

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

**“ESTUDO DE INIBIDORES NATURAIS E SINTÉTICOS DE  
CISTEÍNO PROTEASES”**

**TAYNARA LOPES SILVA\***

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

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira**

**Co-orientador: Prof. Dr. Dieter Brömme**

**\* Bolsista CNPq**

**São Carlos – SP  
2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Taynara Lopes Silva, realizada em 30/11/2018:

---

Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira  
UFSCar

---

Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento  
UNESP

---

Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos  
FCFRP/USP

---

Prof. Dr. Hugo César Ramos de Jesus  
UFSCar

---

Prof. Dr. João Batista Fernandes  
UFSCar

Dedico este trabalho,

A minha mãe Elane, meu maior exemplo de amor,  
determinação e perseverança.

E aos meus professores, que foram inspiração para  
que eu chegasse até aqui.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira pela orientação, ensinamentos, apoio e amizade durante todos esses anos.

Aos demais professores do Laboratório de Produtos Naturais pela contribuição na minha formação e pela infraestrutura compartilhada durante todo esse tempo que estive no laboratório.

Ao Prof. Dr. Dieter Brömme da University of British Columbia pela co-orientação neste trabalho, por me receber em seu laboratório e pelos ensinamentos.

Aos amigos de Vancouver e da UBC, pela amizade e por todo apoio.

Ao Aloísio B. Andrade, juntamente com o Prof. Dr. Kleber T. de Oliveira; e a Dra. Deborah Araújo juntamente com a Profa. Dra. Arlene G. Correa, por disponibilizar os compostos sintéticos para os ensaios com a CatK.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais pela amizade, apoio, incentivo e tantos momentos de alegria.

Aos funcionários e técnicos do DQ-UFSCar, em especial à Luciana Vizotto pela amizade, auxílio e incentivo.

A minha mãe Elane e meu irmão Guthemberg, por todo amor e dedicação, por me apoiarem nas minhas decisões, sempre me incentivando para que eu nunca desistisse diante das dificuldades.

Ao Fabinho e a Jussara pelo carinho que sempre tiveram comigo, pelo apoio, consideração, por acreditarem e torcerem por mim.

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram e torceram por mim.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A CAPES – O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A Deus por me fazer forte para vencer as dificuldades, pela minha vida, e por me permitir viver tudo isso.

## Abreviaturas e Símbolos

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micro molar
$\delta$	Deslocamento químico em partes por milhão (ppm)
$\emptyset$	Diâmetro
$\lambda_{\text{em}}$	Comprimento de onda de emissão
$\lambda_{\text{ex}}$	Comprimento de onda de excitação
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
BDA	Batata dextrose ágar
BMGY	<i>Buffered glycerol-complex médium</i>
BMMY	<i>Buffered methanol-complex médium</i>
Cat	Catepsina
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
GAG	Glicosaminoglicano
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Cys	Cisteína
C-4S	Sulfato de condroitina 4
d	Dupleto
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTE	Ditioeritritol
E-64	L-3-carboxi-trans-2,3-epoxipropionil-leucilamido(4-guanino)butano
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EM	Espectrometria de massas
eV	Elétron-volt

Gln	Glutamina
Gly	Glicina
Glu	Ácido glutâmico
h	Altura
His	Histidina
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	Concentração que reduz em 50% a atividade enzimática
<i>J</i>	Constante de acoplamento
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
K <sub>i</sub>	Constante de afinidade
m	Multiplete
M	Concentração molar (mol/L)
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MeOH	Metanol
MHz	Mega-hertz
OD <sub>600</sub>	Densidade óptica medida em 600 nm
PDB	Protein data bank
pH	Potencial hidrogeniônico
quint	Quintupleto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Simpleto
sext	Sextupleto
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
t	Triplete
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Tris	Trisaminometano
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>
ZFR-MCA	Carbobenzoxi-fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina

## Lista de Tabelas

TABELA 1: Espécies de plantas ricas em proteases e fungos que as infectam. ....	9
TABELA 2: Condições cromatográficas utilizadas para análise dos microextratos obtidos em diferentes meios de cultivo de <i>F. proliferatum</i> utilizando UPLC-MS. Sendo os solventes utilizados: A – água; B – ACN e C – MeOH.....	19
TABELA 3: Rampa de aquecimento da coluna cromatográfica nas análises por CG-EM.....	24
TABELA 4: Parâmetros operacionais utilizados para análises em CG-EM.....	24
TABELA 5: Concentração de substrato ZFR-MCA utilizada para cada enzima com base no valor de $K_m$ de cada uma.....	25
TABELA 6: Compostos isolados dos extratos do meio líquido (FA) e do micélio (ME) do cultivo de <i>F. proliferatum</i> .....	30
TABELA 7: Dados de RMN de $^1H$ para o composto <b>PN1</b> .....	33
TABELA 8: Dados de RMN de $^1H$ para o composto <b>PN2</b> .....	38
TABELA 9: Dados de RMN de $^1H$ para o composto <b>PN4</b> .....	41
TABELA 10: Dados de RMN de $^1H$ para o composto <b>PN5</b> .....	44
TABELA 11: Dados de RMN de $^1H$ para o composto <b>PN6</b> .....	46
TABELA 12: Dados de RMN de $^1H$ para o composto <b>PN7</b> .....	49
TABELA 13: Valor de $K_m$ para as enzimas papaína, CatV e CatB com o substrato ZFR-MCA.....	54
TABELA 14: Triagem da atividade inibitória dos compostos isolados de <i>F. proliferatum</i> frente as enzimas Papaína, CatV e CatB. ....	55
TABELA 15: Valores de $IC_{50}$ obtidos para o composto <b>PN1</b> frente as diferentes enzimas. ....	56
TABELA 16: Valores de $IC_{50}$ obtidos para os compostos <b>PN3</b> e <b>PN6</b> frente a Papaína. ....	57
TABELA 17: Valores da concentração molar e $K_m$ da catepsina K expressa.....	78
TABELA 18: Porcentagem de inibição dos compostos mostrados na FIGURA 48 frente a CatK em diferentes concentrações.....	80
TABELA 19: Valores de $IC_{50}$ dos compostos testados frente ao sitio ativo da CatK.....	81
TABELA 20: Valores de $\alpha$ obtidos para os compostos 14 e 17, mostrando maior semelhança ao modo de inibição incompetitivo.....	91
TABELA 21: Determinação do valor de $K_i$ frente a CatK. ....	91

## Lista de Figuras

FIGURA 1: Inibidores de proteases que atuam como medicamentos.....	3
FIGURA 2: Estrutura tridimensional da CatK obtidas do PBD 1ATK. Em azul estão destacados os principais resíduos catalíticos. ....	4
FIGURA 3.....	6
FIGURA 4: Diversidade fúngica. ....	10
FIGURA 5: Produtos naturais isolados de fungos utilizados como fármacos.....	11
FIGURA 6: Estrutura química de alguns compostos produzidos por <i>F. proliferatum</i> .....	12
FIGURA 7: Ilustração das etapas de pré-tratamento em cartuchos de SPE (CALDAS et al., 2011). ....	20
FIGURA 8: Fluxograma do fracionamento do extrato obtido da fase orgânica do cultivo de <i>F.proliferatum</i> .....	22
FIGURA 9: Fluxograma do fracionamento do extrato obtido do micélio de <i>F. proliferatum</i> extraído com etanol. ....	23
FIGURA 10: Esquema de geral dos ensaios enzimáticos com o substrato fluorogênico ZFR-MCA. ....	26
FIGURA 11: Cromatogramas de íons totais obtidos a partir da análise dos microextratos de <i>F. proliferatum</i> em diferentes meios de cultivo, 1 – ágar nutrientes; 2 – BDA; 3 – Czapeck com extrato de levedura e ágar; 4 – Malte e ágar. Em todos os cromatogramas foram descontados os picos referentes ao controle/branco. ....	28
FIGURA 12: Estrutura química da beauvericina ( <b>PN1</b> ). ....	31
FIGURA 13: Espectro RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>PN1</b> (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	32
FIGURA 14: Mapa de contorno de HSQC do composto <b>PN1</b> (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD). ....	34
FIGURA 15: Mapa de contorno de HMBC do composto <b>PN1</b> (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	35
FIGURA 16: Espectro de íons produtos (ESI+) do composto <b>PN1</b> . ....	36
FIGURA 17: Proposta de fragmentação do composto <b>PN1</b> , beauvericina. ....	36
FIGURA 18: Estrutura química do ácido fusárico ( <b>PN2</b> ). ....	37
FIGURA 19: Espectro RMN de <sup>1</sup> H para o composto <b>PN2</b> (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	38
FIGURA 20: Estrutura química do composto N-etil-3-fenil-acetamida ( <b>PN3</b> ). ....	39
FIGURA 21: Espectro RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>PN3</b> (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	39
FIGURA 22: Espectro de massas (EI) obtido do composto <b>PN3</b> .....	40
FIGURA 23: Estrutura química do composto N-acetilriptamina ( <b>PN4</b> ). ....	40
FIGURA 24: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto <b>PN4</b> (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	41
FIGURA 25: Espectro de massas (EI) obtido do composto <b>PN4</b> .....	42
FIGURA 26: Estrutura química da dicetopiperazina ciclo prolina-valina ( <b>PN5</b> ). ....	42



FIGURA 27: Espectro RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>PN5</b> (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	43
FIGURA 28: E .....	44
FIGURA 29: Estrutura química da dicetopiperazina ciclo prolina-leucina ( <b>PN6</b> ). .....	45
FIGURA 30: Espectro RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>PN6</b> (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	46
FIGURA 31: Espectro de massas (EI) obtido do composto <b>PN6</b> .....	47
FIGURA 32: Estrutura química da dicetopiperazina ciclo valina-fenilalanina ( <b>PN7</b> ). .....	47
FIGURA 33: Espectro RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>PN7</b> (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	48
FIGURA 34: Espectro de massas (EI) obtido do composto <b>PN7</b> .....	49
FIGURA 35: Estrutura química do composto uracila ( <b>PN8</b> ).....	50
FIGURA 36: Espectro RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>PN8</b> (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	50
FIGURA 37: Estrutura química do composto indol-3-carboxaldeído ( <b>PN9</b> ).....	51
FIGURA 38: Espectro RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>PN9</b> (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	52
FIGURA 39: E .....	52
FIGURA 40: Foto ilustrativa da perda de densidade óssea causada pela osteoporose, que leva a maior incidência de fraturas.....	59
FIGURA 41: Equilíbrio cinético de reação enzimática.....	61
FIGURA 42: Esquema geral do modo de inibição competitiva.....	63
FIGURA 43: Esquema geral do modo de inibição não competitiva.....	64
FIGURA 44: Esquema geral do modo de inibição incompetitiva.....	65
FIGURA 45: Estrutura química do inibidor irreversível de cisteíno protease (E-64).....	66
FIGURA 46: Estruturas químicas dos inibidores de catepsina K que passaram por estudos clínicos. ....	67
FIGURA 47: Estrutura química dos compostos DHT e DHT1 que apresentaram atividade inibitória frente ao exossítio da CatK.....	68
FIGURA 48: Estruturas químicas dos compostos avaliados como possíveis inibidores de catepsina K.....	79
FIGURA 49: Numeração atribuída as estruturas químicas, sendo (a) para quinolinas-ftalonitrilas; (b) para epóxi- $\alpha$ -aciloxicarboxamida; e (c) para epóxi- $\alpha$ -acilaminocarboxamida. ....	84
FIGURA 50: Avaliação da degradação do colágeno pela catK sem GAG (a) (SHARMA et al., 2015). Avaliação de diferentes concentrações de C4-S na degradação do colágeno pela catK (b). ....	86
FIGURA 51: Compostos testados em ensaio de degradação de colágeno pela CatK em gel de eletroforese. ....	87
FIGURA 52: Gráfico de Lineweaver-Burk e gráfico de Dixon para o composto 2 como modo de inibição incompetitivo. ....	88
FIGURA 53: Gráfico de Lineweaver-Burk e gráfico de Dixon para o composto 17 como modo de inibição mista. ....	89

FIGURA 54: Gráfico de Michaelis-Menten para o composto 14 como modo de inibição mista. ....	90
FIGURA 55: Fórmula matemática para a obtenção do valor de $\alpha$ no modo de inibição mista. ....	90
FIGURA 56: Estrutura de superfície da CatK obtidas do PDB1ATK. Destacado as regiões onde estão localizados os exosítios 1 e 2 (vermelho e amarelo), o sítio ativo da enzima (verde) e a local de ligação dos inibidores avaliados. ....	92
FIGURA 57: Modelo de ligação proposto para o complexo CatK/composto 2. Representação da estrutura tridimensional em <i>cartoon</i> (a) e por superfície (b). ....	93
FIGURA 58: Interações observadas entre o composto 2 e a catepsina K. ....	94
FIGURA 59: Interações hidrofóbicas propostas entre o composto 2 e a catepsina K. ....	95
FIGURA 60: Modelo de ligação proposto para o complexo CatK/composto 14. Representação da estrutura tridimensional em <i>cartoon</i> (a) e por superfície (b). ....	96
FIGURA 61: Interações observadas entre o composto 14 e a catepsina K. ....	97
FIGURA 62: Interações hidrofóbicas entre o composto 14 e a catepsina K. ....	98
FIGURA 63: Modelo de ligação proposto para o complexo CatK/composto 17. Representação da estrutura tridimensional em <i>cartoon</i> (a) e por superfície (b). ....	98
FIGURA 64: Interações observadas entre o composto 17 e a catepsina K. ....	99
FIGURA 65: Compostos 16 e 17 e seus respectivos valores de $IC_{50}$ para a catepsina K. ....	100
FIGURA 66: Interações hidrofóbicas entre o composto 14 e a catepsina K. ....	101

## Resumo

ESTUDO DE INIBIDORES NATUAIS E SINTÉTICOS DE CISTEÍNO PROTEASES. Este trabalho descreve, em sua primeira parte o estudo químico do fungo *Fusarium proliferatum* buscando inibidores de cisteíno proteases, através de duas abordagens distintas: i) A busca de inibidores de papaína, para o entendimento da interação quimioecológica entre plantas ricas em proteases e micro-organismos que conseguem infectá-las; ii) o isolamento de compostos que sejam possíveis inibidores de cisteíno proteases humanas. Foram isolados nove metabólitos, sendo a beuveracina o composto majoritário nos extratos. Este composto apresentou atividade inibitória frente a papaína com  $IC_{50}$ : 25,2  $\mu$ M. Além disso, a beuvericina também apresentou atividade inibitória de duas cisteíno proteases humanas, CatV com  $IC_{50}$ : 40,6  $\mu$ M e CatB com  $IC_{50}$ : 6,8  $\mu$ M. Na segunda parte do trabalho, foram avaliados compostos sintéticos quanto a inibição da catepsina K. Esta enzima é também uma cisteíno protease, *papain-like*, e está diretamente associada ao processo de reabsorção óssea, onde uma elevada atividade de CatK está relacionada com doenças ósseas como a osteoporose. Foram avaliados dezesseis novos compostos sintéticos, que apresentaram atividades moderadas, em baixo micro molar frente a CatK, utilizando duas abordagens de busca de inibidores: i) inibição de sitio ativo e ii) inibição de exosítios da enzima. Os compostos avaliados pertencem a três classes diferentes, sendo os epóxi- $\alpha$ -aciloxicarboxamida, os epóxi- $\alpha$ -acilaminocarboxamida e as quinolinas ftalonitrilas. Foi realizada uma triagem inicial para verificar a atividade dos inibidores, em seguida verificado a potência destes inibidores e os compostos que apresentaram melhores atividades inibitórias foram submetidos a estudos dos mecanismos de ação. Também foram realizados estudos de *docking* molecular para o entendimento das interações existentes entre a proteína e o inibidor avaliado. Os compostos testados apresentaram atividade inibitória moderada, sendo as quinolinas-ftalonitrilas os que apresentaram maior potência, com  $IC_{50}$  de aproximadamente 1,5  $\mu$ M. Os compostos avaliados, foram identificados como inibidores incompetitivos da CatK.

**Abstract****STUDY OF NATURAL AND SYNTHETIC INHIBITORS OF CYSTEINE PROTEASE.**

This work describes in its first part the chemical study of the fungus *Fusarium proliferatum* looking for inhibitors of cysteine proteases, with two distinct approaches: i) The search for papain inhibitors, to understand the chemoecological interaction between plants rich in proteases and micro-organisms that can infect them; ii) the isolation of compounds that are possible human cysteine protease inhibitors. Nine metabolites were isolated, with beauvericin being the major compound in the extracts. This compound showed inhibitory activity against papain with  $IC_{50}$ : 25.2  $\mu$ M. In addition, beauvericin also showed inhibitory activity of two human cysteine proteases, CatV with  $IC_{50}$ : 40.6  $\mu$ M and CatB with  $IC_{50}$ : 6.8  $\mu$ M. In the second part of the study, synthetic compounds were evaluated for inhibition of cathepsin K. This enzyme is also a cysteine protease, papain-like, and is directly associated with the bone resorption process, where high CatK activity is related to bone diseases such as osteoporosis. Sixteen new synthetic compounds were evaluated, which presented moderate activities, low micro molar, against of CatK, using two approaches to search for inhibitors: i) inhibition of active site and ii) inhibition of exosites of enzyme. The compounds evaluated belong to three different classes, being epoxy- $\alpha$ -acyloxycarboxamide, epoxy- $\alpha$ -acylaminocarboxamide and quinolines phthalonitriles. An initial screening was performed to verify the activity of the inhibitors, then verified the potency of these inhibitors and the compounds that presented the best inhibitory activities were submitted to studies of the mechanisms of action. Molecular docking studies were also performed to understand the interactions between the protein and the inhibitor evaluated. The evaluated compounds showed moderate inhibitory activity, with the phthalonitriles being the ones with the highest potency, with  $IC_{50}$ : 1.5  $\mu$ M approximately. The compounds evaluated were identified as incompatible CatK inhibitors.

## Sumário

1 – Introdução (Parte I) .....	2
1.1 – Enzimas como alvos moleculares .....	2
1.2 – Papaína e Cisteíno Proteases Lisossomais .....	3
1.2.1 – Catepsina V .....	6
1.2.2 – Catepsina B .....	7
1.3 – Proteases em Plantas e Fungos Fitopatogênicos .....	8
1.4 – Micro-organismos como Fontes Promissoras de Substâncias Bioativas .....	9
1.5 – <i>Fusarium proliferatum</i> .....	11
2 – Objetivos (Parte I) .....	13
3 – Materiais e Métodos (Parte I) .....	14
3.1 – Reagentes e Solventes .....	14
3.1.1 – Meios de Cultivo: .....	14
3.2 – Suportes para cromatografia .....	15
3.3 – Equipamentos .....	15
3.4 – Isolamento e Identificação de <i>F. proliferatum</i> .....	17
3.5 – Avaliação do Perfil Químico em Diferentes Meios de Cultivo .....	18
3.6 – Crescimento de <i>F. proliferatum</i> em Meio Sólido, Larga Escala.....	19
3.7 – Metodologia para Extração em Fase Sólida e Fracionamentos de Fp .....	20
3.8 – Crescimento de <i>Fusarium proliferatum</i> em Meio Líquido .....	21
3.9 – Fracionamento dos Extratos Obtidos do Cultivo de <i>F. proliferatum</i> .....	21
3.10 – Análise por CG-EM dos compostos isolados .....	23
3.11 – Ensaio Enzimáticos .....	24
4 – Resultados e Discussão (Parte I) .....	27
4.1 – Escolha do Meio de Cultivo .....	27
4.2 – Cultivo em Larga Escala em Meio Sólido .....	29
4.3 – Cultivo em Meio Líquido .....	29
4.4 – Compostos Isolados – Elucidação Estrutural .....	31
4.4.1 – Composto PN1 .....	31
4.4.2 – Composto PN2 .....	36
4.4.3 – Composto PN3 .....	38

4.4.4 – Composto PN4 .....	40
4.4.5 – Composto PN5 .....	42
4.4.6 – Compostos PN6.....	45
4.4.7 – Composto PN7 .....	47
4.4.8 – Composto PN8 .....	50
4.4.9 – Composto PN9 .....	51
4.5 – Ensaio Enzimáticos .....	52
4.5.1 – Titulação do Sítio Ativo da Papaína.....	53
4.5.2 – Determinação do valor de Km .....	54
4.5.3 – Avaliação da Atividade de Inibição Enzimática dos Compostos Isolados.....	54
5 – Introdução (Parte II) .....	59
5.1 – Osteoporose.....	59
5.2 – Catepsina K.....	60
5.3 – Modo de Inibição Enzimática.....	61
5.3.1 – Inibição competitiva .....	62
5.3.2 – Inibição não competitiva .....	63
5.3.3 – Inibição incompetitiva .....	64
5.4 – Inibidores de Cisteíno Proteases Lisossomais .....	65
5.5 – Exosítio Catepsina K.....	67
6 – Objetivos .....	69
7 – Materiais e Métodos .....	70
7.1 – Reagentes e Solventes .....	70
7.2 – Equipamentos .....	70
7.3 – Compostos Avaliados.....	71
7.4 – Expressão e Purificação da Catepsina K .....	71
7.5 – Titulação do Sítio Ativo com E-64 e Determinação de Km.....	72
7.6 – Complexo Colagenoliticamente Ativo K/GAG – Determinação da Concentração de C4-S .....	73
7.7 – Ensaio Enzimáticos .....	74
7.7.1 – Ensaio Sitio Ativo.....	74
7.7.2 – Ensaio de Degradação de Colágeno – Exosítio .....	74

7.8 – Determinação IC <sub>50</sub> – Ensaio Sítio Ativo .....	75
7.9 – Determinação do Mecanismo de Ação dos Inibidores .....	75
7.10 – Estudo de <i>Docking</i> .....	76
8 – Resultados e Discussão (Parte II) .....	77
8.1 – Determinação da Concentração da Enzima e do Valor de Km .....	77
8.2 – Avaliação da Atividade Inibitória.....	78
8.3 – Determinação da Potência dos Inibidores (IC <sub>50</sub> ) .....	81
8.4 – Ensaio de Degradação de Colágeno.....	85
8.4.1 – Complexo Colagenoliticamente Ativo CatK/GAG .....	85
8.4.2 – Avaliação dos Compostos como Inibidores de Exosítio .....	86
8.5 – Determinação do Mecanismo de Ação dos Inibidores e do valor de K <sub>i</sub> .....	88
8.6 – Modelagem molecular do complexo CatK/inibidores.....	91
9 – Conclusão .....	102
10 – Referências Bibliográficas .....	104

**Parte I: Estudio de *Fusarium proliferatum* Buscando  
Inibidores de Cisteíno Proteases**



## 1 – Introdução (Parte I)

### 1.1 – Enzimas como alvos moleculares

Enzimas catalisam reações químicas que são essenciais para a vida. No entanto, problemas na regulação de suas atividades catalíticas, como por exemplo, a superexpressão, causam um aumento em sua atividade e levam ao desenvolvimento de diversas patologias. A mutação de genes responsáveis pela produção de enzimas pode levar a um nível anormal de concentração de determinada enzima dentro da célula. Isto causa o aumento da formação de produtos de reação que podem levar a patologias (COPELAND, 2013).

As enzimas têm um papel importante em muitas vias de sinalização e representam excelentes alvos para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de muitos problemas de saúde como doenças cardiovasculares e câncer, bem como para combater muitos parasitas e micro-organismos causadores de patologias (DRAG & SALVESEN, 2010). Outro atrativo para o uso de enzimas como alvos terapêuticos é o fato de que elas são altamente propensas à inibição por moléculas de baixa massa molecular. Assim, as enzimas são comumente alvos na descoberta e desenvolvimento de substâncias de interesse de grandes empresas farmacêuticas (COPELAND, 2013).

Os inibidores enzimáticos têm sido utilizados como intervenção farmacológica, tornando-se quase a metade dos fármacos atualmente em uso clínico (COPELAND, 2013; ROBERTSON, 2007). Dentre as classes enzimáticas, estima-se que as proteases representem aproximadamente de 5-10% de todos os alvos farmacêuticos demonstrados pelos medicamentos disponíveis no mercado (DRAG & SALVESEN, 2010).

Proteases são enzimas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas de proteínas, e sua utilização como alvo para o desenvolvimento de novos medicamentos é bem estabelecida. Alguns inibidores de proteases foram desenvolvidos como medicamentos muito bem-sucedidos (FIGURA 1). Como exemplo podemos citar o captopril que utilizado no tratamento de hipertensão, e que atua sobre a enzima conversora da angiotensina (SMITH & VANE, 2003). Também inibidores de protease do HIV, como saquinavir, indinavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, fosamprenavir, lopinavir, atazanavir, tipranavir, e darunavir, são medicamentos licenciados para uso

clínico em pacientes portadores do vírus, e têm demonstrado sucesso terapêutico substancial (LV et al., 2015).

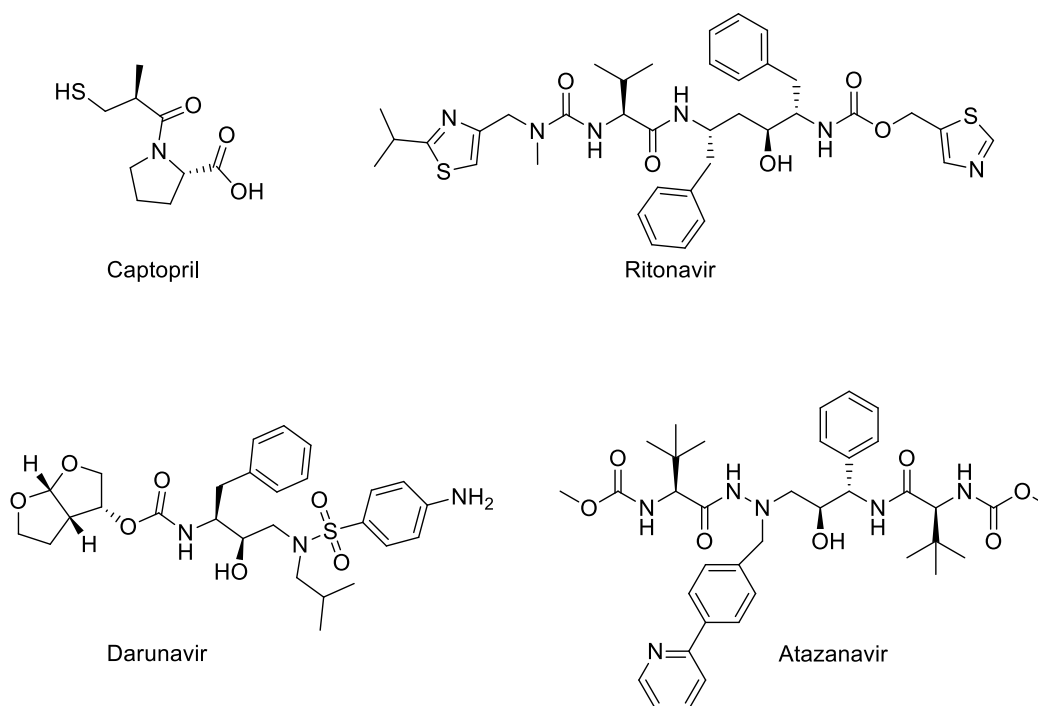


FIGURA 1: Inibidores de proteases que atuam como medicamentos.

## 1.2 – Papaína e Cisteíno Proteases Lisossomais

As proteases, são macromoléculas biológicas responsáveis por executar a importante tarefa de degradação proteica. Estas enzimas são classificadas de acordo com suas características estruturais e catalíticas (TURK et al., 2012).

As cisteíno proteases são agrupadas em clãs (superfamílias), sendo o clã CA o maior deles. Cada clã é subdivido em famílias com base em suas homologias e estrutura tridimensional. A família da papaína (C1) é uma das famílias pertencentes a clã CA, sendo a papaína, a primeira cisteíno protease isolada de *Carica papaya* e caracterizada e também a primeira protease que teve sua estrutura determinada por cristalografia de raios-X (LIU et al., 2018).

As cisteíno proteases pertencentes a família C1 são expressas em diferentes organismos como vírus, bactérias, plantas e animais. Em mamíferos, estas cisteíno proteases são chamadas de catepsinas (LECAILLE et al., 2002). Estas enzimas são sintetizadas como precursores inativos contendo um pró-domínio auto inibidor para evitar a degradação proteica indesejada. O pró-domínio pode bloquear o acesso do

substrato ao sítio ativo da enzima. A atividade destas proteases também é diretamente dependente do pH e da presença de seus ativadores endógenos, onde é necessário um equilíbrio entre eles e as proteases, para o controle da atividade e do catabolismo das enzimas (LIU et al., 2018).

Com exceção da catepsina C, que é tetramérica, todas as cisteíno proteases lisossomais são proteínas monoméricas com massa molecular entre 23-25kDa (TURK & GUNCAR, 2003). A estrutura tridimensional das cisteíno proteases pertencentes a família C1 é altamente conservada apresentando dois domínios, R (direita) e L (esquerda), formando uma fenda catalítica entre eles (LECAILLE et al., 2002). Cys25 e His159 (numeração papaína) são os resíduos que formam a díade catalítica, estes se encontram em diferentes domínios da enzima, sendo Cys25 no domínio esquerdo e His159 no domínio direito. Outros dois resíduos funcionalmente importantes também são encontrados nas enzimas da família C1, estes são Gln19 que auxilia na estabilização do intermediário tetraédrico e Asn175 que orienta o anel imidazólico da His catalítica (POLGÁR, 2013). Na FIGURA 2 é mostrado a estrutura tridimensional da catepsina K, com os domínios R e L e a fenda catalítica. Em azul estão destacados os resíduos de aminoácidos diretamente envolvidos no processo catalítico das enzimas da família C1.

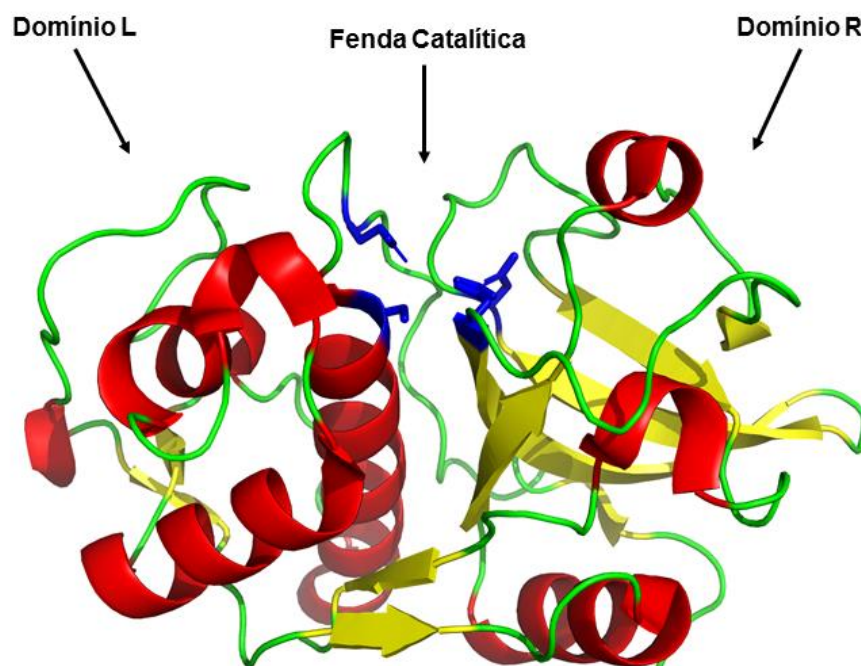


FIGURA 2: Estrutura tridimensional da CatK obtidas do PBD 1ATK. Em azul estão destacados os principais resíduos catalíticos.

O mecanismo catalítico destas enzimas é similar ao de outras cisteíno proteases. A díade catalítica Cys-His, durante a catálise enzimática, forma um par iônico através da transferência de um próton do grupo tiol da cisteína para o nitrogênio imidazólico da histidina, antes da ligação com o substrato. Neste processo, um resíduo de asparagina no sítio catalítico orienta a histidina durante a sua catálise ácido-base e, assim, é normalmente referido como o terceiro resíduo catalítico de proteases do tipo papaína. Em seguida, ocorre um ataque nucleofílico do enxofre da cisteína à carbonila da ligação peptídica do substrato e, assim, um intermediário tetraédrico é formado. Esse intermediário, por sua vez, é estabilizado por um resíduo de glutamina através de uma ligação de hidrogênio. O bolsão onde ocorre esta estabilização é denominado cavidade oxianiônica e está diretamente relacionado a especificidade enzimática. Na etapa posterior, ocorre a regeneração da carbonila e clivagem da ligação peptídica. Nesta etapa, a histidina doa seu próton adicional para o nitrogênio da porção N-terminal do substrato, dando origem à acil-enzima e liberando a amina. Para completar a clivagem e liberar a enzima da porção C-terminal do substrato, ocorre a desacilação da enzima através do ataque nucleofílico de uma molécula de água à carbonila da acil-enzima, fornecendo o segundo intermediário tetraédrico. Mais uma vez, este passo é realizado por meio de desprotonação da água pela histidina para criar um nucleófilo mais forte. Em seguida, a carbonila é regenerada, liberando assim a enzima e fornecendo o peptídeo resultante (LECAILLE et al., 2002; POLGÁR, 2013). Na FIGURA 3 mostrado um esquema do mecanismo de hidrólise peptídica pelas cisteíno proteases.

