruturas químicas e bioatividades conhecidas de compostos estruturalmente similares (CERETO-MASSAGUÉ et al, 2014).

O campo de bases de dados públicos, privados e de bioatividade está em constante crescimento. Não se pode pretender apresentar uma visão completa dos dados de bioatividade, no entanto, devido à importância deste tipo de dados, pelo menos, uma visão geral das principais bases de dados públicas podem ser listados na Tabela 3 (KOUTSOUKAS et al, 2014).

Tabela 3 – Informação sobre alguns dos principais recursos de dados de bioatividade pública

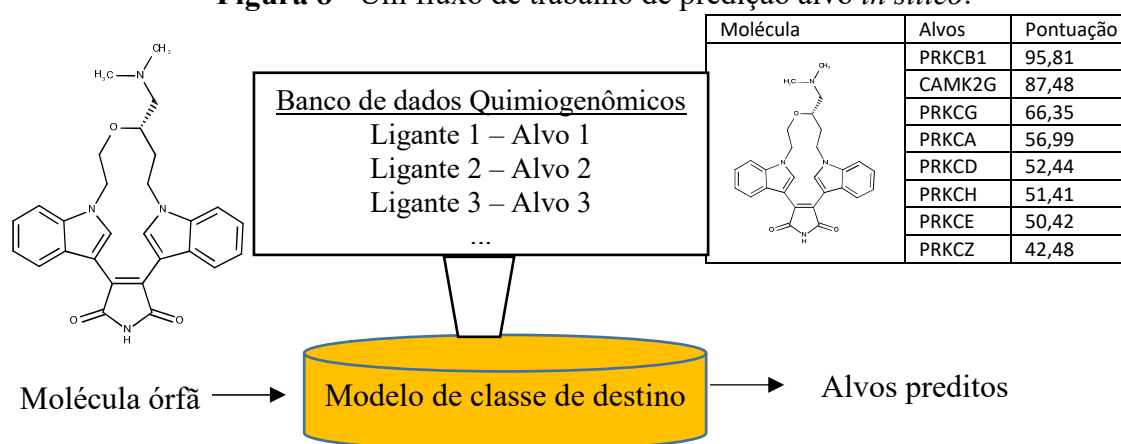
Banco de dados	Dados	Endereço
CheMBL	> 700 mil pequenas moléculas com > 2,7 milhões de informações de bioatividade	ebi.ac.uk/chembl
DrugBank	4800 informações de fármacos, incluindo: > 1350 medicamentos aprovados pela FDA	drugbank.ca/
ChemBank	Informações sobre centenas de milhares de moléculas pequenas e centenas de ensaios biomédicos	chembank.broadinstitute.org/
Comparative Toxicogenomics Database (CTD)	6000 compostos	ctd.mdibl.org/
SuperTarget	1500 fármacos, 2500 proteínas alvo e 7300 interações alvo-fármaco	bioinf-tomcat.charite.de
MATADOR	Moléculas selecionadas do banco de dados SuperTarget	matador.embl.de/
Therapeutic Target Database (TTD)	1906 alvos, incluindo 358 ensaios completos, 251 ensaios clínicos, 43 descontinuados, 1254 alvos de investigação, 5124 drogas, incluindo 1.511 aprovadas, 1.118 ensaios clínicos e 2.331 medicamentos experimentais	xin.cz3.nus.edu.sg
PubChem BioActivity BindingDB	250 mil moléculas, 2500 bioensaios	pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/
BindingDB	>271 mil substâncias, > 620 mil afinidades de ligação contra 5526 proteínas alvo	bindingdb.org
DrugPort (EBI)	1492 medicamentos aprovados e 1664 proteínas alvo exclusivas	ebi.ac.uk
Potential Drug Target Database (PDTD)	1207 entradas que cobrem 841 conhecidas e potenciais alvos de drogas com estruturas do Protein Data Bank (PDB)	dddc.ac.cn/pdtd/
Promiscuous	> 20 milhões de publicações, incluindo > 10 milhões de proteínas, >25 mil substâncias, bem como efeitos colaterais de fármacos	bioinformatics.charite.de/promiscuous
T3DB	Banco de dados de toxinas e toxinas-alvo; >2900 toxinas, 1300 toxinas-alvo e >33.000 associações toxina-alvo	www.t3db.org/
Chem2Bio2RDF	Banco de dados que integra química, dados biológicos e fenotípica	cheminfov.informatics.indiana.edu:8080/

Fonte: KOUTSOUKAS et al, 2014 (adaptada)

Dados de bioatividade de pequenas moléculas podem ser utilizados em uma variedade de formas, para prever alvos proteicos de pequenas moléculas, bem como para conceber

ligantes com bioatividade desejada contra um conjunto de metas, com base no conhecimento contido nas bases de dados. O conceito de predição de atividade biológica pode ser resumido na Figura 8, em que o pesquisador introduz a estrutura molecular em modelo de bioatividade computacional, e em que as prováveis bioatividades da molécula são geradas baseando-se em critérios de semelhança estrutural, afinidade molecular ou *fingerprints*. Esta avaliação irá abranger a racionalização das observações fenotípicas relacionadas com aplicação da molécula, bem como a criação de potencial de novas moléculas com as atividades desejadas (KOUTSOUKAS et al, 2014).

Figura 8 - Um fluxo de trabalho de predição alvo *in silico*.



Fonte: KOUTSOUKAS et al, 2014 (adaptada)

Ao longo dos últimos 10 anos algumas abordagens foram desenvolvidas, tais como a busca de similaridade de estrutura química, extração de dados, acoplamento molecular e espectros de bioatividade com base algoritmos (Tabela 4) (KEISER et al, 2009; Li et al, 2006; CERETO-MASSAGUÉ et al, 2014; LIU et al, 2013).

Tabela 4 - Comparação das tecnologias para Triagem Virtual Inversa

Método	Metodologia	Vantagens	Desvantagens
Pesquisa por similaridade química	Pesquisas de subestruturas, impressões digitais químicas, ReliBase, semelhança morfológica e de superfície em 3D	Não requer conjunto de treinamento ou banco de dados	Ignorar o conhecimento pré-existente da classe do alvo Problema com a classificação dos alvos Ignorar frequência do alvo na base de dados
Extração de dados	Regressão, redes neurais probabilísticas, análise de tendência do vetor,	Rápido, robusto, preciso, fornece uma lista	Não é possível prever alvos fora do conjunto de

	múltiplas categorias de modelos Bayesianos, mapas auto organizáveis	ordenada dos alvos	treinamento
			Requer anotação exata do conjunto de treinamento
Espectro de bioatividades	Afinidade por impressões digitais, impressões digitais farmacofóricas em 3D e modelos de comportamento de vizinhança	Ligações entre estrutura e resposta biológica em vários alvos	Matrizes focadas para poucos alvos
Acoplamento molecular	SIFts, INVDOCK, AutoDock e outros métodos de acoplamento	Não depende de dados do ligante	Lento, limitados a alvos com estruturas resolvidas, preparação de dados intensivo, complicado para normalizar pontuação de acoplamento para o alvo classificado

Fonte: JENKINS; BENDER; DAVIES, 2006 (adaptada)

2.4.1.1 Método de similaridade molecular

Os métodos mais simples para a previsão de alvos são baseados na semelhança química e no conhecimento atual sobre a bioatividade de milhões de moléculas pequenas, em que moléculas semelhantes são susceptíveis de ter propriedades similares (CERETOMASSAGUÉ et al, 2014; ADAMS et al, 2009). Assim, os alvos de determinada molécula podem ser preditos através da identificação de proteínas com ligantes conhecidos que são muito semelhantes à molécula de consulta (BENDER et al, 2007). A vantagem destes métodos é que eles exigem apenas o cálculo da semelhança entre as substâncias (CERETOMASSAGUÉ et al, 2014, CHEN et al, 2011).

Nos métodos de similaridade molecular moléculas pequenas são representadas como *fingerprint* químico. O *fingerprint* consiste em formas de codificar a estrutura da molécula. Para comparar o *fingerprint* de duas moléculas, o coeficiente Tanimoto é o mais comumente utilizado. Quanto mais próximo de 1 o coeficiente Tanimoto for, mais semelhante dois compostos são. Duas estruturas são geralmente consideradas semelhantes se o coeficiente Tanimoto entre eles é maior do que 0,85. Bancos de dados que descrevem as bioatividades de milhares ou milhões de pequenas moléculas ou as atividades de fármacos conhecidos podem ser utilizados para a previsão alvo, como ChEMBL, BindingDB, Drugbank (CERETOMASSAGUÉ et al, 2014).

Por poderem ser calculadas mais rapidamente, *fingerprint* 2D têm sido amplamente usado para pesquisa de similaridade na triagem inversa. No entanto, os descritores químicos

3D também podem ser utilizados (JENKINS; BENDER; DAVIES, 2006), embora calculá-los seja computacionalmente mais caro. Por conterem mais informações, espera-se que as previsões com base em *fingerprint* 3D sejam melhores do que aqueles que se baseiam nos dados em 2D. No entanto, em alguns casos, os métodos que utilizam *fingerprint* 2D superaram esses métodos que usam dados em 3D quanto a previsão correta do alvo. Descritores 3D funcionam melhor em casos de baixa similaridade estrutural (CERETO-MASSAGUÉ et al, 2014).

Uma limitação conhecida dessas abordagens é que a semelhança química de substâncias inativas podem, por vezes, apresentar boa semelhança com moléculas ativas se tiverem sido obtidas por modificação de substância ativa em alguma posição chave crucial para suas interações. Estes compostos inativos podem fornecer previsões de alvos falsos positivos (GFELLER et al, 2014).

2.4.1.2 Extração de dados

Outro campo cada vez mais importante utilizado para a previsão da bioatividade das substâncias químicas são os métodos de mineração de dados. Estes métodos, em contraste com os métodos de similaridades químicas, que simplesmente identificam alvos potenciais com base nas semelhanças de subestruturas moleculares do ligante, realizam reconhecimento de padrões em vastos compostos de espaço e de *cluster* quimiogenômico que apresentam semelhanças no espaço multidimensional. Estes métodos têm ganhado constantemente a preferência e credibilidade, já que são capazes de identificar e correlacionar grande número de substâncias que de outra forma seriam impossíveis de se conectar semelhanças subestruturais sozinho. Métodos de aprendizagem de máquina, como *Support Vector Machines* e modelos de regressão linear são a força motriz dessas abordagens. Um número significativo de métodos que utilizam abordagens de prospecção de dados para mapeamento do espaço quimiogenômico foram publicados durante a última década (KOUTSOUKAS et al, 2014).

2.4.1.3 Espectro de bioatividades

As atividades de determinada substância através de série de leituras biológicas, tais como perfis de expressão de gene ou micro ensaios da proteína, podem também ser vistos como descritores moleculares e utilizados para a previsão de alvos (BENDER et al, 2007; IORIO et al, 2010; EMIG et al, 2013). Estes métodos usam valores experimentais das moléculas de consulta e requerem conjunto de referência, tal como o mapa de conectividade,

de perfis de expressão de genes a partir de células humanas de cultura tratados com pequenas moléculas bioativas (LAMB et al, 2006; CERETO-MASSAGUÉ et al, 2014). O servidor web 2.0 Mantra explora semelhanças entre os perfis de transcrição induzida por drogas e representa esta informação como uma rede. Inspeção visual das drogas ajudam a revelar modos de ação e sugere novas aplicações de drogas conhecidas (CARRELLA et al, 2014).

2.4.1.4 Acoplamento molecular

Outros métodos de triagem inversa usam a estrutura das proteínas alvos para prever novas bioatividades. Para estes estudos busca-se por farmacóforos, ou *fingerprint* das interações proteína-ligante (GAO et al, 2008; LUO et, 2011; WANG et al, 2011; LIU et al, 2010; CERETO-MASSAGUÉ et al, 2014). Estes métodos estão limitados a alvos com estruturas resolvidas. O acoplamento molecular de determinada molécula de consulta em grande grupo de estruturas cristalográficas exige grande poder computacional ou quantidade extraordinária de tempo. Além disso, o acoplamento molecular não é maneira mais confiável para investigar interações ligante-alvo, já que não existe nenhuma relação estatisticamente significativa entre os escores de encaixe e afinidade do ligante (BENDER et al, 2007). Apesar dessas limitações, os programas específicos de acoplamento e servidores de triagem inversa, chamados métodos inversos de acoplamento, tem sido desenvolvidos, em alguns casos, reduzindo o tempo de processamento necessário e desenvolvendo medidas de pontuação especiais (CERETO-MASSAGUÉ et al, 2014).

Métodos baseados na estrutura, no contexto da concepção de fármacos, geralmente descrevem abordagens que exploram informação estrutural da proteína, juntamente com funções de pontuação, a fim de prever os pares ligante-alvo. Mais convencionalmente, ligantes são identificados como pares de interação para dada proteína, no entanto, mais recentemente, este conceito tem também sido revertido para encaixar pequenas moléculas contra grupo de múltiplos receptores (acoplamento inverso), que é então aplicada ao alvo de predição (KOUTSOUKAS et al, 2014).

Em particular, os métodos baseados em acoplamento como TarFisDock e sc-PDB foram apresentados com o objetivo de elucidar a proteína alvo de determinada molécula, com base na avaliação da afinidade entre grupo de proteína com o ligante avaliado. TarFisDock é baseado no software DOCK e também está disponível publicamente em uma interface na web. Por outro lado, O sc-PDB realiza comparação por similaridade estrutural

entre os ligantes complexados e a estrutura de interesse (CHEN et al, 2003; GAO et al, 2008; CARREGAL et al, 2011; ROGNAN, 2010).

2.4.1.5 Servidores de TVI

Para prever interações proteína-molécula, banco de dados de referência construído manualmente por Yamanishi et al (2008) tem sido frequentemente utilizado, o qual é composto de quatro tipos de interações proteína-molécula, isto é, interações enzimáticas, canais iônicos, receptores acoplados a proteína G (RAPG), e os receptores nucleares. Recentemente, esse banco de dados de referência que consiste em mais de 155000 pares de proteína-molécula a partir de 894 alvos proteicos humanos tem sido proposto para os futuros métodos de predição de alvos. Existem vários servidores na Web publicamente disponíveis para a triagem inversa (Tabela 5), com diferentes métodos desenvolvidos (WANG et al, 2011; CERETO-MASSAGUÉ et al, 2014).

Tabela 5 - Servidores da Web que podem ser empregados para a triagem inversa *in silico*

Servidor	Método	Endereço
ChemMapper	Cálculo de Similaridade 3D (forma molecular e características quimiotípicas)	lilab.ecust.edu.cn/chemmapper/
ChemProt 2.0	Baseado em impressões digitais	cbs.dtu.dk/services/ChemProt-2.0/
DRAR-CPI HitPick	Baseado em acoplamento molecular Combina impressões digitais 2D e método de aprendizagem de máquina com base em um modelo Laplacian modificado	cpi.bio-x.cn/drar/mips.helmholtzmuenchen.de/proj/hitpick
idTarget	Método de acoplamento molecular	idtarget.rcas.sinica.edu.tw/
Mantra 2.0	Estatísticas não paramétricas e teoria de redes sobre a expressão gênica de dados	mantra.tigem.it/
PASS ONLINE	Impressões digitais Bayesiana com base no conhecimento sobre as relações estrutura-atividade de mais de 260000 compostos	pharmaexpert.ru/passonline/
PharmMapper	Baseado no farmacóforo	59.78.96.61/pharmmapper/index.php
Similarity ensemble approach (SEA) SPiDER	Baseado em impressões digitais Previsão baseada em mapas auto organizáveis	sea.bkslab.org/ modlab-cadd.ethz.ch/software/spider/
SuperPred	Combinação de similaridade 2D, 3D	prediction.charite.de/

	e fragmentos	
SwissTargetPrediction	Combinação de valores de similaridade 2D e 3D	swisstargetprediction.ch/
TarFisDock	Baseado em acoplamento molecular	dddc.ac.cn/tarfisdock/
TargetHunter	Baseado em impressões digitais	cbligand.org/TargetHunter/

Fonte: CERETO-MASSAGUÉ et al, 2014 (adaptada)

Avanços no desenvolvimento de ferramentas para o acoplamento de pequenas moléculas a proteínas, ou seja, da avaliação virtual, demonstrou a eficácia desta abordagem para a descoberta de moléculas para o desenvolvimento de drogas potenciais na era pós-genômica (CERETO-MASSAGUÉ et al, 2014; LI et al, 2006). Programas de acoplamento molecular foram usados para procurar ligantes que reconhecem a estrutura 3D de determinado alvo obtido por cristalografia de raios X, espectroscopia de RMN ou mesmo por modelagem comparativa. No entanto, a identificação e validação de alvos entre milhares de macromoléculas candidatas ainda é tarefa desafiadora (HADJUCK; HUTH; TSE, 2005).

Neste contexto, tornou-se necessário o desenvolvimento de métodos rápidos, robustos e eficientes para identificar e validar novos alvos e, concomitantemente, para mapear o espaço de perfis ligante-alvo. Abordagem proteômica na identificação de proteínas potenciais envolve a comparação dos perfis de expressão de proteína para determinada célula ou tecido, na presença ou na ausência da molécula em estudo. Este método não provou ser muito eficaz na descoberta de alvos porque é trabalhoso e demorado (LIU et al, 2010). Dentro deste novo cenário, métodos *in silico* de determinação de perfis dos alvos moleculares estão surgindo como alternativas eficientes para o alto custo, atualmente inacessíveis, na determinação de perfis de alvos *in vitro* de moléculas, bem como para encontrar novas indicações terapêuticas para medicamentos antigos, atividade muitas vezes referida como reaproveitamento de drogas (BAJORATH, 2008; KLEBE, 2006; KEISER et al, 2007).

O DRAR-CPI é um servidor utilizado para a previsão de reposicionamento de fármacos potenciais e reações adversas a medicamentos via interação proteína-ligante (YANG; CHEN; HE, 2009). Este servidor possui coleção abrangente dos modelos estruturais de 385 proteínas humanas segmentáveis e 254 formas ativas de moléculas pequenas com descrições conhecidas, indicações e reações adversas a medicamentos. Quando usuário envia determinada molécula, programas de acoplamento molecular podem ser aplicados para calcular a energia de ligação entre a molécula e os alvos. O servidor irá atribuir as pontuações positivas ou negativas de associação entre molécula do usuário e os fármacos da biblioteca com base em seus perfis de interação. Desde que os fármacos da biblioteca tenham, anotação

abrangente de suas indicações e reações adversas, pode-se prever potenciais indicações ou reações adversas a medicamentos, com base nos escores de associação de sua molécula em todas as moléculas da biblioteca. As previsões *in silico* de associações medicamentosas com aqueles previstos através de perfis de expressão genética tem sido correspondidas, atingindo taxa 74%, reduzindo significativamente o tempo e custo. Informações sobre as associações de droga-droga pode levar a novas indicações para fármacos já existentes, tais como a aplicação de anti-psicóticos para o tratamento potencial de infecções bacterianas, vice-versa (LUO et al, 2011).

Entre os recentes avanços do sistemas químicos biológicos, servidores de suporte de perfil de fármacos como STITCH (KUHN et al, 2012), DisGENET (BAUER-MEHREN et al, 2010) ou PROMISCUOUS (von EICHBORN et al, 2011) devem ser mencionados. STITCH3 fornece pontuações de confiança que refletem o nível de confiança e significância das interações molécula-proteínas. PROMISCUOUS é focado em moléculas de drogas, incluindo interação droga-proteína e efeitos colaterais. DisGENET é um banco de dados abrangente de associação de genes-doenças focado no conhecimento atual das doenças genéticas humanas (KJÆRULFF et al, 2013).

O ChemProt é um banco de dados de biologia e química das doenças (TABOUREAU et al, 2011). Em comparação com outras abordagens, ChemProt 1.0 oferece nível elevado de integração de dados químicos e biológicos, incluindo interações proteína-proteína associada a doenças (LAGE et al, 2007). A segunda versão do ChemProt fornece recurso de interações de biologia e química de doença selecionadas e preditas. Esse servidor contém compilação de mais de 1.100.000 produtos químicos exclusivos com atividade biológica e mais de 15.000 proteínas. Foi adicionada interface visual que suporta navegação através dos dados, atividades biológicas e associações de doenças. ChemProt-2.0 agora permite que o usuário consulte o banco de dados não apenas por produtos químicos ou proteínas, mas também através de efeitos terapêuticos, reações adversas a medicamentos e doenças. O *Similarity Ensemble Approach* (SEA), desenvolvido por Keiser et al (2007) também tem sido implementado, de modo que a similaridade de sequência de proteína possa ser utilizada quando se examina a promiscuidade química. Com essas atualizações, ChemProt-2.0 oferece abordagem integrada para compreender o impacto de pequenas moléculas em sistemas biológicos e contribui para a investigação dos mecanismos moleculares relacionados a doenças e os resultados clínicos (KJÆRULFF et al, 2013).

Com base no pressuposto de que os compostos de estrutura semelhante têm potenciais bioatividades semelhantes, o ChemProt codifica a estrutura química através de dois tipos

diferentes de *fingerprint*: 166 MACCS que codifica a presença ou ausência de algumas subestruturas predefinidas ou grupos funcionais (DURANT et al, 2002) e o *fingerprint* FP2 computados com OpenBabel (O'BOYLE et al, 2011). A similaridade química entre duas substâncias é avaliada quantitativamente utilizando o coeficiente Tanimoto (CT). Ao incluir o método SEA (KEISER et al, 2007), também se pode prever potenciais novos alvos para determinada substância. Compostos com valor de atividade $<100 \mu\text{M}$ foram considerados (apenas CI_{50} , CE_{50} , potência, AC_{50} , valores de K_i foram utilizados). Além disso, para completar o conjunto de ligantes e proteínas ativas, interações ligante-proteína do CTD, Drugbank e PharmGKB também foram incluídos, juntamente com proteína-ligante do banco de dados STITCH. No ChemProt 2.0, todas as proteínas com mais de cinco ligantes bioativos são consideradas. Além disso, para todos os alvos de proteína, que operam com similaridade de seqüência alta podem partilhar funções semelhantes e podem ser alvo de mesmo composto (provavelmente com diferentes atividades biológicas). As seqüências de proteínas são obtidas a partir de UniProt (UNIPROT CONSORTIUM, 2011), e comparações de seqüências, são calculadas usando BLASTP (ALTSCHUL et al, 1997). A semelhança entre duas seqüências é avaliada utilizando *E*-score, valor de expectativa relacionada com a probabilidade de que a semelhança de seqüências entre duas proteínas não é conseguida por acaso, onde apenas foram considerados *E*-value $< 10^{-10}$ (ALTSCHUL et al, 1997).

O servidor GUSAR *Antitarget/Toxicity Prediction* utiliza base de dados interna criada a partir da Banco de Dados de Toxicidade SYMYX MDL (SYMYX MDL *Toxicity Database including* RTECS). Ele inclui informação sobre aproximadamente 10.000 estruturas químicas com os dados sobre a toxicidade aguda em ratos. Para as moléculas que apresentaram mais de um valor dose letal média (DL_{50}) para um tipo apropriado de administração, o servidor utilizou-se de valor médio. A conversão de valores da faixa de toxicidade aguda, que varia segundo a via de administração, obtidos experimentalmente é feita em classes de 1 a 5, em que a classe 1 é a mais tóxica e a classe 5 a menos tóxica. Em casos de valores abaixo da faixa de classe 5, a molécula é considerada não tóxica para a via analisada (LAGUNIN et al, 2011).

A abordagem utilizada pelo GUSAR é comparada com os métodos realizados pelo programa TEST 3.0 (Toxicidade Estimativa SOFTWARE Tool) fornecido pela US EPA (*Environmental Protection Agency*) (LAGUNIN et al, 2011). Este programa inclui modelos obtidos utilizando vários métodos QSAR:

1. Método hierárquico: A toxicidade para determinada molécula de consulta é estimada com base na média ponderada das previsões de vários modelos diferentes.

2. Método de FDA: A predição para cada produto químico de teste é feita através de novo modelo que se adapta aos produtos químicos, que são mais similares à molécula de teste.

3. Método do vizinho mais próximo: A toxicidade prevista é estimada calculando valor médio para três produtos químicos no conjunto de treinamento que são mais semelhante à substância em estudo.

4. Método de Consenso: A toxicidade predita é estimada pela média das toxicidades prevista a partir dos métodos QSAR (do inglês *Quantitative structure–activity relationship*) anteriores.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Análise Fitoquímica

3.1.1 Coleta e identificação do material vegetal

A coleta de *Asemeia ovata* foi realizada no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS (Feira de Santana, estado da Bahia, Brasil) no período agosto de 2013. A identificação foi feita por comparação, pelo especialista na família José Floriano B. Pastore, com a exsicata depositada no Herbário do Departamento de Biologia da UEFS (HUEFS) com identificação HUEFS 168952.

3.1.2 Preparação do extrato e frações

Após a coleta, o material foi submetido à secagem em estufa a (45 ± 3) °C, durante 15 dias, até peso constante. Após a secagem, toda a planta, incluindo parte aérea e raízes, foi moída em liquidificador industrial. A coleta da *A. ovata* resultou, após trituração, em 2.898,38 g de massa pulverizada.

A extração foi realizada através do método de maceração, utilizando metanol como solvente extrator. A cada 5 dias, o solvente foi renovado, e essa operação foi repetida por 5 vezes. Os filtrados obtidos em cada etapa foram reunidos e concentrados em evaporador rotativo sob pressão reduzida, com banho em temperatura de (50 ± 1) °C. Após esse processo foi obtida massa de 404,8 g do extrato metanólico bruto (EBAO), equivalente a 13,9 % de rendimento.

Depois da obtenção do extrato metanólico seco, massa de 3 g foi retirada para a realização das análises subsequentes, sendo que a massa restante foi submetida à partição para obtenção dos extratos hexânico, clorofórmico e acetato de etila (Figura 9).

Figura 9 - Etapas de preparo dos extratos de *A. ovata* (à esquerda concentração do EBAO, à direita partição)



Para a partição, o extrato bruto seco (EBAO) foi diluído em solução hidroalcoólica de metanol:água na proporção (9:1). Em seguida, colocou-se a solução em funil de separação com hexano, sendo o volume de hexano utilizado equivalente a 1/3 do volume total da solução hidroalcoólica. A fase hexânica foi coletada em um recipiente de vidro, previamente pesado, e a fase aquosa submetida mais duas vezes à partição com hexano, utilizando o mesmo volume de solvente em cada etapa.

Ao fim da extração com hexano, a fase aquosa foi diluída, para obtenção da solução metanol:água na proporção (6:4). Essa solução foi submetida ao mesmo procedimento utilizando o clorofórmio. A fase clorofórmica foi coletada e seca em evaporador rotativo.

A fase aquosa foi submetida à evaporador rotativo para eliminação do metanol. Em seguida, a mesma foi novamente colocada em funil de separação, para partição com acetato de etila. A fase acetato de etila foi coletada separadamente e submetida ao processo de secagem para obtenção do extrato seco. As frações obtidas após a partição do extrato bruto apresentaram como rendimento 62,31 g (15,33%) para EHAO, 33,97 g (8,39%) para ECAO e 15,09 g (3,73%) para EAAO.

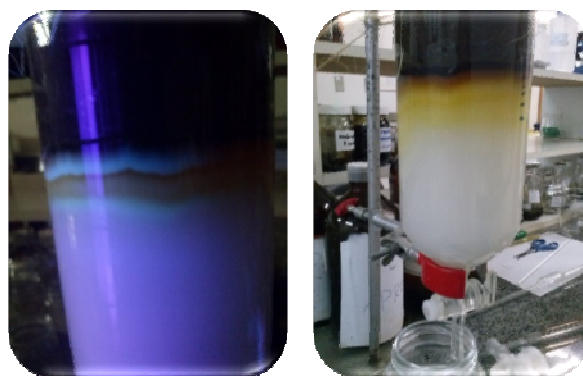
Assim como para o EBAO, após secagem dos extratos obtidos da partição, foram retiradas alíquotas dos extratos hexânico (EHAO), clorofórmico (ECAO) e acetato de etila (EAAO) para realização das demais análises.

Os extratos foram submetidos a análise dos seus perfis cromatográficos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Realizou-se então a CCD utilizando como fase móvel hexano:acetato de etila e diclorometano:metanol, em que foi observada melhor separação para ECAO e EHAO no sistema utilizando hexano/acetato de etila, e para o EAAO

o sistema com diclorometano/metanol apresentou melhores resultados. Dessa forma, prosseguiu-se com a realização das Cromatografias em Coluna (CC) utilizando os sistemas de solventes citados.

Para realização da CC aberta foi necessária a confecção de pastilha. Foi utilizada sílica gel 60H (0,063–0,200 mm)/(70-230 mesh). A eluição da coluna foi realizada segundo ordem crescente de polaridade de acordo com o sistema escolhido para cada extrato (clorofórmio:metanol para EAAO e hexano:acetato de etila para ECAO e EHAO). A mudança da proporção dos solventes foi realizada conforme a necessidade durante o experimento, para isso lâmpada de UV (254 e 365 nm), bem como a mudança de coloração das bandas na luz ambiente e a coloração das frações coletadas, auxiliaram na visualização da separação das bandas (Figura 10).

Figura 10 - Coluna Cromatográfica do ECAO (à esquerda visualização em UV a 365 nm, à direita visualização em luz visível)



A coluna cromatográfica (CC) do ECAO resultou em 27 frações, enquanto que a do EHAO resultou em 23 frações e a do EAAO em 19 frações. As frações obtidas foram submetidas à análise por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando diferentes sistemas de solventes, que incluíam misturas de hexano/acetato de etila, como também de diclorometano/metanol, e resultando na união das frações com perfil em CCD semelhantes. A revelação foi feita em câmara de UV (254 e 365 nm) e/ou vapor de iodo. Dessa forma, a fração clorofórmica resultou em 10 grupos de frações, a fração hexânica em 9 grupos de frações, e a fração acetato de etila resultou em 7 grupos de frações.

As frações obtidas também foram reveladas com reagentes específicos como Cloreto férrico, Hidróxido de potássio ou Liebermann-Burchard. As que apresentaram bons resultados para alguns desses reagentes foram submetidos a nova CC. Nesse contexto, as frações 6 e 11 de EAAO (FAAO6 e FAAO11) foram submetidas a nova coluna cromatográfica em sílica gel. As subfrações foram submetidas ao mesmo procedimento de CCD realizado para as frações,

com o objetivo de unir as que apresentaram mesmo perfil cromatográfico. Assim, o total de subfrações obtidas foram de: 35 para FAAO6 e 33 para FAAO11.

3.1.2.1 Purificação das frações

Algumas das subfrações apresentaram precipitados em forma de cristais (SFA6-J e SFA11-A). A SFA6-J foi submetida a novo fracionamento por cromatografia por exclusão efetuados por permeação em gel de dextrana Sephadex[®] LH-20 e eluído com solventes apropriados (clorofórmio:metanol – 1;1). As separações foram monitoradas por CCD. Das subfrações obtidas, a SFA6-J31 apresentou grau de pureza suficiente para análise por RMN de ¹H e RMN de ¹³C, para auxiliar na identificação da substância. As subfrações SFA6-J58 e SFA11-A foram purificadas dissolvendo as impurezas em metanol, em seguida, separado o sobrenadante (contendo as impurezas), e após diversas lavagens foram analisadas por CCD e apresentaram-se puras, que foram também submetidas a reagentes específicos e foram submetidas à análise por RMN.

A substância isolada SFA6-J31 foi enviada para o Laboratório Baiano de Ressonância Magnética Nuclear (LABAREMN) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), para obtenção dos espectros de RMN unidimensionais, e para Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, do Instituto de Química, na Universidade Federal de Goiás, para obtenção dos espectros de RMN bidimensionais. A SFA11-A teve sua estrutura elucidada com base nas análises de EM e RMN, no Laboratório Baiano de Ressonância Magnética Nuclear (LABAREMN) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Por fim, a substância SFA6-J58 foi analisada somente por CLAE-DAD, usando as mesmas condições cromatográficas descritas no tópico Análise do perfil cromatográfico por CLAE-DAD.

A espectrometria de massa de eletrospray (ESI-EM) foi realizada através de um sistema cromatográfico Shimadzu (LCMS-2310), enquanto que a espectroscopia de RMN (uma e duas dimensões) foi realizada em aparelho Varian Gemini 2000 e INOVA 500, operando a 500 MHz espectrômetro de ¹H e 125 MHz para ¹³C. O clorofórmio deuterado (CDCl₃) foi usado como solvente para a SFA6-J31 e a piridina-d₅ foi usada como solvente para a SFA11-A, já o tetrametilsilano (TMS) utilizado como padrão interno.

3.1.3 Triagem fitoquímica

A triagem fitoquímica foi realizada no Laboratório de Extração (LAEX) no Horto Florestal da UEFS, a partir do EBAO, através de testes colorimétricos e ensaios de

precipitação para detecção de compostos fenólicos, taninos, flavonoides, antocianinas, antraquinonas, alcaloides, esteroides, saponinas e cumarinas, de acordo com a metodologia descrita previamente por Matos (1997).

Para o teste de determinação da presença de compostos fenólicos, foi preparada uma solução utilizando-se 0,5 g do EBAO da planta, diluído em 50 mL de etanol. Foram adicionados 4 mL do extrato etanólico em tubo de ensaio seguido de 3 gotas de solução alcoólica de FeCl_3 a 2%, agitando-se por alguns segundos. Foi preparado também um teste em branco com água destilada e FeCl_3 para comparações, sendo que a presença de fenóis é indicada pelo aparecimento da coloração que varia entre o azul e o vermelho.

No teste de taninos foi pesado 0,5 g do EBAO, adicionando-se 25 mL de água destilada em um erlenmeyer. A solução foi aquecida durante 15 minutos, e após arrefecimento a mesma foi filtrada e adicionada em três tubos de ensaios. No tubo 1, foram colocados 1 mL do extrato aquoso e mais 5 mL de água destilada, além de 5 gotas de FeCl_3 a 2%. Nos tubos 2 e 3, foram adicionados 2 mL do extrato aquoso e 5 gotas de acetato de chumbo a 10% e 5 gotas de acetato de cobre a 3%, respectivamente. A presença de compostos taninos é identificada pela mudança de coloração e aparecimento de precipitado.

Para a determinação de flavonoides, foi pesado 1 g do EBAO em um erlenmeyer, e adicionou-se 15 mL de etanol 70% deixando-se em aquecimento brando durante 15 minutos. Após ser filtrado, o extrato etanólico foi adicionado em tubos de ensaio para a realização da reação com hidróxidos alcalinos e da reação de Shinoda. No primeiro caso, foi adicionado 2 mL desse extrato em dois tubos e 0,5 mL de solução de NaOH 1N ao tubo 1, fazendo-se comparações da coloração obtida com o extrato contido no tubo 2. Já no segundo caso, foi colocado 3 mL do extrato etanólico e alguns fragmentos de magnésio, adicionando-se lentamente 1 mL de HCl concentrado. A reação é positiva, indicando a presença de flavonoides, quando ocorre a intensificação da coloração amarelada do tubo 1 na reação com o hidróxido alcalino, bem como pelo aparecimento de coloração variando de rósea a vermelha na reação de Shinoda.

No teste de antraquinonas, em um erlenmeyer de 125 mL foi adicionado 0,3 g do EBAO da planta e 5 mL de hexano. Deixou-se decantar o solvente, transferindo-o para um tubo de ensaio, e em seguida foi adicionado à solução cerca de 1 mL de NH_4OH concentrado, sendo conhecido como a reação de Borntraeger. O aparecimento da coloração rósea ou vermelha da camada aquosa indica a presença de compostos antraquinônicos livres.

No teste de antocianinas, foi pesado 1 g do EBAO e em seguida adicionou-se 10 mL de água destilada. O extrato aquoso foi filtrado e adicionado em 3 tubos de ensaio, os quais

foram conduzidos a valores de pH ácido, neutro e alcalino, respectivamente. Para tal, no tubo 1 adicionou-se 3 gotas de HCl 6N e no tubo 3 adicionou-se 3 gotas de NH₄OH 6N. Logo após, foram observadas as mudanças de coloração desenvolvida em cada tubo de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6 - Indicativos da presença de antocianinas

pH do meio	Coloração adquirida
Ácido	Vermelha
Neutro	Lilás
Alcalino	Azul-púrpura

Fonte: MATOS, 1997 (adaptada)

O teste para detecção de esteroides e triterpenoides foi realizado diluindo-se uma pequena quantidade do EBAO em etanol, colocando-se logo em seguida, 10 mL dessa solução em banho-maria até secar total. O resíduo seco resultante no fundo do béquer foi extraído com 2 mL de clorofórmio, por três vezes. A solução foi filtrada em um funil fechado com algodão coberto com Na₂SO₄ anidro e passada para um tubo de ensaio. Em seguida, foi adicionado 1 mL de anidrido acético e 3 gotas de H₂SO₄ concentrado, agitando-se suavemente. O aparecimento da coloração azul seguida de verde permanente é indicativo da presença de esteroides livres, enquanto que o aparecimento da coloração entre parda a vermelha indica a presença de triterpenoides.

Para a determinação de saponinas, o resíduo seco obtido no teste anterior foi redissolvido utilizando-se 5 mL de água destilada, e logo após, foi filtrado para um tubo de ensaio. A solução foi agitada por 3 minutos, observando-se a formação de espuma. A presença de espuma persistente e abundante indica a presença de saponinas.

Já no teste de cumarinas pesou-se uma pequena quantidade do EBAO, dissolvendo-se em etanol. A partir desse extrato etanólico adicionou-se uma gota em dois pedaços de papel filtro, e em seguida, colocou-se uma gota de KOH 10% sobre a mancha de um dos papéis. Os mesmos foram colocados em uma câmara com incidência de luz ultravioleta e foi observado se houve o aparecimento de uma mancha fluorescente, a qual indica a presença de cumarinas.

Por fim, o teste para determinação de alcaloides foi realizado, pesando-se 0,5 g do EBAO e dissolvendo-se em 25 mL de ácido acético a 5%. A solução foi aquecida em banho-maria até obter fervura e depois alcalinizada com NH₄OH a 10%, sendo transferida para um funil de separação. Em seguida, adicionou-se 10 mL de clorofórmio, agitou-se e deixou-se a solução em repouso por alguns minutos. A fase clorofórmica foi retirada do funil e colocada

em banho-maria até evaporação desse solvente, restando apenas um resíduo contendo supostamente alcaloides. A esse resíduo adicionou-se HCl a 1%, colocando-se em uma placa de Petri uma gota dessa solução e, ao lado, uma gota de reagente de Dragendorff. As porções das duas soluções foram postas em contato e observou-se a reação. O aparecimento de precipitado é indicativo da presença de alcaloides.

3.1.4 Análise do perfil cromatográfico por CLAE-DAD

Os extratos secos obtidos (EBAO; EHAO; ECAO; EAAO) foram submetidos à técnica de CLAE-DAD para traçar o perfil químico e identificar possíveis substâncias através de comparação com padrões externos. Os padrões analisados foram canferol, canferide, rutina, quercetina, procianidina, epicatequina, formononetina, ácido *trans*-ferúlico, ácido cafeico, catequina, ácido *trans*-cinâmico, ácido *p*-cumárico, propilgalato, luteolina, luteolina-7-*O*-glicosídeo, artepelin e emetina da Sigma-Aldrich® e ácido gálico da Vetec.

Para traçar o perfil químico, os extratos foram dissolvidos com a fase móvel orgânica (Fase B) e filtrados sob pressão em cartucho de extração em fase sólida (SPE-C18 200 mg/3 ml - Cleanert®), o qual foi acondicionado com a mesma fase móvel orgânica, seguida de outra filtração em filtro de 0,45 µm antes da injeção no cromatógrafo. Para a identificação, foram preparadas soluções dos padrões pela dissolução dos mesmos na fase móvel B na concentração de 1 mg/mL. Solução de mistura de todos os padrões também foi analisada com objetivo de avaliar a separação dos mesmos.

As amostras foram analisadas em cromatógrafo Varian e detector de arranjo de diodo Varian ProStar. A separação cromatográfica foi realizada por meio de coluna LiChroCART Purospher StaR® RP18-e (250 mm x 4,6 mm i.d.) (5µm) (Merck, Darmstadt, Germany) combinado com pré-coluna apropriada da Merck. O método utilizado foi adaptado de Cíková e colaboradores (2008). A partir do gradiente de eluição de Cíková, várias proporções da fase móvel foram testadas até ser determinado o gradiente com melhor definição dos picos tanto da mistura de padrões quanto das amostras testadas. O melhor gradiente de eluição obtido foi solução de ácido acético 0,7% (Fase A) e acetonitrila (MeCN): ácido acético 0,7% (8:2) (Fase B) mostrado na Tabela 7. As condições cromatográficas incluíram: fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL, faixa de comprimento de onda de 220-600 nm. Os cromatogramas foram comparados, em diferentes comprimentos de onda, quanto ao número de picos e a qualidade dos mesmos.

Para as análises em CLAE foram usados solventes de grau cromatográfico de pureza (Merck® e Vetec®) e água ultra purificada.

Tabela 7 - Gradiente de eluição

Tempo (min)	Ácido Acético %	Ácido Acético + MeCN %
0:00	95	5
1:00	95	5
5:00	90	10
12:00	83	17
30:00	20	80

3.1.5 Quantificação dos compostos identificados

A análise por CLAE-DAD também foi utilizada com o objetivo de quantificar as substâncias identificadas nos extratos analisados. As condições cromatográficas foram as mesmas utilizadas para a determinação do perfil químico. Entretanto, a aquisição cromatográfica foi definida em 280 nm.

Para a quantificação, foram preparadas soluções estoque das substâncias identificadas (1 mg/mL). A partir dessas, foram preparadas 5 soluções em diferentes concentrações para a obtenção das respectivas curvas de calibração. As soluções estoque foram armazenadas a 4°C. Para a preparação da amostra, foram preparadas soluções de cada extrato (EBAO, ECAO, EAAO e EHAO) na concentração de 2 mg/mL, dissolvidos na fase móvel orgânica. A solução da amostra foi filtrada através de cartucho de extração em fase sólida (SPE-C18 200mg/3ml - Cleanert®) seguida de outra filtração em filtro de 0,45 µm antes da injeção de CLAE.

O método foi validado segundo as diretrizes da International Conference on Harmonization (ICH) (ICH, 1995A; ICH, 1995B). Os parâmetros utilizados foram, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e de quantificação.

A seletividade foi determinada por meio da comparação de picos dos padrões e das amostras, levando-se em consideração: tempo de retenção, espectro de ultravioleta e pureza do pico em três pontos diferentes.

A linearidade foi determinada pela curva de calibração, levando-se em consideração o coeficiente de correlação (R^2). As curvas de calibração foram obtidas por injeções triplicatas

de cinco soluções de diferentes concentrações dos padrões externos. As soluções estoque dos padrões externos foram preparadas pela dissolução na fase móvel orgânica dos mesmos.

A precisão foi avaliada pelo teste de repetibilidade. O teste foi realizado com três diferentes concentrações de soluções padrão, em triplicata (SHEKARCHI et al, 2010). O valor do desvio padrão relativo (DPR) foi tomado como uma avaliação da precisão (RAI; PATIL; RAJPUT, 2009), segundo a fórmula,

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

A exatidão foi verificada pelo fator de recuperação. Amostras da matriz foram fortificadas com três soluções de cada padrão de concentrações conhecidas. As amostras fortificadas, juntamente com amostra de matriz não-fortificada, foram submetidas a todo o processo de extração e injetadas em CLAE. A exatidão foi determinada pela fórmula:

$$Rec\% = \frac{[\text{valor obtido} - \text{valor real}]}{\text{valor real}} \times 100$$

O limite de detecção (LD) foi estimado pela relação do desvio padrão e da inclinação da curva de calibração, segundo a fórmula:

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}$$

em que, DP_a é o desvio padrão obtido a partir da curva de calibração; IC é a inclinação da curva de calibração.

O limite de quantificação (LQ) foi estimado pela relação do desvio padrão e da inclinação da curva de calibração, segundo a fórmula:

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC}$$

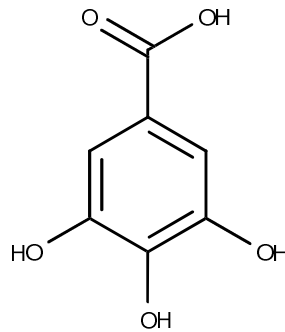
em que, DP_a é o desvio padrão obtido a partir da curva de calibração; IC é a inclinação da curva de calibração.

3.1.6 Determinação de fenólicos e flavonoides totais

A análise do teor de fenólicos foi realizada com base no método colorimétrico de Folin Ciocalteau (FC) com modificações (Georgé et al, 2005). As análises foram feitas com soluções aquosas das amostras dos extratos por espectroscopia na região do visível a 760 nm.

Foi utilizado padrão de ácido gálico (Figura 11) para a construção da curva analítica e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente (AGE)/ 100 gramas de extrato.

Figura 11 - Estrutura do ácido gálico



Foram preparadas a solução aquosa do reagente FC (1/10), a solução aquosa de carbonato de sódio (7,5%) e solução aquosa (matriz) do padrão ácido gálico (100 µg/mL). Em seguida, foram preparadas soluções de ácido gálico em concentrações menores, a partir da solução matriz, variando de 10-60 µg/mL.

As amostras testadas foram obtidas dissolvendo-se 10 mg do extrato em 10 mL de água. Posteriormente, foi adicionado 0,5 mL da amostra e das diferentes concentrações de ácido gálico em tubos de ensaios. O branco foi preparado somente com água destilada. Em cada tubo, incluindo o branco, adicionou-se 2,5 mL do reagente FC agitando-se, em seguida, para proporcionar mistura de reagente com amostra. Após 3 minutos, foi adicionado 2 mL da solução de carbonato de sódio 7,5% em cada tubo, e em seguida, agitou-os. Os tubos foram submetidos ao aquecimento em banho-maria a 50°C por 5 minutos, e após serem retirados, aguardou-se 15 minutos.

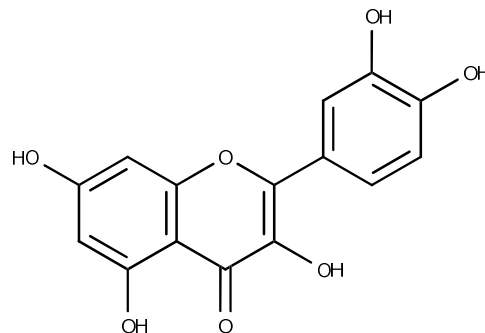
Os tubos foram colocados em banho de gelo por 3 minutos, e posteriormente, submetidos à leitura em espectrofotômetro a $\lambda=760$ nm, sendo que as leituras foram realizadas em duplicata.

O teor de fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorbância da amostra contra a curva padrão de ácido gálico (10 a 60 µg/mL), a partir da equação da curva padrão do ácido gálico $Y = aX + b$, onde Y é a absorbância da amostra, e X a concentração. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico em 100 g de extrato, utilizando-se a fórmula $\%(g/100g) = (C \times D) / (10.000 \times (M/V))$, em que C = concentração obtida através da curva padrão; D = diluição da amostra; M = massa necessária para fazer o extrato; V = volume de solução extratora.

Para determinação do conteúdo de flavonoides totais nos extratos foi empregado método espectrofotométrico descrito por Pothitirat e colaboradores (2009), utilizando como reagente cloreto de alumínio (AlCl_3). Foram preparadas soluções das amostras dos extratos em metanol. A aquisição da absorbância foi realizada a 415 nm e a partir dos resultados obtidos foi construída a curva de calibração com o padrão quercetina, cuja equação foi utilizada para o cálculo dos teores de flavonoides totais. O conteúdo de flavonoides foi expresso em gramas de quercetina equivalentes (QE)/ 100 g do extrato (POTHITIRAT et al, 2009).

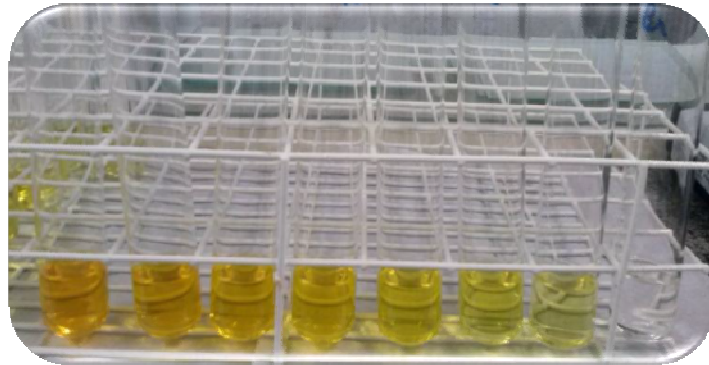
As soluções do padrão quercetina (Figura 12) foram preparadas com concentrações que variaram de 2 $\mu\text{g/mL}$ a 20 $\mu\text{g/mL}$ para realização da curva analítica. Para o preparo das amostras, pesou-se, aproximadamente, 10 mg dos extratos EBAO, ECAO, EHAO e EAAO, que foram dissolvidos em 20 mL de metanol. Foi preparada também uma solução metanólica de cloreto de alumínio a 2%.

Figura 12 - Estrutura química da quercetina



Para o teste, adicionou-se 1,5 mL da amostra ou padrão de quercetina a 1,5 mL da solução metanólica de cloreto de alumínio. Após 10 minutos de reação, as amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro em $\lambda = 415 \text{ nm}$. Para o branco, procedeu-se da mesma forma que as demais amostras, no entanto foi adicionado metanol no lugar da amostra (Figura 13).

Figura 13 - Padrão de quercetina após reação de 10 min com AlCl_3 (aumento da coloração indica complexação com alumínio)



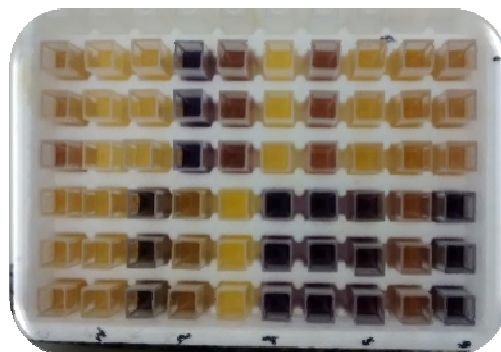
3.2 Estudos biológicos

3.2.1 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos foi realizada por meio do teste do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (MALTERUD et al, 1993). Assim, foram preparadas soluções metanólicas em diferentes concentrações de EBAO (0,5-10,0 mg/mL), EHAO (1,0-40,0 mg/mL), ECAO (0,5-9,0 mg/mL) e de EAAO (0,1-6,0 mg/mL).

Para realização do teste tomou-se uma alíquota de 3 mL da solução metanólica de DPPH (45 $\mu\text{g/mL}$) e adicionou-se a esta, 50 μL da amostra. O extrato padronizado de *Ginkgo biloba* (EGb761) foi utilizado como controle positivo. O branco (controle negativo) foi preparado substituindo a amostra pelo mesmo volume de etanol. A reação foi monitorada em espectrofotômetro UV-VIS da marca Varian, modelo Cary 100 Bio, com $\lambda=517$ nm, sendo avaliadas as absorbâncias nos tempos 0 e 15 minutos (Figura 14). As leituras foram realizadas em triplicata.

Figura 14 - Ilustração de amostras após 15 min de reação com DPPH (coloração variando de roxa para amarela indica aumento da atividade antioxidante)



A atividade sequestrante de DPPH pela amostra foi calculada, em porcentagem, a partir da seguinte fórmula: $\%SRL = 100 (At_0 - At_{15}) / (At_{0p} - At_{15p})$, em que At_0 = absorvância inicial da amostra; At_{20} = absorvância final da amostra; At_{0p} = absorvância inicial do padrão e At_{20p} = absorvância final do padrão. Foi plotado o gráfico correlacionando os valores das médias de %SRL *versus* as concentrações testadas do extrato de *A. ovata*, empregando-se intervalo de confiança de 95%. Através da regressão linear dos pontos do gráfico, originou-se a equação da reta que foi utilizada para calcular a concentração efetiva para sequestrar 50% dos radicais DPPH (Concentração efetiva - CE_{50}).

3.2.2 Atividade anticolinesterásica

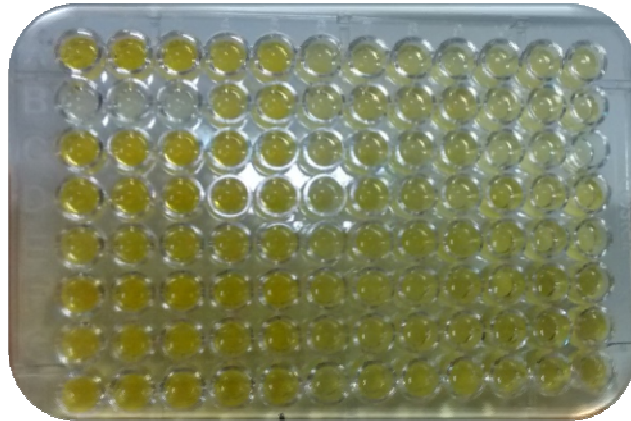
Para a avaliação da atividade anticolinesterásica foi utilizado o método desenvolvido por Ellman e colaboradores (1961) adaptado por Rahman e colaboradores (2001) que se baseia na reação da acetiltiocolina com o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), formando um produto de coloração amarela. Dessa forma, foram depositadas nas cavidades das microplacas de ELISA 140 μ L de tampão fosfato (pH 7.5), 20 μ L da enzima acetilcolinesterase (0,5 U/mL), 20 μ L dos extratos a serem testados diluídos em etanol (1 mg/mL) e 10 μ L do ácido 5-5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (10 mM). A placa foi então incubada em temperatura ambiente por 15 minutos sendo em seguida adicionados 10 μ L de iodeto de acetiltilcolina (15 mM). O branco (controle negativo) foi realizado substituindo a amostra pelo mesmo volume de etanol. A absorvância foi monitorada a 405 nm após 20 minutos (Figura 15). Os resultados foram comparados com o padrão comercial Eserina (fisiostigmina) (500 μ mol).

A porcentagem de inibição foi calculada segundo a fórmula:

$$\%IACHe = \frac{(AChE - AchI)}{AChE} \times 100$$

Em que, %IACHe é a porcentagem de inibição da AChE, AchI é a atividade obtida na presença do inibidor, no tempo de 20 minutos, e AChE na ausência do inibidor (padrão ou amostra), no tempo inicial.

Figura 15 - Ilustração da reação de Ellman em amostras (diminuição da coloração indica inibição de AchE)



3.2.3 Letalidade frente à *Artemia salina*

O teste de letalidade frente à *Artemia salina* (TAS) foi realizado com os extratos EBAO, EHAO, ECAO e EAAO, baseado no método desenvolvido por Meyer (1982) e adaptado por Serrano, Ortega e Villar (1996).

Para isso, foi preparado um aquário com água do mar artificial. Sendo necessários misturar 19 g de sal marinho, adquiridos em uma loja local de produtos para aquários, em 5 L de água mineral. O aquário foi dividido em duas partes, com divisória de isopor, que possuía pequenos orifícios para permitir a passagem dos *nauplii* de *Artemia salina* entre os diferentes lados. A menor parte do aquário foi revestida com papel alumínio para impedir a entrada de luz, enquanto que a maior parte foi iluminada com o auxílio de uma lâmpada incandescente de 60W, para que os *nauplii* recém eclodidos migrassem para a luz e pudessem ser recolhidos com maior facilidade. A oxigenação do aquário foi realizada com bomba de ar própria para aquários. Por fim, foram adicionados à parte escura do aquário, os ovos de *Artemia salina*, os quais foram deixados para eclosão total em 24 horas (Figura 16).

Figura 16 - Teste de *Artemia salina*



As amostras foram preparadas através de soluções-mãe, das quais foram retiradas e transferidas alíquotas de diferentes volumes para frascos de vidro, nos quais os testes foram realizados. As alíquotas foram secas em estufa a $(60 \pm 1)^\circ\text{C}$ para posterior diluição com água do mar artificial.

Dez *nauplii* de *Artemia salina* foram transferidos para frascos contendo água artificial do mar e o extrato a ser testado, em cinco diferentes concentrações (5-200 $\mu\text{g/mL}$). O branco foi preparado com também 10 *nauplii*, mas somente em água do mar artificial. Os testes foram feitos em triplicata. A contagem dos animais mortos e vivos foi realizada após 24 h de incubação, com iluminação constante. Os *nauplii* foram considerados mortos caso não exibissem nenhum movimento durante dez segundos de observação.

Nos testes que ocorreram morte no branco, os dados foram corrigidos usando a fórmula de correção, a seguir:

$$\%LAS = \frac{(n^\circ \text{ de mortos no teste} - n^\circ \text{ de mortos no branco})}{n^\circ \text{ de sobreviventes no branco}} \times 100$$

Após obtenção dos resultados em porcentagem para cada concentração foi traçado um gráfico e realizada regressão linear para se obter a equação da reta e determinar o CL_{50} dos extratos de *A. ovata*.

3.3 Triagem Virtual Inversa

3.3.1 Identificação dos alvos moleculares

A triagem virtual inversa *in silico* foi utilizada para identificar outros alvos terapêuticos para as substâncias identificadas nos extratos por CLAE-DAD. O objetivo foi prever possíveis atividade dessas moléculas e compará-las com as já descritas na literatura. A

primeira etapa consistiu na construção das estruturas moleculares das substâncias no programa MarvinSketch versão 15.10.26.0, seguida da checagem de estado de protonação e obtenção dos *Simplified Molecular-Input Line-Entry System* (SMILES).

Os servidores foram utilizados em suas configurações padrões. O objetivo foi utilizar métodos de busca diferentes para categorizar as moléculas com melhor acurácia na predição de suas possíveis atividades, para isso foram utilizados métodos baseados em ligantes, como também baseados no receptor (Tabela 8)

Tabela 8 - Servidores levantado para etapa de Triagem Virtual Inversa

	Servidor	Método	Referência
Baseados no ligante	ChemProt 2.0	Impressões digitais	KJÆRULFF et al, 2013
Baseados no receptor	DRAR-CPI	Acoplamento	LUO et al, 2011

Para o experimento com o servidor ChemProt 2.0 foram utilizados os bancos de dados ChEMBL (versão 14) (GAULTON et al, 2012), BindingDB (LIU et al, 2007), banco de dados PDSP Ki (ROTH et al, 2004), Drugbank (versão 3.0) (KNOX et al, 2011), PharmGKB (McDONAGH et al, 2011), PubChem (2012) somente compostos ativos a partir de bioensaios, por fim, visando proteínas humanas, e os bancos de dados de estruturas químicas: WOMBAT (versão 2011), WOMBAT-PK (versão 2011) (OLAH et al, 2007) e IUPHAR-DB (SHARMAN et al, 2011), CTD (DAVIS et al, 2011) e do STITCH (KUHN et al, 2012). O método implementado no SEA (KEISER et al, 2007) foi incluído com o objetivo de prever potenciais novos alvos para determinada substância. Para o SEA foram considerados somente compostos com valor de atividade $<100 \mu\text{M}$ (CI_{50} , CE_{50} , potência, AC_{50} , valores de K_i).

No servidor ChemProt 2.0 as estruturas foram selecionadas primeiramente levando-se em consideração o Coeficiente de Tanimoto (CT), em que foram selecionados somente ligantes com $1,0 > CT \geq 0,85$. Para as estruturas pontuadas com $CT=1$ pode-se considerar que a própria molécula de consulta foi testada para aquele alvo, enquanto que estruturas com CT acima de 0,85 foram consideradas similares a molécula de consulta. Para a seleção dos alvos potenciais neste servidor, também foi considerada a bioatividade de cada molécula. Dessa forma, foram selecionados 5 alvos que apresentaram melhores resultados de constante de inibição (K_i). Valores de $K_i > 1.000 \text{ nM}$ foram excluídos.

O servidor DRAR-CPI possui coleção de 385 modelos estruturais de proteínas humanas e 254 formas ativas de moléculas pequenas com descrições conhecidas, indicações e reações adversas a medicamentos. (WISHART et al, 2008; YANG et al, 2011).

O servidor utiliza o programa de DOCK (EWING et al, 2001) para o acoplamento molecular. Pontuações de acoplamento ≥ 0 foram tratados com valores perdidos (YANG et al, 2001). O servidor DRAR-CPI utiliza função de transformação para converter a pontuação de acoplamento molecular em Z' -scores de modo a aumentar a precisão e normalizar os resultados, afim de permitir a comparação entre os resultados do acoplamento molecular. A molécula tende a interagir com a proteína se o Z' -score for inferior a -0,5. Sendo assim, foram selecionados 5 alvos com melhores resultados de Z' -score para cada molécula de consulta.

3.3.2 Acoplamento Molecular

Com os alvos moleculares identificados pelos servidores, os compostos foram submetidos a uma rotina de acoplamento molecular, visando identificar a afinidade dos mesmos frente as proteínas alvo. Para o acoplamento molecular foi utilizado o programa DOCK 6.7 e acessórios (LANG et al., 2015).

3.3.2.1 Busca e seleção por complexos cristalográficos

A busca por complexos cristalográficos dos alvos selecionados foi realizado no *Protein Data Bank* – PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>), um banco virtual que contém informações sobre as estruturas, experimentalmente determinadas, de proteínas, ácidos nucleicos e complexos proteína-ligantes (BERMAN et al., 2000). A seleção dos complexos disponíveis no PDB foi feita com base em sua resolução e na presença de um ligante co-cristalizado.

O complexo cristalográfico selecionado foi preparado no programa UCSF Chimera 1.9 retirando-se as moléculas de águas e outras estruturas co-cristalizadas, adicionado os hidrogênios polares e cargas Gasteiger (campo de força ff12SB). O ligantes foram preparados utilizando a mesma rotina.

3.3.2.2 Avaliação dos parâmetros de busca

A delimitação do espaço de acoplamento molecular foi realizada por meio dos programas acessórios do DOCK 6.7. Através da superfície molecular de acesso ao solvente do receptor gerada pelo programa acessório DMS (do inglês *Display Midas System*) (FERRIN et al., 1988), foi construída a imagem negativa da superfície molecular do sítio ortostérico (região de ligação do ligante cristalográfico) pelos programas SPHGEN e SPHERE_SELECTOR (KUNTZ et al., 1982). As propriedades moleculares para a região de

acoplamento molecular foram calculadas pelo programa GRID em sua configuração padrão. Para a pontuação das moléculas foi utilizada a função padrão do DOCK 6.7 (GridScore) (MENG; SHOICHET; KUNTZ, 1992).

A validação desses parâmetros de delimitação foi realizada através do reacoplamento molecular. O reacoplamento compara a orientação e conformação já conhecidas do ligante cristalográfico, com a pose obtida do cálculo de acoplamento molecular, foi considerado satisfatório resultados com valor do desvio médio quadrático (RMSD) menor que 2Å (RMSD < 2Å).

3.3.2.2 Análise das interações intermoleculares

O perfil de interação foi observado através da submissão do arquivo de acoplamento da molécula de consulta e seu respectivo alvo no servidor *Protein-Ligand Interaction Profiler* (PLIP). Além disso, os perfis de interação foram comparados com os obtidos pelos ligantes levantados no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB), através dos dados encontrados nos respectivos artigos e da submissão do respectivo código PDB no servidor PLIP.

Este servidor pode assim ser aplicado na avaliação dos resultados de acoplamento molecular, *design* de fármacos, na avaliação da semelhança de sítios de ligação e reposicionamento de fármacos. O serviço web PLIP permite a detecção abrangente e visualização de padrões de interação proteína-ligante de estruturas 3D, quer diretamente a partir do PDB ou em estruturas fornecidas pelo usuário. Os resultados para cada sítio de ligação são fornecidos como diagramas de interação em 3D para inspeção manual (on-line em JSmol e offline com PyMOL), bem como arquivos XML para posterior processamento (SALENTIN et al, 2015).

Todas as interações são listadas em detalhes no nível dos átomo, permitindo análises das características de ligação específica. Conjunto de dados de referência de 30 complexos de proteína-ligante documentados na literatura é fornecido juntamente com o código fonte (SALENTIN et al, 2015).

3.3.3 Predição da toxicidade aguda das moléculas

O servidor GUSAR *Antitarget/Toxicity Prediction*, por sua vez, foi utilizado para prever a toxicidade aguda das moléculas de consulta, no qual baseia-se na predição *in silico* de valores de dose letal média (DL₅₀ - mg/kg) para os ratos com 4 tipos de administração (oral - VO, intravenosa - IV, intraperitoneal - IP e subcutânea - SC). A conversão de valores da

faixa de toxicidade aguda, que varia segundo a via de administração, obtidos experimentalmente foi feita em classes de 1 a 5, em que a classe 1 é a mais tóxica e a classe 5 a menos tóxica. Em casos de valores abaixo da faixa de classe 5, a molécula é considerada não tóxica para a via analisada.

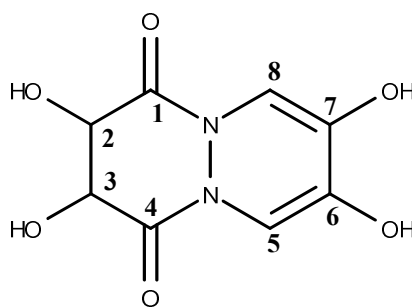
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise Fitoquímica

4.1.1 Elucidação Estrutural

A substância SFA6-J31 apresentou-se como pó branco, solúvel em clorofórmio levemente aquecido, foi eluída em CCD e revelada com reagentes químicos, apresentando resultados positivos para os reagentes de Dragendorff e Mayer, sugerindo se tratar de substância da classe dos alcaloides. Essa substância foi analisada por RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , HMQC e HMBC. Através da análise dos espectros sugere-se que a estrutura química dessa substância pode ser a apresentada na Figura 17.

Figura 17 - Estrutura química da SFA6-J31



Através da análise do espectro de RMN de ^1H pode-se a presença do sinal em aproximadamente $\delta 1,48$, característico de graxa, devido ao não acoplamento com nenhum outro sinal. O sinal em $\delta 4,71$ (2H, s; H2 e H3) foi atribuído a hidrogênios oximetilênicos (H2 e H3). O sinal em $\delta 8,10$ (2H, s), característico de substâncias aromáticas (Ar-H), atribuídos aos hidrogênios H5 e H8. A Figura 18 mostra a integração do RMN de ^1H , permitindo sugerir quantos hidrogênios correspondem cada sinal do espectro.

Analisando-se o espectro de RMN de ^{13}C observa-se a presença de cinco sinais de carbono. No entanto, o sinal em aproximadamente $\delta 30,00$ foi atribuído a graxa, devido à ausência de acoplamento com outros átomos da molécula. Por outro lado, o sinal em $\delta 62,76$

característico de carbonos oximetilênicos, foi atribuído aos carbonos C2 e C3. Os sinais em δ 129,77 e δ 133,76, característicos de substâncias aromáticas ou vinílicas (C=C), foram atribuídos aos carbonos C5 e C8 e C6 e C7, respectivamente. Por fim, o sinal em δ 165,32 característico de carbono carbonílico, foi atribuído aos carbonos C1 e C4 (Figura 19).

Figura 18 - Espectro de RMN de ^1H da SFA6-J31 [500 MHz, Clorofórmio, δ (ppm)]

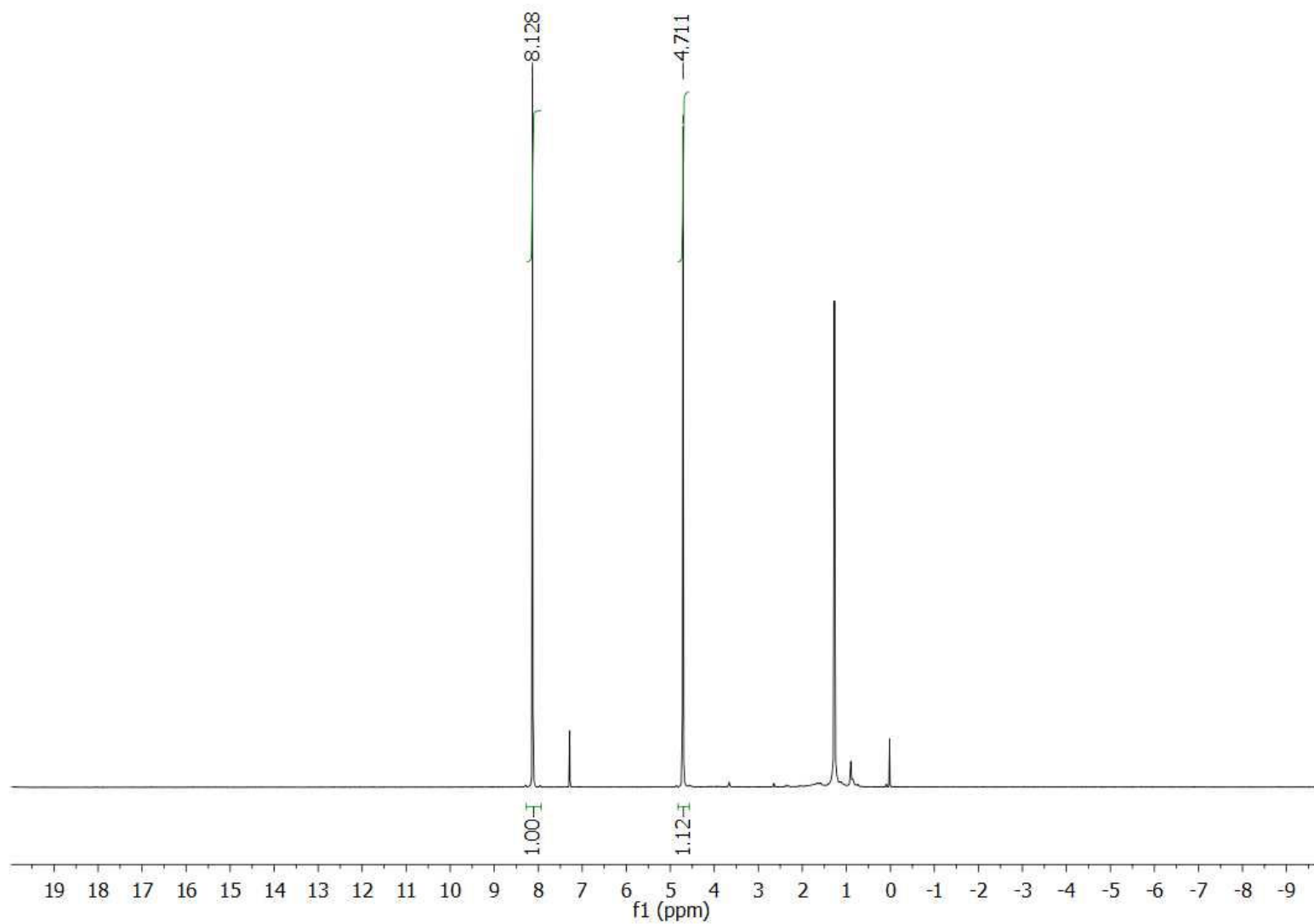
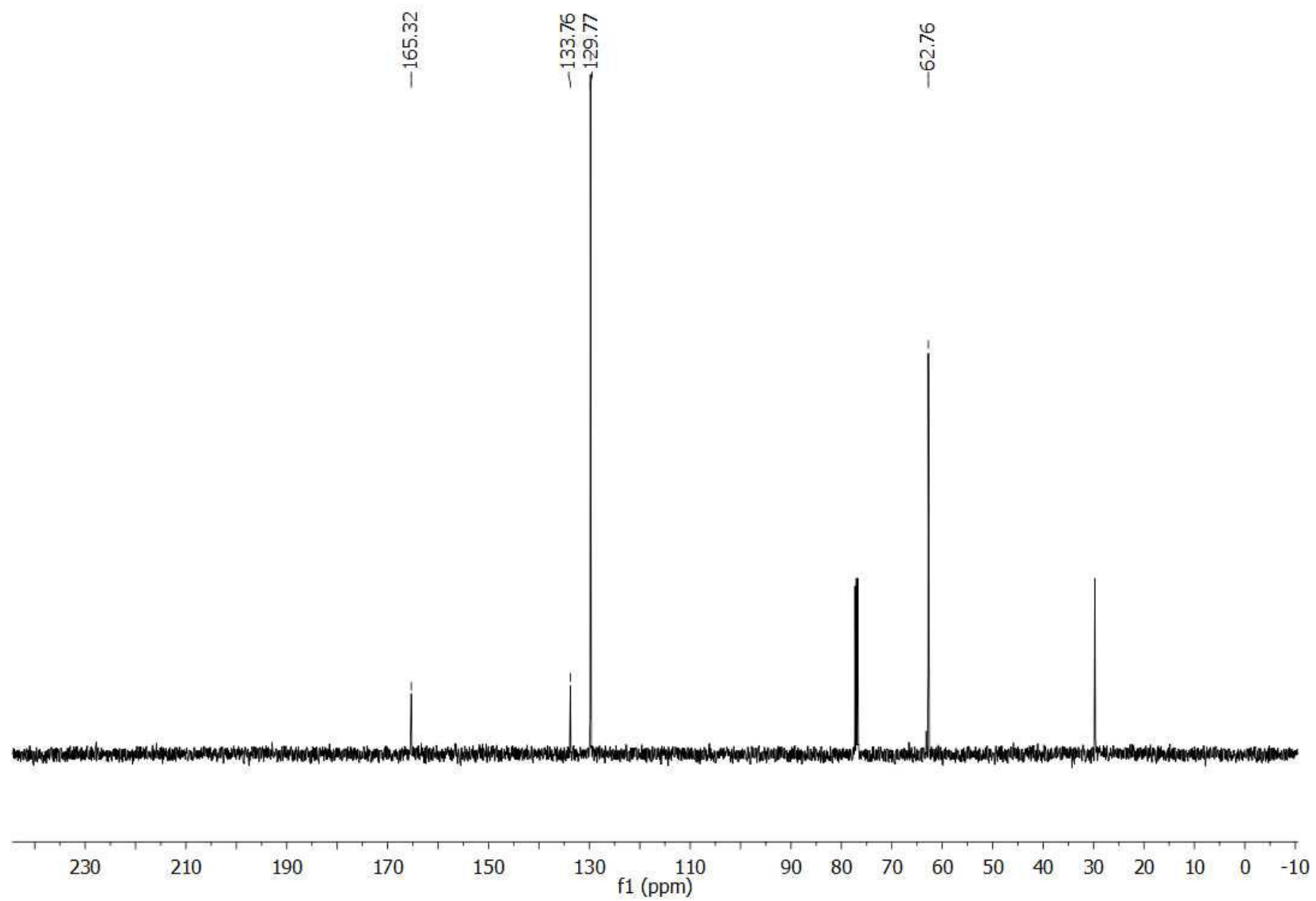


Figura 19 - Espectro de RMN de ^{13}C da SFA6-J31 [500 MHz, Clorofórmio, δ (ppm)]



A Tabela 9 e Figura 20 mostram as correlações observadas nos espectros de HMQC (Figura 21 e Figura 22) e HMBC (Figura 23 e Figura 24). O espectro de HMBC mostrou correlação entre os hidrogênios em δ_H 4,71 ppm e os carbonos em δ 62,76 e δ 165,32 e entre os hidrogênios em δ 8,12 e os carbonos em δ 129,77, δ 133,76 e δ 165,32. No entanto, faz-se necessário a obtenção dos Espectros de Massas para confirmação da estrutura proposta.

Tabela 9 - Correlações observadas nos espectros de HMQC e HMBC da SFA6-J31

HMQC (δ_H)	δ_C	HMBC (ppm)
4,71 (s)	62,76	62,76; 165,32
8,12 (s)	129,77	129,77; 133,76; 165,32

Figura 20 - Principais correlações observadas no espectro de HMBC da SFA6-J31

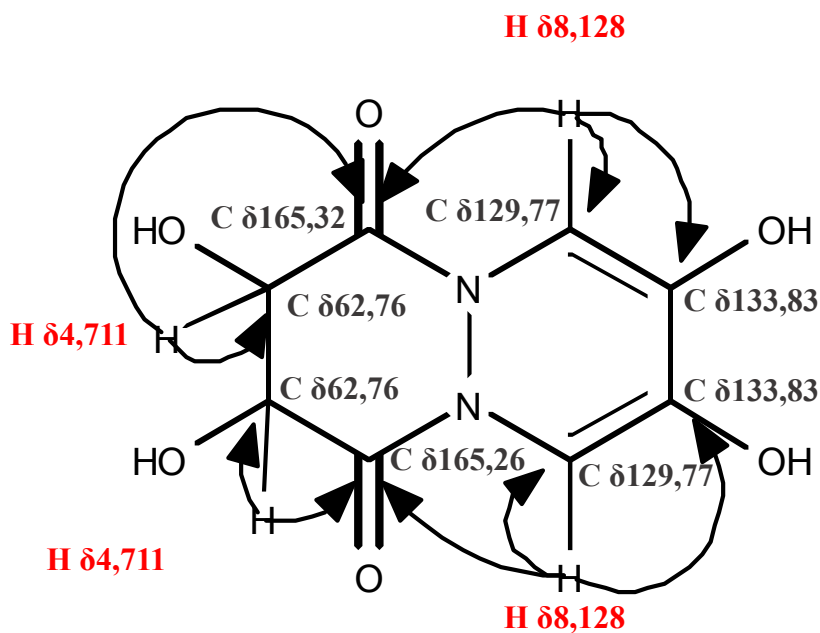


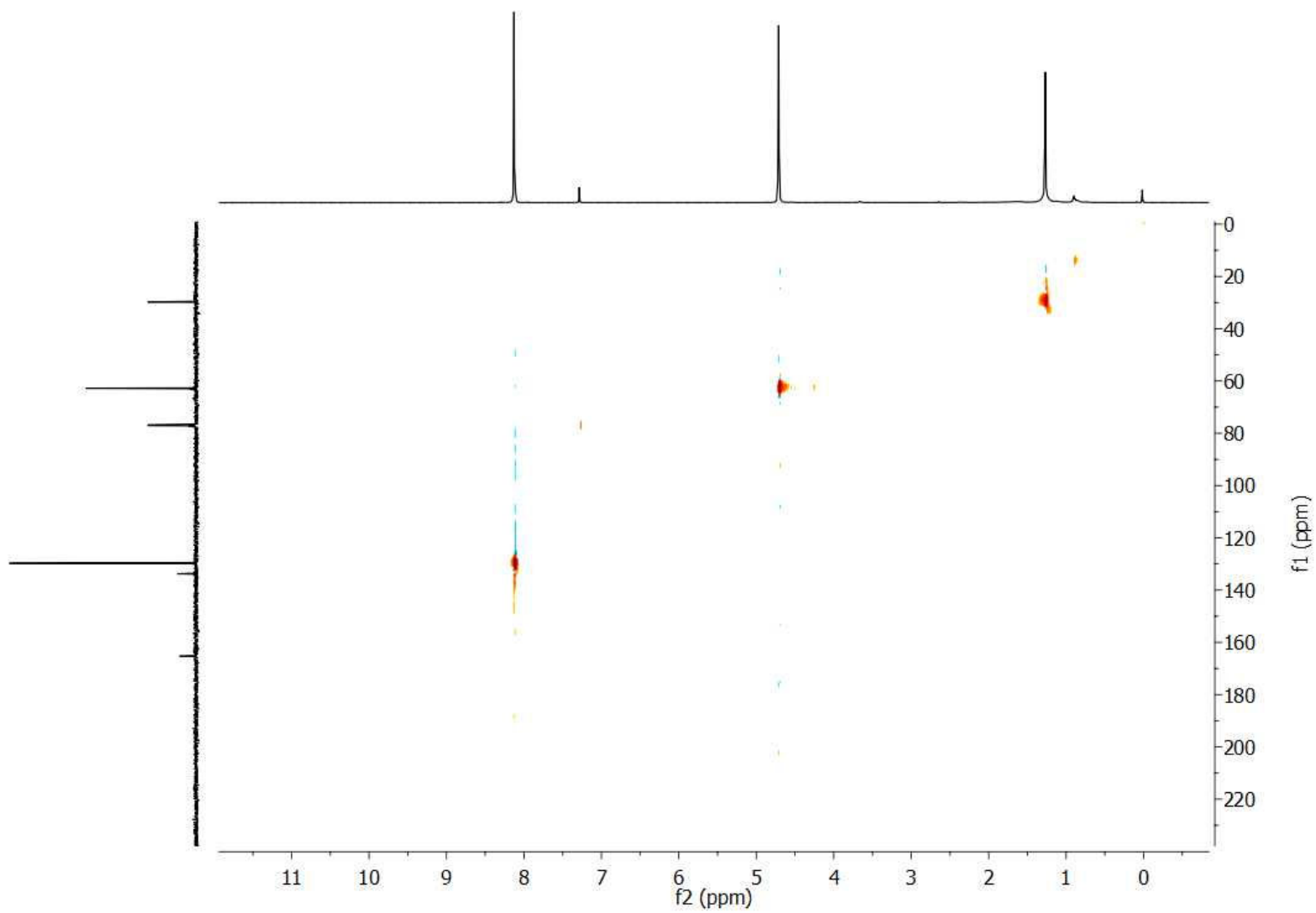
Figura 21 - Espectro de HMQC da SFA6-J31

Figura 22 - Espectro de HMQC da SFA6-J31 (ampliação)

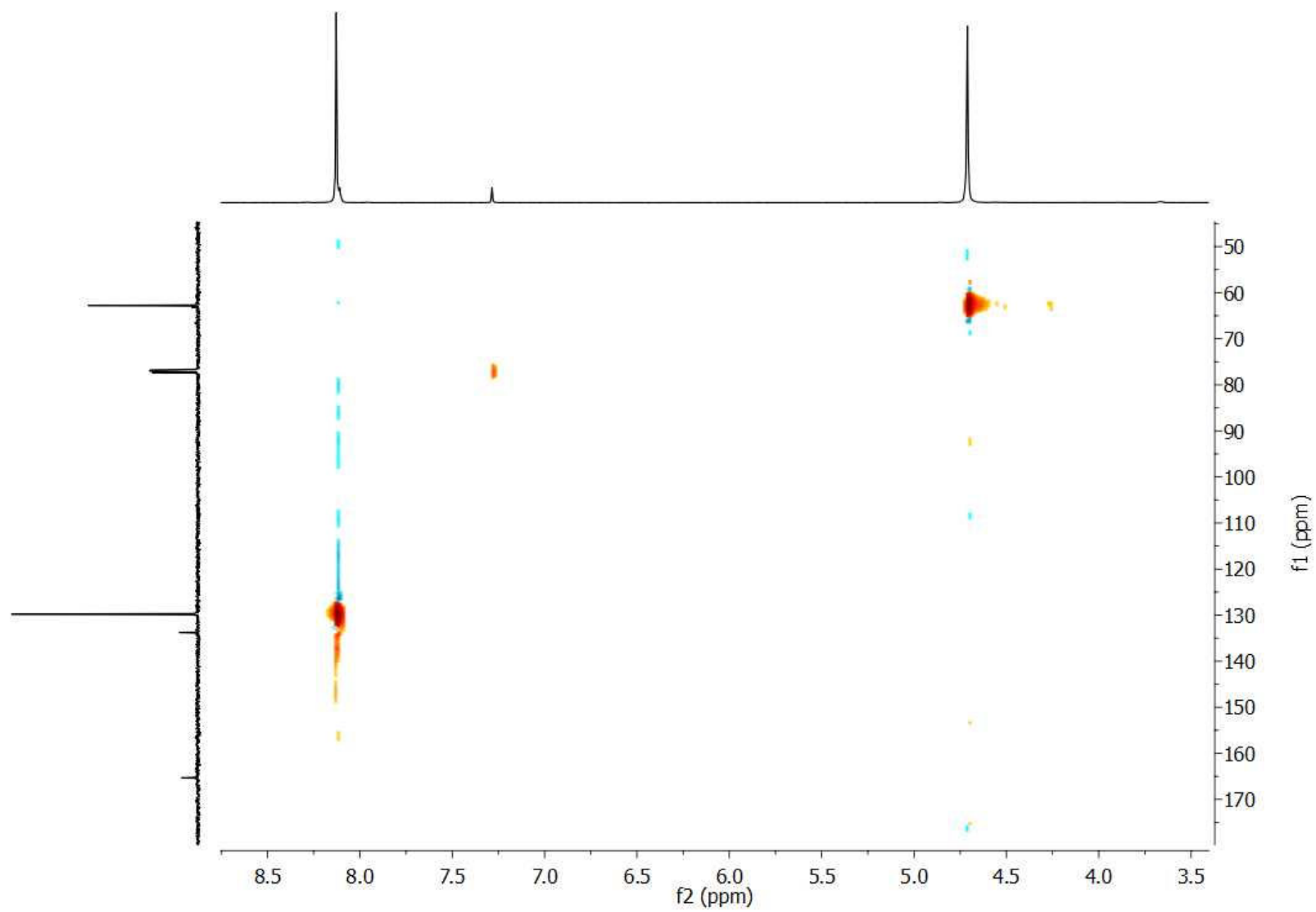


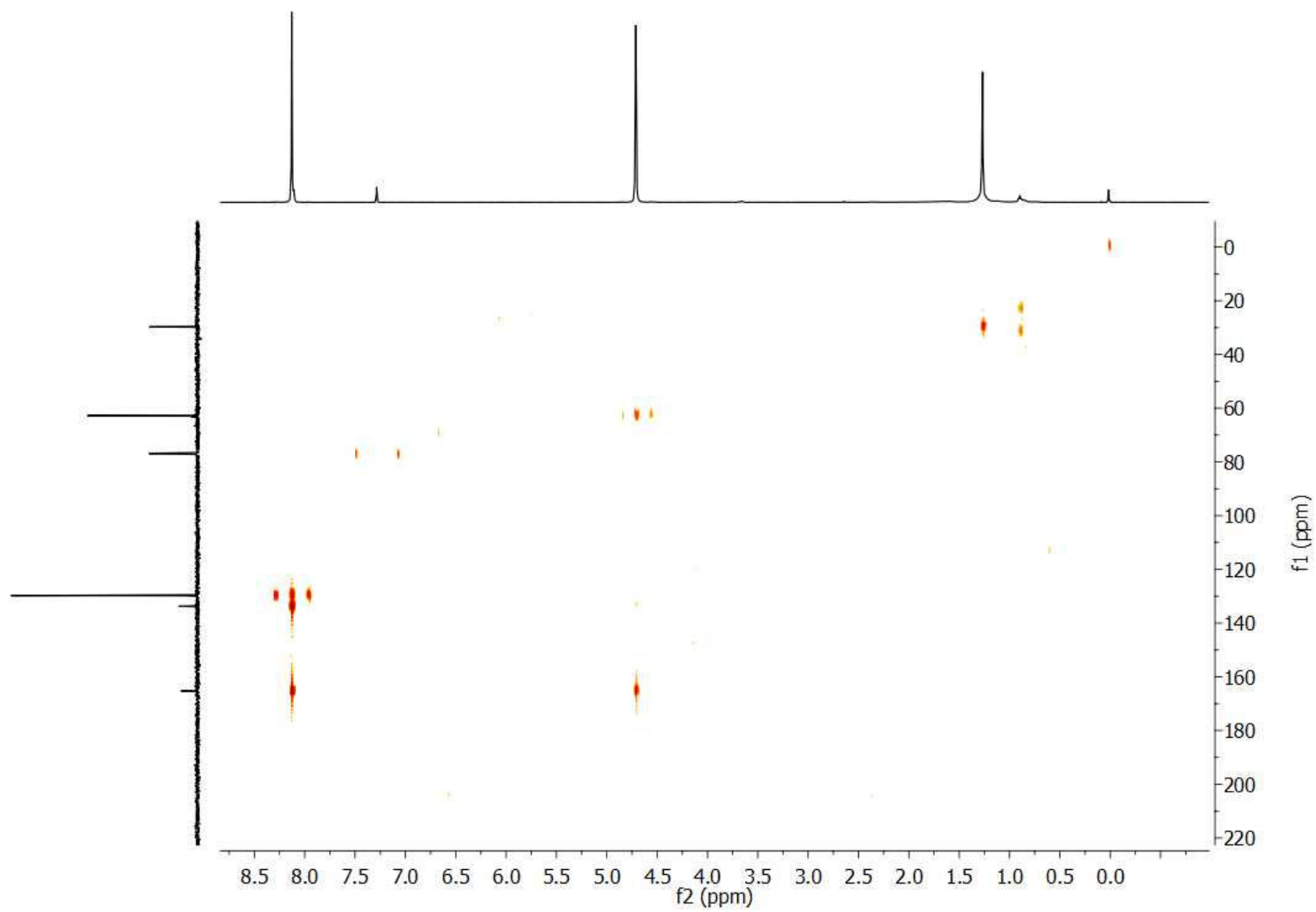
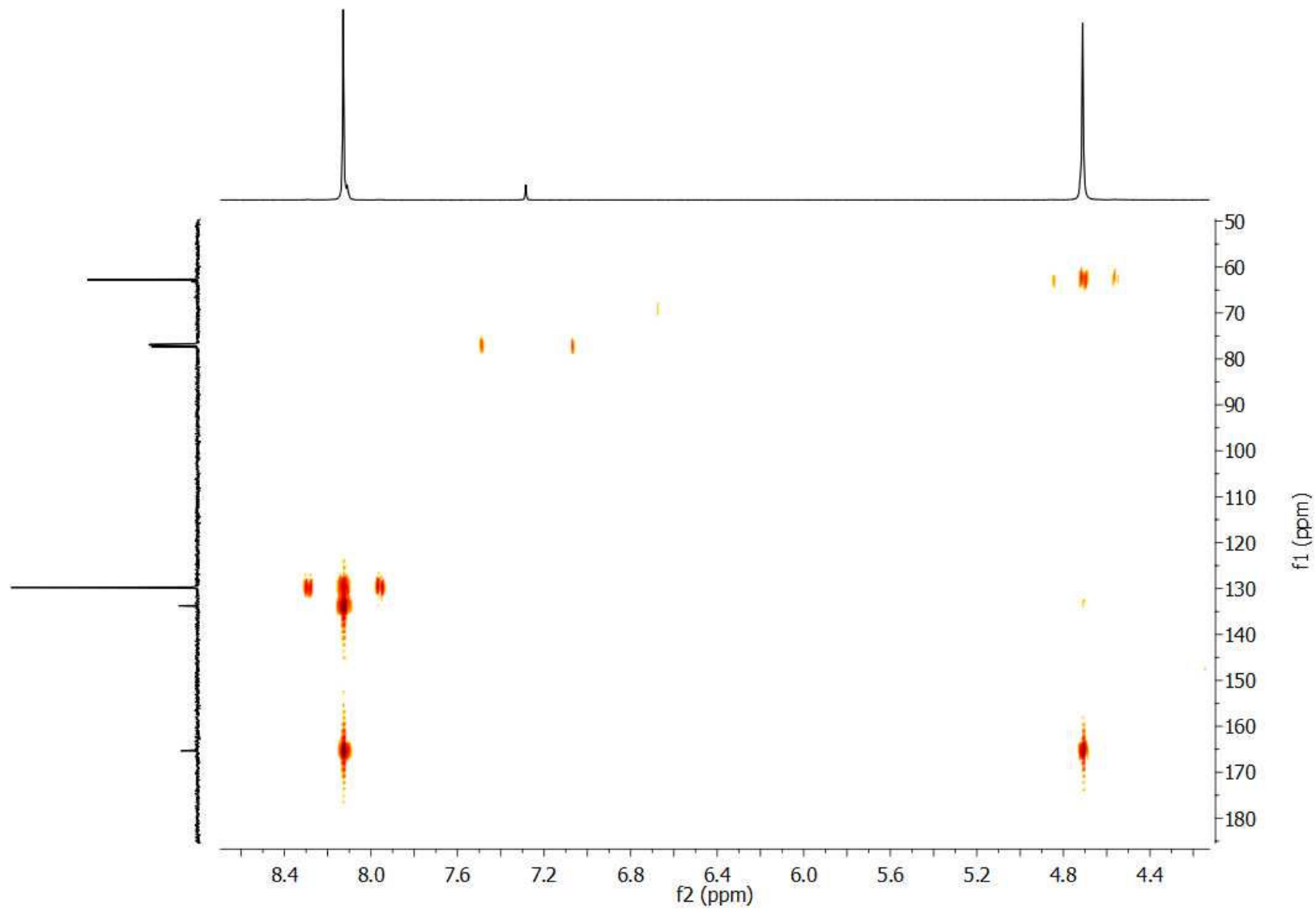
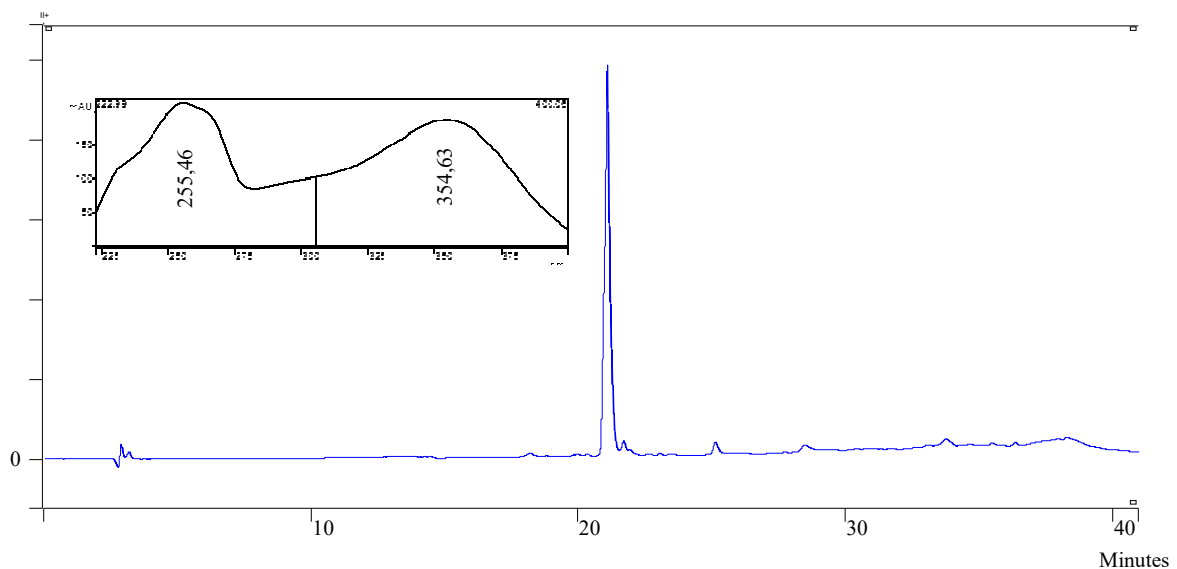
Figura 23 - Espectro de HMBC da SFA6-J31

Figura 24 - Espectro de HMBC da SFA6-J31 (ampliação)

As subfrações SFA6-J58 e SFA11-A também foram submetidas à revelação com reagentes específicos em CCD. A SFA6-J58 apresentou resultado positivo para cloreto férrico, sugerindo tratar-se de um composto fenólico. Por outro lado, a SFA11-A apresentou resultado positivo para hidróxido de potássio (KOH), sugerindo tratar-se de cumarina. Ambas subfrações foram submetidas à análise por CLAE-DAD para confirmação das classes sugeridas e identificação através de comparação com padrões e obtenção dos respectivos espectros no UV.

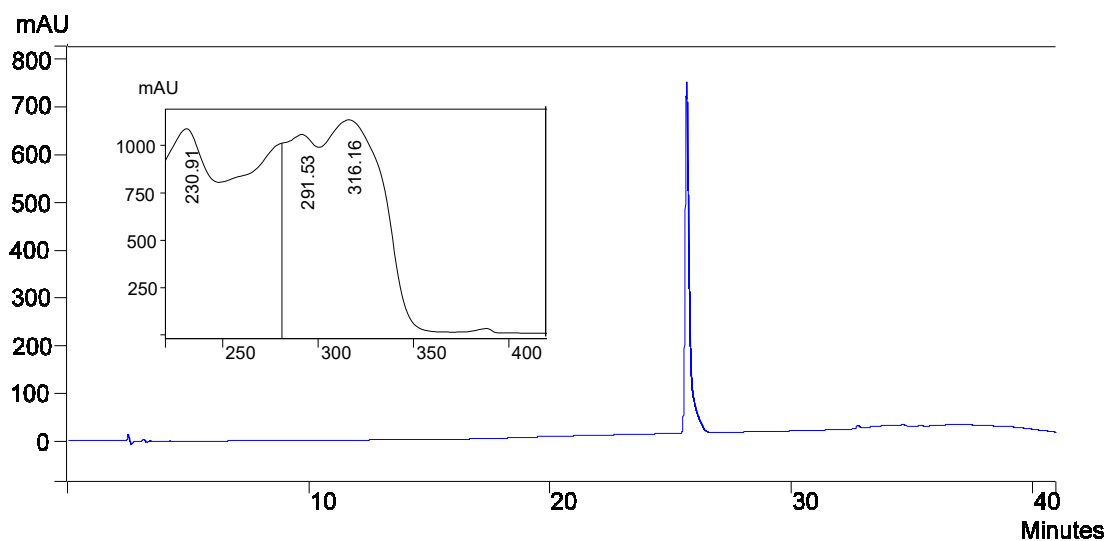
A subfração SFA6-J58 apresentou características de flavonoide, com bandas nas faixas de $\lambda_{\text{máx}} = 240-285 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{máx}} = 300-400 \text{ nm}$ (ZUANAZZI, 2000) (Figura 25). Comparando-se com os padrões de flavonoides analisados pôde-se inferir que a substância trata-se da rutina, quando comparados os tempos de retenção ($T_{\text{rpadrão}} = 20,5 \text{ min}$ e $T_{\text{rsubf}} = 20,74$) e espectros no UV ($\lambda_{\text{máxpadrão}} = 255,83$ e $354,42$).

Figura 25 - Cromatograma e espectro no UV da subfração SFA6-J58



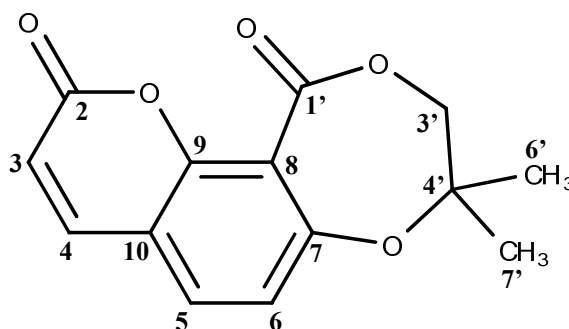
A análise da subfração SFA11-A por CLAE-DAD revelou o grau de pureza da mesma, bem como reforçou a sugestão de se tratar de substância da classe das cumarinas, através da análise do espectro no UV (Figura 26). As cumarinas podem apresentar de duas a três bandas, sendo essas, comumente próximas a 270 e 320 nm, para as que apresentam duas bandas, e mais uma entre 200-240 nm, para as que apresentam três bandas (FONSECA, 2009).

Figura 26 - Cromatograma e espectro no UV da subfração SFA11-A

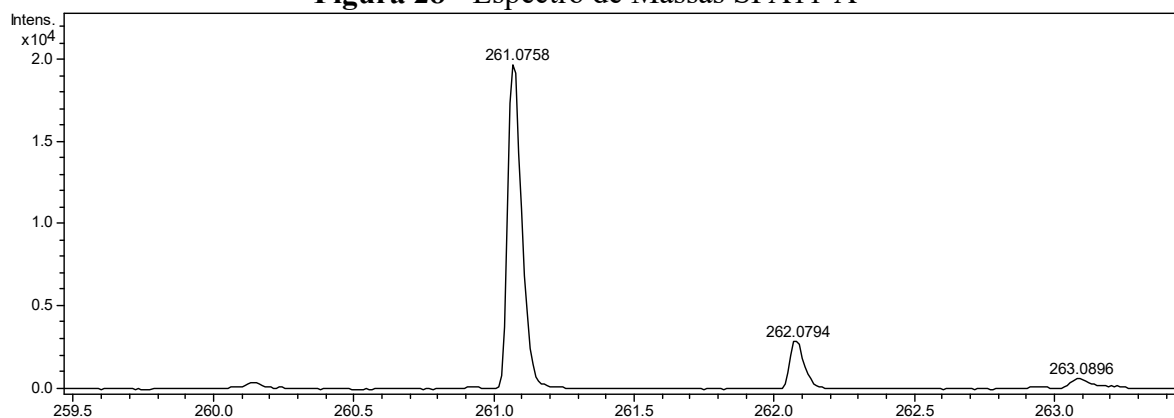


A SFA11-A foi identificada através da análise dos espectros de massas, juntamente com dados espectrais de RMN de ^{13}C , RMN de ^1H , DEPT 135° , HMQC e HMBC. Dessa forma foi possível identificá-la como a cumarina isolada pela primeira vez em *P. boliviensis*, poligaleno (SILVA, 2015). Essa substância apresenta-se como cristais brancos em forma de agulhas, com M.M. = 260 Da, ponto de fusão de $222\text{-}224^\circ\text{C}$ e fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_5$ (Figura 27).

Figura 27 - Estrutura química da SFA11-A (poligaleno)



O espectro de massas (Figura 28) apresentou íon *pseudo*-molecular com razão massa/carga (m/z) em 261 $[\text{M}+1]$, confirmando o M.M. da substância analisada.

Figura 28 - Espectro de Massas SFA11-A

Através do espectro de RMN de ^1H (Figura 29, e Figura 30) foi possível observar a presença de sinais característicos de hidrogênios de anéis aromáticos entre δ 6,00 e 8,00, sendo os sinais em δH3 6,45 (*d*;1H; $J_{3,4} = 9,5$ Hz) e δH4 7,75 (*d*;1H; $J_{4,3} = 9,5$ Hz) característicos de sistema carbonílico α , β insaturado, bem como sinais em δH5 6,96 (*d*;1H; $J_{5,6} = 8,5$ Hz) e δH6 7,63 (*d*;1H; $J_{6,5} = 8,5$ Hz) característicos de hidrogênios i relacionados. Além disso, observa-se ainda um singlete em $\delta\text{H3}'$ 4,19 (*s*; 2H), característico de hidrogênio ligados a carbono oximetilênico, enquanto que o singlete em $\delta\text{H6}'$ H7' 1,35 (*s*; 6H) pode ser atribuído a hidrogênios ligados a carbonos metílicos. A Figura 31 mostra a integração do RMN de ^1H , permitindo sugerir quantos hidrogênios correspondem a cada sinal do espectro.

Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H da SFA11-A [500 MHz, Piridina, δ (ppm)] – ampliação 1

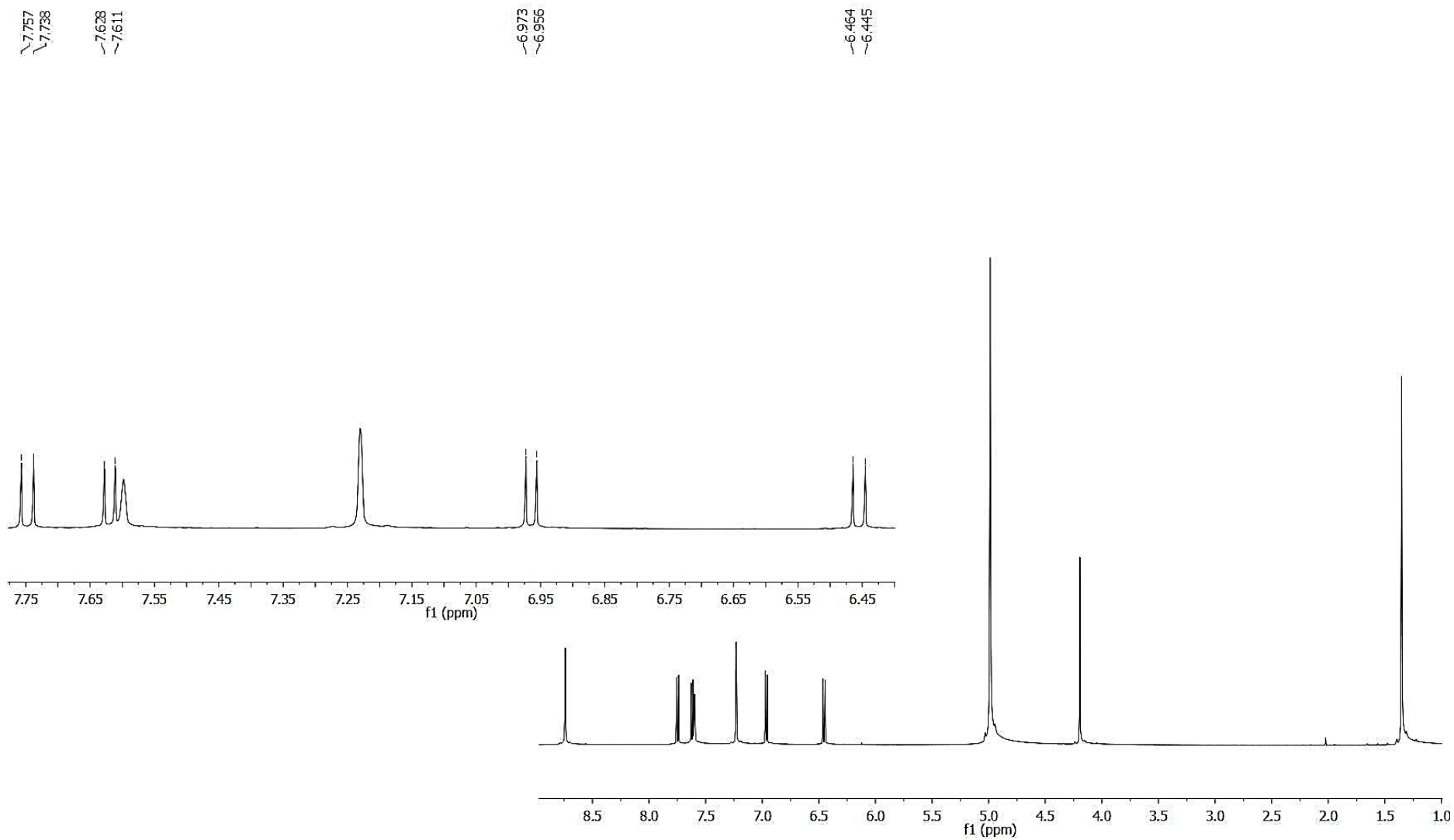


Figura 30 - Espectro de RMN de ^1H da SFA11-A [500 MHz, Piridina, δ (ppm)] – ampliação 2

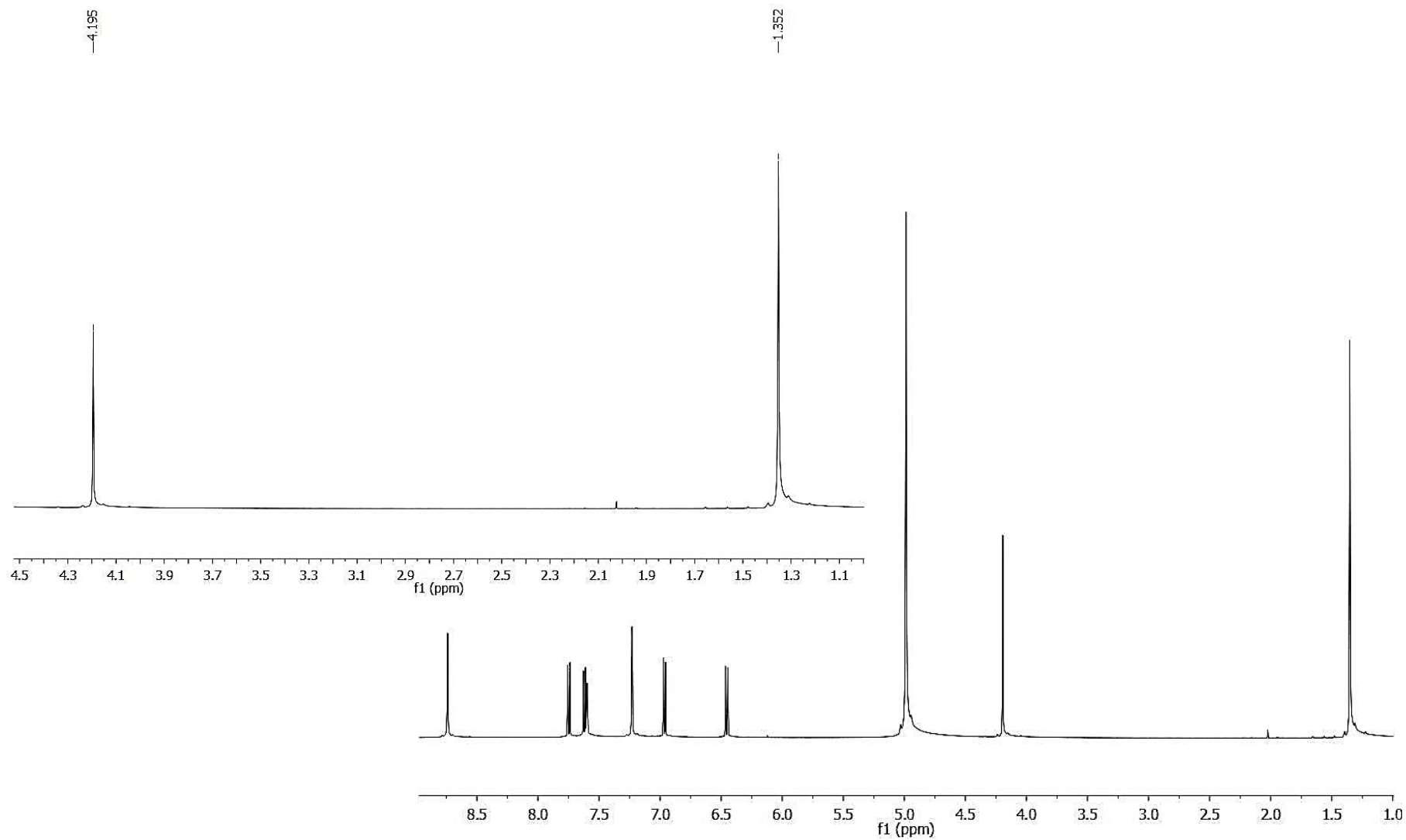
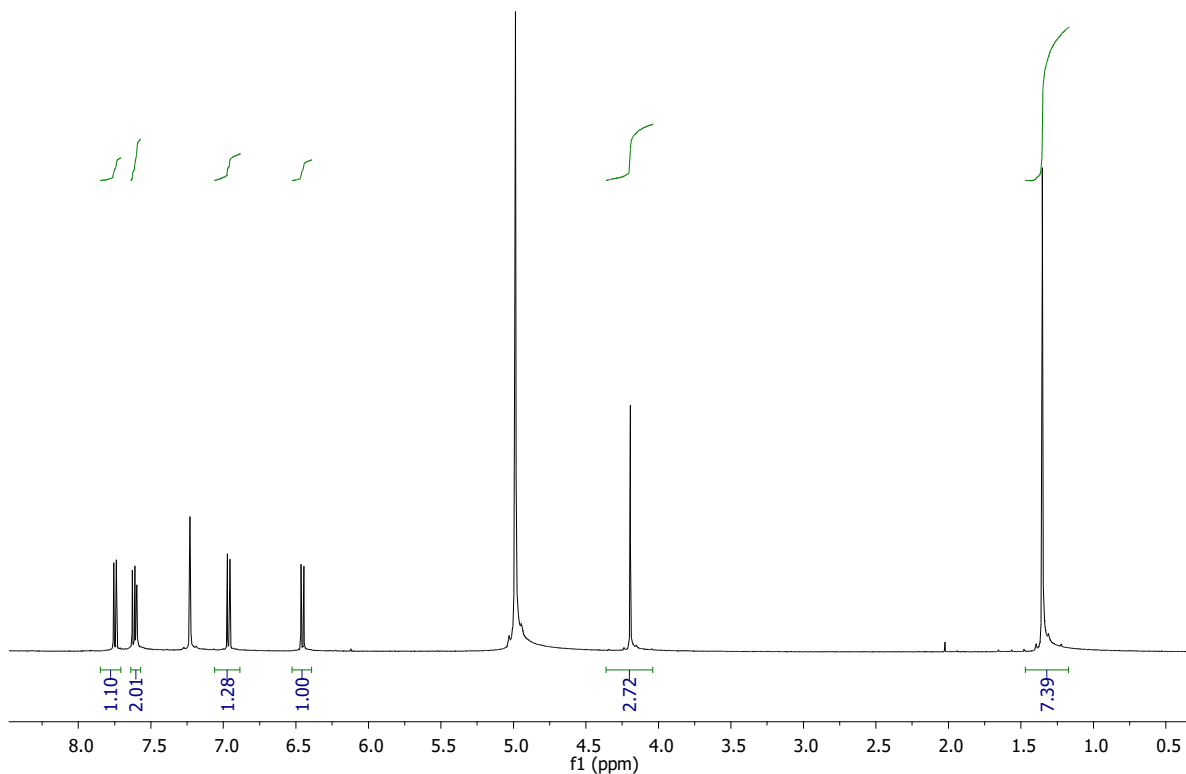


Figura 31 - Integração do espectro de RMN de ^1H da SFA11-A [500 MHz, Piridina, δ (ppm)]



Analisando os espectros de RMN de ^{13}C (Figura 32) foi possível evidenciar a presença de treze sinais de carbono, com sinais na região entre $\delta 20$ a 90 , relacionados a carbonos sp^3 e sinais na região entre $\delta 100,0$ a $165,0$ (Figura 33), relacionados com carbonos aromáticos, heteroaromáticos e carbonos de carbonila. Comparando esse espectro ao de DEPT 135° (Figura 34), nota-se que desses carbonos, seis sinais correspondem a carbonos hidrogenados, sendo o sinal negativo apresentado em $\delta 71,4$ ($\text{C}3'$) corresponde ao carbono oximetilênico, enquanto que os sinais positivos em $\delta 23,9$ ($\text{C}6'$ e $\text{C}7'$) a C metílicos e $\delta 116,0$ ($\text{C}3$); $\delta 120,1$ ($\text{C}6$); $\delta 133,2$ ($\text{C}5$) e $\delta 143,8$ ($\text{C}4$) correspondem a carbonos aromático característicos de sistemas cumarínicos. Os sinais que não são visualizados nesse espectro correspondem aos carbonos não hidrogenados, sendo esses $\delta 84,5$ ($\text{C}4'$); $\delta 114,6$ ($\text{C}8$); $\delta 117,1$ ($\text{C}10$); $\delta 154,1$ ($\text{C}9$), $\delta 156,3$ ($\text{C}7$), $\delta 159,9$ ($\text{C}2$), $\delta 164,6$ ($\text{C}1'$).

Figura 32 - Espectro de RMN de ^{13}C da SFA11-A [125 MHz, Piridina, δ (ppm)] – ampliação 1

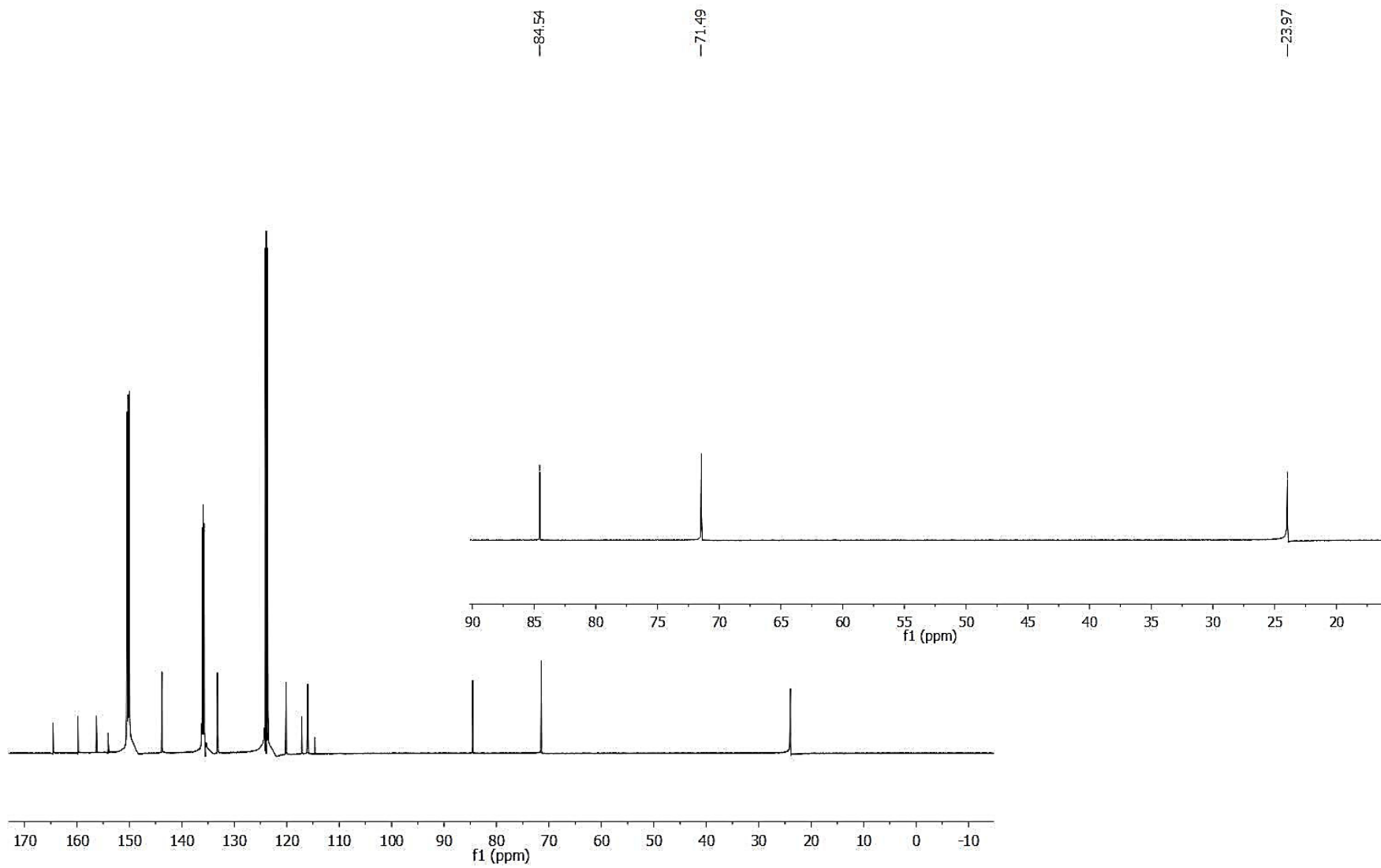


Figura 33 - Espectro de RMN de ^{13}C da SFA11-A [125 MHz, Piridina, δ (ppm)] – ampliação 2

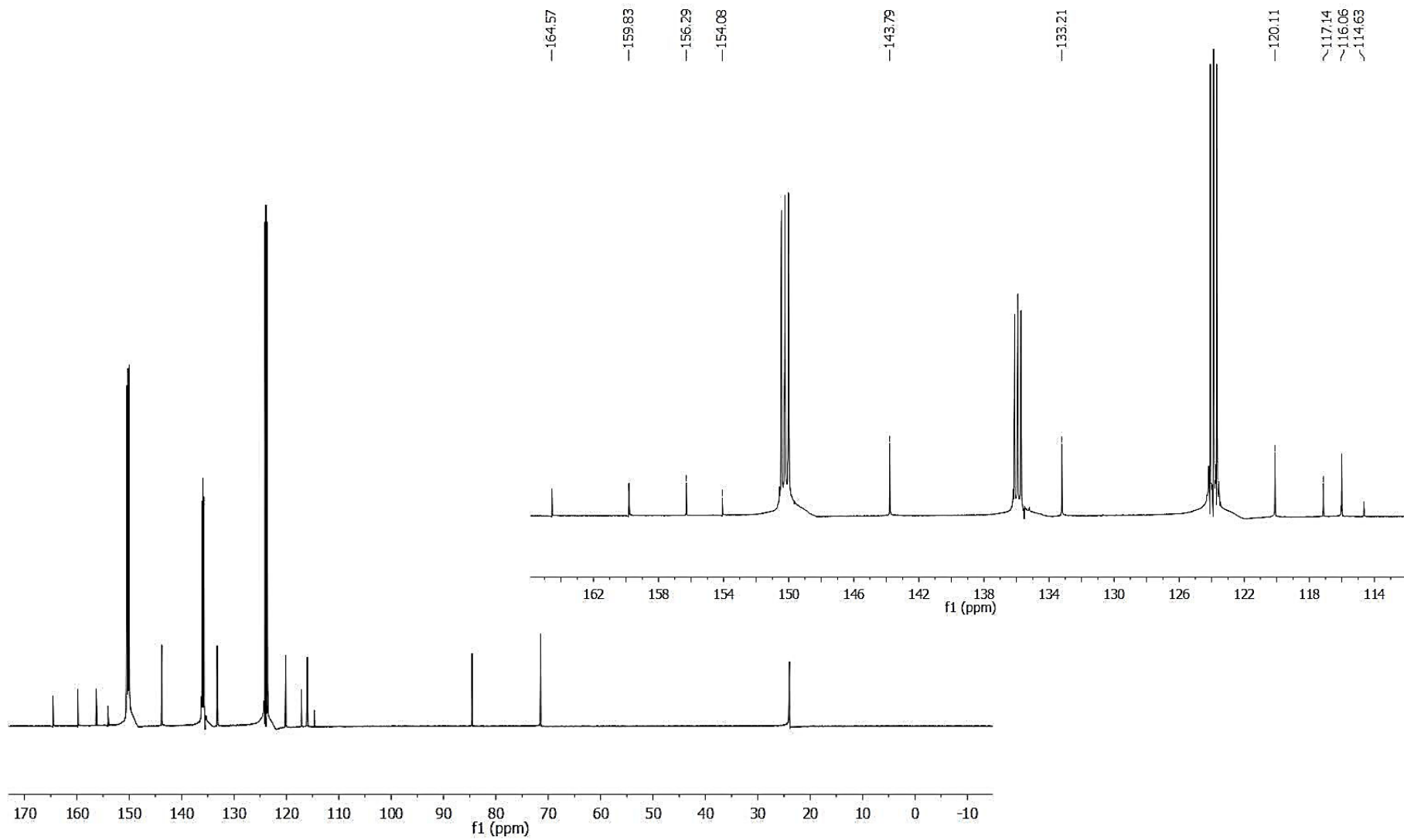
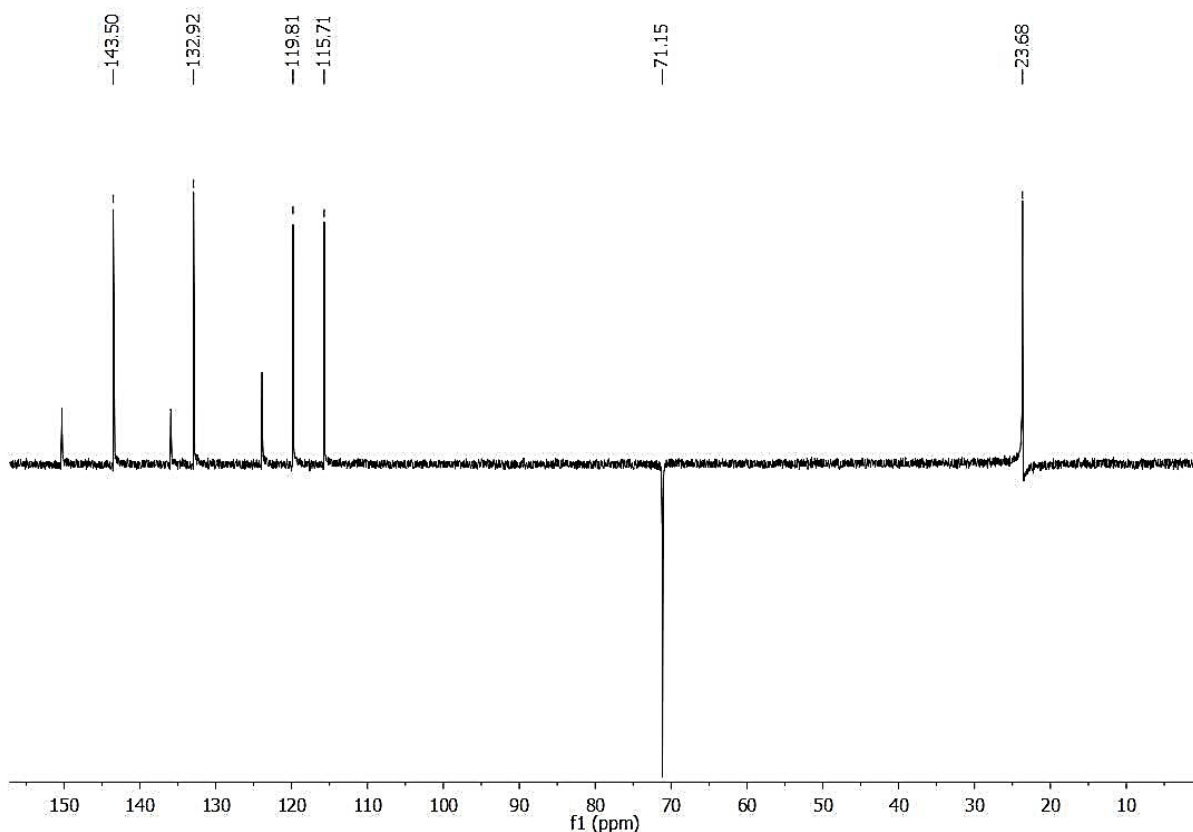


Figura 34 - Espectro de DEPT 135° da SFA11-A [125 MHz, Piridina, δ (ppm)]

A Tabela 10 e Figura 35 mostram as correlações observadas nos espectros de HMQC (Figura 36) e HMBC (Figura 37 e Figura 38). O espectro de HMBC mostrou correlação entre os hidrogênios em $\delta_{H3'}$ 4,19 ppm e o carbono em δ 164,6 (C1') e entre os hidrogênios em $\delta_{H6'H7'}$ 1,35 e os carbonos em δ 23,9 (C6' e C7'), 84,5 (C4') e 71,4 (C3'), levando a concluir que esta parte da molécula está ligada aos carbonos C-7 e C-8 do núcleo cumarínico. Dessa forma os sinais em δ 114,6 (C8); 116,0 (C3); 117,1 (C10); 120,1 (C6); 133,2 (C5); 143,8 (C4); 154,1 (C9); 156,3 (C7) e 159,9 (C2) foram atribuídos ao núcleo cumarínico 7,8-dissubstituído.

Tabela 10 - Correlações observadas nos espectros de HMQC e HMBC da SFA11-A

Nº	HMQC (δ_H (mult, J/Hz))	δ_C	HMBC (ppm)
2	-	159,9	-
3	6,45 (d; 9,5 Hz)	116,0	159,9; 117,1
4	7,75 (d; 9,5 Hz)	143,8	159,9; 133,2
5	7,62 (d; 8,5 Hz)	133,2	117,1; 154,1; 156,3
6	6,96 (d; 8,5 Hz)	120,1	156,3
7	-	156,3	-
8	-	114,6	-
9	-	154,1	-
10	-	117,1	-
1'	-	164,6	-
3'	4,19 (s)	71,4	164,6; 23,9

4'	-	84,5	-
6'	1,35 (s)	23,9	23,9; 84,5; 71,4
7'	1,35 (s)	23,9	23,9; 84,5; 71,4

Figura 35 - Principais correlações observadas no espectro de HMBC da SFA11-A

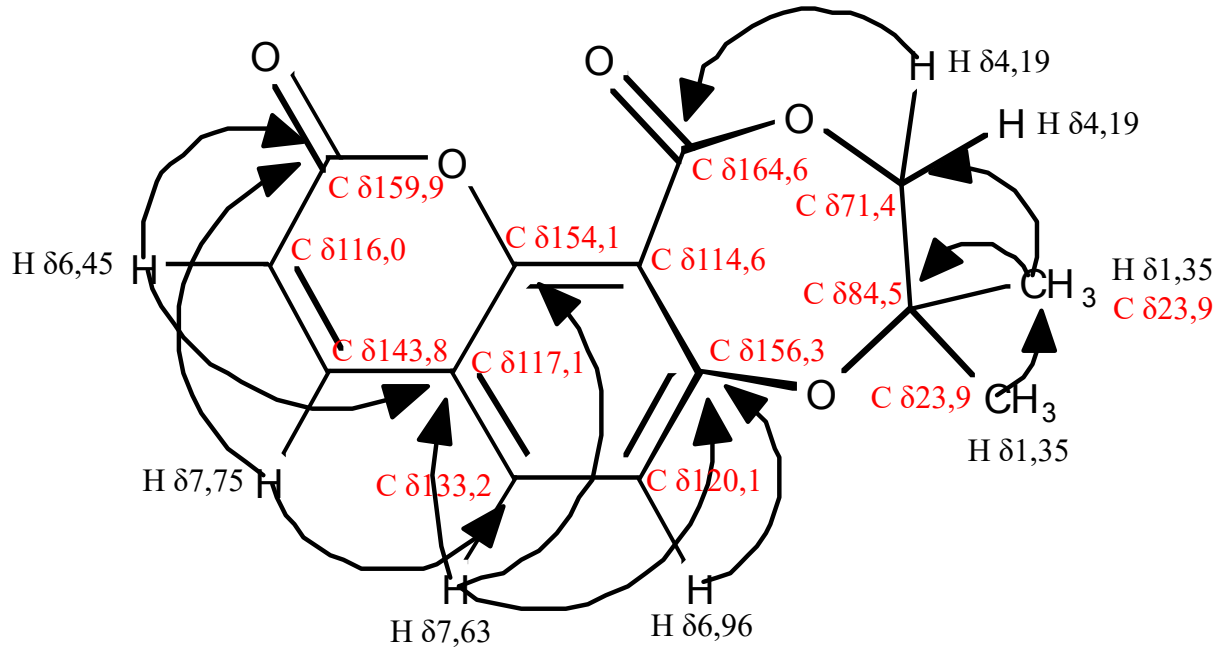


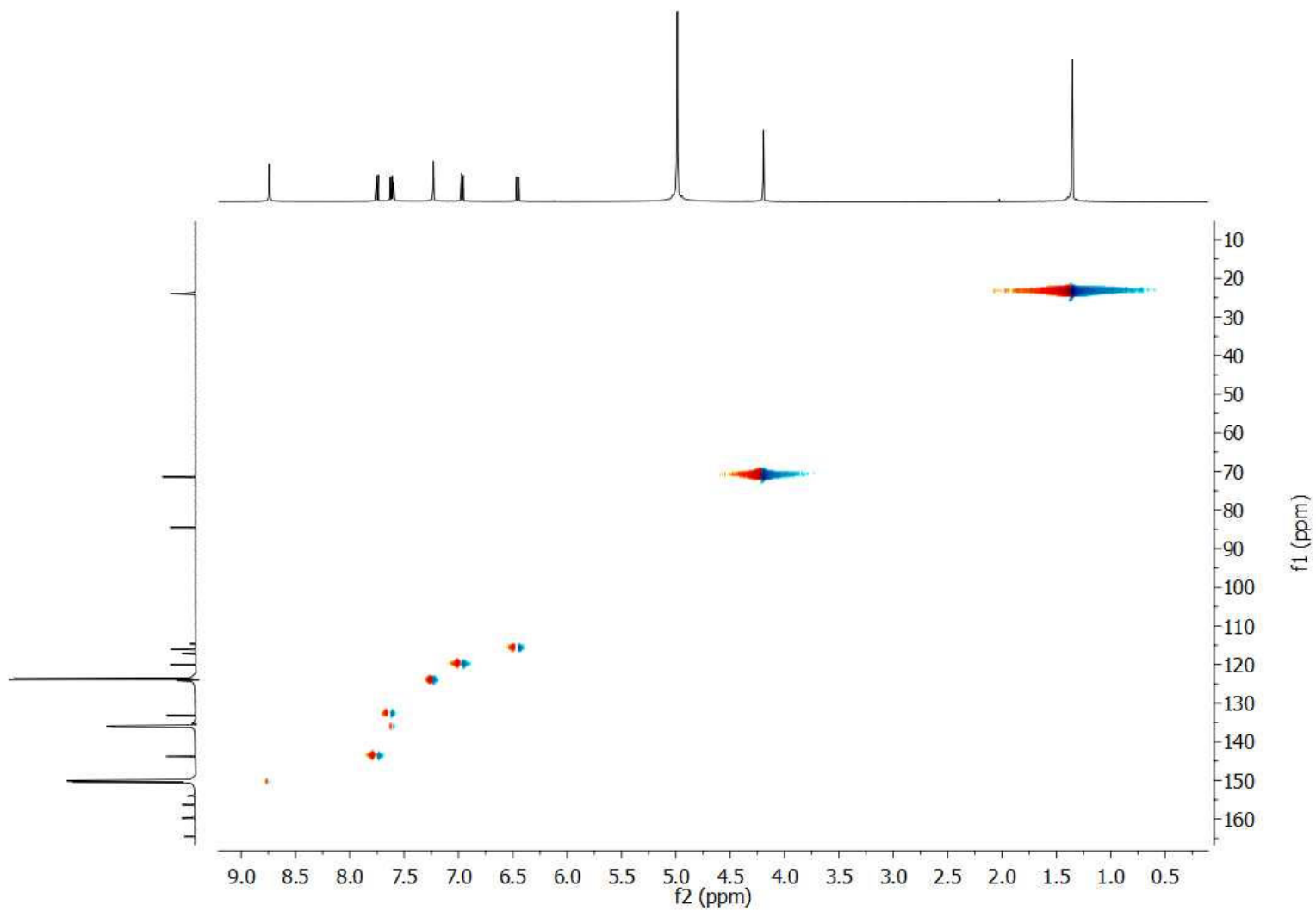
Figura 36 - Espectro de HMQC da SFA11-A

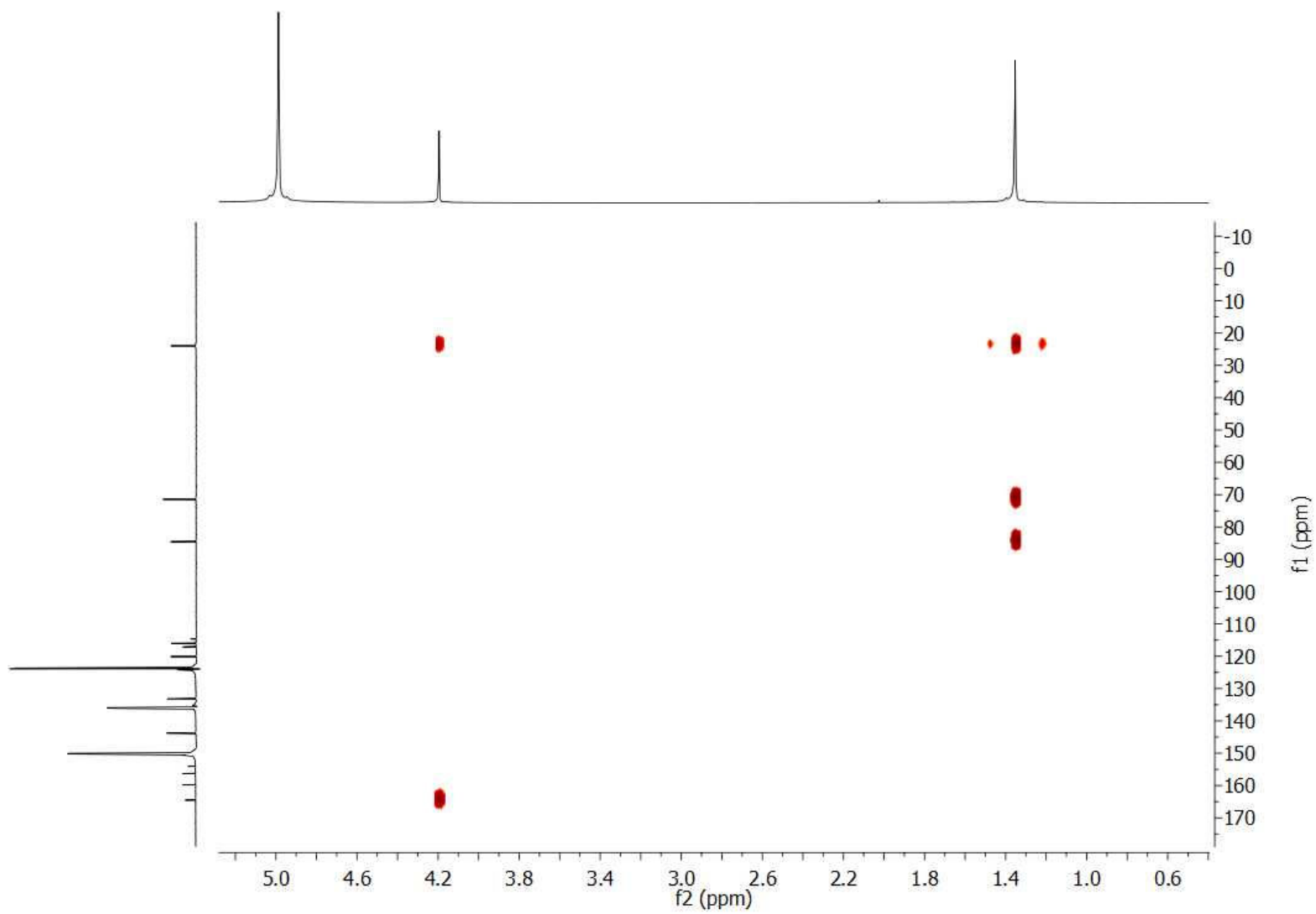
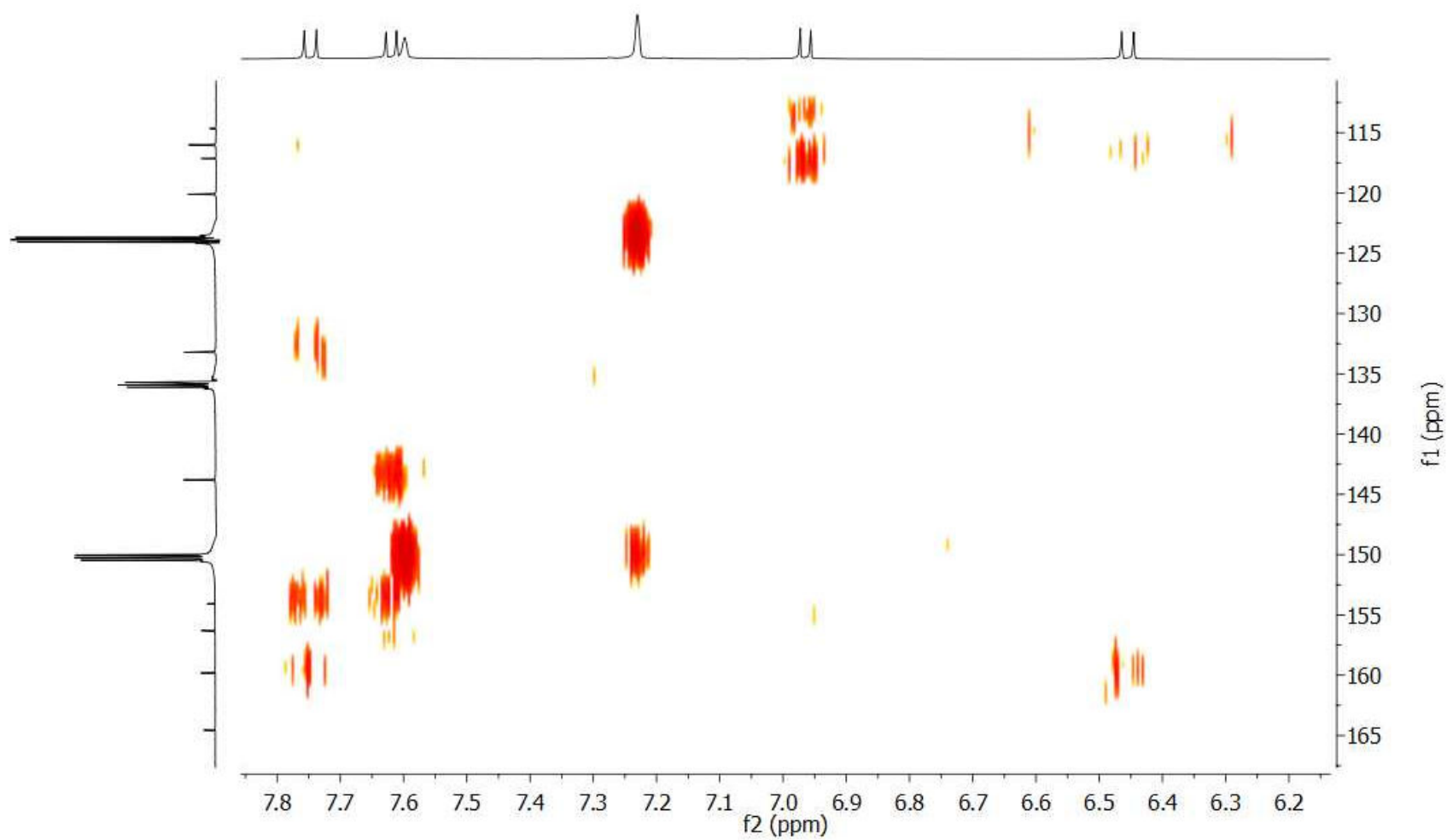
Figura 37 - Espectro de HMBC da SFA11-A – ampliação 1

Figura 38 - Espectro de HMBC da SFA11-A – ampliação 2

A presença de cumarinas em espécies da família Polygalaceae vem sendo relatada por alguns autores (PIZZOLATTI; LUCIANO; DELLE MONACHE, 2000; CUNHA JUNIOR, 2002). No entanto, o primeiro relato do isolamento do poligaleno foi na família Polygalaceae (SILVA, 2015). Dessa forma, o presente estudo configura o segundo relato de isolamento dessa cumarina, e o primeiro relato do isolamento no gênero *Asemeia*.

Dentre as atividades já atribuídas às cumarinas, pode-se destacar: atividade hepatoprotetora, antioxidante (BEILLEROT et al., 2008; SHAW et al., 2003), anti-inflamatória (KIM et al., 2005), ação espasmolítica (OLIVEIRA; SILVEIRA, 2001), ação antitrombótica e vasodilatadora (MONTI et al., 2007), propriedade antimutagênica, inibição da proliferação celular (KIM et al., 2005; LIU et al., 2001; JIMÉNEZ-OROZCO et al., 2001), antineoplásica (STANCHEV et al., 2008), atividade antinociceptiva (MEOTTI et al., 2006), dentre muitas outras.

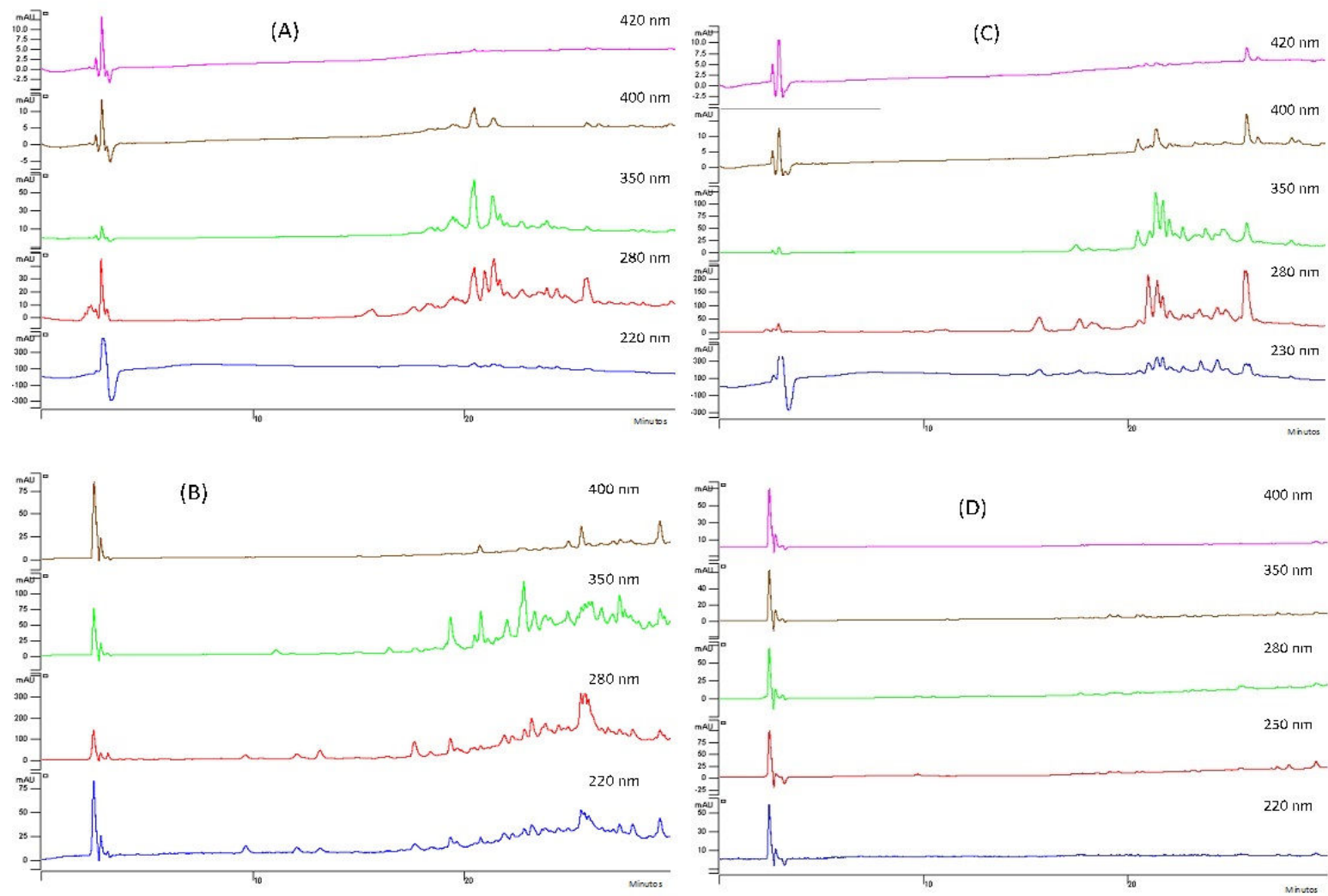
4.1.2 *Fingerprint* e triagem fitoquímica

A triagem fitoquímica realizada com testes colorimétricos e de precipitação permitiu sugerir a presença de substâncias bioativas das classes: fenóis, taninos, cumarinas, esteroides livres, saponinas e flavonoides. Os resultados negativos obtidos para as classes antraquinonas, antocianinas, triterpenoides e alcaloides podem estar relacionados com a ausência ou baixa concentração destes nos extratos ou pela baixa sensibilidade dos testes realizados.