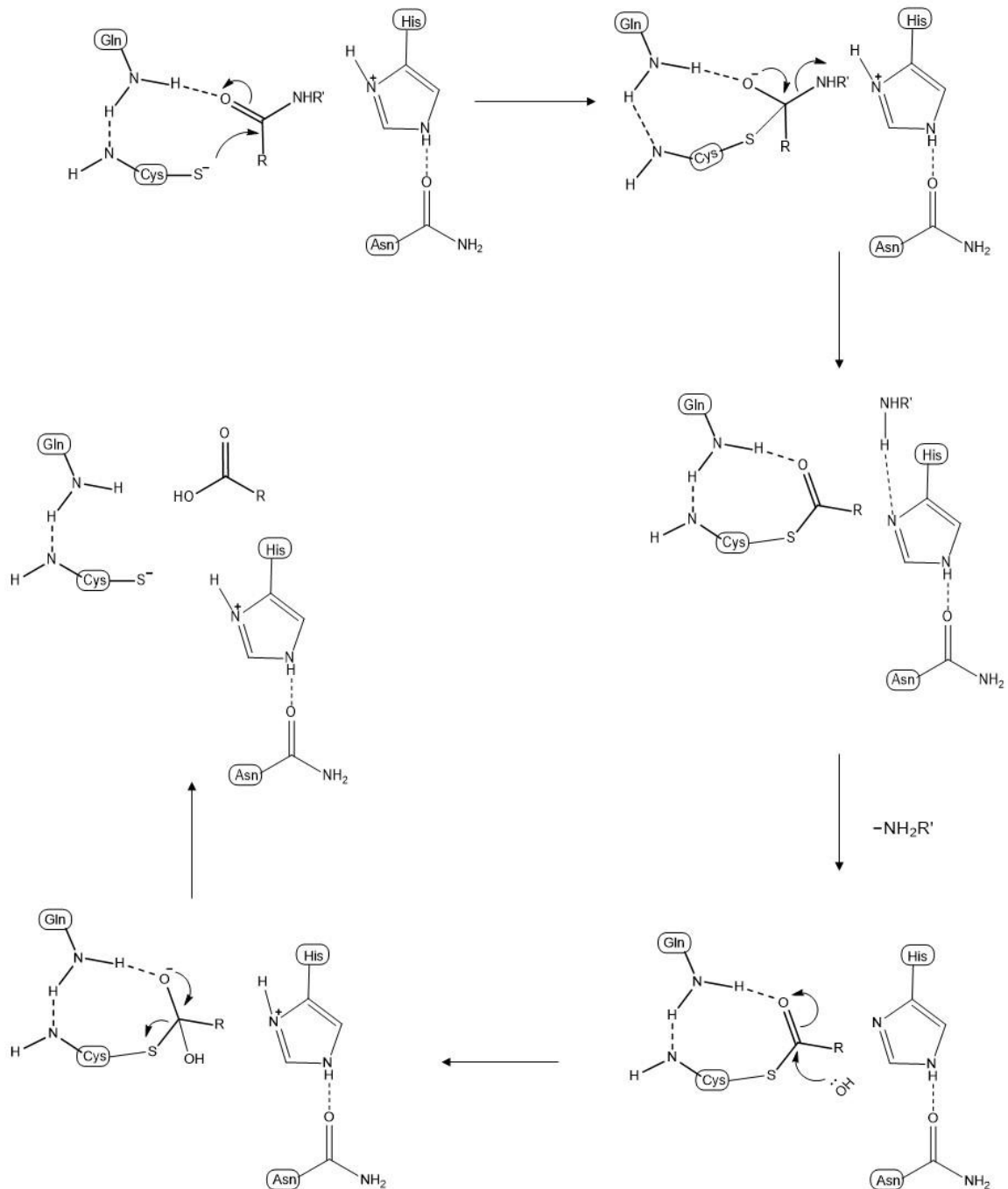


FIGURA 3: Mecanismo de hidrólise peptídica pelas cisteíno proteases da família C1 (Adaptado (LECAILLE et al., 2002).

### 1.2.1 – Catepsina V

A catepsina V é predominantemente expressa no timo, testículos e córnea epitelial. Está associada com miastenia gravis, diabetes tipo 1 e também a doenças neurológicas. Além das funções fisiológicas as quais a CatV participa, esta enzima é

também altamente expressa em algumas linhagens de cânceres, como carcinomas da mama e colo retal (NIWA et al., 2012). Ela compartilha cerca de 80% de identidade sequencial com a catepsina L, no entanto se diferem na especificidade para o substrato e na distribuição tecidual. A catepsina V é especificamente expressa no timo, nos testículos e no epitélio da córnea, e essa distribuição limitada contrasta com a catepsina L, que é expressa em todo o corpo (SOMOZA et al., 2000).

Possui alta atividade elastolítica, sendo a mais potente dentre as proteases. Desta forma, a catepsina V é um interessante alvo molecular para o tratamento da aterosclerose (YASUDA et al., 2004). Considerando também seu grande potencial em apresentar antígeno do timo, esta enzima pode ser considerada como alvo na busca por medicamentos para o tratamento de doenças autoimunes.

### **1.2.2 – Catepsina B**

A catepsina B é uma protease de ampla distribuição tecidual. É a única dentre as catepsinas que pode atuar como endo e exopeptidase, devido à presença de uma região na enzima denominada loop de oclusão. Sua atividade depende do pH, atuando como endopeptidase em pH neutro e como exopeptidase em pH ácido (BRÖMME & KALETA, 2002; LECAILLE et al., 2002; Y. LI et al., 2016).

Juntamente com a catepsina L, a catepsina B está intimamente associada a diversos tipos de cânceres. Uma elevada atividade da catepsina B já foi descrita em carcinomas de cérebro, mama, cólon e pâncreas (BRÖMME & KALETA, 2002; LECAILLE et al., 2002; SLOANE et al., 1986).

Além do lisossomo, a catepsina B também já foi descrita como sendo localizada na membrana plasmática de células tumorais. Isso se deve à acidificação do ambiente tumoral, o que proporciona condições ideais para a atividade da enzima. Estudos de progressão tumoral demonstraram que grandes quantidades de catepsina B são encontradas na maioria dos tumores malignos em estágios invasivos. Assim, a busca por inibidores destas enzimas tem despertado muita atenção nos últimos anos (AGGARWAL & SLOANE, 2014; TURK et al., 2002).

### 1.3 – Proteases em Plantas e Fungos Fitopatogênicos

As plantas possuem um refinado sistema imunológico para lidar com diferentes patógenos microbianos e outros invasores. Pesquisas recentes mostram evidências de que proteases são fundamentais na imunidade das plantas, sendo necessárias para a grande resistência das plantas a vários patógenos (MISAS-VILLAMIL et al., 2016).

As enzimas proteolíticas, presentes em diversas espécies de plantas, estão envolvidas em quase todos os aspectos do crescimento e desenvolvimento do vegetal, incluindo a germinação e a morte celular programada. Além disso, desempenham papéis importantes na regulação de processos biológicos tais como o reconhecimento de patógenos e a indução de respostas de defesa eficazes (HOORN & JONES, 2004).

A maioria das enzimas proteolíticas presente nas plantas são cisteíno proteases e assim como as catepsinas humanas, pertencem à família da papaína. Estudos mostram que a atividade destas proteases em plantas é necessária para desencadear respostas imunes das plantas contra o ataque de patógenos (LIU et al., 2018).

Diversos estudos demonstraram a importância das proteases pertencentes a família da papaína na defesa das plantas. Proteases presentes no látex de *Carica papaya*, *Ficus glabrata* e *Ervatamia coronaria* foram associadas à proteção destas espécies contra patógenos e pragas, tais como bactérias, fungos e insetos (DOMSALLA & MELZIG, 2008).

Estudos realizados por Konno e colaboradores (KONNO et al., 2004) demonstraram que dietas artificiais contendo uma das três enzimas papaína, bromelina ou ficina, encontradas respectivamente no mamão, abacaxi e figo, nas mesmas concentrações em que ocorrem no látex destas plantas, foram tóxicas para larvas de bicho da seda. Também foi observado que as larvas morreram quando foram alimentadas com folhas de figo, no entanto as larvas não morreram quando o látex foi removido destas folhas por lavagem ou quando as enzimas foram inativadas pelo E-64, um inibidor de cisteíno proteases.

As enzimas proteolíticas desempenham um papel fundamental na fisiologia da planta, elas mantêm o pool de proteínas da célula, e também estão envolvidos em vários processos intra e extracelulares de defesa da planta (DOMSALLA & MELZIG, 2008).

O importante papel das cisteíno proteases pertencentes à família da papaína na imunidade do vegetal tem se tornado bastante evidente. No entanto, plantas conhecidas por conterem altos teores destas enzimas não estão isentas dos ataques de patógenos, como por exemplo fungos. Um exemplo é o abacaxi, (*Ananas comosus*) que, apesar de ser rico em bromelina, é comumente infectado por fungos do gênero *Fusarium* (STEPIÉN et al., 2013). Na TABELA 1 são mostrados alguns exemplos de micro-organismos que infectam plantas contendo elevados teores de proteases pertencentes a família da papaína.

TABELA 1: Espécies de plantas ricas em proteases e fungos que as infectam.

<b>Planta</b>	<b>Protease presente</b>	<b>Fungos Fitopatogênico</b>
<b><i>Carica Papaya</i></b>	Papaína	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Asperisporium caricae</i>
<b><i>Ananas comosus</i></b>	Bromelaína	<i>Fusarium proliferatum</i> <i>Fusarium subglutinans</i>
<b><i>Ficus glabrata</i></b>	Ficina	<i>Glomerella cingulata</i>
<b><i>Actinidia deliciosa</i></b>	Actinidina	<i>Ceratocystis fimbriata</i> <i>Armillaria mellea</i>

As proteases são essenciais para a imunidade da planta. No entanto, ainda não é bem conhecido como estas enzimas são ativadas e quais são as vias de sinalização que desencadeiam as diferentes respostas. Além disso, é necessário ressaltar que ao mesmo tempo que as proteases são necessárias para a resistência das plantas, elas são alvos de efeitos de agentes patogênicos secretados para suprimir as respostas imunes. Assim, estão sujeitas a uma corrida armamentista co-evolucionária do patógeno e o hospedeiro (LIU et al., 2018; MISAS-VILLAMIL et al., 2016).

#### **1.4 – Micro-organismos como Fontes Promissoras de Substâncias Bioativas**

Os produtos naturais são fundamentais na descoberta de compostos bioativos. Há muitos anos eles têm sido fonte de inspiração para grande parte dos fármacos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*). Entre o ano de 1981 e 2014, cerca de 35% dos medicamentos aprovados para comercialização em todo o mundo



são baseados em produtos naturais. Eles também foram as principais fontes moléculas utilizadas como materiais de partida nas descobertas farmacêuticas ao longo do século passado (MISHRA & TIWARI, 2011; NEWMAN & CRAGG, 2016). Além da diversidade estrutural os produtos naturais possuem uma característica adicional importante, muitas vezes apresentam atividades biológicas altamente específicas com base em mecanismos de ação (CRAGG & NEWMAN, 2013).

Apesar dos estudos químicos de plantas serem mais frequentes, os micro-organismos vêm sendo explorados como hábeis produtores de metabólitos secundários. Substâncias produzidas por micro-organismos apresentam um vasto leque de aplicações, tais como antibióticos, anti-inflamatórios, agroquímicos, inseticidas e anticancerígenos (BAKER et al., 2000).

O reino fungi é um dos mais numerosos, ele inclui muitas espécies, apresentando uma grande variedade morfológica, comportamentos e vias bioquímicas únicas (FIGURA 4). Muitas dessas espécies são utilizadas na fabricação de alimentos, bebidas, cosméticos e fármacos. Os fungos possuem uma ampla e diversa arquitetura molecular, sendo uma importante fonte na descoberta de moléculas bioativas (DEMAIN & SANCHEZ, 2009; KELLER et al., 2005).



FIGURA 4: Diversidade fúngica.

A descoberta acidental da penicilina, (FIGURA 5) por Fleming, em 1928, isolada do fungo *Penicillium notatum*, deu início aos estudos utilizando fungos como fonte de substâncias bioativas. As pesquisas mostram o enorme potencial dos fungos em produzir diversas classes de substâncias que podem ser utilizadas na medicina. A partir destes organismos ocorreu um grande avanço nas áreas dos antibióticos, imunossuppressores e medicamentos anti-neoplasmáticos (TULP & BOHLIN, 2004).

Dentre os compostos produzidos por fungos, existem importantes produtos farmacêuticos como a lovastatina (reduzidor de colesterol) e a ciclosporina (imunossupressor), (FIGURA 5) (KELLER et al., 2005).

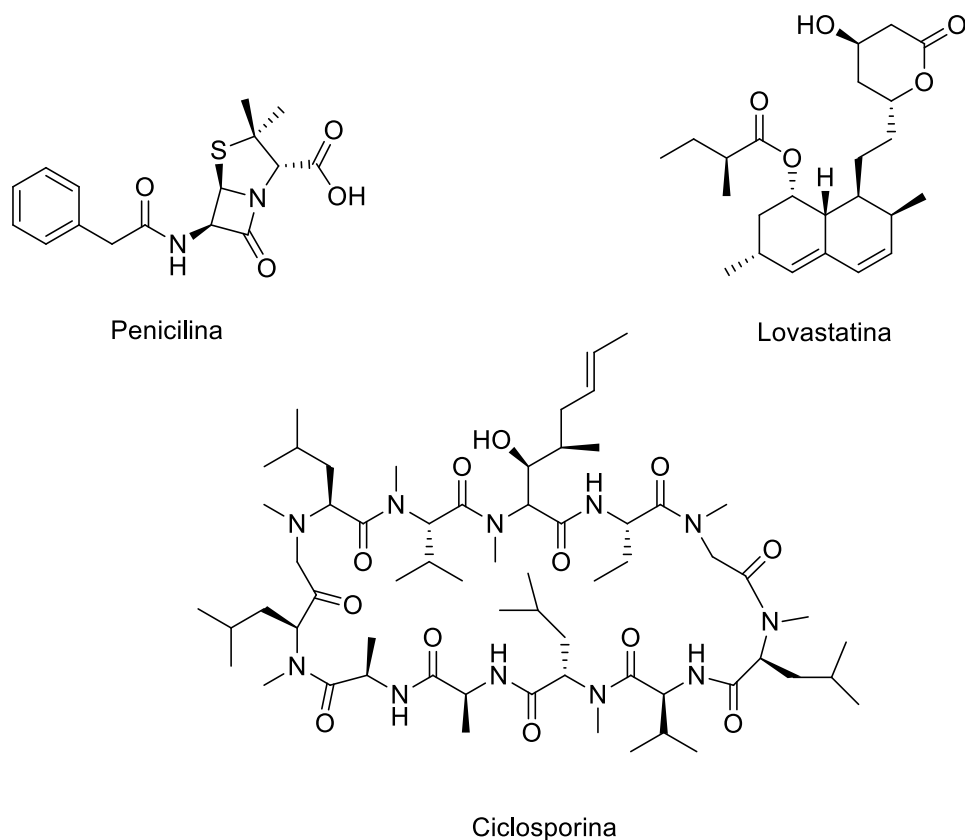


FIGURA 5: Produtos naturais isolados de fungos utilizados como fármacos.

São muitas as razões para se utilizar fungos como fontes de substâncias bioativas. Os fungos podem apresentar diferentes tipos de interações com seus hospedeiros e essas interações permitem que tenham um sistema enzimático muito rico para a produção de metabólitos secundários na tentativa de se fortalecer em seu habitat. Assim, os fungos possuem um potencial para produção de substâncias bioativas que podem ser utilizadas com diversos propósitos medicinais (CRAGG & NEWMAN, 2013).

### 1.5 – *Fusarium proliferatum*

A espécie *Fusarium proliferatum* é um fungo fitopatogênico que cresce principalmente em partes aéreas de plantas, mas pode estar associado a solos.

Possui ampla distribuição mundial em uma grande variedade de cultivos agrícolas (NEUMANN et al., 2004).

Sobre a classificação taxonômica, *F. proliferatum* pertence ao gênero *Fusarium*, ordem Hypocreales, do filo Ascomycota. O gênero *Fusarium* constitui um estado anamorfo, sendo *F. proliferatum* o anamorfo da espécie *Gibberella intermedia*. Juntamente com outras espécies, *F. proliferatum* compõe o complexo *Gibberella fujukuroi*, que estão associadas a doenças de diversas culturas de importância econômica, como milho, trigo e cana-de-açúcar (LESLIE et al., 2004; NEUMANN et al., 2004; WALKER et al., 2016).

Esta espécie já foi descrita como fitopatogênica de diversos cultivares, como abacaxi (STEPIÉN et al., 2013), banana (JIMÉNEZ et al., 1993), citrus (SANDOVAL-DENIS et al., 2018), dentre outras. Alguns estudos realizados com *F. proliferatum* permitiram o isolamento de diversos compostos químicos, como do ciclopeptídeo beauvericina (MORETTI et al., 1994), o sesterterpeno fusaproliferina (SANTINI et al., 1996) e algumas naftoquinonas, (FIGURA 6) (DAME et al., 2015).

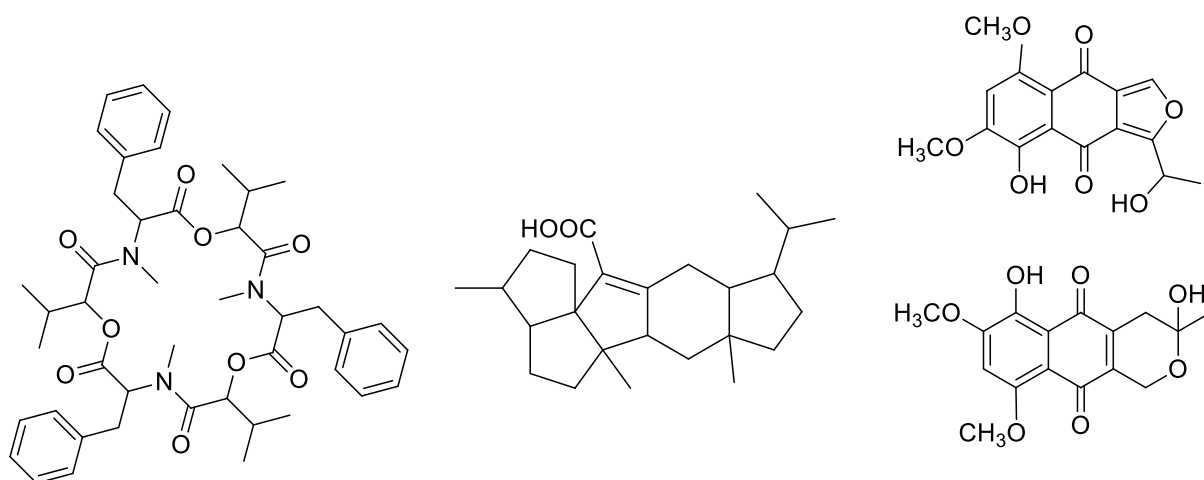


FIGURA 6: Estrutura química de alguns compostos produzidos por *F. proliferatum*.

A linhagem de *F. proliferatum* utilizada neste trabalho foi isolada de *Ananas comosus*, sendo esta uma espécie conhecida por ser rica em enzimas proteolíticas pertencentes à família da papaína. Assim o uso deste micro-organismo se constitui em uma atraente estratégia na busca por compostos inibidores de enzimas desta classe.

## 2 – Objetivos (Parte I)

Esta parte do trabalho teve como objetivo, realizar o estudo químico de *F. proliferatum*, isolado de *Ananas comosus* (abacaxi), buscando o entendimento das interações quimioecológicas entre o micro-organismo e a planta. Também o isolamento e identificação de compostos que sejam possíveis inibidores de papaína e das cisteíno proteases humanas, catepsina V e catepsina B. Para isto foi necessário:

- Realizar o isolamento e identificação do micro-organismo a ser estudado;
- Estabelecer protocolos de cultivo, extração e análise do micro-organismo a ser estudado;
- Cultivar o micro-organismo em larga escala para obtenção dos extratos;
- Isolar e caracterizar os metabólitos presentes no extrato, através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas diversas;
- Realizar ensaios para avaliação da atividade enzimática dos metabólitos isolados;
- Determinar a potência ( $IC_{50}$ ) dos inibidores mais promissores.

### 3 – Materiais e Métodos (Parte I)

#### 3.1 – Reagentes e Solventes

- Foram utilizados solventes comerciais destilados no DQ-UFSCar;
- Solventes para CLAE: solventes comerciais ULTRA ANALYSIS marca Tedia;
- Solventes para ensaio: Dimetilsulfóxido (DMSO) da marca Mallinckrodt Chemicals;
- Solventes para análises espectroscópicas: solventes deuterados MERCK e ALDRICH;
- Água purificada em aparelho Milli-Q;
- Cartuchos C18/500mg – Chromabond;
- Substrato Z-FR-MCA (Carbobenzoxi-fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina) – Sigma;
- Inibidor E-64 [L-3-carboxi-trans-2,3-epoxipropionil-leucilamido(4-guanino)butano] – Sigma;
- DTE (ditioeritritol) – Sigma;
- Ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) da J.T. Baker;
- Acetato de Sódio triidratado da J.T. Baker;

##### 3.1.1 – Meios de Cultivo:

- Ágar Nutriente
  - Peptona
  - Extrato de carne
  - Extrato de levedura
  - NaCl
  - Ágar
- BDA (Batata, Dextrose e Ágar)
- Malte – Ágar
- Meio de Cultivo Czapeck com extrato de levedura:
  - $\text{NaNO}_3$

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- KCl
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- D-glicose
- Extrato de levedura
- Ágar (em caso de meio de cultivo sólido).

### 3.2 – Suportes para cromatografia

- Sephadex LH-20 – Amershan Pharmacia Biotech AB;
- Placas de CCD (Macherey-Nagel) ALUGRAM® SIL G/UV254 für die DC
- Coluna analítica Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl 250 x 4.6mm (5 $\mu$ m);
- Coluna semipreparativa Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl 300 x 4,6 mm (5 $\mu$ m);
- Coluna CG: Rtx-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m).

### 3.3 – Equipamentos

- Análises espectroscópicas:
  - Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear marca Bruker Avance III - 9,4 Tesla (400 MHz para frequência do hidrogênio e 100 MHz para o carbono);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a Espectrômetro de Massas:
  - Agilent 1200 serie equipado com bomba quaternária G1311A, injetor automático G1329A, detector arranjo de diodos G1314B e degaseificador G1322A; Espectrômetro de massas modelo API2000 da marca Applied Biosystems, com fonte de ionização por eletrospray e analisador triplo quadrupolo.
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência:

- Agilent Technologies 1200 series, equipado com bomba quaternária G1311A, injetor automático G1329A, detector UV-Vis G1314B e degaseificador G1322A;
  - Shimadzu LC-20AD preparativo, composto por Injetor para HPLC SHIMADZU SIL-20AP Vp, módulo de comunicação detector/computador em CBM-20. Communication BUS Module, bomba SHIMADZU LC20AP gradient pumps, detector SPD-20AV UV-Vis, degaseificador DGU-20A;
- Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência acoplado a espectrômetro de massas:
- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência Waters® Acquity UPLC H-class, acoplado a um espectrômetro de massas Waters® Xevo® G2-XS QToF com interface eletrospray (ESI) (Waters Corporation);
- Cromatógrafo a gás acoplado à espectrômetro de massas:
- CG-EM Shimadzu® GC 2010 Plus acoplado a Espectrômetro de massas MSTQ8030, detector de ionização por elétrons de 70eV;
- Evaporadores rotativos: os extratos foram concentrados em evaporador rotativos de baixa pressão do tipo Büchi Rotavapor R-114 com banho Büchi Watherbath B-480, e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 25°C;
- Fluorímetro: Leitor de placa de ELISA modelo SpectraMax M3 da Molecular Devices;
- Câmara de Fluxo Laminar: Veco VL FS-12M;
- Autoclave Vertical: Phoenix AV 70;
- Banho de ultrassom: Tecnal TE 140.

### 3.4 – Isolamento e Identificação de *F. proliferatum*

A espécie *F. proliferatum* foi isolada de abacaxi (*Ananas comosus*) que apresentava infecção fúngica (podridão), pelo fitopatologista Dr. Leonardo Toffano, utilizando a metodologia descrita por (PETRINI et al., 1992).

A região de infecção da fruta retirada, e em seguida lavada com água esterilizada. Logo após foi feita a imersão do material em hipoclorito de sódio 1%, seguido de etanol 70% e por fim água destilada. Este processo foi repetido quatro vezes. Ao finalizar o processo de esterilização, o tecido infectado foi transferido para placas de petri contendo meio de cultivo BDA (batata, dextrose e ágar).

Após o crescimento dos micro-organismos, a purificação da cepa de *F. proliferatum*, foi realizada através de sucessivas repicagens em placas de petri contendo meio BDA. Após a purificação, o fungo foi mantido em tubos estéreis de penicilina contendo água destilada estéril, em glicerol 10% armazenado em freezer - 80° C, e em placas de petri contendo meio de cultivo BDA.

A identificação do micro-organismo foi realizada pela empresa BPI Biotecnologia, utilizando o método sequenciamento Sange. As etapas realizadas na identificação da cepa foram fornecidas pela própria empresa, sendo elas:

**1 – Extração do DNA:** o DNA total da amostra foi extraído através do Kit ZR Fungal/Bacterial DNA MicroPrep™ (D6007) de acordo com protocolo do fabricante. A qualidade do DNA extraído foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 2% e quantificados por fluorescência (Qubit). O DNA extraído foi mantido à temperatura de -20 °C até o momento do uso.

**2 – Amplificação do DNA:** As reações de PCR foram feitas em um volume final de 20 µL, contendo 10 µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, USL), 0.6 µM de oligonucleotideo foward e 0.6 µM de oligonucleotideo reverse, 40 ng de DNA genômico e água ultrapura estéril suficiente para 20 uL. Para a amplificação da região ITS foram utilizados os primers ITS-5 foward (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS-4 reverse (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') conforme descrito por (WHITE et al., 1990). O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 seg., anelamento a 56 °C por 40 seg; extensão a 72 °C por 1 min e uma extensão final a 72 °C por 5 min. As reações de



amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems).

**3 – Sequenciamento:** As amostras de PCR foram avaliadas em gel de agarose 2% corados com UniSafe Dye, visualizado sob luz UV e após purificadas com Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.). A quantificação dos produtos purificados foi realizada por fluorescência em aparelho Qubit (ThermoFischer). Para realização do sequenciamento foram utilizados os primers ITS 5 e ITS 4. Reação de Sequenciamento BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied) e reação de precipitação por Etanol/EDTA/Acetato de Sódio. Sequenciamento automático por eletroforese capilar no equipamento ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

**4 – Análise dos resultados:** Após o sequenciamento, foi realizado a análise dos eletroferogramas utilizando os programas EMBOSS/Merger, Chromas Lite, Geneious 4.8.3 para obtenção da sequência consenso. Após a edição, a sequência obtida foi utilizada na busca de sequências de referência similares depositadas no GenBank, através da ferramenta BLAST.

### **3.5 – Avaliação do Perfil Químico em Diferentes Meios de Cultivo**

A espécie *F. proliferatum* foi cultivada em quatro diferentes meios de cultivo sólido para verificar a variação do perfil químico da espécie. Para cada meio foram feitas triplicata, além de um branco, onde não se inoculou o micro-organismo. Os meios de cultivo utilizados foram: ágar-nutrientes, BDA (batata, dextrose e ágar), Czapeck com extrato de levedura e ágar, e malte-ágar. Todos os meios foram preparados utilizando água destilada, e autoclavados por 15 minutos a 120 °C. Cerca de 20 mL de cada meio foram vertidos em placas de petri descartáveis e estéreis.

Depois de resfriadas e ainda em fluxo laminar, inoculou-se um plug de 0,9 cm do micélio em cada placa. Após o crescimento de 14 dias, os metabólitos foram extraídos pelo processo de microextração, onde foram retirados dez plugs de 0,9 cm de diâmetro, em diferentes partes da placa e estes foram colocados na mistura de solvente MeOH/DCM/AcOEt, nas proporções 1:2:3 e extraídos em banho de ultrassom pelo período de uma hora (SMEDSGAARD, 1997). Após a extração o

solvente foi filtrado, evaporado e os microextratos obtidos foram analisados em UPLC-QTof.

A análise dos microextratos foram realizadas em UPLC-MS da Waters Acquity, em coluna Waters® Acquity UPLC BEH (2,1 x 100 mm) - C18 de partícula com diâmetro de 1,7 µm. Utilizou-se o modo gradiente de eluição de acordo com a metodologia descrita na TABELA 2, com um fluxo de 0,5 mL/min, volume de injeção de 5,0 µL. Todas as linhas foram acidificadas com 0,1% v/v de ácido fórmico. Os espectros de massas foram obtidos através de uma varredura em *fullscan* no modo positivo em fonte ESI.

TABELA 2: Condições cromatográficas utilizadas para análise dos microextratos obtidos em diferentes meios de cultivo de *F. proliferatum* utilizando UPLC-MS. Sendo os solventes utilizados: A – água; B – ACN e C – MeOH.

Tempo (min)	%A	%B	%C
0,0	97	1,5	1,5
3,0	80	10	10
14,0	30	35	35
15,0	0	50	50
19,0	0	50	50
22,0	97	1,5	1,5
24,0	97	1,5	1,5

### 3.6 – Crescimento de *F. proliferatum* em Meio Sólido, Larga Escala

Após definir o meio de cultivo a ser utilizado, experimentos em larga escala foram realizados para obtenção de maiores quantidades de extrato, para o isolamento de seus constituintes químicos.

*F. proliferatum* foi inoculado em placas de petri 25 cm de diâmetro contendo meio sólido de cultivo Czapeck com extrato de levedura e ágar. Para este experimento foram preparadas 100 placas sendo 3 placas utilizadas como branco. Em cada placa foram inoculados 3 plugs de 0,9 cm de diâmetro.

Após o crescimento do micro-organismo pelo período de 14 dias, o material das placas (meio de cultivo e fungo) foi extraído utilizando a mistura de solventes MeOH/DCM/AcOEt, nas proporções 1:2:3 em banho de ultrassom pelo período de uma hora. O extrato (Fp) foi obtido após a evaporação do solvente em rotaevaporador.

Após a obtenção do extrato, este foi submetido a extração em fase sólida, com o objetivo de retirar constituintes que pertenciam apenas ao meio de cultivo utilizado.

### 3.7 – Metodologia para Extração em Fase Sólida e Fracionamentos de Fp

O procedimento de extração em fase sólida, foi realizado com o auxílio de cartuchos de C18/500mg da marca Chromabond. Esta extração seguiu procedimento de pré-tratamento de amostras descrito por (CALDAS et al., 2011), realizado em 4 etapas:

**1 – Condicionamento:** Referente à ativação da fase estacionária. O solvente utilizado nesta etapa, depende do tipo de fase estacionária está sendo utilizada.

**2 – Aplicação da amostra:** Retenção dos compostos de interesse e descarte dos possíveis interferentes na eluição.

**3 – Lavagem:** Remoção dos interferentes menos retidos que os compostos de interesse. O solvente a ser utilizado nesta etapa depende do modo de eluição e das características da amostra.

**4 – Eluição:** Eluição dos compostos retidos. Nesta etapa são utilizados solventes que rompam as interações da amostra com a fase estacionária.

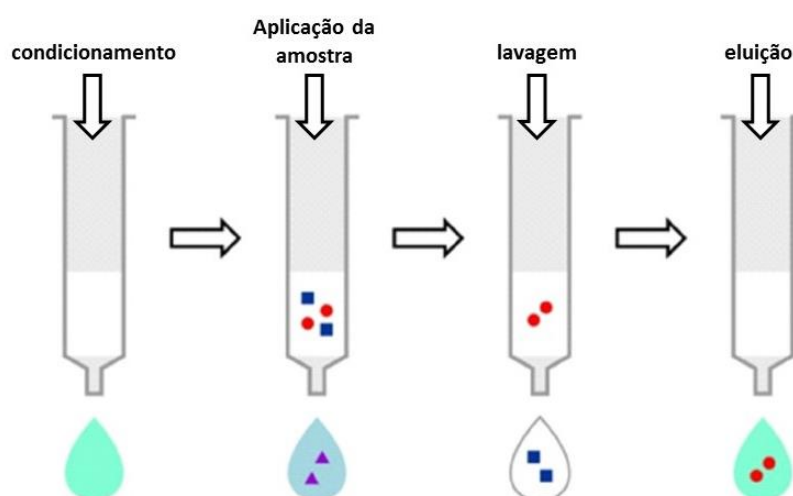


FIGURA 7: Ilustração das etapas de pré-tratamento em cartuchos de SPE (CALDAS et al., 2011).

Para extração em fase sólida do extrato Fp, os cartuchos foram condicionados com 3 volumes de metanol (6 ml por volume) e uma vez com água (6 ml). Em seguida aplicaram-se 50 mg (10% da capacidade máxima do cartucho) do extrato Fp solubilizado em metanol. Após a aplicação do extrato, procedeu-se a limpeza dos cartuchos, utilizando o seguinte sistema de solvente: 6 ml de água 100%, 6 ml de 70% água e 30% metanol, 6 ml de metanol 100% para eluição dos analitos de interesse.

Logo após o pré-tratamento do extrato, deu-se início ao fracionamento de Fp, que foi realizado por cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex LH20 (h= 45 cm, ø= 4 cm), utilizando como fase móvel metanol 100%. A análise das frações foi feita por CCDA e RMN de <sup>1</sup>H.

### **3.8 – Crescimento de *Fusarium proliferatum* em Meio Líquido**

Para o cultivo de *F. proliferatum* em meio líquido, prepararam-se 12 litros de meio de cultivo Czapeck com extrato de levedura, que foram repartidos igualmente em 40 Erlenmeyers de 1 L de capacidade, (300 mL de meio em cada erlenmeyer), e autoclavados por 15 minutos a 120° C.

Após a esterilização e resfriamento do meio de cultivo, o fungo foi inoculado. Para isto, 100 µL de uma suspensão de esporos a 106 esporos/mL foram adicionados a cada erlenmeyer, sendo 3 deles deixados para serem utilizados como controle/branco, onde não foi feita a inoculação do micro-organismo.

Após 14 dias de crescimento, fez-se a separação do micélio do meio líquido por filtração a vácuo, utilizando funil de Büchner. Com a fase aquosa realizou-se partição líquido-líquido utilizando AcOEt (3 vezes), e após a separação das fases, o solvente da fase orgânica foi coletado e evaporado em rotaevaporador para a obtenção do extrato codificado como (FA). Ao micélio foi adicionado etanol e deixado em repouso por 3 dias, em erlenmeyer vedado. Logo após este período o solvente foi concentrado para a obtenção do extrato codificado como (ME).

### **3.9 – Fracionamento dos Extratos Obtidos do Cultivo de *F. proliferatum***

Após a obtenção dos extratos da fase orgânica (FA) e do micélio (ME), estes foram submetidos a fracionamento em HPLC-UV com detecção em 210 nm.

O extrato FA foi fracionado em HPLC preparativo, com vazão de 4,7 mL/min utilizando coluna Luna Phenyl-Hexyl 300 x 4,6 mm (5 $\mu$ ), e o sistema de eluição composto por água e ACN. Iniciou-se com 5% de ACN e indo até 30% em 40 minutos, seguido de 30% de ACN até 100% em 2 minutos, mantendo-se em 100% de fase orgânica (ACN) por 8 minutos para limpeza, em seguida fez-se o acondicionamento da coluna cromatográfica para posterior análise por mais 15 minutos, totalizando 65 minutos. Conforme mostrado na , o fracionamento de FA resultou em 13 frações, que foram analisadas por CCDA e RMN de  $^1\text{H}$ .

As frações obtidas foram submetidas a novos fracionamentos para a purificação dos metabólitos presentes. As purificações denominadas **A1**, **A2**, **A3**, **A4**, **A5** e **A6** mostradas na FIGURA 8, foram obtidas por cromatografia de exclusão molecular, utilizando Sephadex LH20 (h= 32 cm,  $\varnothing$ = 2 cm) como fase estacionária, e metanol como fase móvel.