A utilização do *fingerprint* vem sendo utilizada a fim de caracterizar extratos vegetais, devido à complexidade de avaliar cada substância individualmente. As técnicas mais utilizadas para a obtenção desses perfis químicos são CCD, CLAE, CG, Cromatografia em Contra Corrente e Eletroforese Capilar. No entanto, a utilização da CLAE ganhou destaque e tem sido amplamente utilizada para esse fim (HONG-LAN *et al.*, 2010).

Para a realização do *fingerprint*, a aquisição dos cromatogramas foi feita em diferentes comprimentos de onda entre 220-600 nm para a determinação do melhor comprimento para análise de cada extrato, levando-se em consideração o número de picos e a qualidade dos mesmos (Figura 39). Os extratos EBAO, ECAO e EAAO apresentaram melhor resolução dos cromatogramas em 280 nm, enquanto o EHAO apresentou em 250 nm.

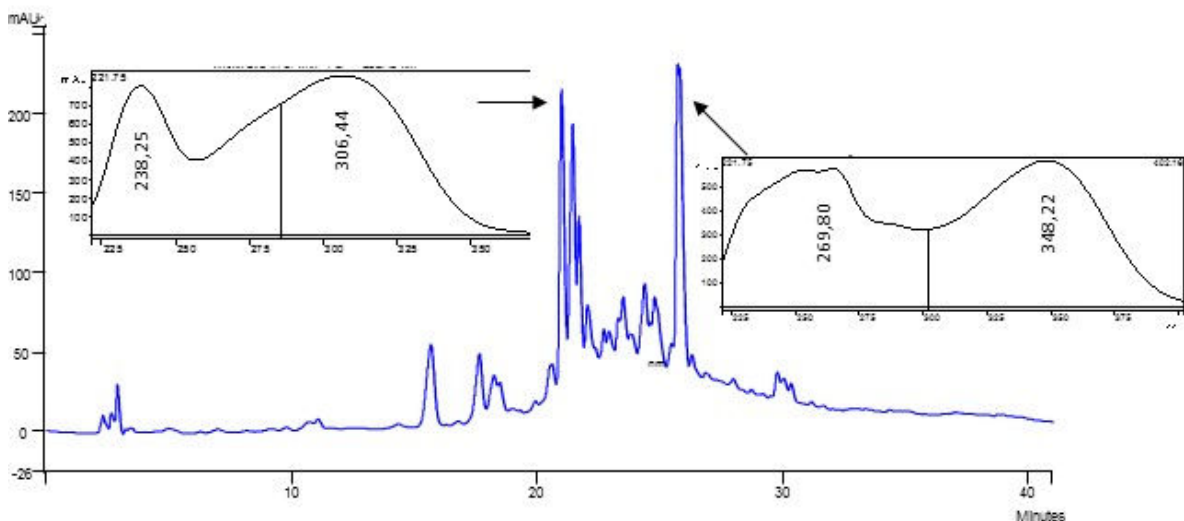
Figura 39 - Comparação dos cromatogramas em diferentes comprimentos de onda de (A) EBAO, (B) ECAO, (C) EAAO e (D) EHAO



A análise cromatográfica por CLAE-DAD mostrou variação no perfil de todos os extratos. Foi possível observar a presença de diversos compostos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos ($\lambda_{\text{máx}}=220-290$ nm e $\lambda_{\text{máx}}= 330$ aprox.) (TERMENTZI; KEFALAS; KOKKALOU, 2014) e compostos flavonoídicos ($\lambda_{\text{máx}}=240-285$ nm e $\lambda_{\text{máx}}=300-400$ nm, variando a depender da classe e do padrão de substituição) (ZUANAZZI, 2000), nos extratos bruto, clorofórmico e acetato de etila (Figura 40). No extrato hexânico foram detectados espectros característicos de flavonoides, porém devido à natureza do extrato, sugere-se que sejam flavonoides metoxilados. Em estudo realizado por Hong-Lan e colaboradores (2010) com a espécie *Polygala japonica*, o *fingerprint* pôde identificar também a presença de flavonoides.

Vale ressaltar que os resultados obtidos podem estar relacionados com as limitações do método, tendo em vista a utilização do detector de DAD, o qual permite a detecção apenas de substâncias que apresentem grupos cromóforos, como os fenólicos. Prado (2012) afirma que o perfil cromatográfico de um extrato vegetal pode representar a complexidade química da amostra, levando em conta as restrições em relação ao método específico escolhido, bem como as limitações do detector utilizado.

Figura 40 - Cromatograma e Espectros no UV ilustrativo do EBAO



Os resultados obtidos por CLAE-DAD corroboram com a triagem fitoquímica prévia, utilizando métodos colorimétricos e de precipitação. No entanto, não foi possível detectar todas as classes encontradas na triagem devido às limitações do método, como a necessidade de cromóforos na estrutura das moléculas.

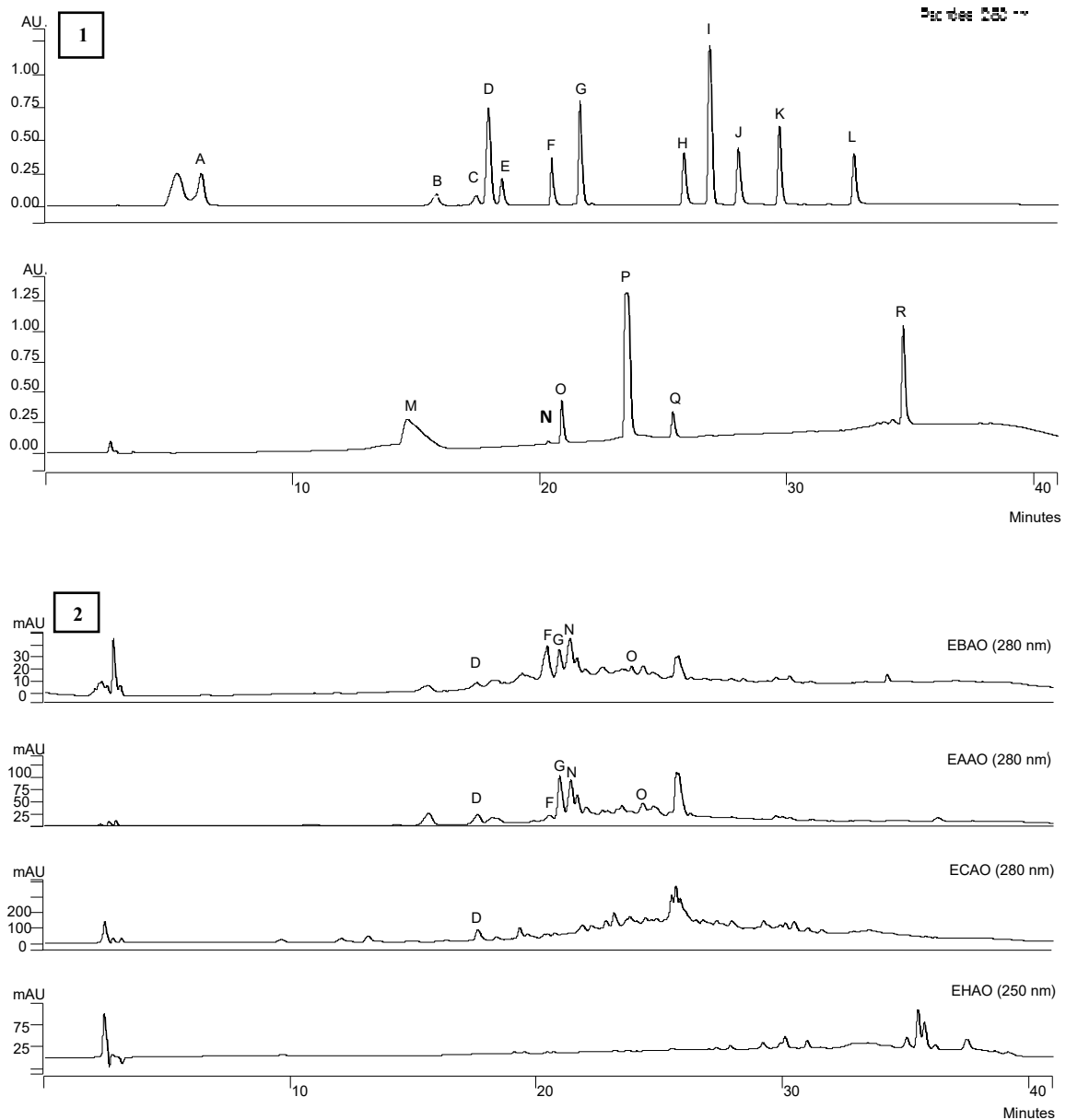
Compostos como cumarinas, xantonas, esteroides e flavonoides já foram encontrados em outras espécies da família Polygalaceae. Em estudos realizados com *Polygala cyparissias*

foi isolada a xantona identificada como 1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi xantona, a qual apresentou atividade antinociceptiva frente ao teste de contração abdominal induzida por ácido acético (CI₅₀ de 1,5 mg/kg) (CAMPOS, SANTOS, VAZ, 1997). Foram isolados de *Polygala sabulosa* compostos como dihidrostiril-2-pironas, estiril-2-pirona, α -espinasterol, escopoletina e dois ésteres de cumarina (escopoletina) obtidos semissinteticamente, acetilescopoletina e benzoilescopoletina, os quais exibiram efeitos antinociceptivos significativos e dose-dependente contra dor visceral induzida por ácido acético (MEOTTI et al, 2006). Também foi obtido de outra espécie da família, *Polygala paniculata*, o flavonoide rutina, o qual apresentou inibição dose-dependente da dor produzida pelo glutamato (LAPA et al, 2006). A presença de salicilatos, em especial salicilato de metila, também é característica das espécies da família, sendo encontrado em diversas espécies, incluindo *A. ovata*, principalmente em suas raízes (MENDES, 2008, ROCHA, 2012).

4.1.3 Validação e Quantificação das substâncias identificadas por CLAE-DAD

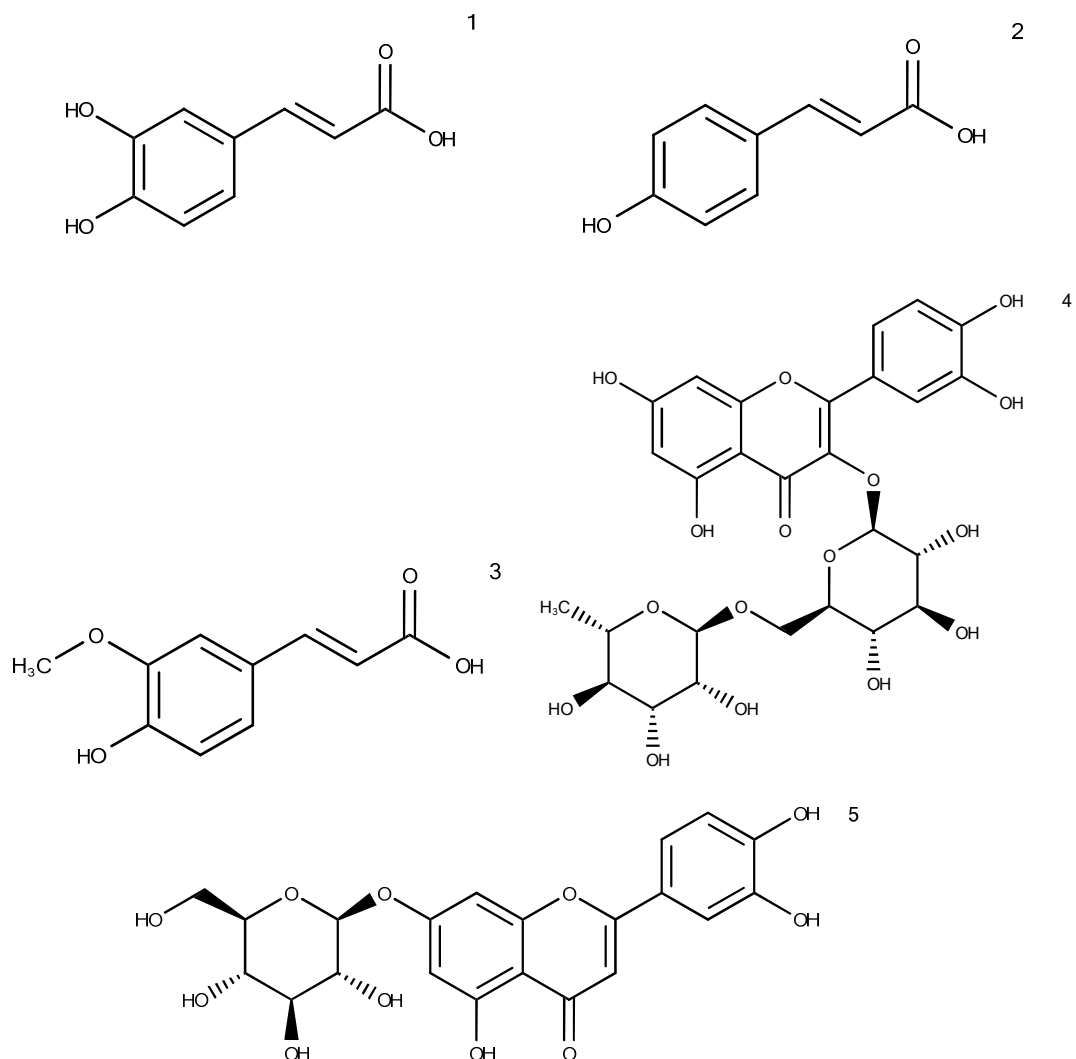
O método utilizado por Cíchová e colaboradores (2008) foi otimizado quanto ao sistema de eluição, através da avaliação de várias proporções da fase até obtenção da melhor definição dos picos tanto da mistura de padrões, quanto das amostras testadas. Diferentes comprimentos de onda também foram analisados para melhor resolução dos picos, sendo definido em 280 nm para os extratos bruto, acetato de etila e clorofórmico, e 250 nm para o extrato hexânico. Os cromatogramas dos padrões e extratos analisados após otimização estão mostrados na Figura 41.

Figura 41 - Cromatograma (1) dos padrões e (2) extratos analisados em CLAE-DAD. (A) Ácido gálico, (B) Catequina, (C) Procianidina, (D) Ácido cafeico, (E) Epicatequina, (F) Rutina, (G) Ácido *trans*-ferúlico, (H) Quercetina, (I) Ácido *trans*-cinâmico, (J) Canferol, (K) Formononetina, (L) Canferide, (M) Propilgalato, (N) Ácido *p*-cumárico, (O) Luteolina-7-*O*-glicosídeo, (P) Emetina, (Q) Luteolina e (R) Artepelin.

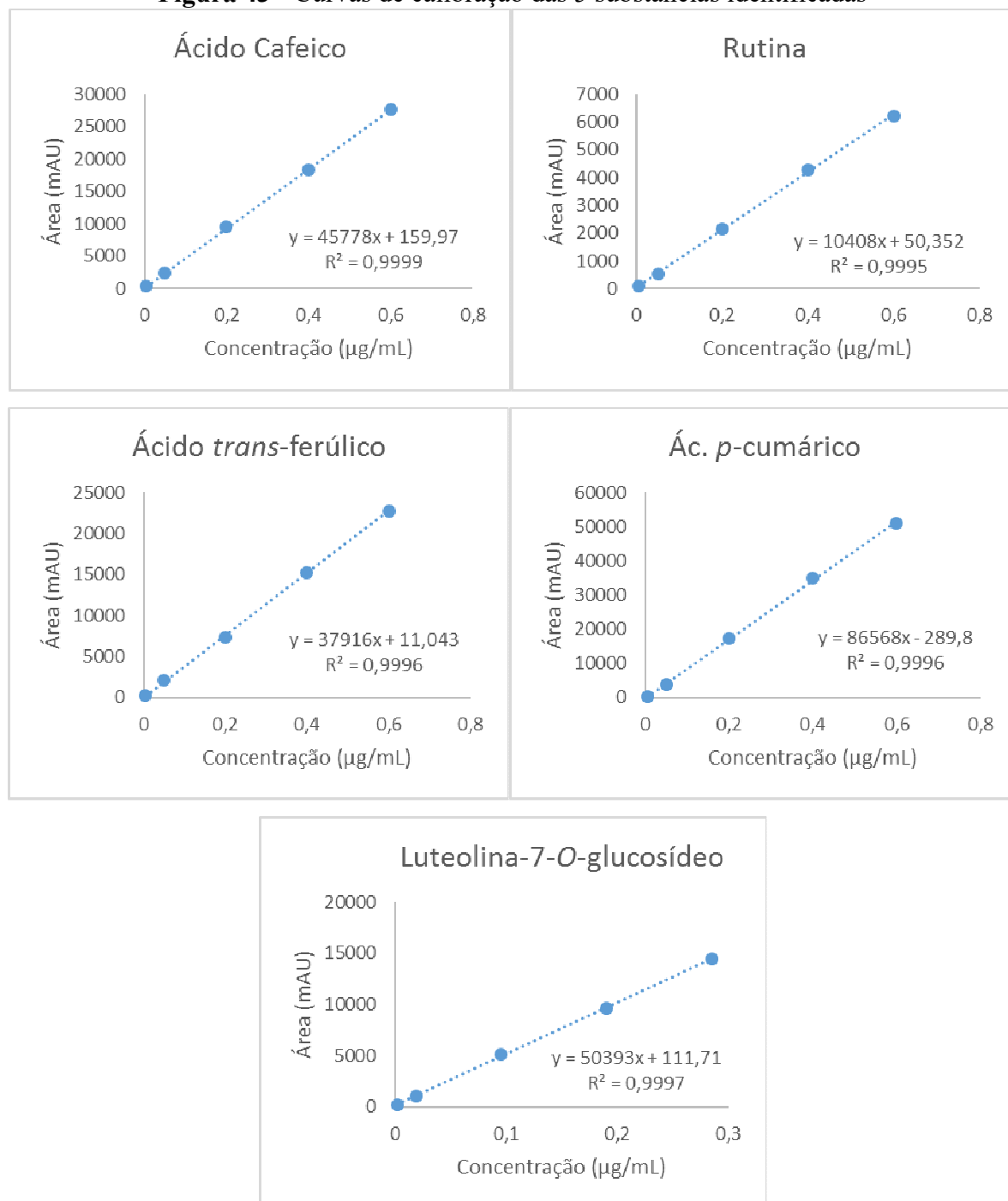


Foram analisadas 17 substâncias pelo método determinado, porém apenas 5 destas foram identificadas nas amostras de *A. ovata*: ácido cafeico, rutina, ácido *trans*-ferúlico, ácido *p*-cumárico e luteolina-7-*O*-glicosídeo (Figura 42). Sendo assim, a validação da metodologia foi feita para as substâncias identificadas.

Figura 42 - Estrutura do ácido cafeico (1), ácido *p*-cumárico (2), ácido *trans*-ferúlico (3), rutina (4) e luteolina-7-*O*-glicosídeo (5)



As equações de regressão dos 5 compostos foram obtidas a partir da curva de calibração para investigar linearidade (Figura 43). A equação de regressão, o coeficiente de correlação (R^2) e os LD e LQ dos 5 compostos foram dados na Tabela 11. Todas as curvas de calibração dos compostos exibiram coeficiente de correlação (R^2) acima de 0,9996. O maior LD encontrado foi de 3,34 $\mu\text{g/mL}$, enquanto o maior LQ foi de 11,28 $\mu\text{g/mL}$, mostrando alta sensibilidade para todos os compostos.

Figura 43 - Curvas de calibração das 5 substâncias identificadas**Tabela 11 -** Dados da regressão linear, limite de detecção e limite de quantificação das 5 substâncias identificadas

Substância	Intervalo (µg/mL)	Equação da reta*	R ² (n=5)	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
D	5,0-600,0	$y = 45778x + 159,97$	0,9999	2,903	9,677
F	5,0-600,0	$y = 10408x + 50,352$	0,9995	3,3383	11,277
G	5,0-600,0	$y = 37916x + 11,043$	0,9996	0,649	2,164
N	5,0-600,0	$y = 86568x - 289,8$	0,9997	0,888	2,959

O	1,9-285,0	$y = 50393x + 111,71$	0,9996	0,965	3,215
----------	-----------	-----------------------	--------	-------	-------

*y= área do pico. x= concentração injetada

Como listado na (Tabela 12), os valores de DPR ficaram todos abaixo do preconizado, ou seja, menores que 5,0%, o que mostrou uma boa reprodutibilidade do método. As recuperações, do teste de exatidão, variaram de 85,68-99,12% em todas as concentrações de 5 compostos (Tabela 12).

Tabela 12 - Precisão das 5 substâncias

Substância	Concentração (µg/mL)	Média ± DPa (µg/mL)	DPR (%)
D	50	53,094±0,001	1,82
	200	206,838±0,002	1,00
	400	401,583±0,002	0,55
F	50	52,128±0,001	2,17
	200	207,974±0,002	0,79
	600	598,670±0,005	0,80
G	200	192,021±0,001	0,65
	400	401,507±0,002	0,61
	600	601,738±0,005	0,84
N	50	42,364±0,001	0,76
	200	200,389±0,003	1,74
	400	403,039±0,003	0,88
O	95	100,678±0,001	0,45
	190	191,225±0,005	2,76
	285	286,773±0,004	1,35

^aOs valores foram de média ± desvio padrão de 3 injeções

Tabela 13 - Recuperação das 5 substâncias

Substância	Concentração adicionada (µg/mL)	Recuperação (n=3, %) ^a
D	40	91,29
	200	96,76
	400	99,12
F	40	85,68
	200	92,45
	400	94,31
G	40	88,43
	200	89,37
	400	95,76
N	40	86,56
	200	93,29
	400	98,41
O	20	98,74
	100	89,35
	200	97,46

^aA recuperação foi medida pela equação (valor obtido da amostra com adição de padrão – valor obtido da amostra)/ valor obtido da amostra com adição de padrão x 100

No extrato bruto foram identificados ácido cafeico, rutina, ácido *trans*-ferúlico, ácido *p*-cumárico e luteolina-7-*O*-glicosilada; no extrato acetato encontrou-se ácido cafeico, rutina, ácido *trans*-ferúlico, ácido *p*-cumárico e luteolina-7-*O*-glicosídeo; e no extrato clorofórmico foi identificado apenas o ácido cafeico (Figura 21). As concentrações das 5 substâncias foram calculadas a partir da curva de calibração. Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 14, mostrando a variação das substâncias encontradas nos diferentes extratos.

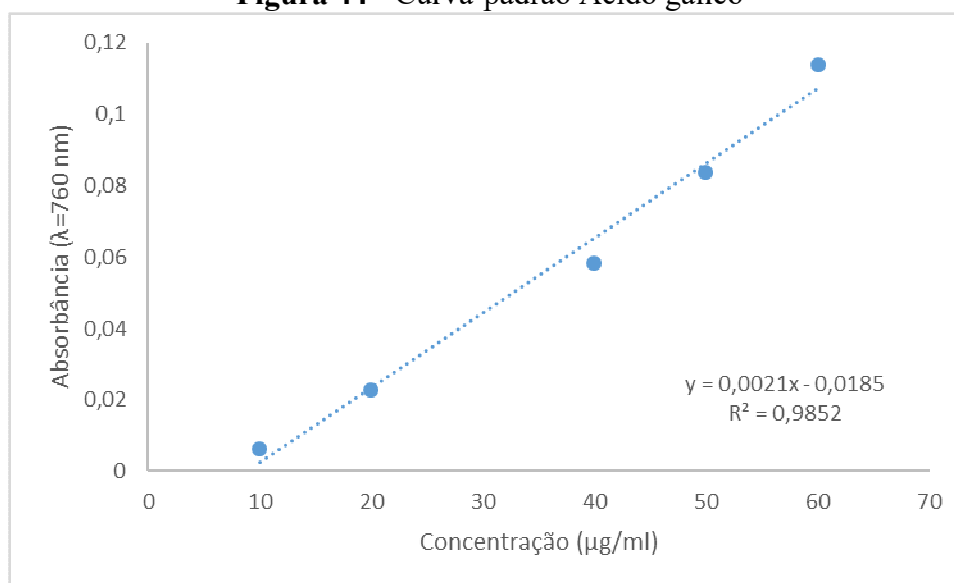
Tabela 14 - Conteúdo das substâncias nos 4 extratos de *A. ovata*

Substância	Concentração (µg/mL)			
	EBAO	EAAO	ECAO	EHAO
D	52,61±0,005	203,37±0,001	216,01±0,003	-
F	36,76±0,002	94,21±0,002	-	-
G	85,16±0,005	286,46±0,004	-	-
N	50,91±0,001	87,78±0,003	-	-
O	3,64±0,002	17,37±0,001	-	-

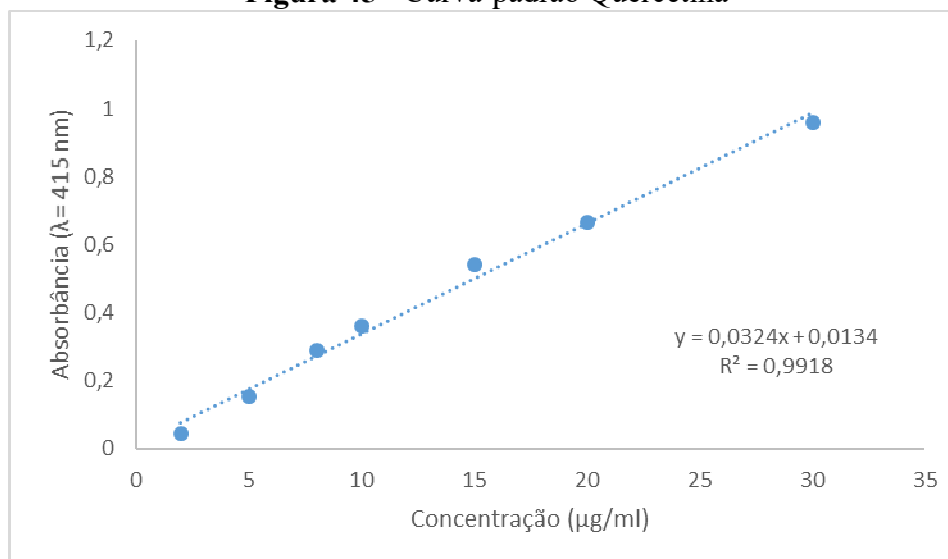
4.1.4 Fenólicos e flavonoides totais

O teor de fenólicos totais foi calculado com base na equação obtida através da curva padrão de ácido gálico (Figura 44).

Figura 44 - Curva-padrão Ácido gálico



O teor de flavonoides totais, por sua vez, foi calculado com base na equação obtida através da curva padrão da quercetina (Figura 45).

Figura 45 - Curva-padrão Quercetina

O conteúdo de fenólicos totais obtidos pelo método de Folin Ciocalteu, expressos em g de AGE/100 g de extrato, foi de $2,95 \pm 0,02$ g/100 g de EBAO. Já para os extratos ECAO, EHAO e EAAO os valores obtidos foram $5,82 \pm 0,04$ g/100 g, $1,69 \pm 0,04$ g/100 g e $12,37 \pm 0,03$ g/100 g, respectivamente. Observa-se que o teor de fenólicos no EAAO foi o mais representativo, isso pode se dar pela maior afinidade desses compostos por esse solvente e pela consequente concentração desses compostos após a partição do extrato bruto.

Na quantificação de flavonoides totais, foram obtidos os valores, expressos em g de QE/100 g de extrato, para EBAO, ECAO e EAAO, o EHAO não apresentou níveis suficientes para serem detectados pela técnica utilizada. Dessa forma obteve-se $0,93 \pm 0,02$ g/100 g para EBAO, $1,39 \pm 0,03$ g/100 g no ECAO e $2,34 \pm 0,05$ g/100 g para o EAAO.

O teor de fenólicos e flavonoides totais apresentaram resultados superiores aos encontrados com outras espécies da família. O extrato bruto de *P. sabulosa*, por exemplo, contém, como teor de fenólicos totais, aproximadamente 0,00164 g de AGE/g de extrato seco, enquanto o extrato hexânico e o de acetato de etila apresentaram aprox. 0,00143 e 0,00160 g de AGE/g de extrato seco, respectivamente (MENDES, 2008).

Quanto à avaliação do teor de flavonoides totais, os extratos bruto, hexânico e de acetato de etila de *P. sabulosa* apresentaram como resultados, respectivamente, 0,00016, 0,00011 e 0,00014 g de QE/g de extrato seco aproximadamente (MENDES, 2008). Comparando-se com os resultados observado com *A. ovata*, observa maiores concentrações para os extratos bruto e de acetato de etila (0,93 e 2,34 g de QE/g de extrato seco) dessa espécie. Por outro lado, o extrato hexânico não apresentou resultado positivo para flavonoides,

diferente do observado com *P. sabulosa*. Porém, pelo perfil químico obtido por CLAE-DAD foi possível observar a presença de possível flavonoide metoxilado no extrato hexânico de *A. ovata*. Isso mostra a limitação do método de flavonoides totais, que é baseado na complexação dos íons alumínio, que ocorre em locais específicos em que existem hidroxilas. Então, esse método pode ter resultado subestimado, tendo em vista que é mais propício para flavonoides com padrões de hidroxilação como o da quercetina.

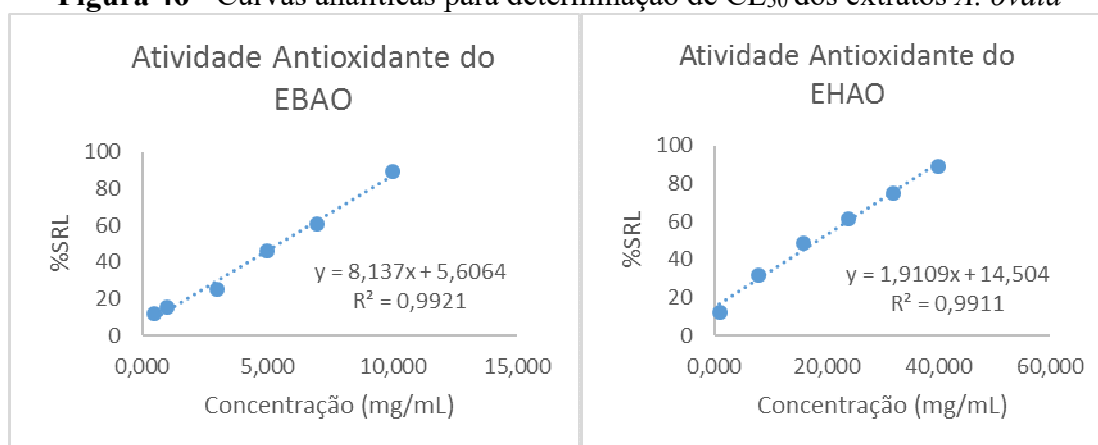
Os resultados obtidos com esses testes corroboram os resultados do perfil fitoquímico obtido com CLAE-DAD, onde foi possível observar a presença de vários compostos fenólicos e flavonoídicos.

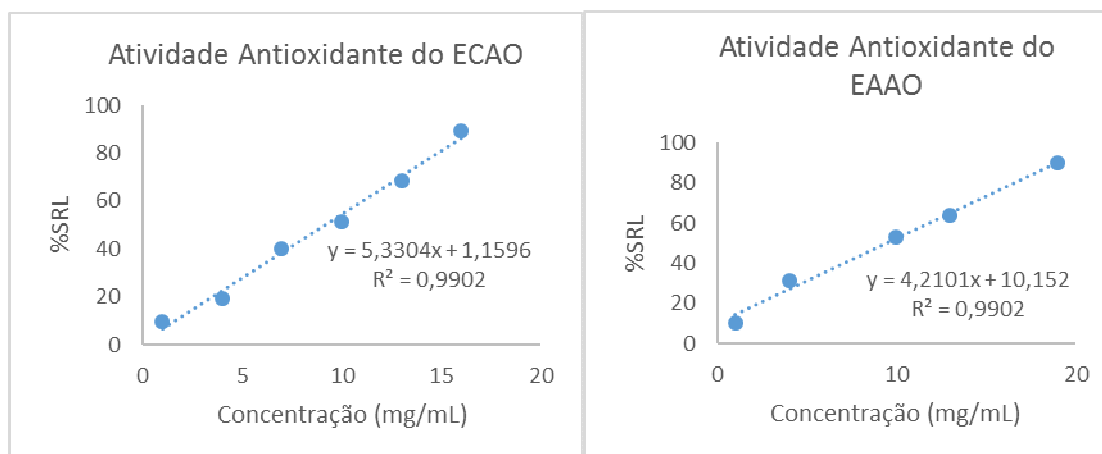
4.2 Atividades biológicas

4.2.1 Atividade antioxidante

No ensaio de avaliação quantitativa da atividade antioxidante, EBAO, ECAO, EAAO e EHAO foram testados em diferentes concentrações, para obtenção do valor do CE_{50} , ou seja, a concentração que atinja o sequestro de 50% do radical DPPH. Dessa forma, utilizou-se dados de seis diferentes concentrações (para cada fração), as quais apresentaram linearidade adequada (Figura 46). O valor de CE_{50} encontrado para EBAO foi de $9,46 \pm 0,15$ mg/mL, para ECAO foi de $9,16 \pm 0,09$ mg/mL, para EHAO foi de $13,21 \pm 0,12$ mg/mL, e para EAAO foi de $5,46 \pm 0,11$ mg/mL.

Figura 46 - Curvas analíticas para determinação de CE_{50} dos extratos *A. ovata*





Os efeitos de espécies oxidantes sobre o organismo tornaram-se alvo de interesse e intensa investigação científica, uma vez que exercem um papel importante em doenças graves, como distúrbios neurodegenerativos, câncer, cirrose hepática, aterosclerose, catarata, inflamação e diabetes (LIU et al, 2008b).

Os resultados obtidos com a determinação do teor de fenólicos e flavonoides totais corroboram com os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante, onde o EAAO apresentou melhores resultados. O extrato bruto apresenta uma mistura complexa de metabólitos especiais que podem agir sinergicamente para expressão de determinada atividade biológica, ou podem antagonizar a ação de algum componente químico. A partição com solventes de diferentes polaridades possibilitou a obtenção de extratos semipurificados, devido à seleção dos componentes químicos que ocorre pela afinidade desses com o solvente extrator.

Nesse sentido, pode-se inferir que a partição do EBAO acarretou no aumento da atividade do EAAO, podendo-se inferir que os componentes ativos estavam em menores concentrações no EBAO ou sofriam interferência de antagonistas. A partição não alterou significativamente a atividade do ECAO, quando comparado ao EBAO, mesmo havendo aumento nos teores de fenólicos e flavonoides, após a partição. Tal resultado confere com os dados da literatura, em que o fracionamento com acetato de etila implica no aumento da atividade antioxidante expressada, isso porque as substâncias relacionadas a essa atividade, como flavonoides, cumarinas, taninos e outros fenólicos estão em maior concentração nesse tipo de extrato (BALESTRIN et al., 2008; MANETTI et al., 2010; MISSAU, et al., 2007; TREVISAN, 2010).

Além disso, é evidente a influência que a presença dos flavonoides exerce nos resultados de sequestro de radical DPPH, visto que o EHAO foi o que apresentou maior CE_{50}

e não foram detectados flavonoides na amostra. Sugere-se que a atividade antioxidante apresentada por esse extrato seja proveniente de outras substâncias doadoras de hidrogênio, também capazes de reagir com DPPH (Tabela 15).

Tabela 15 - Resultados da quantificação de flavonoides, fenólicos e atividade antioxidante em *Asemeia ovata*

	Extrato e frações			
	EBAO	EHAO	ECAO	EAAO
Flavonóides totais (g/100g)	0,936±0,02	X	1,39±0,02	2,34±0,05
Fenólicos totais (g/100g)	2,95±0,02	1,69±0,04	5,82±0,04	12,37±0,03
Atividade antioxidante (mg/mL)	9,46±0,15	13,21±0,12	9,16±0,09	5,46±0,11

Legenda: X = valor não detectado pelo método.

Como relatado em literatura, os fenólicos, em especial, flavonoides apresentam alta capacidade antioxidante devido à sua estrutura química. A presença de anéis aromáticos, que permitem a ressonância dos elétrons, bem como os sítios de quelação de metais contribui, invariavelmente, com essa atividade (RAMALHO; JORGE, 2006).

Bianchi e Antunes (1999) afirmam que os antioxidantes presentes nos vegetais mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos, como os flavonoides, e que as propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de sequestrar os radicais livres.

A avaliação da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de *P. paniculata*, realizada por Lapa e colaboradores (2007), apresentou como resultado CE₅₀ de 61,2 mg/mL. Com este resultado, foi sugerido que o efeito antioxidante pode estar relacionado ao efeito gastroprotetor observado para esta espécie. Já Mendes (2008) apresentou valores de CE₅₀ de 63,76 µg/mL para o extrato hidroalcoólico de *P. sabulosa* e 110,50 µg/mL para o extrato acetato de etila. Sakthidevi e Mohan (2012) obtiveram valores de CE₅₀ equivalentes a 48,26, 59,10 e 41,58 µg/mL para *P. javana*, *P. chinensis* e *P. rosmarinifolia*, respectivamente. Observa-se que a *A. ovata*, por sua vez, apresenta melhores resultados de atividade antioxidante apenas quando comparada com os resultados obtidos com a espécie *P. paniculata*.

Fatores como tempo de reação, concentração inicial do DPPH• e comportamento cinético das diferentes amostras, influenciam no valor de CE₅₀ obtido, dificultando a comparação de resultados (FADDA et al, 2014). Nesse sentido, apesar do relato na literatura de estudos com outras espécies da família Polygalaceae, a comparação dos resultados é dificultada devido a diferentes formas de execução do teste de sequestro do radical livre

DPPH•. Dessa forma, foi realizado também, pelo mesmo método, a determinação da CE₅₀ do extrato padronizado de *Ginkgo biloba* (Egb761), utilizado como padrão positivo para o teste.

Foram encontrados valores de CE₅₀ de 3,28±0,38 mg/mL para o extrato Egb761. Comparando esses resultados com o obtido para EAAO pelo teste de Dunnett (p<0,05) a diferença é significativa, no entanto, é possível avaliar que o valor de CE₅₀ do EAAO é o valor mais próximo ao Egb761, que, de acordo com Bridi, Steffen e Henriques (2001) tem sua atividade antioxidante relacionada com os efeitos benéficos desse extrato em doenças neurodegenerativas. Nesse sentido, a atividade apresentada pela espécie em questão deve ser avaliada quanto a expressão de outras atividades biológicas que apresentam relação com a atividade antioxidante pelo sequestro de radicais livres.

4.2.2 Atividade anticolinesterásica

O envelhecimento pode ser acompanhado por algumas alterações nos neurotransmissores, dentre eles a acetilcolina. Alterações cerebrais nos níveis desse neurotransmissor tem sido relacionadas com problemas de memória e outros processos cognitivos, sendo que, em condições normais, a enzima acetilcolinesterase é a principal responsável por manter os níveis adequados (LI et al, 2014).

O teste de atividade anticolinesterásica realizado com a espécie *A. ovata* apresentou baixa atividade em todos os extratos analisados, quando comparados com o padrão eserina, como indicado na Tabela 16.

Tabela 16 - Resultado da atividade anticolinesterásica dos extratos de *A. ovata*

Amostra	%IACHÉ
EBAO	8,68±0,24 ^{a1}
EHAO	-
ECAO	-
EAAO	15,35±1,29 ^{a2}
Eserina	90,21±0,41 *

(-) Não apresentou resultado pelo método

Estatística realizada: ANOVA e Teste Tukey (p<0,05), *Teste Dunnett (p<0,05)

Observa-se que EBAO e o EAAO apresentaram diferença significativa nos resultados obtidos, sendo que o EAAO apresentou atividade melhor.

Estudos apontam que a classe de substâncias com maior potencial anticolinesterásico são os alcaloides, no entanto, existem relatos de compostos de outras classes que apresentam tal atividade. Queiroz (2013) cita que além dos alcaloides, compostos como terpenoides e polifenóis também podem apresentar atividade anticolinesterásica. Já Vieira (2010) avaliou a

atividade expressada com cumarinas sintéticas. Nesse sentido, novos estudos deverão ser realizados com frações e substâncias isoladas.

Li e colaboradores (2014), assim como Park e colaboradores (2002) relatam que a espécie *P. tenuifolia* pode ser utilizada no tratamento de problemas de memória, sendo uma das suas principais formas de ação, a inibição da AChE.

4.2.3 Avaliação da letalidade frente à *A. salina*

Foram testados todos os extratos obtidos de *A. ovata* e determinadas as CL_{50} através da determinação de equações por regressão linear, como mostra a Figura 47 e Tabela 17.

Figura 47 - Curvas analíticas para determinação de CL_{50} dos extratos *A. ovata*

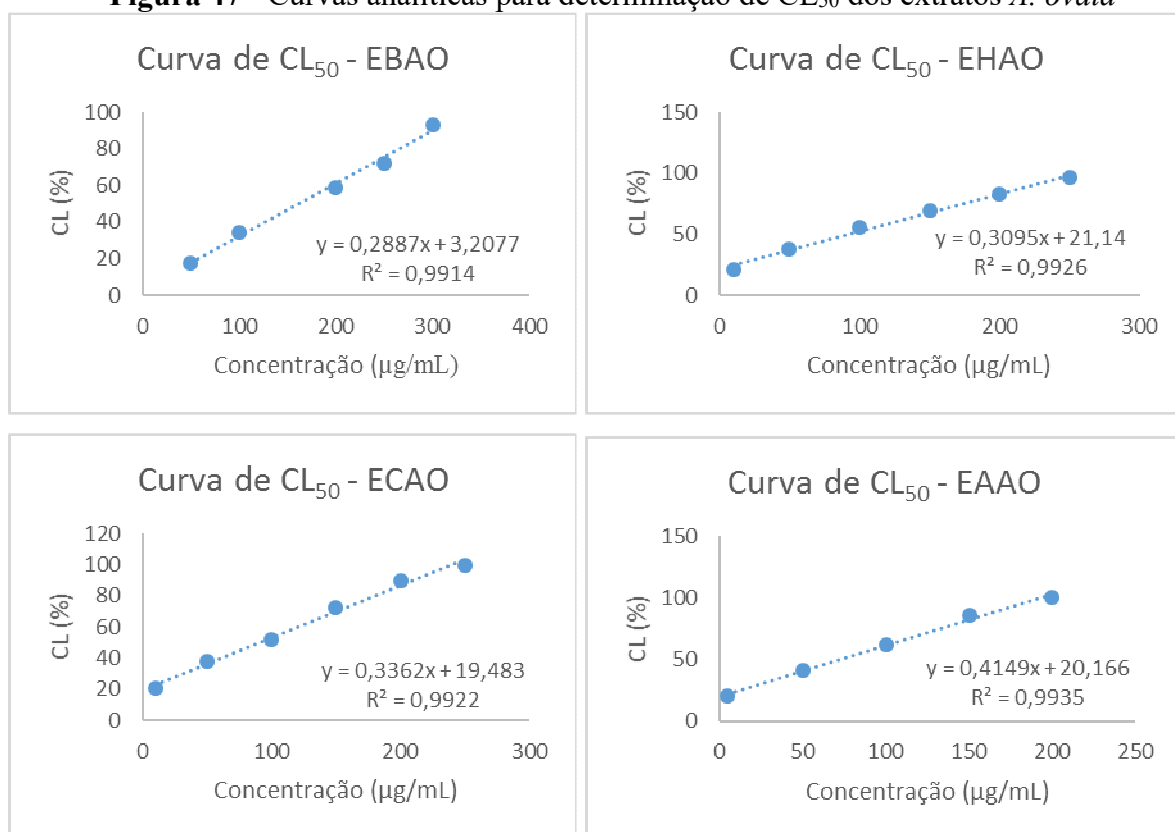


Tabela 17 - CL₅₀ dos extratos de *A. ovata*

Amostras	CL ₅₀ (µg/mL)
EBAO	162,08±3,11 ^{a4}
EHAO	93,25±0,49 ^{a3}
ECAO	90,77±0,47 ^{a2}
EAAO	71,91±1,88 ^{a1}

Estadística realizada: ANOVA e Teste Tukey (p<0,05)

Os resultados obtidos na avaliação da letalidade frente ao microcrustáceo *A. salina* sugere que todos os extratos apresentaram toxicidade, de acordo com a classificação descrita por Mayer (1982 apud RIBEIRO et al, 2014), que considera tóxicos extratos que apresentam CL₅₀ inferior a 1000 µg/ml, tornando-os potenciais fornecedores de algum agente citotóxico.

Estudos com outras espécies da família Polygalaceae também demonstram alta toxicidade frente a *A. salina*, em que o extrato da casca da raiz da espécie *Securidaca longependunculata* apresentou CL₅₀ de 0,32 µg/mL para o extrato etanólico e de 3,01 µg/mL para o extrato aquoso (KAMBA; HASSAN,2010).

Outro estudo, com *Asemeia extraaxilaris*, apresentou CL₅₀ para seu extrato etanólico bruto de 242,23 µg/mL, as frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila apresentaram, respectivamente, 289,17 µg/mL, 248,22 µg/mL e 232,37 µg/mL (SILVA, 2014). Dessa forma, pode-se dizer que todos os extratos testados apresentaram letalidade frente ao microcrustáceo, contudo, os extratos de *A. ovata* apresentaram maior toxicidade.

Montanher, Pizzolatti e Brighente (2003) testaram o extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* e encontraram CL₅₀ de 1396 µg/mL, enquanto que para o extrato hidroalcoólico de *P. sabulosa* foi encontrado valor de 692 µg/mL. Ao fracionar o extrato de *P. sabulosa*, os autores também observaram o aumento da atividade para os extratos hexânico (661 µg/mL) e diclorometano (652 µg/mL), no entanto houve diminuição da atividade para o extrato acetato de etila (>1000 µg/mL).

Missau (2008) encontrou também uma maior atividade para os extratos diclorometano (776,25 µg/mL) e hexânico (741,31 µg/mL), quando comparados aos extratos bruto (954,65 µg/mL) e acetato de etila (975,25 µg/mL) de *P. paniculata*. Já para *P. pulchella* dentre os extratos analisados, apenas o extrato etanólico das flores apresentou-se ativo, com CL₅₀ de 371,53 µg/mL.

4.3 Triagem virtual inversa

As cinco substâncias identificadas pelo método de CLAE-DAD, rutina, luteolina-7-*O*-glicosídeo, ácido cafeico, ácido *trans*-ferúlico e ácido *p*-cumárico (Figura 42), assim como a substância isolada poligaleno, foram submetidas aos servidores de triagem virtual inversa. O servidor GUSAR foi utilizado somente para predição da toxicidade aguda das seis substâncias.

As técnicas baseadas em *fingerprint* consistem em métodos simples para previsão de alvos, baseando-se na semelhança química e no conhecimento da bioatividade de moléculas semelhantes. Essa semelhança química implica em semelhança de propriedades, podendo, assim, os alvos de determinada molécula serem preditos através da identificação de proteínas com ligantes conhecidos que são muito semelhantes à molécula de consulta. Por outro lado, o método de acoplamento molecular usa a estrutura das proteínas alvos para prever novas bioatividades (CERETO-MASSAGUÉ et al, 2014, CHEN et al, 2011).

A análise dos servidores utilizados demonstrou que há diferenças na quantidade de alvos moleculares encontrados para todas as substâncias, como mostra a Tabela 18. Essa diferença pode ser explicada devido a diferença dos métodos utilizados pelos mesmos, como também a biblioteca de alvos moleculares.

Tabela 18 - Quantidade de alvos moleculares por servidor

Substância	Servidor	
	ChemProt 2.0	DRAR-CPI
Rutina	311	281
Luteolina-7-<i>O</i>-glicosídeo	321	335
Ácido cafeico	156	353
Ácido <i>p</i>-cumárico	79	353
Ácido <i>trans</i>-ferúlico	189	353
Poligaleno	-	375

Observa-se que a cumarina, poligaleno, não apresentou nenhum resultado no servidor ChemProt 2.0. Como explicado anteriormente, tal servidor baseia-se no método de *fingerprint* para previsão dos alvos. Dessa forma, o núcleo cumarínico conjugado com anel de sete átomos, da referida molécula de consulta, pode ser fator limitante para o servidor encontrar moléculas que apresentem similaridade química acima de 85%.

4.3.1 Chemprot 2.0

A Tabela 19 traz resultados encontrados pelo ChemProt 2.0 para alvos identificados com CT = 1, indicando que a referida molécula de consulta foi testada no alvo molecular em questão.

Tabela 19 - Exemplos de atividades encontradas para os ligantes avaliados

Substância	Alvo	Tipo de bioatividade	Valor
Rutina	Receptor adrenérgico 2A	Ki	9,00 nM
	Xantina desidrogenase	CI ₅₀	52200,00 nM
Luteolina-7-O-glicosídeo	Receptor muscarínico (M5)	Ki	35,13 nM
	Vírus influenza A (H1N1)	CI ₅₀	47400,00 nM
Ácido cafeico	Lipoxigenase 1	CI ₅₀	3000,00 nM
	Anidrase carbônica 2	Ki	16100,00 nM
Ácido <i>p</i>-cumárico	Alfa-glucosidase MAL32	CI ₅₀	1,27 nM
	Anidrase carbônica 2	Ki	9800,00 nM
Ácido <i>trans</i>-ferúlico	Anidrase carbônica 14	Ki	94300,00 nM
	Hialuronidase 1	CI ₅₀	>2000000,00 nM

Nahrstedt e Butterweck (2010) estudaram alguns dos constituintes ativos de *Hypericum perforatum* L. (Clusiaceae). Dentre os diversos flavonoides glicosilados, a rutina foi identificada. Em estudos de ligação ao receptor, a rutina apresentou considerável afinidade pelos receptores adrenérgicos 2A e 2C, com Ki = 9 nM. Tal resultado, juntamente com os obtidos para os outros flavonoides, servem para confirmar a importância dessas moléculas como co-efetores que auxiliam nas propriedades farmacológicas para o tratamento da depressão da hipericina, principal constituinte de *H. Perforatum*.

Liu e colaboradores (2008a) avaliaram a relação estrutura-atividade de 25 flavonoides contra o vírus Influenza. Dentre os flavonoides analisados, a luteolina-7-O-glicosídeo, chamado de galuteolina pelos autores, apresentou atividade moderada, com CI₅₀ = 4,74 µM. Por outro lado, sua forma não glicosilada apresentou atividade considerada boa, com CI₅₀ = 33,7 µM.

Innocenti e colaboradores (2010), por sua vez, investigaram o potencial inibitório contra a metaloenzima anidrase carbônica (AC), dentre elas a isoforma 2, de alguns ácidos

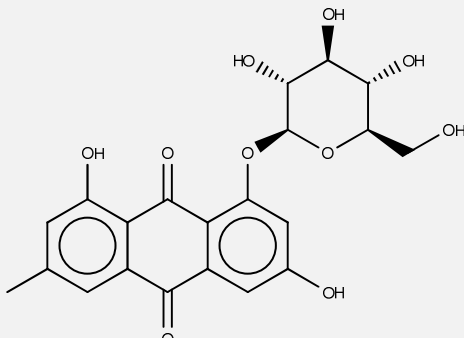
fenólicos, incluindo os ácidos cafeico e *p*-cumárico. Ambas moléculas apresentaram inibição efetiva com $K_i = 1,61$ e $0,68 \mu\text{M}$, respectivamente. O ácido *p*-cumárico apresentou um dos melhores resultados da série de moléculas testadas. Segundo os autores supracitados, fenóis, como os investigados, possuem mecanismo de inibição da AC distinta daquela das sulfonamidas/sulfamatos utilizados clinicamente ou as cumarinas. Ao contrário das sulfonamidas, que se ligam ao íon zinco catalítico, fenóis são ancoradas com Zn (II) coordenado por molécula de água e se ligam mais externamente na cavidade do sítio ativo, fazendo contato com vários resíduos de aminoácidos. Como esta é a região com a maior variabilidade entre as várias isoenzimas de AC encontradas em mamíferos, esta classe de compostos pode levar a inibidores seletivos para uma ou algumas isoformas de ACs medicinalmente relevantes.

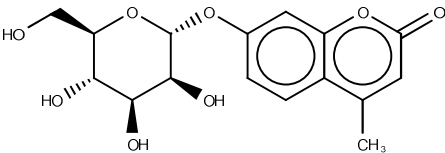
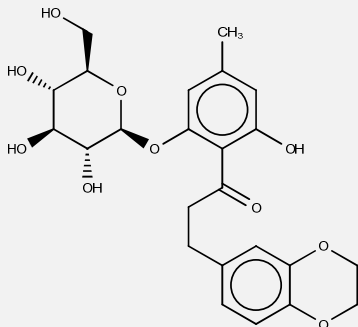
Iwanaga e colaboradores (2010) isolaram de *Cimifuga simplex* Wormsk. e *C. japonica* (Thumb.) Spreng. (Ranunculaceae) e investigaram série de moléculas, incluindo o ácido *trans*-ferúlico, sobre a inibição da hialuronidase. Nesse estudo foi observado que o ácido em questão apresentou baixo potencial sobre o alvo estudado, com $CI_{50} > 2000 \mu\text{M}$.

4.3.1.1 Seleção dos alvos

A Tabela 20 mostra os resultados obtidos para a rutina e a luteolina-7-*O*-glicosídeo, as quais apresentaram resultados idênticos entre si para a identificação dos alvos moleculares. Foram listados apenas os 5 alvos moleculares selecionados nesse servidor que apresentaram $CT > 0,88$ e bioatividade $< 600 \text{ nM}$. Destaca-se que para as etapas subsequentes, o alvo escolhido foi baseado no maior valor de CT e melhor valor de bioatividade.

Tabela 20 - Potenciais alvos para a rutina e luteolina-7-*O*-glicosídeo obtidos pelo servidor ChemProt 2.0

Estrutura de referência	Alvo	CT	K_i (nM)
 <p>Emodina 8-glicosídeo</p>	Receptor de estrogênio	0,90	5,70

 <p>4-metilumbeliferil alfa-D-manopiranosideo</p>	Anidrase carbônica 12	0,92	8,50
	Anidrase carbônica 9	0,92	9,20
	Anidrase carbônica 1	0,92	590,00
 <p>Análogo do benzodioxano</p>	Cotransportador 2 de sódio/glicose	0,88	9,00

A Tabela 21 mostra os resultados obtidos para os ácidos caféico, *p*-cumárico e *trans*-ferúlico. Observa-se que alguns alvos iguais foram selecionados para os diferentes ácidos, porém com variações nos parâmetros CT, bioatividade e estrutura de referência. Os ligantes selecionados apresentaram alta similaridade química (CT > 0,7) (IRWIN et al, 2012) com as moléculas de consulta, podendo-se sugerir que as mesmas têm potencial para apresentar ação sobre os alvos selecionados.

O alvo Aldose redutase foi selecionado para o ácido caféico e o ácido *trans*-ferúlico, porém a estrutura de referência que apresentou similaridade química entre eles não foi a mesma. O ácido protocatecuico apresentou CT = 0,95 de similaridade com o ácido caféico, enquanto que o ácido síringico apresentou CT = 0,88 de similaridade com o ácido *trans*-ferúlico.

O alvo Receptor de fator de crescimento epidérmico foi selecionado para os três ácidos identificados nos extratos de *A. ovata*. Para o ácido caféico, o ácido 2,5-dihidroxisirilcarbâmico apresentou CT = 0,90 de similaridade. Já para o ácido *p*-cumárico a estrutura base que apresentou similaridade foi o ácido *p*-hidroxibenzóico (CT = 0,94), enquanto que para o ácido *trans*-ferúlico, o metil 2,5-dihidroxicinamato foi a molécula que apresentou CT = 0,96 de similaridade.

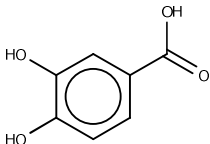
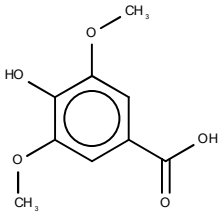
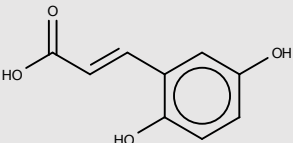
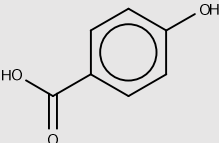
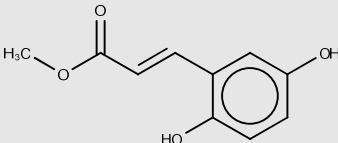
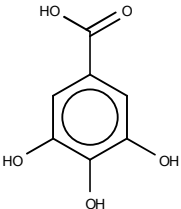
Os alvos Anidrase carbônica 9 e 12 foram selecionados tanto para o ácido caféico quanto para o ácido *p*-cumárico tendo a mesma estrutura de referência, o ácido *o*-cumárico, variando somente o nível de similaridade, CT = 0,86 para o primeiro e CT = 0,89 para o segundo. A Anidrase carbônica 12 também foi selecionada para o ácido *trans*-ferúlico, porém

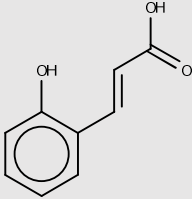
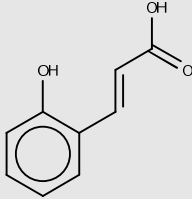
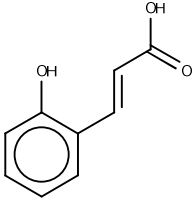
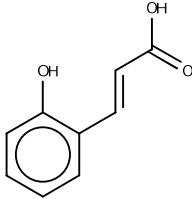
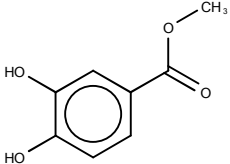
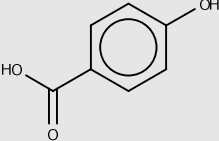
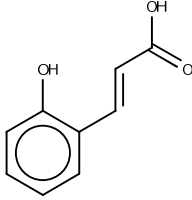
com estrutura de referência diferente dos outros ácidos, metil 3,4-dihidroxibenzoato, com CT = 0,88. Vale ressaltar que ambas isoenzimas de anidrase carbônica também foram selecionadas para os flavonoides identificados (rutina e luteolina-7-*O*-glicosídeo), sendo a estrutura de referência o 4-metilumbeliferil alfa-D-manopiranosídeo, que apresentou CT = 0,92.

A anidrase carbônica 1 foi selecionada para os flavonoides rutina e luteolina-7-*O*-glicosídeo com a mesma estrutura de referência das outras isoenzimas citadas anteriormente (CT = 0,92), e também foi selecionada para o ácido *trans*-ferúlico através de sua similaridade de (CT = 0,88) com o ácido siríngico. Todos os outros alvos foram selecionados exclusivamente para sua respectiva molécula de consulta. O poligaleno, por sua vez, não apresentou resultado por este servidor.

Os resultados obtidos permitiram observar que todas as estruturas de referência e as moléculas de consulta fazem parte da extensa classe de substâncias naturais bioativas dos polifenóis. Tal fato possibilita explicar os resultados em comum obtidos pelas diferentes moléculas de consulta. As estruturas de referência também possuem pelo menos um núcleo em comum com a respectiva molécula de consulta, o que proporcionou a possibilidade de apresentarem considerável similaridade química e serem selecionadas pelo servidor. Além disso, essa semelhança química permite que as moléculas de consultas apresentem potencial atividade sobre os alvos selecionados.

Tabela 21 - Potenciais alvos para os ácidos cafeico, *p*-cumárico e *trans*-ferúlico obtidos pelo servidor ChemProt 2.0. Ki (nM)

Alvo	Estrutura base		
	Ácido cafeico	Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido <i>trans</i> -ferúlico
Aldose redutase	 <p>Ácido protocatecuico (CT = 0,95; Ki = 42,70)</p>	-	 <p>Ácido siríngico (CT = 0,88; Ki = 41,50)</p>
Receptor de fator de crescimento epidérmico	 <p>Ácido 2,5-dihidroxistirilcarbâmico (CT = 0,90; Ki = 8,00)</p>	 <p>Ácido <i>p</i>-hidroxibenzóico (CT = 0,94; Ki = 10,00)</p>	 <p>Metil 2,5-dihidroxicinamato (CT = 0,96; Ki = 20,00)</p>
Enzima conversora de angiotensina	 <p>Ácido gálico (CT = 0,87; Ki = 7,70)</p>	-	-

Anidrase carbônica 9	 Ácido <i>o</i> -cumárico (CT = 0,86; Ki = 1,00)	 Ácido <i>o</i> -cumárico (CT = 0,89; Ki = 1,00)	-
Anidrase carbônica 12	 Ácido <i>o</i> -cumárico (CT = 0,86; Ki = 1,00)	 Ácido <i>o</i> -cumárico (CT = 0,89; Ki = 1,00)	 Metil 3,4-dihidroxi benzoato (CT = 0,88; Ki = 67,00)
Succinato-semialdeido desidrogenase	-	 Ácido <i>p</i> -hidroxi benzoico (CT = 0,94; Ki = 1,00)	-
Anidrase carbônica 13	-	 Ácido <i>o</i> -cumárico (CT = 0,89; Ki = 1,00)	-

Anidrase carbônica 2	-	-	 <p>Ácido siríngico (CT = 0,88; Ki = 319,00)</p>
Anidrase carbônica 1	-	-	 <p>Ácido siríngico (CT = 0,88; Ki = 41,50)</p>

4.3.1.2 Acomplamento molecular

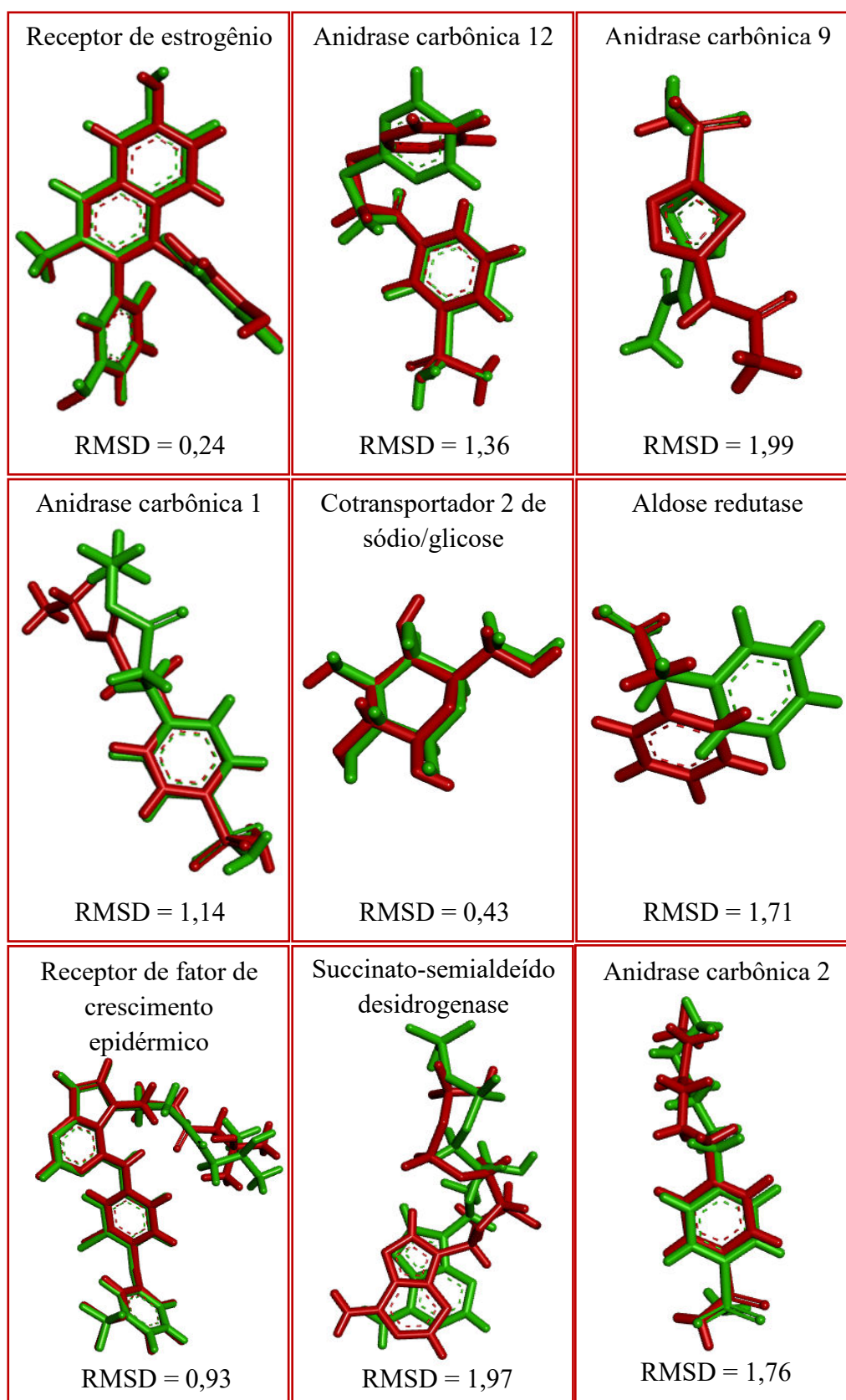
O servidor ChemProt utiliza informações baseadas em características de ligantes, com o intuito de avaliar a afinidade dos compostos estudados com os respectivos alvos moleculares selecionados, procedeu-se a etapa dos estudos de acoplamento molecular. Inicialmente as proteínas foram identificadas no *Protein Data Bank* (PDB), considerando os parâmetros estabelecidos na metodologia, as proteínas selecionadas estão apresentadas na tabela 22.

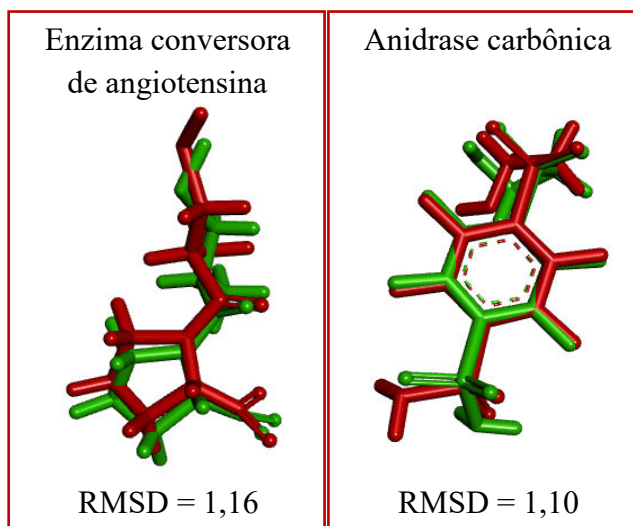
Tabela 22 - Proteínas selecionadas no PDB

Proteína	PDB ID	Resolução (Å)	Referência
Receptor de estrogênio	3DT3	2,40	Fang et al, 2008
Anidrase carbônica 12	4KP8	1,80	C̄apkauskaite et al, 2013
Anidrase carbônica 9	3IAI	2,20	Alterio et al, 2009
Anidrase carbônica 1	2NN7	1,85	Srivastava et al, 2007
Cotransportador 2 de sódio/glicose	3DH4	2,70	Faham et al, 2008
Aldose redutase	2INE	1,90	Brownlee et al, 2006
Receptor de fator de crescimento epidérmico	3POZ	1,50	Aertgeerts et al, 2011
Enzima conversora de angiotensina	1UZF	2,00	Natesh et al, 2004
Succinato-semialdeido desidrogenase	2W8Q	2,40	Kim et al, 2009
Anidrase carbônica 13	4HU1	1,95	Dudutiene et al, 2013
Anidrase carbônica 2	5EKH	1,34	Wang et al, 2016

Para avaliação dos parâmetros definidos no acoplamento molecular foi utilizado o cálculo do *Root Mean Square Deviation* (RMSD) foi utilizado para determinar o quanto de desvio foi observado a partir da conformação original do ligante após a realização do reacoplamento. A Figura 49 mostra os valores de RMSD para cada alvo selecionado.

Figura 48 - Valores de RMSD (Å) após o reacoplamento de cada alvo selecionado pelo ChemProt 2.0. Configuração cristalográfica em vermelho e ligante após reacoplamento em verde





Observa-se que todos os reacoplamentos foram realizados de forma adequada, como pode ser observado pelos valores de RMSD obtidos dentro do parâmetro definido na metodologia, com isso a pose gerada pelo DOCK 6.7 não se distanciou ($\text{RMSD} > 2 \text{ \AA}$) da pose cristalográfica

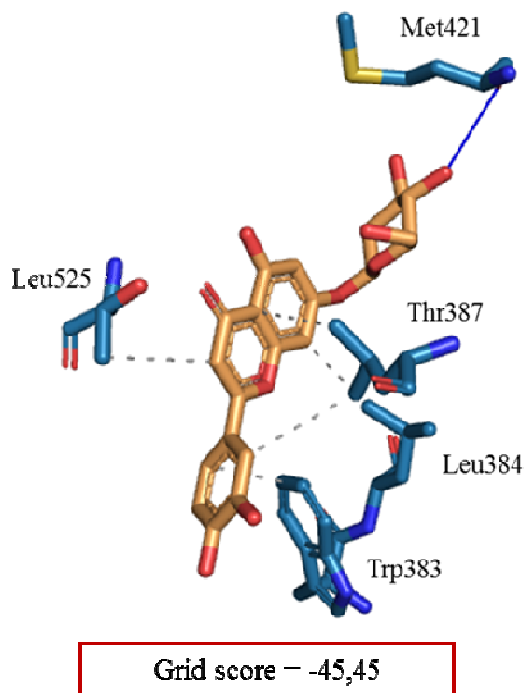
4.3.1.2.1 Receptor de estrogênio

Os receptores de estrogênio (RE) são membros da superfamília de receptores nucleares modulados por ligantes que medeiam as ações de hormônios esteroides, vitamina D, retinoides, e hormônios da tireoide. Estrogênios que ocorrem naturalmente, tais como 17β -estradiol, têm sido utilizados na terapia de substituição hormonal (TSH) por mulheres pós-menopáusicas, para o tratamento da osteoporose. Embora TSH seja eficaz, ela tem sido associada a risco aumentado de doenças cardiovasculares e de câncer da mama. Moduladores seletivos do receptor de estrogênio (MSREs) são classe de agentes terapêuticos que proporcionam o benefício do estrogênio, limitando algumas deficiências associadas. A sua seletividade tecidual permite que eles atuem como agonistas do estrogênio em alguns tecidos, e como antagonista em outros. A utilidade clínica dos MSREs tem sido exemplificada com tamoxifeno, para a prevenção e tratamento do câncer da mama, e do raloxifeno, para a prevenção do câncer da mama e osteoporose pós-menopáusicas em mulheres (FANG et al, 2008).

O acoplamento do flavonoide luteolina-7-*O*-glicosídeo com o RE ocorre através de interações hidrofóbicas com os resíduos Thr347, Trp383, Leu384 e Leu525. Apenas uma interação de hidrogênio foi observada, entre o oxigênio carbonílico do resíduo Met421 e a porção glicosídica da molécula. Todas as outras interações ocorreram com o núcleo

flavonoídico. O anel A faz interação hidrofóbica apenas com o resíduo Leu384. O anel B faz interação do tipo hidrofóbica com os resíduos Thr383 e Leu525. O resíduo Leu525 também interage hidrofobicamente com um dos átomos de carbono que une o anel A ao anel C. O anel C, por sua vez, também faz ligação hidrofóbica com o resíduo Thr347 (Figura 49 e Tabela 25).