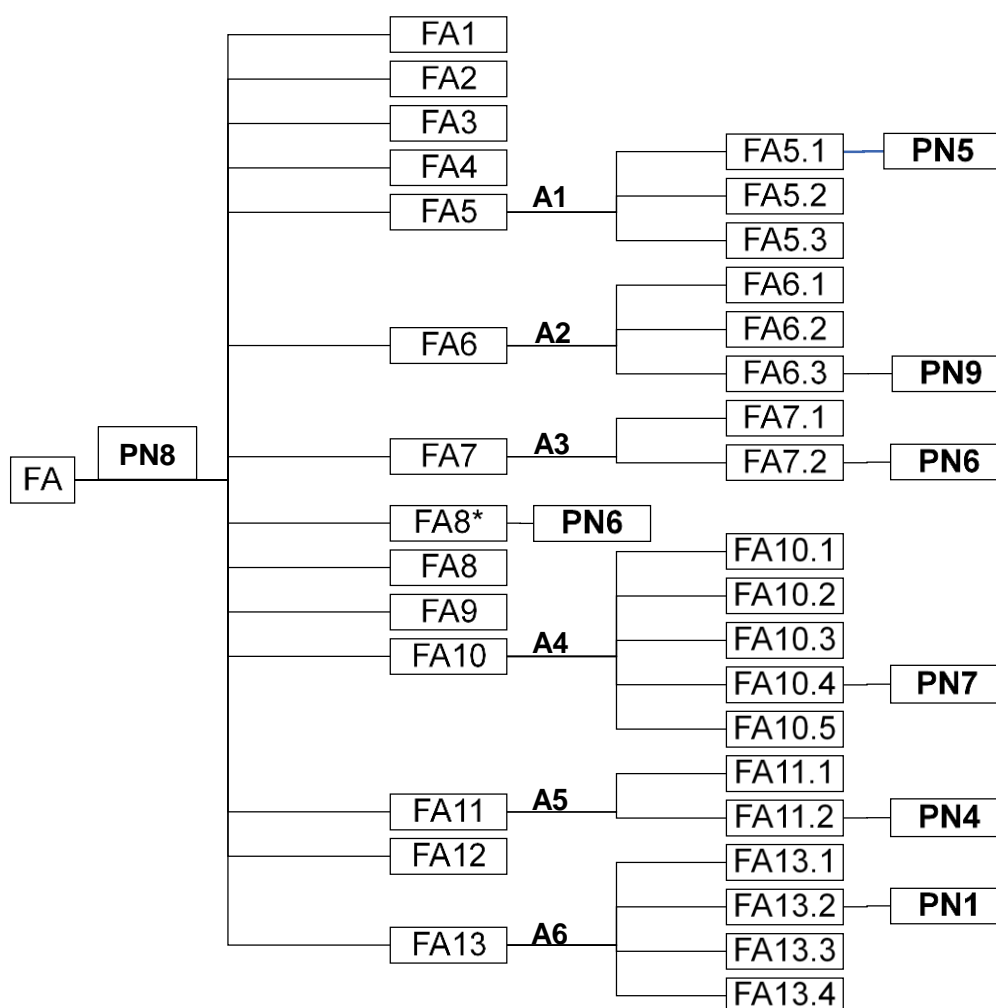


FIGURA 8: Fluxograma do fracionamento do extrato obtido da fase orgânica do cultivo de *F. proliferatum*.

O fracionamento do extrato ME (FIGURA 9), foi realizado em HPLC preparativo, com vazão de 4,7 mL/min, utilizando coluna Luna Phenyl-Hexyl 300 x 4,6 mm (5  $\mu$ ), e o sistema de eluição composto por água e ACN. Iniciando-se com 5% de ACN e indo até 100% em 45 minutos, seguido de 10 minutos de limpeza apenas com a fase orgânica (100% ACN) e depois recondicionamento da coluna cromatográfica para posterior análise por mais 15 minutos, totalizando 70 minutos.

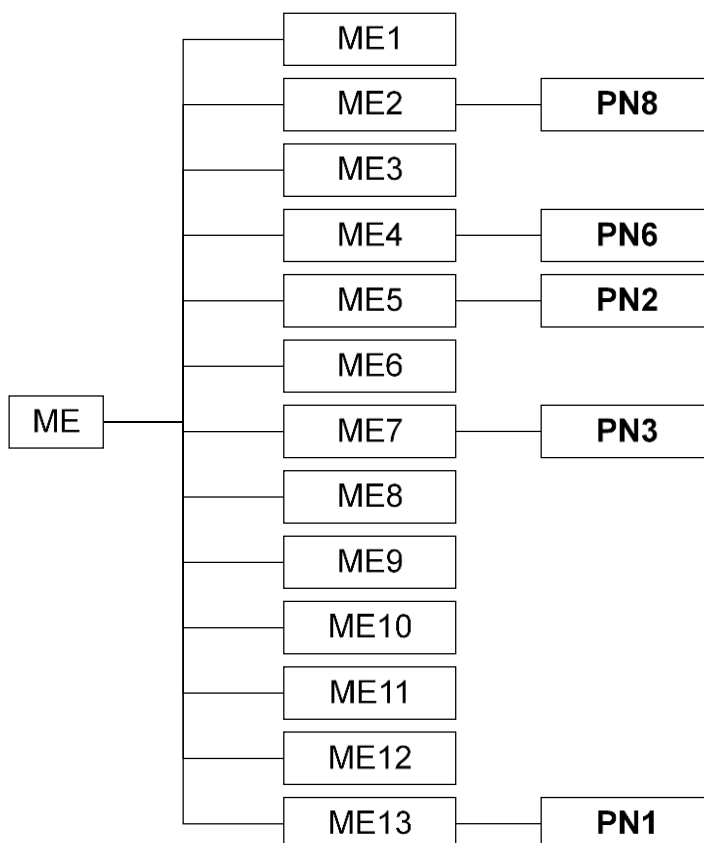


FIGURA 9: Fluxograma do fracionamento do extrato obtido do micélio de *F. proliferatum* extraído com etanol.

### 3.10 – Análise por CG-EM dos compostos isolados

Os compostos PN3, PN4, PN4, PN5, PN6, PN7 e PN9 foram analisados por CG-EM para a confirmação das estruturas químicas propostas.

As análises foram realizadas em um sistema de Cromatografia a gás acoplado a Espectrômetro de Massas (CG-EM), equipado com autoinjeter (Combi PAL AOC-5000 Shimadzu), coluna Restek Rtx-5ms (30m x 0,250 mm x 0,25  $\mu$ m) fundida com sílica e Espectrômetro de Massas Sequencial (MSTQ8030 Shimadzu). O tratamento

de dados foi realizado utilizando-se o Software GCMS Real Time Analysis®, e a comparação dos espectros foi feita com a biblioteca NIST.

A rampa de aquecimento na coluna cromatográfica e os parâmetros operacionais utilizados para as análises dos compostos são mostrados nas TABELA 3 e TABELA 4 respectivamente. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste.

TABELA 3: Rampa de aquecimento da coluna cromatográfica nas análises por CG-EM.

	Taxa de variação (°C min <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)
0	-	80	1,0
1	10	280	1,0

TABELA 4: Parâmetros operacionais utilizados para análises em CG-EM

Temperatura do forno da coluna	80° C
Temperatura de injeção	280° C
Volume de injeção	1 µL
Pressão	90,2 kPa
Fluxo na coluna	1,2 mL/min
Velocidade linear	40,4 cm/sec
Razão de fracionamento	10,0
Temperatura da fonte de íons	280 °C
Faixa de varredura massas	m/z 45 a m/z 600

### 3.11 – Ensaio Enzimáticos

O procedimento para os ensaios enzimáticos com a papaína, catepsina V e catepsina B são semelhantes. O que varia em cada ensaio é a concentração de substrato utilizada para cada enzima, que é ajustada de acordo com o valor de  $K_m$  de enzima em relação ao ZFR-MCA. As concentrações de substrato utilizadas para cada enzima no ensaio são mostradas na TABELA 5.

TABELA 5: Concentração de substrato ZFR-MCA utilizada para cada enzima com base no valor de  $K_m$  de cada uma.

<b>Enzima</b>	<b>Concentração de ZFR-MCA (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>Papaína</b>	90
<b>CatV</b>	10
<b>CatB</b>	185

A atividade enzimática é determinada com base no aumento da fluorescência em função do tempo de reação, através da hidrólise do substrato ZFR-MCA. Este experimento foi realizado em um fluorímetro utilizando placas de ELISA de 96 poços preta e opaca, com volume final de 200  $\mu\text{L}$ , temperatura 27 °C, com comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) 380 nm e emissão ( $\lambda_{\text{em}}$ ) 460 nm.

Na placa de ELISA, contendo 150  $\mu\text{L}$  de tampão acetato (pH 5.5, 2,5 mM de DTE e 2,5 mM de EDTA), a enzima foi incubada com 5  $\mu\text{L}$  da solução de inibidor em DMSO na concentração a ser testada, pelo período de 5 minutos, em seguida adicionaram-se 45  $\mu\text{L}$  da solução contendo substrato ZFR-MCA na concentração correspondente para cada enzima, e fez-se a leitura de fluorescência. Como controle negativo utilizou-se DMSO e para controle positivo E-64. A determinação da atividade enzimática foi realizada através do monitoramento contínuo e direto da hidrólise do substrato fluorogênico (ZFR-MCA) por 300 segundos (5 minutos) (SEVERINO, 2008). Na FIGURA 10 é mostrado um esquema geral da metodologia do ensaio.



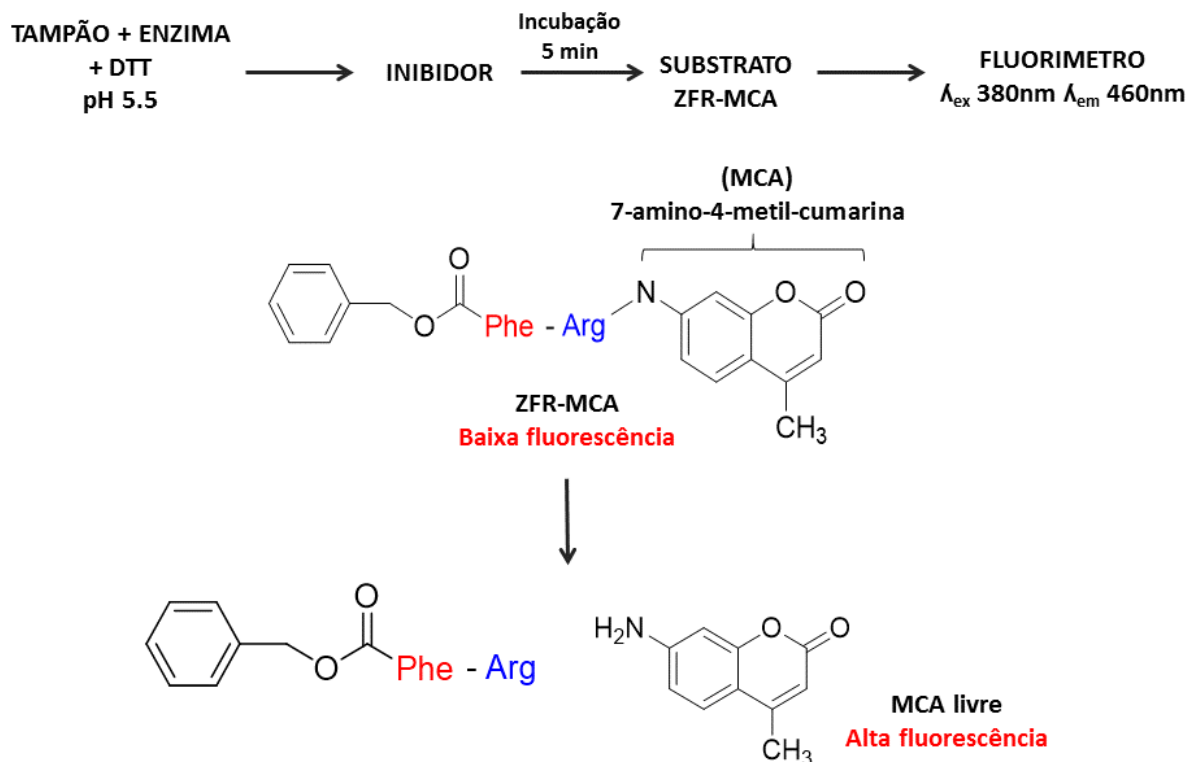


FIGURA 10: Esquema de geral dos ensaios enzimáticos com o substrato fluorogênico ZFR-MCA.

O percentual de inibição é calculado pelo software do equipamento utilizado para as leituras, SoftMaxPro®.

## 4 – Resultados e Discussão (Parte I)

### 4.1 – Escolha do Meio de Cultivo

Com o objetivo de definir qual meio de cultivo seria utilizado para o crescimento em larga escala de *F. proliferatum*, primeiramente foi realizado um cultivo em pequena escala, em diferentes meios de cultivo. Assim, através da análise dos extratos obtidos, pôde-se definir qual melhor meio para o cultivo em larga escala do micro-organismo.

*F. proliferatum* foi cultivado em 4 tipos diferentes de meio de cultivo disponíveis no laboratório. Os meios utilizados foram: 1 – ágar-nutrientes, 2 – batata, dextrose e ágar, 3 – Czapeck com extrato de levedura e ágar, e 4 – malte e ágar.

Após 14 dias de crescimento, foi realizado o procedimento de microextração para a obtenção dos microextratos, conforme descrito anteriormente. A análise dos extratos foi realizada por UPLC-MS, e os cromatogramas de íons totais (TIC) são mostrados na FIGURA 11.

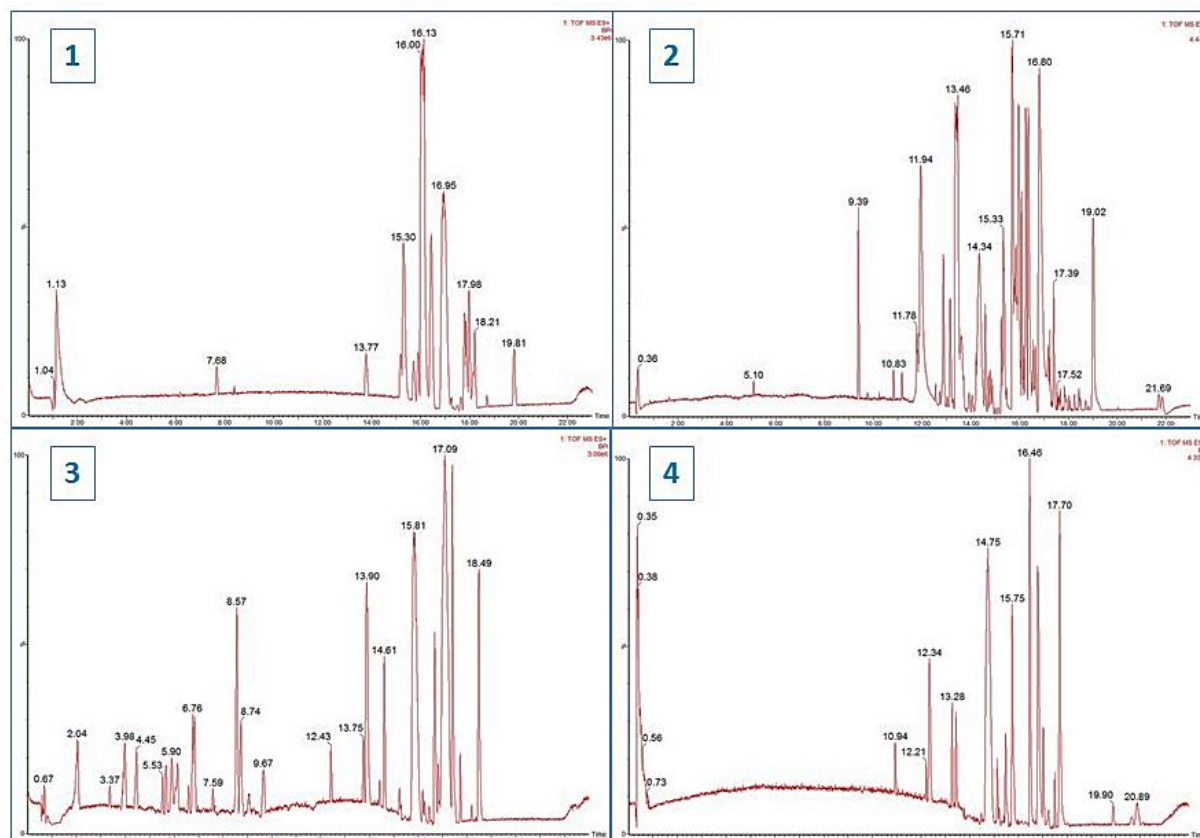


FIGURA 11: Cromatogramas de íons totais obtidos a partir da análise dos microextratos de *F. proliferatum* em diferentes meios de cultivo, 1 – ágar nutrientes; 2 – BDA; 3 – Czapeck com extrato de levedura e ágar; 4 – Malte e ágar. Em todos os cromatogramas foram descontados os picos referentes ao controle/branco.

Este experimento foi realizado com o objetivo de verificar o perfil metabólico do fungo em diferentes meios, em qual deles *F. proliferatum* produziria a maior variedade de metabólitos. Nos TICs apresentados, já foram descontadas as bandas referentes ao controle.

Como pode ser observado na FIGURA 11, os meios de ágar-nutrientes (1) e malte-ágar (4), apresentaram uma quantidade menor de bandas, referente a quantidade de metabólitos produzidos pelo fungo nestes meios de cultivo. Além disso, é possível observar que os metabólitos presentes nestes meios de cultivo são apenas compostos baixa polaridade, pois estes tiveram maior retenção da coluna cromatográfica. Os meios de cultivo BDA (2) e Czapeck com extrato de levedura (3) foram os que apresentaram maior quantidade de bandas. No TIC 3, as bandas estão mais bem resolvidas, com melhor separação. Também é possível observar uma maior variabilidade metabólica presente neste extrato, com compostos de diversas polaridades. Assim, com a análise dos TICs obtidos, o meio de cultivo escolhido foi Czapeck com extrato de levedura.

## 4.2 – Cultivo em Larga Escala em Meio Sólido

Após a escolha do meio de cultivo, foi realizado experimento para a obtenção de maior quantidade de extrato para possibilitar o isolamento dos metabólitos. Foram preparadas 100 placas de petri de 25 cm de diâmetro contendo meio de cultivo Czapeck com extrato de levedura e ágar e em cada placa foram inoculados 3 plugs de 0,9 cm diâmetro do fungo.

Os extratos foram obtidos e fracionados conforme descrito anteriormente. No entanto, a quantidade de extrato obtida com o cultivo em meio sólido foi pequena (112 mg), resultando no isolamento de apenas um composto, sendo este o constituinte majoritário do extrato. Através das análises dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC, foi possível concluir que o composto é a beauvericina (FIGURA 12). A discussão da elucidação estrutural deste composto será apresentada no item composto PN1.

## 4.3 – Cultivo em Meio Líquido

Tendo como objetivo a obtenção de maior quantidade de extrato para isolamento e caracterização dos metabólitos, optou-se pelo cultivo de *F. proliferatum* em meio líquido. Assim, foram preparados 12 litros de meio de cultivo Czapeck com extrato de levedura e a obtenção dos extratos foi feita conforme descrita anteriormente.

O cultivo em larga escala em meio líquido resultou na obtenção de dois extratos, sendo um proveniente da partição líquido-líquido da fase aquosa com AcOEt (FA) e o outro da extração do micélio com etanol (ME). As massas obtidas para cada extrato foram 306 mg para o extrato FA, e 698 mg para o extrato ME.

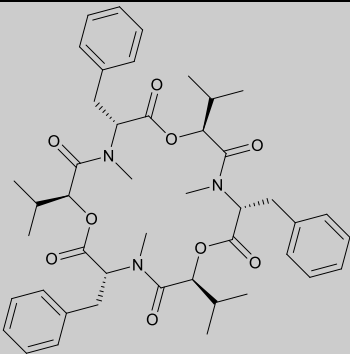
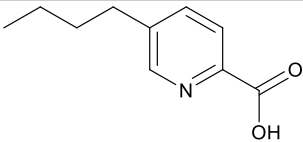
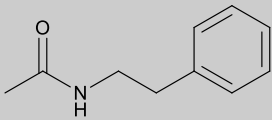
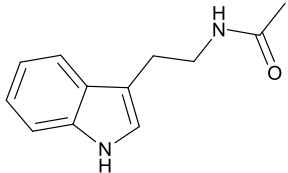
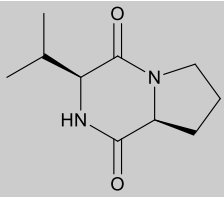
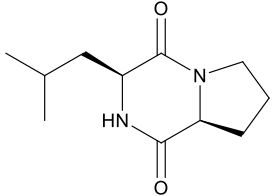
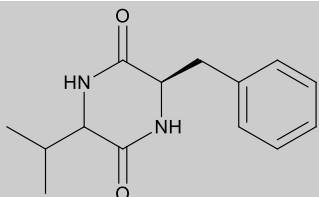
Após a obtenção dos extratos deu-se início aos fracionamentos utilizando metodologia descrita anteriormente.

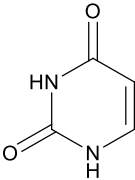
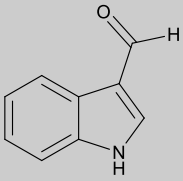
Ao solubilizar o extrato FA em metanol, foi possível observar um precipitado de coloração branca, este foi separado do restante do extrato para análise espectroscópica de RMN de  $^1\text{H}$ , que levou a conclusão de que se tratava do composto codificado como PN8 (FIGURA 35).

Através dos fracionamentos realizados com FA e ME foi possível isolar um total nove metabólitos. Alguns destes metabólitos, como é o caso de PN1, PN6 e PN8 foram observados nos dois extratos, sendo a beauvericina (PN1), o constituinte

majoritário de ambos os extratos. Na TABELA 6 são mostrados os compostos isolados, juntamente com a descrição das frações das quais foram isoladas cada composto e a massa total obtida do composto.

TABELA 6: Compostos isolados dos extratos do meio líquido (FA) e do micélio (ME) do cultivo de *F. proliferatum*.

Cód.	Estrutura Química	Fração da qual foi isolado	Massa
PN1		FA13.2 MA13	17 mg
PN2		MA5	7,8 mg
PN3		MA7	3,8 mg
PN4		FA11.2	2,2 mg
PN5		FA5.1	1,2 mg
PN6		FA7.2 FA 8* MA 4 (identificada)	4,3 mg
PN7		FA 10.4	0,8 mg

PN8		FA MA2	5,6 mg
PN9		FA6.3	1,1 mg

## 4.4 – Compostos Isolados – Elucidação Estrutural

### 4.4.1 – Composto PN1

O composto PN1 foi isolado de ambos os extratos, fase aquosa (FA) e micélio (ME) de *F. proliferatum*, na forma de sólido branco (17,3 mg). A análise dos dados de RMN permitiu concluir que PN1 é a beauvericina (FIGURA 12). A beauvericina é um ciclo-depsipeptídeo formado por três unidades de resíduos de fenilalanina e três unidades de ácido hidroxi-isovalérico intercaladas. Este composto é muito comumente produzido por pelo fungo *Beauveria bassiana* e também por diversas espécies de *Fusarium* (LOGRIECO et al., 1998).

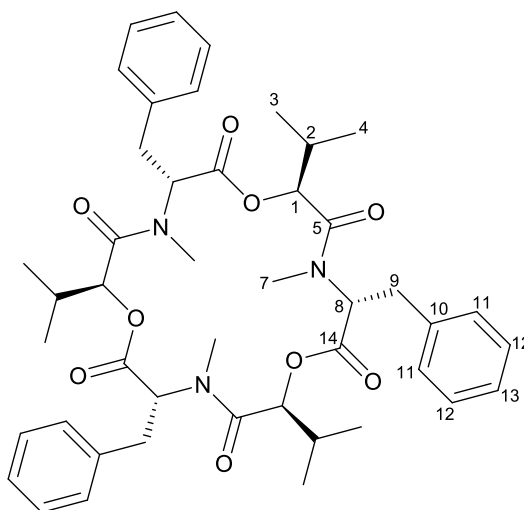


FIGURA 12: Estrutura química da beauvericina (PN1).

Por se tratar de unidades repetidas de resíduos de fenilalanina e do ácido hidroxi-isovalérico, os valores das integrais apresentados no espectro RMN de  $^1\text{H}$  estão multiplicados por 3.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 13) foram observados dois dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  0,85 e  $\delta_{\text{H}}$  0,25, integrando para três hidrogênios cada, referente aos hidrogênios dos grupos metilas (H3 e H4). Também foi observado um multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  1,80 referente a H2 e um dupletto em  $\delta_{\text{H}}$  4,84 referente a H1. Sendo estes sinais de deslocamento químico referentes à porção proveniente do ácido hidroxí-isovalérico.

Além disso, também foram observados sinais de deslocamentos químicos referente a porção proveniente do resíduo de aminoácido fenilalanina. Foram observados sinais de deslocamento químico característicos de hidrogênios ligados a anel aromático em  $\delta_{\text{H}}$  7,18 e  $\delta_{\text{H}}$  7,26, referente a H11, H12 e H13. Também foi observado um simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  3,14 referente a hidrogênios de grupo metila ligada a nitrogênio (H7), um duplo dupletto em  $\delta_{\text{H}}$  5,80 referente a H8 e dois duplos dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  3,40 e  $\delta_{\text{H}}$  3,04 referentes aos hidrogênios da posição 9 (H9a e H9b). Todos os valores de deslocamentos químicos de hidrogênio estão mostrados na TABELA 7, juntamente com os dados da literatura utilizada para comparação.

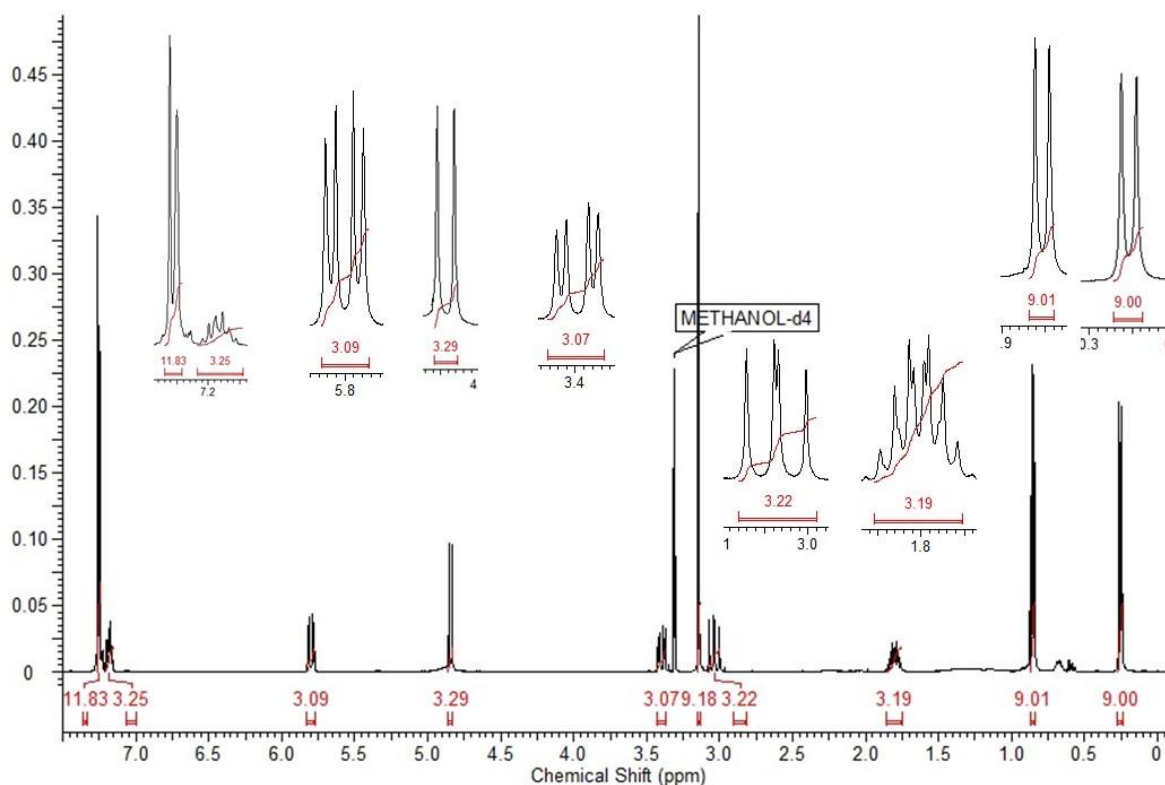


FIGURA 13: Espectro RMN de  $^1\text{H}$  do composto **PN1**(400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

TABELA 7: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  para o composto **PN1**.

H	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )	$\delta_{\text{H}}$ (HU & RYCHILIK, 2012) (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
1	4,84 (d, J= 8,9Hz)	4,80 (d, J= 8,1Hz)
2	1,80 (m)	1,89 (m)
3	0,85 (d, J= 6,6Hz)	0,73 (d, J= 6,6Hz)
4	0,25 (d, J= 6,9Hz)	0,34 (d, J= 6,8Hz)
7	3,14 (s)	2,95 (s)
8	5,80 (dd, J= 12,7; 4,5Hz)	5,47 (m)
9	3,04 (dd, J= 14,7; 12,7Hz)	2,89 (m)
	3,40 (dd, J= 14,7; 4,6Hz)	3,32 (m)
11	7,26 (m)	7,26 (m)
12	7,26 (m)	7,26 (m)
13	7,18 (m)	7,26 (m)

No espectro de HSQC (FIGURA 14) foi possível observar as correlações entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  0,85; 0,25; 1,80; 4,84 com seus respectivos carbonos  $\delta_{\text{C}}$  18,07; 16,52; 29,65 e 75,94, referente a porção proveniente do ácido hidroxí-isovalérico.

Também foram observadas as correlações dos hidrogênios aromáticos  $\delta_{\text{H}}$  7,18 e 7,26 com os carbonos  $\delta_{\text{C}}$  126,49 e 128,93 respectivamente. As correlações dos hidrogênios  $\delta_{\text{H}}$  3,14; 5,80 com seus respectivos carbonos  $\delta_{\text{C}}$  30,25 e 55,83. E também a correlação dos hidrogênios da posição 9,  $\delta_{\text{H}}$  3,40 e 3,04 com o carbono  $\delta_{\text{C}}$  34,61. Sendo estas correlações referentes a porção proveniente do resíduo de aminoácido fenilalanina.



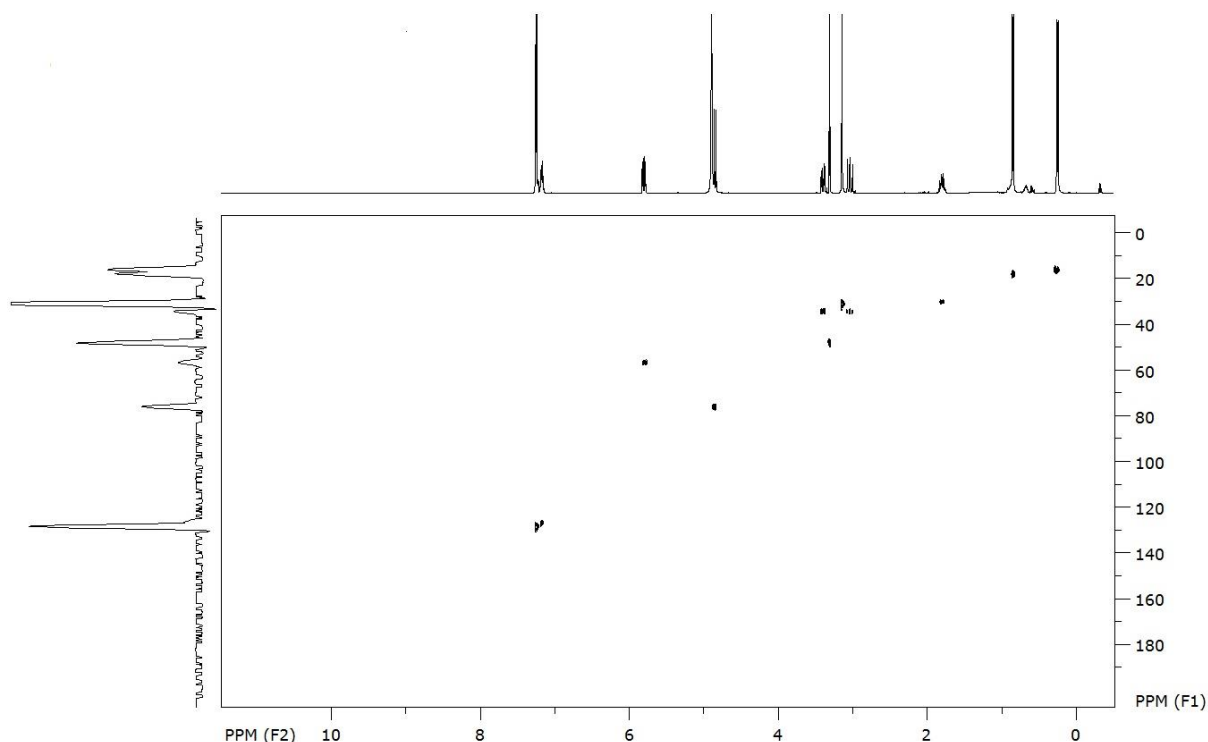


FIGURA 14: Mapa de contorno de HSQC do composto **PN1** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

No espectro de HMBC (FIGURA 15), foi possível observar as correlações entre o hidrogênio em  $\delta_H$  0,25 (H4) com os carbonos em  $\delta_C$  18,7 (C3); 29,65 (C2) e 75,94 (C1), entre o hidrogênio em  $\delta_H$  0,85 (H3) com os carbonos em  $\delta_C$  16,52 (C4); 29,65 (C2) e 75,94 (C1), entre o hidrogênio em  $\delta_H$  4,87 (H1) com os carbonos em  $\delta_C$  29,65 (C2) e 169,73 (C5 grupo carbonila).

Também foram observadas as correlações dos hidrogênios aromáticos em  $\delta_H$  7,26 (H11 e H12) com os carbonos aromáticos em  $\delta_C$  127,64 (C11 e C12) e 126,3 (C13), e com o carbono em  $\delta_C$  34,61 (C9). Assim como a correlação entre o hidrogênio em  $\delta_H$  3,14 (H7) com os carbonos em  $\delta_C$  55,83 (C8) e 171,37 (C14) grupo carbonila, entre o hidrogênio em  $\delta_H$  5,80 (H8) com os carbonos em 35,12 (C9), 134,20 (C10) e 171,37 (C14). A correlação dos hidrogênios da posição 9, sendo em  $\delta_H$  3,40 com os carbonos em 55,83 (C8), 127,64 (C11) e 134,20 (C10), e em  $\delta_H$  3,04 com os carbonos em 55,83 (C8), 127,64 (C11) e 134,20 (C10) e (C14) grupo carbonila.