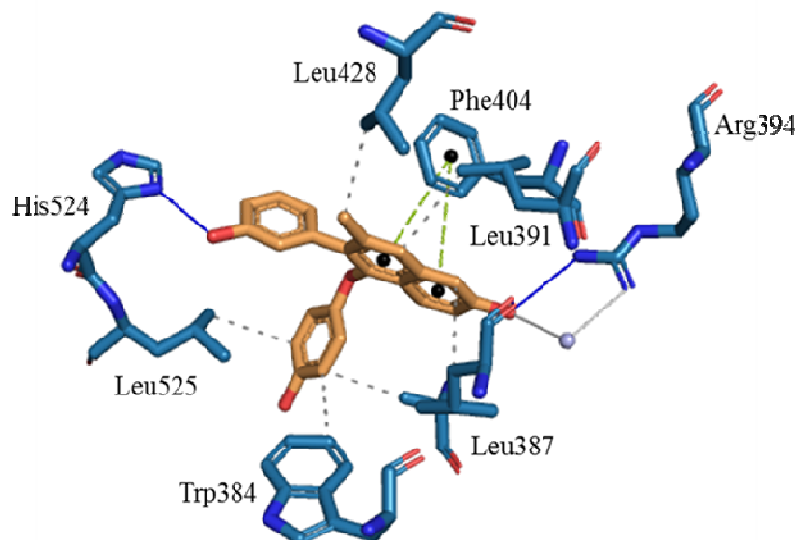
Figura 49 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da luteolina-7-*O*-glicosídeo com RE. Proteína: azul, luteolina-7-*O*-glicosídeo: laranja, ligações hidrofóbicas: barra cinza, interações de hidrogênio: barra azul



Série de ligantes dos REs derivados do naftaleno tem sido reportada. Nesse interim, Fang e colaboradores (2008) trabalharam com a estrutura cristalográfica por raio-X do análogo do naftaleno, 5-(4-hidroxifenoxi)-6-(3-hidroxifenil)-7-metil-naftalen-2-ol (369), acoplado ao RE. Eles observaram que o sítio de ligação é formado pelos resíduos Glu353, Arg394, Leu428, Phe425 e Met388. Além disso, eles verificaram a importância de interações de hidrogênio com os resíduos Glu353, Arg394 e His524.

A análise do perfil de interação pelo servidor PLIP com o ligante obtido pelo código PDB 3DT3 mostrou-se semelhante ao apresentado pelos autores citados (Figura 50). As diferenças observadas encontram-se em outras interações não citadas/observadas pelos mesmos.

Figura 50 - Perfil de interação do ligante 369 com RE. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações de hidrogênio: barras azuis, interações π -paralelas: barras tracejadas verdes



Apenas os dois flavonoides identificados foram avaliados com o receptor de estrogênio. Porém, com a submissão no programa DOCK 6.7, não foi possível acoplar a rutina à esse alvo. O acoplamento molecular da luteolina-7-*O*-glicosídeo, apesar de ocorrer no mesmo sítio de ligação do ligante 369, apresenta interações com resíduos diferentes do mesmo. Todas interações podem ser observadas na Tabela 23. Os resultados obtidos através do cálculo de acoplamento molecular (GRID score) corroboram com os perfis de interação obtidos, onde o ligante apresentou resultado superior, Grid score = -65,77.

Tabela 23 - Perfil de interação com o alvo Receptor de estrogênio

Fang et al (2008)	Ligante (369)	Luteolina-7- <i>O</i> -glicosídeo
	Interações hidrofóbicas	
Ala350	Ala350	Thr347
	Trp383	Trp383
		Leu384

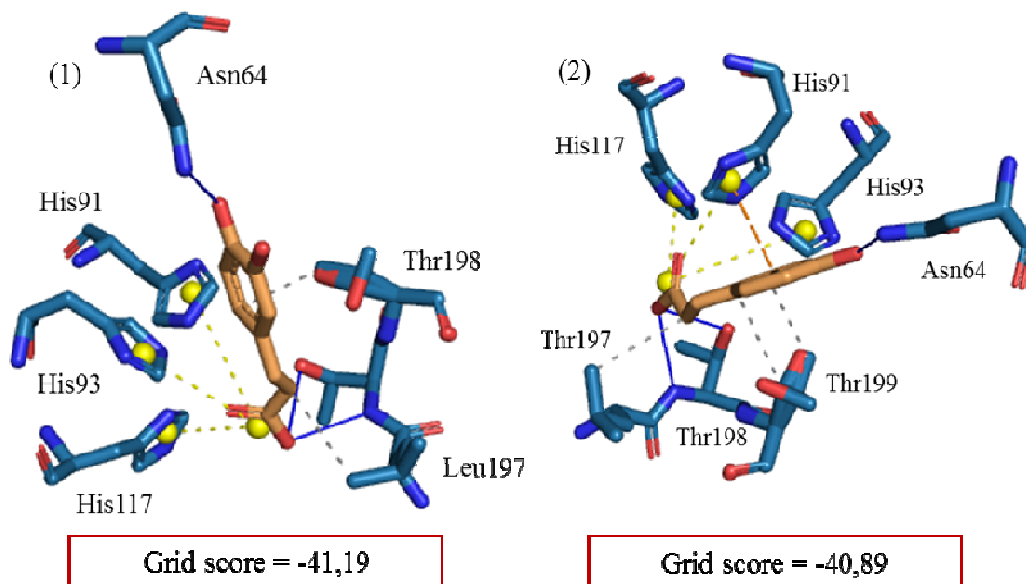
	Leu387	
Leu391	Leu391	
	Leu428	
Leu525	Leu525	Leu525 (2x)
Ligações aceptoras de hidrogênio		
Arg394	Arg394	
Ligações doadoras de hidrogênio		
Glu353		
	Leu387	
		Met421
His524	His524	
Interações π-paralelas		
Phe404 (tipo T)	Phe404 (2x) (tipo T)	

4.3.1.2.2 Anidrase carbônica 12

Estudos mostram que a anidrase carbônica 12 (AC 12) está relacionada a problemas de hipercloridrose (eliminação de cloreto em excesso pelo suor) e hipóxia, indicativo de fibrose cística e conjunção com várias desordens metabólicas, endócrinas e dermatológicas (FEINSTEIN et al, 2014; FELDSHTEIN et al, 2010).

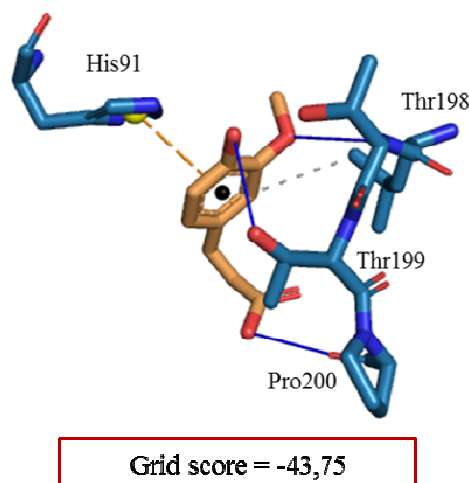
O perfil de interação dos ácidos caféico e *p*-cumárico com o alvo AC 12 ocorrem de forma similar. Apresentam interações hidrofóbicas com os resíduos Leu197 e Thr199. A primeira interação ocorre com o carbono- α da cadeia lateral do ácido e a metila terminal do aminoácido, enquanto que a segunda ocorre com C6 do anel aromático e a metila do aminoácido. Interação de hidrogênio ocorre com a amida terminal do resíduo Asn64 a o átomo de O da hidroxila em C4. As outras ligações de hidrogênio ocorrem com a hidroxila de a amina do resíduo Thr198 e a hidroxila do grupo carboxílico do ácido. Três pontes salinas também são observadas, todas elas ocorrem entre o anel imidazol do resíduo de histidina (His91 e His93) e o grupamento carboxílico dos ácidos fenólicos. O ácido *p*-cumárico apresenta como única diferença interação do tipo π -cátion entre o seu anel aromático e o anel imidazol do resíduo His91 (Figura 51).

Figura 51 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação dos ácidos cafeico (1) e *p*-cumárico (2) com AC 12. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações de hidrogênio: barras azuis, pontes salinas: barras pontilhadas amarelas, interações π -cátion: barras tracejadas laranja



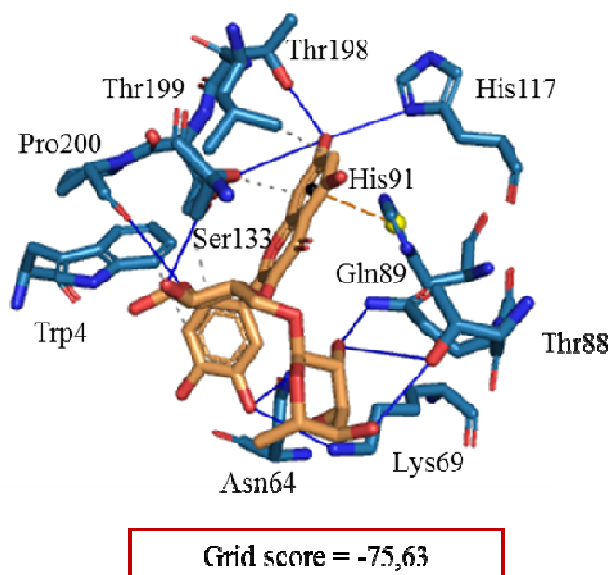
O ácido *trans*-ferúlico interage com a enzima AC 12 através de interação hidrofóbica entre o resíduo Leu197 e o anel do ácido. As interações de hidrogênio ocorrem entre a amina do resíduo Thr198 e o átomo de oxigênio do grupo metoxila do ácido, entre o oxigênio da hidroxila de Thr199 e o oxigênio da hidroxila em C4, e entre o oxigênio carbonílico de Pro200 e a hidroxila carbonílica da molécula. Observa-se ainda interação π -cátion entre o anel imidazol de His91 e o anel aromático do ácido *trans*-ferúlico (Figura 52).

Figura 52 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *trans*-ferúlico com AC 12. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações de hidrogênio: barras azuis, interações π -cátion: barras tracejadas laranja



O flavonoide rutina, por sua vez, interage com o alvo em questão através de interações hidrofóbicas com os resíduos Trp4, Leu197 e Thr199. Diversas ligações de hidrogênio foram observadas: o átomo de oxigênio do grupo hidroxila em C5' interage com o átomo de nitrogênio da amida terminal do resíduo Asn64 e com o átomo de nitrogênio da amina terminal de Lys69; a porção glicosídica interage com os resíduos Thr88 (-OH), Ser133 (-OH), Gln89 (-NH₂) e Pro200 (-C=O). O átomo de oxigênio da hidroxila em C7 interage com o átomo de nitrogênio (N1) do anel imidazol de His117, e com os átomos de oxigênio das hidroxilas de Thr198 e Thr199. Além disso, observa-se interação π -cátion entre o anel A do núcleo flavonoídico e a anel imidazol de His91 (Figura 53).

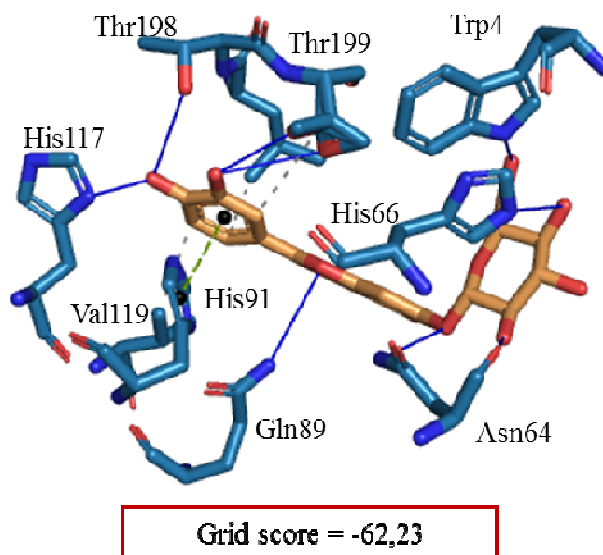
Figura 53 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da rutina com AC 12. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações de hidrogênio: barras azuis, interações π -cátion: barras tracejadas laranja



A última molécula de consulta submetida ao acoplamento molecular com o alvo AC 12, o flavonoide luteolina-7-*O*-glicosídeo, apresentou interações hidrofóbicas com os resíduos Val119, Leu197 e Thr199, todas com o anel B do núcleo flavonoídico. As ligações de hidrogênio que ocorrem com a porção glicosilada foram observadas com o átomo de nitrogênio do núcleo indol do resíduo Trp4, com o átomo de nitrogênio (N3) do núcleo imidazol de His66 e com o átomo de nitrogênio da amina de Asn64. O átomo de nitrogênio da amida terminal desse mesmo resíduo faz ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio que liga a porção glicosilada e o núcleo flavonoídico. Outras ligações de hidrogênio ocorrem entre o átomo de oxigênio do anel C do núcleo flavonoídico e a amida terminal de Gln89; entre o oxigênio da hidroxila em C4' e o átomo de nitrogênio (N1) de His117 e o oxigênio da

hidroxila de Thr198; entre o oxigênio da hidroxila em C3' e o grupo carboxila de Thr199. Por fim, observa-se interação π -paralela do tipo T entre o anel B do flavonoide e o anel imidazol de His91 (Figura 54).

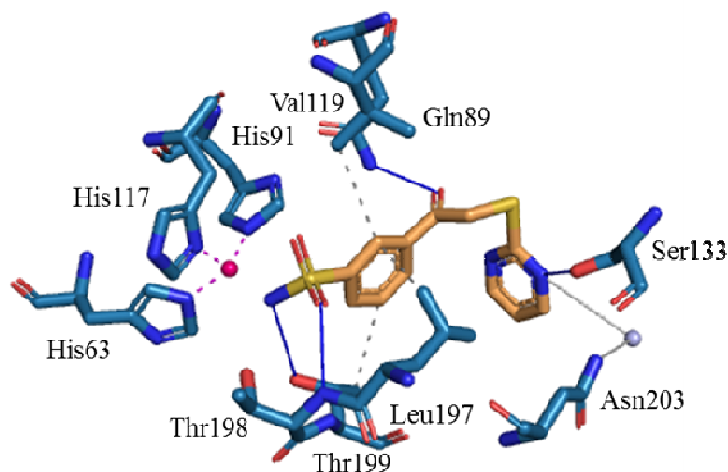
Figura 54 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da luteolina-7-*O*-glicosídeo com AC 12. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações de hidrogênio: barras azuis, interações π -paralelas: barras tracejadas verde



Capkauskaitė e colaboradores (2013) avaliaram dois grupos de derivados de benzenossulfonamida, tendo porções de pirimidina, como inibidores de seis isoformas recombinantes humanas de anidrase carbônica (AC I, II, VI, VII, XII, XIII). Ao acoplar o ligante 3-[(piridin-2-il -sulfonil) acetil] benzenossulfonamida (E1G), observaram que eles se ligavam no sítio de ligação formado pelo aminoácidos Gln89, His91, His93, Val119, Leu197, Thr198, Pro201 e Ser133, sendo que este último favorece a interação ligante-alvo através de ligação de hidrogênio.

Através da análise pelo servidor PLIP, observa-se semelhança no perfil de interação. As semelhanças encontram-se nos aminoácidos Val119, Leu197 e Ser133, sendo esta última a de maior destaque. Outras cinco interações diferenciam-se entre ambos perfis (Figura 55).

Figura 55 - Perfil de interação do ligante E1G com AC 12. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações de hidrogênio: barras azuis, interações de hidrogênio mediada por água: barras cinza, complexo com metal: barra pontilhada magenta



Avaliando o perfil de interação entre as moléculas de consulta, nota-se que todas encontram-se no sítio de ligação do alvo, na região entre Gln89, His91, His93, Val119, Leu197, Thr198, Pro201, porém o perfil de interação é diferente do observado no acoplamento do derivado de benzossulfonamida.

O ácido cafeico interage de forma semelhante com o derivado de benzossulfonamida apenas através de interação hidrofóbica com Leu197. Não apresenta ligação de hidrogênio com Ser133, porém apresenta ligação semelhante com Thr198. Além disso, apresenta interação do tipo ponte salina com os aminoácidos His91, His93 e His117, todos fazendo parte do sítio de ligação. O ácido *p*-cumárico apresenta perfil de interação semelhante com a ácido cafeico, diferindo apenas de interação π -cátion adicional com His91. O ácido *trans*-ferúlico, por sua vez, foi o que apresentou perfil de interação com maior diferença quando comparado com o ligante.

Os flavonoides rutina e luteolina-7-*O*-glicosídeo apresentaram maior número de interações, mesmo quando comparado com o derivado de benzossulfonamida. Contudo, o perfil também apresentou algumas diferenças, principalmente no que diz respeito ao tipo de ligações feitas no sítio de ligação. Enquanto que para o derivado de benzossulfonamida a maioria das ligações era do tipo hidrofóbica, com exceção da Ser133, para os flavonoides, com os mesmos aminoácidos, diferentes tipos de ligações foram formadas, principalmente ligações de hidrogênio.

Para a rutina, apenas a interação hidrofóbica com Leu197 foi semelhante ao derivado de benzossulfonamida. Esse flavonoide fez ligação de hidrogênio com Gln89 e Thr198, e ligação π -cátion com His91, diferente das interações hidrofóbicas obtidas com o ligante com

esses mesmos aminoácidos. Outra interação que merece destaque é a ligação doadora de hidrogênio com Ser133 apresentada pela rutina, diferindo do ligante, pois este faz ligação de hidrogênio do tipo aceptora. Vale ressaltar, que apenas a rutina apresentou algum tipo de interação com Ser133, a qual é importante para a orientação da ligação com a anidrase carbônica 12 (C̄apkauskaite et al, 2013). Esse flavonoide ainda apresentou nove ligações a mais que o ligante, com diferentes aminoácidos.

A luteolina-7-*O*-glicosídeo apresentou perfil semelhante com a rutina, porém com três ligações a menos e algumas com diferentes aminoácidos. Esse flavonoide não apresentou ligação com Ser133, porém apresentou interação hidrofóbica com Leu197 e Val119, ambas apresentadas pelo derivado de benzossulfonamida.

Pode-se observar que o alvo anidrase carbônica 12 foi selecionado para todas as substâncias identificadas (Figura 56) e os respectivos perfis de interação são mostrados na Tabela 24, na qual também pode-se observar o perfil de interação do alvo com o ligante apresentado pelo artigo levantado através do código PDB 4KP8 (CAPKAUSKAITE et al, 2013), bem como o obtido através da submissão do respectivo código PDB no servidor PLIP.

Figura 56 - Estrutura do (A) ligante E1G, (B) ácido cafeico, (C) ácido *p*-cumárico, (D) ácido *trans*-ferúlico, (E) rutina e (F) luteolina-7-*O*-glicosídeo

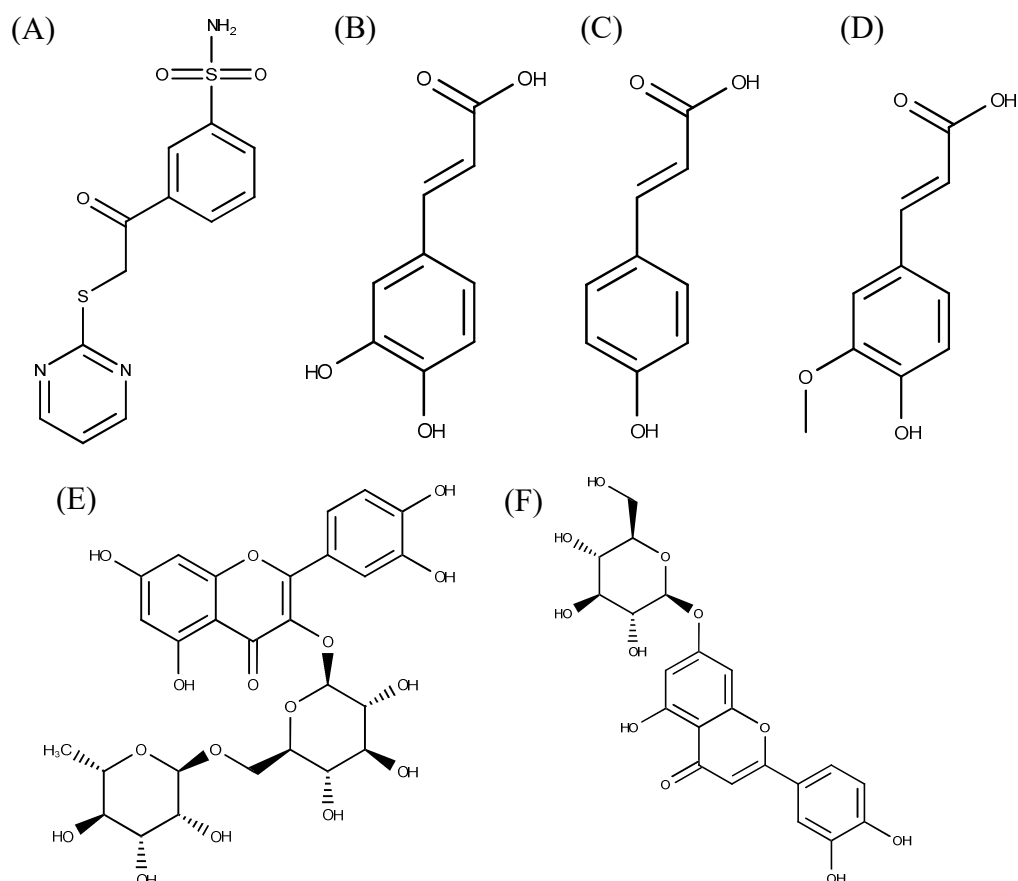


Tabela 24 - Perfil de interação com o alvo Anidrase carbônica 12

Capkauskaite et al (2013)	Ligante (E1G)	Ácido cafeico	Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido <i>trans</i> -ferúlico	Rutina	Luteolina-7-O-glicosídeo
Interações hidrofóbicas						
					Trp4	
Gln89						
His91						
His93						
Val119	Val119					Val119
Leu197	Leu197	Leu197	Leu197	Leu197	Leu197	Leu197
Thr198						
	Thr199	Thr199	Thr199 (2x)		Thr199 (2x)	Thr199
Pro201						
Ligaçõesceptoras de hidrogênio						
						Trp4
		Asn64	Asn64		Asn64	Asn64
					Lys69	
					Thr88	
	Gln89				Gln89	Gln89
					His117	His117
Ser133	Ser133					
	Thr198	Thr198 (2x)	Thr198 (2x)	Thr198	Thr198	Thr198
					Thr199 (2x)	Thr199 (2x)
Ligaçõesdoadoras de hidrogênio						
						Asn64
						His66
					Thr88	
					Ser133	
	Thr198					
				Thr199	Thr199	Thr199
				Pro200	Pro200	
Ligaçõesceptoras de hidrogênio através de pontes de água						
	Asn203					
Interações π-cátion						
		His91	His91	His91	His91	
Ligações π-paralelas						
						His91 (tipo T)
Pontes salina						
		His91	His91			
		His93	His93			
		His117	His117			

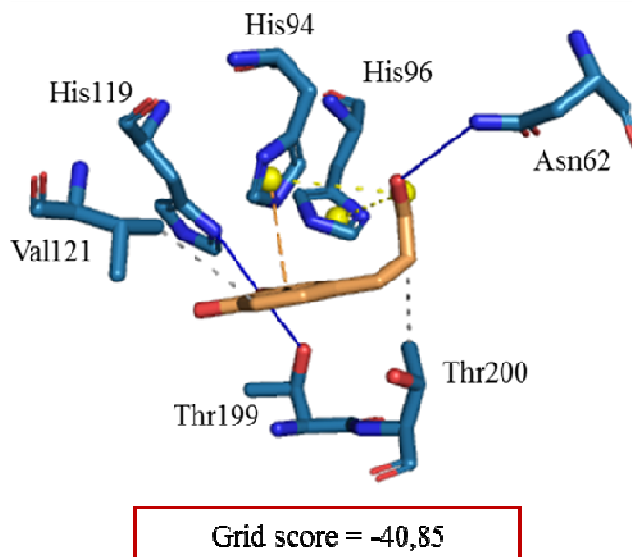
Nos resultados de GRID score a rutina apresentou melhor resultado entre todas as moléculas testadas, seguida do ligante (Grid score = -68,33) e da luteolina-7-*O*-glicosídeo. Os ácidos fenólicos apresentaram resultados inferiores, principalmente o ácido *p*-cumárico.

4.3.1.2.3 Anidrase carbônica 9

A anidrase carbônica 9 é uma proteína trans-membrânica e é apenas uma das duas isoenzimas da anidrase carbônica (AC) associados a tumores conhecidos, incluindo os malignos de mama. Ela é expressa em todos os carcinoma das células renais, mas não é detectado no rim normal ou na maioria dos outros tecidos normais. A expressão específica de tumor de CAIX e sua associação com a progressão do câncer, juntamente com baixa eficiência do tratamento levou ao interesse em alvejar esta enzima para terapia de câncer (CHEN et al, 2010; DUDEK et al, 2010; GILBERT et al, 2006; KRISTIENSEN et al, 2010; LOU et al 2011).

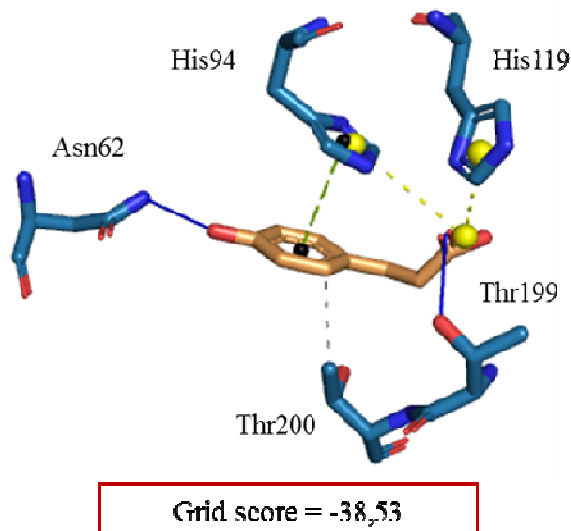
O ácido cafeico interage com o alvo AC 9 através de interações hidrofóbicas com os resíduos Val121 e Thr200, com a anel aromático e com a cadeia lateral da molécula, respectivamente. As ligações de hidrogênio ocorrem entre o átomo de oxigênio da hidroxila carbonílica da molécula e o átomo de nitrogênio da amida terminal do resíduo Asn62; e entre o átomo de oxigênio da hidroxila do C3 e o átomo de nitrogênio N1 do anel imidazol de His119 e o átomo de oxigênio da hidroxila de Thr199. Observa-se interação π -cátion entre o anel aromático do ácido e o anel imidazol do resíduo His94. O grupo carboxílico da molécula interage através de ponte salina com esse mesmo resíduo e com o anel imidazol de His96 (Figura 57).

Figura 57 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido cafeico com AC 9. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações de hidrogênio: barras azuis, interações π -cátion: barras tracejadas laranja, pontes salinas: barras pontilhadas amarela



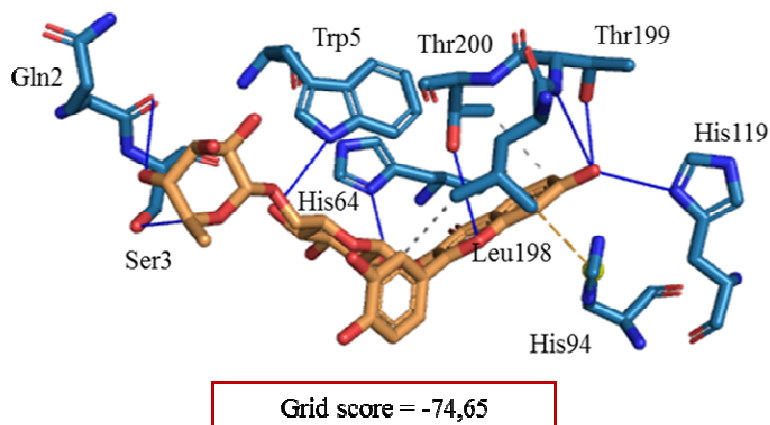
O ácido *p*-cumárico interage com o mesmo alvo através de ligações hidrofóbicas apenas com o resíduo Thr200 e o anel aromático da molécula. As ligações de hidrogênio ocorrem entre o átomo de oxigênio da hidroxila na posição C3 do ácido e o átomo de nitrogênio da amida terminal de Asn62; e entre o átomo de oxigênio carbonílico e o átomo de oxigênio da hidroxila de Thr199. Interações π -paralela (tipo P) e ponte salina são observadas entre o anel imidazol de His94 e o anel aromático e o grupo carboxílico do ácido, respectivamente. Outra ponte salina é observada entre o anel imidazol de His119 e o grupo carboxílico do ácido (Figura 58).

Figura 58 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *p*-cumárico com AC 9. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações de hidrogênio: barras azuis, interações π -paralela: barras tracejadas verde, pontes salinas: barras pontilhadas amarela



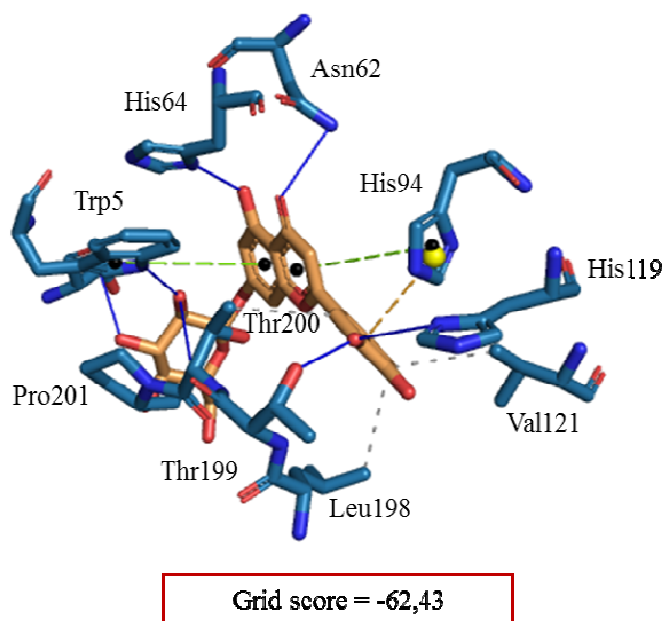
A interação entre a rutina e o alvo AC 9 ocorre através das ligações hidrofóbicas entre o anel A e B do núcleo flavonoídico e os resíduo Thr200 e Leu198, respectivamente. Observa-se interação π -cátion entre o anel flavonoídico A e o anel imidazol de His94. Várias interações de hidrogênio também são observadas. A porção glicosídica faz ligações de hidrogênio com os resíduos His64, Trp5, Ser3 e Gln2. O átomo de oxigênio da hidroxila C7 do flavonoide faz ligações de hidrogênio com o átomo de nitrogênio N1 do anel imidazol de His119, com o grupo hidroxílico e amina de Thr199. O grupo hidroxílico de Thr200 faz ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio do anel C flavonoídico (Figura 59).

Figura 59 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da rutina com AC 9. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações de hidrogênio: barras azuis, interações π -cátion: barras tracejadas laranja



Por fim, no acoplamento da luteolina-7-*O*-glicosídeo com o alvo AC 9 pode-se observar interações hidrofóbicas entre o anel flavonoídico C e os resíduos Val121, Leu198 e Thr200. As ligações de hidrogênio que ocorrem na porção glicosídica são com os resíduos Ser3, Trp5 e Pro201. O anel pirrol do resíduo Trp5 também faz interação π -paralela (tipo T) com o anel A do núcleo flavonoídico. Interação π -paralela e π -cátion ocorrem com o anel imidazol de His94 e o anel C e B da luteolina-7-*O*-glicosídeo, respectivamente. O átomo de oxigênio da hidroxila em C5 do anel A do flavonoide faz interação de hidrogênio com o átomo N1 do núcleo imidazol de His64. O oxigênio carbonílico do anel C faz ligação de hidrogênio com o nitrogênio da amida terminal de Asn62. Duas interações de hidrogênio podem ser observadas com o átomo de oxigênio da hidroxila em C5', com o átomo N1 do núcleo imidazol de His119 e com o grupo hidroxila de Thr199 (Figura 60).

Figura 60 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da luteolina-7-*O*-glicosídeo com AC 9. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações de hidrogênio: barras azuis, interações π -paralela



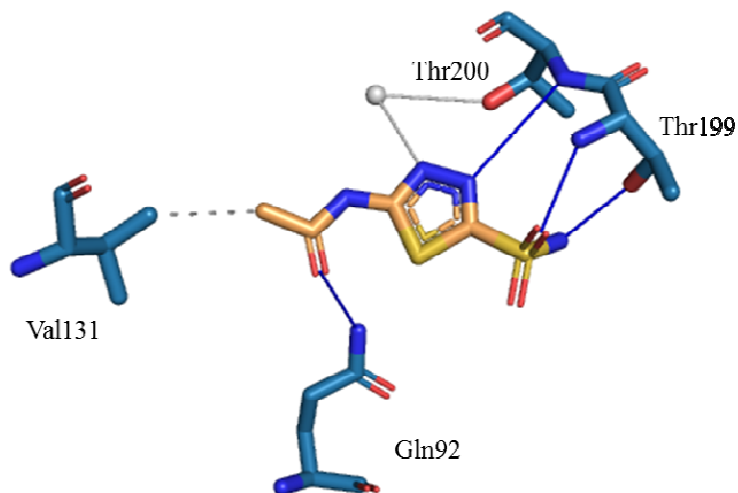
Alterio e colaboradores (2009) relatam a estrutura de raio-X do domínio catalítico de AC 9 complexado com um inibidor sulfonamida clássico, utilizado clinicamente, acetazolamida. A estrutura revela uma típica dobra α , que difere significativamente das outras isoenzimas de AC quando a estrutura proteica quaternária é considerada.

Tal como observado na estrutura de outras isoenzimas α -AC, o sítio ativo AC IX é localizado em grande cavidade cônica, que se estende a partir da superfície para o centro da proteína. O íon de zinco situa-se na parte inferior desta cavidade. Duas regiões distintas feitas de aminoácidos hidrofóbicos ou hidrofílicos delimitam o sítio ativo. Em particular, Leu91,

Val121, Val131, Leu135, Leu141, Val143, Leu198 e Pro202 definem a região hidrofóbica, enquanto a Asn62, His64, Ser65, Gln67, Thr69, e Gln92 identificam a região hidrofílica. A molécula de acetazolamida (AZM) acopla dentro do sítio ativo através de interações hidrofóbicas com Val121, Val131 e Leu198, e ligações de hidrogênio com Thr199, Thr200, Gln92 e Thr199.

Comparando-se o resultado obtido para o ligante AZM pelo servidor PLIP com o resultado apresentado pelo artigo de Alterio e colaboradores (2009), pôde-se observar semelhança em quase todas as interações, sendo que no primeiro houveram menor número de interações hidrofóbicas, apenas com Val131. Os ácidos cafeico e *p*-cumárico foram acoplados no mesmo sítio de ligação do ligante AZM, porém apresentando algumas diferenças no perfil de interação. O primeiro apresentou interações com Val121, Thr200, Asn62, His119, Thr199, His94 e His96, já o segundo só não apresentou interação com Val121 e His96 (Figura 61).

Figura 61 - Perfil de interação do ligante AZM com AC 9. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, interações de hidrogênio: barras azul, interações de hidrogênio mediada por água: barras cinza

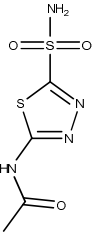
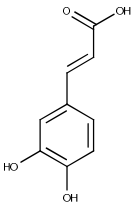
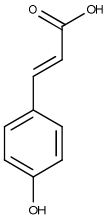
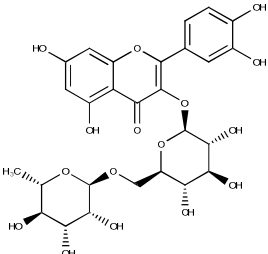
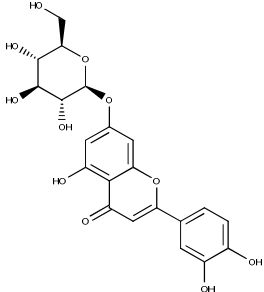


Quanto aos flavonoides rutina e luteolina-7-*O*-glicosídeo, também acoplaram no mesmo sítio de ligação que o ligante AZM, porém com perfis de interação bastante diferentes. A rutina apresentou interações idênticas a AZM somente com Leu198 e Thr199, e a luteolina-7-*O*-glicosídeo, além desses também apresentou interação com Val121. Quanto ao GRID score, observa-se que os flavonoides apresentaram melhores resultados do que o ligante AZM (Grid score = -55,10). Os ácidos fenólicos, por outro lado, apresentaram resultados inferiores.

A Tabela 25 lista as interações entre a anidrase carbônica 9 e o ligante apresentado pelo artigo levantado através do código PDB 3IAI (ALTERIO et al, 2009), bem como o

obtido através da submissão do respectivo código PDB e dos arquivos de acoplamento alvo-moléculas de consulta no servidor PLIP.

Tabela 25 - Perfil de interação com o alvo Anidrase carbônica 9

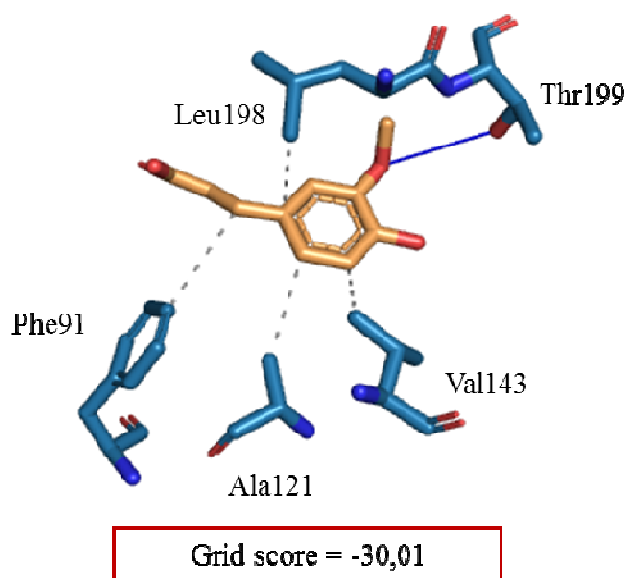
Alterio et al (2009)	Ligante (AZM)	Ácido cafeico	Ácido <i>p</i> -cumárico	Rutina	Luteolina-7- <i>O</i> -glicosídeo
					
Interações hidrofóbicas					
Val121		Val121			Val121
Val131	Val131				
Leu198				Leu198	Leu198
		Thr200	Thr200	Thr200	Thr200
Ligaçõesceptoras de hidrogênio					
				Ser3	
				Trp5	Trp5
		Asn62	Asn62		Asn62
				His64	His64
	Gln92				
		His119		His119	His119
Thr199	Thr199	Thr199	Thr199	Thr199 (2x)	
Thr200	Thr200				
Ligações doadoras de hidrogênio					
				Gln2	
					Ser3
Gln92					
Thr199	Thr199				
					Pro201
Ligaçõesceptoras de hidrogênio através de pontes de água					
	Thr200				
Interações π-cátion					
		His94		His94	His94
Ligações π-paralelas					
					Trp5 (tipo T)
			His94 (tipo P)		His94 (tipo T)
Pontes salina					
		His94	His94		
		His96			
			His119		

4.3.1.2.4 Anidrase carbônica 1

Inibidores da anidrase carbônica 1 (AC 1) estão sendo usados para tratar o glaucoma. O bloqueio desta enzima muda o equilíbrio de líquido nos olhos do paciente para reduzir o acúmulo de fluidos aliviando assim a pressão ocular (MINCIONE; SCOZZAFAVA; SUPURAN, 2007).

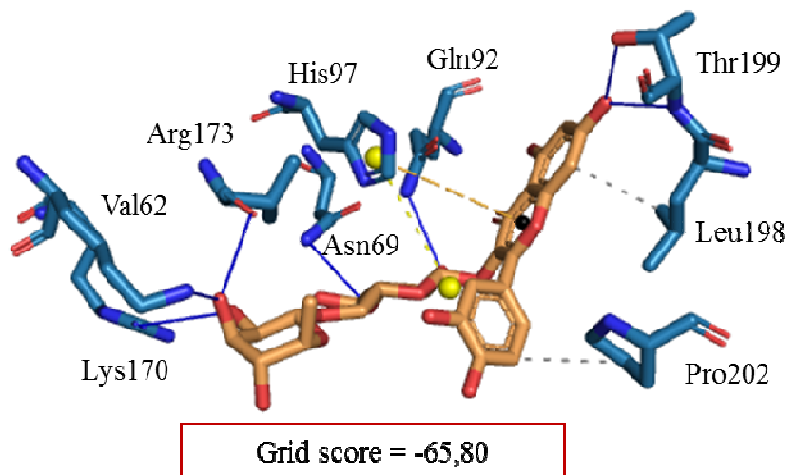
O ácido *trans*-ferúlico, quando acoplado com o alvo AC 1, apresenta interações hidrofóbicas com os resíduos Phe91, Ala121, Val143 e Leu198. Apenas uma ligação de hidrogênio pode ser observada, entre o átomo de oxigênio do grupo metoxila do ácido e o grupo hidroxila do Thr199 (Figura 62).

Figura 62 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *trans*-ferúlico com AC 1. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza



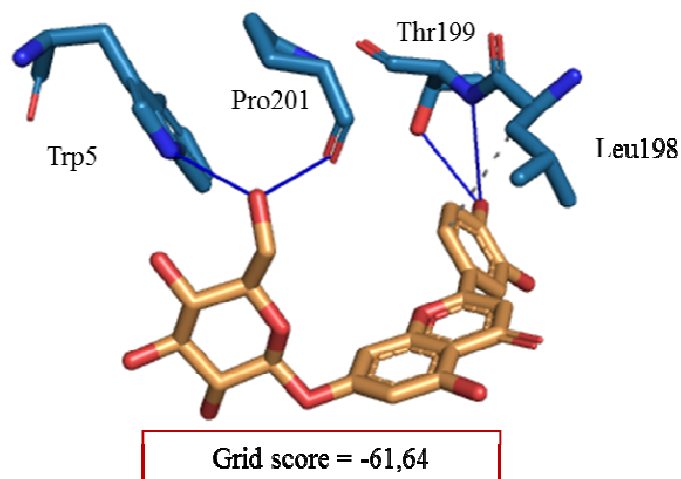
A rutina, por sua vez, interage através de ligações hidrofóbicas entre os anéis do núcleo flavonoídico e os resíduos Leu198 e Pro202. A porção glicosídica faz ligações de hidrogênio com os resíduos Lys170, Val62, Arg173, Asn69 e Gln92, e interação de ponte salina com o núcleo imidazol de His67. Esse mesmo anel do resíduo His67 faz interação π -cátion com o anel B do núcleo flavonoídico. O átomo de oxigênio da hidroxila em C7 (anel A) faz duas ligações de hidrogênio com a hidroxila e amina de Thr199 (Figura 63).

Figura 63 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da rutina com AC 1. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, interações π -cátion: barras tracejadas laranja, pontes salina: barras pontilhadas amarela



A luteolina-7-*O*-glicosídeo faz interação hidrofóbica com esse mesmo alvo através do seu núcleo flavonoídico e o resíduo Leu198. A porção glicosídica faz ligações de hidrogênio com os resíduos Pro201 e Trp5. As outras ligações de hidrogênio ocorrem no anel B e o grupo hidroxila e amina de Thr199 (Figura 64).

Figura 64 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da luteolina-7-*O*-glicosídeo com AC 1. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, interações π -cátion: barras tracejadas laranja, pontes salina: barras pontilhadas amarela

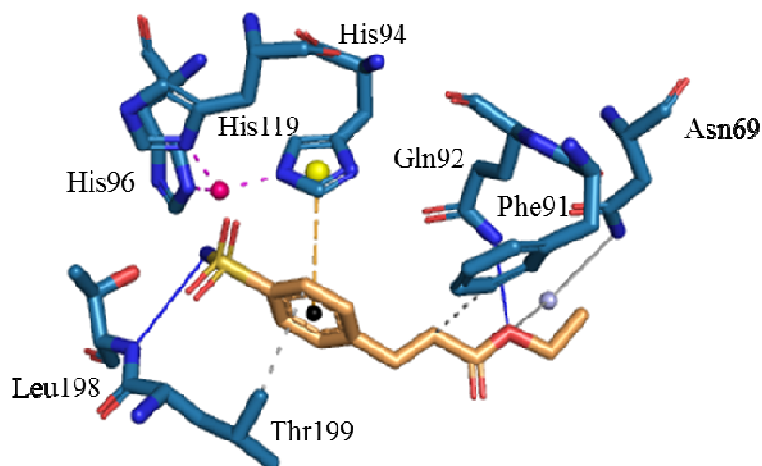


Para explorar a base estrutural do sítio de ligação da anidrase carbônica isoenzima 1 (AC 1), Srivastava e colaboradores (2007) sintetizaram diferentes inibidores de benzenossulfonamida simples substituídos na posição *para* e determinaram as afinidades e estruturas cristalinas de raios-X dos complexos enzimáticos formados. Dentre os inibidores

testados encontra-se o éster etílico de 4-propil benzenossulfonamida (M29). A porção benzenossulfonamida do inibidor liga-se no sítio ativo da seguinte forma: o grupo ionizado NH^- da sulfonamida coordenado pelo Zn^{2+} faz ligação doadora de hidrogênio para o átomo O- γ de Thr199, e um dos átomos de oxigênio da sulfonamida aceita uma ligação de hidrogênio do grupo NH do Thr199. Além disso, o inibidor testado faz ligações de hidrogênio com Gln92 e Phe91, sendo a interação com este último mediada por molécula de água.

Avaliando o resultado obtido para o mesmo ligante, obtido pelo código PDB 2NN7, através do servidor PLIP, observa-se as mesmas interações principais apresentadas pelo artigo de Srivastava e colaboradores (2007), porém com algumas diferenças, principalmente com a presença de interações do tipo hidrofóbica e π -cátion (Figura 66).

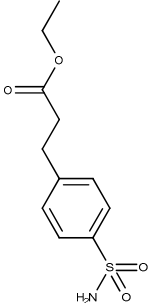
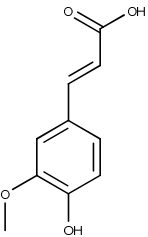
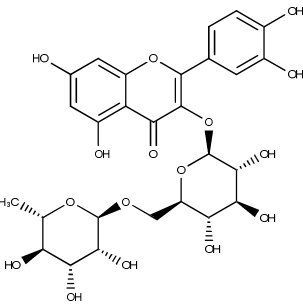
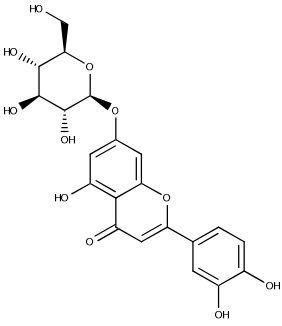
Figura 65 - Perfil de interação do ligante M29 com AC 1. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, interações π -cátion: barras tracejadas laranja, pontes salina: barras pontilhadas amarela



Todas as moléculas de consulta apresentaram a principal ligação com o alvo AC 1, a ligação de hidrogênio com Thr199. Apenas a rutina apresentou a interação com Gln92 citada por Srivastava e colaboradores (2007). Além disso, esse mesmo flavonoide apresentou diversas outras interações, principalmente ligações de hidrogênio, com outros aminoácidos do sítio ativo.

O ácido *trans*-ferúlico apresenta maior número de interações do tipo hidrofóbica, sendo o único dentre as moléculas de consulta que apresentou algum tipo de interação com Phe91, também citada pelos autores em questão. Todos os perfis de interação são apresentados na Tabela 26.

Tabela 26 - Perfil de interação com o alvo Anidrase carbônica 1

Srivastava et al (2007)	Ligante (M29)	Ácido <i>trans</i> -ferúlico	Rutina	Luteolina-7-O-glicosídeo
				
Interações hidrofóbicas				
	Phe91	Phe91		
		Ala121		
		Val143		
	Leu198	Leu198	Leu198	Leu198
			Pro202	
Ligaçõesceptoras de hidrogênio				
				Trp5
			Val62	
			Asn69	
Gln92	Gln92		Gln92	
			Lys170	
			Arg173	
Thr199	Thr199	Thr199	Thr199 (2x)	Thr199 (2x)
Ligações doadoras de hidrogênio				
Thr199				Pro201
Ligaçõesceptoras de hidrogênio através de pontes de água				
	Asn69			
Phe91				
Interações π-cátion				
			His67	
His94				
Pontes salina				
			His67	

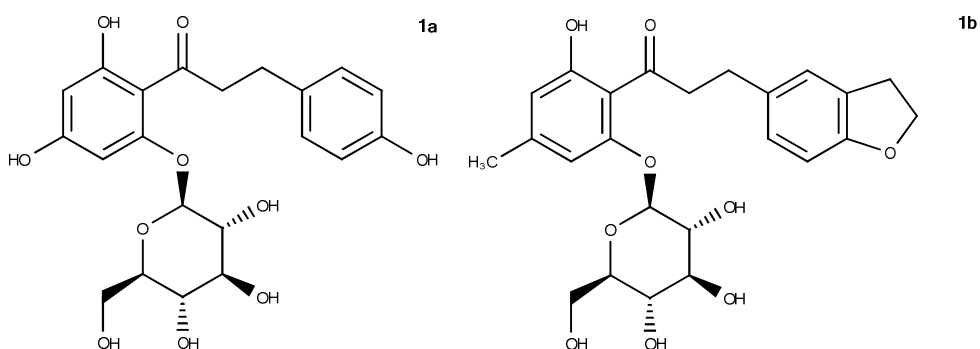
Os resultados de GRID score permitiram observar que o ligante apresentou melhor resultado (Grid score = -67,34), seguido dos flavonoides analisados. O ácido ferúlico analisado apresentou, por sua vez, o pior resultado.

4.3.1.2.5 Cotransportador 2 de sódio/glicose

O ligante relacionado ao Cotransportador 2 de sódio/glicose (CSGL 2) é o que apresenta menor similaridade com a rutina e luteolina-7-*O*-glicosídeo. Mesmo com CT=0,88 pode-se observar diferença estrutural significativa entre ele e os flavonoides em questão. Porém, ambos apresentam núcleos importantes para a ligação com o alvo em questão.

O Phlorizin (Figura 66, 1a) é inibidor específico natural do CSGL. Compostos análogos sintéticos (Figura 66, 1b) desse fármaco tem mostrado inibição tanto do CSGL 1 quanto do CSGL 2. Levando-se em consideração que CSGL 1 tem grande afinidade porém baixa capacidade de transporte, enquanto que o CSGL 2 tem baixa afinidade e alta capacidade de transporte, o CSGL 2 deve produzir aumento terapêuticamente útil da excreção urinária de glicose (DUDASH et al, 2004).

Figura 66 - Estruturas de inibidores de CSGL



Fonte: DUDASH et al, 2004 (adaptada)

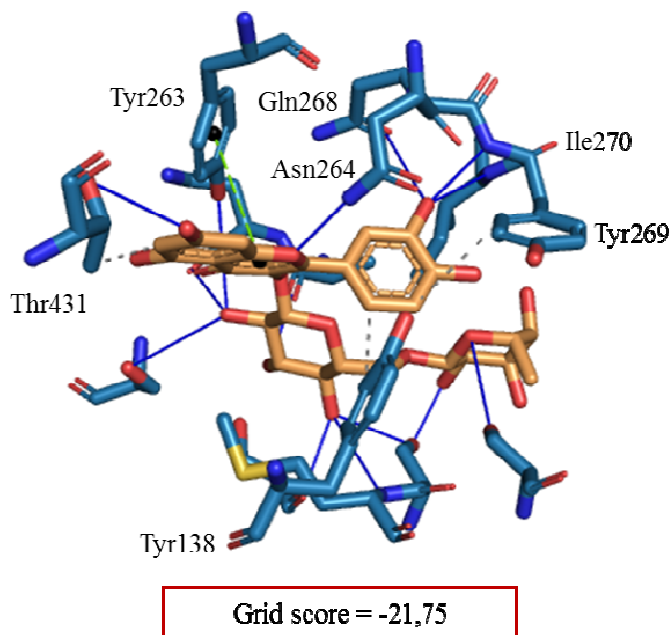
Em estudo feito por Dudash e colaboradores (2004), foi observado a importância de sistemas bicíclicos na estrutura, sendo que análogos de benzodioxano são mais seletivos para a CSGL2 e apresentam a mesma capacidade inibitória do composto 1b. Foi observado também a importância de hidroxilas tanto para formação de ligações doadoras de hidrogênio (através de interações intermoleculares ou intramoleculares) ou para formação de ligações aceitadoras de hidrogênio. Comparando com os flavonoides rutina e luteolina-7-*O*-glicosídeo, pode-se observar que as mesmas apresentam tais características, podendo ser potenciais inibidoras de CSGL 2.

O aumento da excreção de glicose através da inibição de cotransportador de sódio/glicose tem vantagens potenciais. Inibidores desse receptor, através do aumento da excreção de glicose, diminuem as concentrações de glicose no plasma e têm o benefício

adicional de reduzir o peso corporal. Além disso, o mecanismo de ação não dependem da presença de insulina (VALENTINE et al, 2012). Drogas tem sido testadas nesse alvo para o tratamento de diabetes do tipo II (FAHAM et al, 2008).

Dentre as moléculas de consulta testadas frente a esse alvo, a rutina apresentou interações hidrofóbicas entre seu núcleo flavonoídico e os resíduos Tyr138, Tyr269 e Thr431. O anel C desse núcleo apresenta interação π -paralela (tipo T) com o anel aroâmático do resíduo Tyr263. Várias ligações de hidrogênio são observadas. O anel A interage através de ligação de hidrogênio com o grupo hidroxila de Thr431. No anel C observa-se mesmo tipo de interação entre o átomo de oxigênio e e o nitrogênio da amida terminal de Asn264. No anel B, por sua vez, apresenta ligações de hidrogênio entre a hidroxila em C3' e três resíduos: com as aminas de Tyr269 e Ile270, e com oxigênio carbonílico da porção amida de Gln268. As outras interações observadas ocorrem na porção glicosídica do flavonoide (Figura 67 e Tabela 29).

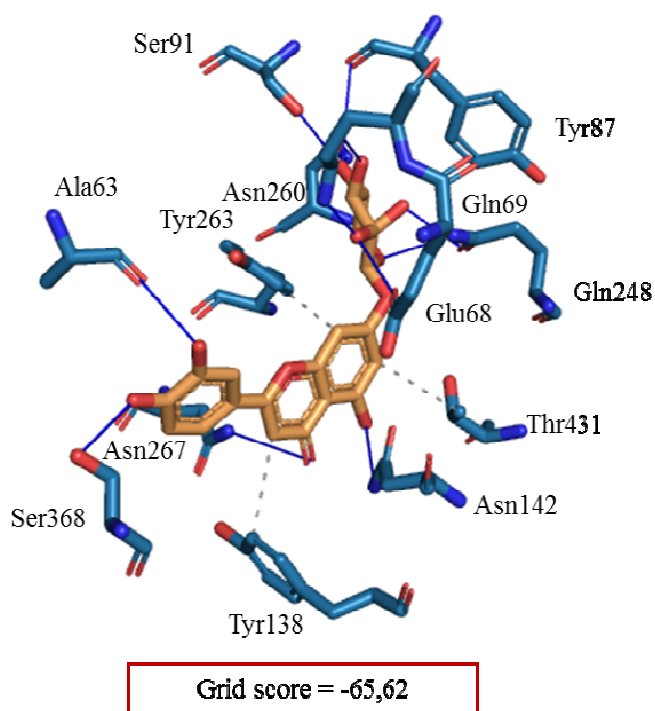
Figura 67 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da rutina com CSGL. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, interações π -paralela: barras tracejadas verde



A luteolina-7-*O*-glicosídeo apresenta interações hidrofóbicas entre seu anel flavonoídico e os resíduos Tyr238, Tyr263 e Thr431. As outras interações observadas são ligações de hidrogênio. No anel A, a ligação de hidrogênio ocorre entre a hidroxila em C5 e o amida terminal de Asn142. No anel C, a interação ocorre entre o oxigênio carbonílico (C4) e a amida terminal de Asn267. No anel B, duas ligações de hidrogênio são observadas: entre a hidroxila em C3' com o oxigênio carbonílico de Ala63 e entre a hidroxila em C4' com

oxigênio carbonílico de Ser368. As outras interações de hidrogênio ocorrem na porção glicosídica do flavonoide com os resíduos Asn260, Ser91, Tyr87, Gln69, Gln248 e Glu68 (Figura 68 e Tabela 29).

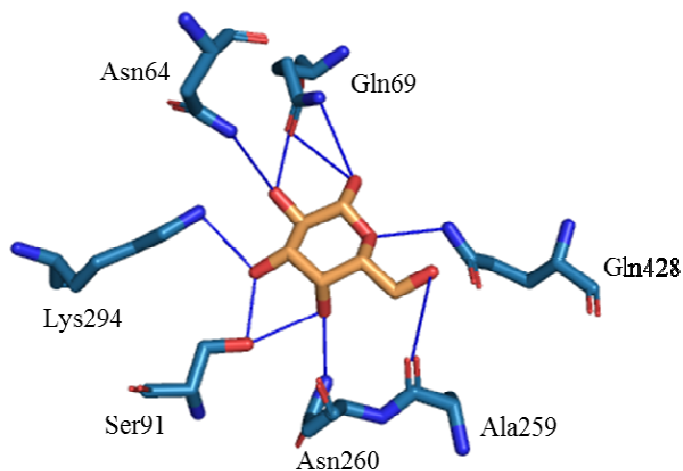
Figura 68 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da luteolina-7-*O*-glicosídeo com CSGL. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis



Faham e colaboradores (2008) analisaram o sítio de ligação da galactose (GAL) no CSGL. Esse sítio de ligação encontra-se entre resíduos hidrofóbicos que formam portões intra- e extracelulares. De acordo com esses autores, todos os grupos -OH do anel da galactose são coordenados por ligações de hidrogênio. Dentre elas, a formação de ligação de hidrogênio entre o oxigênio carbonílico de Tyr87 e o grupo C4-OH da galactose, e entre o resíduo Lys294 e o grupo C2-OH encontram-se entre as principais interações ligante-receptor. Outras interações apresentadas pela galactose encontram-se nos resíduos Gln69, Ser91, Asn290 e Gln428.

O resultado obtido no servidor PLIP para a galactose, levantada pelo código PDB 3DH4, mostrou semelhanças com o apresentado no estudo de Faham e colaboradores (2008). Apenas dois resíduos diferentes apareceram no resultado obtidos no servidor, Ala259 e Asn64. Porém, para os dois flavonoides analisados com esse alvo, as diferenças foram maiores, em especial para a rutina. Esta foi acoplada em sítio diferente do ligante em questão, como pode ser observado com os diferentes resíduos aos quais foram obtidas interações (Figura 69).

Figura 69 - Perfil de interação do ligante GAL com CSGL. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barras azuis



A luteolina-7-*O*-glicosídeo, por sua vez, acoplou no mesmo sítio de ligação da galactose, apresentando mesmo perfil de interação com os resíduos feitos por ela. As diferenças apresentadas encontram-se em interações adicionais realizadas por este flavoinoide, como pode ser observado na Tabela 27. Essas interações adicionais permitiram incremento na energia de acoplamento molecular, como observado pelo GRID score maior do que o do ligante GAL (Grid score = -40,67). Dessa forma, sugere-se que a luteolina-7-*O*-glicosídeo pode vir a ser potencial inibidor do CSGL.

Tabela 27 - Perfil de interação com o alvo Cotransportador de sódio/glicose

Faham et al (2008)	Ligante (GAL)	Rutina	Luteolina-7- <i>O</i> -glicosídeo
Interações hidrofóbicas			
		Tyr138	Tyr138
			Tyr263
		Tyr269	
		Thr431	Thr431
Ligaçõesceptoras de hidrogênio			
	Asn64	Ser66	
			Glu68
Gln69	Gln69		Gln69
Ser91	Ser91		Ser91

		Asn142
Asn260	Asn260	Asn260
		Tyr263
		Asn267
		Tyr269
		Ile270
		Ser368
		Met369
		Ser372
Gln428	Gln428	Gln428
		Thr431
Ligações doadoras de hidrogênio		
		Ala63
		Asn64
		Glu68
Gln69	Gln69 (2x)	
Tyr87		Tyr87
	Ser91	
	Ala259	
		Gln268
Lys294	Lys294	
		Ser365
		Ser368
		Ser368
Gln428		Gln428
		Thr431
Interações π-paralelas		
		Tyr263 (tipo t)

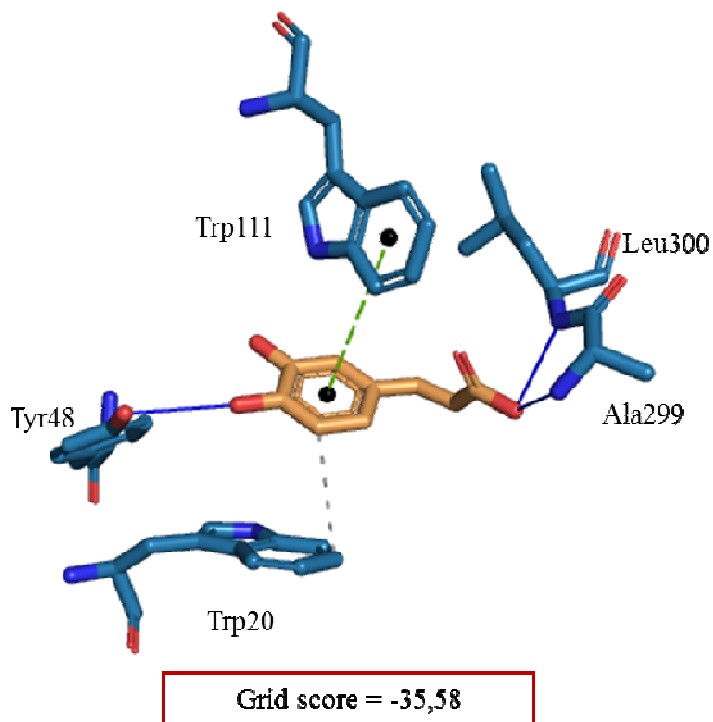
4.3.1.2.6 Aldose redutase

A aldose redutase (AR) é enzima amplamente expressa capaz de metabolizar aldeído. Essa enzima foi inicialmente envolvida apenas nas complicações diabéticas secundárias devido ao seu potencial de redução de glicose. No entanto, as evidências a partir de estudos recentes indica que a AR é excelente redutora de número de aldeídos lipídicos derivados de peroxidação, bem como os seus conjugados de glutathione, que regulam sinais inflamatórios iniciados por oxidantes, tais como citocinas, fatores de crescimento e as endotoxinas bacterianas, e revelaram o potencial de usar inibidores de AR como abordagem para prevenir complicações inflamatórias (PANDEY; SRIVASTATA; RAMANA, 2012; SRIVASTAVA; RAMANA; BHATNAGAR, 2005; ABDILLAH; RAMASAMY, 2013).

O ácido cafeico, quando acoplado a AR, apresenta interação hidrofóbica entre seu anel aromático e o do resíduo Trp20. O anel aromático do ácido também faz interação π -paralela (tipo T) com o anel aromático de Trp111. Ligações de hidrogênio ocorrem entre a hidroxila

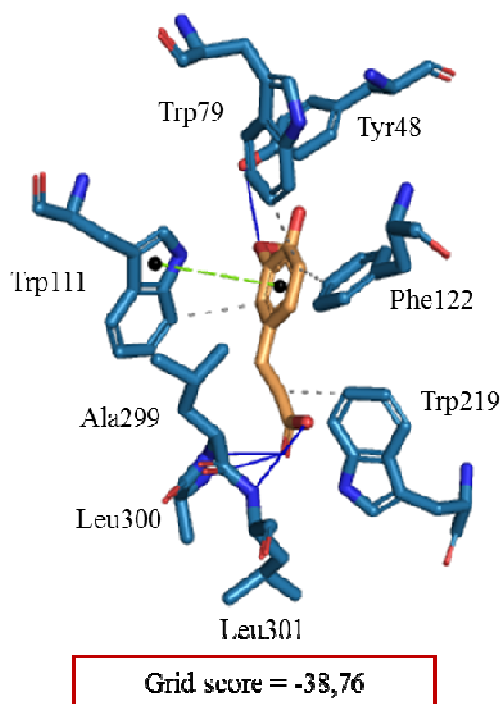
em C4 do ácido e a hidroxila de Tyr48; entre a hidroxila carboxílica do ácido e a amina terminal de Ala299 e amina de Leu300 (Figura 70).

Figura 70 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido cafeico com AR. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, interações π -paralela: barras tracejadas verde



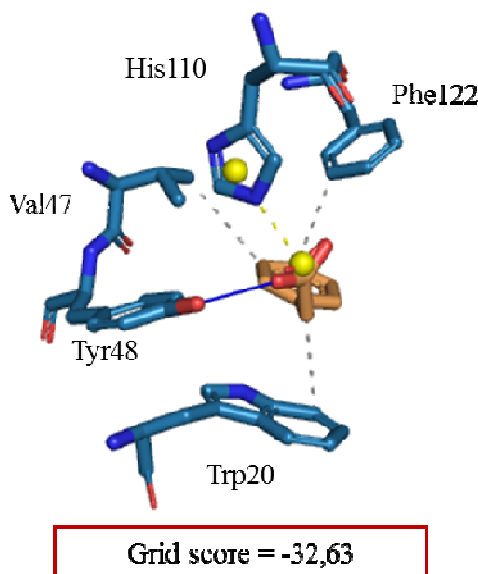
O ácido *trans*-ferúlico interage com o alvo AR através de ligações hidrofóbicas que ocorrem tanto no anel (Trp79, Trp111 e Phe122) quanto na cadeia lateral (Trp219). O anel aromático do ácido também faz interação π -paralela (tipo T) com o anel indol de Trp111. As ligações de hidrogênio ocorrem entre o átomo de oxigênio da metoxila em C3 e a hidroxila de Tyr48; entre a hidroxila carboxílica do ácido e a amina de Leu301; e entre o oxigênio carbonílico da molécula e as aminas de Ala299 e Leu300 (Figura 71).

Figura 71 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *trans*-ferúlico com AR. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, interações π -paralela: barras tracejadas verde



Brownlee e colaboradores (2006), avaliaram o acoplamento molecular entre o ácido fenilacético (PAC) com a AR e observaram que as principais interações ocorrem com os resíduos Trp20, Tyr48 e His110. Foram avaliadas, também, as interações obtidas pelo servidor PLIP, utilizando o mesmo ligante obtido pelo código PDB 2INE, ácido fenilacético (Figura 72). Por esse método, observa-se as mesmas interações principais, além de outras duas com resíduos diferentes, Val47 e Phe122.

Figura 72 - Perfil de interação do ligante PAC com AR. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, ponte salina: barras pontilhadas amarela



Os dois ácidos fenólicos avaliados junto ao alvo AR, ácido cafeico e *trans*-ferúlico, apresentaram interação com a Tyr48. Apenas o ácido cafeico apresentou outra das interações importante citadas, com o resíduo Trp20. Por outro lado, o ácido *trans*-ferúlico apresentou interação hidrofóbica com o resíduo Trp219, assim como apresentado pelo artigo citado. Ambos ácidos fenólicos apresentaram interações adicionais com o alvo, como pode ser observado na Tabela 28. Tais interações proporcionaram incremento na energia de ligação, como observado pelos resultados superiores ao do ligante (Grid score = -32,63), obtidos com o cálculo de acoplamento molecular, GRID score.

Tabela 28 - Perfil de interação com o alvo Aldose redutase

Brownlee et al (2006)	Ligante (PAC)	Ácido cafeico	Ácido <i>trans</i>-ferúlico
	Interações hidrofóbicas		
Trp20	Trp20	Trp20	
	Val47		
			Trp79
			Trp111
	Phe122		Phe122

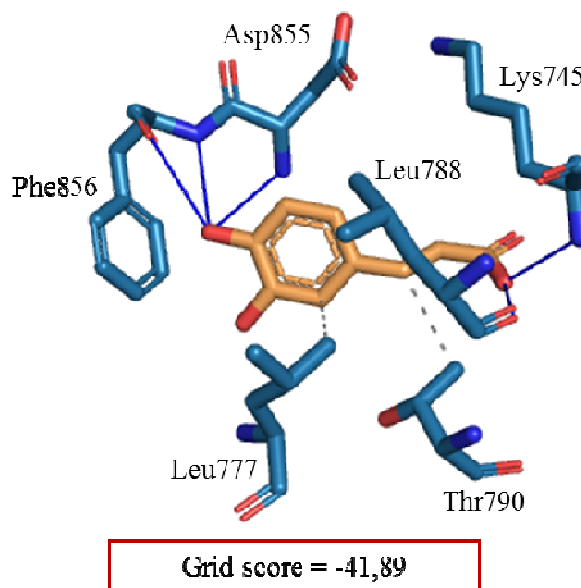
Trp219			Trp219
Ligaçõesceptoras de hidrogênio			
Tyr48	Tyr48	Tyr48	Tyr48
		Ala299	Ala299
		Leu300	Leu300
			Leu301
Interações π-paralelas			
		Trp111 (tipo T)	Trp111 (tipo T)
Pontes salina			
His110	His110		

4.3.1.2.7 Receptor de fator de crescimento epidérmico

O receptor de fator de crescimento epidérmico (RFCE) é um membro amplamente expresso da família de receptores tirosina quinase e é super-expresso em muitos tumores. Décadas de pesquisa em oncologia molecular têm trazido novas terapias promissoras, que são projetadas para alvejar moléculas específicas que promovem o crescimento de tumores e sobrevivência. O receptor do fator de crescimento epidérmico encontra-se entre um dos primeiros alvos importantes para novos agentes antitumorais. Cerca de metade dos casos de câncer de mama triplo-negativo e câncer de mama inflamatório super-expressam esse receptor. Assim, os inibidores para tratamento de câncer da mama foram avaliados em vários estudos (SWANSON et al, 2012; MASUDA et al, 2012).

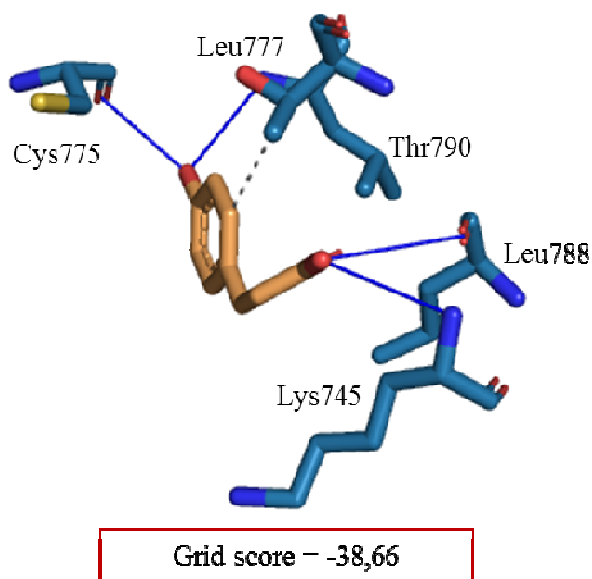
No acoplamento do ácido cafeico com o alvo RFCE observa-se interações hidrofóbicas com os resíduos Leu777 e Thr790. Ligações de hidrogênio são observadas entre a hidroxila em C4 do anel aromático da molécula com o oxigênio carboxílico e a amina de Phe856 e com a amina de Asp855. Na cadeia lateral, ligações de hidrogênio ocorrem entre a hidroxila grupo carboxílico e o oxigênio carbonílico Leu788 e o radical amina de Lys745 (Figura 73).

Figura 73 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido cafeico com RFCE. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis



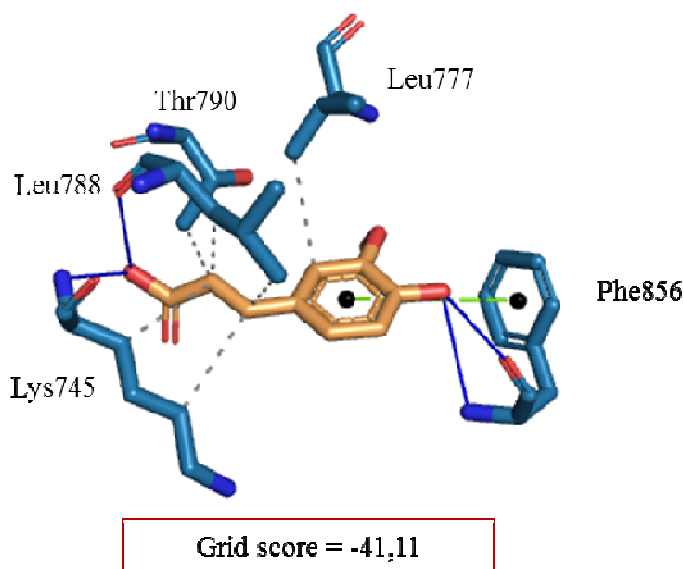
O ácido *p*-cumárico acopla com RFCE através de interação hidrofóbica entre o anel aromático e o resíduo Thr790. No oxigênio da hidroxila em C4 observa-se ligação de hidrogênio com oxigênio carbonílico de Cys775 e com a amina da Leu777. Outras ligações de hidrogênio são observadas entre a hidroxila do grupo carbonílico do ácido e com o radical amina de Lys745 e com o oxigênio carbonílico de Leu788 (Figura 74).