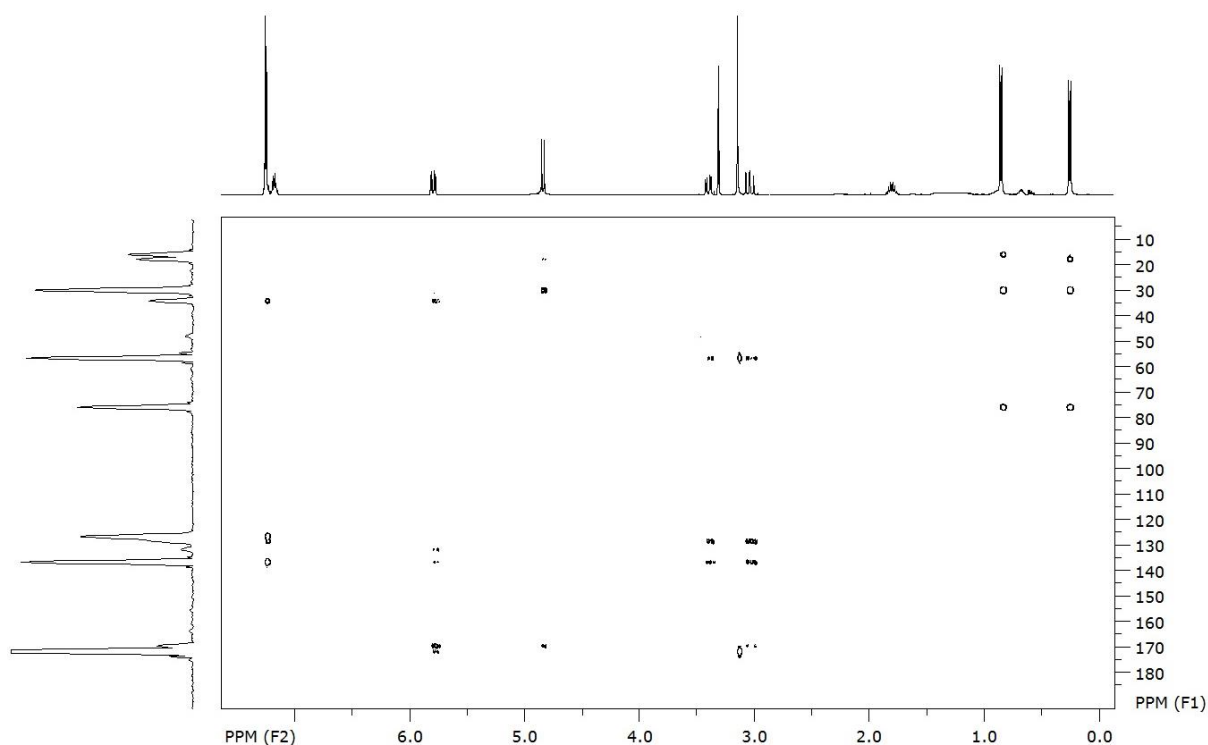


FIGURA 15: Mapa de contorno de HMBC do composto **PN1** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

Através do espectro de massas (FIGURA 16) obtido para este composto observou-se o pico do íon  $[M+Na]^+$  de  $m/z$  806,3904, cuja a fórmula molecular corresponde a  $[C_{45}H_{57}N_3O_9Na]^+$ . A fragmentação do pico de  $m/z$  806,3984 forneceu os íons de  $m/z$  645,3143,  $m/z$  545,2620,  $m/z$  384,1783,  $m/z$  284,1226 e  $m/z$  266,1153, referente as espécies  $[C_{35}H_{46}N_2O_8Na]^+$ ,  $[C_{30}H_{38}N_2O_6Na]^+$ ,  $[C_{30}H_{38}N_2O_6Na]^+$ ,  $[C_{15}H_{19}NO_3Na]^+$  e  $[C_{15}H_{17}NO_2Na]^+$  respectivamente, também confirmam tal proposta. Na FIGURA 17 é mostrada a proposta de fragmentação para gerar cada um dos íons observados.

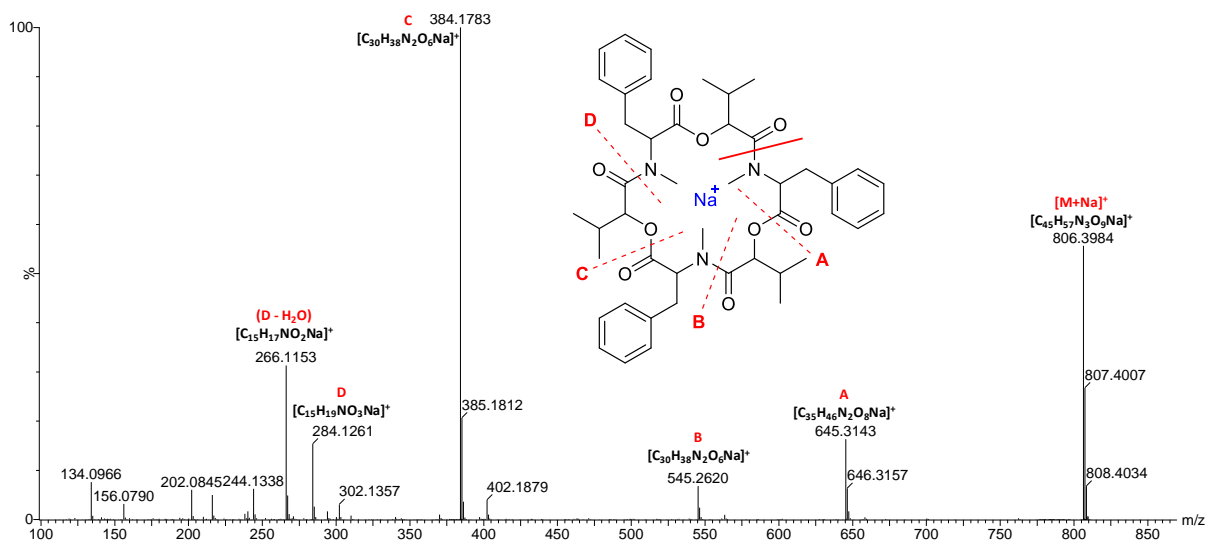


FIGURA 16: Espectro de íons produtos (ESI+) do composto **PN1**.

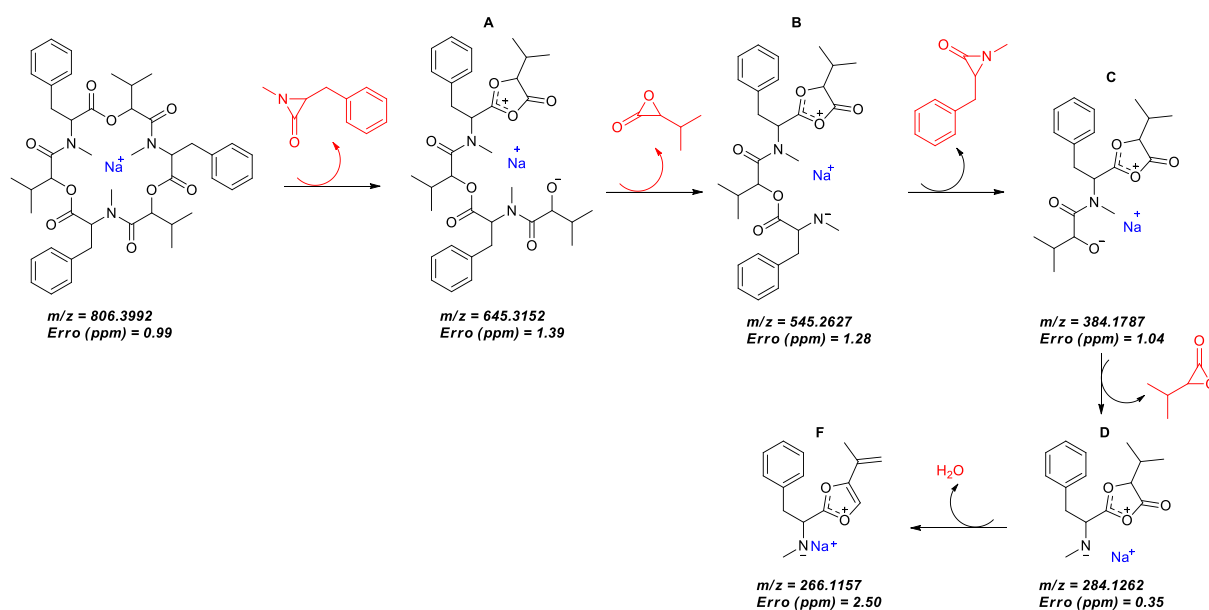


FIGURA 17: Proposta de fragmentação do composto **PN1**, beauvericina.

#### 4.4.2 – Composto PN2

O composto PN2 foi isolado na forma de um sólido branco (7,8 mg). A análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  permitiu concluir que este composto é o ácido fusárico (FIGURA 18), uma micotoxina comumente produzida por fungos do gênero *Fusarium*.

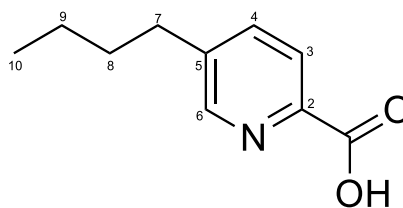


FIGURA 18: Estrutura química do ácido fusárico (**PN2**).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 19), foram observados sinais de deslocamento químico característico de hidrogênios aromáticos, ligados a um anel piridínico substuído nas posições 2 e 5. Um simpleto largo em  $\delta_{\text{H}}$  8,51, um duplete em  $\delta_{\text{H}}$  8,10 ( $J= 8,0\text{Hz}$ ) e um duplo duplete em  $\delta_{\text{H}}$  7,90 ( $J= 8,0$  e  $2,1\text{Hz}$ ), atribuídos a H6, H3 e H4 respectivamente.

Também foi possível observar sinais deslocamento químicos característicos de hidrogênios benzílicos. Um tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  2,76 ( $J= 7,8\text{Hz}$ , 2H) referente aos hidrogênios da posição 7, um quintuplete em  $\delta_{\text{H}}$  1,66 ( $J= 7,6$ , 2H) referente aos hidrogênios da posição 8 e sextuplete em  $\delta_{\text{H}}$  1,40 ( $J=7,4$ , 2H) referente aos hidrogênios da posição 9. Além destes sinais, um tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  0,96 ( $J=7,3$ , 3H) referente aos hidrogênios metílicos (H10). Assim, através das análises do dados de RMN de  $^1\text{H}$  e em comparação com dados da literatura (STIPANOVIC et al., 2011), foi possível concluir que o composto PN2 é o ácido fusárico. Na TABELA 8 são mostrados os valores dos sinais de deslocamentos químicos observados juntamente com os da literatura utilizado para comparação.

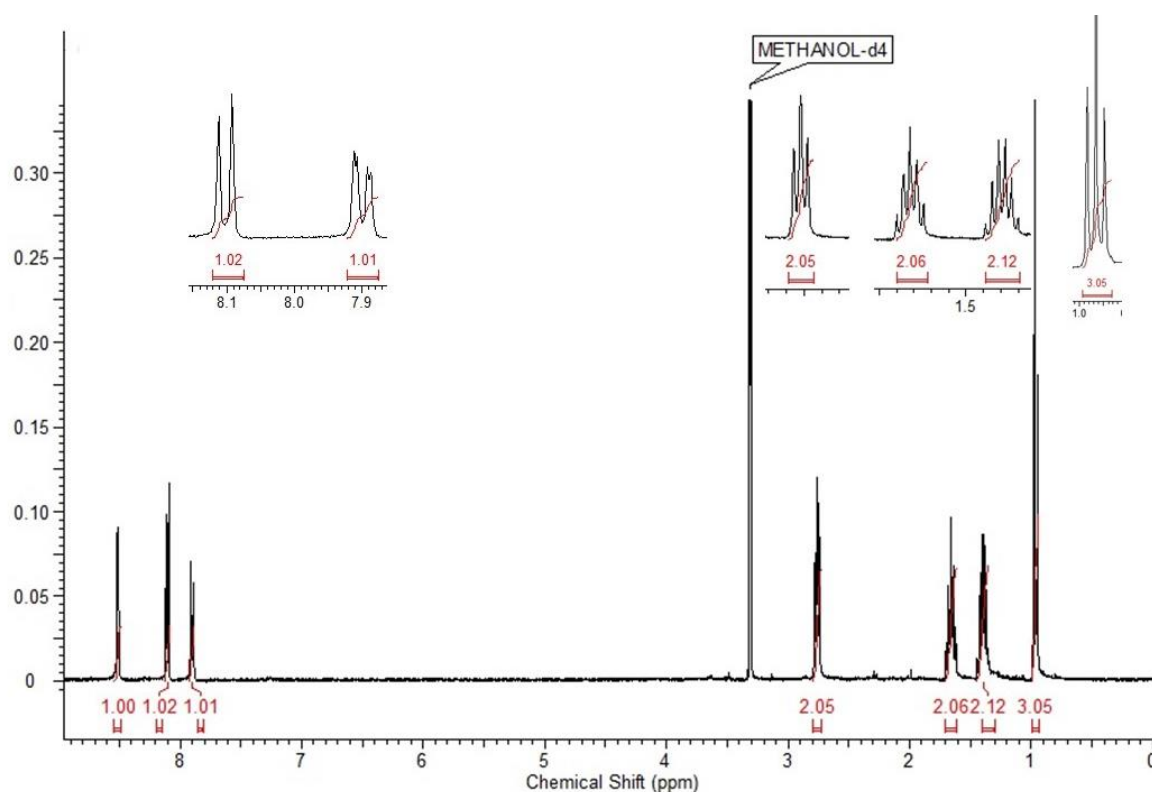


FIGURA 19: Espectro RMN de  $^1\text{H}$  para o composto **PN2** (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

TABELA 8: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  para o composto **PN2**.

H	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )	$\delta_{\text{H}}$ (STIPANOVIC et al., 2011) (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
3	8,10 (d, $J= 8,0\text{Hz}$ )	8,17
4	7,90 (dd, $J= 8,0; 2,1\text{Hz}$ )	7,75
6	8,51 (s)	8,70
7	2,76 (t, $J= 7,8\text{Hz}$ ) (2H)	2,71
8	1,66 (quint, ( $J= 7,6\text{Hz}$ ) (2H)	1,62
9	1,40 (sext, $J= 7,4\text{Hz}$ ) (2H)	1,34
10	0,96 (t, $J= 7,3\text{Hz}$ ) (3H)	0,90

#### 4.4.3 – Composto PN3

O composto PN3 (FIGURA 20) foi isolado (3,8 mg) a partir do fracionamento do extrato do micélio de *F. proliferatum*.

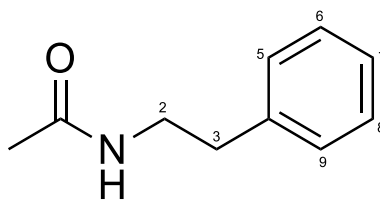


FIGURA 20: Estrutura química do composto N-etil-3-fenil-acetamida (**PN3**).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de PN3 (FIGURA 21) foi possível observar sinais característicos de hidrogênios aromáticos ligados a anel monossustituído. Um multiplete em  $\delta_{\text{H}}$  7,20 integrando para três hidrogênios, atribuído a H6, H7 e H8, e um multiplete em  $\delta_{\text{H}}$  7,28 integrando para 2 hidrogênios, atribuído a H5 e H9. Também foram observados dois tripletos em  $\delta_{\text{H}}$  2,80 e  $\delta_{\text{H}}$  3,38 atribuídos há H3 e H2 respectivamente e um simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  1,90 integrando para três hidrogênios, referente aos hidrogênios metílicos.

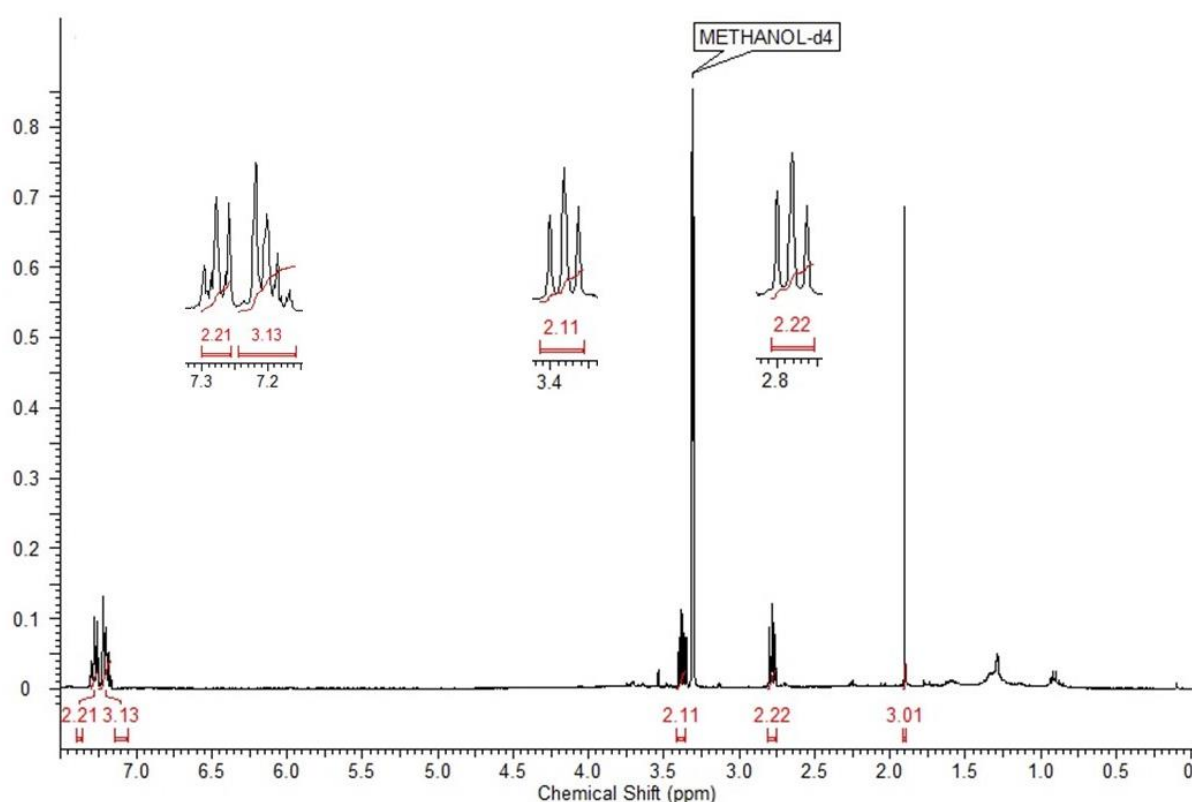


FIGURA 21: Espectro RMN de  $^1\text{H}$  do composto **PN3** (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

Para a confirmação da estrutura do composto, fez-se análise deste por CG-EM FIGURA 22. Observou-se o pico do íon molecular com  $m/z$  163, correspondente a estrutura proposta pelos dados de RMN de  $^1\text{H}$ .

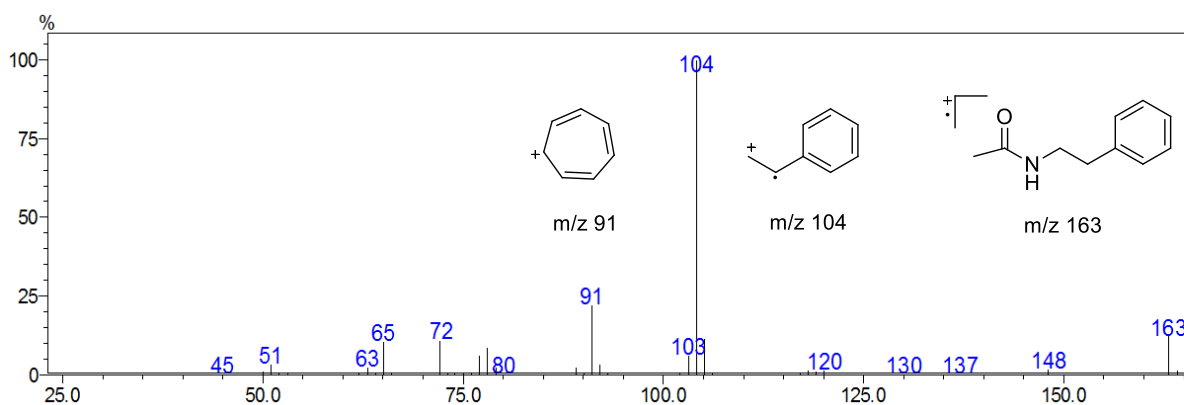


FIGURA 22: Espectro de massas (EI) obtido do composto **PN3**.

Assim, com base nos dados obtidos por RMN de  $^1\text{H}$  e por CG-EM, pode-se concluir que o composto PN3 é a N-etil-3-fenil-acetamida.

#### 4.4.4 – Composto PN4

O composto PN4 foi isolado (2,2 mg) do extrato da fase aquosa, na forma de um pó branco. A análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  permitiu concluir que o composto é a N-acetiltriptamina.

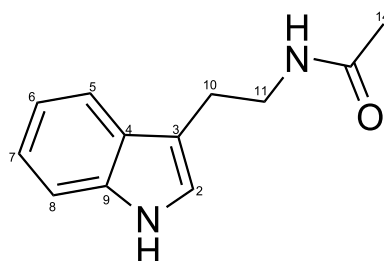


FIGURA 23: Estrutura química do composto N-acetiltriptamina (**PN4**).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 24) foram observados um simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  1,93 integrando pra três hidrogênios, atribuído aos hidrogênios do grupo metila (H14), dois tripletos em  $\delta_{\text{H}}$  2,96 e  $\delta_{\text{H}}$  3,48 integrando para dois hidrogênios cada, característicos de ligação  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ , atribuídos a H10 e H11 respectivamente, e um multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  7,0 atribuído a H2.

Também foram observados sinais de hidrogênios aromáticos ligado a anel *orto*-dissubstituído e dois dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,57 e  $\delta_{\text{H}}$  7,32 atribuídos a H5 e H8 respectivamente, além de um multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  7,08 integrando pra dois hidrogênios, atribuído a H6 e H7. Na TABELA 9 são mostrados os valores dos sinais de

deslocamentos químicos observados juntamente com os da literatura utilizada para comparação. (PAVLÁT et al., 1999).

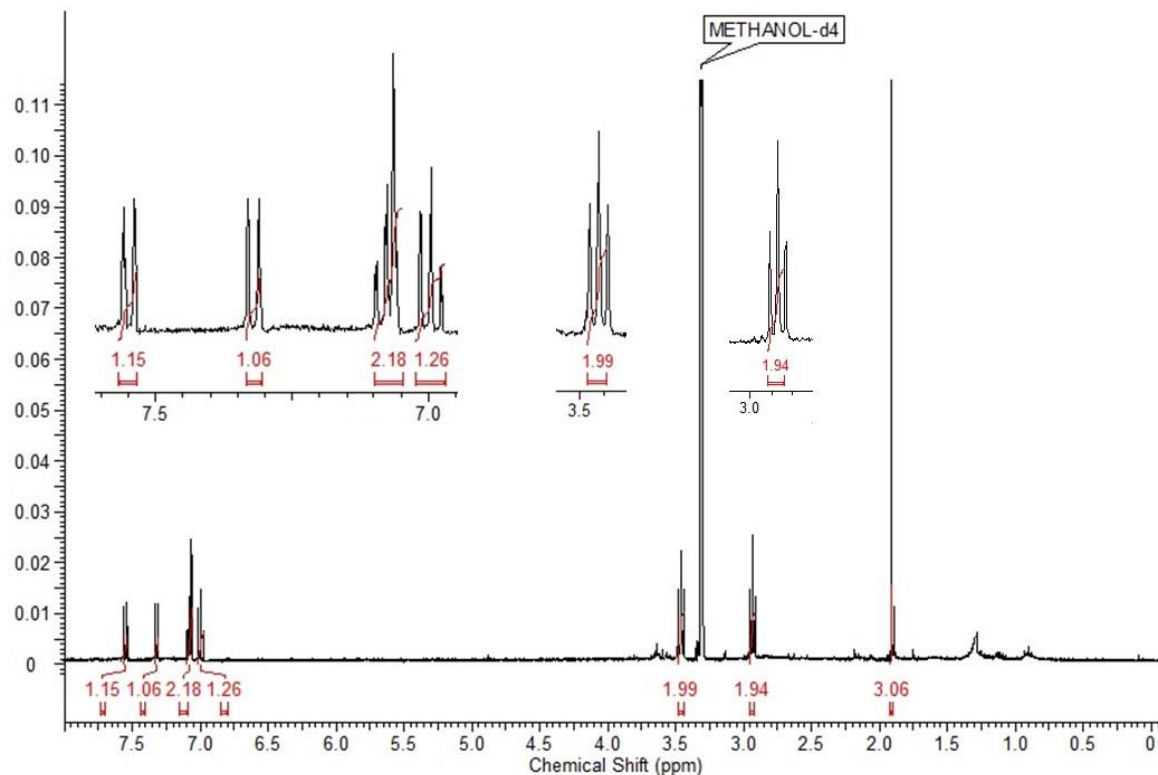


FIGURA 24: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **PN4** (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

TABELA 9: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  para o composto **PN4**.

H	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )	$\delta_{\text{H}}$ (PAVLÁT et al., 1999) (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )
2	7,00 (m)	7,03
5	7,57 (d, $J= 7,9\text{Hz}$ )	7,05
6	7,08 (m)	-
7	7,08 (m)	7,75
8	7,32 (d, $J= 8,1\text{Hz}$ )	7,21
10	2,96 (t, 7,1Hz)	2,90
11	3,48 (t, 7,3Hz)	3,43
14	1,93 (s)	1,82



No espectro de massas (FIGURA 25) do composto PN4 foi possível observar o pico do íon molecular de  $m/z$  202, que está de acordo com os dados obtidos por RMN de  $^1\text{H}$ .

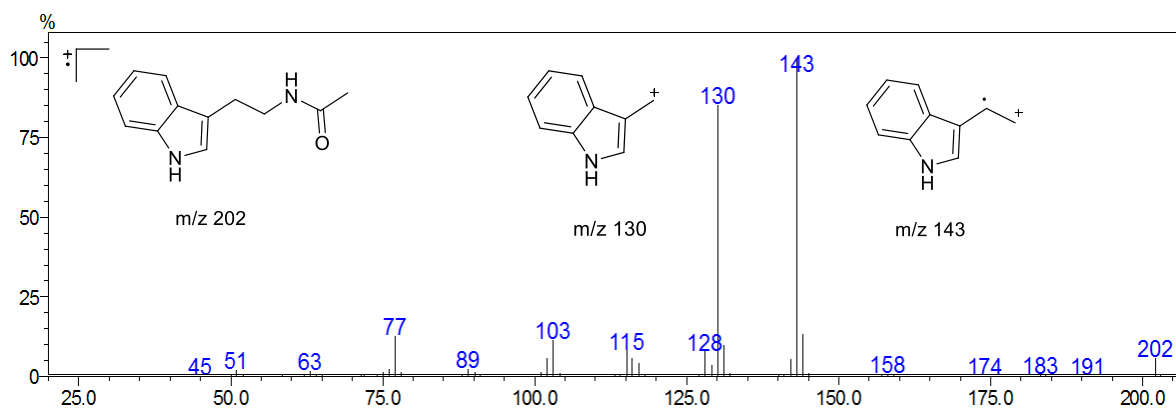


FIGURA 25: Espectro de massas (EI) obtido do composto **PN4**.

Assim com base nos dados obtidos por RMN de  $^1\text{H}$ , CG-EM e em comparação com dados da literatura (PAVLÁT et al., 1999), foi possível concluir que o composto PN4 é a acetiltriptamina.

#### 4.4.5 – Composto PN5

O composto PN5 foi isolado na forma de um sólido branco/transparente (1,2mg), com alguns cristais em forma de agulha. A análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  permitiu concluir que este composto é a dicetopiperazina ciclo prolina-valina (FIGURA 26).

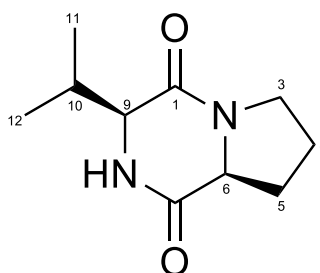


FIGURA 26: Estrutura química da dicetopiperazina ciclo prolina-valina (**PN5**).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 27) foi possível observar sinais de deslocamento químico característicos de dicetopiperazinas derivadas de aminoácidos

não aromáticos. Foram observados dois dupletos em  $\delta_H$  0,93 ( $J= 6,9\text{Hz}$ ) e  $\delta_H$  1,09 ( $6,9\text{Hz}$ ) referentes a hidrogênios de grupos metílicos. Também foram observados um sinal em  $\delta_H$  4,19 e um duplo hepteto em  $\delta_H$  2,48 ( $J=7,1; 2,5\text{Hz}$ ) atribuídos a H9 e H10 respectivamente. Esses sinais são característicos da porção formada pelo resíduo de aminoácido valina.

Observaram-se também multipletos entre  $\delta_H$  1,9 e 3,5 característicos de hidrogênios metilênicos atribuídos aos hidrogênios das posições 3, 4, e 5 e um sinal em  $\delta_H$  4,03 atribuído a H6. Estes sinais são referentes à porção formada pelo resíduo do aminoácido prolina. Os deslocamentos químicos de cada hidrogênio do composto PN5, juntamente com os dados obtidos da literatura são mostrados na TABELA 10.

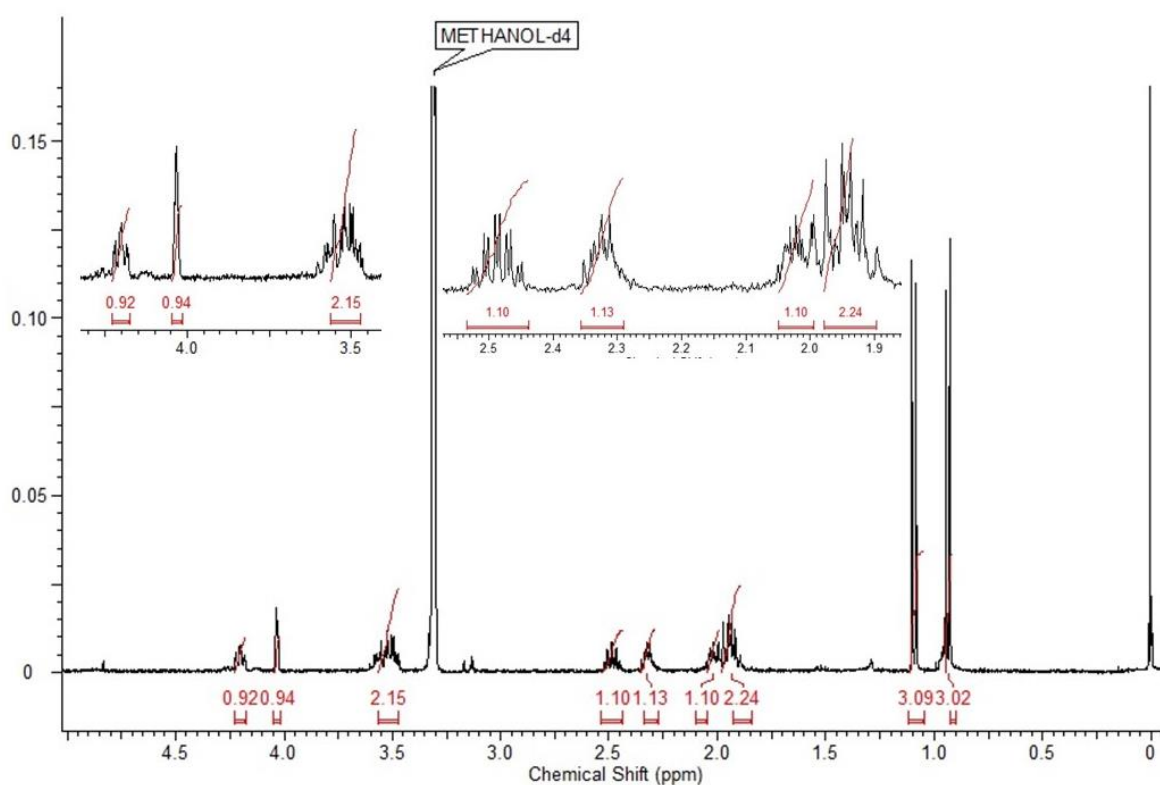
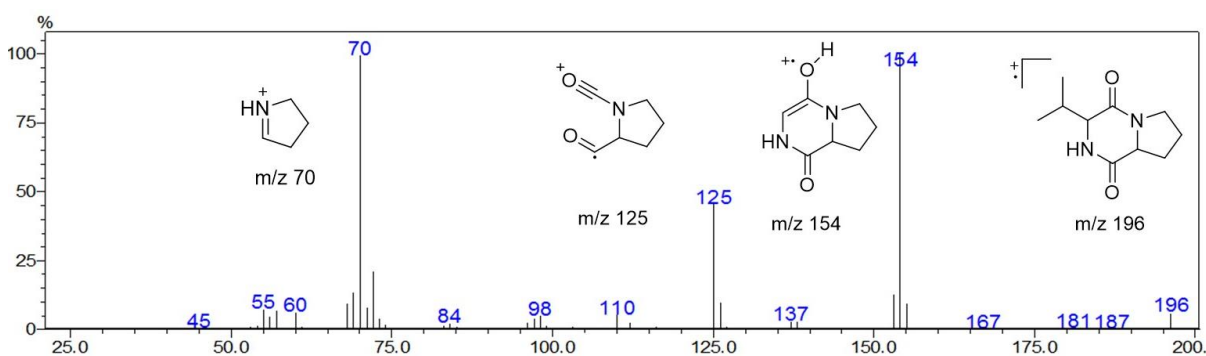


FIGURA 27: Espectro RMN de  $^1\text{H}$  do composto PN5 (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

TABELA 10: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  para o composto **PN5**.

H	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )	$\delta_{\text{H}}$ (HE et al., 2013) (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
<b>3</b>	3,47 – 3,58 (m) (2H)	3,53
		3,69
<b>4</b>	1,94 (m) 2,03 (m)	1,89
		2,03
<b>5</b>	1,94 (m) 2,32 (m)	1,94
		2,40
<b>6</b>	4,03 (m)	4,09
<b>9</b>	4,19 (m)	3,73
<b>10</b>	2,48 (dhept, $J=7,1; 2,5\text{Hz}$ )	2,24
<b>11</b>	0,93 (d, $J=6,9\text{Hz}$ )	0,99
<b>12</b>	1,09 (d, $J=6,9\text{Hz}$ )	1,04

Para a confirmação da estrutura química, o espectro de massas (CG-EM) foi adquirido. O pico do íon de  $m/z$  196 foi observado, estando de acordo com os dados obtidos de RMN de  $^1\text{H}$  para esta estrutura. Também foram observados picos de  $m/z$  característicos desta dicetopiperazina, conforme mostrados na .