Figura 74 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *p*-cumárico com RFCE. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis



O acoplamento do ácido *trans*-ferúlico com RFCE apresenta interações hidrofóbicas com os resíduos Lys745, Leu777, Leu788 e Thr790. O anel aromático do ácido faz interação π -paralela (tipo T) com o anel aromático de Phe856. Esse mesmo resíduo faz duas ligações de hidrogênio com a hidroxila em C4 da molécula, através de sua amina e de seu oxigênio carbonílico. As outras duas ligações de hidrogênio ocorrem entre a hidroxila do grupo carboxílico do ácido e com a amina de Lys745 e com o oxigênio carbonílico de Leu788 (Figura 75).

Figura 75 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *trans*-ferúlico com RFCE. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, interações π -paralela: barras tracejadas verde



Aertgeerts e colaboradores (2011) avaliaram a estrutura cristalográfica do complexo RFCE com o inibidor TAK-285 (N-{2-[4-({3-cloro-4-[3-(trifluorometil) fenoxi] fenil} amino)-5H-pirrolo [3,2-d] pirimidin-5-il] etil}-3-hidroxi-3-metilbutanamida). Eles observaram que um dos átomos de nitrogênio do anel pirimidina faz ligação de hidrogênio com o nitrogênio da cadeia principal do resíduo Met793, do alvo RFCE. O outro átomo de nitrogênio do anel pirimidina faz ligação de hidrogênio mediada por água com o resíduo Thr854. Já o grupo volumoso fenil-3-fluor-metil ocupa o bolsão hidrofóbico formado pelos resíduos Met766, Cys775, Leu777, Leu788, Thr790, Thr854, e Phe856.

As interações obtidas através da submissão do ligantes obtido pelo código PDB 3POZ, TAK-285, no servidor PLIP (Figura 76), apresentaram semelhança com as citadas no estudo de Aertgeerts e colaboradores (2011). Os três ácidos fenólicos complexados com o alvo RFCE apresentaram semelhança apenas em poucas interações ocorridas no bolsão hidrofóbico, com o ácido *trans*-ferúlico apresentando maior semelhança. Porém outras interações foram

observadas com outros resíduos, principalmente ligações de hidrogênio (Tabela 29). Através dos cálculos de acoplamento molecular, pode-se observar que as três moléculas avaliadas apresentaram resultados inferiores ao obtido para o ligante TAK-285 (Grid score = -97,73).

Figura 76 - Perfil de interação do ligante TAK-285 com RFCE. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, interações π -paralela: barras tracejadas verde, ligação com halogênio: barras ciano

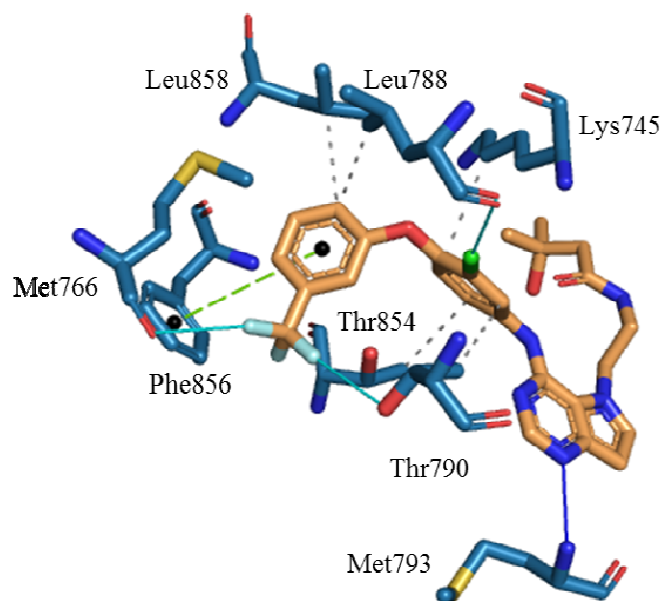


Tabela 29 - Perfil de interação com o alvo Receptor de fator de crescimento epidérmico

Aertgeerts et al (20011)	Ligante (TAK-285)	Ácido cafeico	Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido <i>trans</i> -ferúlico
Interações hidrofóbicas				
	Lys745			Lys745 (2x)
Cys755				
Met766				
Leu777		Leu777		Leu777
Leu788	Leu788			Leu788 (2x)
Thr790	Thr790	Thr790	Thr790	Thr790
Thr854	Thr854			
Phe856				
	Leu858			

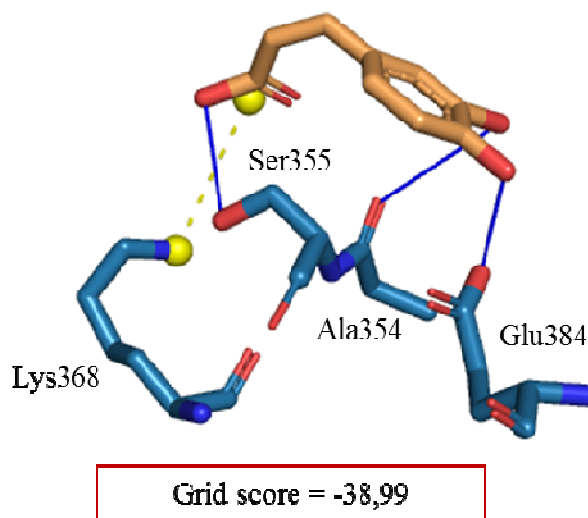
Ligaçõesceptoras de hidrogênio			
		Lys745	Lys745
			Leu777
Met793	Met793		
		Asp855	
		Phe856	Phe856
Ligações doadoras de hidrogênio			
			Cys755
		Leu788	Leu788
		Phe856	Phe856
Ligaçõesceptoras de hidrogênio através de pontes de água			
Thr854			
Interações π-paralelas			
	Phe856 (tipo T)		Phe856 (tipo T)

4.3.1.2.8 Enzima conversora de angiotensina

A enzima conversora de angiotensina (ECA) é regulador negativo do sistema renina-angiotensina, e funciona como a chave do receptor coronavírus na síndrome respiratória aguda severa e estabilizador de transportadores de aminoácidos neutros. Evidências indicam que a atividade enzimática de ECA tem papel protetor nas doenças cardiovasculares. A perda de ECA pode ser prejudicial, uma vez que conduz à deterioração funcional do coração e progressão de doenças cardíacas, renais, patologias vasculares (KUBA; IMAI; PENNINGER, 2013). Bloqueadores da ECA estão entre os agentes de maior relevância farmacológica que bloqueiam o sistema renina-angiotensina-aldosterona. Esses bloqueadores atuam diminuindo a degradação de bradicinina, conduzindo a liberação de óxido nítrico e prostaglandinas, resultando em vasodilatação (VARK et al, 2012). Além disso, tem sido relatado que inibidores da ECA estão associados a taxas reduzidas de declínio cognitivo em paciente com demência, sugerindo que podem desacelerar a progressão da doença (O'CAOIMH et al, 2014).

Acoplado o ácido cafeico com o alvo ECA pode-se observar que esta molécula faz apenas ligações de hidrogênio. Essas ligações ocorrem entre a hidroxila em C3 do ácido e o oxigênio carbonílico de Ala354, entre a hidroxila em C4 e a hidroxila do grupo carboxílico de Glu384, e entre a hidroxila do grupo carboxílico do ácido e a hidroxila de Ser355. Ponte salina também é observada entre o grupo carboxílico da molécula e a amina terminal da Lys368 (Figura 77).

Figura 77 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido cafeico com ECA. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela



Natesh e colaboradores (2004) relataram a estrutura cristalina de alta resolução do complexo ECA com o primeiro inibidor concebido com sucesso – captopril (1-(3-mercaptopropionil)-pyrrolidina-2-carboxílico). O captopril é ancorado apenas no grupo carbonila central e no grupo carboxilato da prolina. O grupo carbonila central, entre o grupo sulfidril e prolina terminal, ancora-se por duas ligações de hidrogênio com dois resíduos de histidinas (His513 e His353). Do mesmo modo, átomo de oxigênio do grupo carboxilato da porção prolina realiza interações com Tyr520, Gln281 e Lys511. O outro átomo de oxigênio do grupo carboxilato da porção prolina interage com as águas circundantes (Tabela 30).

As interações obtidas pela submissão do complexo obtido pelo código PDB 1UZF no servidor PLIP apresentaram diferenças consideráveis (Figura 78). Apenas a interação de hidrogênio com Gln281 foi semelhante com às citadas pelo estudo de Natesh e colaboradores (2011). O ácido cafeico, a única molécula de consulta complexada com esse alvo no presente estudo, não apresentou interações importantes semelhantes com o captopril, apenas com o resíduo Glu384, porém de perfis diferentes. Os resultados obtidos com os perfis de interação são corroborados com os obtidos pelos cálculos de acoplamento molecular, na qual observa que o captopril (Grid score = -50,93) apresentou resultado consideravelmente superior ao ácido cafeico. Desta forma, sugere-se que tal ácido não apresenta potencial apreciável sobre o alvo analisado.

Figura 78 - Perfil de interação do ligante Captopril com ECA. Proteína: azul, ligante: laranja, esfera magenta: íon, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela; complexo com metal: barras pontilhadas magenta

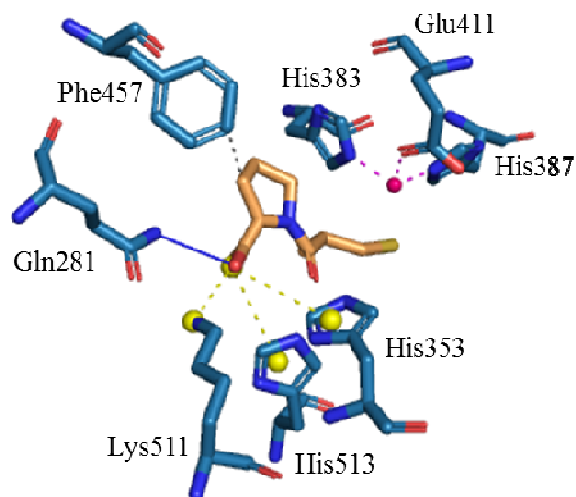
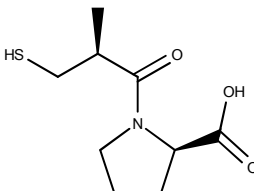
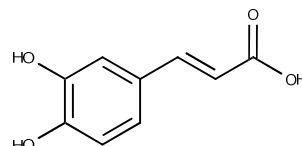


Tabela 30 - Perfil de interação com o alvo Enzima Conversora de Angiotensina

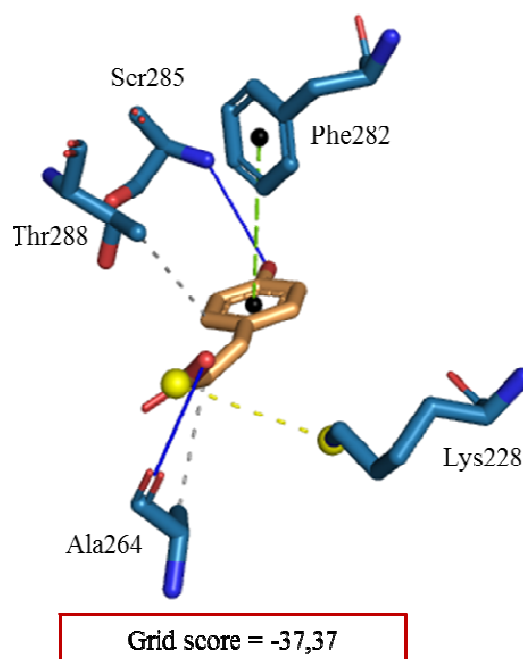
			
Natesh et al (2004)		Ligante (Captopril)	Ácido cafeico
Interações hidrofóbicas			
		Phe457	
Ligaçõesceptoras de hidrogênio			
Gln281		Gln281	
His353			Ser355
Lys511			
His513			
Tyr520			
Ligações doadoras de hidrogênio			
			Ala354
			Glu384
Pontes salinas			
		Lys511	
		His353	
			Lys368
Glu384			
		His513	

4.3.1.2.9 Succinato-semialdeído desidrogenase

A deficiência de succinato-semialdeído desidrogenase (SSADH) é uma desordem hereditária rara que perturba o metabolismo do neurotransmissor inibitório ácido 4-aminobutírico (GABA). Identificado em conjunto com aumento da excreção urinária do ácido gama-hidroxibutírico (GHB), análogo de GABA, numerosos pacientes foram identificados em todo o mundo. O fenótipo é disfunção neurológica não progressiva em que as crises podem ser bem visíveis. Anormalidades na neurotransmissão GABAérgica e GHBérgica, documentadas em pacientes e camundongos, formam componente da fisiopatologia da doença, apesar de inúmeros outros distúrbios (acúmulos de metabólitos, anomalias de mielina, estresse oxidante, etc.) também podem estar envolvidos no desenvolvimento do fenótipo da doença. Mais recentemente, a demonstração de sistema de controle de redox no sítio ativo dessas proteínas forneceu novas ideias sobre a regulamentação das mesmas pelo potencial de oxidação/redução celular (KIM et al, 2011; VOGEL, 2014).

O acoplamento do ácido *p*-cumárico com SSADH apresentou interações hidrofóbicas com os resíduos Ala264 e Thr288. Ligações de hidrogênio foram observadas entre a hidroxila do grupo carboxila e o oxigênio carbonílico de Ala264, e entre a hidroxila em C4 e a amina da Ser285. O anel aromático do ácido realiza interação do tipo π -paralela (tipo T) com o anel aromático de Phe282. Ponte salina também é observada entre o o grupo carboxílico e a amina terminal de Lys228 (Figura 79).

Figura 79 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *p*-cumárico com SSADH. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela; interações π -paralelas: barras tracejadas verde



De acordo com Kim e colaboradores (2009), no SSADH humano, a porção adenosina-5'-difosfato (ADP) da molécula de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD^+) é estabilizada da seguinte forma: a base adenina é posicionada em bolso hidrofóbico constituído por vários resíduos hidrofóbicos, tais como Ile201, Ala264, Leu292 e Gly268. Para a estabilização do anel de ribose, os grupos hidroxila do anel fazem ligações de hidrogênio com as cadeias laterais de Lys228 e Glu231, e o grupo CO de Thr202. O átomo de oxigênio do grupo difosfato também faz ligações de hidrogênio com as cadeias laterais de Ser285 e Thr288.

O perfil de interação obtido pela submissão do complexo de código PDB 2W8R no servidor PLIP (Figura 80), não apresentou nenhuma das interações hidrofóbicas citadas por Kim e colaboradores (2009). As interações com os resíduos Ser285, Thr202 e Glu231 foram as únicas equivalentes em ambos os resultados. O ácido *p*-cumárico também apresentou diferenças significativas quando comparado com os resultados apresentados pelos autores citados. Apenas interações com quatro resíduos foram equivalentes, Ala264 (ambas interações hidrofóbicas), Ser285 (ambas interações de hidrogênio), Thr288 (interação hidrofóbica para o ácido *p*-cumárico e interação de hidrogênio para o ADP), e Lys228 (ponte salina para o ácido e ligação de hidrogênio para o ADP). Outras interações também foram apresentadas pelo ácido avaliado (Tabela 31). O cálculo de acoplamento molecular corrobora com os resultados

obtidos dos perfis de interação, onde o ligante ADP apresentou-se superior (Grid score = -66,40). Sugere-se que o ácido *p*-cumárico não apresenta potencial considerável para o alvo em questão.

Figura 80 - Perfil de interação do ligante ADP com SSADH. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis

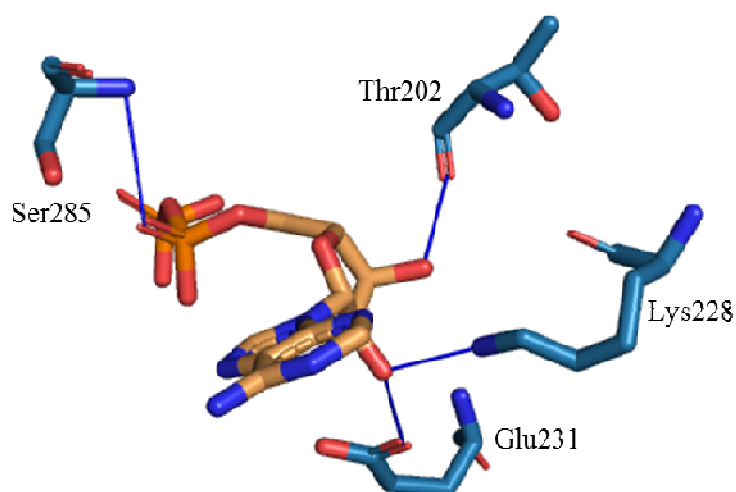


Tabela 31 - Perfil de interação com o alvo Succinato-semialdeído desidrogenase

Kim et al (2009)	Ligante (ADP)	Ácido <i>p</i> -cumárico
	Interações hidrofóbicas	
Ile201		
Ala264		Ala264
Gly268		
		Thr288
Leu292		
	Ligaçõesceptoras de hidrogênio	
	Lys228	
Ser285	Ser285	Ser285
Thr288		
		Gln380
	Ligaçõesdoadoras de hidrogênio	
Thr202	Thr202	
Lys228		
Glu231	Glu231	

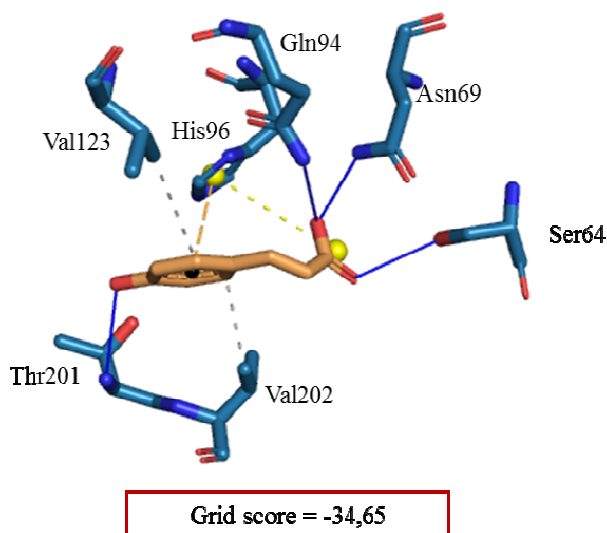
	Ala264
Interações π-paralelas	Phe282
Pontes salina	Lys228

4.3.1.2.10 Anidrase carbônica 13

As anidrase carbônicas humanas (AC) são uma família de metaloenzimas de zinco que catalisam a hidratação reversível de CO_2 . Esta reação regula grande variedade de funções fisiológicas, tais como a respiração, transporte de CO_2 /bicarbonato entre os pulmões e tecidos metabolizantes, o pH e a homeostase de CO_2 , a secreção do eletrólito em muitos tecidos/órgãos, etc. A isoforma citosólica 13 é um membro recentemente descoberto dessa família. É expressa seletivamente em tecidos nos órgãos reprodutivos, onde pode controlar o pH e o equilíbrio iônico, garantindo condições de fertilização, portanto, adequados (DI FIORI et al, 2009; DUDUTIENE et al, 2013).

O ácido *p*-cumárico interage com a isoenzima AC 13 através de interações hidrofóbicas ocorrentes entre o anel aromático e os resíduos Val23 e Val202. O anel imidazol do resíduo His96 faz interações π -cátion e ponte salina com o anel aromático e o grupo carboxílico do ácido, respectivamente. As ligações de hidrogênio ocorrem entre a hidroxila em C4 e a amina de Thr201, entre o oxigênio carbonílico e a hidroxila terminal de Ser64, e entre a hidroxila carbonílica do ácido e as amidas de Asn69 e Gln94 (Figura 81).

Figura 81 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *p*-cumárico com AC 13. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela; interações π -cátion: barras tracejadas laranja



Segundo Dudutiene e colaboradores (2013), a conformação do ligante 2,3,5,6-tetrafluoro-4 - [(2-hidroxietil) sulfonyl] benzenossulfonamida (V13) complexado com a AC 13 permite que o anel de benzeno fluorado seja fixado no bolso de ligação dessa isoenzima por interações principalmente hidrofóbicas com Leu200, Val202, Val145 e Phe133. O outro lado do anel é sustentado pelos resíduos His96, Val123 e Gln94. O grupo sulfonyl do ligante V13 faz ligações de hidrogênio mediada por água com Arg93 e Asn69 e interação de van der Waals com Gln94.

O perfil de interação obtido pela submissão do complexo de código PDB 4HU1 no servidor PLIP (Figura 82), apresentou apenas duas interações equivalentes às citadas por Dudutiene e colaboradores (2013), com os resíduos Gln94 e Asn69, e duas outras adicionais. Do mesmo modo, o ácido *p*-cumárico apresentou duas interações com resíduos equivalentes às obtidas pelo ligante V13, com os resíduos Asn69 e Gln94 (Tabela 32). Essa diferença nos perfis de interação refletem os resultados obtidos através dos cálculos de acoplamento molecular. Observa-se que o resultado apresentado pelo ácido *p*-cumárico foi significativamente inferior ao do ligante V13 (Grid score = -60,15), sugerindo que esse ácido não apresenta considerável potencial para agir sobre a isoenzima AC 13.

Figura 82 - Perfil de interação do ligante V13 com AC 13. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barras azuis, ligações de hidrogênio mediada por água: barras cinza, complexos com metal: barras pontilhadas magenta

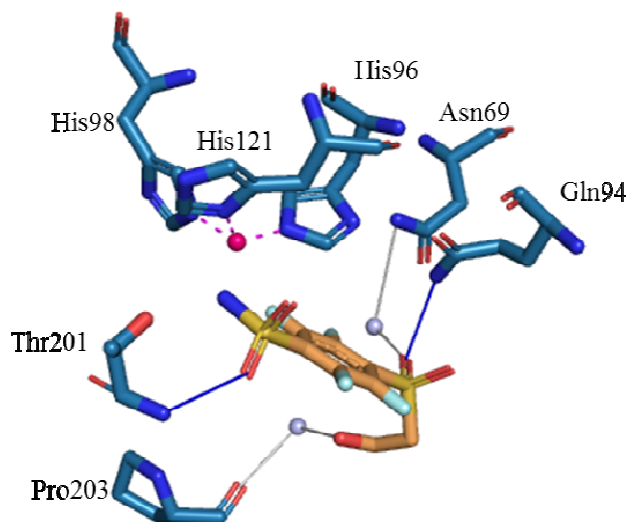


Tabela 32 - Perfil de interação com o alvo Anidrase carbônica 13

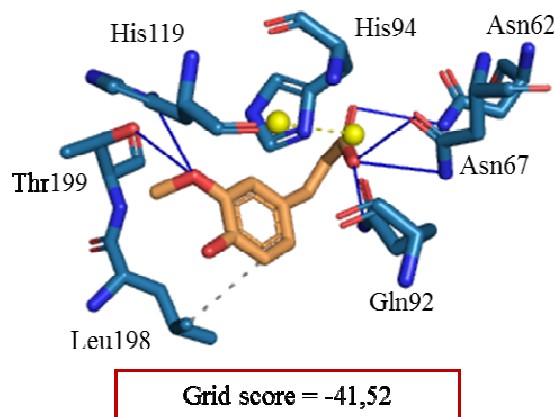
Dudutiene et al (2013)	Ligante (V13)	Ácido <i>p</i> -cumárico
Interações hidrofóbicas		
		Val123
Phe133		
Val145		
Leu200		
Val202		Val202
Ligaçõesceptoras de hidrogênio		
		Ser64
		Asn69
Gln94	Gln94	Gln94
	Thr201	Thr201
Ligaçõesceptoras de hidrogênio através de pontes de água		
Asn69	Asn69	
Arg93		
Ligaçõesdoadoras de hidrogênio através de pontes de água		
	Pro203	
Interações π-cátion		
		His96
Pontes salina		
		His96

4.3.1.2.11 Anidrase carbônica 2

Estudos recentes mostraram a formação de uma resposta autoimune contra a isoenzima AC 2 em várias doenças (ALVER et al, 2011; ALVER et al, 2014), incluindo a síndrome de Sjögren. Os elevados níveis de pH urinário e acidose tubular renal observada nesta síndrome foram atribuídos aos auto anticorpos de AC 2 (PERTOVAARA et al, 2011). O mecanismo responsável pela formação desses anticorpos ainda não foi identificado, embora tenha sido sugerido que o estresse oxidativo pode ser envolvido (ALVER et al, 2014). A AC 2 também tem sido relacionada com o glaucoma, uma das principais causas de cegueira. Inibidores da AC 2 está entre as opções terapêuticas, diminuindo a pressão intraocular através da redução da taxa de formação de bicarbonato e, assim, a secreção de humor aquoso (MASINI et al, 2013).

O acoplamento molecular do ácido *trans*-ferúlico com a isoenzima AC 2 apresentou interação hidrofóbica apenas com o resíduo Leu198. Ponte salina pode ser observada entre o grupo carboxilato e a anel imidazol de His94. As ligações de hidrogênio que ocorrem nesse mesmo grupo são feitas entre o átomo de oxigênio carbonílico e o grupo $-NH_2$ de amida terminal de Asn62, e entre a hidroxila e as amidas terminais de Asn67 ($-NH_2$ e $-C=O$) e GLN92 ($-NH_2$). O átomo de oxigênio metoxílico da posição C3 do anel liga-se ao N1 do anel imidazol de His119 e a hidroxila de Thr199 (Figura 83).

Figura 83 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *trans*-ferúlico com AC 2. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela



Segundo Wang e colaboradores (2016), a porção benzenossulfonamida do ligante 4-(butilaminometil)-benzenossulfonamida (5RD) forma as interações normalmente observadas para os inibidores arilsulfonamida: o átomo nitrogênio (N) sulfonamidato doa ligação de hidrogênio para o oxigênio hidroxila de Thr199, e um átomo oxigênio de sulfonamida aceita ligação de hidrogênio a partir do nitrogênio da amida de Thr199. A cauda n-butil de 5RD ocupa bolsa hidrofóbica formada pelos resíduos Leu198, Pro202, Leu204, Phe131, Val135 e Leu141. Outros inibidores de sulfonamida com caudas hidrofóbicas flexíveis também ocupam este bolso. O nitrogênio da amina da cauda de 5RD localiza-se perto dos resíduos Leu198 e Pro202, mas não formam ligações de hidrogênio com a proteína ou o solvente.

O perfil de interação obtido pela submissão do complexo de código PDB 4HU1 no servidor PLIP (Figura 84), apresentou somente uma interação hidrofóbica equivalente ao citado pelos autores para o ligante em questão e para o ácido analisado, com os resíduos Val135 e Leu198, respectivamente. A interação com o resíduo Thr199 constituiu em apenas uma ligação de hidrogênio, para o ligante 5RD, enquanto que diversas outras foram encontradas para a molécula de consulta. O servidor não encontrou a formação de ligação

doadora entre átomo nitrogênio (N) sulfonamidato e o oxigênio hidroxí de Thr199, em nenhuma das duas moléculas (Tabela 33). O cálculo de energia de acoplamento mostrou que, apesar do número maior de ligações de hidrogênio apresentada pelo ácido, o ligante 5RD tem maior atividade potencial que o mesmo (Grid score = -84,44).

Figura 84 - Grid score e perfil de interação do ligante 5RD com AC 2. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis

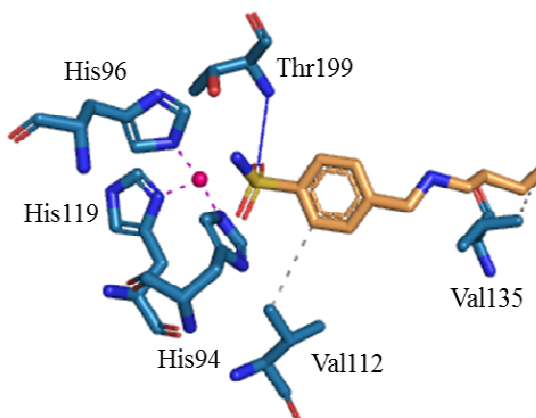


Tabela 33 - Perfil de interação com o alvo Anidrase carbônica 2

Artigo	Ligante (5RD)	Ácido <i>trans</i> -ferúlico
Interações hidrofóbicas		
		Val121
Phe131		
Val135	Val135	
Leu141		
Leu198		Leu198
Pro202		
Leu204		
Ligaçõesceptoras de hidrogênio		
		Asn62
		Asn67
		Gln92
		His119
Thr199	Thr199	Thr199
Ligações doadoras de hidrogênio		

	Asn67
Thr199	
Pontes salinas	
	His94

4.3.2 DRAR-CPI

4.3.2.1 Seleção dos alvos

Os potenciais alvos selecionados no servidor DRAR-CPI são apresentados na Tabela 34. Todos os 5 alvos selecionados nesse servidor para cada molécula apresentaram Z'-score abaixo de -0,5, como preconizado pelo servidor para considerar potencial atividade sobre determinado alvo. Além disso, todos os alvos selecionados foram os que apresentaram menores valores de Z'-score para cada molécula de consulta.

Tabela 34 - Alvos com melhores pontuações obtidos no servidor DRAR-CPI

Molécula de consulta	Alvo molecular	Código PDB	Pontuação de acoplamento	Z'-score
Rutina	Receptor do fator de crescimento epidérmico	1M17	-71,11	-2,06
	Proteína quinase dependente de 3-fosfoinosítídeo	2BIY	-73,30	-1,95
	Glicogênio sintase quinase 3 beta	1J1B	-76,47	-1,90
	Fator de coagulação VII	1Z6J	-75,90	-1,62
	Receptor do fator de crescimento do fibroblasto 2	2PVY	-63,08	-1,61
Luteolina-7-O-glicosídeo	Proteína quinase s6 ribossomal alfa 1	2Z7R	-61,65	-2,63
	Proteína quinase CDC42 ativada 1	1U54	-54,44	-2,22
	Proteína 1 da triáde de histidina de ligação do nucleotídeo	1KPF	-50,05	-2,10
	Beta-1,4-galactosiltransferase 1	2FYB	-56,99	-1,10
	Receptor glicocorticoide	1NHZ	-60,56	-1,88
Ácido cafeico	Ras-relacionada ao substrato C3 da Toxina botulínica 1	1E96	-45,90	-3,62
	Ornitina carbamoiltransferase, mitocondrial	1OTH	-55,02	-2,93
	2-oxoisovalerato desidrogenase subunidade alfa, mitocondrial	1OLS	-43,93	-2,71
	Carbonil redutase [NADPH] 3	2HRB	-46,91	-2,57
	Fator inibitório de migração de macrófago	1GCZ	-37,91	-2,43
Ácido p-cumárico	Ornitina carbamoiltransferase, mitocondrial	1OTH	-52,96	-2,86
	Carbonil redutase [NADPH] 3	2HRB	-45,75	-2,66
	Maleilacetoacetato isomerase	1FW1	-43,38	-2,66
	Ras-relacionada ao substrato C3 da	1E96	-40,63	-2,66

	Toxina botulínica 1			
	2-oxoisovalerato deidrogenase subunidade alfa, mitocondrial	1OLS	-41.97	-2.64
Ácido <i>trans</i>-ferúlico	Carbonil redutase [NADPH] 3	2HRB	-51.50	-3.04
	Ornitina carbamoiltransferase, mitocondrial	1OTH	-56.67	-2.78
	Malato desidrogenase, mitocondrial	2DFD	-52.44	-2.53
	Albumina de soro	2BX8 2	-41.75	-2.50
	Maleilacetoacetato isomerase	1FW1	-46.54	-2.47
Poligaleno	Proteína quinase 2 de divisão celular	1OIQ	-356,01	-339,57
	Proteína quinase s6 ribossomal alfa 1	2Z7R	-365,94	-308,89
	Proteína tirosina quinase JAK2	1XBA	356,35	-251,43
	Proteína quinase CDC42 ativada 1	1U54	-307,89	-242,09
	MAP quinase ativada por proteína quinase 2	1NY3	-343,51	-223,77

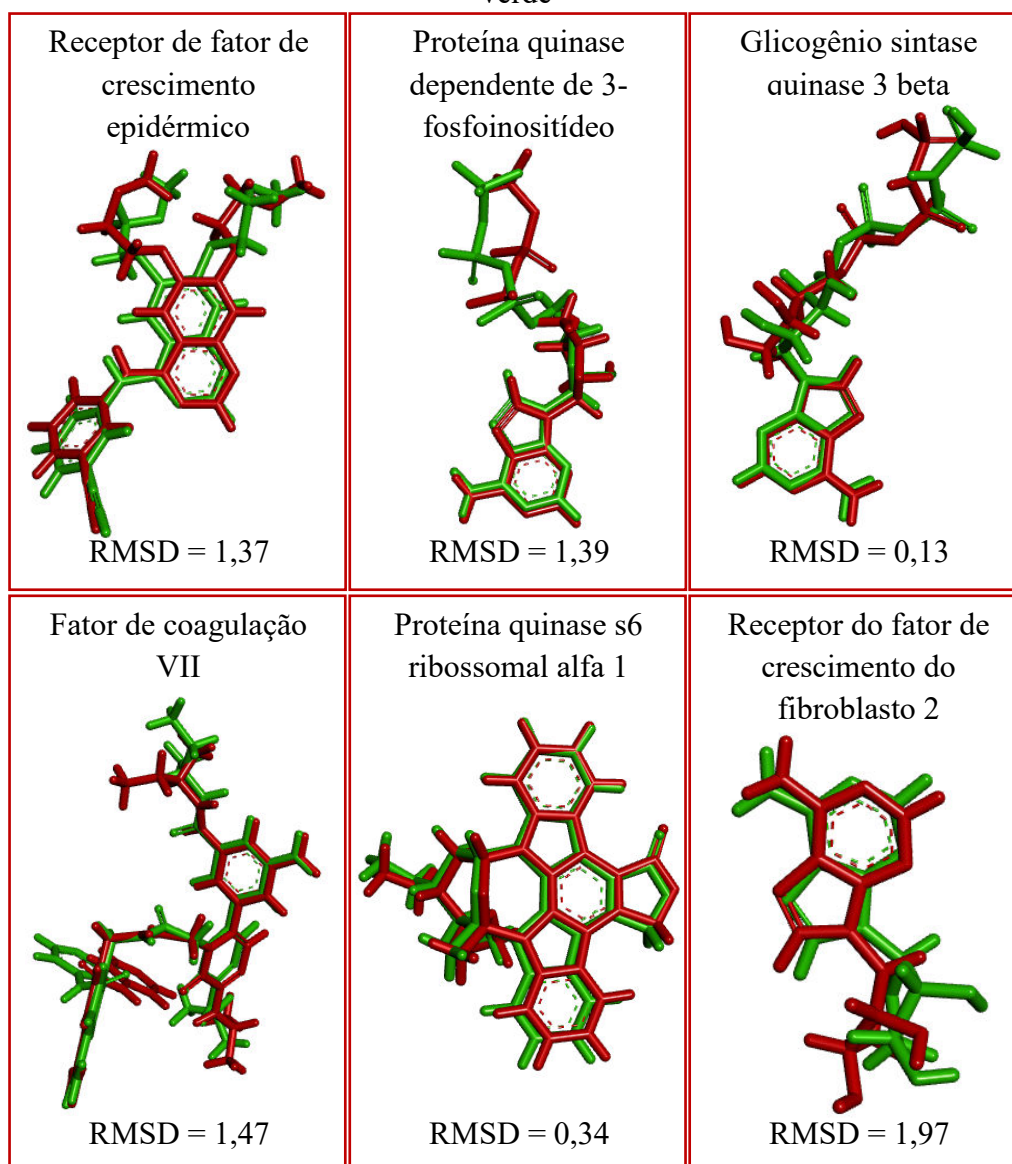
Pode-se observar que algumas moléculas de consulta apresentaram mesmo alvo com melhor pontuação por esse servidor. O flavonoide luteolina-7-*O*-glicosídeo e a cumarina poligaleno apresentaram como alvos em comum a Proteína quinase s6 ribossomal alfa 1 e Proteína quinase CDC42 ativada 1, variando nas pontuações de acoplamento e *Z'*-score. Os ácidos fenólicos avaliados (ácido cafeico, *p*-cumárico e *trans*-ferúlico) também apresentaram vários alvos em comum. Os alvos Carbonil redutase [NADPH] 3 e Ornitina carbamoiltransferase, mitocondrial foram selecionados para os três ácidos fenólicos. Outros alvos foram selecionados para apenas dois deles, como a Maleilacetoacetato isomerase selecionada para os ácidos *trans*-ferúlico e *p*-cumárico, e Ras-relacionada ao substrato C3 da Toxina botulínica 1 e 2-oxoisovalerato deidrogenase subunidade alfa para os ácidos *p*-cumárico e cafeico. O flavonoide rutina não apresentou nenhum alvo em comum com as outras moléculas de consulta.

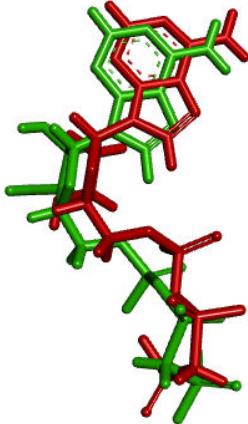
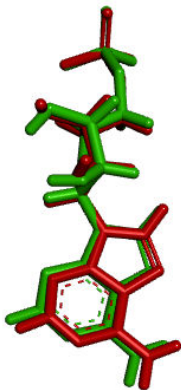
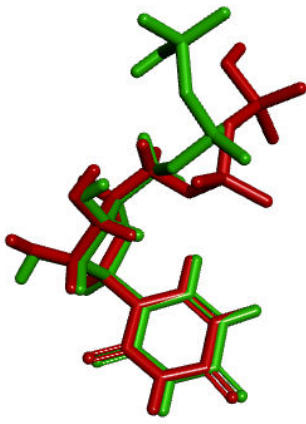
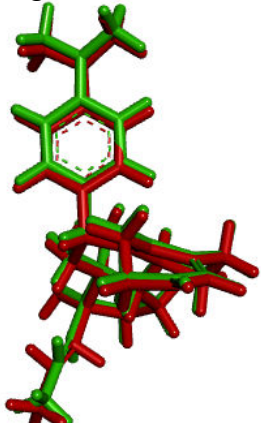
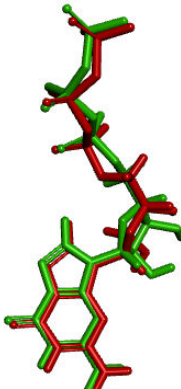
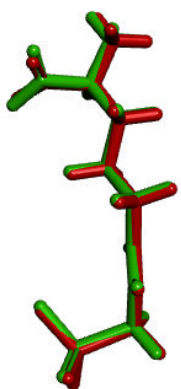
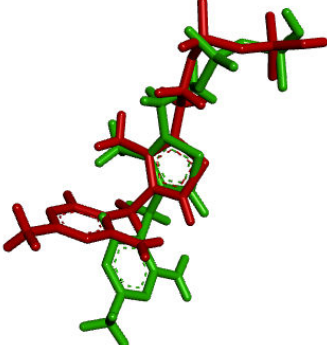
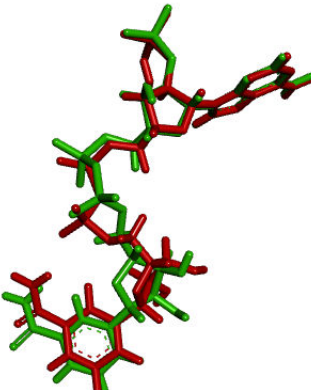
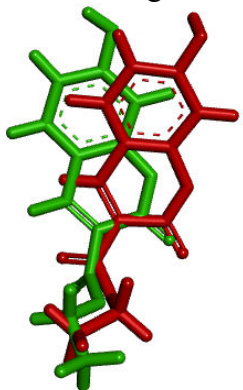
4.3.2.2 Acoplamento molecular

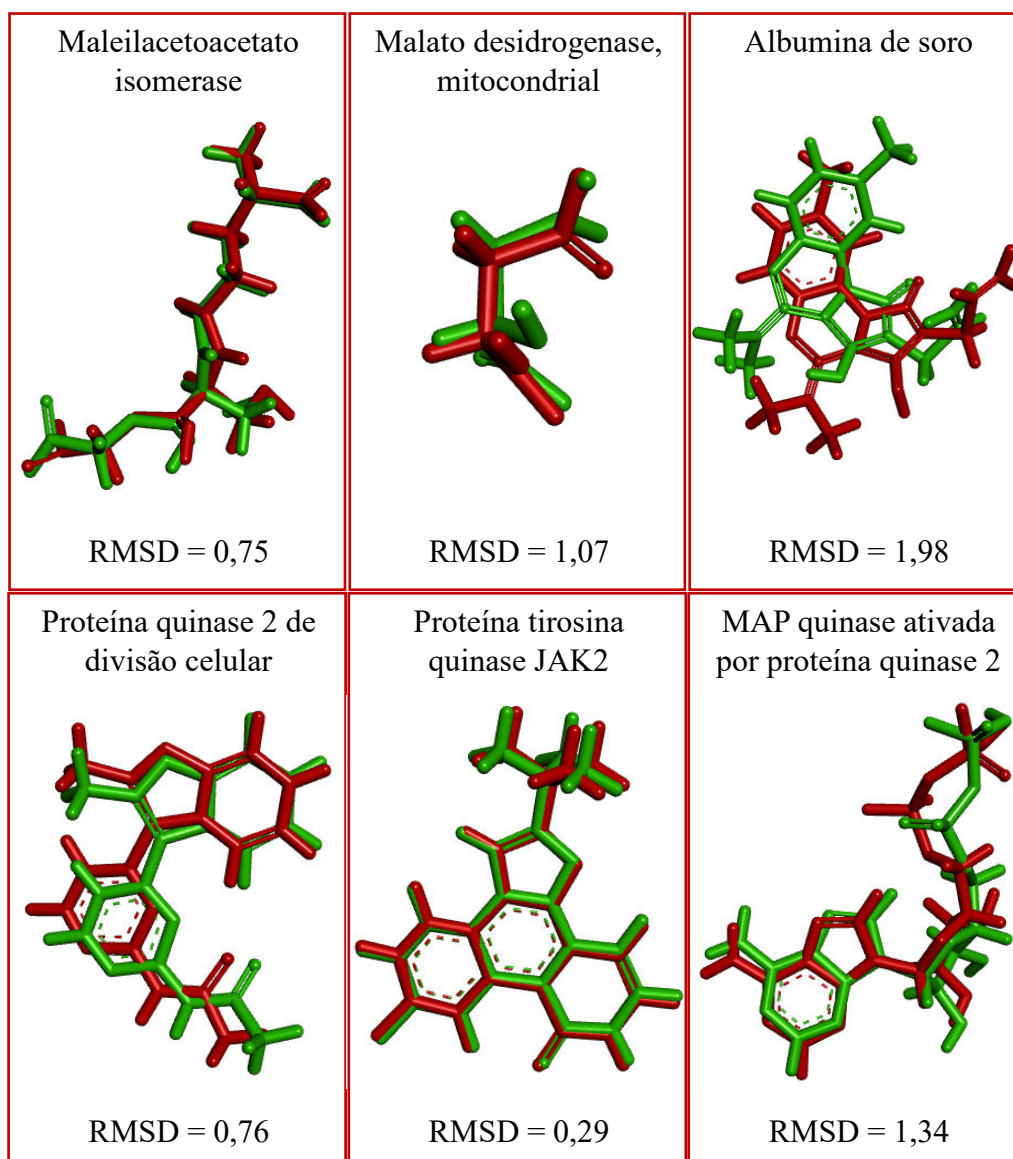
Realizada a seleção das proteínas, as moléculas de consulta e os respectivos ligantes apresentados pelo PDB indicado pelo servidor DRAR-CPI foram submetidos a acoplamento molecular através do programa DOCK 6.7. Assim como para o servidor ChemProt 2.0, o acoplamento molecular objetivou avaliar os perfis de interação das moléculas com seus respectivos alvos, assim como o GRID score. O cálculo do *Root Mean Square Deviation* (RMSD) foi utilizado para determinar o quanto de desvio foi observado a partir da conformação original do ligante após a realização do reacoplamento molecular. A Figura 85

mostra os valores de RMSD para cada alvo selecionado. Observa-se que todos os reacoplamentos moleculares foram realizados de forma adequada, como pode ser observado pelos valores de RMSD obtidos dentro do parâmetro definido na metodologia.

Figura 85 - Valores de RMSD (Å) após o reacoplamento molecular de cada alvo selecionado pelo DRAR-CPI. Configuração cristalográfica em vermelho e ligante após reacoplamento em verde



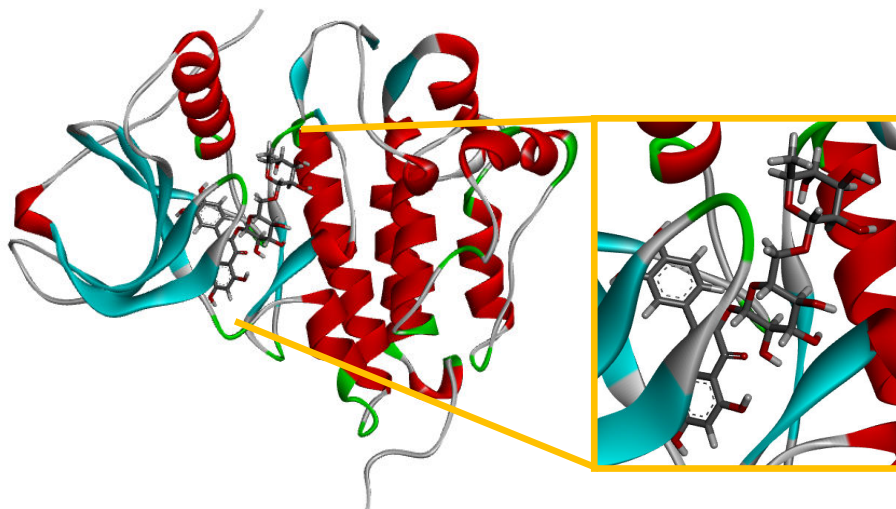
<p>Proteína quinase CDC42 ativada 1</p>  <p>RMSD = 1,46</p>	<p>Proteína 1 da tríade de histidina de ligação do nucleotídeo</p>  <p>RMSD = 0,33</p>	<p>Beta-1,4- galactosiltransferase 1</p>  <p>RMSD = 1,88</p>
<p>Receptor glicocorticoide</p>  <p>RMSD = 0,91</p>	<p>Ras-relacionada ao substrato C3 da Toxina botulínica 1</p>  <p>RMSD = 0,64</p>	<p>Ornitina carbamoiltransferase, mitocondrial</p>  <p>RMSD = 0,20</p>
<p>2-oxoisovalerato deidrogenase subunidade alfa, mitocondrial</p>  <p>RMSD = 1,95</p>	<p>Carbonil redutase [NADPH] 3</p>  <p>RMSD = 1,11</p>	<p>Fator inibitório de migração de macrófago</p>  <p>RMSD = 1,56</p>



4.3.2.2.1 Receptor do fator de crescimento epidérmico (RFCE)

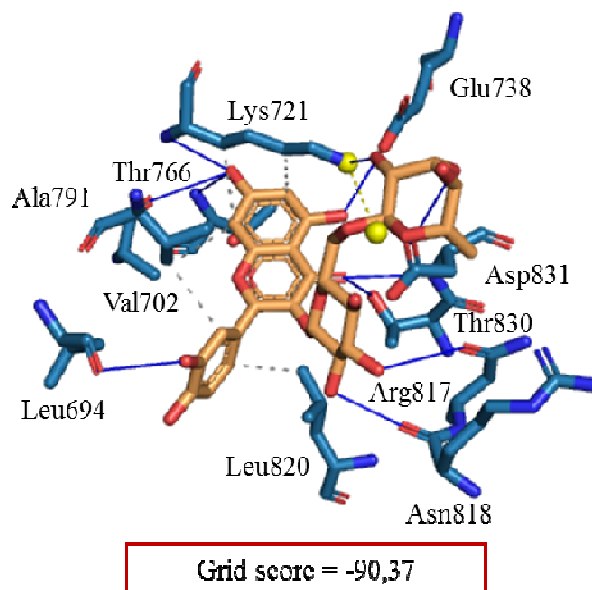
A estrutura cristalina do receptor do fator de crescimento epidérmico (1M17) foi determinada na resolução de 2,6 Å, com e sem o inibidor específico, atualmente em ensaios clínicos de Fase III como um agente antineoplásico, Erlotinib (STAMOS; SLIWKOWSKI; EIGENBROT, 2002). O servidor DRAR-CPI realizou o acoplamento com a molécula de consulta (rutina), como pode ser observado na Figura 86.

Figura 86 - Acoplamento da rutina com o alvo 1M17 pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1.



Através da submissão da molécula de consulta rutina no servidor PLIP, pode-se observar que esse flavonoide interage com o alvo RFCE através de ligações hidrofóbicas entre o núcleo flavonoídico e os resíduos Val702, Ala719, Lys721 e Leu820. O resíduo Lys721 também interage com a molécula através de ponte salina e ligação de hidrogênio entre sua amina terminal e a porção glicosídica. Outras ligações de hidrogênio que ocorrem com a porção glicosídica são com os resíduos Asp831, Asn818 e Arg817. No anel A da rutina observa-se ligações de hidrogênio entre a hidroxila em C5 e a hidroxila do grupo carboxila terminal de Glu738, e entre a hidroxila em C7 e a amina de Thr766 e Lys721, o oxigênio carbonílico de Ala719. O anel B apresenta ligação de hidrogênio entre a hidroxila de C3' e o oxigênio carbonílico de Leu694. Por fim, o anel C exibe ligações de hidrogênio entre o átomo de oxigênio carbonílico e a amina de Asp831 e a hidroxila de Thr830 (Figura 87).

Figura 87 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da rutina com RFCE. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela



Stamos, Sliwkowski e Eigenbrot (2002) avaliaram a complexação do Erlotinib com o receptor do fator de crescimento epidérmico (RFCE) e observaram que o átomo de nitrogênio N1 da quinazolina aceita um hidrogênio (ligação de hidrogênio) do nitrogênio amida do resíduo Met769. O outro átomo de nitrogênio da quinazolina (N3) não está dentro da distância de ligação de hidrogênio da cadeia lateral de Thr766 (4,1 Å), mas uma molécula de água preenche essa lacuna.

O perfil de interação obtido pela submissão do complexo de código PDB 1M17 no servidor PLIP (Figura 88), apresentou as duas interações citadas por Stamos, Sliwkowski e Eigenbrot (2002), com os resíduos Met769 e Thr766, porém apresentou outras interações adicionais, do tipo hidrofóbica com os resíduos do bolsão hidrofóbico. A rutina não apresentou a ligação de hidrogênio com o resíduo Met769, porém com o resíduo Thr766 a ligação de hidrogênio foi direta, não havendo necessidade de molécula de água para mediá-la. Além disso, esse flavonoide apresentou outras interações com resíduos do sítio ativo do alvo, tanto do tipo hidrofóbica quanto ligações de hidrogênio. Todas as interações estão listadas na Tabela 35.

Figura 88 - Perfil de interação do ligante Erlotinib com RFCE. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, interações de hidrogênio mediada por água

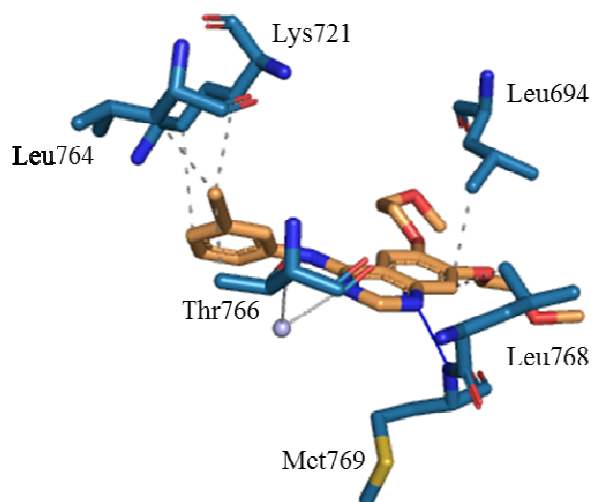


Tabela 35 - Perfil de interação com o alvo receptor do fator de crescimento epidérmico

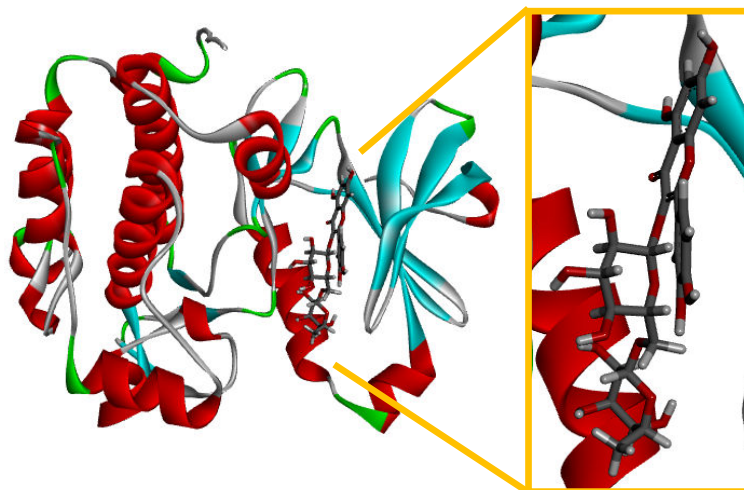
Stamos, Sliwkowski e Eigenbrot (2002)	Ligante (Erlotinib)	Rutina
Interações hidrofóbicas		
	Leu694	Val702
		Ala719
	Lys721 (2x)	Lys721 (2x)
	Leu764	
	Thr766	
	Leu768	
		Leu820
Ligaçõesceptoras de hidrogênio		
		Lys721 (2x)
		Glu738
		Thr766
Met769	Met769	Thr830
		Asp831
Ligaçõesdoadoras de hidrogênio		
		Leu694
		Ala719
		Glu738
		Arg817
		Asn818
		Asp831
Ligaçõesceptoras de hidrogênio através de pontes de água		
Thr766	Thr766	
Pontes salinas		
		Lys721

Os resultados obtidos com o cálculo de acoplamento molecular corroboram com os perfis de interação apresentados. Observa-se que a rutina apresentou resultado significativamente superior ao apresentado pelo inibidor Erlotinib (Grid score = -65,63). Dessa forma, sugere-se que a rutina tem potencial em apresentar atividade inerentes a inibição desse alvo.

4.3.2.2.2 Proteína quinase dependente de 3-fosfoinosítídeo (CD3F)

Proteína quinase dependente de 3-fosfoinosítídeo fosforila várias proteínas quinases da família AGC (AMPC-dependentes, GMPc-dependentes, proteína-quinase C), resultando na ativação das mesmas. Essa proteína está relacionada a geração de tumores malignos no ovário, mama e pâncreas (GAGLIARDI et al, 2012). Em estudo feito por Komander e colaboradores (2005), esse alvo (2BIY) foi acoplado molecularmente com os ligantes adenosina-5'-trifosfato (ATP), glicerol e íon sulfato. Na Figura 89 pode-se observar o acoplamento do mesmo alvo com a rutina, realizado pelo servidor em questão.

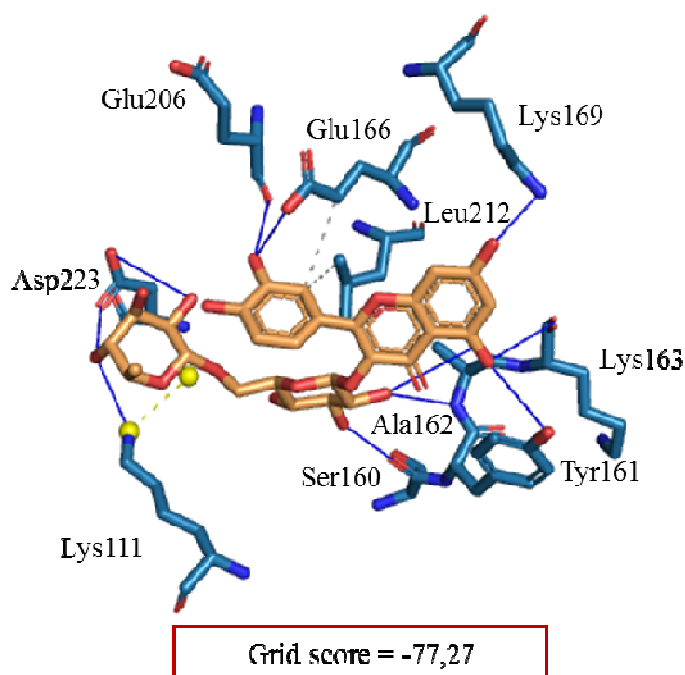
Figura 89 - Acoplamento da rutina com o alvo 2BIY pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1.



O flavonoide rutina, quando acoplado a proteína quinase dependente de 3-fosfoinosítídeo, apresenta interações hidrofóbicas entre o anel flavonoídico B e os resíduos Glu166 e Leu212. Ponte salina é observada entre a porção glicosídica e o resíduo Leu111. Várias ligações de hidrogênio são observadas. Na porção glicosídica, essas interações ocorrem com os resíduos Lys111, Asp223, Ser160, Tyr161 e Ala162. O resíduo Tyr161 também faz ligação de hidrogênio através de sua hidroxila em C4 com a hidroxila em C5 do anel flavonoídico A. Essa mesma hidroxila do flavonoide faz ligação de hidrogênio com o oxigênio carbonílico de Lys163. Outra ligação de hidrogênio observada no anel A, ocorre

entre a hidroxila em C3 e a amina terminal de Lys169. No anel B, observa-se ligação de hidrogênio entre a hidroxila em C3' e o oxigênio carbonílico de Glu209 e a hidroxila do grupo carboxila de Glu166 (Figura 90).

Figura 90 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da rutina com CD3F. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela



Komander e colaboradores (2005) afirmam que na proteína quinase dependente de 3-fosfoinosítido, a interação de hidrogênio que ocorre entre o resíduo Lys111 e o grupo fosfato da molécula de adenosina-5'-trifosfato (ATP) é necessária para a realização de fosforilação, como ocorre na maioria das proteínas quinase..

O perfil de interação obtido pela submissão do complexo de código PDB 2BIY no servidor PLIP (Figura 91), apresentou a interação com o resíduo Lys111, porém do tipo ponte salina e ligação de hidrogênio, porém mediada por molécula de água, diferente da ligação direta como encontrada por Komander e colaboradores (2005). As outras ligações foram equivalentes entre si. O flavonoide rutina apresentou a interação de hidrogênio com o resíduo Lys111 e diversas outras interações do mesmo tipo com outros resíduos, sendo que com os resíduos Ala162, Glu166 e Ser160 também foram apresentadas pelos autores citados. Outras interações são apresentadas na Tabela 36.

Figura 91 - Perfil de interação do ligante ATP com CD3F. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela

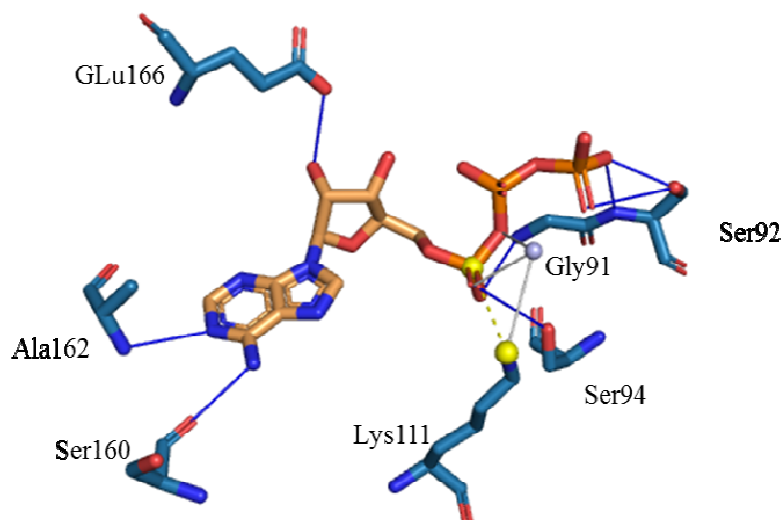


Tabela 36 - Perfil de interação com o alvo proteína quinase dependente de 3-fosfoinosítídeo

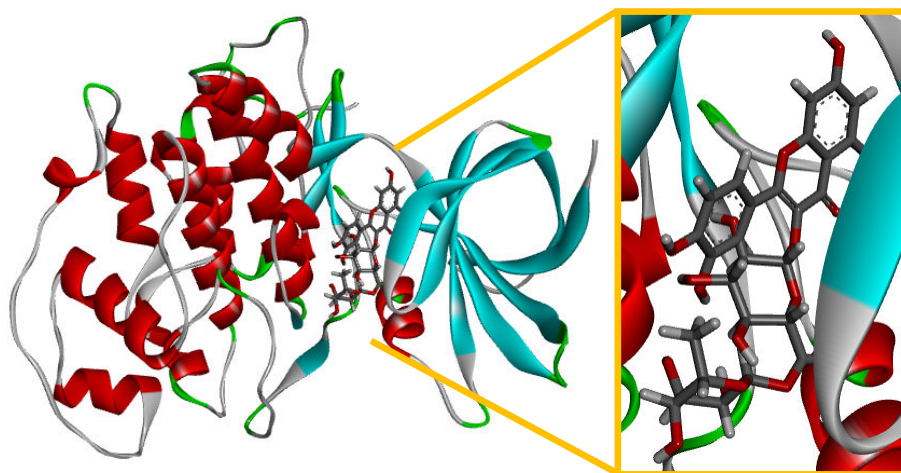
Komander et al (2005)	Ligante (ATP)	Rutina
Interações hidrofóbicas		
		Glu166
Leu212		Leu212
Ligaçõesceptoras de hidrogênio		
	Gly91	
Ser92 (2x)	Ser92	
Ser94	Ser94	
Lys111		Lys111
		Tyr161
Ala162	Ala162	Ala162
	Glu166	Glu166
		Lys169
Ligaçõesdoadoras de hidrogênio		
	Ser92 (2x)	
	Ser94	
Ser160	Ser160	Ser160
		Ala162
		Lys163
Glu166	Glu166	
		Glu209
		Asp223
Ligaçõesceptoras de hidrogênio através de pontes de água		
	Lys111 (2x)	
Pontes salinas		
	Lys111	Lys111

Com os resultados do cálculo de energia de acoplamento pode-se observar que o ligante ATP possui energia de acoplamento maior (Grid score = -89,43) que a rutina. Porém não se descarta a potencialidade de atuação da mesma no alvo em questão.

4.3.2.2.3 Glicogênio sintase quinase 3 β (GSQ3 β)

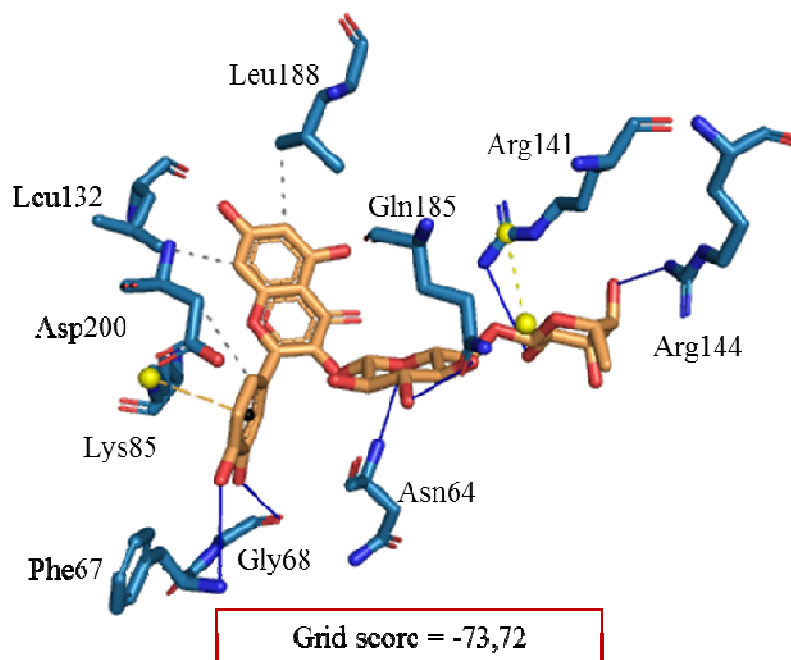
O alvo Glicogênio sintase quinase 3 β (GSQ3 β) é uma serina/treonina-proteína-quinase que participa na doença de Alzheimer (AOKI et al, 2004). Em estudo feito por Aoki e colaboradores (2004), foi obtida a estrutura binária completa dessa proteína quinase resolvida pelo método de difração de raio X, com resolução de 1,8 Å. Nesse estudo o alvo foi acoplado com derivado éster do ácido fosfoaminofosfônico (ligante). A Figura 92 apresenta o acoplamento desse alvo (1J1B) com a rutina gerado pelo programa DRAR-CPI.

Figura 92 - Acoplamento da rutina com o alvo 1J1B pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1.



A rutina acopla com o alvo GSQ3 β através de interações hidrofóbicas entre a porção flavonoídica da molécula e os resíduos Leu132, Leu188 e Asp200. Ponte salina é observada entre a porção glicosídica e o resíduo Arg141, bem como interação π -cátion ocorre entre o anel B e Lys85. Arg141 também faz ligação de hidrogênio com a porção glicosídica, assim como os resíduos Gln185, Asn64 e Arg144. Na porção flavonoídica, as ligações de hidrogênio são observadas apenas no anel B, entre as hidroxila C4' e C5' e os resíduos Phe67 (-NH₂) e Gly68 (-C=O) (Figura 93).

Figura 93 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da rutina com GSQ3 β . Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela, interações π -cátion: barras tracejadas laranja



Aoki e colaboradores (2004) determinaram a estrutura cristalográfica do complexo do análogo do ATP conhecido como adenilil-imidodifosfato (AMPPNP), com o alvo GSQ3 β , à resolução de 1.8Å. Nesse estudo, eles observaram que a molécula de AMPPNP liga-se aos resíduos de aminoácido na fenda entre os dois domínios principais do alvo GSQ3 β . O anel de adenina acopla na bolsa hidrofóbica formada por Ile62, Val70, Ala83, Val110, Leu132 e Leu188. A base de purina também interage especificamente com o átomo de oxigênio do resíduo Asp133. Interação entre o grupo NH₂ do resíduo Arg141 e átomo de nitrogênio do anel de adenina ocorre através de duas moléculas de água. O grupo NH₂ do resíduo Arg141 também faz interação de hidrogênio mediada por água com a parte açúcar do ligante

Átomo de oxigênio do açúcar faz ligações de hidrogênio com átomo de oxigênio carboxílico da cadeia principal de Gln185 e com o átomo de oxigênio hidroxílico de Thr138 por meio de duas moléculas de água. A cadeia lateral de Lys85 interage com os grupos α - e β -fosforil, que auxilia na estabilização do grupo fosforilo durante a fosforilação. Além disso, o grupo γ -fosforil do AMPPNP faz ligação de hidrogênio com o resíduo Asn186.

O perfil de interação obtido pela submissão do complexo de código PDB 1J1B no servidor PLIP (Figura 94), apresentou semelhança na maioria das interações, com exceção das interações hidrofóbicas, não apresentadas pelo método utilizado pelo servidor. A rutina, por sua vez, interage com os principais resíduos de interação do ligante AMPPNP, porém

havendo algumas discrepâncias no tipo de interação. O resíduo Arg141, por exemplo, interage através de ligação de hidrogênio direta e por ponte salina com a rutina, e por ligação de hidrogênio mediada por água com o ligante. O resíduo Gln85 faz duas ligações de hidrogênio com o flavonoide, enquanto que apenas uma com o AMPPNP. Todas as interações estão apresentadas na Tabela 37.

Figura 94 - Perfil de interação do ligante AMPPNP com GSQ3 β . Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barras azuis, ligações de hidrogênio mediadas por água: barras cinza, pontes salina: barras pontilhadas amarela

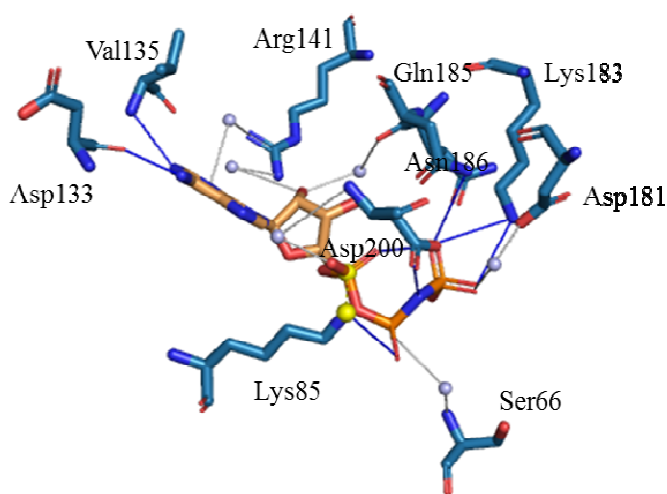


Tabela 37 - Perfil de interação com o alvo Glicogênio sintase quinase 3 β

Aoki et al (2004)	Ligante (AMPPNP)	Rutina
Interações hidrofóbicas		
Ile62		
Val70		
Ala83		
Val110		
Leu132		Leu132
Leu188		Leu188
		Asp200
Ligaçõesceptoras de hidrogênio		
		Asn64
		Phe67
Lys85	Lys85	
	Val135	
		Arg141
		Arg144
	Lys183	
Asn186	Asn186	
Ligaçõesdoadoras de hidrogênio		
		Gly68
Asp133	Asp133	

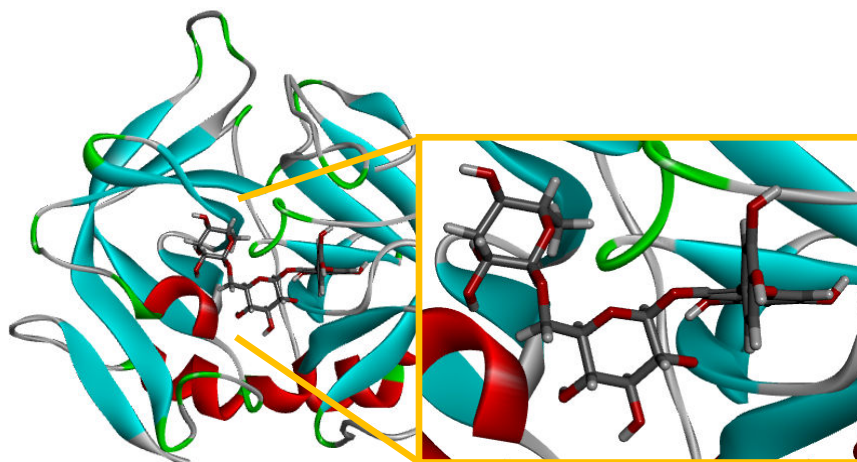
Lys183 (2x)		
Gln185		Gln185 (2x)
Asp200 (2x)		
Ligações aceptoras de hidrogênio através de pontes de água		
Ser66		
Arg141 (2x)		Arg141 (2x)
Asp181		
Asp200		
Ligações doadoras de hidrogênio através de pontes de água		
Thr138		
Gln185		
Interações π-cátion		
		Lys85
Pontes salinas		
		Lys85
		Arg141

Quanto aos resultados obtidos através do cálculo de energia de acoplamento (GRID score), o ligante em questão apresentou melhor valor (Grid score = -92,38) do que o obtido para o flavonoide rutina. Porém, tal resultado ainda indica potencialidade para a mesma na atuação sobre o alvo GSQ3 β .

4.3.2.2.4 Fator de coagulação VII (FC VII)

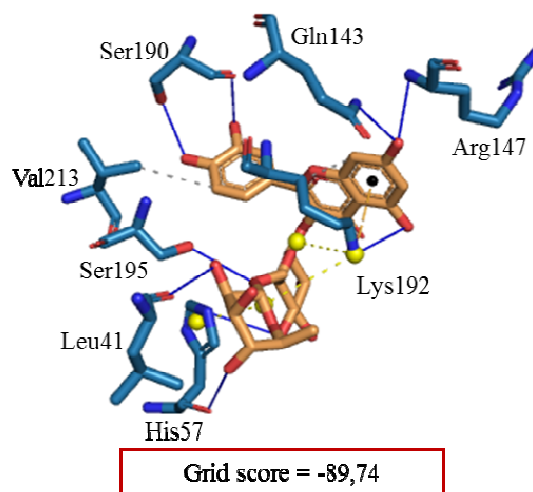
Estudos como o de Ben-Hadj-Khalifa e colaboradores (2013) documentam que elevados níveis de fator de coagulação VII (FC VII) contribuem para o surgimento de problemas cardiovasculares. Schweitzer e colaboradores (2005) descreveram a estrutura, síntese, e atividade enzimática de série de pirazinonas como inibidores do fator de coagulação VII (1Z6J). O acoplamento da molécula de consulta rutina é apresentado na Figura 95.

Figura 95 - Acoplamento da rutina com o alvo 1Z6J pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1.



O acoplamento do flavonoide rutina com o alvo FCVII mostrou interações hidrofóbicas entre a porção flavonoídica e os resíduos Lys192 e Val213. O resíduo Lys92 também realiza interações π -cátion, entre sua amina terminal e o anel A, e pontes salina, entre sua amina terminal e a porção glicosídica. Ponte salina também é observada entre o anel imidazol de His57 e a porção glicosídica do flavonoide. Ainda na porção glicosídica, pode-se observar ligações de hidrogênio com os resíduos His57, Ser195 e Leu41. No anel A, a hidroxila em C3 faz ligação de hidrogênio com a amida terminal da Gln143 e com a amina da Arg147. No anel B, ambas hidroxilas, C3' e C4', fazem ligação de hidrogênio com o oxigênio carbonílico e com a hidroxila terminal de Ser190 (Figura 96).

Figura 96 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da rutina com FC VII. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela, interações π -cátion: barras tracejadas laranja



O estudo de Schweitzer e colaboradores (2005) apresenta a estrutura cristalográfica do complexo formado pelo alvo FC VII e a molécula 5-[amino (imino) metil]-2-[[[6-[3-amino-5- ((1R)-1-metilpropil) amino} carbonil) fenil]-3-(isopropilamino)-2-oxopirazin-1(2H)-il] acetil] amino) metil]-N-piridin-4-il-benzamida (PY3). A porção benzamidina do inibidor forma ligação iônica (ponte salina) com o grupo carboxilato de Asp189. Além disso, a porção guanidina também forma ligações de hidrogênio com a cadeia lateral de Ser190 e com o grupo carbonila da cadeia principal de Gly219. O inibidor forma três ligações de hidrogênio com átomos da cadeia principal de Ser214 e Gly216. A amina (meta) do grupo fenilo de forma ligações de hidrogênio com as cadeias laterais de Asp60 e Tyr94 e com o grupo carbonila da cadeia principal de Thr99. Outro grupo amida também forma ligação de hidrogênio com o grupo carbonila da cadeia principal de His57.

Ainda outro grupo amida da cadeia lateral de PY3 está envolvido em três interações de hidrogênio. Uma delas é formada entre o nitrogênio amida e cadeia principal de Gly216. As outras duas ocorrem entre o grupo carbonil da amida e o nitrogênio da cadeia principal de PY3 e o nitrogênio terminal de Lys192.

O servidor PLIP forneceu perfil de interação pela submissão do complexo de código PDB 1Z6J, semelhante ao apresentado pelos autores supracitados (Figura 97). A maioria das interações principais foram apresentadas pelo método do servidor em questão. O flavonoide rutina apresentou interações equivalentes às realizadas pelo ligante PY3 com o alvo FC VII. Entretanto, observa-se variação no tipo de interação com alguns dos resíduos principais do sítio de ligação desse alvo. Todas as interações podem ser vistas na Tabela 38. O resultado do

cálculo do GRID score para a rutina foi inferior ao obtido para o ligante PY3 (Grid score = -103,51).

Figura 97 - Grid score e perfil de interação do ligante PY3 com FC VII. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, ligações de hidrogênio mediadas por água, interações π -paralelas: barras tracejadas verde, interações π -cátion: barras tracejadas laranja

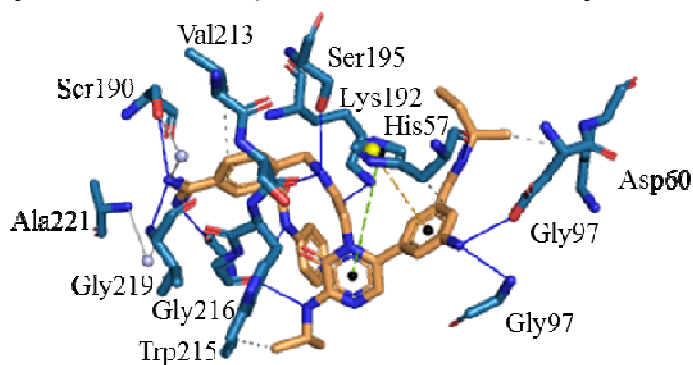


Tabela 38 - Perfil de interação com o alvo Fator de coagulação VII

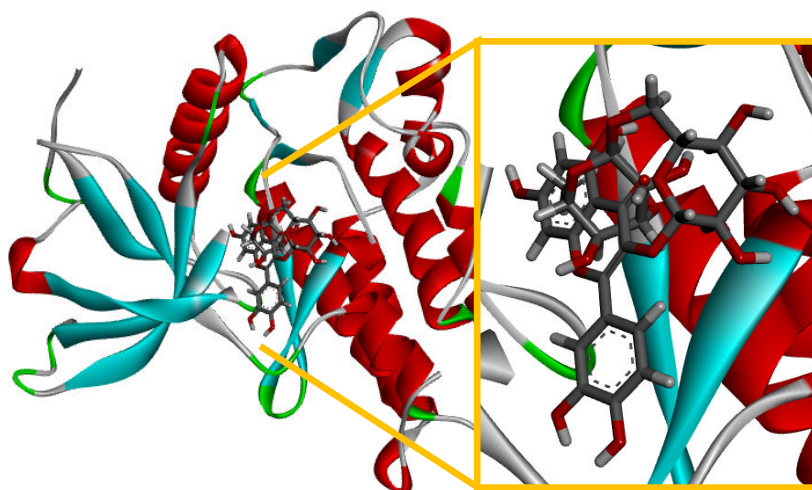
Schweitzer et al (2005)	Ligante (PY3)	Rutina
Interações hidrofóbicas		
	His57	
	Lys60	
		Lys192
	Val213	Val213
	Trp215	
Ligaçõesceptoras de hidrogênio		
	Gly97	
		Gly143
		Arg147
Lys192 (2x)	Lys192	Lys192
	Ser195	Ser195
Gly216		
	Val227	
Ligações doadoras de hidrogênio		
		Leu41
His57	His57	His57 (2x)
Asp60	Asp60	
Tyr94		
Thr99		
Ser190	Ser190	Ser190 (2x)
Ser214	Ser214	
Gly216	Gly216 (2x)	
Gly219	Gly219	
Ligaçõesceptoras de hidrogênio através de pontes de água		
Ser190	Ser190	
	Ala221	

Ligações π-paralela	
His57 (tipo t)	
Interações π-cátion	
His57	
	Lys192
Pontes salinas	
	His57
Asp189	
	Lys192 (2x)

4.3.2.2.5 Receptor do fator de crescimento do fibroblasto 2 (RFCF2)

As mutações de ativação do domínio da tirosina quinase de receptores tirosina-quinases, como o receptor do fator de crescimento do fibroblasto 2 (RFCF2), causam câncer e distúrbios esqueléticos. Nesse sentido, Chen e colaboradores (2007) avaliaram forma de regular a atividade dessa tirosina-quinase (2PVY) com o inibidor adenosina-5'-[beta, gama-metileno]-trifosfato (ACP), na presença de íon sulfato. O acoplamento realizado pelo DRAR-CPI com a rutina é observado na Figura 98.

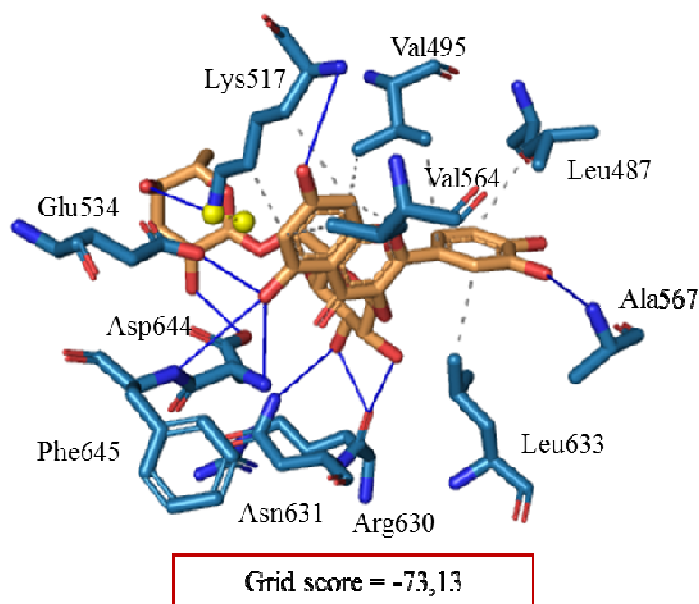
Figura 98 - Acoplamento da rutina com o alvo 2PVY pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1.



No acoplamento da rutina com o alvo RFCF2 são observadas interações hidrofóbicas com os resíduos Leu487, Val495, Lys517, Val564 e Leu633. O resíduo Lys517 também forma ponte salina com a porção glicosídica do flavonoide. Algumas ligações de hidrogênio podem ser observadas também na porção glicosídica, com os resíduos Lys517, Asp644, Asn631 e Arg630. A porção flavonoídica apresenta ligações de hidrogênio nos anéis A e B. No anel B, apenas uma dessas ligações é observada, entre a hidroxila em C3' e a amina de

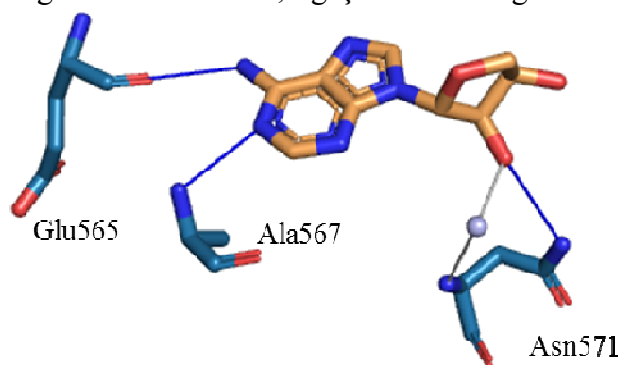
Ala567. No anel A, a hidroxila em C7 faz ligação de hidrogênio com a amina da Lys517, e a hidroxila em C5 faz três ligações desse tipo, com as aminas de Asp644 e Phe645 e com a hidroxila carboxílica de Glu534 (Figura 99).

Figura 99 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da rutina com RFCF2. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis, pontes salina: barras pontilhadas amarela



No estudo de Chen e colaboradores (2007) foi observado que as principais interações que o análogo de ATP utilizado como ligante faz com o RFCF2 ocorrem com os resíduos Leu487, Leu633, Ala567 e Glu565. Na Tabela 41, observa-se que o perfil de interação obtido pela submissão do complexo de código PDB 2PVY no servidor PLIP (Figura 100), também apresentou as interações com os resíduos Ala567 e Glu565, porém não apresentou as interações com os outros dois resíduos, do tipo hidrofóbica.

Figura 100 - Perfil de interação do ligante ACP com RFCF2. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barras azuis, ligações de hidrogênio mediadas por água



O flavonoide avaliado no presente estudo para o alvo em questão apenas não apresentou interação com o resíduo Glu565, como descrito por Chen e colaboradores (2007). Todas as outras interações apresentadas por esses autores também foram encontradas com a rutina, além de diversas outras interações adicionais (Tabela 39). Tais interações forneceram incremento na energia de acoplamento, o qual levou a resultado superior ao obtido com o ligante ACP (Grid score = -37,89). Dessa forma, sugere-se que a rutina apresenta potencial como inibidora do receptor em questão.

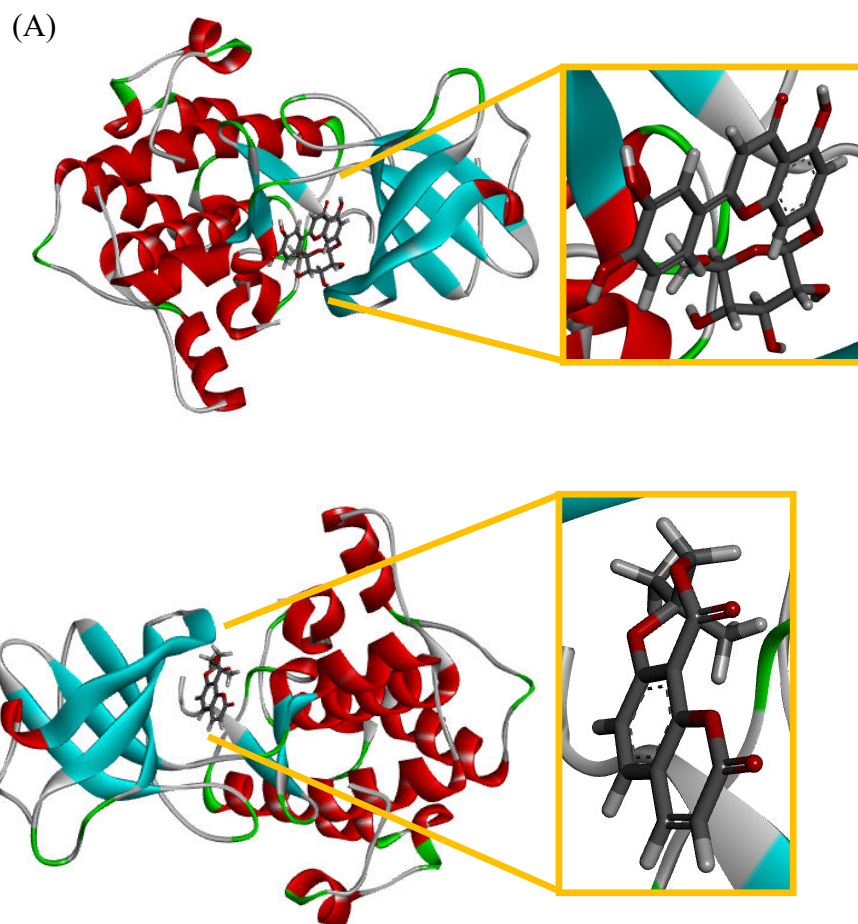
Tabela 39 - Perfil de interação com o alvo receptor do fator de crescimento do fibroblasto 2

Chen et al (2007)	Ligante (ACP)	Rutina
Interações hidrofóbicas		
Leu487		Leu487
		Val495 (2x)
		Lys517 (2x)
		Val564 (2x)
Leu633		Leu633
Ligaçõesceptoras de hidrogênio		
		Lys517 (2x)
Ala567	Ala567	Ala567
	Asn571	
		Asn631
		Asp644
		Phe645
Ligações doadoras de hidrogênio		
		Glu534
Glu565	Glu565	
		Arg630 (2x)
		Asp644
Ligaçõesceptoras de hidrogênio através de pontes de água		
	Asn571	
Pontes salinas		
		Lys517

4.3.2.2.6 Proteína quinase s6 ribossomal alfa 1 (CS6)

A proteína quinase s6 ribossomal alfa 1 (2Z7R) são proteínas-quinases serina/treonina, cujo inibidores, como por exemplo a Estaurosporina, podem atuar como potenciais agentes anticancerígenos e na regulação da atividade catalítica dessas proteínas (IKUTA et al, 2007). Na Figura 101 pode-se observar o acoplamento desse alvo com as moléculas de consulta, luteolina-7-*O*-glicosídeo e poligaleno.

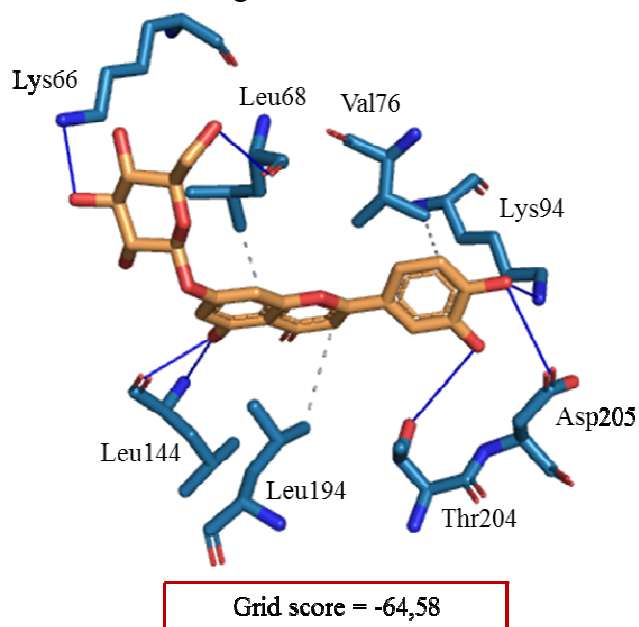
Figura 101 - Acoplamento da luteolina-7-*O*-glicosídeo (A) e do poligaleno (B) com o alvo 2Z7R pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1.



O complexo luteolina-7-*O*-glicosídeo/CS6 apresenta interações hidrofóbicas entre a porção flavonoídica da molécula e os resíduos Leu68, Val76 e Leu194. A hidroxila em C5 do anel A dessa porção faz ligações de hidrogênio com o oxigênio carbonílico e a amina de Leu144. No anel B, observa-se ligações de hidrogênio entre as hidroxilas C4' e C5' e o

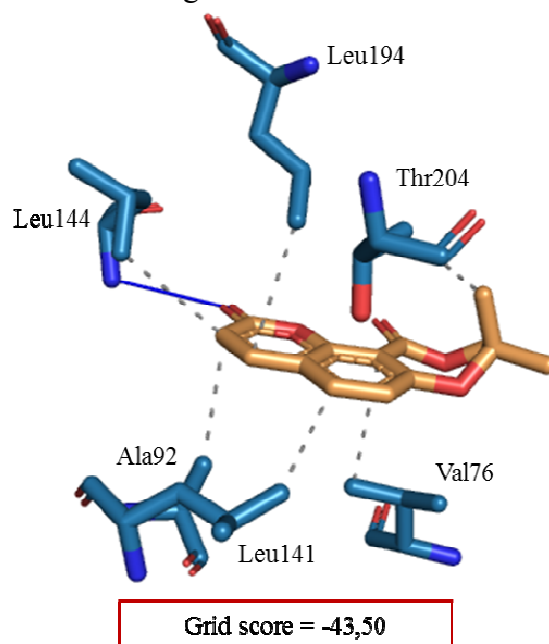
oxigênio carbonílico de Asp205 e a hidroxila de Thr204. A porção glicosídica apresenta ligações de hidrogênio com os resíduos Lys66 e Leu68 (Figura 102).

Figura 102 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da luteolina-7-*O*-glicosídeo com CS6. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis



Já no complexo poligaleno/CS6 observa-se em sua grande maioria interações hidrofóbicas, com os resíduos Val76, Ala92, Leu141, Leu144, Leu194 e Thr204. Apenas uma ligação de hidrogênio é observada, ocorrente entre o oxigênio carbonílico (C2) e a amina do resíduo Leu144 (Figura 103).

Figura 103 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do poligaleno com CS6. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis



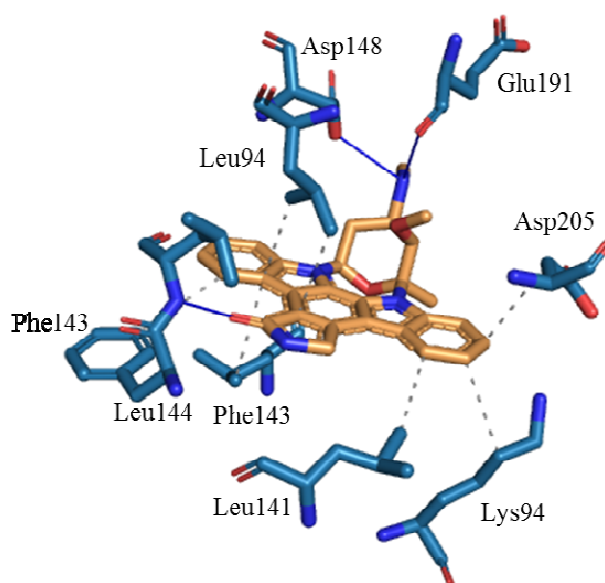
No estudo de Ikuta e colaboradores (2007), eles observaram que o ligante Estaurosporina (STU) se liga no sítio de ligação de ATP com o anel de tetra-hidropirano em conformação de barco. Um dos lados do núcleo hidrofóbico do carbazol torna favorável interações do tipo hidrofóbica com as cadeias principais e laterais dos resíduos Leu68, Val76, Ala92, Lys94, Leu141 e Phe143. O outro lado do núcleo carbazol faz interações com as cadeias laterais de Val125, Leu194 e Asp205 a partir de ambos os lóbulos N- e C-terminais. O anel de tetrahidropirano acopla-se no sítio de ligação ribose cercado por Asp148, Asn192, Leu194, Ser204 e Asp205. O átomo N1 de estaurosporina na porção lactama faz ligação de hidrogênio com o oxigênio carbonílico de Asp142, enquanto átomo O5 do inibidor aceita ligação de hidrogênio a partir do nitrogênio da amida de Leu144. Este padrão de ligações de hidrogênio é comum em muitos complexos de quinase-ATP proteína conhecida.

O átomo N4 de estaurosporina no anel tetrahidropirano faz ligação de hidrogênio com Asp148 de CS6. Acredita-se que a conformação de barco do anel de tetrahidropirano seja biologicamente ativa (FURET et al., 1995). Esta conformação permite que o átomo de N4 de estaurosporina faça essa ligação com Asp148. Esse mesmo átomo de N também faz ligação de hidrogênio com o resíduo Glu191.

O perfil de interação obtido pela submissão do complexo de código PDB 2Z7R no servidor PLIP (Figura 104), apresentou-se bastante semelhante ao encontrado por Ikuta e

colaboradores (2007). O flavonoide luteolina-7-*O*-glicosídeo, avaliado no presente estudo, apresentou interações com a maioria dos resíduos citados pelos autores em questão, porém com algumas mudanças no tipo de ligação e ainda algumas interações com resíduos diferentes. A exemplo da primeira situação, pode-se citar a ligação doadora de hidrogênio com Leu144 e acceptoras de hidrogênio com Lys94, apresentadas pela Estaurosporina como acceptora e hidrofóbica, respectivamente. Por outro lado, o flavonoide também apresentou interações com Lys66, Thr204 e Asp205 não apresentadas pelo ligante.

Figura 104 - Perfil de interação do ligante STU com CS6. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinza, ligações de hidrogênio: barras azuis



Por outro lado, a cumarina poligaleno apresentou interações com os resíduos Val76, Ala92, Leu194, Leu144, Leu141 e Thr204. Apenas as interações hidrofóbicas com Leu144 e Thr204 não foram apresentadas pela Estaurosporina. Esse perfil de interação é refletido pelo resultado obtido no cálculo de energia de acoplamento, onde a cumarina em questão apresentou resultado inferior as outras moléculas. A Estaurosporina apresentou o melhor resultado dentre elas (Grid score = -80,28), porém o resultado obtido para a luteolina-7-*O*-glicosídeo não permite descartar a potencialidade da mesma como inibidor desta proteína. Os perfis de interação estão resumidos na Tabela 40.

Tabela 40 - Perfil de interação com o alvo proteína quinase s6 ribossomal alfa 1 Ikuta et al (2007) Ligante (STU) Luteolina-*O*-glicosídeo Poligaleno

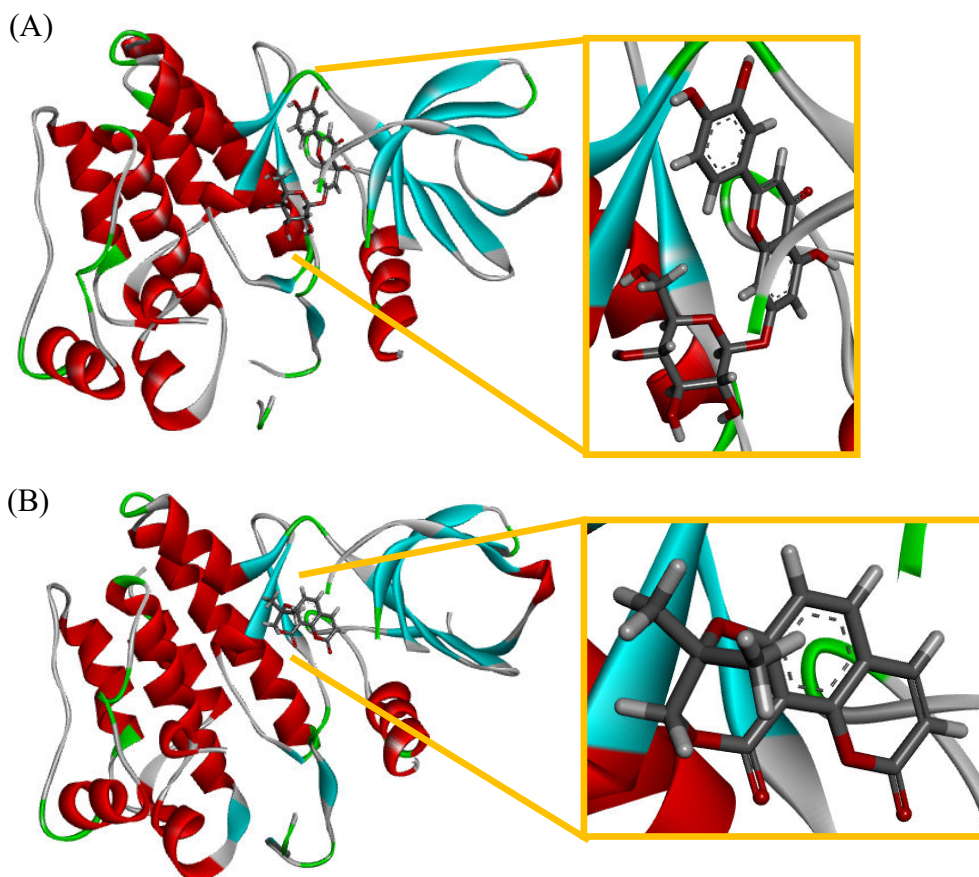
Interações hidrofóbicas			
Leu68	Leu68	Leu68	
Val76		Val76	Val76
Ala92			Ala92

Lys94	Lys94		
Val125			
Leu141	Leu141		Leu141
			Leu144
Phe143	Phe143		
Leu194	Leu194 (2x)	Leu194	Leu194
			Thr204
Asp205	Asp205		
Ligaçõesceptoras de hidrogênio			
		Lys66	
		Lys94	
Leu144	Leu144	Leu144	Leu144
	Asp148		
Ligações doadoras de hidrogênio			
		Leu68	
Asp142			
		Leu144	
Asp148			
Glu191	Glu191		
		Thr204	
		Asp205	

4.3.2.2.7 Proteína quinase CDC42 ativada 1

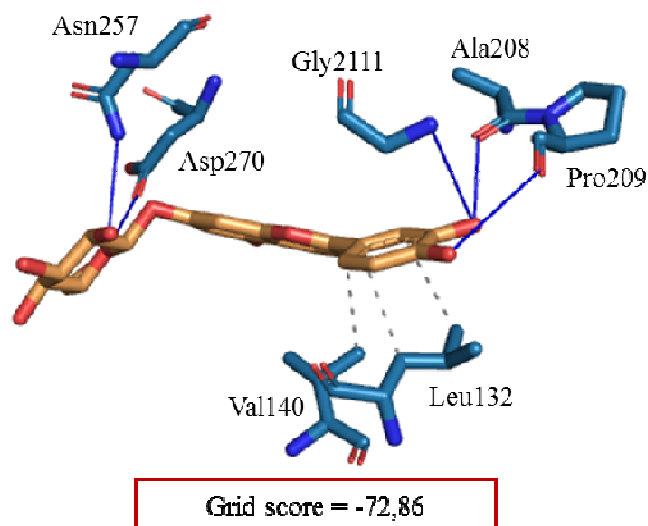
Alguns estudos relacionam a proteína quinase CDC42 ativada 1 com o desenvolvimento de células cancerígenas, como demonstrado por Redelman-Sidi e colaboradores (2013). Outro estudo determinou as estruturas cristalinas fosforilada e não fosforilada dos domínios quinase da tirosina-quinase CDC42 (1U54) associada ACK1 (multidomínio não receptor tirosina quinase) (LOUGHEED et al, 2004). O acoplamento do alvo em questão com as moléculas de consulta analisadas pelo DRAR-CPI é apresentado na Figura 105.

Figura 105 - Acoplamento da luteolina-7-*O*-glicosídeo (A) e do poligaleno (B) com o alvo 1U54 pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1.



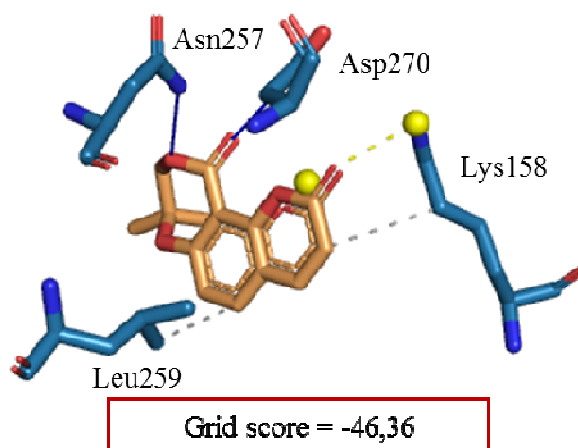
A luteolina-7-*O*-glicosídeo, quando acoplada a proteína CDC42, apresenta interações hidrofóbicas com os resíduos de aminoácidos Leu132 e Val140. As outras interações apresentadas consistem apenas em ligações de hidrogênio. Na porção glicosídica, essas interações ocorrem com os resíduos Asn257 e Asp270. Na porção flavonoídica, as ligações de hidrogênio são observadas apenas no anel B, entre a hidroxila em C4' e o oxigênio carbonílico de Pro209, e entre a hidroxila em C5' e o oxigênio carbonílico de Ala208 e a amina terminal de Gly211 (Figura 106).

Figura 106 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da luteolina-7-*O*-glicosídeo com CDC42. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul



O poligaleno, por sua vez, acoplado a proteína CDC42, apresenta interações hidrofóbicas entre o núcleo cumarínico e os resíduos Lys158 e Leu259. Ponte salina é observada entre o grupamento éster do núcleo cumarínico (O1 e C2=O) e a amina terminal de Lys158. As ligações de hidrogênio ocorrem no anel de 7 membros, entre o oxigênio carbonílico (C1) e o oxigênio carbonílico terminal de Asp270, e entre o átomo de oxigênio do anel (O2) e a amida terminal de Asn257 (Figura 107).

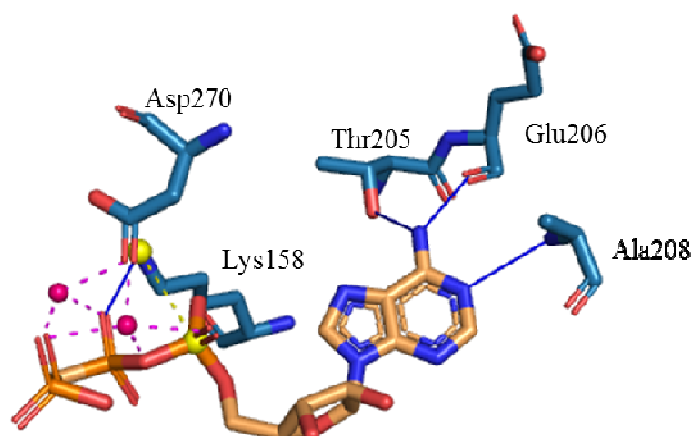
Figura 107 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do poligaleno com CDC42. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela



Segundo Loughheed e colaboradores (2004), o ligante análogo do ATP, Adenosina-5'-[β , γ -metileno]-trifosfato (ACP), interage com a referida proteína da seguinte maneira: a porção de adenina forma duas ligações de hidrogênio os resíduos Glu206 e Ala208, e os

grupos fosfatos estão ligados por pontes salinas formadas entre os β -oxigênios dos grupos fosfato e a cadeia lateral da Lys158. O perfil de interação obtido pela submissão do complexo de código PDB 1U54 no servidor PLIP, apresentou resultado semelhante, como mostrado na Tabela 41 e Figura 108.

Figura 108 - Perfil de interação do ligante ACP com CDC42. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela



As moléculas de consulta acopladas a proteína quinase CDC42 ativada 1 apresentaram perfis diferentes ao apresentado pelo ligante ACP. O flavonoide luteolina-7-*O*-glicosídeo apresentou interação somente com o resíduo Ala208 em comum com o ACP, porém com perfil de interação diferente. No primeiro caso a interação encontrada foi do tipo ligação doadora de hidrogênio, em contrapartida, no segundo caso a interação foi do tipo ligação aceptora de hidrogênio. Tal flavonoide apresentou outras interações com o alvo, mas com resíduos diferentes. A cumarina poligaleno, por sua vez, apresentou interação idêntica ao apresentado pelo ACP com o resíduo Lys158. Outras interações hidrofóbicas foram apresentadas por essa molécula de consulta.

Tabela 41 - Perfil de interação com o alvo proteína quinase CDC42 ativada 1			
Lougheed et al (2004)	Ligante (ACP)	Luteolina-7-<i>O</i>-glicosídeo	Poligaleno
Interações hidrofóbicas			
		Leu132 (2x)	
		Val140	
			Lys158
			Leu259
Ligações aceptoras de hidrogênio			
	Lys158		
	Thr205		
Ala208	Ala208		
		Gly211	
		Asn257	Asn257

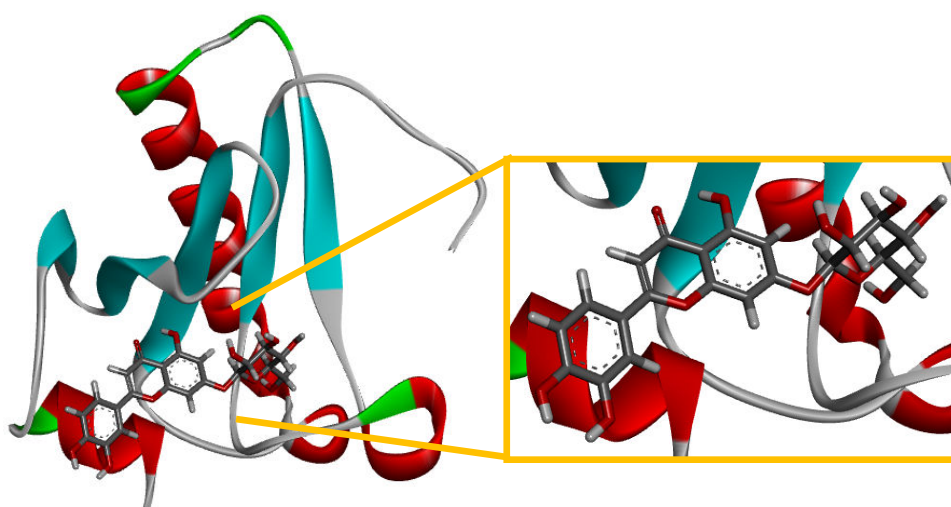
		Asp270	Asp270
Ligações doadoras de hidrogênio			
Glu206	Glu206		
		Ala208	
		Pro209	
Arg256			
Pontes salinas			
Lys158	Lys158		Lys158

Os resultados encontrados no cálculo de energia de acoplamento mostram que o ligante ACP apresenta resultado significativamente maior (Grid score = -232,16) que os obtidos pelas moléculas de consulta. Entre estas, a luteolina-7-*O*-glicosídeo se destacou.

4.3.2.2.8 Proteína 1 da triáde de histidina de ligação do nucleotídeo (P1TH)

Estudos indicam que a proteína 1 da triáde de histidina de ligação do nucleotídeo está implicada na patofisiologia de determinados distúrbios psiquiátricos e também exibe propriedades supressoras de tumor (LINDE et al, 2013). Lima, Klein e Hendrickson (1997) fizeram análise baseada na estrutura dessa proteína (1KPF) e utilizaram como ligante adenosina monofosfato. O DRAR-CPI realizou o acoplamento dessa mesma proteína com a luteolina-7-*O*-glicosídeo (Figura 109).

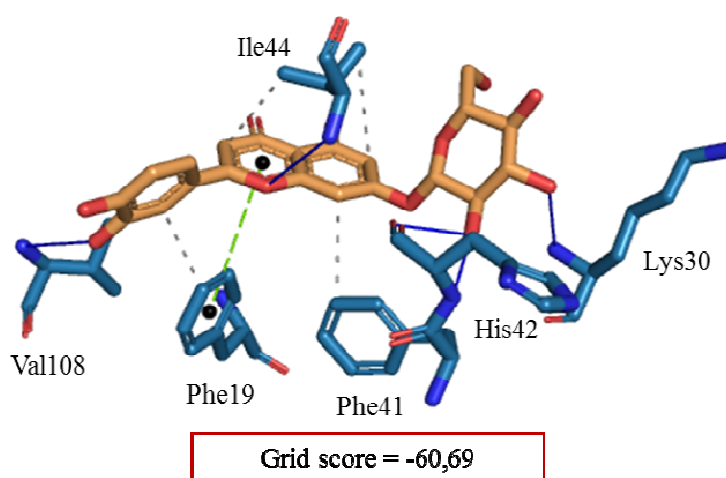
Figura 109 - Acoplamento da luteolina-7-*O*-glicosídeo com o alvo 1KPF pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1.



O acoplamento do flavonoide luteolina-7-*O*-glicosídeo com o alvo P1TH interações hidrofóbicas entre a porção flavonoídica e os resíduos Phe19, Phe41, Ile44 e Val108.

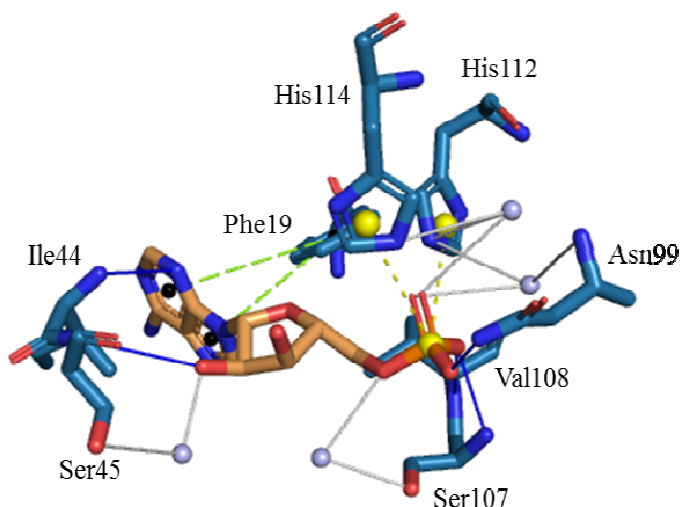
Interação π -paralela (tipo T) pode ser observada entre o anel C do flavonoide e o anel aromático de Phe19. Ligações de hidrogênio observadas na porção glicosídica da molécula ocorrem com os resíduos Lys30, His42 e Phe41. Na porção flavonoídica, as ligações de hidrogênio ocorrem no anel B e C. No primeiro, ocorre entre a hidroxila em C4' e a amina de Val108, e no segundo ocorre entre o átomo de oxigênio do anel e a amina de Ile44 (Figura 110).

Figura 110 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da luteolina-7-*O*-glicosídeo com P1TH. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, interações π -paralela: barra tracejada verde



Através da análise feita por Lima, Klein e Hendrickson (1997), foi possível observar que o ligante Adenosina monofosfato (AMP) interage com P1TH através de ligações de hidrogênio principalmente nos resíduos His51, His112, Asp43, His114 e Asn99. Outras interações podem ser observadas na Tabela 42. Perfil de interação semelhante foi obtido pela submissão do complexo de código PDB 1KPF no servidor PLIP (Figura 111).

Figura 111 - Perfil de interação do ligante AMP com P1TH. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barra azul, interações π -paralela: barra tracejada verde, pontes salina: barra pontilhada amarela



O perfil apresentado pelo flavonoide luteolina-7-*O*-glicosídeo apresentou algumas semelhanças com o AMP, nos resíduos Phe19, Ile44 e Val108. Além disso, apresentou número inferior de interações. O cálculo de energia de acoplamento mostrou-se superior para o ligante AMP (Grid score = -73,06), o que sugere que a molécula de consulta tenha atividade inferior à apresentada pelo ligante sobre o alvo em questão.

Tabela 42 - Perfil de interação com o alvo Proteína 1 da triáde de histidina

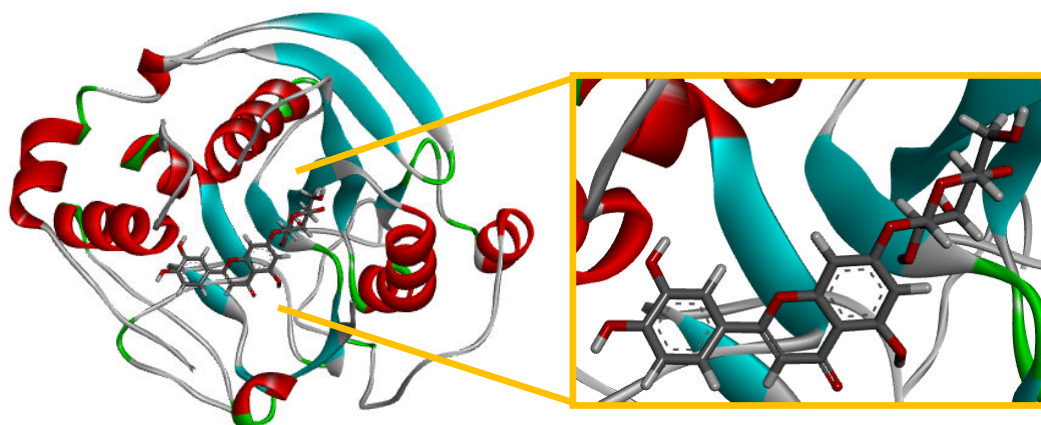
Lima, Klein e Hendrickson (1997)	Ligante (AMP)	Luteolina-7- <i>O</i> -glicosídeo
Interações hidrofóbicas		
Phe19		Phe19
		Phe41
Ile44		Ile44 (2x)
		Val108
Ligaçõesceptoras de hidrogênio		
		Lys30
		His42
Ile44	Ile44	Ile44
	Ser45	
Asn99	Asn99	
Ser107	Ser107	
Val108	Val108	Val108
His114		
Ligaçõesdoadoras de hidrogênio		
		His42
Asp43		
His112		
Ligaçõesceptoras de hidrogênio através de pontes de água		
	Asn99	
	Ser107	

Ligações doadoras de hidrogênio através de pontes de água	
	Ser45
His51	
	His112 (2x)
	His114
Interações π -paralela	
	Phe19 (2x – tipo T)
	Phe19 (tipo T)
Pontes salinas	
	His112 (2x)

4.3.2.2.9 Beta-1,4-galactosiltransferase 1

Beta-1,4-galactosiltransferase 1 desempenha papel crítico na iniciação e manutenção de reação inflamatória do sistema nervoso periférico. Contudo, outros estudos mostram a relação da mesma com apoptose induzida por tumores (YUAN et al, 2012). Ramakrishnan, Ramasamy e Qasba (2006) determinaram a estrutura desse alvo (2FYB) e como ligante utilizaram uridina-5'-difosfato (UDP) na presença de íon manganês (II). O acoplamento com a luteolina-7-*O*-glicosídeo é mostrado na Figura 112.

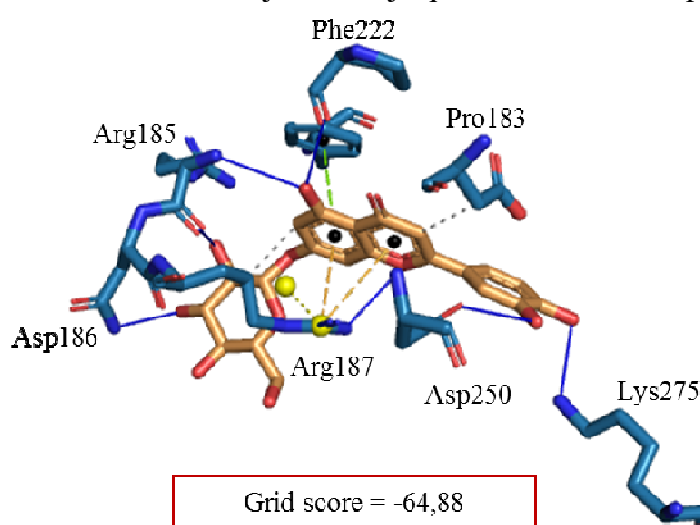
Figura 112 - Acoplamento da luteolina-7-*O*-glicosídeo com o alvo 2FYB pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1.



A molécula de consulta, luteolina-7-*O*-glicosídeo, apresentou interações hidrofóbicas no sítio de ligação do alvo Beta-1,4-galactosiltransferase 1, entre o núcleo flavonoídico e os resíduos Arg187 e Asp248. O resíduo Arg187 ainda faz duas interações π -cátion (grupo guanidina terminal e anéis A e C), ponte salina (grupo guanidina e porção glicosilada) e ligação de hidrogênio (grupamento $-NH_2$ da guanidina e átomo de oxigênio do anel C). Interação π -paralela (tipo P) pode ser observada entre o anel aromático do resíduo Phe222 e o

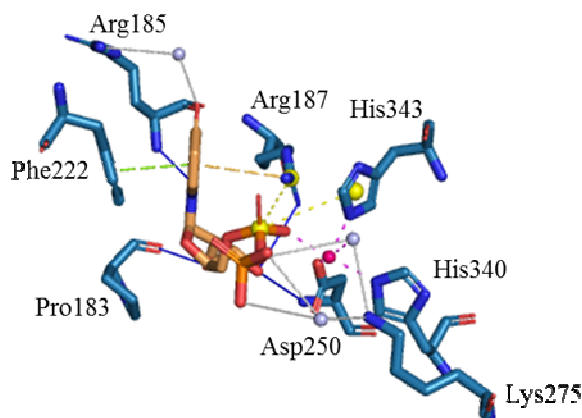
anel A do flavonoide. Duas ligações de hidrogênio são formadas na porção glicosídica (β -D-glicopiranosil) do flavonoide, com os resíduos Asn186 e Arg185. Este último resíduo ainda faz ligação de hidrogênio através de sua amina com a hidroxila em C5 do anel flavonoídico A, assim como o resíduo Pro183 através de seu átomo de oxigênio carbonílico. O anel B também forma ligações de hidrogênio através das hidroxilas em C4 e C5 com a amina terminal de Lys275 e com o átomo de oxigênio carbonílico de Asp250 (Figura 113).

Figura 113 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da luteolina-7-*O*-glicosídeo com Beta-1,4-galactosiltransferase 1. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, interações π -paralela: barra tracejada verde, interações π -cátion: barra tracejada laranja, pontes salina: barra pontilhada amarela



De acordo com Ramakrishnan, Ramasamy e Qasba (2006), o ligante UDP faz interações orientadas pelo íon manganês. As interações mediadas pelo íon metálico ocorrem com os resíduos Asp250, His340 e His344. Além dessas, o ligante faz interações diretas, do tipo ligação de hidrogênio, com os resíduos Asp248 e Asp250. O perfil de interação obtido pela submissão do complexo de código PDB 2FYB no servidor PLIP, mostrou as mesmas interações mediadas pelo íon e a interação direta com o resíduo Asp250, porém apresentou outras interações adicionais (Tabela 43 e Figura 114).

Figura 114 - Perfil de interação do ligante UDP com Beta-1,4-galactosiltransferase 1. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barra azul, ligações de hidrogênio mediadas por água: barra cinza, interações π -paralela: barra tracejada verde, interações π -cátion: barra tracejada laranja, pontes salina: barra pontilhada amarela, complexo com metal: barra pontilhada magenta



A molécula de consulta analisada não complexou com o metal. A mesma apresentou maior semelhança com as interações adicionais apresentadas pelo servidor PLIP para o ligante UDP, porém também apresentou a ligação de hidrogênio com o resíduo Asp250. Os resultados obtidos através do cálculo de energia de acoplamento molecular apresentaram-se próximos ($\text{Grid score}_{\text{UDP}} = -65,84$), indicando potencial atividade da molécula relacionada ao alvo.

Tabela 43 - Perfil de interação com o alvo Beta-1,4-galactosiltransferase 1
Ramakrishnan, Ligante (UDP) Luteolina-7-O-glicosídeo
Ramasamy e Qasba (2006)

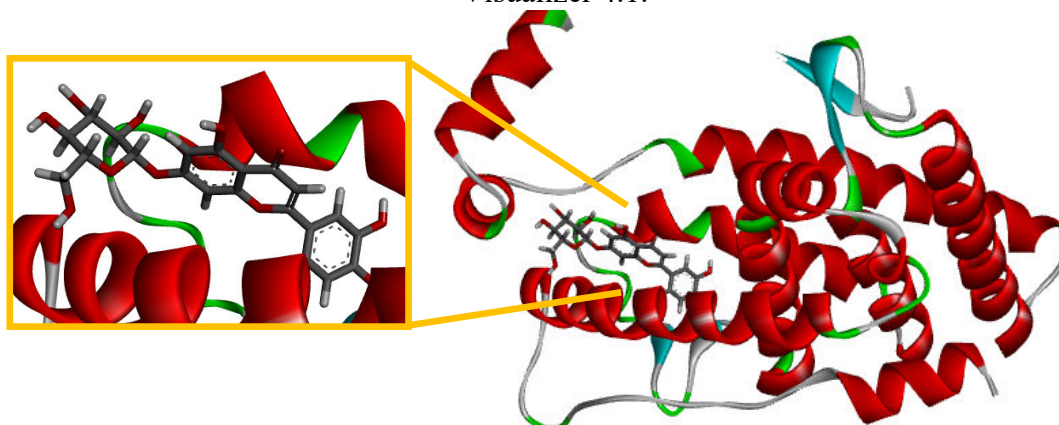
Interações hidrofóbicas		
		Arg187
		Asp248
Ligaçõesceptoras de hidrogênio		
	Arg185	Arg185 (2x)
		Asn186
	Arg187	Arg187
		Lys275
Ligaçõesdoadoras de hidrogênio		
	Pro183	Pro183
		Arg185
Asp248		
Asp250	Asp250	Asp250
Ligaçõesceptoras de hidrogênio mediadas por água		
	Arg185	
	Lys275 (2x)	
Ligaçõesdoadoras de hidrogênio mediadas por água		

Lys275	
Ligações π-paralela	
Phe222 (tipo P)	Phe222 (tipo P)
Interações π-cátion	
Arg187	Arg187 (2x)
Pontes salina	
Arg187	Arg187
Complexo com metal	
Asp250	Asp250
His340	His340
His343	His343

4.3.2.2.10 Receptor glicocorticoide

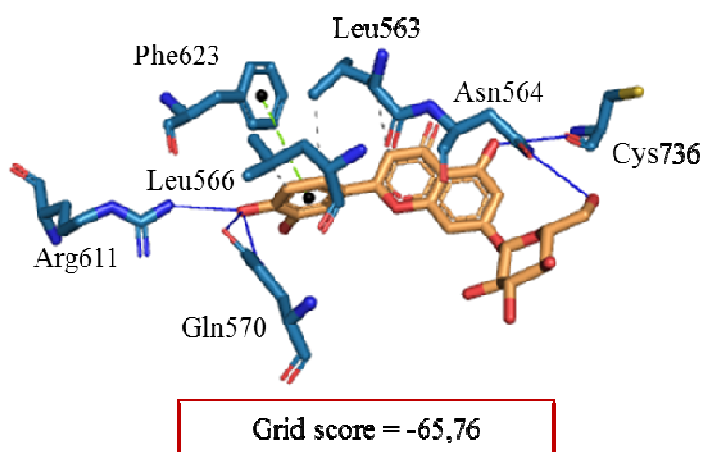
Os glicocorticóides são hormônios esteróides do estresse primários necessários para a vida que regulam vários processos fisiológicos em esforço para manter a homeostase. Glicocorticóides são medicamentos amplamente prescritos para muitas condições, incluindo asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), e doenças inflamatórias do olho. As ações fisiológicas e farmacológicas de glicocorticóides são mediadas pelo receptor de glicocorticóides, membro da superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição dependentes de ligante (KADMIEL; CIDLOWSKI, 2013; OAKLEY; CIDLOWSKI, 2013). Kauppi e colaboradores (2003) determinaram a estrutura cristalográfica 3D (1NHZ) do domínio do receptor de glicocorticóides humano complexado com o antagonista mifepristone (resolução de 2,3 Å) e com agonista dexametasona (resolução de 2,8 Å) em conjunto com um peptídeo (coativador). A complexação desse receptor com a molécula de consulta submetida ao servidor DRAR-CPI é mostrada na Figura 115.

Figura 115 - Acoplamento da luteolina-7-*O*-glicosídeo com o alvo 1NHZ pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1.



O acoplamento da luteolina-7-*O*-glicosídeo com o Receptor de glicocorticoide apresentou interações hidrofóbicas entre a porção flavonoídica da molécula e os resíduos Leu563 e Leu566. Interação π -paralela (tipo T) foi observada entre o anel B dessa porção e o anel aromático de Phe623. O anel B também apresenta três ligações de hidrogênio através da hidroxila em C4, uma com o grupo $-NH_2$ da guanidina terminal de Arg611 e duas com o grupo amida de Gln570. O anel A realiza somente uma ligação de hidrogênio entre a hidroxila em C5 e o oxigênio carbonílico de Cys736 (Figura 11).

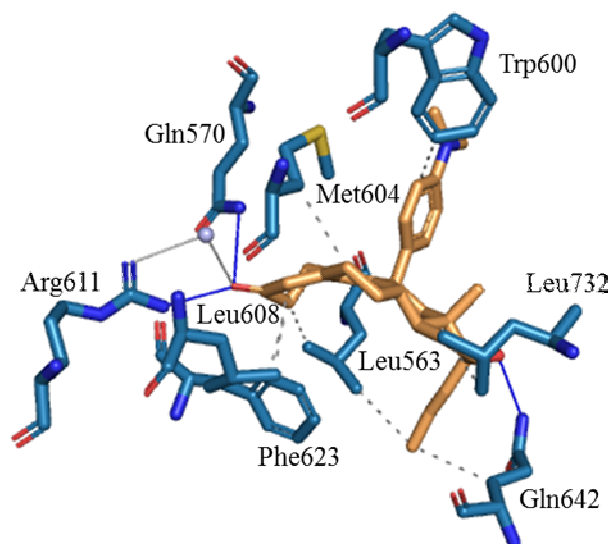
Figura 116 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação da luteolina-7-*O*-glicosídeo com Receptor de glicocorticóide. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, interações π -paralela: barra tracejada verde



No estudo de Kauppi e colaboradores (2003) foi observado que o ligante mifepristone (486) acopla-se ao receptor de glicocorticoide da mesma forma geral que outras moléculas de hormônio esteroide se ligam em receptores nucleares. O grupo hidroxila (17β -OH) é coordenado por Gln642 e uma molécula de água, que por ligações de hidrogênio se voltam para o oxigênio da carbonila de Cys736.

O perfil de interação obtido pela submissão do complexo de código PDB 1NHZ no servidor PLIP (Figura 117), apresentou maior número de interações do que os apresentados pelos autores supracitados, visto que estes não trazem as interações hidrofóbicas formadas. O servidor não apresentou a interação com o resíduo Cys736, a ligação de hidrogênio com Gln642 apresentou perfil diferente, como visto na Tabela 46.

Figura 117 - Perfil de interação do ligante 486 com Receptor de glicocorticoide. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, ligações de hidrogênio mediadas por água: barra cinza



O flavonoide analisado apenas não apresentou a ligação com o resíduo Gln642. Todas as outras ligações importantes levantadas no artigo em questão também foram obtidas para a molécula de consulta, variando o tipo de interação somente para o resíduo Cys736. Outras interações adicionais também foram obtidas (Tabela 44).

Tabela 44 - Perfil de interação com o alvo receptor de glicocorticoide

Kauppi et al (2003) Ligante (486) Luteolina-7-O-glicosídeo		
Interações hidrofóbicas		
	Leu563 (2x)	Leu563 (2x)
		Leu566
	Trp600	
	Met604	
	Leu608	
	Phe623	
	Gln642	
	Leu732	
Ligaçõesceptoras de hidrogênio		
		Asn564
Gln570	Gln570	Gln570
Arg611	Arg611	Arg611
	Gln642	
Ligações doadoras de hidrogênio		
Gln642		
		Gln570
		Cys736
Ligaçõesceptoras de hidrogênio através de pontes de água		

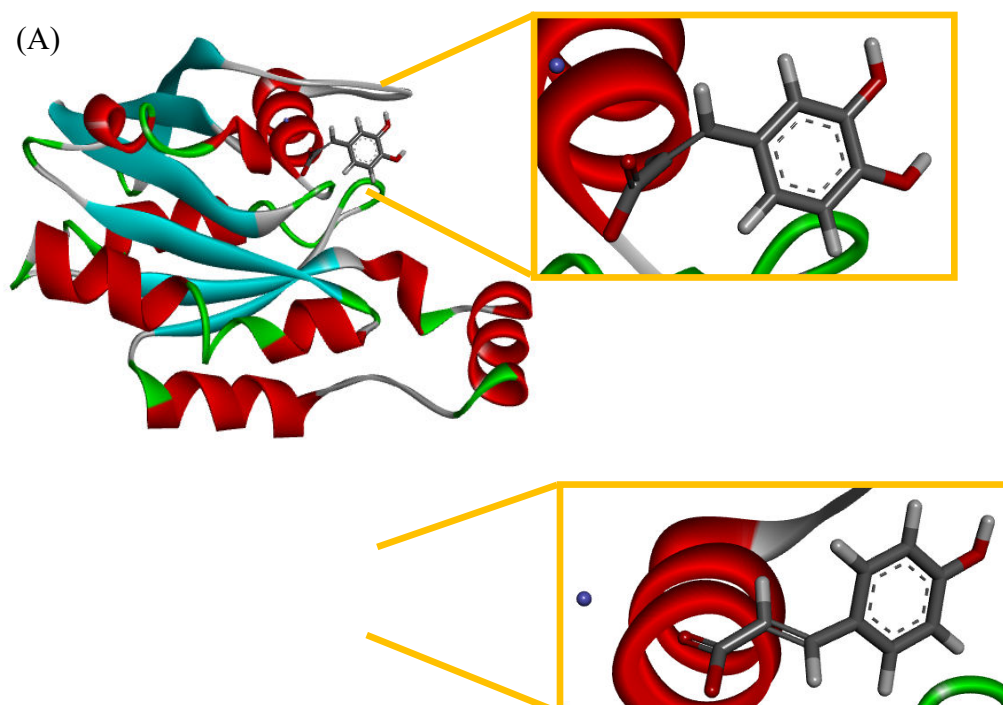
Arg611
Ligaçõesceptoras de hidrogênio através de pontes de água
Cys736
Ligação π-paralela
Phe623 (tipo T)

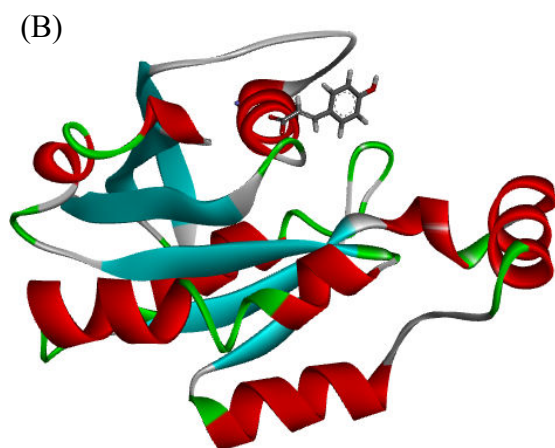
Pode-se observar também que houve diferença nos resultados de energia de acoplamento, onde o ligante apresentou resultado superior (Grid score = -78,77) ao obtido para o flavonoide em questão. Porém, a diferença obtida não permite descartar a luteolina-7-*O*-glicosídeo como possível antagonista desse receptor.

4.3.2.2.11 Ras-relacionada ao substrato C3 da Toxina botulínica 1 (RAC-1)

Ras-relacionada ao substrato C3 da Toxina botulínica 1 desempenha vários papéis em células de mamíferos, tais como regulação da organização do citoesqueleto, adesão celular, migração e alterações morfológicas (ASAHARA et al, 2013). Segundo Lapouge e colaboradores (2000) é parte essencial do sistema NADPH oxidase, complexo enzimático multiprotéico que produz íons superóxido em resposta a infecção microbiana. Os mesmos autores determinaram a estrutura dessa enzima complexada guanosina-5'-trifosfato (GTP) e íon magnésio (1E96). O acoplamento do ácido *p*-cumárico e do ácido cafeico com essa enzima é apresentado na Figura 118.

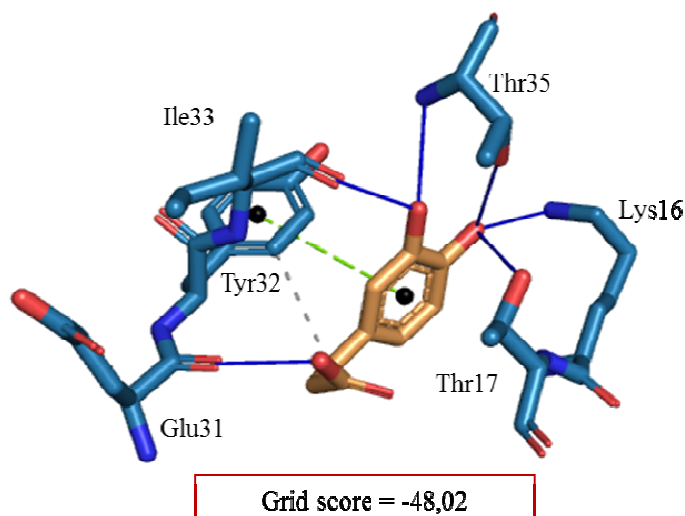
Figura 118 - Acoplamento dos ácidos cafeico e *p*-cumárico com o alvo 1E96 pelo servidor DRAR-CP. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1.





O complexo ácido cafeico/RAC-1 apresenta interação hidrofóbica, entre a cadeia lateral do ácido e o anel aromático do resíduo Tyr32. Além disso, o anel desse mesmo resíduo faz interação π -paralela (tipo T) com o anel aromático da molécula de consulta. As ligações de hidrogênio podem ser observadas tanto na cadeia lateral quanto no anel. A ligação da cadeia lateral ocorre com a hidroxila do grupo carboxila e o átomo de oxigênio carbonílico (C1) de Glu31. No anel, as ligações ocorrem em ambas hidroxilas. Na hidroxila em C3, as ligações ocorrem com o átomo de oxigênio carbonílico de Ile33 e com o grupo amina de Thr35. Esse último resíduo também faz ligação de hidrogênio com a hidroxila em C4, através do seu grupo hidroxila, assim como Thr17 (-OH) e Lys16 (-NH₂ terminal) (Figura 119).

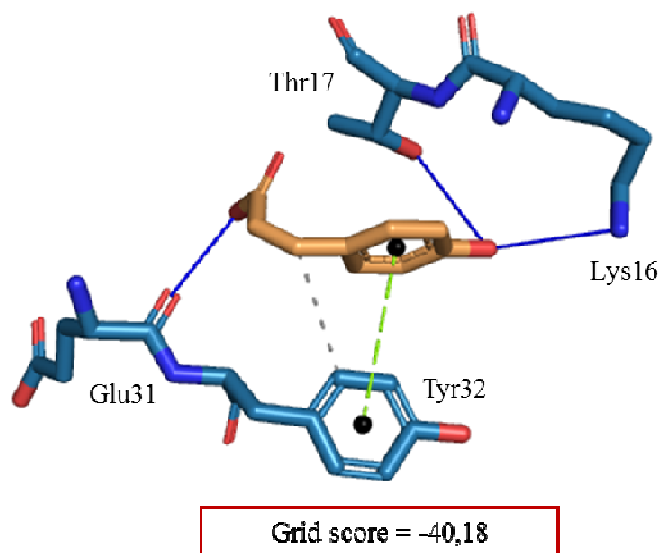
Figura 119 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido cafeico com RAC-1. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, interações π -paralela: barra tracejada verde



Assim como o complexo ácido cafeico/RAC-1, o acoplamento desse alvo com o ácido *p*-cumárico apresenta interações idênticas com o resíduo Tyr32, tanto hidrofóbica quanto π -

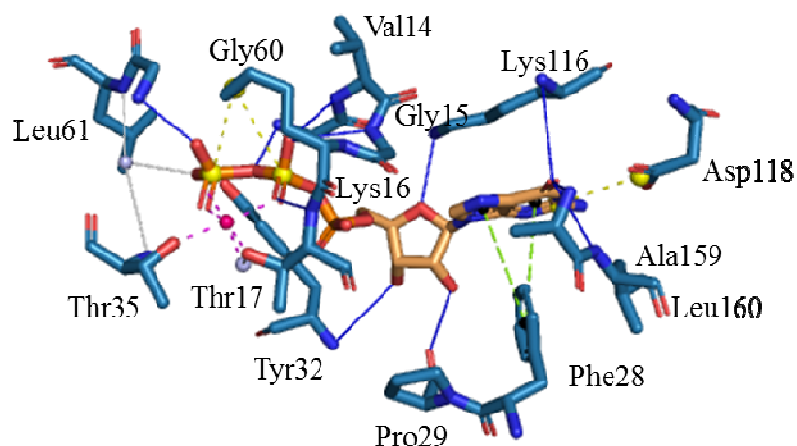
paralela. As ligações de hidrogênio também foram as mesmas apresentadas pelo ácido cafeico. Contudo, como esse ácido apresenta somente hidroxila em C4, as ligações de hidrogênio do anel foram limitadas aos resíduo Lys16 e Thr17 (Figura 120).

Figura 120 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *p*-cumárico com RAC-1. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, interações π -paralela: barra tracejada verde



De acordo com Bunney e colaboradores (2009), a molécula de GTP interage com a enzima citada através dos resíduos Thr17, Thr35, Tyr32 e Gly60. Outras interações estão resumidas na Tabela 68. O perfil de interação obtido pela submissão do complexo de código PDB 1E96 no servidor PLIP, apresentou além das interações citadas no artigo, com pequenas diferenças no perfil, outras interações adicionais (Tabela 45 e Figura 121).

Figura 121 - Perfil de interação do ligante GTP com RAC-1. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barra azul, ligações de hidrogênio mediadas por água: barra cinza, interações π -paralela: barra tracejada verde, pontes salina: barra pontilhada amarela, complexo com metal: barra pontilhada magenta



O ácido cafeico apresentou somente duas interações em resíduos diferentes dos citados por Bunney e colaboradores, Glu31 e Ile33, enquanto que o ácido *p*-cumárico apenas com o resíduo Glu31. Ambos apresentaram número de interações inferior ao apresentado pelo ligante GTP. Tal resultado reflete nos valores significativamente inferiores de energia de acoplamento para ambos, quando comparados com o ligante supracitado (Grid score = -220,56).

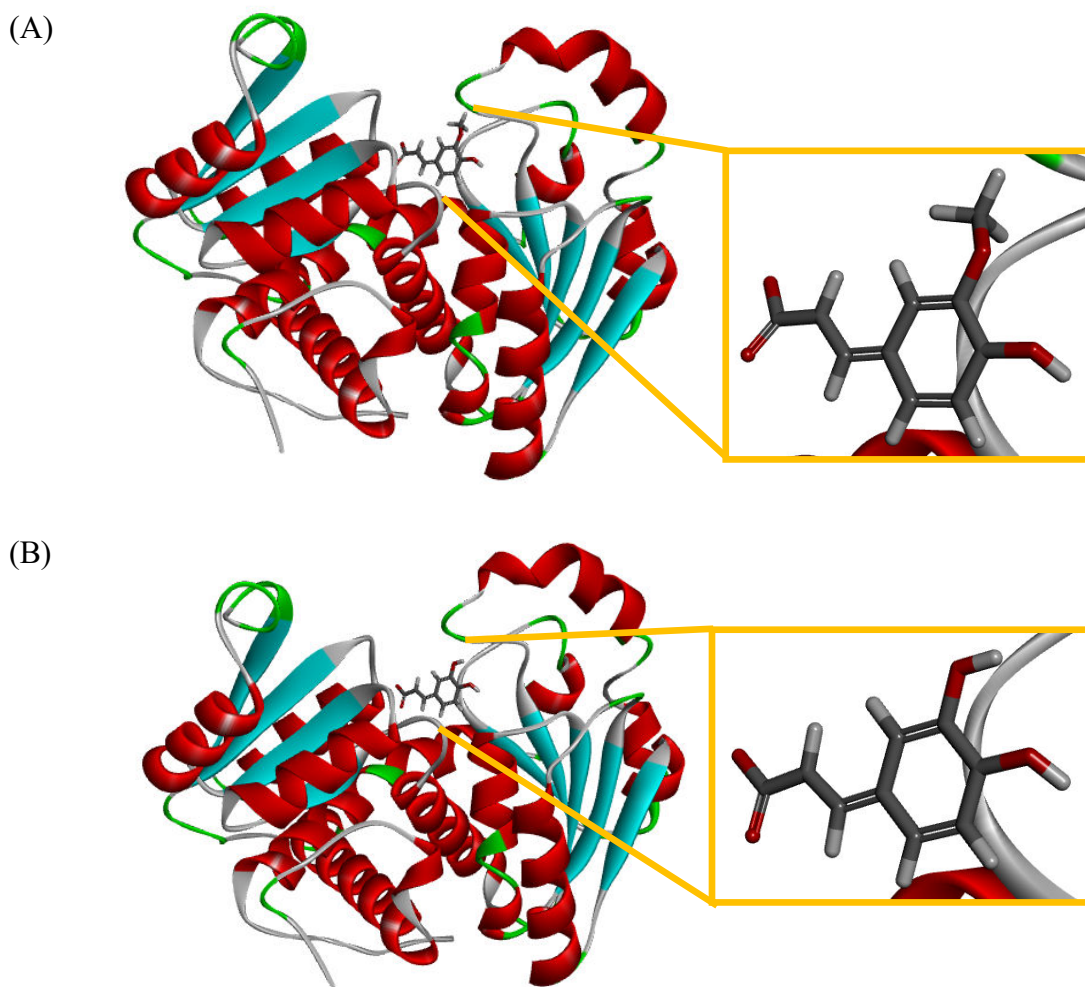
Tabela 45 - Perfil de interação com o alvo Ras-relacionada ao substrato C3 da Toxina botulínica 1

Bunney et al (2009)	Ligante (GTP)	Ácido cafeico	Ácido <i>p</i> -cumárico
Interações hidrofóbicas			
		Tyr32	Tyr32
Ligaçõesceptoras de hidrogênio			
Ala13	Ala13		
	Val14		
	Gly15		
Lys16 (2x)	Lys16	Lys16	Lys16
Thr17 (2x)	Thr17	Thr17	Thr17
Cys18			
		Thr35 (2x)	
Gly60	Gly60		
Lys116	Lys116 (2x)		
	Ala159		
Leu160	Leu160		
Ligaçõesdoadoras de hidrogênio			
	Pro29		
		Glu31	Glu31
Tyr32	Tyr32		
		Ile33	
Ligaçõesceptoras de hidrogênio através de pontes de água			
	Leu61		
Ligaçõesdoadoras de hidrogênio através de pontes de água			
	Thr17		
	Thr35		
Ligações π-paralelas			
	Phe28 (tipo t)		
		Tyr32 (tipo T)	Tyr32 (tipo T)
Pontes salinas			
	Lys16 (2x)		
Asp118	Asp118		
Complexação com metal			
Thr17	Thr17		
Thr35	Thr35		

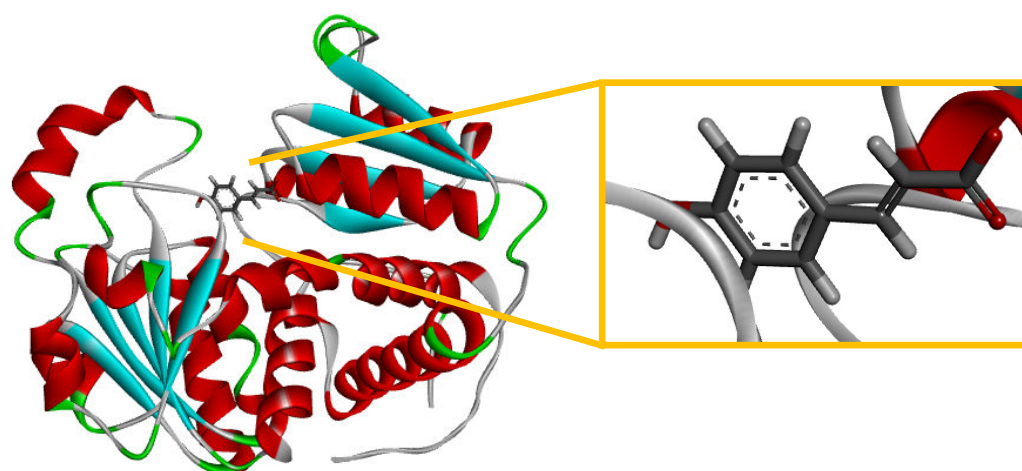
4.3.2.2.12 Ornitina carbamoiltransferase, mitocondrial (ORN)

A estrutura cristalina da ornitina carbamoiltransferase (1OTH) humana complexada com o bissubstrato análogo N-fosfonacetil-L-ornitina (NFLO) foi resolvida em 1,85 Å por substituição molecular (SHI et al, 1998). Mutações deletérias nessa enzima produzem estado clínico de hiperamônia que, se não tratada, resulta em sintomas neurológicos ou morte (deficiência de ornitina carbamoiltransferase) (SHI et al, 1998; MAHMOOD; NUGENT, 2015). Essa enzima foi selecionada como alvo potencial para os três ácidos fenólicos identificados nos extratos de *A. ovata*, ácido *trans*-ferúlico, cafeico e *p*-cumárico. Na Figura 122 pode-se visualizar o acoplamento dessa enzima cada ácido.