FIGURA 28: Espectro de massas (EI) obtido do composto **PN5**.

Desta forma, os dados obtidos por RMN de  $^1\text{H}$  e CG-EM, e em comparação com dados da literatura (HE et al., 2013) foi possível concluir que o composto PN5 é a dicetopiperazina ciclo prolina-valina.

#### 4.4.6 – Compostos PN6

O composto PN6 foi isolado na forma de um pó de coloração amarelada (4,3mg). Através da análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foi possível identificar o composto como sendo da dicetopiperazina ciclo prolina-leucina (FIGURA 29).

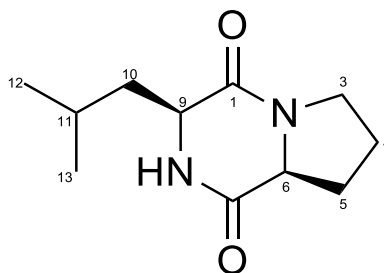


FIGURA 29: Estrutura química da dicetopiperazina ciclo prolina-leucina (**PN6**).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 30) foi possível observar sinais característicos de dicetopiperazinas derivadas de aminoácidos não aromáticos. Analisando o espectro é possível observar dois dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  0,95 ( $J= 2,3$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  0,97 ( $J= 2,3\text{Hz}$ ) referente a hidrogênios de grupos metilas. Também foi possível observar um multiplete referente a hidrogênios metilênicos entre  $\delta_{\text{H}}$  1,83 – 2,08 e um sinal de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  4,26 (ddd  $J= 9,5; 7,0; 1,7\text{Hz}$ ) característico do resíduo de aminoácido leucina. Além desses, também foram observados sinais de hidrogênios metilênicos e metínicos, que são característicos do resíduo de aminoácido prolina. Os deslocamentos químicos de cada hidrogênio do composto PN6, juntamente com os dados obtidos da literatura são mostrados na TABELA 11.

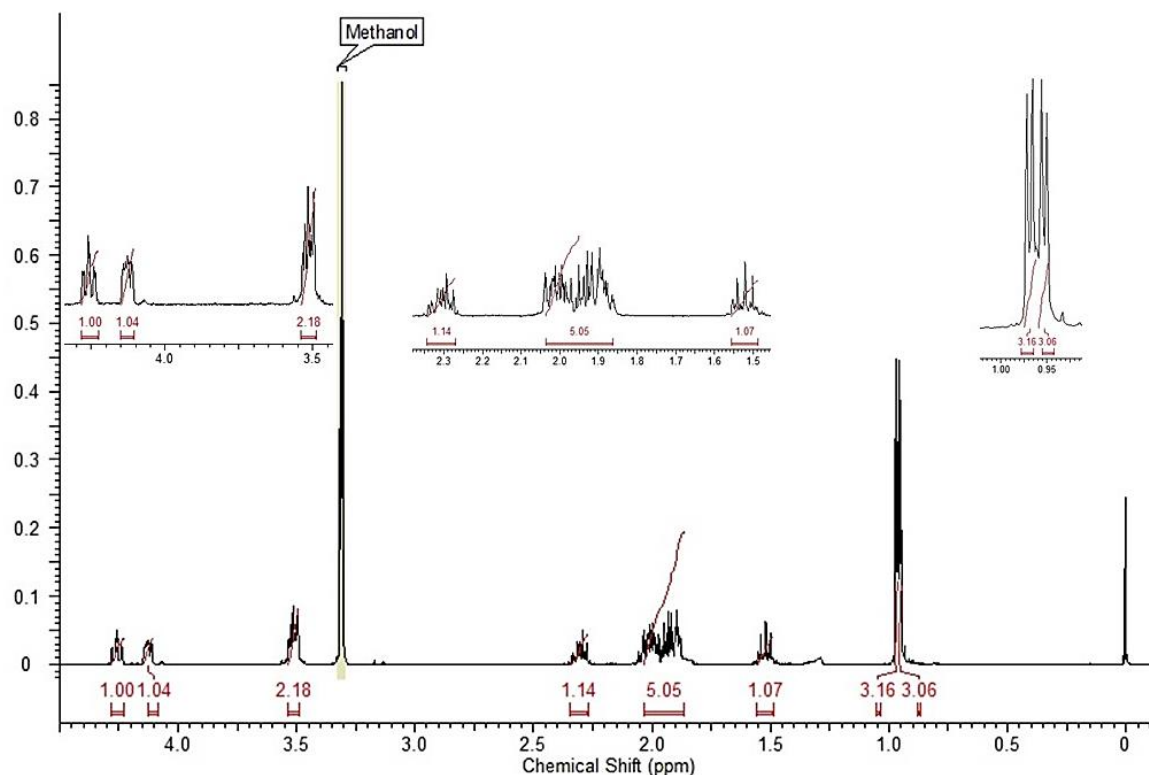


FIGURA 30: Espectro RMN de  $^1\text{H}$  do composto **PN6** (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

TABELA 11: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  para o composto **PN6**.

H	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )	$\delta_{\text{H}}$ (HE et al., 2013) (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
3	3,49 – 3,54 (m) (2H)	3, 52 (m) 3,59 (m)
4	1,83 – 2,09 (m)	1,88 (m) 2,01 (m)
5	2,31 (m) 1,83 – 2,09 (m)	2,33 (m) 2,10 (m)
6	4,13 (m)	4,10 (m)
9	4,26 (ddd, J= 9,5; 70; 1,7 Hz)	4,00 (m)
10	1,53 (m) 1,83 – 2,09 (m)	1,51 (m) 2,05 (m)
11	1,83 – 2,09 (m)	1,77 (m)
12	0,95 (d, J= 2,3Hz)	0,98 (d)
13	0,97 (d, J= 2,3 Hz)	0,98 (d)

No espectro de massas (FIGURA 31) foi observado o pico do íon molecular de  $m/z$  210, e também outros picos de  $m/z$  característicos da fragmentação da dicetopiperazina proposta através dos dados de RMN de  $^1\text{H}$ .

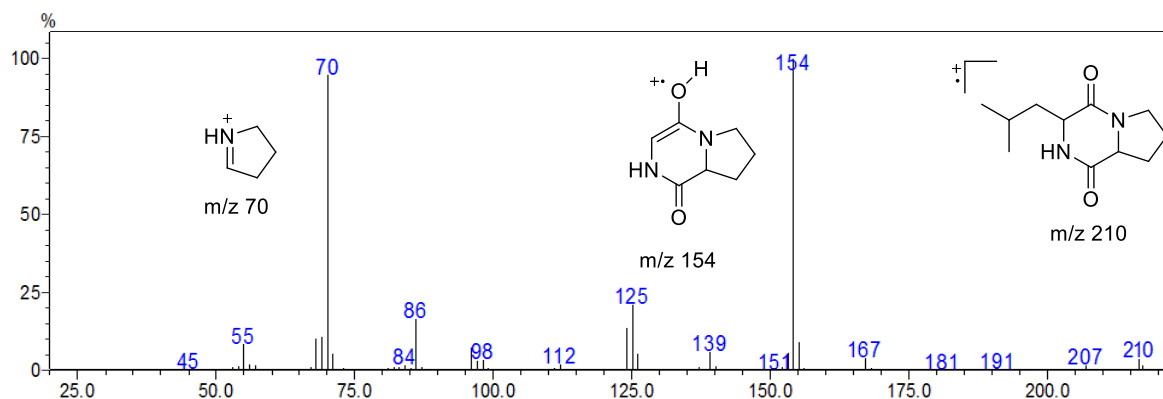


FIGURA 31: Espectro de massas (EI) obtido do composto **PN6**.

Desta forma, as análises dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e CG-EM, e em comparação com dados da literatura (HE et al., 2013) foi possível concluir que o composto PN6 é a dicetopiperazina ciclo prolina-leucina.

#### 4.4.7 – Composto PN7

A substância PN7 foi isolada (0,8 mg) a partir do fracionamento FA10 em coluna de Sephadex. A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  sugeriu que esta substância era uma dicetopiperazina a ciclo valina-fenilalanina (FIGURA 32).

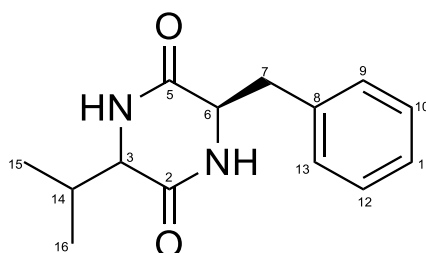


FIGURA 32: Estrutura química da dicetopiperazina ciclo valina-fenilalanina (**PN7**).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 33) foi possível observar dois dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  0,44 ( $J = 6,9\text{Hz}$ ) e  $\delta_{\text{H}}$  0,79 ( $J = 6,9\text{Hz}$ ) referente aos hidrogênios dos grupos metilas, um multiplete em  $\delta_{\text{H}}$  2,15 atribuído a H14 e um multiplete em  $\delta_{\text{H}}$  3,64 atribuído

a H3. Estes sinais são característicos da porção formada pelo resíduo de aminoácido valina.

Também foram observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta_{\text{H}}$  7,23 e  $\delta_{\text{H}}$  7,28, dois duplos dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  3,03 ( $J=13,8$  e  $4,9\text{Hz}$ ) e  $\delta_{\text{H}}$  3,24 ( $J=13,8$  e  $5,1\text{Hz}$ ), referente aos hidrogênios metilênicos da posição 7 e um triplo duplete em  $\delta_{\text{H}}$  4,31 ( $J=5,0$  e  $1,7\text{Hz}$ ) referente a H6. Estes sinais são característicos da porção formada pelo resíduo de aminoácido fenilalanina. Os deslocamentos químicos de cada hidrogênio do composto PN6, juntamente com os dados obtidos da literatura são mostrados na TABELA 12.

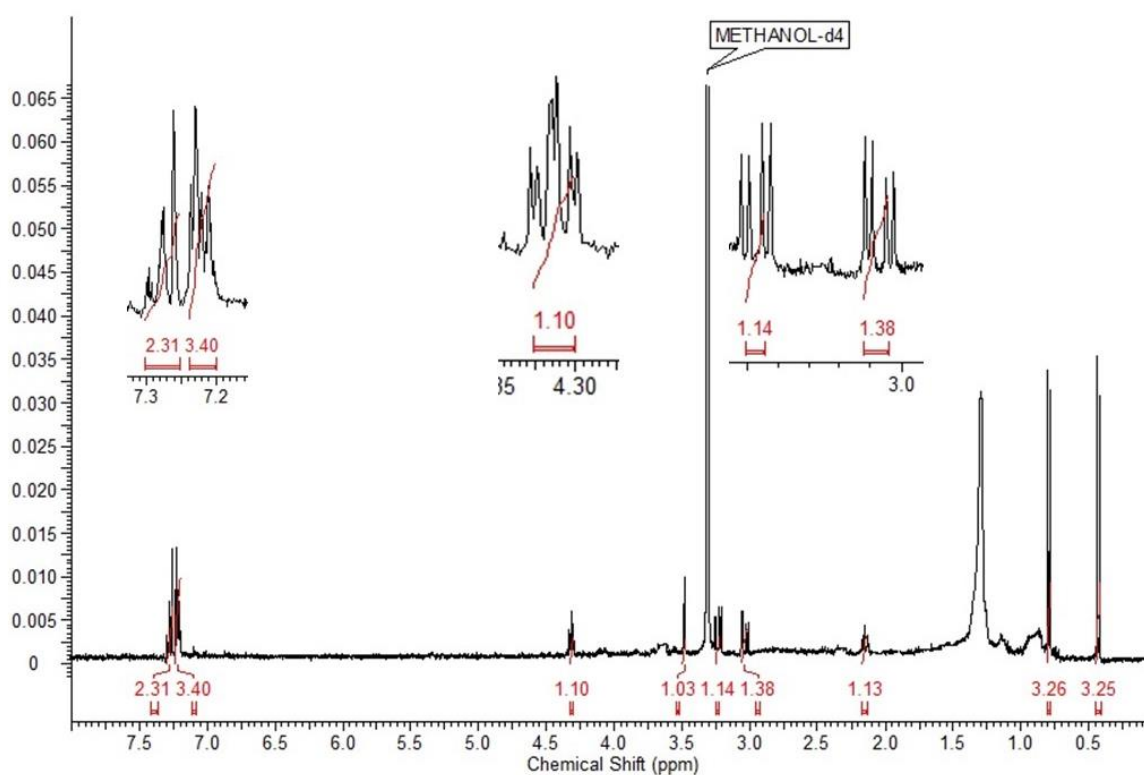
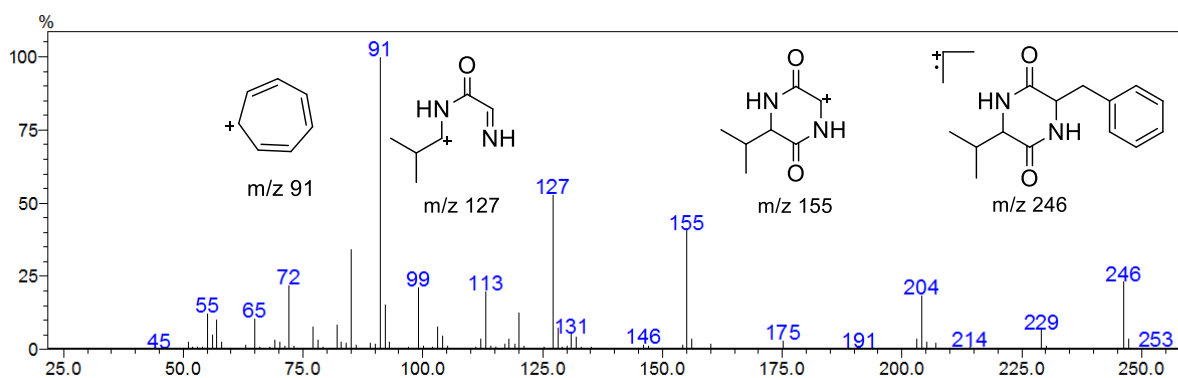


FIGURA 33: Espectro RMN de  $^1\text{H}$  do composto **PN7** (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

TABELA 12: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  para o composto **PN7**.

H	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )	$\delta_{\text{H}}$ (ALSHAIBANI et al., 2017) (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )
3	3,64 (m)	3,66
6	4,31 (td, J=5,0 e 1,7 Hz)	3,34
7	3,03 (dd, J=13,8 e 4,9 Hz) 3,24 (dd, J=13,8 e 5,1 Hz)	3,01 3,26
9	7,28 (m)	7,22
10	7,23 (m)	7,28
11	7,23 (m)	7,23
12	7,23 (m)	7,28
13	7,28 (m)	7,22
14	2,15 (m)	1,66
15	0,79 (d, J=6,9 Hz)	0,79
16	0,44 (d, J=7,0 Hz)	0,42

No espectro de massas do composto **PN7**, foi observado o pico do íon molecular de  $m/z$  246, estando este de acordo com os dados obtidos por RMN de  $^1\text{H}$ . Também foram observados outros fragmentos característicos da molécula, como mostrado na FIGURA 34.

FIGURA 34: Espectro de massas (EI) obtido do composto **PN7**.

Assim, através das análises dos dados de RMN de  $^1\text{H}$ , CG-EM e em comparação com dados da literatura (ALSHAIBANI et al., 2017) foi possível concluir que o composto **PN7** é a dicetopiperazina ciclo valina-fenilalanina.



#### 4.4.8 – Composto PN8

O composto PN8 foi isolado (5,6 mg) do extrato da fase aquosa do cultivo de *F. proliferatum*, na forma de um precipitado branco. A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  permitiu concluir que o composto PN8 é a base nitrogenada uracila (FIGURA 35).

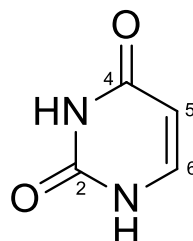


FIGURA 35: Estrutura química do composto uracila (**PN8**).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 36) foram observados apenas dois sinais de deslocamento químico, sendo dois dupletos em  $\delta_{\text{H}} 5,60$  e  $\delta_{\text{H}} 7,40$  referente aos dois hidrogênios H5 e H6.

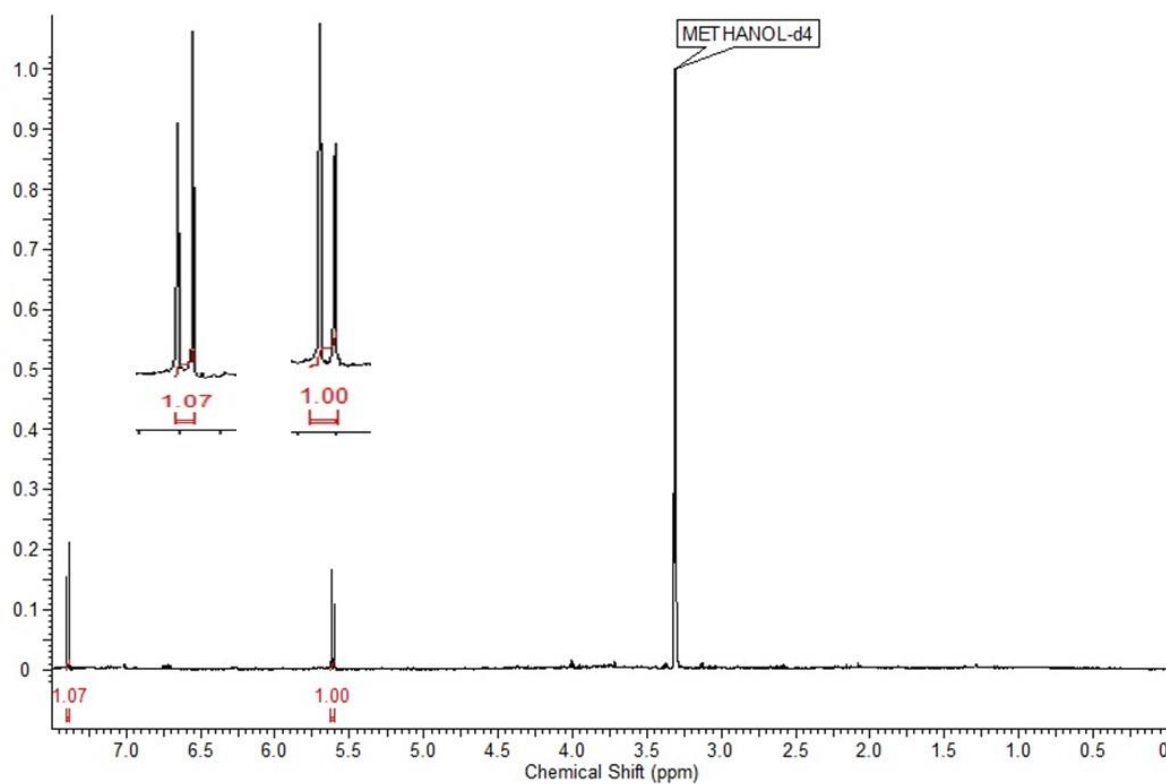


FIGURA 36: Espectro RMN de  $^1\text{H}$  do composto **PN8** (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

#### 4.4.9 – Composto PN9

O composto PN9 foi isolado na forma de pó de coloração amarelada (1,1mg), do fracionamento de FA6. A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e CG-MS sugeriu o composto como sendo o indol-3-carboxaldeído (FIGURA 37).

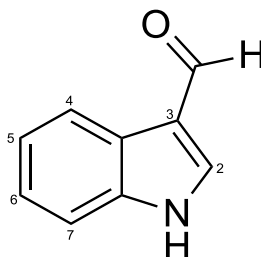


FIGURA 37: Estrutura química do composto indol-3-carboxaldeído (**PN9**).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 38) foi observado um simpleto bastante desblindado em  $\delta_{\text{H}}$  9,90, característico de hidrogênio de grupo aldeído. Também foram observados sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta_{\text{H}}$  8,15 (H4),  $\delta_{\text{H}}$  7,48 (H7), e um multiplete  $\delta_{\text{H}}$  7,22-7,30 integrando para dois hidrogênios, atribuídos a H5 e H6.

No espectro de CG-EM foi possível observar o pico do íon molecular de  $m/z$  145 e também outros picos característicos da molécula, como mostrados na .

Assim, através dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e CG-MS foi possível concluir que o composto PN9 é o indol-3-carboxaldeído.

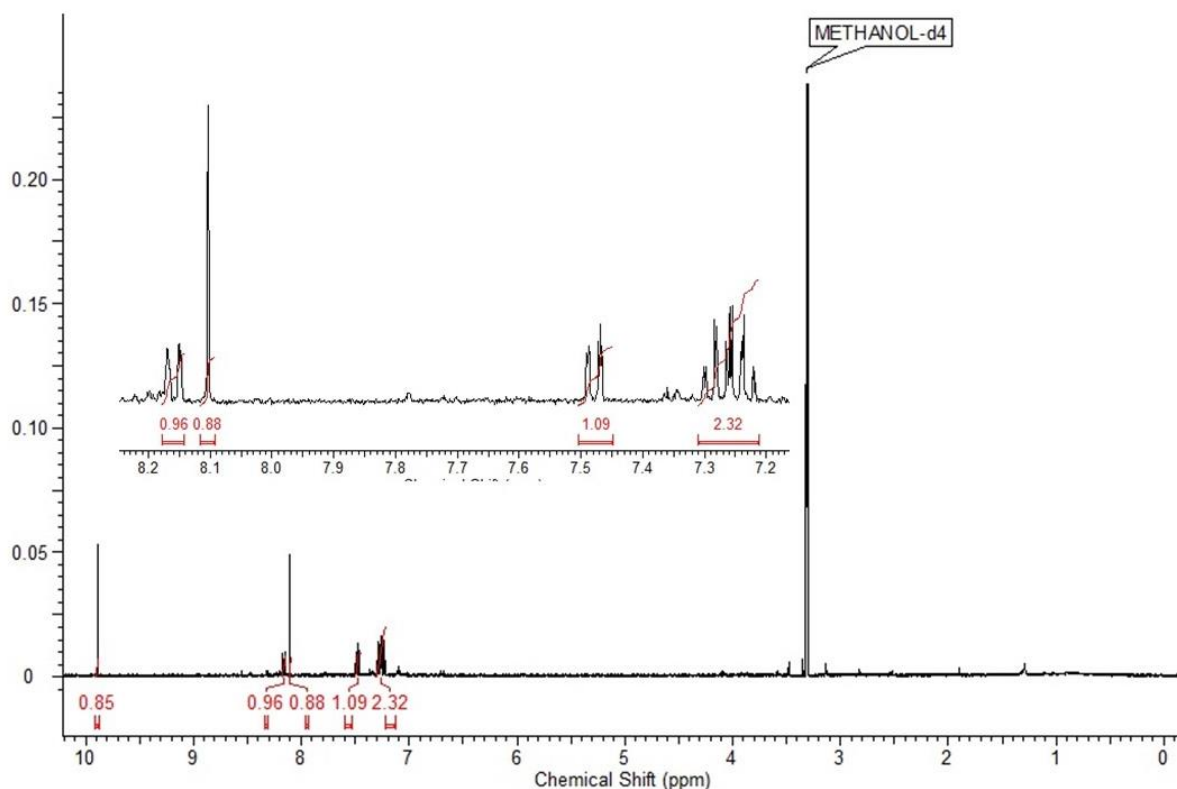


FIGURA 38: Espectro RMN de  $^1\text{H}$  do composto **PN9** (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

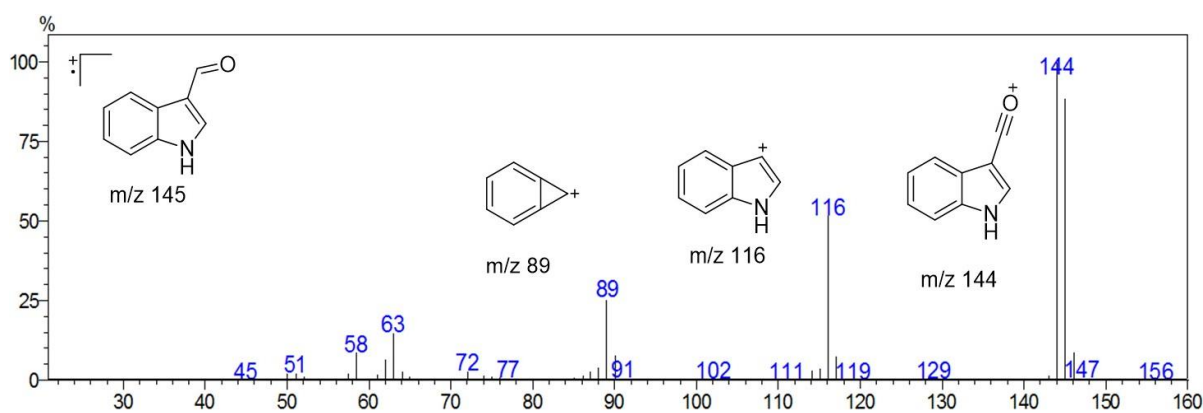


FIGURA 39: Espectro de massas (EI) obtido do composto **PN9**.

## 4.5 – Ensaios Enzimáticos

A procura por inibidores da papaína, neste trabalho, teve como objetivo duas abordagens diferentes. A primeira delas foi a busca por entendimento sobre a interação ecológica entre plantas ricas em proteases e micro-organismos que são capazes de infectá-las, uma vez que estas enzimas participam dos processos de defesas do vegetal, e ainda assim não estão isentas de infecções por patógenos,

como fungos. A segunda abordagem foi o estudo de metabólitos produzidos *F. proliferatum* como possíveis inibidores de catepsinas humanas.

Desta forma o fungo utilizado para este trabalho foi *F. proliferatum*, obtido das partes podres do abacaxi. Os metabólitos isolados foram avaliados quanto a capacidade inibitória da papaína e também frente a duas cisteíno proteases humanas, a catepsina V e a catepsina B.

#### **4.5.1 – Titulação do Sítio Ativo da Papaína**

Para a realização do ensaio de inibição enzimática com a papaína, primeiramente foi necessário a determinação da sua concentração molar. A enzima foi adquirida comercialmente na forma de pó. Para a determinar a concentração molar de enzima utilizada no ensaio de inibição foi preparado uma solução de 5 mg/mL e em seguida feitas diluições necessárias para a observação de sua atividade através da clivagem do substrato fluorogênico.

A descoberta do E-64 como inibidor de cisteíno proteases e o entendimento da estequiometria da reação entre este composto e a enzima possibilitou a titulação do sítio ativo e então a determinação da concentração da enzima (BARRETT et al., 1982).

Para a determinar a concentração da enzima, a atividade enzimática foi verificada na presença de diferentes concentrações de inibidor E-64. Para a titulação do sítio ativo da papaína foi observado o declínio da atividade enzimática com o aumento da concentração do inibidor. Assim foi traçado um gráfico da atividade enzimática versus concentração de E-64 e o valor da concentração da enzima foi obtido através da intercessão no eixo da abscissa. No caso da papaína a concentração molar encontrada para a solução estoque preparada foi de 184  $\mu$ M, e a concentração utilizada em cada ensaio foi de aproximadamente 2 nM.

Assim como foi feito para outras cisteíno proteases que o grupo já trabalha há alguns anos, após a determinação da concentração molar da enzima estabeleceu-se uma correlação entre concentração da enzima com o valor de slope (inclinação da reta) obtido quando feitos os ensaios cinéticos. Desta forma, a concentração molar da enzima utilizada em cada teste foi monitorada pela hidrólise do substrato, ou seja, foi estabelecido um valor ideal de slope para trabalhar. Com isso não é necessária a realização de titulações diárias da enzima.

Para as outras cisteíno proteases (CatV e CatB) utilizadas neste trabalho, a relação da concentração da enzima e a atividade já haviam sido determinadas anteriormente pelo grupo, assim não houve a necessidade da titulação do sítio ativo destas enzimas. A concentração de enzima utilizada em cada ensaio também foi de aproximadamente 2 nM.

#### 4.5.2 – Determinação do valor de $K_m$

O valor experimental de  $K_m$  foi determinado com a finalidade de se estabelecer a concentração de substrato a ser utilizado nos ensaios enzimáticos de inibição. O  $K_m$  refere-se a afinidade da enzima pelo substrato (COPELAND, 2013). Para sua obtenção realizou-se a leitura da atividade enzimática, como descrito anteriormente, utilizando o substrato ZFR-MCA. O valor encontrado foi comparado com o valor descrito na literatura e estes estão mostrados na TABELA 13.

TABELA 13: Valor de  $K_m$  para as enzimas papaína, CatV e CatB com o substrato ZFR-MCA.

Enzima	$K_m$ experimental	$K_m$ literatura
Papaína	80	79 (DAVY et al., 1998)
CatV	7	6,2 (BRÖMME et al., 1999)
CatB	160	157 (ALMEIDA et al., 2001)

A concentração de substrato utilizada nos ensaios deve ser sempre acima do valor do  $K_m$  da enzima. Assim, para os ensaios de inibição enzimáticas as concentrações de ZFR-MCA utilizada foram 90  $\mu$ M para a papaína, 10  $\mu$ M para a catepsina V e 185  $\mu$ M para a catepsina B.

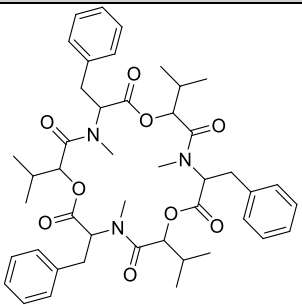
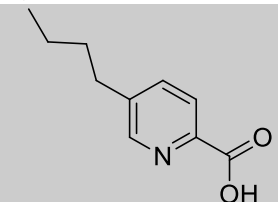
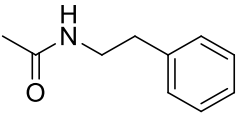
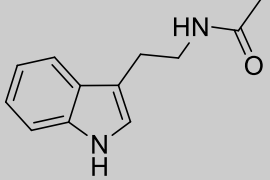
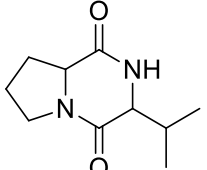
#### 4.5.3 – Avaliação da Atividade de Inibição Enzimática dos Compostos Isolados

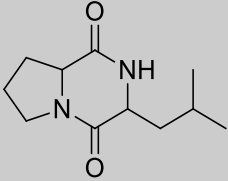
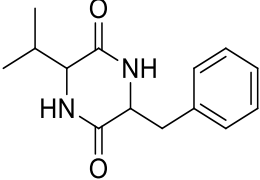
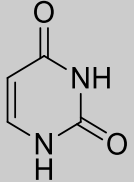
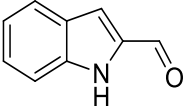
Para verificar a atividade inibitória dos compostos isolados frente às enzimas, foi realizada uma triagem inicial. Para isto os compostos foram avaliados em duas diferentes concentrações para cada uma das enzimas. Para as catepsinas V e B as concentrações utilizadas foram 50 e 10  $\mu$ M. A escolha destas concentrações foi feita

com base em estudos prévios do grupo, onde um grande número de compostos foi avaliado frente a estas enzimas e assim, foi possível ter um parâmetro de comparação entre potências de inibidores. No caso da papaína as concentrações utilizadas na triagem inicial foi de 200 e 50  $\mu\text{M}$ . Como há poucos dados para esta enzima na literatura como alvo na busca por inibidores e não havia conhecimento prévio do grupo sobre potência de compostos testados, optou-se por avaliar os compostos isolados em concentrações mais altas que as utilizadas para catepsinas humanas.

Os valores das porcentagens de inibição para cada enzima estão mostrados na TABELA 14.

TABELA 14: Triagem da atividade inibitória dos compostos isolados de *F. proliferatum* frente as enzimas Papaína, CatV e CatB.

Cód.	Estrutura química	% inibição Papaína		% inibição CatV		% inibição CatB	
		200 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$
PN1		99	79	65	33	73	61
PN2		58	10	0	0	5	0
PN3		89	57	20	0	31	9
PN4		34	18	0	0	0	0
PN5		31	10	14	1	33	25

<b>PN6</b>		96	94	53	12	44	13
<b>PN7</b>		15	3	0	0	31	19
<b>PN8</b>		0	0	0	0	19	12
<b>PN9</b>		6	0	5	0	5	1

Após a triagem da atividade, os inibidores que apresentaram melhores percentuais de inibição (acima de 70%) foram selecionados para a determinação do valor de IC<sub>50</sub>.

Como podemos observar na TABELA 14, o composto **PN1** apresentou atividade inibitória superior a 70% para a papaína e para a CatB. Como a atividade frente a CatV foi próxima a 70%, optou-se por realizar o ensaio de IC<sub>50</sub> deste composto frente as três enzimas. Os resultados são mostrados na TABELA 15.

Além disso, outros dois compostos, PN3 e PN6 apresentaram atividade inibitória frente a papaína e tiveram seus IC<sub>50</sub> calculados. Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para estes compostos são mostrados na TABELA 16. Esses compostos não apresentaram atividade inibitória significativa frente as outras enzimas.

TABELA 15: Valores de IC<sub>50</sub> obtidos para o composto **PN1** frente as diferentes enzimas.

<b>Papaína</b>	<b>Catepsina V</b>	<b>Catepsina B</b>
25,3 ± 1,9 μM	46,0 ± 3,0 μM	6,8 ± 0,7 μM

TABELA 16: Valores de IC<sub>50</sub> obtidos para os compostos **PN3** e **PN6** frente a Papaína.

<b>Composto</b>	<b>IC<sub>50</sub> frente a Papaína</b>
<b>PN3</b>	39,4 ± 2,5 µM
<b>PN6</b>	7,4 ± 0,5 µM

PN1 apresentou atividade moderada frente as três enzimas, sendo a atividade frente a catepsina B a mais potente (menor valor de IC<sub>50</sub>).

Observando a atividade inibitória de compostos produzidos por *F. proliferatum* frente a papaína podemos reforçar a ideia de que um dos meios que pode ser utilizado pelo fungo para conseguir vencer a barreira de proteção da planta e então infecta-la, seja através da produção de substâncias que inibam a atividade das proteases presentes nela.

A atividade destes compostos (PN1, PN3 e PN6) frente a papaína corroboram com a ideia de que fungos que infectam plantas com altos teores de proteases, podem produzir compostos que sejam inibidores destas enzimas. Estes resultados contribuem para o entendimento da interação ecológica entre plantas ricas em proteases e micro-organismos que conseguem infecta-las.

Além disso a beuvericina também apresentou atividade inibitória frente as catepsinas humanas (CatV e CatB).