Figura 122 - Acoplamento do ácido *trans*-ferúlico (A), cafeico (B) e *p*-cumárico (C) com o alvo 1OTH pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1.

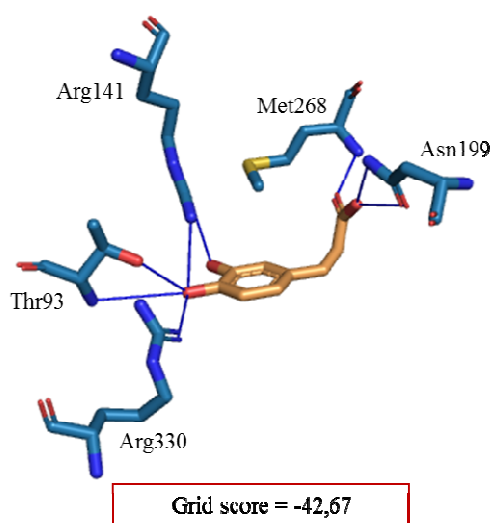


(C)



Os três ácidos fenólicos identificados nos extratos de *A. ovata* tiveram o alvo ORN selecionado pelo servidor DRAR-CPI. O perfil de interação entre esse alvo e o ácido cafeico mostra apenas ligações de hidrogênio. O grupo carboxílico da cadeia lateral faz ligação através do oxigênio carbonílico com grupo amina de Met268, já a hidroxila liga-se ao grupo amida do resíduo Asn199, tanto pelo oxigênio carbonílico quanto pelo grupo $-NH_2$. Ambas hidroxilas do anel fazem ligações de hidrogênio. A C3-OH liga-se ao grupo $-NH$ da porção guanidina terminal de Arg141, enquanto o grupo $-NH_2$ desse resíduo liga-se a C4-OH do ácido. Essa hidroxila também faz ligação com o grupo $-NH$ da guanidina de Arg330 e com a hidroxila e amina de Thr93 (Figura 123).

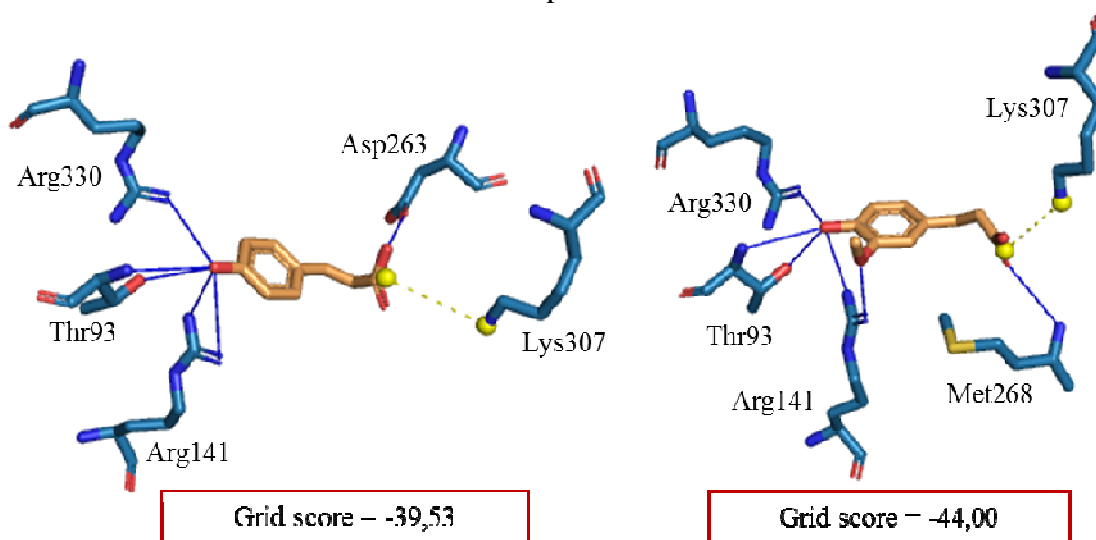
Figura 123 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido cafeico com ORN. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barra azul



No perfil de interação do ácido *p*-cumárico com ORN (Figura 124) observa-se apenas ligações de hidrogênio e ponte salina. Esta última ocorre entre o grupo carboxílico da cadeia

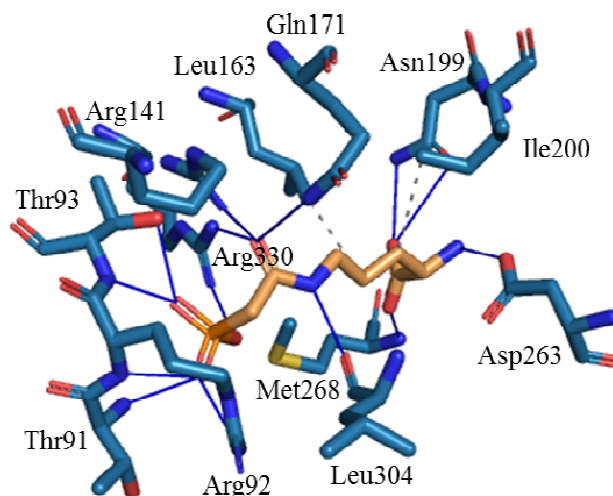
lateral do ácido e a amina terminal de Lys307. As ligações de hidrogênio ocorrem entre a hidroxila do referido grupo carboxílico e o oxigênio carbonílico de Asp263, e entre a hidroxila do anel aromático com o grupo guanidina de Arg141, com hidroxila e amina de Thr93 e com –NH de Arg330. Por fim, no acoplamento do ácido *trans*-ferúlico e o alvo em questão, observa-se as mesmas ligações do ácido cafeico com os resíduos Thr93, Arg330, Met268 e Arg141. Com o resíduo Lys307, o perfil de interação foi o mesmo apresentado pelo ácido *p*-cumárico. Essas semelhanças são esperadas devido a similaridade química/estrutural dos três ácidos.

Figura 124 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação dos ácidos *p*-cumárico e *trans*-ferúlico com ORN. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela



Segundo Shi e colaboradores (1998), os principais resíduos que interagem com a ORN são Asn199, Asp263, Ser267 e Met268. Asp263 que liga um grupo amino de NFLO e o grupo sulfidril de Cys303 é importante para a reação catalítica. Nesta, observa-se que poucas diferenças foram apresentadas pela submissão do complexo de código PDB 1OTH no servidor PLIP, destacando-se a ausência de interação com Ser267 (Figura 125).

Figura 125 - Perfil de interação do ligante NFLO com ORN. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul



O ácido cafeico apresentou interação com dois dos resíduos citados como importantes pelos autores, porém não apresentou interação com Asn263, considerada importante para a reação catalítica. Apenas o ácido *p*-cumárico apresentou interação com esse resíduo, porém, não observa-se interação com os outros resíduos do sítio de ligação de NFLO. O ácido *trans*-ferúlico também apresentou interação com um dos resíduos citados. Esses fatores podem vir a ser limitantes para a atividade frente a esse alvo. Todas as interações estão listadas na Tabela 46.

Tabela 46 - Perfil de interação com o alvo ornitina carbamoiltransferase, mitocondrial

Shi et al (1998)	Ligante (NFLO)	Ácido cafeico	Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido <i>trans</i> -ferúlico
Interações hidrofóbicas				
	Leu163			
	Ile200			
Ligações acceptora de hidrogênio				
Ser90				
Thr91	Thr91			
Arg92 (3x)	Arg92			
Thr93 (2x)	Thr93 (2x)	Thr93 (2x)	Thr93 (2x)	Thr93 (2x)
Arg141	Arg141 (2x)	Arg141 (2x)	Arg141 (2x)	Arg141 (2x)
His168				
	Gln171			
Asn199	Asn199	Asn199		
Met268	Met268	Met268		Met268
Arg330	Arg330	Arg330	Arg330	Arg330
Ligações doadoras de hidrogênio				
	Thr93			
Asn199	Asn199	Asn199		
Asp263	Asp263		Asp263	
Ser267				

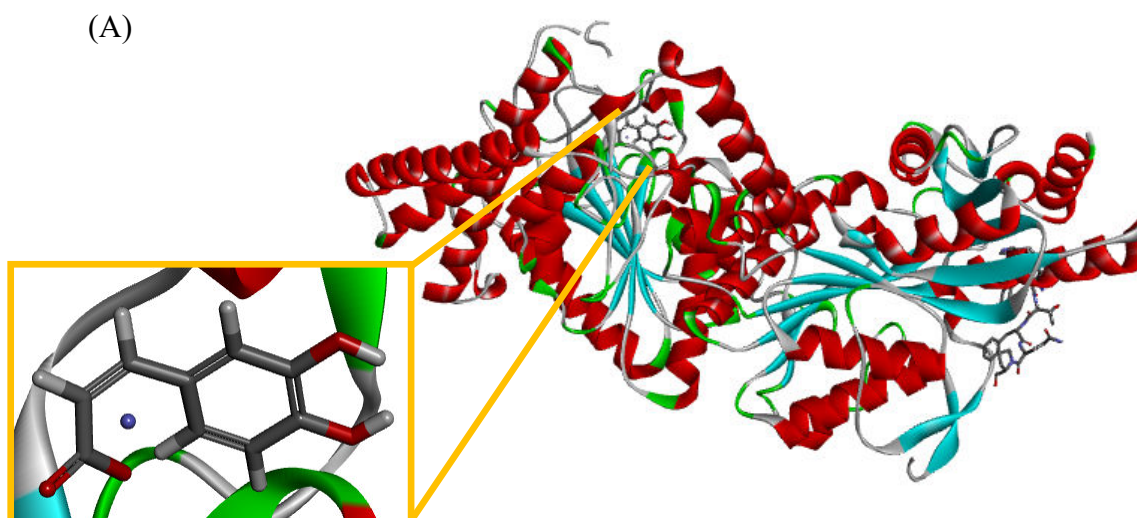
Leu304	Leu304		
Pontes salina			
		Lys307	Lys307

Quanto ao cálculo de energia de acoplamento, os ácidos fenólicos não apresentaram diferença significativa entre eles. No entanto, quando comparados com o ligante NFLO (Grid score = -118,44), todos apresentaram resultados consideravelmente inferiores, possivelmente devido ao número inferior de interações.

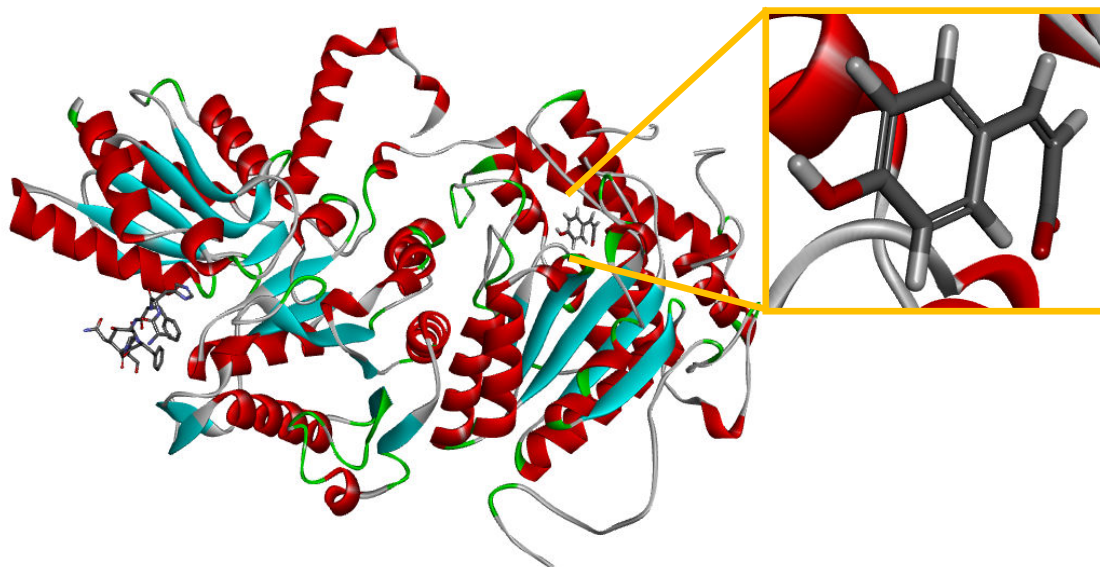
4.3.2.2.13 2-oxoisovalerato desidrogenase subunidade alfa, mitocondrial (2OD)

2-Oxoisovalerato desidrogenase subunidade alfa faz parte do complexo de aminoácidos de cadeia ramificada mitocondrial, que se encontram em níveis elevados na leucínose (doença da urina de xarope de bordo), insuficiência cardíaca, obesidade e diabetes tipo 2. Abordagens farmacológicas para reduzir o acúmulo dessa enzimas em doenças metabólicas e insuficiência cardíaca tem sido estudado (TSO et al, 2013; TSO et al, 2014). Winn e colaboradores (2003) determinaram a estrutura da 2-oxoisovalerato desidrogenase subunidade alfa (1OLS) complexada com tiamina difosfato (TDP), juntamente com glicerol e íons potássio e manganês. O acoplamento dessa enzima com o ácido *p*-cumárico e com o ácido cafeico pode ser visto na Figura 126.

Figura 126 - Acoplamento do ácido cafeico (A) e do ácido *p*-cumárico (B) com o alvo 1OLS pelo servidor DRAR-CP. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1.

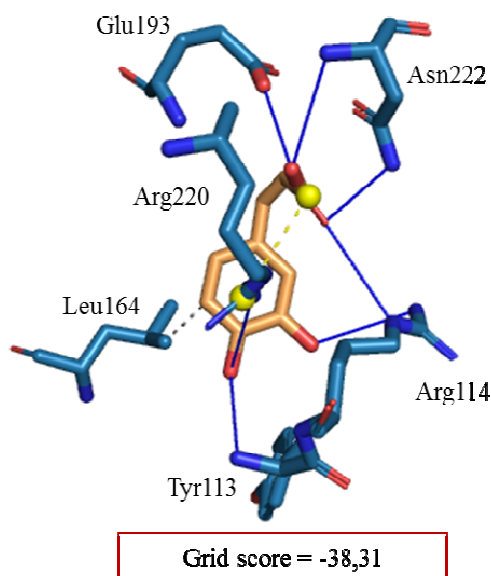


(B)



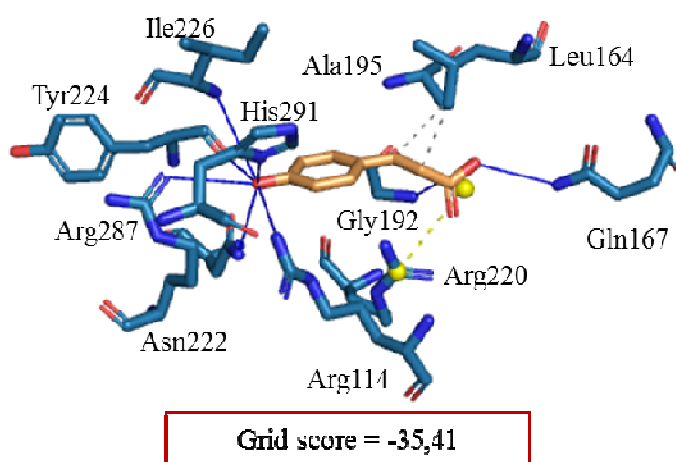
O ácido cafeico, ao ser acoplado com o alvo 2OD, apresentou interação hidrofóbica apenas com o resíduo Leu164. Interações π -cátion e ponte salina é observada entre o grupo guanidina terminal de Arg220 e o anel aromático e grupo carboxílico do ácido, respectivamente. A hidroxila do grupo carboxílico da cadeia lateral da molécula faz ligação de hidrogênio com a hidroxila do grupo carboxila terminal de Glu193 e com a amina de Asn222. Já o oxigênio carbonílico liga-se com a amida de Asn222 e com a guanidina de Arg114. A hidroxila em C3 do anel também liga-se a porção guanidina de Arg114, e a hidroxila em C4 liga-se a guanidina de Arg220 e a amina de Tyr113 (Figura 127).

Figura 127 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido cafeico com 2OD. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela, interações π -cátion: barra tracejada laranja



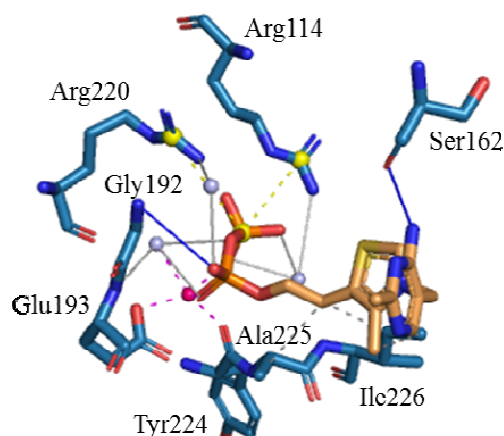
O perfil de interação do ácido *p*-cumárico com 2OD inclui interações hidrofóbicas entre a cadeia lateral e os resíduos Leu164 e Ala195. Arg220 interage através de ponte salina com o grupo carboxílico do ácido. A hidroxila do grupo carboxílico faz ligações de hidrogênio com a amida e a amina de Gln167 e Gly192, respectivamente. Todas as outras ligações de hidrogênio ocorrem com a hidroxila em C4 do anel, como mostra a Figura 128.

Figura 128 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *p*-cumárico com 2OD. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela



No estudo de Winn e colaboradores (2003), foi determinado que átomo de nitrogênio do resíduo His291 faz ligação de hidrogênio mediada por molécula de água com os dois átomos de oxigênio do fosfato terminal de TDP. Outra ligação de hidrogênio é mediado pela mesma molécula de água, entre o TDP e a cadeia lateral de Arg187. A cadeia lateral de Leu164 encontra-se entre os dois anéis de TDP (interação hidrofóbica). Para esse alvo, o perfil de interação obtido pela submissão do complexo de código PDB 1OLS no servidor PLIP, apresentou significativa diferença, não sendo observada nenhuma das interações principais citadas acima (Tabela 47 e Figura 129).

Figura 129 - Perfil de interação do ligante TDP com 2OD. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, ligações de hidrogênio mediadas por água, pontes salina: barra pontilhada amarela, complexo com metal: barra pontilhada magenta



O ácido *p*-cumárico foi a molécula de consulta que apresentou perfil de interação mais semelhante com o ligante TDP. Observa-se interação com os três principais resíduos citados por Winn e colaboradores (2003), Arg287, His291 e Leu164. A ligação de hidrogênio entre Arg198 e His291 não foi mediada por água no complexo ácido *p*-cumárico/2OD, visto que as moléculas de água não foram incluídas. Além dessas interações, esse ácido apresentou interação semelhante com TDP no resíduo Arg220 e Asn222. Com o resíduo Ala195 os tipos de ligação foram diferentes entre si. Outras interações adicionais também foram encontradas para esse ácido.

O ácido cafeico apresentou interação apenas com o resíduo principal Leu164. Apresentou, também, interação em comum com os resíduos Asn222 e Arg220. No entanto, ao observar-se os resultados do cálculo de energia de acoplamento, ambos ácidos fenólicos apresentaram energia inferiores ao obtido para o ligante TDP (Grid score = -69,58).

Tabela 47 - Perfil de interação com o alvo 2-oxoisovalerato desidrogenase subunidade alfa

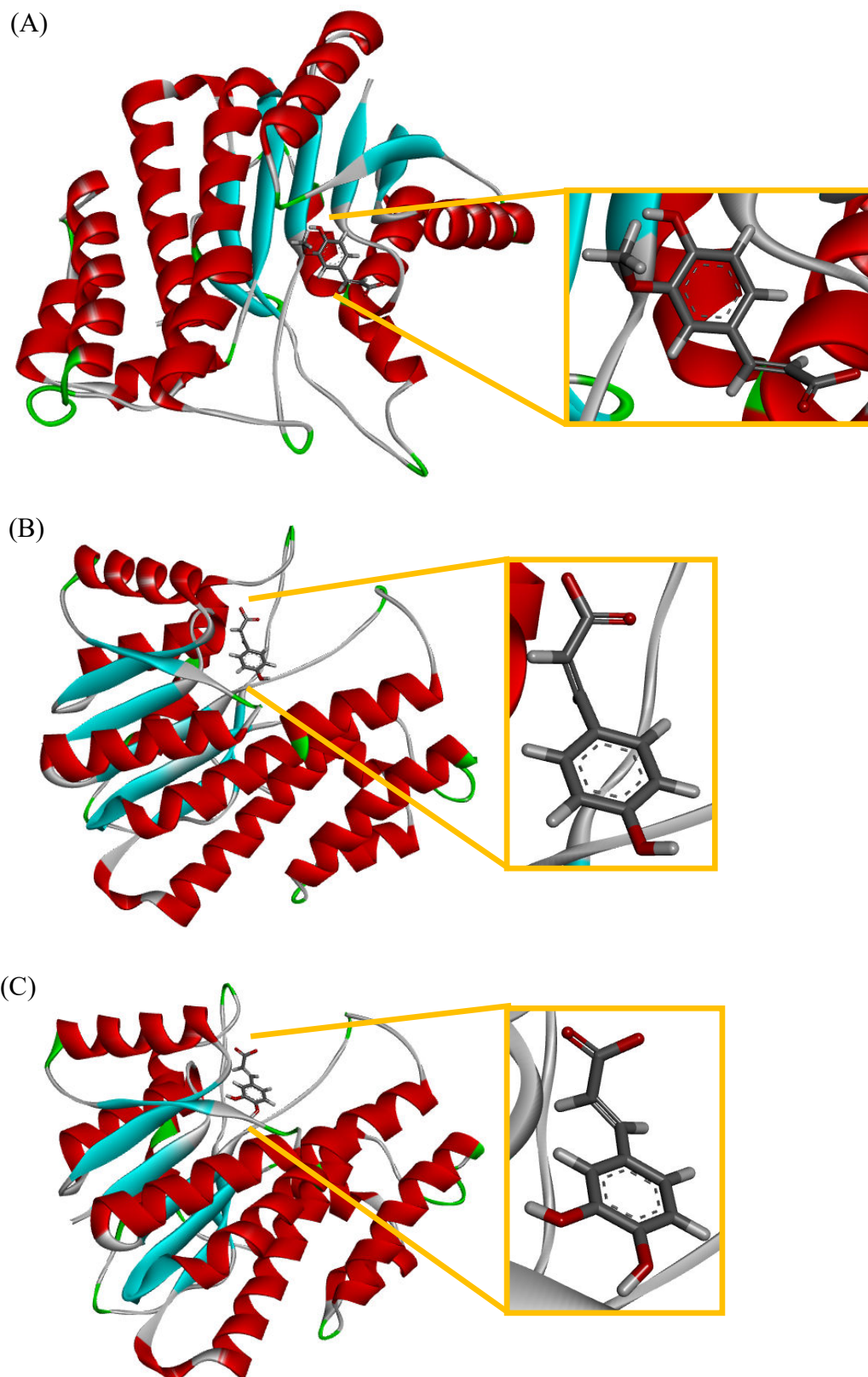
Winn et al (2003)	Ligante (TDP)	Ácido cafeico	Ácido <i>p</i> -cumárico
Interações hidrofóbicas			
Leu164		Leu164	Leu164
			Ala195
		Ala225	
		Ile226 (2x)	
Ligações aceptoras de hidrogênio			
		Tyr113	
		Arg114 (2x)	Arg114
			Gln167
	Gly192		Gly192
Gly194			

Ala195			
Arg220			
Asn222	Asn222	Asn222	
		Ile226	
		Arg287	
		His291	
Ligações doadoras de hidrogênio			
Ser162	Ser162		
		Glu193	
			Tyr224
Ligaçõesceptoras de hidrogênio através de pontes de água			
	Arg114 (2x)		
	Glu193		
	Arg220		
Arg287			
His291 (2x)			
Pontes salinas			
Arg114	Arg114		
Arg220	Arg220	Arg220	Arg220
Interações π-cátion			
		Arg220	

4.3.2.2.14 Carbonil redutase [NADPH] 3 (CBR3)

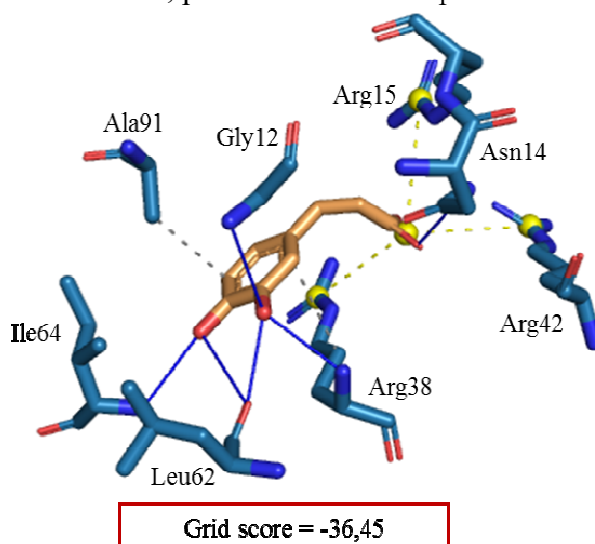
A enzima carbonil redutase 3 (CBR3), que converte prostaglandina E₂ a prostaglandina F_{2 α} , foi associada com a diabetes de tipo 2 e estresse oxidativo (MALÁTKOVÁ et al, 2012; CHANG et al, 2012). No banco de dados PDB foi depositada a estrutura cristalográfica dessa enzima (2HRB) complexada com NADP⁺ e glicerol. O acoplamento, realizado pelo servidor DRAR-CPI, da mesma com o ácido *trans*-ferúlico, *p*-cumárico e cafeico pode ser visto na Figura 130.

Figura 130 - Acoplamento do ácido *trans*-ferúlico (A), *p*-cumárico (B) e cafeico (C) com o alvo 2HRB pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1.



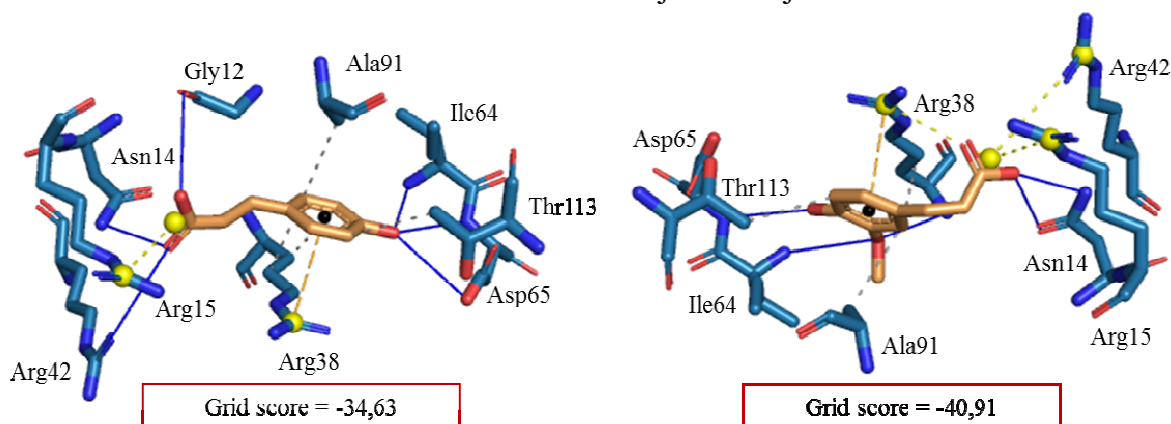
Todos os ácidos fenólicos incluídos no presente trabalho foram acoplados no alvo CBR3. O ácido cafeico apresentou, em seu perfil de interação, interações hidrofóbicas entre o anel aromático e os resíduos Arg38 e Ala91. Três pontes salina foram observadas entre o grupo carboxílico e as porções guanidina dos resíduos Arg15, Arg38 e Arg42. Asn14 faz ligação de hidrogênio com sua amida e a hidroxila do grupo carboxílico. A hidroxila do anel, localizada no C3, faz ligação de hidrogênio com a amina de Gly12 e de Arg38 e ainda com o oxigênio carbonílico de Leu62. Já a hidroxila em C4, do anel, liga-se da mesma forma a Leu62, assim como a amina de Ile64 (Figura 131).

Figura 131 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido cafeico com CBR3. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela



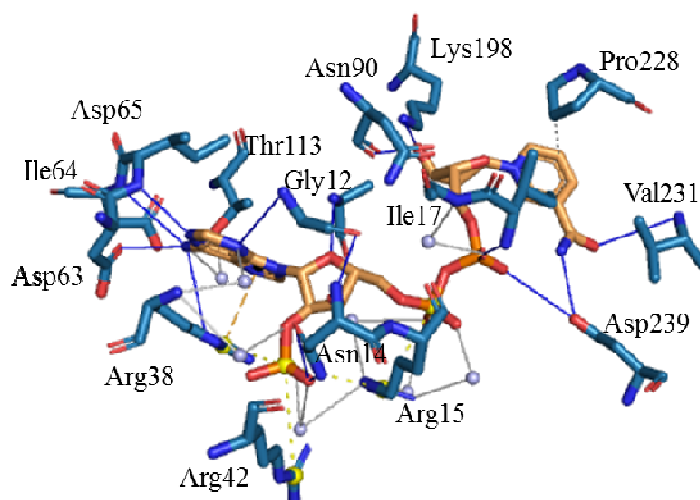
O ácido *p*-cumárico apresenta ligações hidrofóbicas com os mesmos resíduos que o ácido cafeico e com o Thr113. Ponte salina é observada somente com o resíduo Arg15, porém Arg38 faz interação do tipo π -cátion entre a sua porção guanidina e o anel aromático. Duas ligações de hidrogênio são formadas entre o oxigênio carbonílico e os grupos guanidina e amida de Arg42 e Asn14, respectivamente. A hidroxila carboxílica liga-se somente ao oxigênio carbonílico de Gly12. A hidroxila aromática, por sua vez, liga-se com a amina e hidroxila (C4) de Asp65 e com a amina de Ile64. O ácido *trans*-ferúlico, por fim, apresenta interações semelhantes com ambos outros ácidos (Figura 132).

Figura 132 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação dos ácidos *p*-cumárico e *trans*-ferúlico com CBR3. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela, interações π -cátion: barra tracejada laranja



Devido ao artigo depositado sob o código PDB 2HRB ainda não ter sido publicado, a análise do perfil de interação das moléculas de consulta e do ligante NADP⁺ foi feita somente pela submissão de cada complexo no servidor PLIP (Tabela 48 e Figura 133). Observa-se que o ligante em questão apresentou, em sua maioria, interações do tipo ligações de hidrogênio. Além disso, apresentou outras interações do tipo hidrofóbica, pontes salina e π -cátion.

Figura 133 - Perfil de interação do ligante NADP⁺ com CBR3. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, ligações de hidrogênio mediadas por água: barra cinza, pontes salina: barra pontilhada amarela, interações π -cátion: barra tracejada laranja



As interações hidrofóbicas apresentadas pelos três ácidos fenólicos analisados ocorreram em resíduos diferentes do apresentado pelo NADP⁺. As ligaçõesceptoras de hidrogênio e interações do tipo ponte salina apresentadas por eles também foram apresentadas

pelo ligante NADP⁺, havendo diferença apenas na quantidade de interações apresentadas por cada um. Contudo, a ligações doadora de hidrogênio ocorrente entre o ácido cafeico e o alvo em questão é feita em resíduo diferente do ligante, diferentemente dos outros ácidos.

Tabela 48 - Perfil de interação com o alvo Carbonil redutase [NADPH] 3

Ligante (NADP ⁺)	Ácido cafeico	Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido <i>trans</i> -ferúlico
Interações hidrofóbicas			
	Arg38	Arg38 (2x)	Arg38
	Ala91	Ala91	Ala91
		Thr113	Thr113
Pro228			
Ligações aceptora de hidrogênio			
Gly12	Gly12		
Asn14 (2x)	Asn14	Asn14	Asn14
Ile17			
Arg38	Arg38		Arg38
		Arg42	
Ile64	Ile64	Ile64	Ile64
Asp65		Asp65	Asp65
Ala92			
Lys198			
Val213			
Asp239			
Ligações doadoras de hidrogênio			
Gly12		Gly12	
Asn14			Asn14
	Leu62(2x)		
Asp63			
		Asp65	
Asn90			
Asp239			
Ligações aceptoras de hidrogênio através de pontes de água			
Arg15 (5x)			
Gly18			
Arg38 (2x)			
Thr113			
Interações π-cátion			
Arg38		Arg38	Arg38
Pontes salinas			
Arg15 (2x)	Arg15	Arg15	Arg15
Arg38	Arg38		Arg38
Arg42	Arg42		Arg42

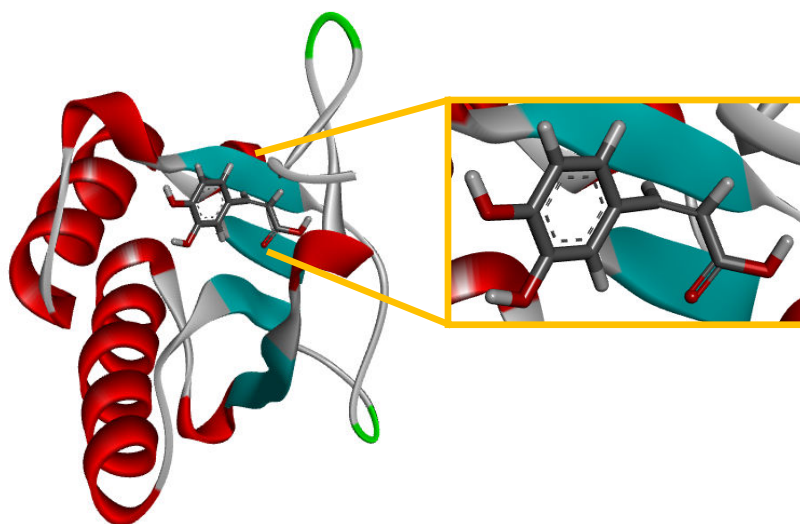
Em resumo, observa-se que o número de interações apresentadas por ambos ácidos fenólicos é inferior ao observado no complexo NADP⁺/CBR3. Tais perfis de interação corroboram com os resultados obtidos por meio do cálculo de energia de acoplamento. Entre elas, não houve diferença significativa. Contudo, em relação ao ligante, este apresentou

resultado consideravelmente maior (Grid score = -156,97) que todas moléculas de consulta analisadas, indicando que as mesmas apresentem, possivelmente, baixa atividade sobre o alvo analisado.

4.3.2.2.15 Fator inibitório de migração de macrófago (FIMM)

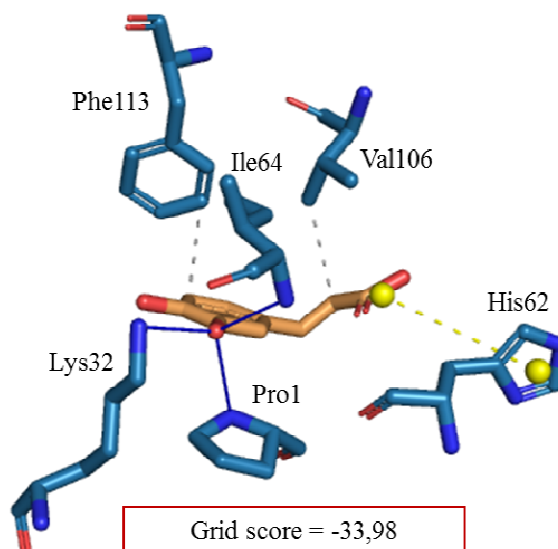
Fator de inibição de migração de macrófagos (FIMM) foi descrito pela primeira vez no âmbito da hipersensibilidade de tipo retardado e surgiu como mediador chave de patologias inflamatórias. Níveis elevados de FIMM foram detectados na sepsia, doenças autoimunes, diferentes tipos de cânceres e desordens metabólicas, tais como diabetes mellitus e obesidade (GRIEB et al, 2010; KIM et al, 2015). No banco de dados PDB foi depositada a estrutura cristalográfica desse alvo (1GCZ) complexada com o inibidor éster etílico do ácido 7-hidroxi-2-oxo-cromeno-3-carboxílico (YZ9), na presença de ácido cítrico e íon sulfato (ORITA et al, 2001). O acoplamento, realizado pelo servidor DRAR-CPI, da mesma com o ácido cafeico pode ser visto na Figura 134.

Figura 134 - Acoplamento do ácido cafeico com o alvo 1GCZ pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1.



O perfil de interação do acoplamento do ácido cafeico com o alvo FIMM apresenta interações hidrofóbicas com os resíduos Val106 e Phe113. Ponte salina entre o grupo carboxílico e o anel imidazol de His62 pode ser observada. As ligações de hidrogênio ocorrem somente na hidroxila aromática em C3, com as aminas de Ile64 e Lys32 (terminal) e com o grupo -NH do anel indol de Pro1 (Figura 135).

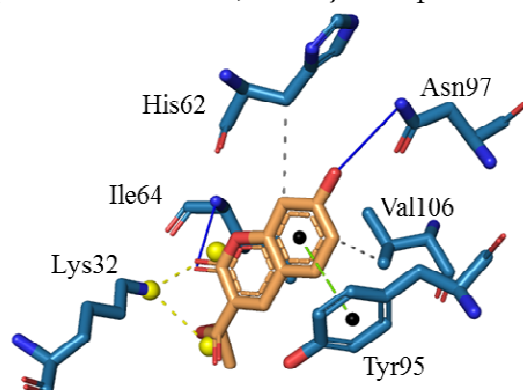
Figura 135 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido cafeico com FIMM. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela



No estudo de Orita e colaboradores (2001), foi observado que o sítio ativo do FIMM é formado pelos resíduos Pro1, Met2, Lys32, Tyr36, His62, Ser63, Ile64, Tyr95, Asn97, Val106, e Phe113. O grupo hidroxila do inibidor YZ9 forma ligação de hidrogênio com o oxigênio carbonílico da cadeia lateral de Asn97. O nitrogênio da cadeia principal de Ile64 no FIMM forma ligação de hidrogênio bifurcada com dois átomos de oxigênio do anel cumarínico do inibidor. O grupo hidroxila de Tyr95 é muito longe do oxigênio carboxílico da ligação éster para formar ligação de hidrogênio, embora possa haver interação fraca entre eles. A amina secundária de Pro1 está posicionada acima do anel cumarínico, o qual está localizado na bolsa hidrofóbica formada pelas cadeias laterais de Pro1, Met2, Ile64, Tyr95, Val106, e Phe113. As interações estão listadas na Tabela 49.

No perfil de interação obtido pela submissão do complexo de código PDB 1GCZ no servidor PLIP (Figura 136), observa-se algumas diferenças quando comparado com perfil de interação apresentado pelos autores citados. Nas interações hidrofóbicas, duas interações não aparecem, com os resíduos Pro1 e Met2. A Ile64 não faz a segunda ligação de hidrogênio, como encontrado por Orita e colaboradores (2001). Além disso, enquanto no estudo dos autores o ligante faz ligação doadora de hidrogênio com Asn97, no servidor a ligação aceptora de hidrogênio. O resíduo Tyr95, além de interação hidrofóbica, faz ligação do tipo π -paralela (tipo T), segundo o PLIP, e o resíduo Lys32 faz duas pontes salinas com o ligante YZ9.

Figura 136 - Perfil de interação do ligante YZ9 com FIMM. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela, interações π -paralela: barra tracejada verde



O ácido cafeico apresentou apenas três interações hidrofóbicas das seis encontradas por Orita e colaboradores (2001). Este ácido não apresentou interação com o resíduo Asn97. Entretanto, apresentou ligação de hidrogênio com o resíduo Ile64, não bifurcada, e com os resíduos Pro1 e Lys32, e ainda interação do tipo ponte salina com o resíduo His62. Avaliando os resultados do cálculo de energia de acoplamento, o ligante YZ9 apresentou resultado ligeiramente maior (Grid score = -39,58) que o ácido cafeico.

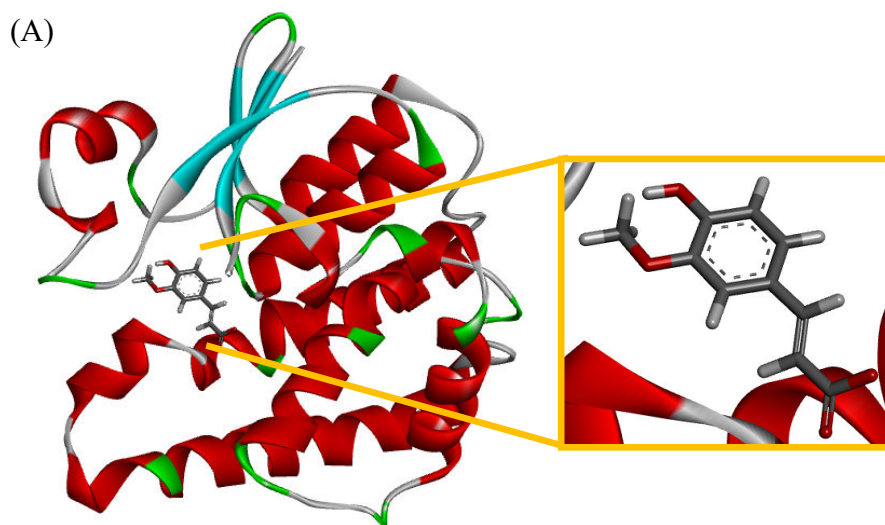
Tabela 49 - Perfil de interação com o alvo fator inibitório de migração de macrófago

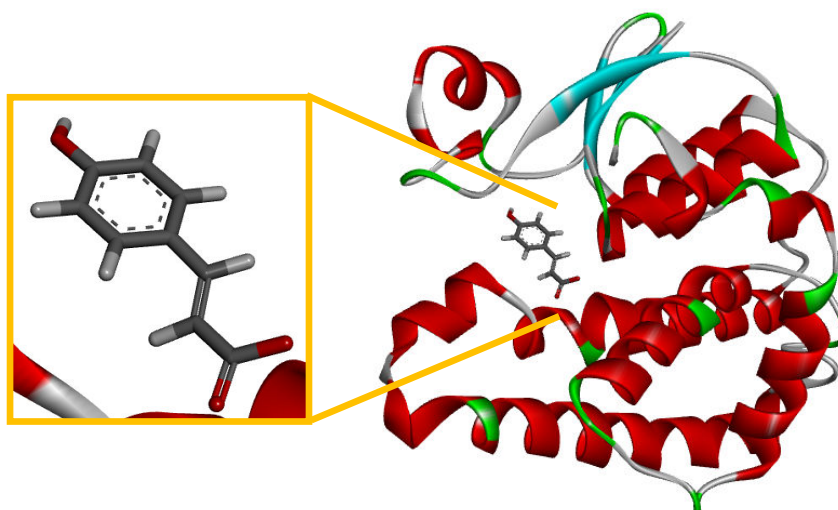
Orita et al (2001)	Ligante (YZ9)	Ácido cafeico
Interações hidrofóbicas		
Pro1		
Met2		
	His62	
Ile64	Ile64	
Tyr95	Tyr95	
Val106	Val106	Val106
Phe113	Phe113	Phe113
Ligações aceptoras de hidrogênio		
		Pro1
		Lys32
Ile64 (2x)	Ile64	Ile64
	Asn97	
Ligações doadoras de hidrogênio		
Asn97		
Ligação π-paralela		
	Tyr95 (tipo T)	
Pontes salinas		
	Lys32 (2x)	
		His62

4.3.2.2.16 Maleilacetoacetato isomerase (MAAI)

Maleilacetoacetato isomerase, enzima chave na degradação metabólica de fenilalanina e tirosina, catalisa a isomerização (dependente da glutathiona-maleilacetoacetato) para fumarilacetoacetato. Deficiências nessa enzima levam à doenças graves, incluindo a fenilcetonúria, alcaptonúria, e a doença fatal, tirosinemia hereditária do tipo I. A determinação da estrutura da maleilacetoacetato isomerase pode ser útil na concepção de inibidores que possam ser utilizados na gestão clínica dessas doenças (POLEKHINA et al, 2001). Polekhina e colaboradores (2001) relatam a estrutura cristalina com resolução de 1.9 Å (1FW1) e complexada com glutathiona (GSH) e íon sulfato, que imita substrato de ligação. A submissão do ácido *trans*-ferúlico e do ácido *p*-cumárico no servidor DRAR-CPI gerou os acoplamentos mostrado na Figura 137.

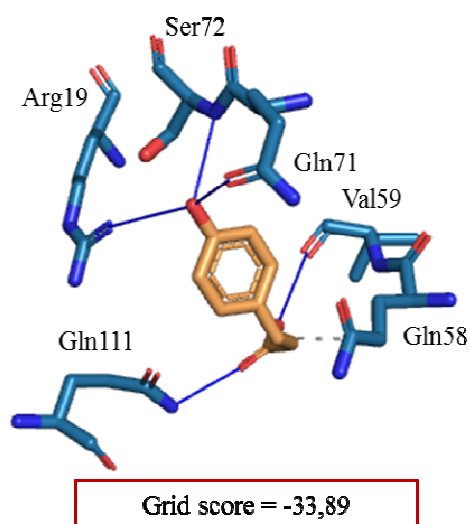
Figura 137 - Acoplamento do ácido *trans*-ferúlico (A) e do ácido *p*-cumárico (B) com o alvo 1FW1 pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1.





O ácido *p*-cumárico, foi acoplado com o alvo MAAI e apresentou em seu perfil de interação, interação hidrofóbica apenas com o resíduo Gln58. As ligações de hidrogênio observadas no grupo carboxila do ácido ocorrem entre a hidroxila e o oxigênio carboxílico de Val59 e entre o oxigênio carboxílico do ácido e a amida de Gln111. A hidroxila aromática da molécula se liga a três resíduos, ao oxigênio carboxílico da amida de Gln71, a amina de Ser72 e ao grupo guanidina (C=N) de Arg19 (Figura 138).

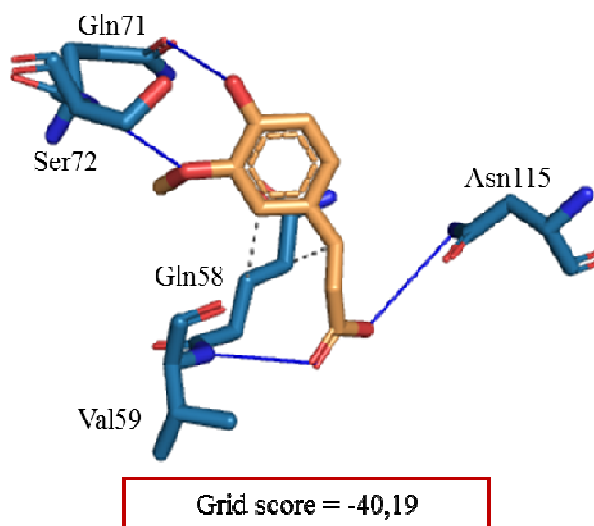
Figura 138 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *p*-cumárico com MAAI. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul



O perfil de interação do ácido *trans*-ferúlico apresentou a mesma interação hidrofóbica do ácido *p*-cumárico, com Gln58. As ligações de hidrogênio observadas no grupo carboxila do ácido ocorrem entre a hidroxila e a amida de Asn115 e entre o oxigênio carboxílico do

ácido e a amina de Val59. O oxigênio metoxílico liga-se a amina da Ser72 e a hidroxila aromática liga-se com o oxigênio carboxílico da amida de Gln71 (Figura 139).

Figura 139 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *trans*-ferúlico com MAAI. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul

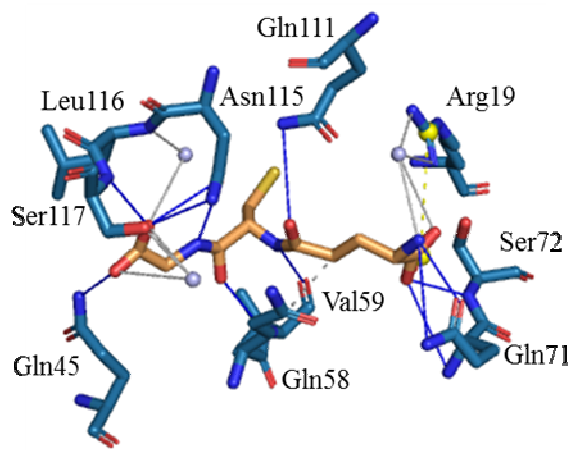


Segundo Polekhina e colaboradores (2001), GSH se liga a MAAI em conformação extensa, formando interações com a proteína que incluem ponte salina e 15 interações de ligação de hidrogênio. Cada átomo polar do ligante está envolvido em contatos diretos ou mediados por água com a proteína. A porção γ -glutamil, através dos oxigênios carboxilatos, forma ponte salina com Arg19. O esqueleto da porção cisteinil está envolvido em interação antiparalela com Val59. O grupo de amida da porção glicil de GSH faz ligação de hidrogênio com Asn115. Os oxigênios carboxilatos da porção glicil formam ligações de hidrogênio com Gln45 e a amida da cadeia principal de Ser117.

Embora próximo a Cys16 (2,8 Å), o átomo de enxofre do grupo cisteinil não está perto o suficiente para formar ponte dissulfeto. O átomo de enxofre está distante o suficiente para formar ligação de hidrogênio ou de van der Waals com a amida de Cys16 (3,5 Å), o grupo amido de Gln111 (3,5 Å), e o grupo hidroxila de Ser15 (4,0 Å). A Tabela 50 lista as principais interações do complexo GSH/MAAI.

O perfil de interação obtido pela submissão do complexo de código PDB 1M17 no servidor PLIP, apresenta todas as interações citadas por Polekhina e colaboradores (2001) e mais interações adicionais (Figura 140). Sugere-se que estas outras interações devam ser as citadas pelos autores porém não apresentadas/discutidas por eles.

Figura 140 - Perfil de interação do ligante GSH com MAAI. Proteína: azul, ligante: laranja, água: esfera cinza, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, ligações de hidrogênio mediadas por água: barra cinza, pontes salina: barra pontilhada amarela



Todas as interações apresentadas pelo ácido *p*-cumárico foram encontradas no perfil obtido pelo GSH através do servidor PLIP. A ligação de hidrogênio com o resíduo Arg19 não ocorre por intermédio de água, como ocorre com o GSH, porém não pode-se afirmar que a interação assim ocorreria, visto que moléculas de água não foram consideradas no complexo ácido *p*-cumárico/MAAI. Todas as interações apresentadas pelo ácido *trans*-ferúlico foram encontradas no perfil obtido pelo GSH através do servidor PLIP. O cálculo de energia de acoplamento permite observar que o ligante GSH apresentou melhor resultado (Grid score = -78,64) que ambos os ácidos. Entre eles, o ácido *trans*-ferúlico apresentou melhor resultado.

Tabela 50 - Perfil de interação com o alvo maleilacetoacetato isomerase

Polekhina et al (2001)	Ligante (GSH)	Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido <i>trans</i> -ferúlico
Interações hidrofóbicas			
	Gln58	Gln58	Gln58 (2x)
Ligaçõesceptoras de hidrogênio			
		Arg19	
Gln45	Gln45		
Val59	Val59		Val59
	Gln71 (2x)		
	Ser72	Ser72	Ser72
	Gln111	Gln111	
	Asn115		Asn115
Ser117	Ser117		
Ligaçõesdoadoras de hidrogênio			
Val59	Val59	Val59	
	Gln71	Gln71	Gln71
Asn115	Asn115 (2x)		
Ligaçõesceptoras de hidrogênio através de pontes de água			
	Arg19 (2x)		
	Leu116		

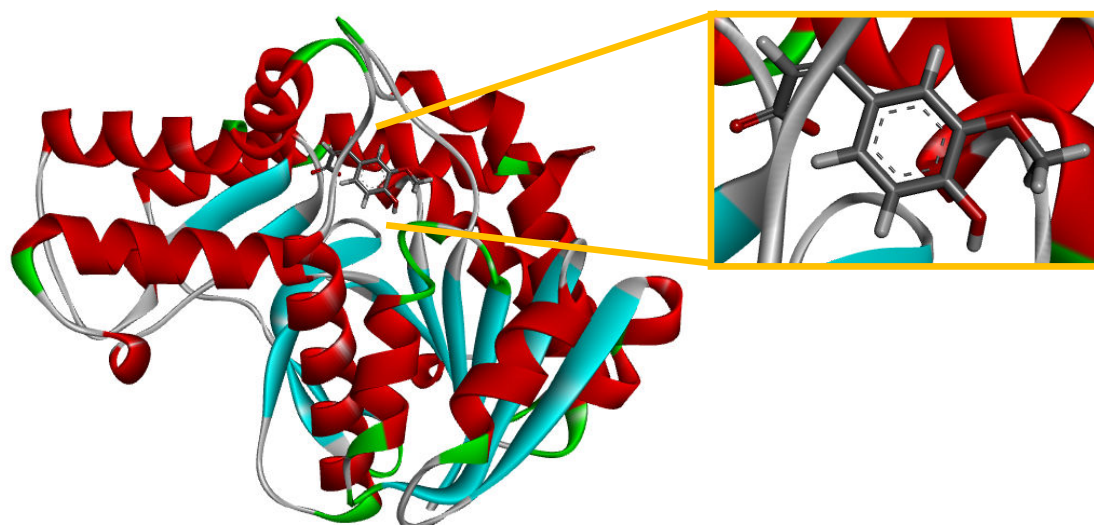
Ser117 (2x)	
Pontes salinas	
Arg19	Arg19

4.3.2.2.17 Malato desidrogenase, mitocondrial (MDH)

Malato desidrogenase (MDH) desempenha papel importante na respiração mitocondrial. Especificamente, catalisa a interconversão dependente de NAD/NADH de malato e oxaloacetato no citoplasma e nas mitocôndrias. Esta reação desempenha um papel chave no transporte malato/aspartato entre o citoplasma através da membrana mitocondrial, e no ciclo do ácido tricarboxílico dentro da matriz mitocondrial (LEE et al, 2012).

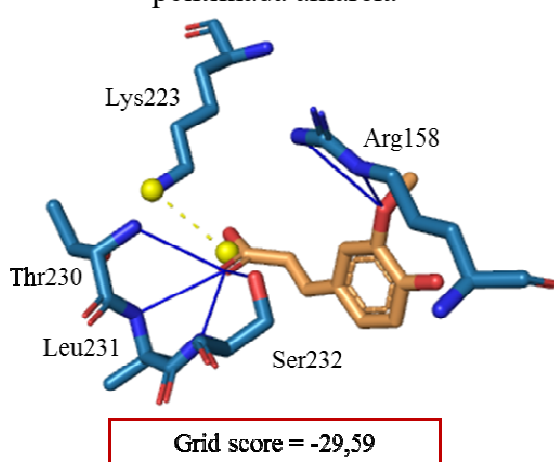
Estudos anteriores indicaram atividade normal ou aumentada de MDH em doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer (BUTTERWORTH; BESNARD, 1990; MIULLI et al, 1993). Korolainen e colaboradores (2006) revelaram aumento da quantidade de glutamato desidrogenase mitocondrial e malato desidrogenase citosólica em cérebros DA. Além disso, afirmam que estas duas enzimas apresentam diminuição significativa do grau de oxidação em cérebros com DA em comparação com os controles. Ugochukwu e colaboradores, por sua vez, depositaram a estrutura cristalográfica da MDH no PDB (2DFD), em artigo ainda não publicado. O acoplamento obtido pelo DRAR-CPI com o ácido *trans*-ferúlico é apresentado na Figura 141.

Figura 141 - Acoplamento do ácido *trans*-ferúlico com o alvo 2DFD pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1.



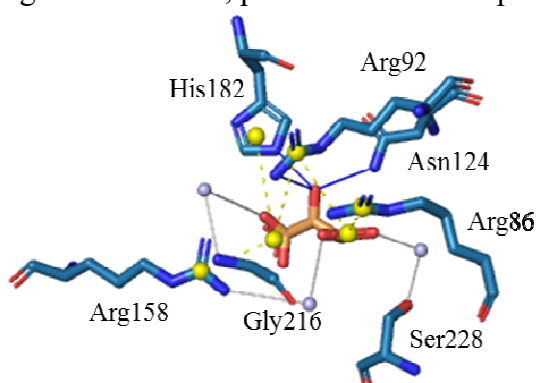
O ácido *trans*-ferúlico apresenta perfil de interação, quando acoplado ao alvo MDH, que inclui apenas ligações de hidrogênio e uma ponte salina. Esta é formada entre o grupo carboxila do ácido e a amina terminal da Lys223. As ligações de hidrogênio que ocorrem com a hidroxila carboxílica são feitas com a hidroxila e amina da Ser232, e com as aminas de Leu231 e Thr230. As outras ligações de hidrogênio ocorrem entre o oxigênio metoxílico e o grupo guanidina de Arg158 (Figura 142).

Figura 142 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *trans*-ferúlico com MDH. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela



Devido ao artigo depositado sob o código PDB 2DFD ainda não ter sido publicado, a análise do perfil de interação das moléculas de consulta e do ligante D-malato foi feita somente pela submissão de cada complexo no servidor PLIP (Tabela 51 e Figura 143). Observa-se que o ligante apresentou apenas interações do tipo ligação de hidrogênio, mediadas e não mediadas por molécula de água, e pontes salina.

Figura 143 - Perfil de interação do ligante D-malato com MDH. Proteína: azul, ligante: laranja, água: esfera cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, ligações de hidrogênio mediadas por água: barra cinza, pontes salina: barra pontilhada amarela



O ácido *trans*-ferúlico apresentou interação com apenas um resíduo em comum com o ligante D-malato, Arg158. Ligações de hidrogênio e pontes salina também foram formadas, no entanto, com resíduos diferentes, evidenciando que ambos caíram em regiões diferentes do alvo.

Tabela 51 - Perfil de interação com o alvo malato desidrogenase

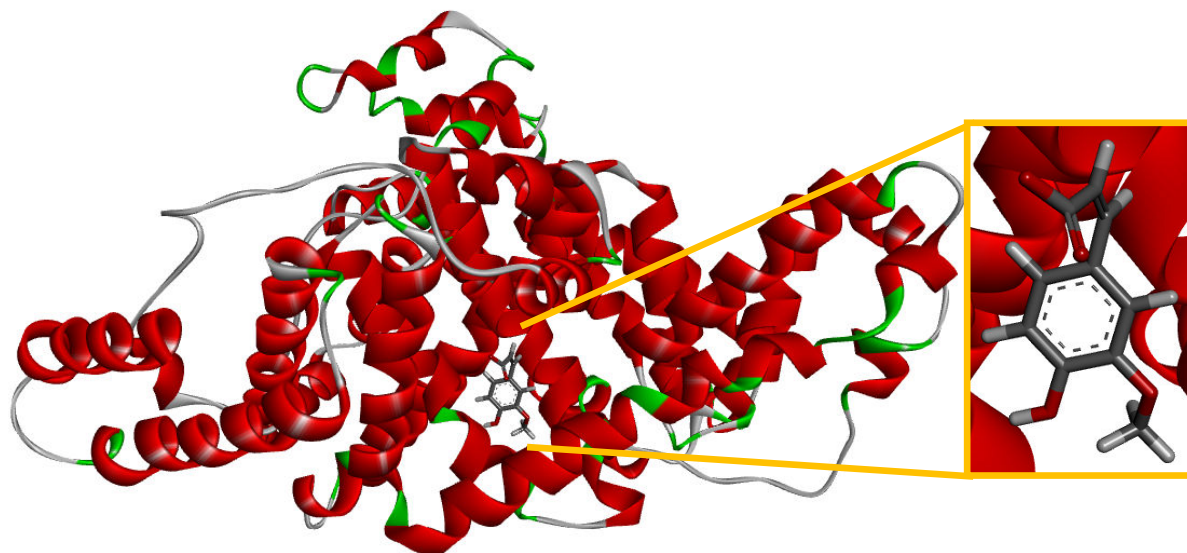
Ligante (D-malato)	Ácido <i>trans</i>-ferúlico
Ligaçõesceptoras de hidrogênio	
Arg92	
Asn124	
	Arg158 (2x)
	Thr230
	Leu231
	Ser232 (2x)
Ligaçõesdoadoras de hidrogênio	
His182	
Ligaçõesceptoras de hidrogênio através de pontes de água	
Arg158	
Gly216	
Ser228	
Pontes salinas	
Arg86	
Arg92 (2x)	
Arg158	
His182	
	Lys223

A energia de acoplamento, calculada através do parâmetro GRID score, corrobora com esse resultado. Observa-se que o ligante apresentou resultado significativamente superior (Grid score = -63,84) ao apresentado pela molécula de consulta, o que indica que está não apresenta potencial sobre o alvo.

4.3.2.2.18 Albumina de soro humano (ASH)

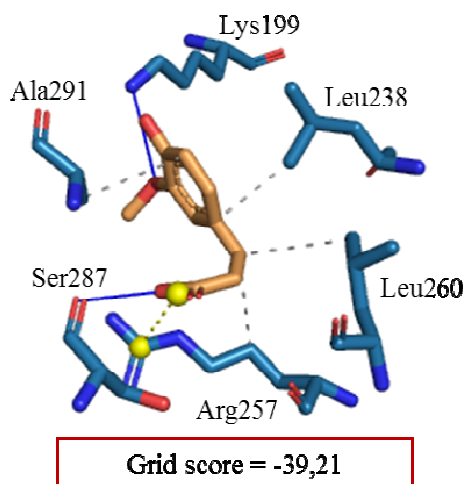
Albumina de soro humano (2BX8) é proteína de plasma abundante que se liga em ampla gama de fármacos, restringindo, assim, a sua forma livre e concentrações ativas. O problema de superar a afinidade de ligação de compostos para albumina de soro representa grande desafio no desenvolvimento de medicamentos (GHUMAN et al, 2005). A Figura 144 mostra o acoplamento dessa proteína com o ácido *trans*-ferúlico.

Figura 144 - Acoplamento do ácido *trans*-ferúlico com o alvo 2BX8 pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1.



O ácido *trans*-ferúlico interage através de ligações hidrofóbicas com os resíduos Leu238, Arg257, Leu260 e Ala291 do alvo ASH. Ponte salina é observada entre o grupo carboxilato do ácido e o grupo guanidina de Arg257. Apenas duas ligações de hidrogênio podem ser vistas, entre o oxigênio metoxílico e a amina terminal de Lys199 e entre a hidroxila carbonílica e o oxigênio carboxílico de Ser287 (Figura 145).

Figura 145 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do ácido *trans*-ferúlico com ASH. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela



Segundo Ghuman e colaboradores (2005), o sítio de ligação da ASH consiste em bolsão de ligação com interior predominantemente apolar, mas contém dois conjuntos de

resíduos polares, porção inferior do bolsão (Tyr150, His242, Arg257) e porção exterior à entrada do bolsão (Lys195, Lys199, Arg218, Arg222). A grande cavidade de ligação é composta por zona central a partir do qual se estendem três compartimentos distintos. A extremidade traseira é dividida por Ile264 em sub câmaras hidrofóbicas esquerda e, enquanto que uma terceira sub câmaras que se projeta a partir da frente do bolsão, delimitada por Phe211, Trp214, Ala215, Leu238 e as porções alifáticas de Lys199 e Arg218. O ligante azapropazona (AZQ) tem como principal interação ligação de hidrogênio com o resíduo Lys199. Outras ligações podem ser vistas na Tabela 52.

O perfil de interação obtido pela submissão do complexo de código PDB 2BX8 no servidor PLIP (Figura 146), mostrou-se semelhante ao apresentado por Ghuman e colaboradores (2005). O ácido *trans*-ferúlico apresentou a ligação de hidrogênio com Lys199 e outras interações adicionais com o alvo ASH, porém não apresentou interação com o resíduo Tyr150. O cálculo de energia de acoplamento não apresentou diferença significativa entre o ligante AZQ (Grid score = -47,54) e o ácido *trans*-ferúlico, o que sugere que o ácido tenha potencial atividade sobre o alvo.

Figura 146 - Perfil de interação do ligante AZQ com ASH. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, interação π -paralela: barra tracejada verde

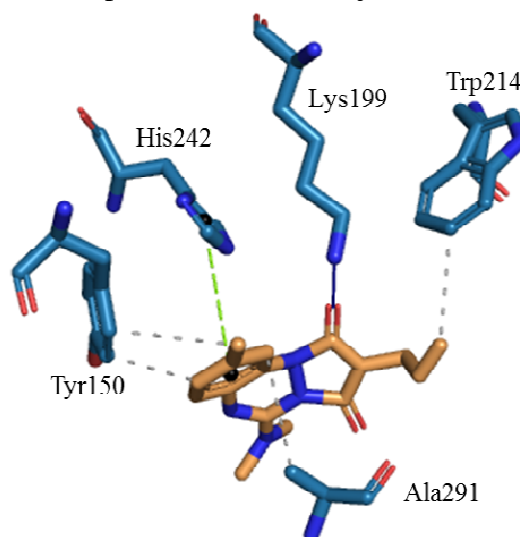


Tabela 52 - Perfil de interação com o alvo albumina de soro humano

Ghuman et al (2205)	Ligante (AZQ)	Ácido <i>trans</i> -ferúlico
Interações hidrofóbicas		
Tyr150	Tyr150 (2x)	
	Trp214	
		Leu238
		Arg257
		Leu260

Ala291	Ala291	Ala291
Ligaçõesceptoras de hidrogênio		
Lys199	Lys199	Lys199
Ligaçõesdoadoras de hidrogênio		
		Ser287
Ligações π-paralela		
Tyr150 (tipo P)		
	His242 (tipo T)	
Pontes salina		
		Arg257

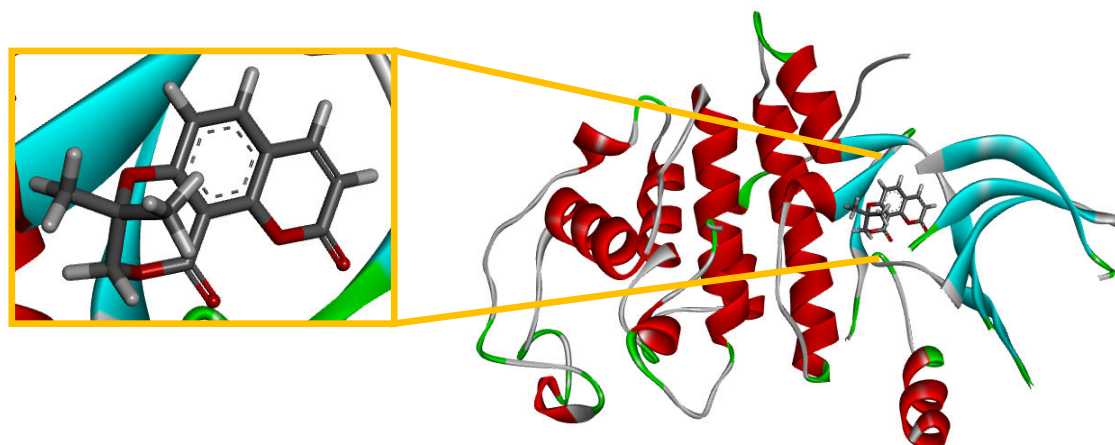
4.3.2.2.19 Proteína quinase de divisão celular 2 (CDC2)

O câncer tem sido reconhecido como doença de proliferação celular aberrante. Sabe-se que as proteínas que regulam a proliferação são frequentemente mutadas, suprimidas ou super-expressadas em linhas celulares do câncer, levando ao crescimento desregulado de células tumorais. Tais proteínas, portanto, representam potenciais alvos de intervenção terapêutica (ANDERSON et al, 2003).

As cinases dependentes de ciclina (CDCs) são família de cinases de serina/treonina que são importantes no controle da entrada e transição através de cada fase do ciclo celular. A sua atividade celular é fortemente regulada através de alguns mecanismos como, fosforilação por quinases e desfosforilação por fosfatases; ligação de proteínas de ativação específicas denominadas ciclinas; e ligação de peptídeos inibidores (ANDERSON et al, 2003).

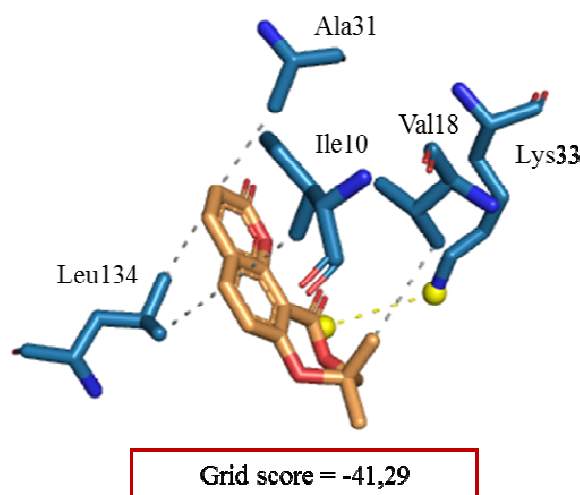
Anderson e colaboradores (2003) depositaram a estrutura cristalográfica da CDC2 no PDB (1OIQ), com resolução cristalográfica de 2,31 Å. O acoplamento obtido pelo DRAR-CPI com o poligaleno é apresentado na Figura 147.

Figura 147 - Acoplamento do poligaleno com o alvo 1OIQ pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1.



O perfil de interação do poligaleno com o alvo CDC2 apresenta em sua maioria interações hidrofóbicas, que envolvem os resíduos Ile10, Val18, Ala31 e Leu134. Ponte salina também é observada entre o anel de sete membros e a amina terminal de Lys33 (Figura 148).

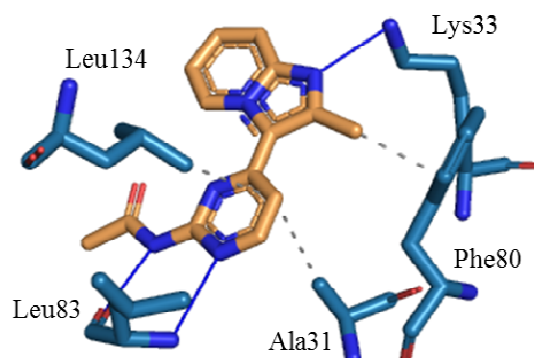
Figura 148 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do poligaleno com CDC2. Proteína: azul, ligante: laranja, interações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, pontes salina: barra pontilhada amarela



De acordo com os autores supracitados, a estrutura cristalina de CDC2 complexada com o ligante N-[4-(2-metilimidazo [1,2-a] piridin-3-il)-2-pirimidinil] acetamida (HDU) revelou o modo de ligação do grupo imidazol [1,2- α] piridina. As interações de ligação de hidrogênio com a proteína está entre o átomo de nitrogênio da pirimidina e grupo NH da cadeia principal de Leu83; o átomo de nitrogênio 2-amida com o oxigênio carbonílico do mesmo resíduo; e o átomo de nitrogênio do grupo imidazol [1,2- α] piridina com o grupo amino de Lys33. Outra ligação de hidrogênio, mediada por molécula de água, ocorre entre o oxigênio carbonílico do grupo 2-amida e a cadeia lateral de Asp86 (Tabela 53).

O perfil de interação obtido pela submissão do complexo de código PDB 1OIQ no servidor PLIP (Figura 149), apresentou todas as ligações de hidrogênio direta. Além disso, apresentou interações hidrofóbicas não citadas pelos autores, e não apresentou a ligação de hidrogênio mediada por água com o resíduo Asp86.

Figura 149 - Perfil de interação do ligante HDU com CDC2. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul



A cumarina poligaleno apresentou somente a ligação de hidrogênio com o resíduo Lys33 em comum com o estudo de Anderson e colaboradores (2003). Além desta, foi observado, também, algumas ligações hidrofóbicas com Ile10, Val18, Ala31 e Leu134, sendo Ala31 e Leu134 também apresentadas pelo servidor com o ligante HDU. O perfil de interação da molécula de consulta confirma o resultado obtido por meio do cálculo de energia de acoplamento. Neste, observa que o ligante HDU apresentou resultado superior (Grid score = -50,05) ao do poligaleno.

Tabela 53 - Perfil de interação com o alvo proteína quinase de divisão celular 2

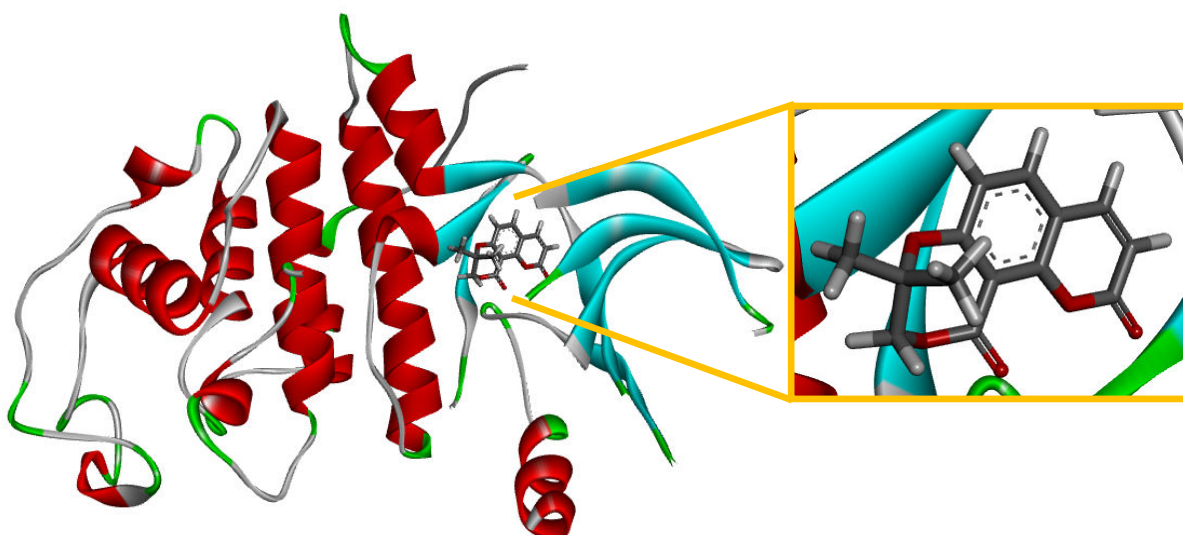
Anderson et al (2003)	Ligante (HDU)	Poligaleno
Interações hidrofóbicas		
		Ile10
		Val18
	Ala31	Ala31
	Phe80	
	Leu134	Leu134 (2x)
Ligaçõesceptoras de hidrogênio		
Lys33	Lys33	
Leu83	Leu83	
Ligaçõesdoadoras de hidrogênio		
Leu83	Leu83	
Ligaçõesceptoras de hidrogênio através de pontes de água		
Asp86		
Pontes salina		
		Lys33

4.3.2.2.20 Proteína tirosina quinase JAK2

JAK2, membro da família Janus quinase (JAK) de proteínas tirosina quinases (PTQ), é considerado importante mediador de sinalização intracelular de citocinas. Mutações do gene

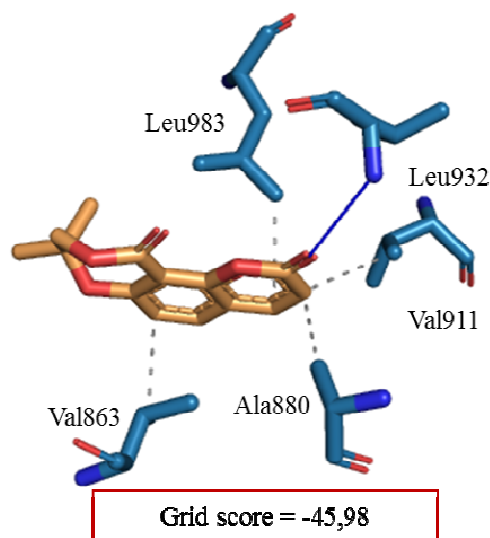
JAK2 estão associados com cânceres hematológicos, e a atividade de JAK anômalo também está associada com número de doenças autoimunes, incluindo artrite reumatoide. Dessa forma, o desenvolvimento de inibidores específicos de JAK2 tem enorme importância clínica. O domínio PTQ é crítico para a função de JAK2 (DEON et al, 2001; HU et al, 2002). Lucet e colaboradores (2006) relataram a estrutura cristalográfica (2,0 Å) da conformação ativa do domínio PTQ de JAK2 em complexo de alta afinidade com inibidor piridona tetracíclico: 2-(1,1-dimetiletil) 9-fluoro-3,6-di-hidro- 7H-benz [H] -imidazo [4,5-f] isoquinolin-7-ona (IZA). O acoplamento obtido pelo DRAR-CPI com o poligaleno é apresentado na Figura 150.

Figura 150 - Acoplamento do poligaleno com o alvo 2B7A pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1.



O acoplamento da cumarina poligaleno ao alvo JAK2 apresentou principalmente ligações hidrofóbicas e somente uma ligação de hidrogênio. As interações hidrofóbicas ocorreram com os resíduos Val863, Ala880, Val911 e Leu983, todas no núcleo cumarínico. A ligação de hidrogênio ocorre entre o oxigênio carbonílico do anel cumarínico (C2) e o grupo amina de Leu932 (Figura 151).

Figura 151 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do poligaleno com JAK2. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul



O ligante IZA é predominantemente hidrofóbico e, conseqüentemente, forma grande número de interações de van der Waals com domínio PTQ JAK2. O sistema de anéis planar do inibidor é acoplado entre os resíduos hidrofóbicos do lobo N-terminal (Leu855, Val863, Ala880, Val911), do lóbulo terminal-C (Leu983 e Gly935), e da dobradiça (Met929, Tyr931). Além disso, o anel piridona faz duas ligações de hidrogênio diretas: entre átomo de nitrogênio do anel e o resíduo Glu930 e entre átomo de oxigênio do anel e o resíduo Leu932, que mimetizam as observadas entre o grupo adenina de ATP e outras PTQ. A unidade de imidazol participa de rede de ligações de hidrogênio mediada por água, onde um dos átomos de nitrogênio interage com os resíduos Asp939, Ser936, Leu855 e Arg980, e o outro interage com Gly993 e Asp994. O grupo hidrofóbico *terc*-butila do inibidor não está bem acomodado no sítio ativo da JAK2, sendo localizado dentro e adjacente a bolso polar que inclui Asp994, Arg980, Asn981, Asn859 e Lis882, coordenado por íons Mg^{2+} (LUCET et al, 2006). A Tabela 54 lista as principais interações.

O perfil de interação obtido pela submissão do complexo de código PDB 2B7A no servidor PLIP (Figura 152), apresentou apenas poucas das ligações citadas por Lucet e colaboradores (2006). Dentre elas destaca-se a ligação de hidrogênio direta com o resíduo Leu932, também apresentada pela molécula de consulta poligaleno. Além dessa interação, ambos complexos submetidos ao servidor PLIP, apresentaram somente interações hidrofóbicas, todas citadas no artigo em questão. O menor número de interações apresentada pela cumarina analisada reflete o menor resultado obtido por meio do cálculo de energia de acoplamento, onde o ligante IZA apresentou resultado superior (Grid score = -57,47).

Figura 152 - Grid score e perfil de interação do ligante IZA com JAK2. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul

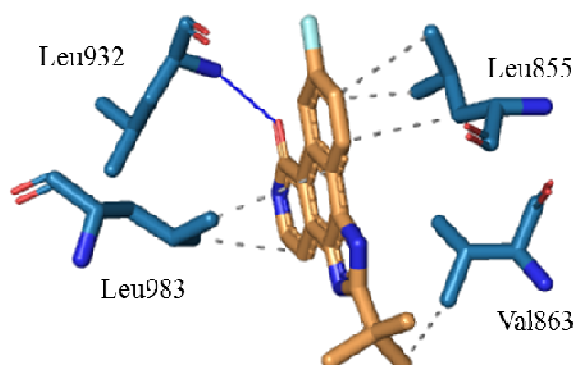


Tabela 54 - Perfil de interação com o alvo Proteína tirosina quinase JAK2

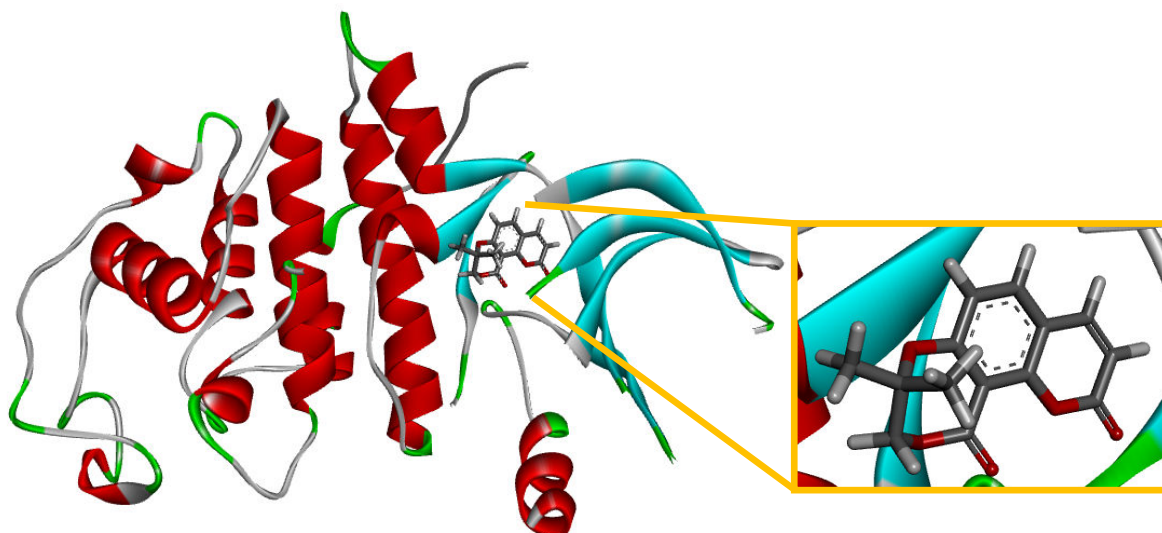
Lucet et al (2006)	Ligante (IZA)	Poligaleno
Interações hidrofóbicas		
Leu855	Leu855 (3x)	
Val863	Val863	Val863
Ala880		Ala880
Val911		Val911
Met929		
Tyr931		
Gly935		
Leu983	Leu983 (2x)	Leu983
Ligaçõesceptoras de hidrogênio		
Leu932	Leu932	Leu932
Ligaçõesdoadoras de hidrogênio		
Glu930		
Ligaçõesceptoras de hidrogênio mediadas por água		
Leu855		
Ser936		
Asp939		
Arg980		
Ligaçõesdoadoras de hidrogênio mediadas por água		
Gly993		
Asp994		

4.3.2.2.21 MAP quinase - ativada por proteína quinase 2 (MQ2)

As proteínas quinases ativadas por mitógeno formam grande e variado grupo de Ser/Thr quinases envolvidas em rotas de sinalização intracelular. Inibição de MQ2 mostra redução em fatores de necrose tumoral α (TNF- α), interferon- γ , interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, o que sugere que esta enzima é componente chave no processo inflamatório e potencial alvo para a terapia anti-inflamatória (UNDERWOOD et al, 2003).

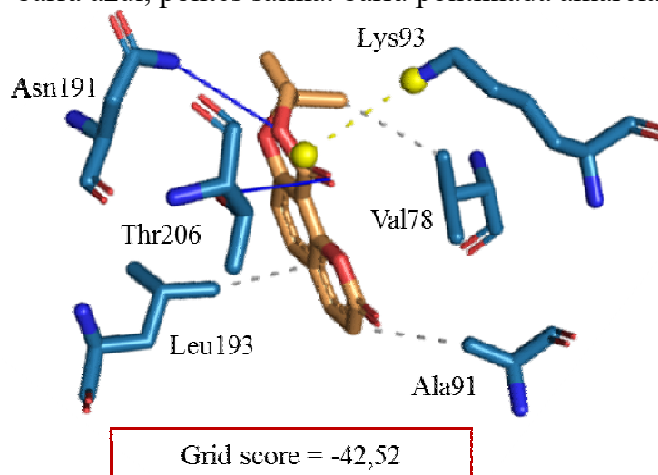
Underwood e colaboradores (2003) determinaram a estrutura cristalográfica do sítio ativo da MQ2 humana complexada com Estaurosporina, a 2,7 Å e com ADP, a 3,2 Å (1NY3). O acoplamento obtido pelo DRAR-CPI com o poligaleno é apresentado na Figura 153.

Figura 153 - Acoplamento do poligaleno com o alvo 1NY3 pelo servidor DRAR-CPI. Alfa hélices: vermelho, folhas beta: azul; turns: verdes; carbonos: cinza; oxigênio: vermelho; hidrogênio: branco. Imagem gerada pelo programa Discovery Studio Visualizer 4.1.



Com o acoplamento molecular do poligaleno com o alvo MQ2 foi possível observar interações hidrofóbicas com os resíduos Val78, Ala91 e Leu193. Ponte salina pode ser observada entre o anel de sete membros e o resíduo Lys93. As ligações de hidrogênio ocorrem também no anel de sete membros, entre o átomo de oxigênio carbonílico em C1' e a hidroxila de Thr206 e entre o átomo de oxigênio O2' e a amina de Asn191 (Figura 154).

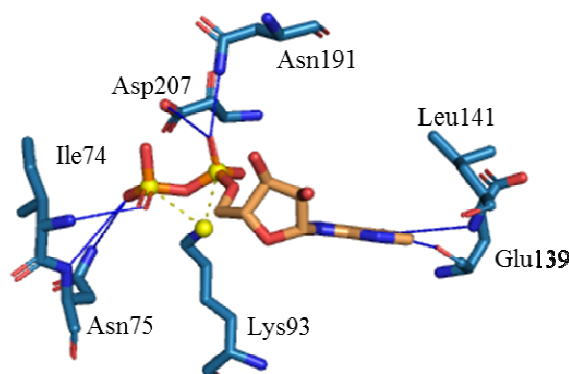
Figura 154 - Grid score (kcal/mol) e perfil de interação do poligaleno com MQ2. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações hidrofóbicas: barra pontilhada cinza, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela



As interações observadas por Underwood e colaboradores (2006) entre a molécula de ADP e o alvo MQ2 foi muito similar as observadas em outros complexos quinases/ADP ou ATP. O anel adenina acopla-se na proteína por meio de interações hidrofílicas com átomo de nitrogênio da cadeia principal do resíduo Leu141 e com átomo de oxigênio da cadeia principal do resíduo Glu139. Os grupos fosfato fazem interações iônicas (pontes salina) com Ile74, Lys93, Asn191 e Asp207. As interações estão listadas na Tabela 55.

O perfil de interação obtido pela submissão do complexo de código PDB 1NY3 no servidor PLIP (Figura 155), apresentou diferenças principalmente no tipo de interações obtidos para os mesmos resíduos encontrados pelos autores citados. As ligações de hidrogênio com Leu141 e Glu139, bem como a ponte salina com Lys93 foram as únicas interações que coincidiram. Interações com Ile74 e Asn91 apresentaram perfis diferentes.

Figura 155 - Grid score e perfil de interação do poligaleno com MQ2. Proteína: azul, ligante: laranja, ligações de hidrogênio: barra azul, pontes salina: barra pontilhada amarela



Para a cumarina, poligaleno, as interações com os resíduos Val78, Leu193, Leu141 e Lys93 foram idênticas às apresentadas pelos autores. Porém, com o resíduo Asn91 o tipo de interação observada foi diferente. A energia de acoplamento mostra que há diferença significativa entre as interações obtidas pelo ligante ADP (Grid score = -78,57) e a molécula de consulta.

Tabela 55 - Perfil de interação com o alvo MAP quinase - ativada por proteína quinase 2

Underwood et al (2006)	Ligante (ADP)	Poligaleno
Interações hidrofóbicas		
Val78		Val78
		Ala91
Leu193		Leu193
Ligaçõesceptoras de hidrogênio		
	Ile74	
	Asn75 (2x)	
Leu141	Leu141	

	Asn191	Asn191	
		Thr206	
Ligações doadoras de hidrogênio			
Glu139		Glu139	
		Asp207	
Pontes salinas			
Ile74			
Lys93		Lys93 (2x)	Lys93
Asn191			
Asp207			

4.3.3 Avaliação dos alvos

O cálculo de energia de acoplamento (Grid score) permitiu avaliar os melhores alvos de cada servidor para cada molécula de consulta. Esses resultados apontam o melhor potencial destas moléculas em apresentar atividades sobre os alvos em questão. A Tabela 56 resume os resultados de energia de acoplamento. A rotina apresentou melhores resultados para os alvos Anidrase carbônica 12 (AC 12) e Receptor de fator de crescimento epidérmico (RFCE), segundo o ChemProt 2.0 e DRAR-CPI, respectivamente.

A luteolina-7-*O*-glicosídeo apresentou melhor energia de acoplamento molecular para os alvos Cotransportador 2 de sódio/glicose (ChemProt 2.0) e Proteína quinase CDC42 ativada 1 (DRAR-CPI). Os melhores acoplamentos moleculares para o ácido cafeico, por sua vez, foram obtidos para os alvos Receptor de fator de crescimento epidérmico (ChemProt 2.0) e Ras-relacionada ao substrato C3 da Toxina botulínica 1 (DRAR-CPI).

O ácido *p*-cumárico, assim como o ácido cafeico, apresentou melhor resultado, segundo o DRAR-CPI, para o alvo Ras-relacionada ao substrato C3 da Toxina botulínica 1. Para o ChemProt 2.0, a melhor energia de acoplamento foi para o alvo Anidrase carbônica 12, assim como ocorreu para a rotina. Os melhores resultados de energia de acoplamento molecular, para o ácido *trans*-ferúlico, foram obtidos com os alvos Anidrase carbônica 12 (ChemProt 2.0), assim como ocorrido para a rotina e ácido *p*-cumárico, e Ornitina carbamoyltransferase, mitocondrial (DRAR-CPI). Por fim, como poligaleno não apresentou alvos selecionados pelo servidor ChemProt 2.0, como explicado anteriormente, o melhor alvo, segundo a energia de acoplamento, segundo o DRAR-CPI, foi Proteína tirosina quinase JAK2.

Tabela 56 - Energias de acoplamento dos alvos selecionados

Molécula de consulta	ChemProt 2.0		DRAR-CPI	
	Alvo	Grid score	Alvo	Grid score
Rutina	Receptor de estrogênio	-	Receptor do fator de crescimento epidérmico	-90,37
	Anidrase carbônica 12	-75,63	Proteína quinase dependente de 3-fosfoinosítido	-77,27
	Anidrase carbônica 9	-74,65	Glicogênio sintase quinase 3 beta	-73,72
	Anidrase carbônica 1	-65,80	Fator de coagulação VII	-89,74
	Cotransportador 2 de sódio/glicose	-21,75	Receptor do fator de crescimento do fibroblasto 2	-73,13
Luteolina-7-O-glicosídeo	Receptor de estrogênio	-45,45	Proteína quinase s6 ribossomal alfa 1	-64,58
	Anidrase carbônica 12	-62,23	Proteína quinase CDC42 ativada 1	-72,86
	Anidrase carbônica 9	-62,43	Proteína 1 da tríade de histidina de ligação do nucleotídeo	-60,69
	Anidrase carbônica 1	-61,64	Beta-1,4-galactosiltransferase 1	-64,88
	Cotransportador 2 de sódio/glicose	-65,62	Receptor glicocorticoide	-65,76
Ácido cafeico	Aldose redutase	-35,58	Ras-relacionada ao substrato C3 da Toxina botulínica 1	-48,02
	Receptor de fator de crescimento epidérmico	-41,89	Ornitina carbamoiltransferase, mitocondrial	-42,67
	Enzima conversora de angiotensina	-38,99	2-oxoisovalerato desidrogenase subunidade alfa, mitocondrial	-38,31
	Anidrase carbônica 9	-40,85	Carbonil redutase [NADPH] 3	-36,45

	Anidrase carbônica 12	-41,19	Fator inibitório de migração de macrófago	-33,98
Ácido <i>p</i>-cumárico	Receptor de fator de crescimento epidérmico	-38,66	Ornitina carbamoiltransferase, mitocondrial	-39,53
	Anidrase carbônica 9	-38,53	Carbonil redutase [NADPH] 3	-34,63
	Anidrase carbônica 12	-40,89	Maleilacetoacetato isomerase	-33,89
	Succinato-semialdeido desidrogenase	-37,37	Ras-relacionada ao substrato C3 da Toxina botulínica 1	-40,18
	Anidrase carbônica 13	-34,65	2-oxoisovalerato deidrogenase subunidade alfa, mitocondrial	-35,41
	Aldose redutase	-38,76	Carbonil redutase [NADPH] 3	-40,91
Ácido <i>trans</i>-ferúlico	Receptor de fator de crescimento epidérmico	-41,11	Ornitina carbamoiltransferase, mitocondrial	-44,00
	Anidrase carbônica 12	-43,75	Malato desidrogenase, mitocondrial	-29,59
	Anidrase carbônica 2	-41,52	Albumina de soro	-39,21
	Anidrase carbônica 1	-39,01	Maleilacetoacetato isomerase	-40,19
	-	-	Proteína quinase 2 de divisão celular	-39,11
Poligaleno	-	-	Proteína quinase s6 ribossomal alfa 1	-41,81
	-	-	Proteína tirosina quinase JAK2	-44,22
	-	-	Proteína quinase CDC42 ativada 1	-40,20
	-	-	MAP quinase ativada por proteína quinase 2	-39,02
	-	-		

4.3.4 GUSAR *Antitarget/Toxicity Prediction*

A toxicidade aguda em camundongos foi predita pelo do servidor GUSAR *Antitarget/Toxicity Prediction*, nas 4 vias de administração (oral/VO, intravenosa/IV, intraperitoneal/IP e subcutânea/SC). Os resultados são mostrados na Tabela 57, na qual observa-se a dose considerada tóxica para cada via de administração e a classificação segundo os parâmetros do servidor, para cada molécula de consulta.

Tabela 57 - Toxicidade aguda em camundongos predita pelo GUSAR				
Via de administração	IP	IV	VO	SC
Rutina				
DL50 (mg/kg)	122,00	2132,00	2953,00	1653,00
Classificação	Classe 4	Não tóxico	Classe 5	Classe 5
Luteolina-7-O-glicosídeo				
DL50 (mg/kg)	691,60	3389,00	2004,00	5767,00
Classificação	Classe 5	Não tóxico	Classe 5	Não tóxico
Poligaleno				
DL50 (mg/kg)	339,60	43,18	1294,00	417,50
Classificação	Classe 4	Classe 4	Classe 4	Classe 4
Ácido cafeico				
DL50 (mg/kg)	890,20	361,40	2386,00	574,70
Classificação	Classe 5	Classe 5	Classe 5	Classe 4
Ácido <i>p</i>-cumárico				
DL50 (mg/kg)	692,30	303,20	2181,00	578,70
Classificação	Classe 5	Classe 5	Classe 5	Classe 4
Ácido <i>trans</i>-ferúlico				
DL50 (mg/kg)	682,30	224,40	2754,00	1058,00
Classificação	Classe 5	Classe 4	Classe 5	Classe 5

Observa-se que a predição da rutina apresentou baixa toxicidade aguda principalmente pelas vias VO e SC, ambas incluídas na Classe 5, ou ausência de toxicidade pela via IV. Wilson, Mortarotti e Doxtader (1947) avaliaram a toxicidade aguda da rutina em camundongos albinos, pelas vias intravenosa e intraperitoneal, nas doses de 30-50 mg/kg, e concluíram que tal substância não apresenta toxicidade nessa doses.

Pode-se observar que luteolina-7-*O*-glicosídeo apresentou baixa ou nenhuma toxicidade aguda predita pelo servidor, contribuindo para o interesse em continuar os estudos sobre a mesma. Tal flavonoide apresentou toxicidade Classe 5 apenas para as vias IP e VO.

Observa-se, também, que os ácidos cafeico e *p*-cumárico apresentaram baixa toxicidade aguda em todas as vias, e classificados da mesma forma. Somente a via SC encontrou-se na Classe 4, todas as demais foram classificadas dentro da Classe 5. O ácido *trans*-ferúlico também apresentou somente uma via dentro da Classe 4 (IV), todas as outras encontraram-se classificadas como Classe 5. O poligaleno foi a única molécula a apresentar todas as vias dentro da Classe 4, sendo a molécula com maior toxicidade dentre as analisadas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstra a importância da espécie *Asemeia ovata* como fonte promissora de substâncias bioativas, uma vez que a mesma apresentou extratos com importante ação antioxidante e letalidade frente à *Artemia salina*, sendo este teste relacionado na literatura com diferentes atividades, como antimicrobiana, antifúngica, antiparasitária e antitumoral. Além disso, as substâncias identificadas apresentaram resultados promissores na predição de atividades *in silico*.

Apesar dos baixos resultados obtidos com o teste de atividade anticolinesterásica, não se descarta a possibilidade dessa espécie biossintetizar substâncias bioativas que tenham potencial nesse quesito. Isso por que, algumas substâncias identificadas fazem parte de classe de substâncias que apresentam resultados positivos sobre a atividade em questão, como alcaloides e cumarinas. Nesse sentido, a realização desse teste com frações semi purificadas e substâncias isoladas podem levar a resultados melhores.

O perfil químico da espécie, avaliado por CLAE-DAD, constatou a riqueza dos extratos de *A. ovata*, principalmente em ácidos fenólicos e flavonoides, bem como permitiu a identificação dos compostos rutina, luteolina-7-*O*-glicosídeo e dos ácidos cafeico, *p*-cumárico e *trans*-ferúlico. A avaliação do teor de flavonoides totais da espécie destacou o extrato acetato de etila, o qual também apresentou melhores resultados em todas as atividades *in vitro* testadas. Por outro lado, o isolamento de substâncias, também focado no extrato acetato de etila devido ao seu potencial, permitiu identificar três substâncias, sendo um flavonoide, uma cumarina e um possível alcaloide, todas inéditas para espécie em estudo. O flavonoide isolado foi a rutina, bastante conhecida e com diversas atividades já relatadas na literatura, como: antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética, dentre outras. A cumarina isolada trata-se do poligaleno, o qual foi isolado unicamente na espécie da mesma família, *P. boliviensis*. Já o possível alcaloide isolado, havendo confirmação da estrutura química proposta, trata-se de substância inédita, contribuindo para o interesse na continuidade da caracterização química dessa espécie.

A predição de atividades *in silico* realizadas com todas as substâncias identificadas na espécie, permitiu levantar diversos alvos potenciais para cada uma. Aumentando o interesse em aprofundar a avaliação biológica desses compostos.

A *A. ovata* é pouco estudada dos pontos de vista químico e biológico. Apenas estudos do grupo de pesquisa do presente trabalho nesse âmbito é encontrada na literatura. Assim, esse trabalho fornece resultados inéditos acerca desta espécie, servindo de suporte para o

desenvolvimento de novas pesquisas sobre o tema, que possam aprofundar e complementar os resultados encontrados. Esses dados possibilitam também contribuir com a quimiotaxonomia do gênero *Asemeia*, e conseqüentemente com a família Polygalaceae.

Nesse sentido, os resultados deste trabalho em conjunto com os dados descritos na literatura, mostram nitidamente que as plantas medicinais são fonte de variedade de compostos com potencial atividade biológica que poderão dar origem ou servir de protótipo para o desenvolvimento de novos produtos terapêuticos.

REFERÊNCIAS

- ABBOT, J. R. Notes on the disintegration of *Polygala* (Polygalaceae), with four new genera for the flora of North America. **Journal of the Botanical Research Institute of Texas**, v. 5, p. 125-137, 2011.
- ABDILLAHI, M.; RAMASAMY, R. Aldose reductase and diabetic cardiovascular disease. **Diabetic Cardiomyopathy**, v. 9, p. 143-158, 2013.
- ADAMS, J. C. et al. A mapping of drug space from the viewpoint of small molecule metabolism. **PLoS Computational Biology**, v. 5, p. 1-12, 2009.
- AERTGEERTS, K. et al. Structural analysis of the mechanism of inhibition and allosteric activation of the kinase domain of HER2 protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 18756-18765, 2011.
- AGUIAR, A. C. A. ARANHA FILHO, J. L. M. A família Polygalaceae na planície litorânea de Picinguaba, Ubatuba, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Biociência**, v. 6, p. 321-328, 2008.
- AHMAD, A. R.; MUN'IM, A.; ELYA, B. Study of antioxidant activity with reduction of DPPH and xanthine oxidase inhibitor of the extract of *Ruellia tuberosa* Linn leaf. **International Research Journal of Pharmacy**, v.3, n.11, 2012.
- ALTERIO, V. et al. Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 16233-16238, 2009.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids. Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ALVER, A. et al. Anti-carbonic anhydrase ii antibodies in end-stage renal disease patients. **Medical Principles and Practice**, v. 23, p. 331-335, 2014.
- ALVER, A. et al. Carbonic anhydrase II autoantibody and oxidative stress in rheumatoid arthritis. **Clinical Biochemistry**, v. 44, p. 1385-1389, 2011.
- ALVES, C. Q. **Estudo químico e avaliação biológica de duas espécies de Leguminosae: *Dioclea virgata* e *Cenostigma macrophyllum***. 2012. 202 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- ANDERSON, J. E. et al. A Blind Comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. **Phytochemical analysis**, v. 2, n.3, p. 107-111, 1991.
- ANDERSON, M. et al. Imidazo[1,2-*a*]pyridines: a potent and selective class of cyclin-dependent kinase inhibitors identified through structure-based hybridisation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 3021-3026, 2003.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 2. 5ª Ed. Brasília, 2010.

AOKI, M. et al. Structural insight into nucleotide recognition in tau-protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 β . **Acta Crystallographica Section D**, v. 60, p. 439-446, 2004.

ARAÚJO, E. M. P. **Técnicas espectroscópicas e quimiométricas como ferramentas na confirmação da estrutura de substâncias isoladas de produtos naturais ou obtidas por síntese**. 2011. 131 f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal da Bahia, 2011. Disponível em: <<https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/10060/1/Edna%20Maura%20Prata%20de%20Ara%C3%BAjo%20-Tese%20de%20Doutorado%20-vers%C3%A3o%20digital.pdf>>. Acesso em: 7 de out. De 2015.

ASAHARA, S. et al. Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1) regulates glucose-stimulated insulin secretion via modulation of F-actin. **Diabetologia**, v. 56, p. 1088-1097, 2013.

BAJORATH, J. Computational analysis of ligand relationships within target families. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, p. 352-358, 2008.

BALESTRIN, L.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, O.G.; DALL'STELLA, D.S.G.; MIGUEL, M.D. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n.2, p. 230-235, 2008.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n.4, p. 629-643, 2010.

BAUER-MEHREN, A. et al. DisGeNET: a Cytoscape plugin to visualize, integrate, search and analyze gene–disease networks. **Bioinformatics**, v. 26, p. 2924-2926, 2010.

BEDNARCZUK, V. O. et al. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2, p. 43-50, 2010.

BEILLEROT, B. et al. Synthesis and protective effects of coumarin derivatives against oxidative stress induced by doxorubicin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n.3, p. 1102-1105, 2008.

BENDER, A. et al. Chemogenomic data analysis: prediction of small-molecule targets and the advent of biological fingerprints. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 10, p. 719-731, 2007.

BEN-HADJ-KHALIFA, S. et al. Contribution of coagulation factor VII R353Q, –323P0/10 and HVR4 polymorphisms to coronary artery disease in Tunisians. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 35, p. 243-249, 2013.

BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, n. 28, p. 235-242, 2000.

BERTÉ, T. E. **Estudo da atividade anticolinesterásica dos compostos taraxerol e ácido ursólico: implicações sobre o processo de memória.** 2009. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí.

BEZERRA, Denise Aline Casimiro. **Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poir e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke.** 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos-PB, 2008.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n.2, p. 123-130, 1999.

BLAKE, S. F. Polygalaceae. **North American Flora**, v. 25, p. 305-379, 1924.

BOHDAL, J. ***Artemia salina*** - Photo n. 14579a. Nature Photo & pictures. Espanha, 2010. Disponível em: <<http://www.naturephoto-cz.eu/artemia-salina-picture-14579.html>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

BRAGA, F. C. Pesquisa fitoquímica. In: LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas.** São Paulo: Atheneu, 2009. cap. 4.

BRIDI, R.; STEFFEN, V. M.; HENRIQUES, A. T. Investigação da atividade antioxidante do extrato padronizado de *Ginkgo biloba* (EGb 761) em ratos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, n.2, p. 159-164, 2001.

BROWNLEE, J. M. et al. Structural and thermodynamic studies of simple aldose reductase–inhibitor complexes. **Bioorganic Chemistry**, v. 34, p. 424-444, 2006.

BUNNEY, T. D. et al. Structural Insights into Formation of an Active Signaling Complex between Rac and Phospholipase C Gamma 2. **Molecular Cell**, v. 34, p. 223-233, 2009.

BUTTERWORTH, R. F.; BESNARD, A. Thiamine-dependent enzyme changes in temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. **Metabolic Brain Disease**, v. 5, p. 179-184, 1990.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin América. A personal view. **Journal Ethnopharmacology**, v.100, p.131-134, 2005.

CAMPOS, R. O. P.; SANTOS, A. R. S.; VAZ, Z. R. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). **Life Science**, v. 61, p. 1619-1630, 1997.

CAPKAUSKAITE, E. et al. Benzenesulfonamides with pyrimidine moiety as inhibitors of human carbonic anhydrases I, II, VI, VII, XII, and XIII. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 6937-6947, 2013.

CAPRA, J. C. et al. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: evidence for the involvement of monoaminergic systems. **European Journal of Pharmacology**, v. 643, n. 2-3, p. 232–238, 2010.

- CARREGAL, A. P. et al. Triagem virtual inversa como ferramenta para química de produtos naturais. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 8, p. 71-82, 2011.
- CARRELLA, D. Mantra 2.0: an online collaborative resource for drug mode of action and repurposing by network analysis. **Bioinformatics**, v. 30, p. 1787-1788, 2014.
- CARVALHO, I. et al. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, 26, n.3, p. 428-438, 2003.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n.1, p. 99-105, 1998.
- CERETO-MASSAGUÉ, A. et al. Tools for *in silico* target fishing. **Methods**, p. 2-6, 2014.
- CHANDRASEKAR, D. et al. Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: A sensitive screening method for polyherbal formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, n.2, p. 460-464. 2006.
- CHANG, Y. et al. Genetic variation in the carbonyl reductase 3 gene confers risk of type 2 diabetes and insulin resistance: a potential regulator of adipogenesis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 90, p. 847-858, 2012.
- CHEN, C. L. et al. Hypoxia and metabolic phenotypes during breast carcinogenesis: expression of HIF-1 α , GLUT1, and CAIX. **Virchows Archiv**, v. 457, p. 53-61, 2010.
- CHEN, H. et al. A molecular brake in the kinase hinge region regulates the activity of receptor tyrosine kinases. **Molecular Cell**, v. 27, p. 717-730, 2007.
- CHEN, K. J. et al. Comparing bioassay response and similarity ensemble approaches to probing protein pharmacology. **Bioinformatics**, v. 27, p. 3044-3049, 2011.
- CHEN, X.; UNG, C. Y.; CHEN, Y. Z. Can an *in silico* drug-target search method be used to probe potential mechanisms of medicinal plant ingredients? **Natural Product Reports**, v. 20, p. 432-44, 2003.
- CHEONG, M. H. et al. Anti-inflammatory effects of *Polygala tenuifolia* root through inhibition of NF- κ B activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglial cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n.3, p. 402-410, 2011.
- CHODAT, R. H. Sur la distribution et l'origine, Polygalacées. **Archives des Sciences Physiques et Naturelles**, v. 25, p. 695-714, 1981.
- CÍCHOVÁ, M. et al. Influence of tannin addition on the content and composition of polyphenolic compounds in wines. **Czech Journal Food Sciences**, Praga, v. 26, p S33-S38, 2008.
- COELHO, V. P. M.; AGRA, M. F.; BARACHO, G. S. Flora da Paraíba, Brasil: *Polygala* L. (Polygalaceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 22, p. 225-239, 2008.

CONCEIÇÃO, V. N. et al. Estudo do teste de Scott via técnicas espectroscópicas: um método alternativo para diferenciar cloridrato de cocaína e seus adulterantes. **Química Nova**, v. 37, n. 9, p.1538-1544, 2014.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversidade: um componente essencial na descoberta de fármacos. In: YUNES, R. A.; CECHINEL, V. F. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2. ed. Itajaí: UNIVALI, p. 51 – 79, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

CRISTIANO, R. et al. Two Xanthones from *Polygala paniculata* and confirmation of the 1-Hydroxy-2,3,5-trimethoxy-xanthone at Trace Level by HRGC-MS. **Zeitschrift Fur Naturforschung C**, v. 58, p. 490-494, 2003.

CUNHA JUNIOR, A., **Constituintes químicos da espécie vegetal *Polygala sabulosa* A.W. Bennett (Polygalaceae): isolamento e atividade biológica**. 2002. 120 p. Dissertação (Mestrado em Química), Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DAO, T. T. et la. Xanthones from *Polygala karensium* inhibit neuraminidases from influenza A viruses. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n.11, 3688–3692, 2012.

DAVID, J. P.; SILVA, E. F.; MOURA, D. L. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetti*. **Química Nova**, v. 24, n.6, p. 730 – 733, 2001.

DAVIS, A. P. et al. The comparative Toxicogenomics database: update 2011. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 1067–1072, 2011.

DEON, D. et al. Cross-talk between IL-1 and IL-6 signaling pathways in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Journal of Immunology**, v. 167, p. 5395-5403, 2001.

DI FIORI, A. et al. Crystal structure of human carbonic anhydrase XIII and its complex with the inhibitor acetazolamide. **Proteins**, v. 74, p. 164-175, 2009.

DUDASH, J. et al. Glycosylated dihydrochalcones as potent and selective sodium glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 5121-5125, 2004.

DUDEK, A. Z. et al. Carbonic anhydrase IX expression is associated with improved outcome of high-dose interleukin-2 therapy for metastatic renal cell carcinoma. **Anticancer Research**, v. 30, p. 987-992, 2010.

DUDUTIENE, V. et al. 4-Substituted-2,3,5,6-tetrafluorobenzenesulfonamides as inhibitors of carbonic anhydrases I, II, VII, XII, and XIII. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 2093-2106, 2013.

DURANT, J. L. et al. Reoptimization of MDL keys for use in drug discovery. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 42, p. 1273–1280, 2002.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, **Biochemical Pharmacology**, v.7, n.2, p. 88-90, 1961.

EMIG, D. et al. Drug target prediction and repositioning using an integrated network-based approach. **Plos One**, v. 8, p. 1-17, 2013.

EWING, T. J. et al. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 15, p. 411–428, 2001.

FADDA, A. et al. Reaction time and DPPH concentration influence antioxidant activity and kinetic parameters of bioactive molecules and plant extracts in the reaction with DPPH radical. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 25, p. 112-119, 2014.

FAHAM, S. et al. The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport. **Science**, v. 321, p. 810-814, 2008.

FALKENBERG, M. B; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução a análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. rev. Porto Alegre: Florianópolis: Ed. da UFRGS; Ed. da UFSC, 2007. cap. 10.

FANG, J. et al. Synthesis of 3-alkyl naphthalenes as novel estrogen receptor ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 5075-5077, 2008.

FANG, M. et al. Genetic diversity in natural populations of the medicinal herb *Polygala tenuifolia* Willd. and its implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 400–406, 2012.

FARZA, H. R. **Módulo II: conhecimentos gerais**. Gerência Geral de Toxicologia – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (GGTOX – ANVISA). 2007. Disponível em: <<http://ltc.nutes.ufrj.br/toxicologia/mII.cond.htm>>. Acesso em: 02 fev. 2015.

FEINSTEIN, Y. et al. Natural history and clinical manifestations of hyponatremia and hyperchlorhidrosis due to carbonic anhydrase XII deficiency. **Hormone Research in Pediatrics**, v. 81, p. 336-342, 2014.

FELDSHTEIN, M. et al. Hyperchlorhidrosis Caused by Homozygous Mutation in CA12, Encoding Carbonic Anhydrase XII. **American Journal of Human Genetics**, v. 87, p. 713-720, 2010.

FELICIANO, A. S. et al. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. (Org.) **Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 4 ed. Itajaí: Univali, 2014. p. 133-173.

FERREIRA, M. A. **Perfil cromatográfico das substâncias fenólicas presentes em extratos de mel de assa peixe e avaliação de seu poder antioxidante**. 2010. 77 p. Monografia (Curso de graduação em Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, v. 408, p. 239-247, 2000.

FONSECA, F. N. **Desenvolvimento tecnológico de fitoproduto a partir de *Justicia pectoralis* – Chambá**: obtenção do extrato seco padronizado (CLAE-DAD) e avaliação farmacológica. 2009. 131 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

FRASSON, A. et al. First report of anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the medicinal plant *Polygala decumbens* from the Brazilian semi-arid region, Caatinga. *Parasitology Research*, v. 110, p. 2581-2587, 2012.

FURET, P. et al. Modelling study of protein kinase inhibitors: Binding mode of Staurosporine and origin of the selectivity of CGP 52411. *Journal Computer-Aided Molecular Design*, v. 9, p. 465–472, 1995.

FURNESS, S. H.; STAFFORD, P. J. The Northwest European Pollen Flora, 55 Polygalaceae. *Review of Palaeobotany and Palynology*, v. 88, p. 61-82, 1995.

GAGLIARDI, P. A. et al. 3-Phosphoinositide-dependent kinase 1 controls breast tumor growth in a kinase-dependent but akt-independent manner. *Neoplasia*, v. 14, p. 719-731, 2012.

GAO, Z. PDTD: a web-accessible protein database for drug target identification. *BMC Bioinformatics*, v. 9, p. 1-7, 2008

GAULTON, A. et al. ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic Acids Research*, v. 40, p. 1100–1107, 2012.

GEORGÉ, S. et al. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n.53, p.1370-1373, 2005.

GFELLER, D. et al. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. *Nucleic Acids Research*, v. 42, p. 32-38, 2014.

GHUMAN, J. et al. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *Journal of Molecular Biology*, v. 353, p. 38-52, 2005.

GILBERT, S. M. et al. Detection of carbonic anhydrase-9 gene expression in peripheral blood cells predicts risk of disease recurrence in patients with renal cortical tumors. *Urology*, v. 67, p. 942-945, 2006.

GIORDANI, R. B. et al. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). *Química Nova*, v. 31, n.8, p. 2042-2046, 2008.

- GOUVÊA, C. M. C. P. Oxidações biológicas e atividade vegetal. In: **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Carvalho, J. C. T. coord. Ribeirão Preto: Tecmedd, p. 101-124, 2004.
- GRIEB, G. et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a promising biomarker. **Drug News Perspect**, v. 23: 257–264, 2010.
- HAJDUK, P. J.; HUTH, J. R.; TSE, C. Predicting protein druggability. **Drug Discovery Today**, v. 10, p. 1675–1682, 2005.
- HAMBURGER, M.; GUPTA, M.; HOSTETTMANN, K. Coumarins from *Polygala paniculata*. **Planta Medica**, v. 51, p. 215-216, 1985.
- HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 14, p. 111-129, 2015.
- HONG-LAN, W. et al. Chemical fingerprinting by HPLC-DAD-ELSD and principal component analysis of *Polygala japonica* from different locations in China. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v.8, n.5, p.343-348, 2010.
- HU, X. et al. Sensitization of IFN-gamma Jak-STAT signaling during macrophage activation. **Nature Immunology**, v. 3, p. 859-866, 2002.
- IKUTA, M. et al. Crystal structures of the N-terminal kinase domain of human RSK1 bound to three different ligands: Implications for the design of RSK1 specific inhibitors. **Protein Science**, v. 16, p. 2626-2635, 2007.
- INNOCENTI, A. et al. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of mammalian isoforms I–XIV with a series of natural product polyphenols and phenolic acids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 2159-2164, 2010.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH); **Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology**, Q2A (CPMP/ICH/381/95), 1995A. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM128048.pdf>>. Acesso em: 19 jul. 2009.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH); **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995B. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM128049.pdf>>. Acesso em: 19 jul. 2009.
- IORIO, F. et al. Discovery of drug mode of action and drug repositioning from transcriptional responses. **Pnas**, v. 107, p. 14621-14626, 2007.
- IRWIN, J. J. et al. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, p. 1757-1768, 2012.
- IWANAGA, A. et al. Phenolic constituents of the aerial parts of *Cimicifuga simplex* and *Cimicifuga japônica*. **Journal of Natural Product**, v. 73, p. 609-612, 2010.

JABERIAN, H.; PIRI, K.; NAZARI, J. Phytochemical composition and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. **Food Chemistry**, v.136, p. 237-244, 2013.

JENKINS, J. L.; BENDER, A.; DAVIES, J. W. *In silico* target fishing: Predicting biological targets from chemical structure. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 3, p. 413–421, 2006.

JIMÉNEZ-OROZCO, F. A. et al. Decrease of cyclin D1 in the human lung adenocarcinoma cell line A-427 by 7-hydroxycoumarin. **Lung Cancer**, v. 34, n.2, p. 185-194, 2001.

JOHANN, S. et al. Antifungal activity of five species of *Polygala*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p. 1065-1075, 2011.

KADMIEL, M.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, p. 518-530, 2013.

KAMALAKKANNAN, N.; PRINCE, P. S. M. The influence of rutin on the extracellular matrix in streptozotocin-induced diabetic rat kidney. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 1091–1098, 2006.

KAMBA, A. S.; HASSAN, A. L. G. Antibacterial screening and brine shrimp (*artemia salina*) toxicity of *Securidaca longepedunculata* (Polygalaceae) Root Bark. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.1, p. 85-95, 2010.

KAUPPI, B. et al. The three-dimensional structures of antagonistic and agonistic forms of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain: RU-486 induces a transconformation that leads to active antagonism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 22748-22754, 2003.

KEISER, M. J. et al. Predicting new molecular targets for known drugs. **Nature**, v. 462, p. 175-181, 2009.

KEISER, M. J. et al. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. **National Biotechnology**, v. 25, p. 197-206, 2007.

KELLENBERGER, E.; HOFMANN, A.; QUINN, R. J. Similar interactions of natural products with biosynthetic enzymes and therapeutic targets could explain why nature produces such a large proportion of existing drugs. **Natural Products Reports**, v. 28, p. 1475-1612, 2011.

KIM, B. et al. The macrophage migration inhibitory factor protein superfamily in obesity and wound repair. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 47, p. 1-10, 2015.

KIM, E. K. et al. Scopoletin induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by activations of nuclear factor kB and caspase-3. **Life Sciences**, v. 77, n.7, p. 824-836, 2005.

KIM, K. et al. Succinic semialdehyde dehydrogenase: biochemical–molecular–clinical disease mechanisms redox regulation, and functional significance. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, p. 691-718, 2011.

- KIM, Y. et al. Redox-switch modulation of human SSADH by dynamic catalytic loop. **The EMBO Journal**, v. 28, p. 956-968, 2009.
- KJÆRULFF, S. K. et al. ChemProt-2.0: visual navigation in a disease chemical biology database. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 464-469, 2013.
- KLEBE, G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. **Drug Discovery Today**, v. 11, p. 580-594, 2006.
- KLEIN-JUNIOR, L. C. et al. Antihyperalgesic activity of the methanol extract and some constituents obtained from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.111, p. 145–153, 2012.
- KNOX, C. et al. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for ‘omics’ research on drugs. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 1035–1041, 2011.
- KOMANDER, D. et al. Role of T-loop phosphorylation in PDK1 activation, stability, and substrate binding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 18797-18802, 2005.
- KOROLAINEN, M. A. et al. Oxidative modification of proteins in the frontal cortex of Alzheimer's disease brain. **Neurobiology of Aging**, v. 27, p. 42-53, 2006.
- KOUTSOUKAS, A. et al. From *in silico* target prediction to multi-target drug design: Current databases, methods and applications. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 2554-2574, 2011.
- KRISTIANSEN, G. Endogenous myoglobin in human breast cancer is a hallmark of luminal cancer phenotype. **British Journal of Cancer**, v. 102, p. 1736–45, 2010.
- KUBA, K.; IMAI, Y.; PENNINGER, J. M. Multiple functions of angiotensin-converting enzyme 2 and its relevance in cardiovascular diseases. **Circulation Journal**, v. 77, p. 301-308, 2013.
- KUÇUK, M. et al. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from *Anatolia*. **Food Chemistry**, v.100, n.2, p. 526–534, 2007.
- KUHN, M. et al. STITCH 3: zooming in on protein–chemical interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 876-880, 2012.
- KUNTZ, I. D. et al. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **Journal Molecular Biological**, v.161, p. 269-288, 1982
- LAGE, K. A human phenome–interactome network of protein complexes implicated in genetic disorders. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 309–316, 2007.
- LAGUNIN, A. et al. QSAR modelling of rat acute toxicity on the basis of PASS prediction. **Molecular Informatics**, v. 30, p. 241-250, 2011.
- LAMB, J. et al. The connectivity map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. **Science**, v. 313, p. 1929-1935, 2006.

LANG, P.T. et al. **DOCK 6.7 Users Manual**. Regents of the University of California, 2015.

LAPA, A. J. et al. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia – da planta ao medicamento*. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da Universidade, p. 183-199, 2007.

LAPA, F. R. **Avaliação da atividade antinociceptiva, antiinflamatória e protetora gástrica do extrato hidroalcoólico bruto da *Polygala paniculata* L.** 2006. 119 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/4631/1/Lapa_FR_2006_Dissertacao_Mestrado.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2009.

LAPA, F. R. et al. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and the flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. in mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 104, p. 206-315, 2006.

LAPA, F. R. et al. Vasorelaxant and hypotensive effects of the extract and the isolated flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. **Jornal of Pharmacy and Pharmacology**, v.63, p. 875–881, 2011.

LAPOUGE, K. et al. Structure of the Tpr domain of P67^{Phox} in complex with Rac.GTP. **Molecular Cell**, v. 6, p. 899-907, 2000.

LEE, S. et al. Cytosolic malate dehydrogenase regulates senescence in human fibroblasts. **Biogerontology**, v. 13, p. 525-536, 2012.

LEITE, J. J. G. et al. Composição química, toxicidade, atividade larvicida e antifúngica de extratos de semente de *Persea americana* (Abacate). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.2, p.110-113, 2009.

LEWARS, E. An outline of what computational chemistry is all about. In: _____. **Computational chemistry: introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics**. Moscow. Kluwer Academic Publishers. 2004, p. 1-6.

LI, C. et al. Three triterpenoid saponins from the roots of *Polygala japonica* Houtt. **Fitoterapia**, v. 83, n.7, p. 1184–1190, 2012a.

LI, H. et al. TarFisDock: a web server for identifying drug targets with docking approach. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 219-224, 2006.

LI, J. et al. Anti-neuroinflammatory constituents from *Polygala tricornis* Gagnep. **Fitoterapia**, v.83, p. 896-900, 2012b.

LI, X. et al. Memory-enhancing effects of the crude extract of *Polygala tenuifolia* on aged mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

LIMA, C. D.; KLEIN, M. G.; HENDRICKSON, W. A. Structure-based analysis of catalysis and substrate definition in the HIT protein family. **Science**, v. 278, p. 286-290, 1997.

- LINDE, C. I. et al. Histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1) regulates Ca²⁺ signaling in mouse fibroblasts and neuronal cells via store-operated Ca²⁺ entry pathway. **American Journal of Physiology**, v. 304, p. 1098-1104, 2013.
- LIU, A. et al. Structure-activity relationship of flavonoids as influenza vírus neuramidase inhibitors and their in vitro anti-viral activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 7141-7147, 2008a.
- LIU, T. et al. Binding DB: a web-accessible database of experimentally determined protein–ligand binding affinities. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. 198–201, 2007.
- LIU, X. et al. Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 219-228, 2008b.
- LIU, X. et al. PharmMapper server: a web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 609-614, 2010.
- LIU, X. L.; et al. Effect of scopoletin on PC3 cell proliferation and apoptosis. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 22, n. 10, p. 929-933, 2001.
- LIU, Z. et al. *In silico* drug repositioning – what we need to know. **Drug Discovery Today**, v. 18, p. 110-115, 2013.
- LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do Infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil**. São Paulo, p. 386, 2002.
- LOU, Y. et al. Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase ix inhibitors. **Therapeutics, targets, and Chemical Biology**, v. 71, p. 3364-3376, 2011.
- LOUGHEED, J. C. et al. Crystal structures of the phosphorylated and unphosphorylated kinase domains of the Cdc42-associated tyrosine kinase ACK1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 44039-44045, 2004.
- LUCET, I. S. et al. The structural basis of Janus kinase 2 inhibition by a potent and specific pan–Janus kinase inhibitor. **Blood**, v. 107, p. 176-183, 2006.
- LÜDTKE, R.; AGUIAR, A. C. A. Nota sobre a ocorrência de pétalas reduzidas em espécies de *Polygala* L. subgênero *Hebeclada* (Chodat) Blake (Polygalaceae) da Região Sul do Brasil. **Biota Neotropical**, v. 8, p. 239-242, 2008.
- LUDTKE, R.; MIOTO, S. T. S. A família Polygalaceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, p. 245-251, 2008.
- LUO, H. et al. DRAR-CPI: a server for identifying drug repositioning potential and adverse drug reactions via the chemical–protein interactome. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 492-498, 2011.

- MAHMOOD, T.; NUGENT, K. Nonhepatic hyperammonemic encephalopathy due to undiagnosed urea cycle disorder. **Proceedings (Baylor University. Medical Center)**, v. 28, p. 375-377, 2015.
- MALÁTKOVÁ, P. et al. Expression of human carbonyl reductase 3 (CBR3; SDR21C2) is inducible by pro-inflammatory stimuli. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 420, p. 368-373, 2012.
- MALTERUD, K.E.; FARBROT, T.L.; HUSE, A.E.; SUND, R.B. Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. **Pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 77-85. 1993.
- MANETTI, L.M.; TURRA, A.F.; TAKEMURA, O.S.; SVIDZINSKI, T.I.E.; LAVERDE JUNIOR, A. Avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica, moluscicida e antioxidante de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.4, p.406-413, 2010.
- MARQUES, M. C. M.; PEIXOTO, A. L. Estudo taxonômico de *Polygala* subgênero *Ligustrina* (Chodat) Paiva (Polygalaceae). **Rodriguésia**, v. 58, p. 95-146, 2007.
- MARSTON, A., KISSLING, J., HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants, **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51, 2002.
- MASINI, E. et al. Antiglaucoma carbonic anhydrase inhibitors: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 23, p. 705-716, 2013.
- MASUDA, H. et al. Role of epidermal growth factor receptor in breast câncer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 136, p. 331-345, 2012.
- MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, p. 45-64, 1997.
- MATOS, M. J. C. P. P. **Novos métodos cromatográficos para análise e separação de novos produtos naturais antimicrobiano**. 2015. 51 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa, 2015. Disponível em: < <http://recil.grupolusofona.pt/handle/10437/6178>>. Acesso em: 7 de out. de 2015.
- McDONAGH, E. M. et al. From pharmacogenomic knowledge acquisition to clinical applications: the PharmGKB as a clinical pharmacogenomic biomarker resource. **Biomarkers in Medicine**, v. 5, p. 795-806, 2011.
- McLAUGHLIN, J. L; ROGERS, L. L; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, p. 513-524. 1998.
- MELO, E. A. et al. Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de polpas congeladas de frutas. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.1, p. 67-72, 2008.

- MENDES, B.G. *Polygala sabulosa* A.W.Bennett: obtenção de estilipironas e cumarinas, preparo de análogos e ensaios de atividades biológicas. 2008. 192 p. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- 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.
- MEOTTI, F. C. et al. Antinociceptive properties of coumarins, steroid and dihydrostyryl-2-pyrone from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 107-112. 2006.
- MESTRES, J. et al. The topology of drug–target interaction networks: implicit dependence on drug properties and target families. **Molecular BioSystems**, v. 5, p. 1051-1057, 2009.
- MEYER, B. N. et al. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Medicinal Plant Research**, v.45, n.5, p. 31 -34. 1982.
- MINCIONE, F.; SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C. T. The development of topically acting carbonic anhydrase inhibitors as anti-glaucoma agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 849-854, 2007.
- MISSAU, F. C. **Estudo das propriedades químicas, estruturais e biológicas das espécies *Polygala paniculata* e *Polygala pulchella***. 2008. 160 p. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- MISSAU, F.C.; MORESCO, H.H.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Avaliação dos extratos e compostos isolados de *Polygala paniculata* através de testes antioxidantes e toxicidade frente à *Artemia salina*. In: 25ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, Águas de Lindóia, 2007. **Anais da 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Disponível em: < <http://sec.sbq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T1140-1.pdf> >. Acesso em: 01 jan. 2015.
- MIULLI, D. E. et al. Plasma concentrations of glutamate and its metabolites in patients with Alzheimer's disease. **Journal of the American Osteopathic Association**, v. 93, p. 670-676, 1993.
- MOLINSKI, T. F. Nanomole-scale natural products discovery. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**. v. 12, p. 197-206, 2009.
- MONTANHER, A. B. P.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Monitoramento dos extratos brutos de espécies de *Polygala* (Polygalaceae) utilizando *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n. 1, p. 66-68, 2003.
- MONTI, M.; et al. Characterization of anti-coagulant properties of prenylated coumarin ferulenol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, n.10, p. 1437-1440, 2007.
- MOTA, K. S. L. et al. Evaluation of the toxicity and antiulcerogenic activity of the ethanol extract of *Maytenus obtusifolia* Mart. Leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 441-446, 2008.

MUKINDA, J. T.; EAGLES, P. F. K. Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n.1, p. 236–240, 2010.

NAHRSTEDT, A. BUTTERWECK, V. Lessons learned from herbal medicinal products: the example of St. John's Wort. **Journal of Natural Product**, v. 72, p. 1015-1021, 2010.

NATESH, R. et al. Structural details on the binding of antihypertensive drugs captopril and enalaprilat to human testicular angiotensin i-converting enzyme. **Biochemistry**, v. 43, p. 8718-8724, 2004.

NOGUEIRA, F. L. P. et al. Atividade analgésica e antiedematogênica de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) selvagem e obtida por micropropagação. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 310-315, 2005.

NUNES, X. P. et al. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 718-723. 2008.

O'BOYLE, N. et al. Open Babel: an open chemical toolbox. **Journal Cheminformatics**, v. 3, p. 33, 2011.

O'CAOIMH, R. et al. Effects of centrally acting angiotensin converting enzyme inhibitors on functional decline in patients with alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 40, p. 595–603, 2014.

OAKLEY, R. H.; CIDLOWSKI, J. A. The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, p. 1033-144, 2013.

OHLSTEIN, E. H. et al. New strategies in drug discovery. In: LARSON, R.S. **Bioinformatics and drug discovery**. New Jersey. Totowa. 2006, p. 1-12.

OLAH, M. et al. **WOMBAT and WOMBAT-PK: bioactive databases for lead and drug discovery**. In: SCHREIBER, S. L.; KAPOOR, T. M.; WESS, G. (eds), *Chemical Biology: From Small Molecules to Systems Biology and Drug Design*. Wiley-VCH, New York, p. 760–786, 2007.

OLIVEIRA, M. C. F.; SILVEIRA, E. R. Pentaoxygenated xanthenes and fatty acids from *Bredemeyera brevifolia*. **Phytochemistry**, v. 55, n.7, p. 847-851, 2001.

ORITA, M. et al. Coumarin and chromen-4-one analogues as tautomerase inhibitors of macrophage migration inhibitory factor: discovery and X-ray crystallography. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 540-547, 2001.7

PAIVA, J. A. R. (1998). *Polygalarum Africanarum et Madagascariensium prodromus atque gerontogaei generis Heterosamara Kuntze, a genere Polygala L. segregati et a nobis denuo recepti, synopsis monographica*. **Fontqueria**, v. 50, p. 1-346, 1998.

PANDEY, S.; SRIVASTATA, S. K.; RAMANA, K. V. A potential therapeutic role for aldose reductase inhibitors in the treatment of endotoxin-related inflammatory diseases. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 21, p. 329-339, 2012.

PARK, C. H. et al. Novel cognitive improving and neuroprotective actives of *Polygala tenuifolia* Willd. Extract, BT-11. **Journal of Neuroscience Research**, v. 70, n.3, p. 484-492, 2002.

PASTORE, J. F. B.; ABBOTT, J. R. Taxonomic notes and new combinations for *Asemeia* (Polygalaceae). **Kew Bulltin**, v. 67, p. 807-813, 2012.

PASTORE, J. F. B.; CARDOSO, D. B. O. S.; AYMARD C., G. A. A synopsis, new combinations, and synonyms in *Acanthocladus* (Polygalaceae). **Novon**, v. 20, p. 317-324, 2010.

PASTORE, J. F. et al. Polygalaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2014. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB195>>. Acesso em: 15 Out. 2015.

PAUL, S. M. et al. *In vitro* and *in vivo* studies demonstrate anticancer property of root extract of *Polygala senega*. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 3, n.3, p. 188–196, 2010.

PEDRO, M. M. **Pesquisa de actividade inibitória do enzima acetilcolinesterase em extratos aquosos de várias plantas usadas como infusões**: identificação de compostos com maior actividade inibitória. 2008. 72 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Química e Bioquímica, Universidade de Lisboa, Lisboa.

PEIXOTO NETO, J. G. **Análise fitoquímica e actividade biológica de Polygalas ocorrentes no semiárido baiano**. 2011. 77 p. Monografia (Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

PERTOVAARA, M. et al. Novel carbonic anhydrase autoantibodies and renal manifestations in patients with primary Sjögren's syndrome. **Rheumatology**, v. 50, p. 1453–1457, 2011.

PINHEIRO, T. R. et al. Three xanthenes from *Polygala cyparissias*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 725-728, 1998.

PIZZOLATTI, M. G. et al. A new styryl-2-pyrone derivative from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 603-606, 2004.

PIZZOLATTI, M. G. et al. Trypanocidal activity of coumarins and styryl-2-pyrones from *Polygala sabulosa* A.W. Bennett (Polygalaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.177-182, 2008.

PIZZOLATTI, M. G.; LUCIANO, C.; MONACHE, F. D. Styryl- and dihydrostyryl-2-pyrones derivatives from *Polygala sabulosa*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 819-922, 2000.

POLEKHINA, G. et al. Crystal structure of maleylacetoacetate isomerase/glutathione transferase zeta reveals the molecular basis for its remarkable catalytic promiscuity. **Biochemistry**, v. 40, p. 1567-1576, 2001.

POTHITIRAT, W.; CHOMNAWANG, M. T.; SUPABPHOL, R.; GRITSANAPAN, W. Comparison of bioactive compounds content, free radical scavenging and anti-acne inducing bacteria activities of extracts from the mangosteen fruit rind at two stages of maturity. **Fitoterapia**, v. 80, n.7, p. 442-447, 2009.

PRADO, V. M. J. **Desenvolvimento de método por CLAE-DAD para discriminação de chás de genótipos de *Lippia gracilis* Schauer através de cromatogramas de *fingerprint* combinados com análises quimiométricas**. 2012. 77 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

QUEIROZ, M. M. F. **Identificação dos inibidores de acetilcolinesterase em *Tetrapteryx mucronata* Cav. (Malpighiaceae) e comparação quali e quantitativa dos derivados triptamínicos presentes na espécie em estudo e Ayahuasca**. 2013. 79 p. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química Orgânica, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

RAFAEL, J. A.; et al. Validation of HPLC, DPPH• and nitrosation methods for mesalamine determination in pharmaceutical dosage forms. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 97-103, 2007.

RAHMAN, A.; et al. Acetyl and butyrylcholinesterase-inhibiting triterpenoid alkaloids from *Buxus papillosa*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 963-968, 2001.

RAI, P.; PATIL, P.; RAJPUT, S. J. Simultaneous determination of phyllanthin and hypophyllanthin in herbal formulation by derivative spectrophotometry and liquid chromatography. **Pharmacognosy Magazine**, v. 18, p. 151-158, 2009.

RAMAKRISHNAN, B.; RAMASAMY, V.; QASBA, P. K. Structural Snapshots of beta-1,4-Galactosyltransferase-I Along the Kinetic Pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 357, p. 1619-1633, 2006.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n.4, p. 755-760, 2006.

REDELMAN-SIDI, G. et al. Oncogenic activation of Pak1-dependent pathway of macropinocytosis determines BCG entry into bladder cancer cells. **Cancer Research**, v. 73, p. 1156-1167, 2013.

RHEE, I. K. et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography**, v.915, p.217-23, 2001.

RIBEIRO, A. R. C. et al. Estudo da atividade anti-helmíntica do extrato etanólico de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) sob *Haemonchus contortus* em ovinos no semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 1051-1055, 2014.

- ROCHA, J. L. C. et al. Quantificação de salicilato de metila em quatro gêneros de Polygalaceae, por CLAE-DAD. **Química Nova**, v. 35, p. 2263-2266, 2012.
- RODRIGUES, M. V. N. et al. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Multiciência**, v. 7, 2006.
- ROGNAN, D. Development and virtual screening of target libraries. **Journal of Physiology**, v. 99, p. 232-244, 2006.
- ROGNAN, D. Structure-based approaches to target fishing and ligand profiling. **Molecular Informatic**, v. 29, p. 176-187, 2010.
- ROTH, B. et al. Screening the receptorome to discover the molecular targets for plant-derived psychoactive compounds: a novel approach for CNS drug discovery. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 102, p. 99–110, 2004.
- RUIZ, A. L. T. G. et al. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p. 98-102, 2005.
- SAKTHIDEVI, G.; MOHAN, V. R. Comparative *in vitro* free radical scavenging activity of *Polygala javana* DC., *Polygala chinensis* L. and *Polygala rosmarinifolia* Wight & Arn (Polygalaceae). **Journal of Current Chemical & Pharmaceutical Sciences**, v.2, n.4, p. 294-298, 2012.
- SALENTIN, S. et al. PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. **Nucleic Acids Research**, v.43, p. 443-447, 2015.
- SCHWEITZER, B. A. et al. Structure-based design and synthesis of pyrazinones containing novel P1 'side pocket' moieties as inhibitors of TF/VIIa. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 3006-3011, 2005.
- SERRANO, C.; ORTEGA, T.; VILLAR, A. Biological activity of traditional medicines from Spain and Guatemala. *Artemia salina* bioassay: a revision. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 118 – 120. 1996.
- SHARMAN, J. L. et al. IUPHAR-DB: new receptors and tools for easy searching and visualization of pharmacological data. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 534–538, 2011.
- SHAW, C. Y. et al. Antioxidant properties of scopoletin isolated from *Sinomonium acutum*. **Phytotherapy Research**, v. 17, n.7, p. 823-825, 2003.
- SHEKARCHI, M. et al. A validated method for analysis of Swerchirin in *Swertia longifolia* Boiss. by high performance liquid chromatography. **Pharmacognosy Magazine**, v. 21, p. 13-18, 2010.
- SHI, D. et al. 1.85-Å resolution crystal structure of human ornithine transcarbamoylase complexed with n-phosphonacetyl-l-ornithine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 34247-34254, 1998.

SHOEB, M. et al. Bioactivity of two Turkish endemic *Centaurea* species, and their major constituents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 155-159, 2007.

SILVA, C. B. *Asemeia extraaxillaris* (Chodat) J.F.B. Pastore & J.R. Abbott (Polygalaceae) e *Microlobius foetidus* (Subsp. *Paraguensis* (Benth.) M. Sousa et G. Andrade) (Fabaceae-Mimosoideae): contribuição ao estudo fitoquímico e investigação das atividades biológicas (alelopática, antiploriferativa, antineoplásica, antimicrobiana, antioxidante, tóxica e larvicida). 2014. 316 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SILVA, D. F. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Polygala boliviensis* A.W. Benn. (Polygalaceae)**. 2015. 131 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Tradução: Ricardo Bicca de Alencastro. Rio de Janeiro: LTC, 2007. 490 p.

SIQUEIRA, J. M. et al. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 21, n.5. 1998.

SOARES, K. C. N. **Estudo do efeito vasorrelaxante e hipotensor do extrato hidroalcoólico da *Polygala paniculata* L. em ratos**. 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008. Disponível em: < <http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/bitstream/handle/1884/19862/DISSERTACAO%20FINAL.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 13 de abr. 2012.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p. 351-355. 2007.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n.3, p. 202-210, 2011.

SRIVASTAVA, D. K. et al. Structural analysis of charge discrimination in the binding of inhibitors to human carbonic anhydrases I and II. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 5528-5537, 2007.

SRIVASTAVA, S. K.; RAMANA, K. V.; BHATNAGAR, A. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. **Endocrine Review**, v. 26, p. 380-392, 2005.

STAMOS, J.; SLIWKOWSKI, M. X.; EIGENBROT, C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 46265-46272, 2002.

STANCHEV, S. et al. Synthesis, computational study and cytotoxic activity of new 4-hydroxycoumarin derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 4, p. 694-706, 2008.

SWANSON, C. D. et al. Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase ameliorates collagen-induced arthritis. **Journal of Immunology**, v. 188, p. 3513-3521, 2012.

SYMYX MDL Toxicity Database including RTECS, Disponível em: <<http://www.symyx.com/products/pdfs/toxds.pdf>>

TABOUREAU, O. et al. ChemProt: a disease chemical biology database. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 367-372, 2011.

TERMENTZI, A.; KEFALAS, P.; KOKKALOU, E. LC-DAD-MS (ESI+) analysis of the phenolic content of *Sorbus domestica* fruits in relation to their maturity stage. **Food Chemistry**, v.106, p. 1234-1245, 2008.

TEST 3.0, Disponível em: <<http://www.epa.gov/nrmrl/std/cppb/qsar/index.html>>

THOMAS, G. Computer-aided drug design. In: _____. **Fundamentals of medicinal chemistry**. New York, N.Y.: J. Wiley & Sons, 2007, p. 113-143.

TREVISAN, R. F. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades biológicas das cascas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent Umaceae**. 2010. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

TSO, S. C. et al. Benzothiophene carboxylate derivatives as novel allosteric inhibitors of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 20583-20593, 2014.

TSO, S. C. et al. Structure-based design and mechanisms of allosteric inhibitors for mitochondrial branched-chain α -ketoacid dehydrogenase kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, p. 9728-9733, 2013.

UNDERWOOD, K. W. et al. Catalytically active MAP KAP kinase 2 structures in complex with staurosporine and ADP reveal differences with the autoinhibited enzyme. **Structure**, v. 11, p. 627-636, 2003.

UNIPROT CONSORTIUM. Ongoing and future developments at the universal protein resource. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 214-219, 2011.

VALENTINE, V. et al. The role of the kidney and sodium-glucose cotransporter-2 inhibition in diabetes management. **Clinical Diabetes**, v. 30, p. 151-155, 2012.

VARK, L. C. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce mortality in hypertension: a meta-analysis of randomized clinical trials of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors involving 158,998 patients. **European Heart Journal**, v. 33, p. 2088-2097, 2012.

VIEIRA, L.C.C. **Síntese de uma coleção de cumarinas, possíveis inibidores da enzima acetilcolinesterase.** 2010. 141 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

VIEIRA, M.N. **Prospecção química e biológica de espécies de Carapanaúba (*Aspidosperma* spp.) empregadas por comunidades quilombolas de Oriximiná – PA.** 2011. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

VOGEL, K. R. **Novel therapeutics and pathomechanisms in human mendelian disorders: phenylketonuria, maple syrup urine disease, and succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency.** 2014. 239 p. Tese (Doutorado em Filosofia) – Programa de Pós-Graduação em Filosofia, Universidade Estadual de Washington, Washington.

von EICHBORN, J. et al. PROMISCUOUS: a database for network-based drug-repositioning. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 1060-1066, 2011.

WANG, L.; XIE, X. Computational target fishing: what should chemogenomics researchers expect for the future of *in silico* drug design and discovery? **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 247-249, 2014.

WANG, Y. et al. Kernel-based data fusion improves the drug–protein interaction prediction. **Computational Biology and Chemistry**, v. 35, p. 353-362, 2011.

WANG, Y. et al. Programming A Molecular Relay for Ultrasensitive Biodetection through ^{129}Xe NMR. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 55, p. 1733-1736, 2016.

WILSON, R. H.; MORTAROTTI, T. G.; DOXTADER, E. K. Toxicity studies on rutin. **Experimental Biology and Medicine**, v. 64, p. 324-327, 1947.

WINN, R. M. et al. Roles of His²⁹¹- α and His¹⁴⁶- β ' in the reductive acylation reaction catalyzed by human branched-chain α -ketoacid dehydrogenase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 43402-43410, 2003.

WISHART, D. S. et al. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. 901–906, 2008.

YAMANISHI, Y. et al. Prediction of drug–target interaction networks from the integration of chemical and genomic spaces. **Bioinformatics**, v. 24, p. 232-240, 2008.

YANG, L. et al. Exploring off-targets and off-systems for adverse drug reactions via chemical-protein interactome—clozapine-induced agranulocytosis as a case study. **PLOS Computational Biology**, v. 7, p. 1002-1016, 2011.

YANG, L.; XU, L.; HE, L. A CitationRank algorithm inheriting Google technology designed to highlight genes responsible for serious adverse drug reaction. **Bioinformatics**, v. 25, p. 2244-2250, 2009.

YOUNG, D. The drug design process. In: _____. **Computational drug design**. New Jersey. J. Wiley & Sons, 2009, p. 7-40.

YUAN, Q. et al. β -1,4-Galactosyltransferase I involved in Schwann cells proliferation and apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha via the activation of MAP kinases signal pathways. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 365, p. 149-158, 2012.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonoides. In: SIMÕES, C.M.O.; SEBENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFGRS/ Ed. Da UFSC, 2000. p. 489-515.