## **Parte II: Avaliação de Compostos Sintéticos como Inibidores de Catepsina K**

## 5 – Introdução (Parte II)

### 5.1 – Osteoporose

A osteoporose é uma doença esquelética que provoca uma diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo. Ela pode progredir para aumento da fragilidade óssea e suscetibilidade a fraturas, que são as principais causas de mortalidade em idosos (ABDEL-MAGID, 2015). Na FIGURA 40 é mostrada uma ilustração da perda de massa óssea causada pela osteoporose que pode levar a fraturas.



FIGURA 40: Foto ilustrativa da perda de densidade óssea causada pela osteoporose, que leva a maior incidência de fraturas.

Esta doença é provocada por um desequilíbrio no processo de remodelamento ósseo. Este é um processo dinâmico, no qual o tecido maduro é substituído por um novo. Ele consiste em dois estágios distintos chamados de reabsorção e formação, e cada estágio envolve um tipo específico de células. Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea, enquanto a formação é realizada pelos osteoblastos. Estes dois processos ocorrem coletivamente, substituindo cerca de 10% do esqueleto humano a cada ano (BOONEN et al., 2012; DRAKE et al., 2017).

Com o envelhecimento progressivo ou por questões patológicas, o processo de remodelamento ósseo pode se tornar desequilibrado, onde a reabsorção excede a formação óssea, resultando na perda de massa óssea e levando ao desenvolvimento de doenças como a osteoporose (DRAKE et al., 2017).

O aumento do número de idosos propensos a ter osteoporose e os grandes gastos de recursos da saúde associados com fraturas osteoporóticas tornam a busca por desenvolvimento de fármacos um objetivo crucial para a prevenção desta doença (BOONEN et al., 2012).

Esta doença afeta homens e mulheres, embora a perda óssea ocorra em mulheres cerca de 15 anos mais cedo do que em homens, devido a alterações hormonais durante e após a menopausa (BRÖMME & LECAILLE, 2009). Estima-se que metade das mulheres e um terço dos homens irão experimentar uma fratura osteoporótica (ABDEL-MAGID, 2015).

Os medicamentos antirreabsortivos disponíveis atualmente no mercado desaceleram as taxas de renovação óssea que ocorrem com o envelhecimento. Entretanto, estes medicamentos interferem tanto no processo de reabsorção quanto na formação óssea, devido ao acoplamento entre eles (BOONEN et al., 2012).

Uma nova classe de fármacos antirreabsortivos em desenvolvimento mostra que uma forma de diminuir a reabsorção óssea sem diminuir sua formação é através da inibição da catepsina K, que é a principal responsável pela degradação da matriz óssea pelos osteoclastos (BONNET et al., 2017; BOONEN et al., 2012).

## 5.2 – Catepsina K

A catepsina K (CatK) é uma cisteíno protease pertencente à família C1, altamente expressa nos osteoclastos e desempenha um papel central na mediação da reabsorção óssea (STOCH et al., 2013). Os osteoclastos formam hemivacúolos extracelular que ficam em contato com a superfície óssea. A catepsina K, é ativa no pH ácido presente nos hemivacúolos, sendo a principal responsável pela degradação do colágeno tipo I, que compõe cerca de 90% da matriz orgânica óssea. Ela também consegue degradar o colágeno tipo II que é um dos principais componentes orgânicos da cartilagem (LINDSTRÖM et al., 2018).

Em relação a sua estrutura, a catepsina K é uma proteína monomérica, expressa na forma de proenzima com aproximadamente 329 resíduos de aminoácidos. O pró peptídeo, responsável pela inativação da enzima, é composto por 99 aminoácidos; além deste a proteína possui um peptídeo sinal contendo 15 aminoácidos. Após a clivagem da porção pró, obtém-se a enzima madura composta por 215 resíduos de aminoácidos. Assim como na papaína, o sítio catalítico encontra-se entre os domínios L e R. Uma particularidade da catepsina K é sua alta frequência de resíduos de aminoácidos contendo cadeia lateral carregada positivamente (Lys e Arg), do lado oposto ao sítio catalítico (LECAILLE et al., 2008). Em proteínas de *Homo sapiens* é observado uma frequência média de 5,5% de resíduos de lisinas, por

exemplo, enquanto que, a catepsina K possui 8,8% desses resíduos, a mesma tendência é observada para resíduos de arginina. Esses resíduos positivos interagem com os glicosaminoglicanos (GAGs) presentes na matriz extracelular, como condroitina 4-sulfato (C4-S), que são carregados negativamente, por meio de interações eletrostáticas e desempenham papel importante na função fisiológica da catepsina K (Z. LI et al., 2008).

A CatK é expressa em vários tecidos, tais como adiposo (CHIELLINI et al., 2003), epitelial (QUINTANILLA-DIECK et al., 2009), pulmão (BÜHLING et al., 2000), ovário (BRÖMME & OKAMOTO, 1995), tireoide (FRIEDRICHS et al., 2003). No entanto, seu papel fisiológico principal parece ser a reabsorção óssea. Camundongos deficientes em CatK apresentaram problemas na reabsorção óssea e desenvolveram osteopetrose (SAFTING et al., 1998). Além disso também foi observado mutações no gene que codifica a CatK em pacientes com picnodisostose, uma doença esquelética rara caracterizada por baixa estatura (GELB et al., 1996). Evidências genéticas e farmacológicas confirmam o papel fundamental da CatK na reabsorção óssea. Em estudos pré-clínicos, os inibidores desta enzima reduziram os níveis de marcadores bioquímicos da reabsorção óssea e aumentaram a densidade mineral óssea. Estes resultados têm apoiado a utilização da catepsina K como um alvo para novas moléculas para o tratamento de osteoporose (STOCH et al., 2013).

### 5.3 – Modo de Inibição Enzimática

As reações catalisadas por enzimas, de forma geral, começam com a ligação da enzima (E) ao seu substrato (S) formando o complexo enzima-substrato (ES). O complexo ES assim formado passa por um estado de transição e começa a gerar o(s) produto(s) de reação através de uma série de etapas químicas, resultando no complexo enzima-produto (EP), que rapidamente se dissocia liberando a enzima e o produto para o meio reacional (FIGURA 41) (COPELAND, 2013).



FIGURA 41: Equilíbrio cinético de reação enzimática.

A atividade catalítica de uma enzima pode ser alterada através da ação de inibidores, que são compostos químicos que interferem na catálise, reduzindo a velocidade ou interrompendo as reações enzimáticas. Os inibidores enzimáticos podem ser reversíveis e irreversíveis. Os inibidores irreversíveis se ligam a enzima de forma que a atividade enzimática é perdida, causam a inativação enzimática e a enzima não volta a ter sua atividade catalítica original. Já os inibidores reversíveis permitem que a atividade enzimática seja recuperada através da remoção do inibidor (COPELAND, 2013).

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

### **5.3.1 – Inibição competitiva**

Os inibidores competitivos são aqueles que competem pelo sítio catalítico da enzima com o substrato uma vez que eles se ligam exclusivamente à enzima livre. A velocidade da reação da formação de produto (P) é diminuída devido à formação do complexo enzima-inibidor (EI) que resulta na diminuição da formação do complexo enzima-substrato (ES) (FIGURA 42). Em relação às constantes cinéticas e às etapas de catálise, na inibição competitiva o valor de  $V_{máx}$  (que está relacionado com a formação do completo ES) se mantém constante, mas o valor de  $K_m$  aparente (que se relaciona com a formação do complexo EI) aumenta com o acréscimo da concentração do substrato.

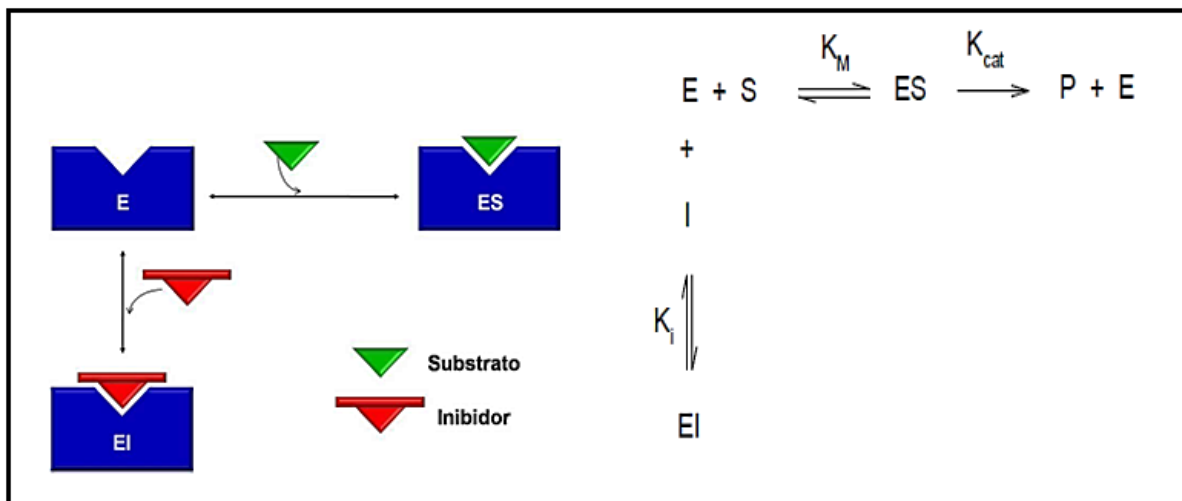


FIGURA 42: Esquema geral do modo de inibição competitiva.

Existem diversos medicamentos em uso para o tratamento de várias doenças que atuam como inibidores enzimáticos competitivos, alguns exemplos são: Acetazolamida, atua inibindo a enzima anidrase carbônica, utilizado para o tratamento de Glaucoma; Viagra atua inibindo a enzima fosfodiesterase, utilizado para o tratamento de disfunção erétil; enalapril atua sobre a enzima conversora de angiotensina, dentre outros (COPELAND, 2013).

### 5.3.2 – Inibição não competitiva

Os inibidores do tipo não competitivo, não se ligam ao sítio catalítico da enzima. Esses inibidores apresentam afinidade tanto pela enzima livre, quanto pelo complexo enzima-substrato. Em ambos os casos, a ligação a um sítio alostérico da enzima induz mudanças conformacionais na sua estrutura, modificando assim a conformação do sítio catalítico impedindo a interação eficaz com o substrato e consequentemente a formação de produto.

Para este tipo de inibição são definidas duas constantes de ligações referentes às afinidades de ligação, uma para o complexo EI ( $K_i$ ) e outra para o complexo ESI ( $\alpha K_i$ ). Assim, quando  $\alpha > 1$ , o inibidor se liga preferencialmente à enzima livre, e quando  $\alpha < 1$ , o inibidor se liga com maior afinidade ao complexo ES. Se  $\alpha = 1$  tem-se que a afinidade do inibidor é a mesma tanto para enzima livre quanto para o complexo ES. Na FIGURA 43 é mostrado um esquema geral de inibição não competitiva e o equilíbrio existente entre as espécies envolvidas.

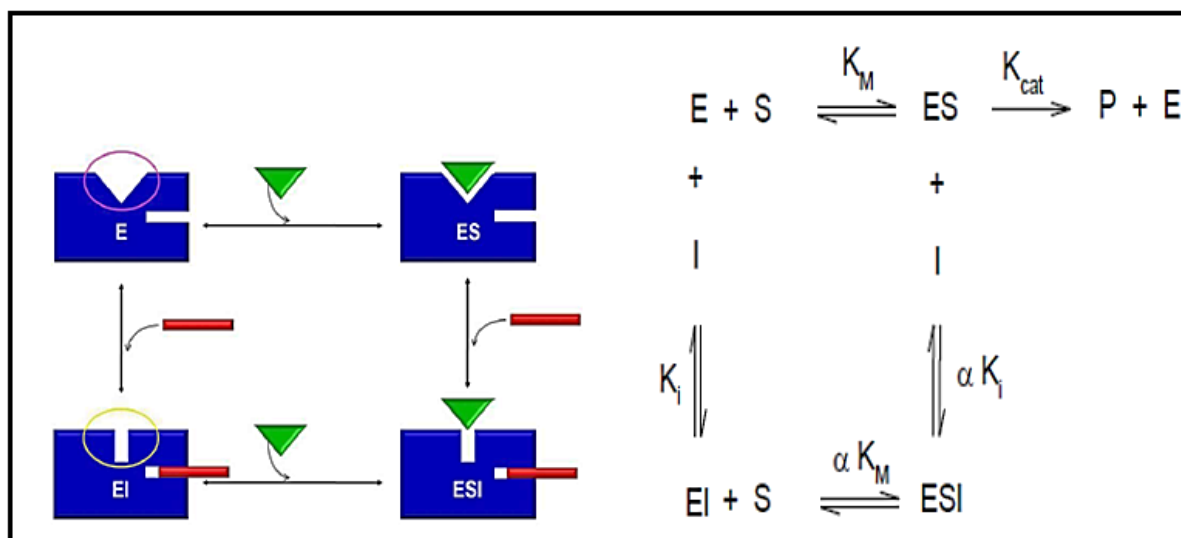


FIGURA 43: Esquema geral do modo de inibição não competitiva.

Existem na literatura diferentes usos do termo inibição não competitiva. Alguns autores reservam esse termo apenas para a situação em que  $\alpha = 1$ , e a afinidade do inibidor para a enzima livre e o complexo ES são, portanto, equivalentes. Alguns autores usam o termo inibição do tipo mista para qualquer situação em que  $\alpha \neq 1$ .

Como exemplo de medicamentos em uso que atuam como inibidores enzimáticos de modo não competitivo podemos citar a Nevirapina, que atua sobre a transcriptase reversa do vírus HIV (COPELAND, 2013).

### 5.3.3 – Inibição incompetitiva

Os inibidores incompetitivos são aqueles que se ligam exclusivamente ao complexo ES, possuem pouca ou nenhuma afinidade pela enzima livre, conforme ilustrado na FIGURA 44. Na inibição incompetitiva, é necessário a formação prévia do complexo ES para que o inibidor se ligue e iniba a atividade enzimática. Assim, neste tipo de inibição ocorre uma diminuição nos valores aparentes de  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$  com o aumento da concentração de inibidor.

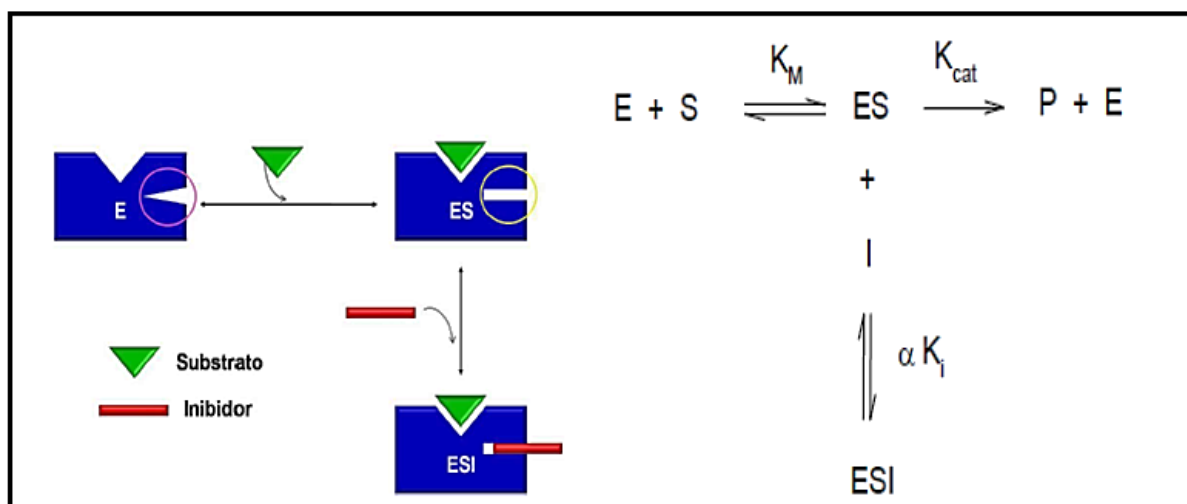


FIGURA 44: Esquema geral do modo de inibição incompetitiva.

A finasterida é um exemplo de medicamento que atua como inibidor enzimático no modo incompetitivo. Ela inibe a enzima 5- $\alpha$ -redutase tipo 2, e é utilizada para o tratamento de neoplasias benignas na próstata e também para o tratamento de calvície em homens (COPELAND, 2013).

#### 5.4 – Inibidores de Cisteíno Proteases Lisossomais

Um dos primeiros compostos estudado como inibidor de cisteíno protease foi o L-*trans*-epoxisuccinil-leucilamido-(4-guanidino)-butano, conhecido como E-64 (FIGURA 45). Este composto, produzido pelo fungo *Aspergillus japonicus*, se liga as cisteíno proteases de forma covalente e irreversível. Ele apresenta uma potente atividade inibitória das cisteíno proteases, no entanto, este inibidor não permite distinguir as várias enzimas desta classe, não sendo seletivo. É comumente utilizado para titulação do sítio ativo de várias destas enzimas e também como controle positivo (inibição enzimática) em ensaios de inibição enzimática (BARRETT et al., 1982). Além das cisteíno proteases lisossomais, o E-64 também possui atividade inibitória para outras cisteíno proteases que não são lisossomais como é o caso das Calpains (MOLDOVEANU et al., 2004).



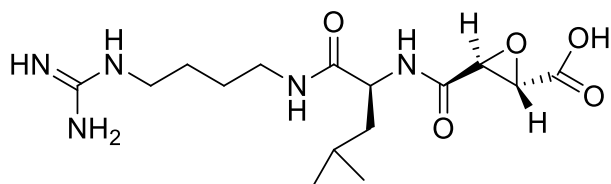


FIGURA 45: Estrutura química do inibidor irreversível de cisteíno protease (E-64).

Nos últimos anos houve um aumento crescente no interesse de indústrias farmacêuticas por inibidores de cisteíno proteases, visto o papel fundamental dessas enzimas no tratamento de diversas patologias. Grandes esforços têm sido realizados no desenvolvimento de inibidores da catepsina K altamente potentes, seletivos e aplicáveis oralmente. Alguns destes inibidores (FIGURA 46) passaram por testes pré-clínicos e clínicos, no entanto, tiveram seus estudos interrompidos. O Relacatib (GSK) e o Balicatib (Novartis), apresentaram baixa seletividade. Relacatib tem uma fraca seletividade sobre as catepsinas B, L, S e V. O Balicatib é seletivo para a catepsina K em ensaios enzimáticos, mas não em ensaios celulares (BOONEN et al., 2012). Recentemente, o Odanacatib (Merck), o inibidor de catepsina K que esteve em estágio mais avançado de estudos, foi retirado do processo de aprovação regulatória. Ele passou por testes de fase clínica com mulheres em período pós menopausa com osteoporose. Enquanto estas avaliações demonstraram reduções significativas nas fraturas em vários locais, o Odanacatib teve seus estudos descontinuados após ter sido associado a um aumento do risco de acidentes vasculares cerebrais (DRAKE et al., 2017). Atualmente o inibidor de catepsina K que está em estágio mais avançado de estudos é o MIV 711 (Medivir), este composto, cuja a estrutura química não foi disponibilizada, encontra-se em fase II de testes clínicos (LINDSTRÖM et al., 2018).

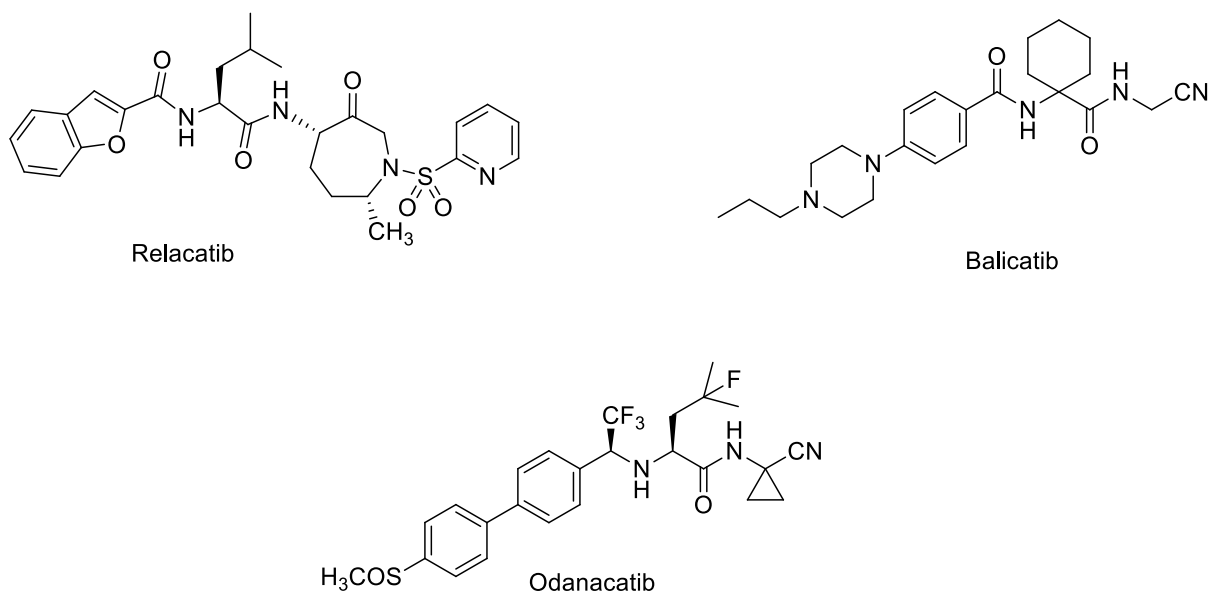


FIGURA 46: Estruturas químicas dos inibidores de catepsina K que passaram por estudos clínicos.

## 5.5 – Exosítio Catepsina K

A catepsina K é considerada um excelente alvo na descoberta de novos medicamentos para o tratamento da osteoporose. Embora a sua atividade de collagenase seja única, a catepsina K também exerce potente atividade elastolítica, que é também observada em outras catepsinas humanas como a catepsina V e a catepsina S. Outros membros da família das cisteína proteases, que são estruturalmente semelhantes, não exibem atividades de degradação de colágeno significativas. Isso levanta a questão da presença de elementos estruturais específicos, como exossítios, que são necessários para essas atividades (AGUDA et al., 2014; SHARMA et al., 2015)

A catepsina K é a principal protease com atividade collagenolítica no osso, o que facilita a degradação óssea tanto fisiológica como patológica. Para a degradação do colágeno por esta protease é necessária a formação de complexos entre enzima e os glicosaminoglicanos (GAG). A ligação da cadeia GAG não interfere na função do sítio ativo da enzima, o complexo ainda apresenta eficiências catalíticas semelhantes à catepsina K monomérica. Na ausência de GAGs, a catepsina K exerce apenas uma atividade de clivagem da gelatina e peptídeos semelhante à de outras catepsinas (AGUDA et al., 2014).

O GAG mais comum associado às fibras de colágeno nos ossos é sulfato de condroitina 4 (C4-S) (CHERNEY et al., 2011). Como a especificidade primária do substrato da catepsina K não é alterada pela formação de complexos, sugere-se que o complexo protease-sulfato de condroitina facilita principalmente a desestabilização e/ou a ligação específica da estrutura do colágeno (Z. LI et al., 2002).

O conhecimento da estrutura do complexo CatK-GAG abriu novas possibilidades na busca por inibidores de catepsina K. Assim, uma nova abordagem para a busca por inibidores da atividade colagenolítica desta enzima seria através do impedimento da formação de complexos CatK-GAG. Alguns compostos já foram testados e apresentaram inibição específica da atividade colagenolítica da catepsina K, como é o caso do compostos *p*-diidrotansinona (DHT) e *o*-diidrotansinona (DHT1) (FIGURA 47) (PANWAR et al., 2016; SHARMA et al., 2015). Experimentos de *docking* realizados sugeriram que estes compostos se liga à exosítio específico na catepsina K, o que é crucial para a formação do complexo colagenoliticamente ativos na presença de GAGs (CHERNEY et al., 2011; SHARMA et al., 2015).

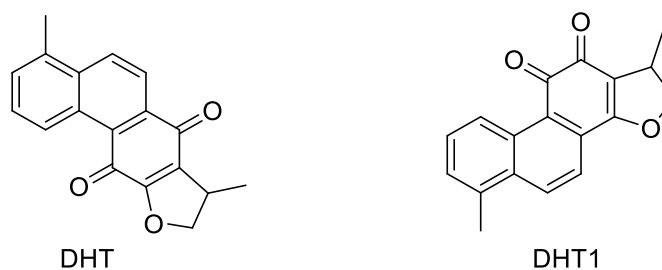


FIGURA 47: Estrutura química dos compostos DHT e DHT1 que apresentaram atividade inibitória frente ao exosítio da CatK.

## 6 – Objetivos

Este trabalho tem como objetivos avaliar compostos sintéticos como possíveis inibidores da catepsina K utilizando duas diferentes abordagens; inibidores do sítio ativo e do exossítio da enzima. Para isto são necessários:

- Realizar a expressão e purificação da enzima recombinante;
- Determinar os parâmetros cinéticos da enzima expressa;
- Realizar a triagem dos compostos para a identificação de possíveis inibidores utilizando as duas metodologias de ensaios propostas;
- Determinar a potência ( $IC_{50}$ ) dos inibidores;
- Determinar o mecanismo de ação dos inibidores mais promissores e suas constantes de afinidade ( $K_i$ );
- Realizar estudos de *docking* dos inibidores mais promissores para entendimento das interações entre eles e a enzima.

## 7 – Materiais e Métodos

Todos os materiais e equipamentos utilizados, bem como os procedimentos experimentais de expressão e purificação da enzima e dos ensaios enzimáticos, neste estudo de busca de inibidores da catepsina K, foram realizados no laboratório do professor Dr. Dieter Brömme na University of British Columbia em Vancouver – Canadá, durante o estágio de doutorado sanduíche.

### 7.1 – Reagentes e Solventes

- Substrato ZFR-MCA (Carbobenzoxi-fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina) – Bachem
- Inibidor E-64 [L-3-carboxi-trans-2,3-epoxipropionil-leucilamido(4-guanino)butano] – Bio Basic Inc
- DTT (ditioeritritol) – Sigma-Aldrich
- Ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) da J.T. Baker
- Acetato de Sódio triidratado da J.T. Baker
- Ácido acético glacial – Fisher Scientific
- Pepsina – Sigma-Aldrich
- Colágeno bovino tipo I – Affymetrix
- Sulfato de condroitina A (C4-S) – Sigma-Aldrich
- Solução 30% acrilamida e bis-acrilamida – Bio-Rad
- Tampão 1,5M Tris (pH 8.8) – Bio-Rad
- Tampão 1,5M Tris (pH6.8) – Bio-Rad
- SDS10%
- Solução de persulfato de amônio10%
- TEMED – Thermo Scientific
- *Protein Ladder* (Escala de proteína) – Page Ruler
- Membrana de Ultrafiltração Amicon – EMD Millipore

### 7.2 – Equipamentos

- Leitor de cubeta: Luminescence Spectrometer LS 50B – Perkin Elmer

### 7.3 – Compostos Avaliados

Os compostos testados neste trabalho são de origem sintética. Foram gentilmente cedidos pelos grupos de síntese de compostos orgânicos do Departamento de Química da UFSCar. As quinolinas-ftalonitrilas foram sintetizadas pelo doutorando Aloísio de Andrade, orientando pelo Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira e os peptidomiméticos (epóxi- $\alpha$ -aciloxicarboxamida e epóxi- $\alpha$ -acilaminocarboxamida) foram sintetizados pela Dra. Deborah Araújo, orientada da Prof. Dra. Arlene Gonçalves Correa.

### 7.4 – Expressão e Purificação da Catepsina K

Para a expressão da catepsina K foi utilizado a linhagem de *Pichia pastori* GS115. Os clones foram incubados em 5 ml de meio BMGY contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 100 mM de fosfato de potássio (pH 6,0), 1,34% YNB, 4x 10-15% de biotina e 1% de glicerol, a 30 °C, até a cultura atingir um OD<sub>600</sub> de 2,0-6,0. As células foram então transferidas para 3 ml de meio BMMY suplementado com 0,5% de metanol a cada 24 horas para induzir a expressão da proteína. O monitoramento da expressão foi feito durante 8 dias e a produção máxima de proteína foi atingida no 4º dia da indução com metanol. Foram retiradas alíquotas para teste da atividade da proteína após a ativação com pepsina. A atividade foi verificada utilizando o substrato ZFR-MCA. Esta parte foi feita pelo grupo do Professor Dieter Brömme, seguindo o protocolo previamente descrito em (BRÖMME & OKAMOTO, 1995; LINNERVERS et al., 1997).

O clone foi inoculado em 5 mL de meio MD, contendo 1,34% YNB 4x 10-15% de biotina, 2% de dextrose e 1,4% de ágar bacteriológico, a 30 °C por 24 horas, seguido de posterior inoculação em 50 mL de meio BMGY por 12 horas. Em seguida as células foram centrifugadas e o *pellet* foi ressuspensão em 500mL de BMGY, para crescimento até obter um OD<sub>600</sub> de 6.0. As células foram transferidas para 1,5 L de meio BMMY com indução de metanol a 0,5% a cada 24 horas. Alíquotas do sobrenadante foram retiradas todos os dias para monitorar a atividade da proteína

após a ativação com pepsina. A atividade foi verificada utilizando o substrato ZFR-MCA. As células foram colhidas no 4º dia de indução. O sobrenadante foi concentrado 50 vezes utilizando membrana de Ultrafiltração Amicon até cerca de 30 mL a 4 °C.

Para purificação da enzima, o pH do sobrenadante concentrado foi reduzido para 4 utilizando ácido acético glacial, e pepsina (concentração final 0,6 mg/mL) foi adicionada para ativação da catepsina K. A mistura foi incubada a 37 °C e monitorada quanto à atividade utilizando o substrato ZFR-MCA em tampão acetato de sódio 100mM (pH 5,5, contendo EDTA 2,5 mM e DTT 2,5 mM). Ao atingir a atividade máxima, o pH foi elevado para 5.5 para parar a ativação com a pepsina e assim evitar a hidrólise da catepsina K pela pepsina. A solução de enzima ativada foi suplementada com sulfato de amônio para uma concentração final de 2M e centrifugada a 15000 rpm por 30 min a 4° C. O sobrenadante resultante foi carregado em uma coluna de *n*-butil Sepharose e lavado completamente com o *high salt buffer* (50nM de acetato de sódio, pH 5,5, 2 M sulfato de amônio, 0,5 mM EDTA e 0,5 mM de DTT). A proteína foi eluída utilizando um gradiente linear com redução da concentração de sulfato de amônio (*Low salt buffer* (50 nM de acetato de sódio, pH 5,5, 0,5 mM EDTA e 0,5 mM de DTT)). A fração contendo a catepsina K foi monitorizada utilizando ZFR-MCA. As frações ativas foram reunidas e concentradas 10 vezes utilizando Ultra Centrifugal Filters Amicon, e o tampão foi mudado para pH 5.5 (tampão acetato de sódio 100 mM, contendo 0,5 mM de EDTA e 0,5 mM de DTT). A enzima purificada final foi armazenada a -80° C para uso posterior.

## 7.5 – Titulação do Sítio Ativo com E-64 e Determinação de $K_m$

Para determinação da concentração molar da catepsina K fez-se uma titulação do sítio ativo da enzima utilizando o inibidor irreversível E-64, conforme descrito em (BARRETT et al., 1982). Para isso foram realizadas medidas da atividade enzimática na presença de diferentes concentrações do inibidor.

Foram preparadas soluções contendo a 9 µL de tampão ativador (0,1 M acetato de sódio, 2,5 mM DTT e 2,5 mM EDTA, pH 5.5), 1 µL de enzima e 10 µL E-64 em diferentes concentrações. As soluções foram incubadas durante 30 minutos em banho de gelo. Após a incubação, fez-se a leitura da atividade enzimática. Adicionaram-se em uma cubeta de quartzo 990 µL de tampão ativador, 5 µL da solução descrita anteriormente e 5 µL de substrato (ZFR-MCA) em seguida fez-se a leitura. Os

resultados foram plotados em um gráfico de atividade enzimática *versus* concentração de inibidor.

Para definir a concentração de substrato utilizada nos ensaios de inibição do sítio ativo da enzima determinou-se primeiramente o valor de  $K_m$  experimental do ZFR-MCA com a catepsina K. Para isso foram utilizadas diferentes concentrações de substrato, até a completa saturação da enzima onde o aumento na concentração de substrato não causasse mudanças significativas na velocidade da reação. A determinação do valor de  $K_m$  foi feita utilizando o programa SigmaPlot 12.0 através do método de regressão não linear.

## **7.6 – Complexo Colagenoliticamente Ativo K/GAG – Determinação da Concentração de C4-S**

Para a realização dos ensaios de degradação de colágeno, foi feito antes um teste para verificar a concentração de C-4S a ser utilizada. Para isto foram verificadas a atividade enzimática de degradação do colágeno em diferentes concentrações de C-4S.

Colágeno bovino tipo I (0,6 mg/mL) foi incubado com 400 nM de catepsina K e diferentes concentrações de C4-S. Foram utilizadas as seguintes concentrações, 0nM, 40 nM, 70 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 1  $\mu$ M e 2  $\mu$ M. Foi adicionado tampão ativador (acetato de sódio, pH 5,5, contendo 2,5 mM DTT e 2,5 mM EDTA) até completar o volume final de 50  $\mu$ L. As reações foram encubadas durante 4 horas a 28 °C. Após este período de incubação, foram adicionados 10  $\mu$ L de *loading buffer* (0,25 nM de tris HCl pH 6.8, 10% SDS, 10%  $\beta$ -mercaptoetanol, 30% glicerol, e corante azul de bromofenol) e colocados a 98 °C por um período de 5 minutos. Em seguida as análises foram realizadas em gel de SDS-PAGE 10%. As bandas que representam o colágeno residual, após coloração com o corante azul de coomassie, foram avaliadas utilizando o programa GeneSnap para determinar a extensão da degradação do colágeno, e assim feita a determinação da concentração de C-4S a ser utilizada.



## 7.7 – Ensaio Enzimáticos

### 7.7.1 – Ensaio Sítio Ativo

O procedimento para a determinação da atividade enzimática da catepsina K é o mesmo descrito anteriormente para as outras cisteíno proteases. No, entanto para este ensaio foi utilizado um fluorímetro leitor de cubeta.

A atividade é determinada com base no aumento da fluorescência em função do tempo de reação, oriunda da hidrólise do substrato ZFR-MCA. Este experimento foi realizado utilizando cubeta de quartzo com volume final de 1000  $\mu$ L e tampão acetato de sódio (pH 5.5). A leitura da fluorescência foi feita em fluorímetro leitor de cubeta com comprimento de onda ajustado para excitação ( $\lambda_{ex}$ ) 380 nm e emissão ( $\lambda_{em}$ ) 460 nm.

Adicionou-se em uma cubeta a enzima com tampão ativador (0,1 M acetato de sódio, 2,5 mM DTT e 2,5 mM EDTA, pH 5,5) e 5  $\mu$ L da solução do inibidor em DMSO a ser testado. O volume de tampão a ser utilizado é ajustado de acordo com o volume da enzima que será adicionado para que esta esteja na concentração de 2 nM, sendo o volume final de 1000  $\mu$ L. Após o período de 5 minutos de incubação da enzima com o inibidor, foi adicionado o substrato ZFR-MCA (10  $\mu$ M) e fez-se a leitura. Como controle negativo utilizou-se DMSO e para controle positivo E-64. A determinação da atividade enzimática foi realizada através do monitoramento contínuo da hidrólise do substrato fluorogênico (ZFR-MCA) pelo período de 5 minutos.

O percentual de inibição foi determinado a partir da atividade enzimática na ausência e na presença do inibidor sendo calculado pela equação:

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

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

### 7.7.2 – Ensaio de Degradação de Colágeno – Exosítio

Para o ensaio de exosítio, a atividade enzimática é avaliada através da degradação do colágeno, observando as bandas características em um gel de eletroforese.

Colágeno bovino tipo I (0,6 mg/mL) foi incubado com 400 nM de catepsina K, 200 nM C4-S e 10  $\mu$ M de inibidor. Foi adicionado tampão ativador (acetato de sódio, pH 5,5, contendo 2,5 mM DTT e 2,5 mM EDTA) até completar o volume final de 50  $\mu$ L. As reações foram incubadas durante 4 horas a 28 °C, e após este período adicionaram-se 5  $\mu$ L de E-64 100  $\mu$ M a cada reação para inibir a atividade enzimática residual. Após a adição do E-64, as misturas reacionais foram mantidas em geladeira a 4 °C durante a noite e as análises realizadas em gel de SDS-PAGE 10%. As bandas que representam o colágeno residual, após coloração com o corante azul de coomassie, foram avaliadas utilizando o programa GeneSnap para determinar a extensão da degradação do colágeno.

## **7.8 – Determinação IC<sub>50</sub> – Ensaio Sítio Ativo**

O valor de IC<sub>50</sub> é definido como concentração de inibidor que provoca uma queda de 50% na atividade da enzima. Este valor é uma convenção criada e utilizada com o objetivo de se comparar a potência entre inibidores.

A determinação do IC<sub>50</sub> foi realizada de maneira direta utilizando o ensaio cinético apresentado com a utilização do substrato fluorogênico. Desta forma, determinaram-se os percentuais de inibição utilizando cerca de oito diferentes concentrações de inibidor, construindo assim, uma curva de concentração versus inibição. Os dados cinéticos foram obtidos e tratados para a determinação do valor de IC<sub>50</sub> através do método de regressão não linear empregando o programa SigmaPlot 12.0.

## **7.9 – Determinação do Mecanismo de Ação dos Inibidores**

Após a determinação dos valores de IC<sub>50</sub>, selecionou-se um inibidor de cada classe de compostos testados que foram submetidos a ensaios cinéticos para a determinação de seus mecanismos de ação e a obtenção do valor de K<sub>i</sub>.

O método experimental deste estudo consiste em medir a velocidade de reação na ausência e em diferentes concentrações de substrato, e também na ausência e em diferentes concentrações de inibidor. A escolha das concentrações de substrato foi realizada com base no valor de K<sub>m</sub> experimental obtido e as concentrações de

inibidores foram escolhidas com base no valor do  $IC_{50}$  do composto a ser testado. Assim, o mecanismo de ação dos inibidores é determinado através do gráfico de duplo-recíproco pelo modo de intersecção das retas no plano de coordenadas cartesianas. Com esses dados também é possível obter o valor de  $K_i$  para cada inibidor.

## 7.10 – Estudo de *Docking*

Nas simulações de *docking* molecular foi utilizado o protocolo RosettaScripts (FLEISHMAN et al., 2011). do *software* Rosetta (versão 3.8) (ALFORD et al., 2017). Inicialmente, a estrutura cristalográfica da catepsina K de *Homo sapiens* (CatK; PDB 1ATK) foi relaxada/refinada utilizando o algoritmo Relax (CONWAY et al., 2013; NIVÓN et al., 2013). Em seguida, para cada inibidor a ser testado, foi gerada uma biblioteca de conformeros a partir do método de amostragem conformacional BCL::Conf (KOTHIWALE et al., 2015), considerando todos os estereoisômeros possíveis e o estado tautomérico do composto em pH fisiológico.

O centro geométrico inicial do ligante, em cada um dos complexos de interação, foi determinado com auxílio do servidor PatchDock (SCHNEIDMAN-DUHOVNY, INBAR et al., 2005). As simulações de *docking* entre a estrutura refinada da CatK e os conformeros possíveis para cada um dos compostos foram então realizadas dentro de uma esfera de 60 Å, a partir do centro geométrico. Foram gerados um total de 1000 modelos para cada complexo de interação utilizando as rotinas descritas por (COMBS et al., 2013).

A seleção do modelo foi feita inicialmente filtrando os 50 modelos de menor energia (Rosetta score). Os principais componentes da função de energia do Rosetta são termos associados com interações de van der Waals, interações eletrostáticas, energia de ligação, ligações de hidrogênio, solvatação e comprimentos e ângulos de ligações (COMBS et al., 2013). O subconjunto de modelos (50 de menor energia) foi agrupado com base em sua similaridade estrutural, dada pelo desvio da raiz média quadrática (RMSD), e aquele com o menor RMSD médio foi escolhido.

## 8 – Resultados e Discussão (Parte II)

A importância da busca por inibidores enzimáticos de catepsina K está baseada nos processos patológicos aos quais esta enzima está envolvida e à dificuldade de se encontrar tratamentos eficazes e específicos para a reabsorção óssea. A descoberta de inibidores desta enzima é também de grande interesse da indústria farmacêutica, como anteriormente apresentado, sendo a catepsina K um alvo validado na procura por tratamento de doenças ósseas, como a osteoporose

Considerando que as possibilidades de se encontrarem novos inibidores para essa enzima pode se sustentar na variedade química, três diferentes classes de compostos que ainda não haviam sido testadas frente a este alvo, foram selecionadas para o desenvolvimento deste estudo. As quinolinas-ftalonitrilas que são compostos inéditos na literatura e foram sintetizadas para serem utilizadas, que também são precursoras de outras moléculas de interesse. Por serem compostos inéditos, não existe nenhum tipo de estudo sobre a atividade inibitória enzimática destes compostos. As epóxi- $\alpha$ -aciloxicarboxamida e as epóxi- $\alpha$ -acilaminocarboxamida (chamados de peptidomiméticos), foram sintetizados com base em estudos preliminares do grupo onde compostos com estruturas químicas similares a estes apresentaram significativa inibição frente a catepsina L (SANTOS et al., 2017).

### 8.1 – Determinação da Concentração da Enzima e do Valor de Km

Após a expressão e purificação da catepsina K foi feita a determinação da concentração da enzima. Através da titulação do seu sítio ativo, utilizando o inibidor de cisteíno protease E-64, é possível determinar essa concentração (BARRETT et al., 1982).

O procedimento realizado para titulação do sítio ativo da catepsina K e a determinação da concentração molar da enzima, foi o mesmo descrito para a papaína. A atividade enzimática foi verificada na presença de diferentes concentrações de inibidor E-64. Para a titulação do sítio ativo da catepsina K foi observado o declínio da atividade enzimática com o aumento da concentração do inibidor. Assim foi traçado um gráfico da atividade enzimática *versus* concentração de E-64 e o valor da concentração da enzima foi obtido através da intercessão da reta com o eixo da

abscissa. A concentração da enzima expressa é mostrada na TABELA 17. Após a expressão e purificação, a enzima foi distribuída em alíquotas de 30  $\mu\text{L}$  e mantida em freezer  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ .

Em trabalhos anteriormente realizados pelo grupo, alguns experimentos permitiram correlacionar a concentração molar da enzima com o valor da inclinação da reta (slope) obtida quando feitos os ensaios cinéticos. Assim, a concentração molar da enzima utilizada em cada teste foi monitorada pela hidrólise do substrato, ou seja, foi estabelecido um valor ideal de slope para trabalhar com a enzima. Desta forma foi estimada a concentração molar da enzima, para não haver a necessidade de titulações diárias.

Para estabelecer a concentração de substrato a ser utilizada nos ensaios de inibição enzimática, primeiramente determinou-se o  $K_m$  experimental da enzima para o substrato ZFR-MCA. O procedimento realizado para sua determinação foi o mesmo descrito na Parte I deste trabalho. O valor encontrado foi comparado com o valor descrito na literatura e estes estão mostrados na TABELA 17, juntamente com a concentração molar da catepsina K expressa.

TABELA 17: Valores da concentração molar e  $K_m$  da catepsina K expressa

Enzima	Concentração molar	$K_m$ experimental	$K_m$ literatura
CatK	8 $\mu\text{M}$	8,38	7,5 (BRÖMME et al., 1996).

## 8.2 – Avaliação da Atividade Inibitória

Realizou-se uma triagem inicial da atividade inibitória dos compostos frente a catepsina K. Através da triagem foi possível identificar os compostos que são capazes de interferir significativamente na atividade catalítica desta enzima.

Primeiramente preparou-se uma solução estoque na concentração de 10 mM dos compostos a serem ensaiados, utilizando-se DMSO como solvente. Assim, os compostos foram testados em três diferentes concentrações 50  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$ . As estruturas químicas dos compostos estão mostradas na FIGURA 48 e os valores das porcentagens de inibição são mostrados na TABELA 18

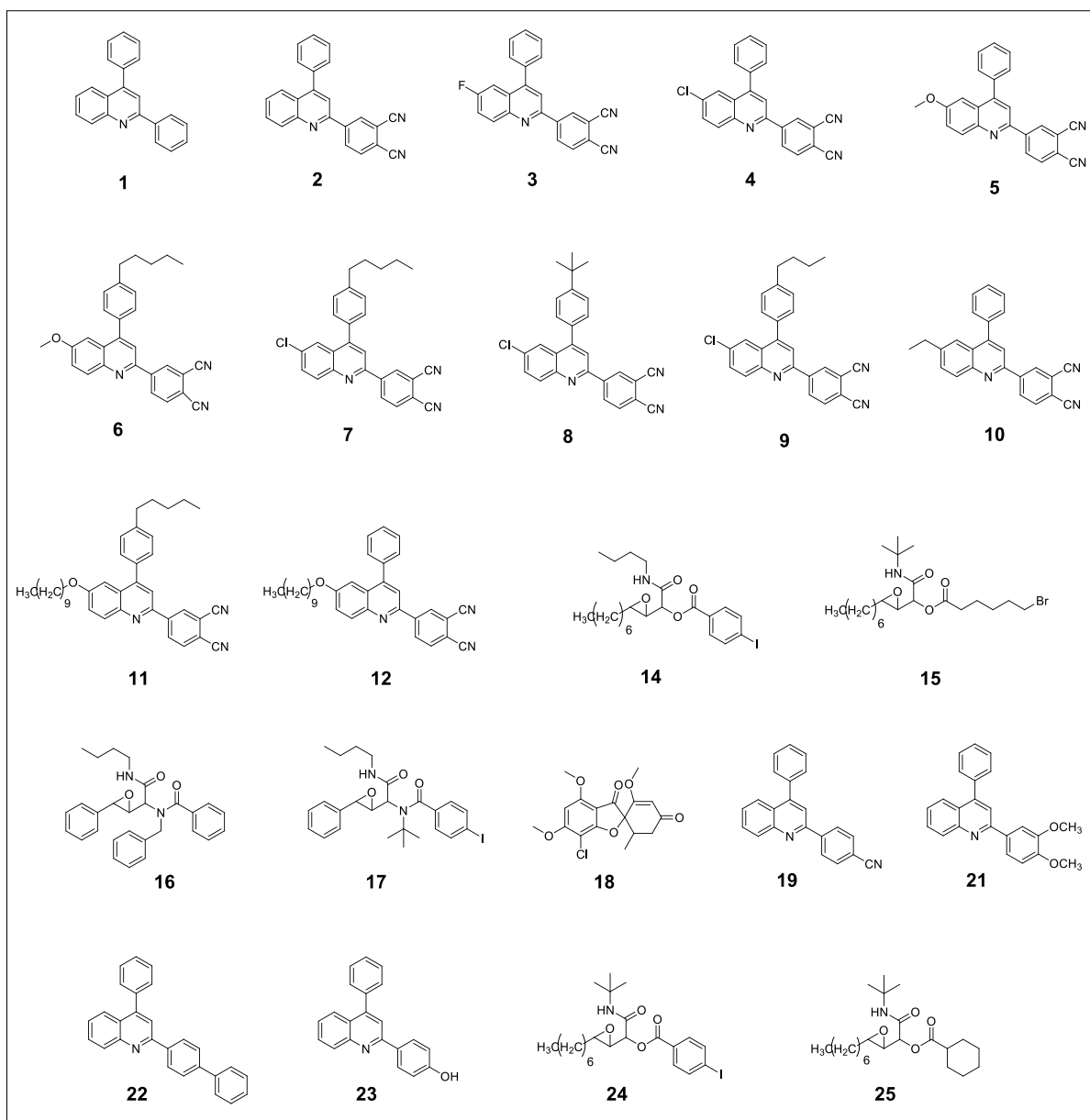


FIGURA 48: Estruturas químicas dos compostos avaliados como possíveis inibidores de catepsina K.

TABELA 18: Porcentagem de inibição dos compostos mostrados na FIGURA 48 frente a CatK em diferentes concentrações.

<b>Composto</b>	<b>% Inibição 50<math>\mu</math>M</b>	<b>% Inibição 10<math>\mu</math>M</b>	<b>% Inibição 1<math>\mu</math>M</b>
1	94	55	14
2	100	77	42
3	100	91	34
4	-	-	-
5	100	97	37
6	100	87	38
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	99	99	32
11	-	-	-
12	-	-	-
14	96	77	25
15	81	66	23
16	90	23	12
17	95	79	12
18	7	5	-
19	90	79	18
21	83	57	24
22	85	67	31
23	82	80	8
24	95	77	25
25	74	47	10

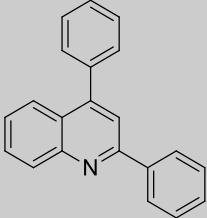
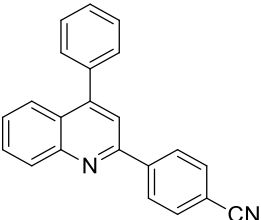
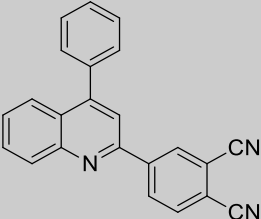
Os compostos 4, 7, 8, 9, 11, e 12 não foram solúveis em DMSO e/ou água, assim não foi possível testá-los. O composto 18 não apresentou inibição significativa da enzima nos ensaios preliminares e, portanto, teve seu estudo descontinuado.

### 8.3 – Determinação da Potência dos Inibidores (IC<sub>50</sub>)

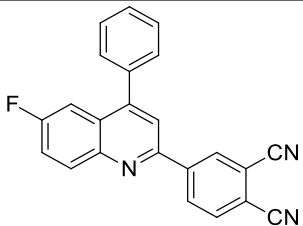
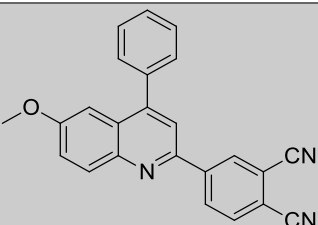
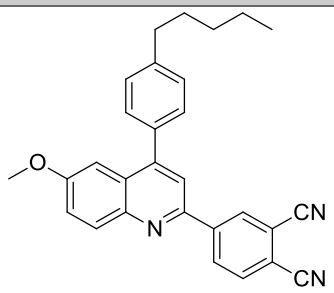
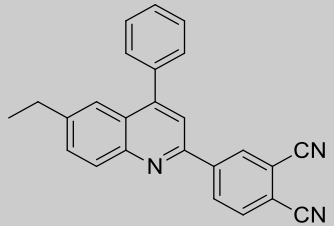
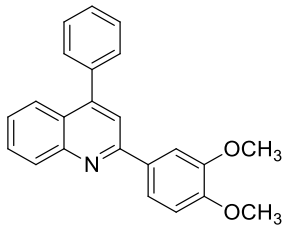
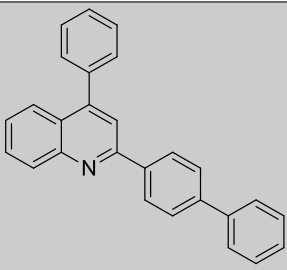
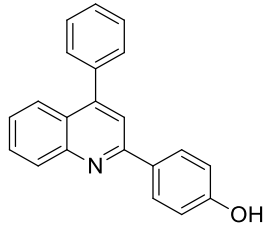
Após os testes iniciais de inibição, os compostos que apresentaram inibição significativa (maiores que 70%) foram selecionados para a determinação do valor de IC<sub>50</sub>. O IC<sub>50</sub> é definido como a concentração de inibidor capaz de reduzir a atividade enzimática em 50%. Através deste estudo é possível determinar a potência dos inibidores testados (COPELAND, 2013).

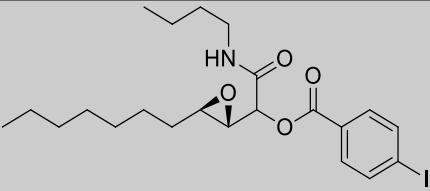
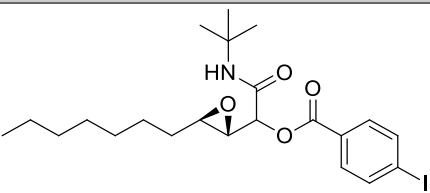
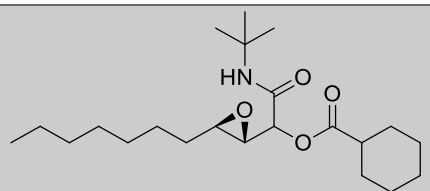
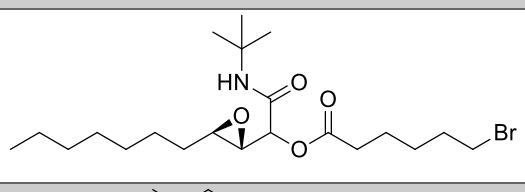
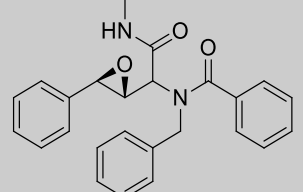
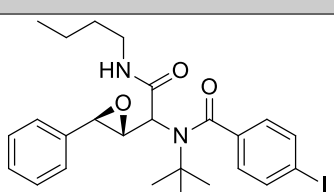
A determinação da potência dos inibidores (IC<sub>50</sub>) foi realizado através do ensaio cinético de fluorescência, utilizando o substrato fluorogênico ZFR-MCA, conforme a metodologia apresentada anteriormente. A atividade enzimática foi avaliada em diferentes concentrações de inibidores e em seguida, construiu-se um gráfico de concentração de inibidor *versus* porcentagem de inibição, utilizando pelo menos oito pontos, explorando valores de inibição entre 15 e 90%, para maior confiabilidade dos resultados. Os dados cinéticos obtidos foram tratados pelo método de regressão não linear, através de uma curva sigmoide, utilizando o programa SigmaPlot 12.0. Os valores de IC<sub>50</sub> dos compostos são apresentados na TABELA 19.

TABELA 19: Valores de IC<sub>50</sub> dos compostos testados frente ao sitio ativo da CatK.

Composto	Estrutura Química	IC <sub>50</sub> (μM)
1		IC <sub>50</sub> = 7,29 ± 0,73 R= 0,99
19		IC <sub>50</sub> = 3,91 ± 0.20 R= 0,99
2		IC <sub>50</sub> = 1,55 ± 0,26 R= 0,98



3		$IC_{50} = 1,42 \pm 0,10$ $R = 0,99$
5		$IC_{50} = 1,41 \pm 0,06$ $R = 0,99$
6		$IC_{50} = 1,50 \pm 0,12$ $R = 0,99$
10		$IC_{50} = 2,12 \pm 0,04$ $R = 0,99$
21		$IC_{50} = 6,71 \pm 0,69$ $R = 0,99$
22		$IC_{50} = 1,61 \pm 0,15$ $R = 0,99$
23		$IC_{50} = 6,54 \pm 0,22$ $R = 0,99$

14		$IC_{50} = 3,35 \pm 0,28$ $R = 0,99$
24		$IC_{50} = 2,21 \pm 0,77$ $R = 0,99$
25		$IC_{50} = 7,60 \pm 0,18$ $R = 0,99$
15		$IC_{50} = 3,81 \pm 0,81$ $R = 0,97$
16		$IC_{50} = 18,45 \pm 1,34$ $R = 0,99$
17		$IC_{50} = 6,44 \pm 0,54$ $R = 0,99$

Na TABELA 19 são mostrados os valores de  $IC_{50}$  obtidos para as três classes diferentes de compostos avaliados. As quinolinas-ftalonitrilas compostos 1, 2, 3, 5, 6, 10, 19, 21, 22 e 23; os epóxi- $\alpha$ -aciloxicarboxamida, compostos 14, 15, 24, 25; e os epóxi- $\alpha$ -acilaminocarboxamida, compostos 16 e 17. A sequência dos compostos na tabela foi feita de acordo com a estrutura química dos mesmos, desta forma é possível avaliar as diferenças estruturais entre os compostos pertencentes a mesma classe..

De forma geral, os compostos apresentaram atividades moderadas com baixos valores de  $IC_{50}$  frente a catepsina K.

Para a discussão da atividade dos compostos em relação às suas estruturas químicas, serão utilizadas as numerações conforme mostradas na FIGURA 49.

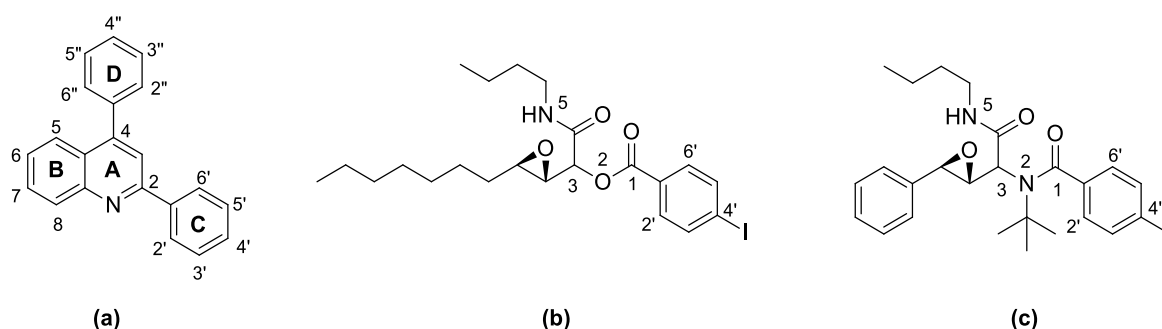


FIGURA 49: Numeração atribuída às estruturas químicas, sendo (a) para quinolinas-ftalonitrilas; (b) para epóxi- $\alpha$ -aciloxicarboxamida; e (c) para epóxi- $\alpha$ -acilaminocarboxamida.

Começando pelos compostos 16 e 17, as epóxi- $\alpha$ -acilaminocarboxamida, é possível observar uma mudança significativa no valor de  $IC_{50}$  passando do 16 para o 17. Existem duas diferenças estruturais entre esses dois compostos que podem estar relacionada a essa mudança na atividade, sendo elas a inserção de um átomo de iodo na posição 4' do anel aromático e a mudança do grupo substituinte no nitrogênio da posição 2. Para melhor entendimento das interações dos compostos e a enzima, e assim compreender a relação dos grupos substituintes da molécula e a atividade inibitória dos compostos, foram feitos estudos de modelagem molecular que serão apresentados e discutidos no item 8.6.

Para os compostos 14, 24, 25, 15, as epóxi- $\alpha$ -aciloxicarboxamida, podemos observar a influência do anel aromático contendo um átomo de iodo. Quando analisamos os compostos 14 e 24, onde a mudança está no grupo ligado ao átomo de nitrogênio da posição 5, não é possível observar grandes mudanças no valor do  $IC_{50}$ . No entanto, quando se substitui o grupo ligado a carbonila do éster (posição 1), ocorre um aumento no valor de  $IC_{50}$ , o que mostra a importância do anel aromático contendo o átomo de iodo, na inibição da atividade enzimática.

Para as quinolinas-ftalonitrilas, é possível observar a importância dos grupos CN nas posições 4' e 5' para a atividade inibitória. Passando do composto 1 para o composto 19 houve uma queda quase pela metade no valor do  $IC_{50}$ , pela inserção de um grupo CN na posição 4'. Avaliando a estrutura do composto 2, é possível observar que o valor de  $IC_{50}$  diminuiu significativamente quando são inseridos grupos CN nas posições 4' e 5'. Isto demonstra a importância destes grupos na inibição da atividade

enzimática. Quando novos substituintes são inseridos nas posições 6 e 4", não se observam grandes mudanças nos valores de IC<sub>50</sub>. Isto sugere que estas posições na molécula não interferem no mecanismo de inibição da enzima. Já mudando o substituinte das posições 4' e 5', como é o caso dos compostos 21 e 23 observa-se o aumento no valor de IC<sub>50</sub>. O que confirma a importância dos grupos CN para a atividade inibitória destes compostos

Estudos de modelagem molecular foram realizados para o melhor entendimento das interações existentes entre os inibidores e a proteína e estes estão mostrados no item 8.6.

## **8.4 – Ensaio de Degradação de Colágeno.**

A busca por inibidores de exosítio da catepsina K é uma nova abordagem utilizada para reduzir a excessiva atividade proteolítica desta enzima frente ao colágeno. Este estudo leva em consideração a formação do complexo entre a enzima com glicosaminoglicanos (CatK-GaG) que favorece alta atividade colagenolítica. Neste sentido, esta elevada atividade colagenolítica da catepsina K pode ser bloqueada pela inibição da formação deste complexo.

Antes de seguir com os estudos de inibição do sítio ativo da catepsina K, os inibidores também foram avaliados no ensaio de degradação de colágeno, para verificar se estes poderiam ser também inibidores desta enzima via exosítio.

### **8.4.1 – Complexo Colagenoliticamente Ativo CatK/GAG**

A atividade colagenolítica da catepsina K requer a assistência de GAGs, como C4-S para formar complexos, como mostrado em estudos anteriores (LI et al., 2002; SHARMA et al., 2015). Sem GAGs, a catepsina K é incapaz de clivar a fibra de colágeno (FIGURA 50a) devido ao insuficiente espaço ativo da fenda (5Å) para acomodar uma molécula de colágeno três vezes maior (15Å). Os ensaios de degradação de colágeno realizados utilizando uma quantidade fixa de catepsina K (400nM) revelaram que apenas uma pequena faixa de concentrações de GAG permitiu a quebra eficiente do colágeno solúvel (FIGURA 50b). No caso do C4-S esta janela de concentração varia de algo entorno de 100-400 nM. Dentre as opções a

concentração de 200 nM de C4-S foi a mais eficiente e esta foi a concentração escolhida.

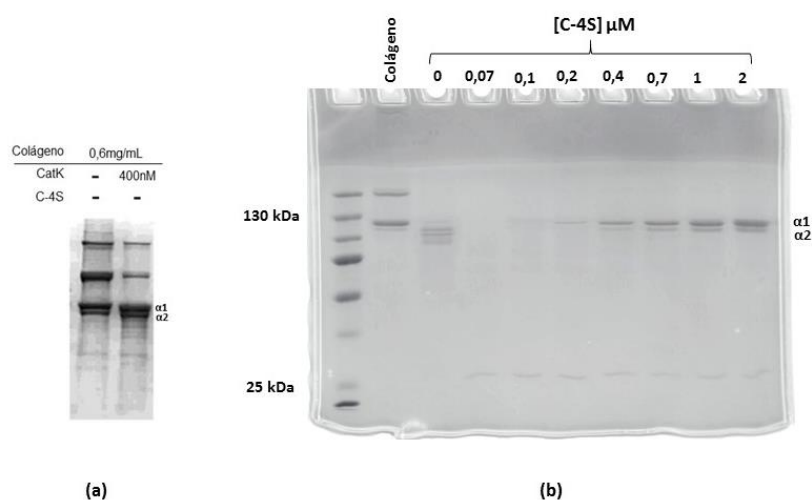


FIGURA 50: Avaliação da degradação do colágeno pela catK sem GAG (a) (SHARMA et al., 2015). Avaliação de diferentes concentrações de C4-S na degradação do colágeno pela catK (b).

#### 8.4.2 – Avaliação dos Compostos como Inibidores de Exosítio

Após a determinação da concentração de C4-S a ser utilizada no ensaio de degradação de colágeno, passou-se à avaliação dos compostos.

Com conhecimento da atividade inibitória dos compostos testados frente ao sítio ativo da catepsina K, é preciso levar em consideração esta atividade na avaliação destes compostos no ensaio de degradação de colágeno.

A concentração de enzima utilizada em cada ensaio é diferente, sendo assim é necessário considerar a relação entre a concentração de enzima utilizada no ensaio de sítio ativo e concentração de inibidor utilizada neste ensaio ( $IC_{50}$ ), para que não haja resultados falsos positivos, uma vez que inibindo o sítio ativo de uma enzima, toda e qualquer atividade catalítica da mesma é inibida. Desta forma, para avaliar a possibilidade dos inibidores do sítio ativo da catepsina K, serem também inibidores desta enzima via exosítio, estes foram testados em concentração abaixo da que apresentou atividade inibitória do sítio ativo da catepsina K.

Os compostos testados frente ao sítio ativo da catepsina K apresentaram atividade inibitória com valor de  $IC_{50}$  em torno de 2  $\mu$ M, em sua grande maioria, como mostrado na TABELA 19, sendo a concentração de enzima utilizada neste ensaio de

2 nM. No ensaio de degradação de colágeno (exosítio) a concentração de enzima utilizada é 400 nM. Desta forma, se os compostos fossem testados em concentrações correspondentes a cada ensaio, a inibição da degradação do colágeno seria observada. No entanto, esta inibição não seria via exosítio, uma vez que já sabemos que os inibidores testados inibem o sítio ativo da enzima. Tendo este conhecimento, optou-se por ensaiar os compostos no exosítio da catepsina K a concentração de 10 $\mu$ M, sendo esta uma concentração muito abaixo do valor da inibição do sítio ativo da enzima. Os resultados deste ensaio são mostrados na FIGURA 51.

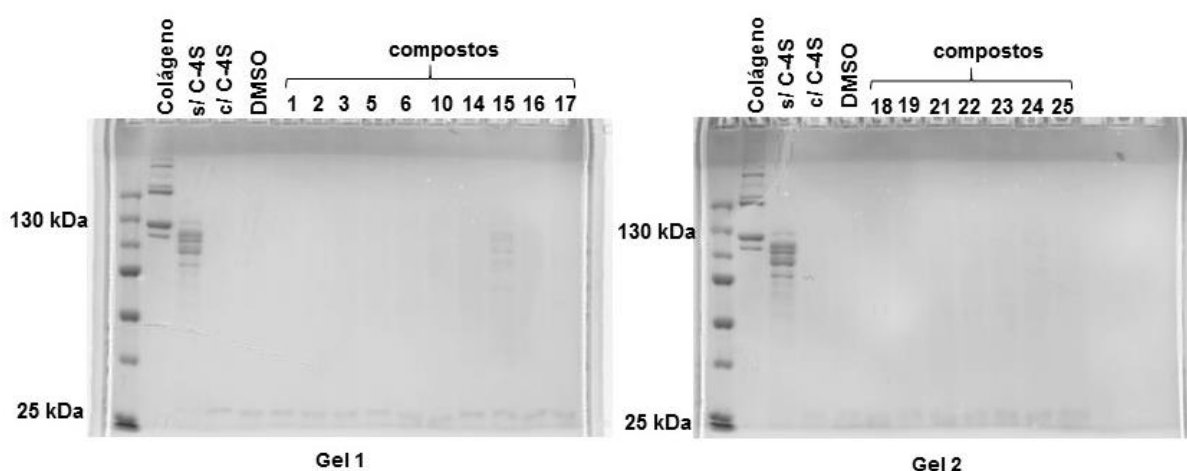


FIGURA 51: Compostos testados em ensaio de degradação de colágeno pela CatK em gel de eletroforese.

Na FIGURA 51 são mostrados os dois géis onde foram testados os compostos no ensaio de degradação de colágeno. A metodologia utilizada foi a descrita anteriormente, sendo o conteúdo de cada poço: 1 – escala de proteína (padrão de massa molecular); 2 - controle de colágeno (sem CatK); 3 – controle da degradação do colágeno pela CatK sem C-4-S; 4 – controle da degradação do colágeno na presença de C-4S; 5 – controle do solvente que foi utilizado para solubilizar os inibidores (DMSO), nos demais poços são os compostos que foram testados como possíveis inibidores.

A avaliação da atividade enzimática é feita através da degradação da fibra de colágeno, observando as bandas características no gel de eletroforese. Como pode ser observado, na ausência do C-4S (poço 3) a catepsina não é capaz de degradar o colágeno de forma eficiente, sendo possível observar as bandas referentes ao colágeno residual. Na presença de C-4S, com a formação do complexo CatK-C4S

(poço 4), ocorre a completa degradação do colágeno pela enzima, não sendo possível observar nenhuma banda residual.

Desta forma, podemos concluir da FIGURA 51, que os compostos testados não apresentaram atividade inibitória da catepsina K no ensaio de degradação de colágeno, uma vez que na ausência de inibição a enzima é capaz de degradar totalmente o colágeno existente, não sendo assim a possível visualização de suas bandas características.

## 8.5 – Determinação do Mecanismo de Ação dos Inibidores e do valor de $K_i$

Os experimentos para determinação do mecanismo de ação dos inibidores foram realizados de acordo com os procedimentos descritos anteriormente, utilizando o método do gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk e também os gráficos de Dixon. Os dados obtidos foram tratados no programa SigmaPlot 12.0 e no GraphPad Prism 5.

Para a realização deste experimento selecionou-se um composto de cada classe dentre os compostos testados. Os compostos selecionados foram 2, 14 e 17.

O composto 2 apresentou inibição do tipo incompetitiva, ou seja, se liga exclusivamente ao complexo enzima-substrato. Para este tipo de inibição, os gráficos plotados se apresentam com retas paralelas entre si (FIGURA 52).

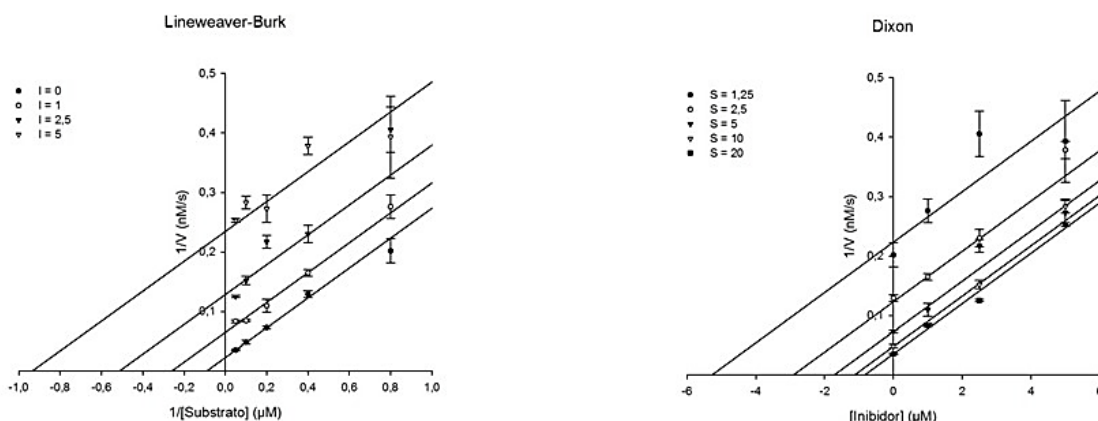


FIGURA 52: Gráfico de Lineweaver-Burk e gráfico de Dixon para o composto 2 como modo de inibição incompetitivo.

Para os compostos 14 e 17 foram observadas inibições do tipo mista. A inibição mista é observada quando o inibidor possui mecanismo de ação que pode se assemelhar a mais de um modo. Em alguns casos, o composto possui uma afinidade desigual pela enzima livre e/ou pelo complexo enzima-substrato, não podendo assim, ser considerado um inibidor do tipo não competitivo ou do tipo incompetitivo.

Os gráficos de Lineweaver-Burk e Dixon foram plotados para o composto 17, apresentando inibição do tipo mista, como citado anteriormente (FIGURA 53).

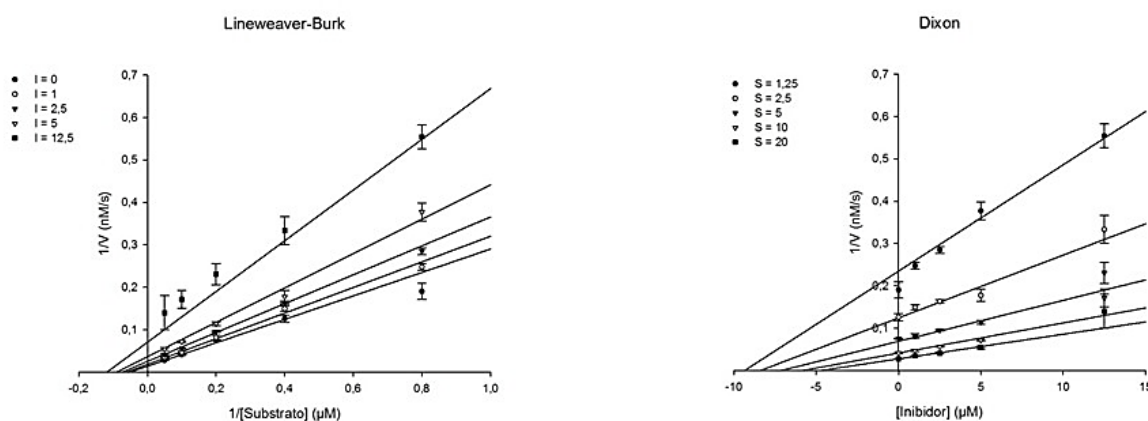


FIGURA 53: Gráfico de Lineweaver-Burk e gráfico de Dixon para o composto 17 como modo de inibição mista.

Para o composto 14 também foram realizados os mesmos experimentos anteriores, no entanto ao plotar os gráficos de Lineweaver-Burk e Dixon através do programa SigmaPlot 12.0, as retas não se ajustaram de forma que pudessem ser entendidas. Sendo assim, optou-se pelo uso de outro software para tratamento de dados de cinética enzimática deste composto, o GraphPad Prism 5. Os dados para o composto 14 foram tratados através do gráfico de Michaelis-Menten, onde foi possível observar, através das características das curvas obtidas, que este composto também atua sob o modo de inibição mista (FIGURA 54).



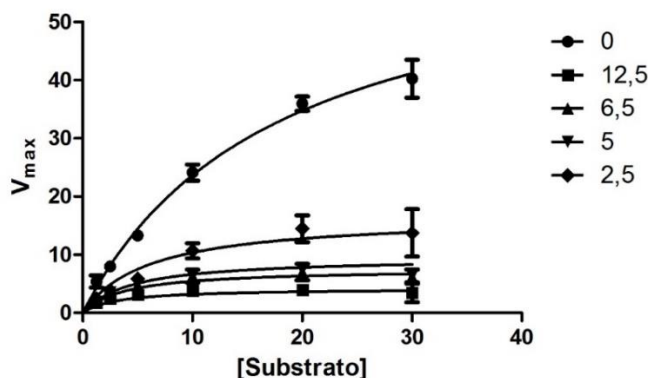


FIGURA 54: Gráfico de Michaelis-Menten para o composto 14 como modo de inibição mista.

Uma análise do valor de  $\alpha$  dos dados obtidos para um modo de inibição mista permite inferir com qual modelo o inibidor mais se assemelha. Seu valor determina o grau em que a ligação do inibidor altera a afinidade da enzima pelo substrato e pode ser calculado de acordo com a fórmula mostrada na FIGURA 55. Assim, quando  $\alpha > 1$  temos que a ligação do inibidor impede a ligação do substrato e o modelo misto se assemelha à inibição competitiva; quando  $\alpha = 1$ , temos que o inibidor não altera a ligação do substrato à enzima e o modelo misto se assemelha à inibição não competitiva; e quando temos  $\alpha < 1$ , temos que o inibidor tem maior preferência por se ligar ao complexo enzima-substrato, e o modelo misto se assemelha à inibição incompetitiva (COPELAND, 2013).

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

FIGURA 55: Fórmula matemática para a obtenção do valor de  $\alpha$  no modo de inibição mista.

Para ambos os compostos 14 e 17 temos que o modo de inibição mista possui maior semelhança com a inibição incompetitivo. Os valores de  $\alpha$  são mostrados na TABELA 20.

TABELA 20: Valores de  $\alpha$  obtidos para os compostos 14 e 17, mostrando maior semelhança ao modo de inibição incompetitivo.

Composto	$\alpha$	Modo de inibição
14	0,12	incompetitivo
17	0,24	incompetitivo

A determinação da afinidade do inibidor pela enzima é de grande interesse no processo de busca por novas moléculas quem possam ser candidatos a fármacos. Esta afinidade é definida pelo valor de  $K_i$  e pode ser determinada através de dados cinéticos obtidos em experimentos específicos para determinação do mecanismo de ação dos inibidores. Os valores de  $K_i$  para os compostos 2, 14 e 17 foram obtidos através do tratamento de dados dos ensaios para verificar o modo de ação dos inibidores utilizando os programas SigmaPlot 12.0 e GraphPad Prism 5 e são mostrados na TABELA 21.

TABELA 21: Determinação do valor de  $K_i$  frente a CatK.

Composto	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )
2	0,5
14	7,08
17	11,96

Os dados obtidos mostraram que os compostos possuem afinidade moderada para catepsina K, sendo o composto 2 o de maior afinidade (menor valor de  $K_i$ ) e assim, podem ser utilizados como modelos para o a busca e desenvolvimento de inibidores desta enzima.

## 8.6 – Modelagem molecular do complexo CatK/inibidores

Os compostos selecionados para realização do *docking* molecular foram os mesmos utilizados nos estudos do mecanismo de ação. Através dos estudos por modelagem molecular, é possível observar a região de interação do inibidor com a enzima. No caso dos inibidores testados (compostos 2, 14 e 17) todos eles interagem no mesmo sítio de ligação da enzima, mudando apenas a conformação de cada inibidor no sítio. De acordo com os estudos, a região de interação dos inibidores

testados é um dos sítios alostérico da enzima, eles não se ligam ao sítio ativo da enzima e nem aos exosítios apresentados em (SHARMA et al., 2015). Esses resultados estão de acordo com os dados experimentais obtidos nos estudos de mecanismo de ação, onde os inibidores avaliados se apresentaram como inibidores incompetitivos, ou seja, não competem com o substrato pelo sítio ativo da enzima e também com os resultados obtidos nos ensaios de degradação de colágeno (exosítio), onde os compostos avaliados não apresentaram atividade, ou seja, não se ligam aos exosítios da enzima.

Na FIGURA 56 é mostrada a estrutura tridimensional da catepsina K e os locais onde estão situados os exosítios, o sítio ativo da enzima e também a região onde os inibidores avaliados se ligaram.

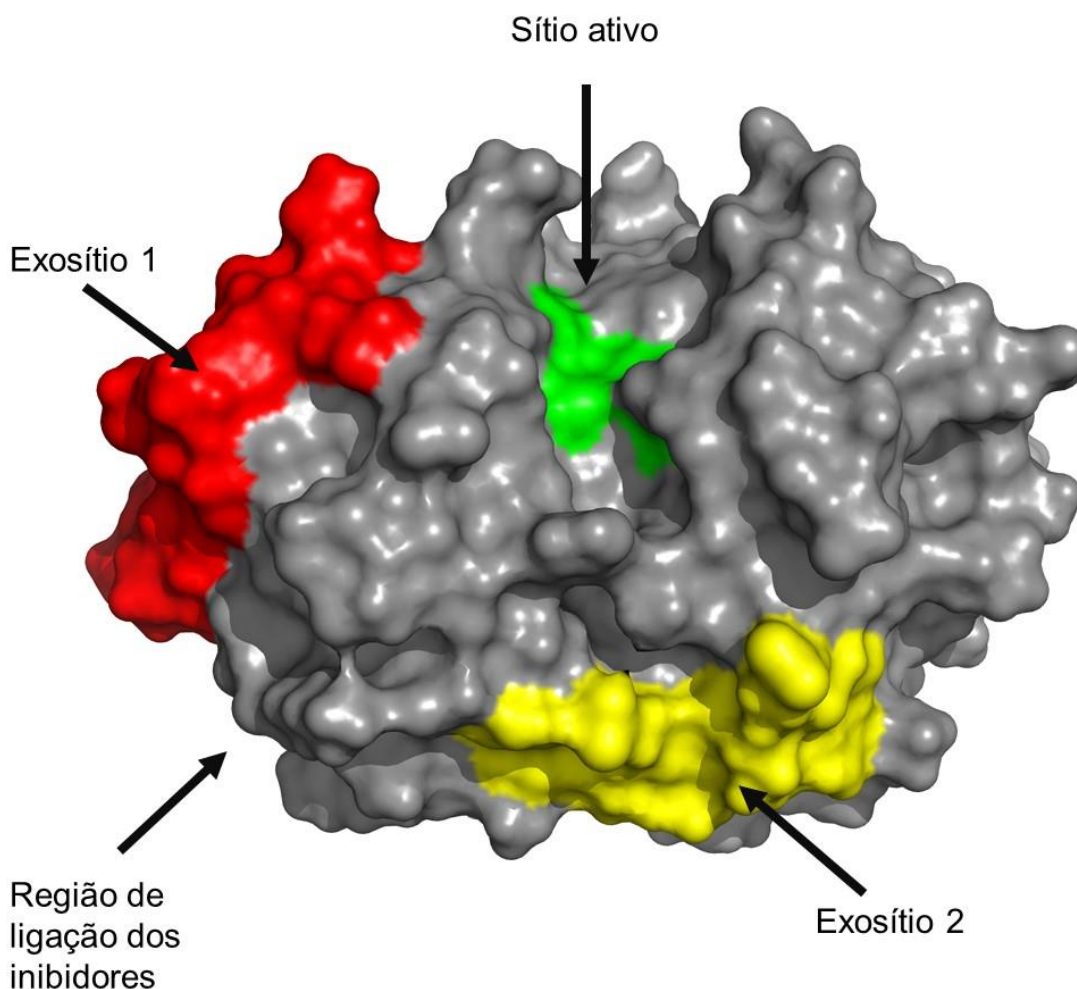


FIGURA 56: Estrutura de superfície da CatK obtidas do PDB1ATK. Destacado as regiões onde estão localizados os exosítios 1 e 2 (vermelho e amarelo), o sítio ativo da enzima (verde) e a local de ligação dos inibidores avaliados.

No estudo de *docking* molecular, foram gerados 1000 modelos estruturais para cada complexo CatK/inibidor, utilizando o programa Rosetta 3.8 (ALFORD et al., 2017), mais especificadamente o protocolo de modelagem RosettaScripts (FLEISHMAN et al., 2011). O modelo tridimensional para o complexo foi escolhido a partir de sua energia associada e da similaridade estrutural com os demais modelos amostrados, conforme descrito anteriormente. A cada um dos modelos é associado um *score* baseado em uma função de energia potencial do Rosetta que inclui termos associados com interações de van der Waals, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, solvatação, comprimentos e ângulos de ligações e energia de ligação. Os 50 modelos de menor energia/*score* foram selecionados para uma posterior etapa de filtragem.

Dessa forma, para o composto 2, o modelo selecionado é o mostrado na FIGURA 57.

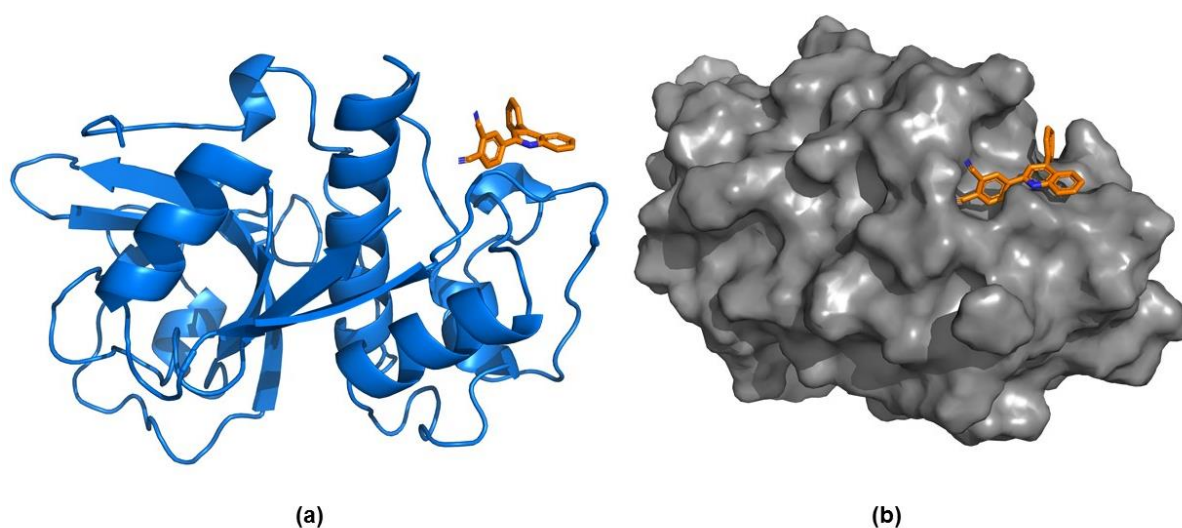


FIGURA 57: Modelo de ligação proposto para o complexo CatK/composto 2. Representação da estrutura tridimensional em *cartoon* (a) e por superfície (b).

Através dos estudos realizados é possível observar as interações existentes entre os grupos CN do inibidor com a enzima. Como mostrado na FIGURA 58 o resíduo de Lys41 está projetado entre os dois grupos CN existentes na molécula do inibidor a uma distância de aproximadamente 2,4 Å. Assim, pode ocorrer a formação de uma ligação de hidrogênio a partir do grupo amino terminal do resíduo de Lys41 e os grupos CN do inibidor. De maneira similar a Arg108 também interage com um dos grupos CN através de ligação de hidrogênio a uma distância euclidiana de 2,9 Å. Além

das interações com os grupos CN, também foi possível observar que a Lys103 está posicionada de maneira que possa ocorrer uma ligação de hidrogênio entre seu grupo amino terminal e o nitrogênio piridínico no anel B.

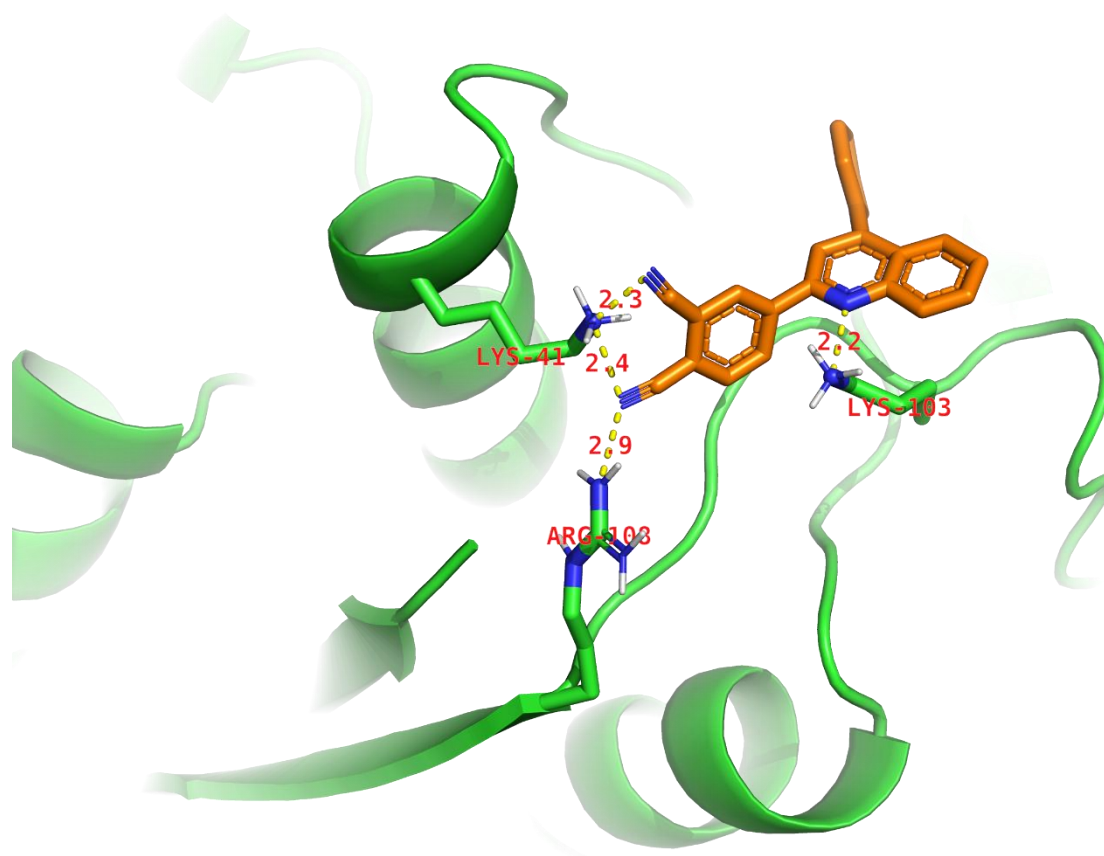


FIGURA 58: Interações observadas entre o composto 2 e a catepsina K.

Estes resultados confirmam os valores de atividade inibitória ( $IC_{50}$ ) obtidos, demonstrando assim a importância dos grupos CN para a atividade dos compostos avaliados. No caso do composto 21, que possui duas metoxilas ( $OCH_3$ ) no lugar dos grupos CN, o valor de  $IC_{50}$  aumenta devido a um possível impedimento estérico dos grupos  $CH_3$ , que são volumosos, que impedem a formação da ligação de hidrogênio da Lys41 e Arg108 com o oxigênio das metoxilas do inibidor. Para o composto 23, não ocorre impedimento estérico, no entanto o valor de  $IC_{50}$  aumenta ao trocar os grupos CN por OH, devido a ligação de hidrogênio ser mais forte com o grupo CN do que com o OH, conforme calculado por Chen e colaboradores (CHEN et al., 2016), que descreve que o grupo CN possui uma capacidade de ligação de hidrogênio de aproximadamente duas vezes maior que grupos OH.

Além das ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas também são observadas entre o composto 2 e a catepsina K. Como mostrado na FIGURA 59, o anel D está voltado para um bolsão hidrofóbico da proteína formado pelos resíduos de Leu38, Leu46, Leu49 e Ala104. Com isso podemos entender melhor o motivo pelo qual a adição de um substituinte apolar na posição 4", como é o caso do composto 6, não causou alteração em sua atividade inibitória. Se este substituinte na posição 4" fosse um grupo polar, provavelmente iria ocorrer um aumento na energia de interação/ligação e o complexo formado seria menos favorecido. Assim, ocorreria a diminuição na atividade enzimática (aumento do IC<sub>50</sub>).

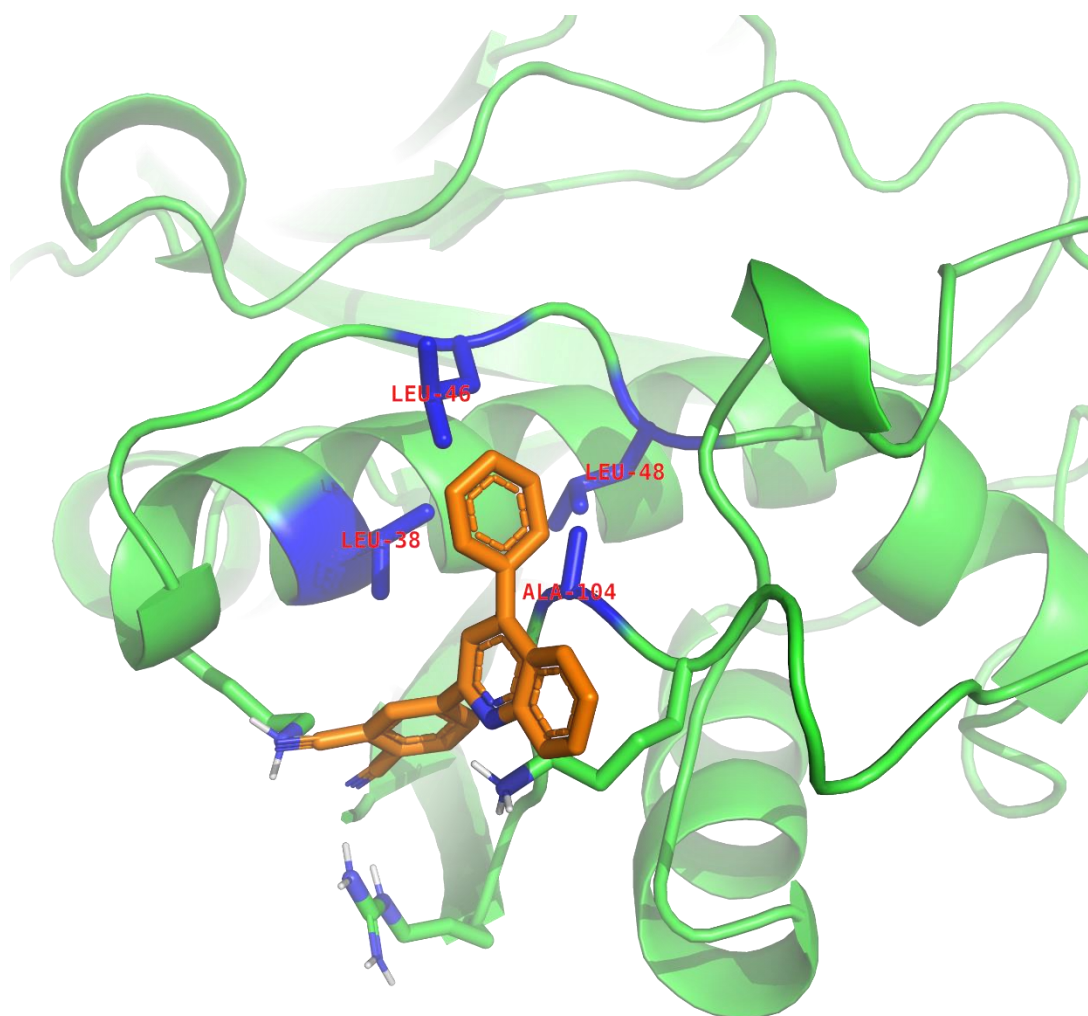


FIGURA 59: Interações hidrofóbicas propostas entre o composto 2 e a catepsina K.

Para o composto 14 o modelo selecionado é mostrado na FIGURA 60.



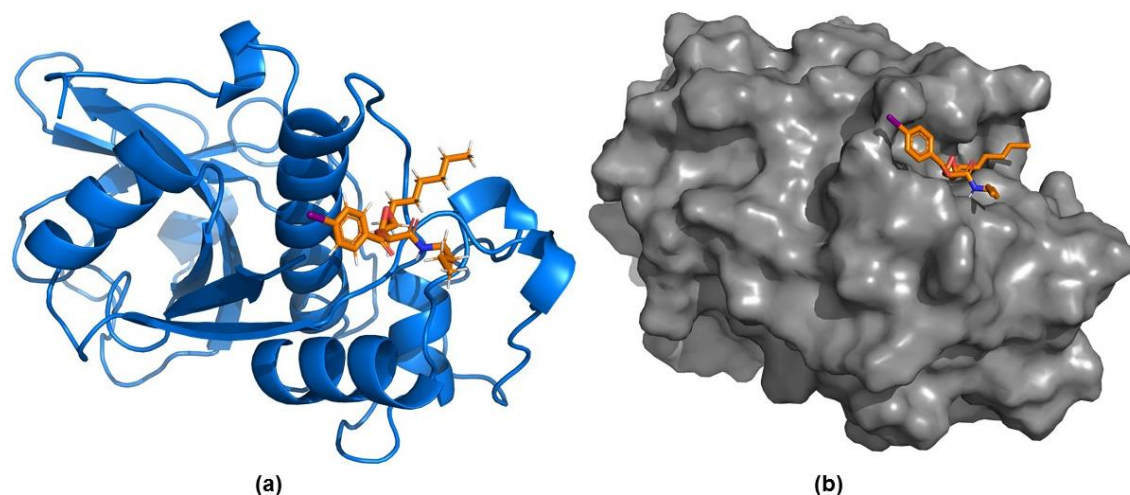


FIGURA 60: Modelo de ligação proposto para o complexo CatK/composto 14. Representação da estrutura tridimensional em *cartoon* (a) e por superfície (b).

Interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio também podem ocorrer entre o composto 14 e a catepsina K. Conforme mostrado na FIGURA 61, o átomo de iodo presente na molécula está projetado entre os resíduos de Lys41 e Lys214, favorecendo a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos amino terminais das lisinas e o iodo. Além das interações com o iodo, pela conformação da molécula do composto 14 no sítio de interação com a enzima, também é possível observar que uma ligação de hidrogênio é favorecida entre o grupo carbonila do éster e o resíduo de Arg108. A conformação da molécula também favorece a interação entre o Glu106 e o nitrogênio da amida.

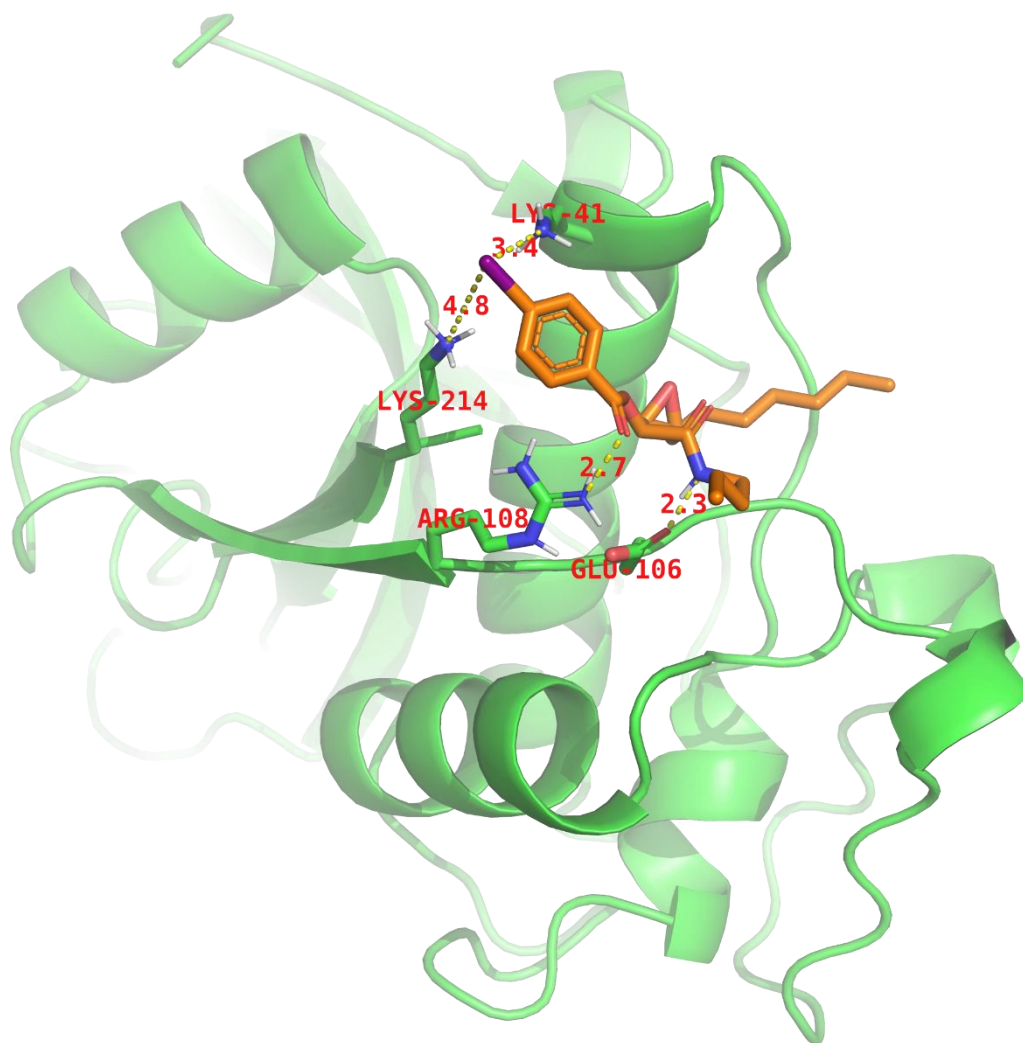


FIGURA 61: Interações observadas entre o composto 14 e a catepsina K.

Interações hidrofóbicas também são favorecidas para o composto 14. Conforme mostrado na FIGURA 62, a cadeia carbônica heptila está alocada em um bolsão hidrofóbico da proteína, formado pelos resíduos de Leu38, Leu46, Leu48, Ala104 e Ala105.



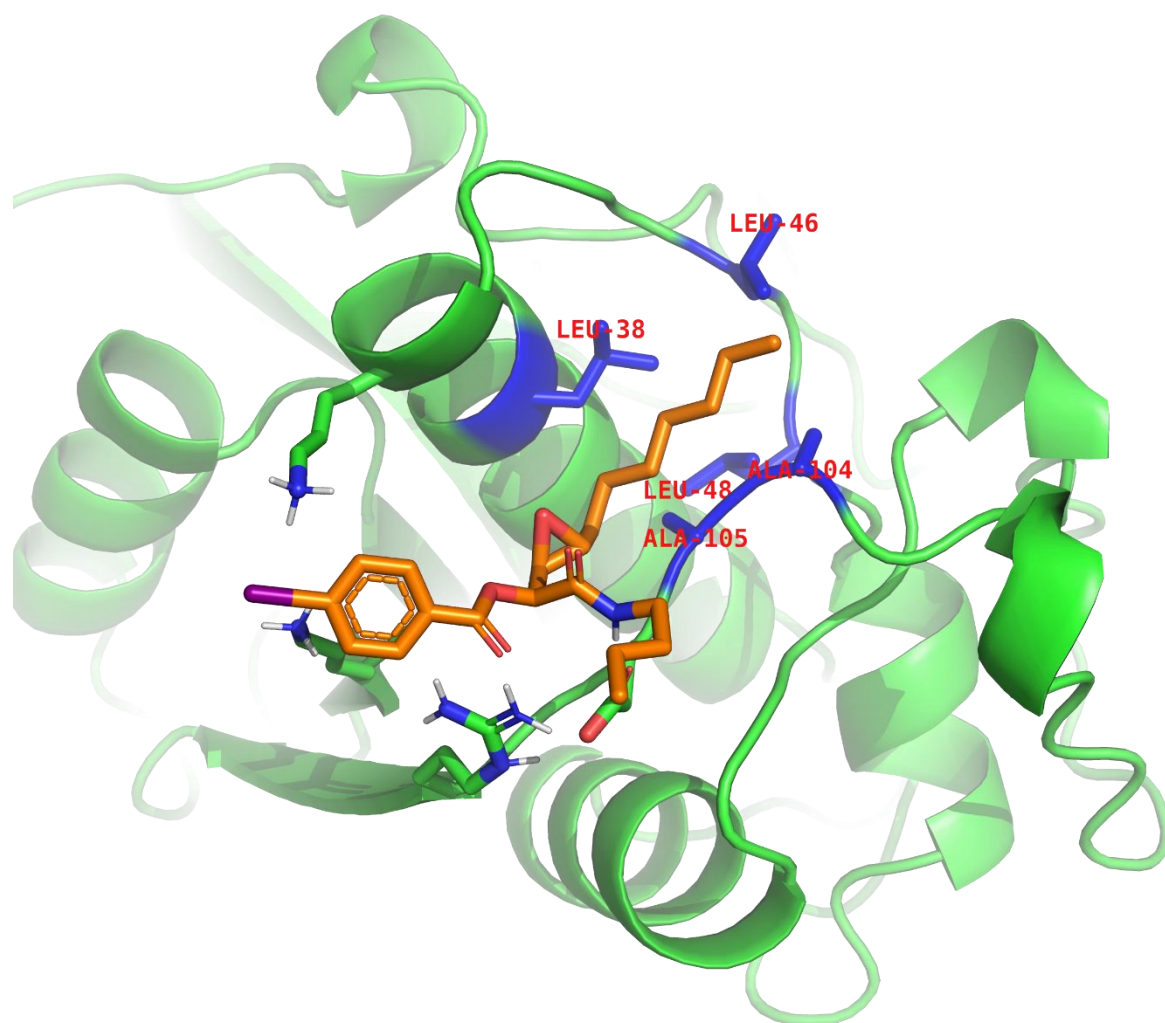


FIGURA 62: Interações hidrofóbicas entre o composto 14 e a catepsina K.

Para o composto 17 o modelo selecionado é mostrado na FIGURA 63.

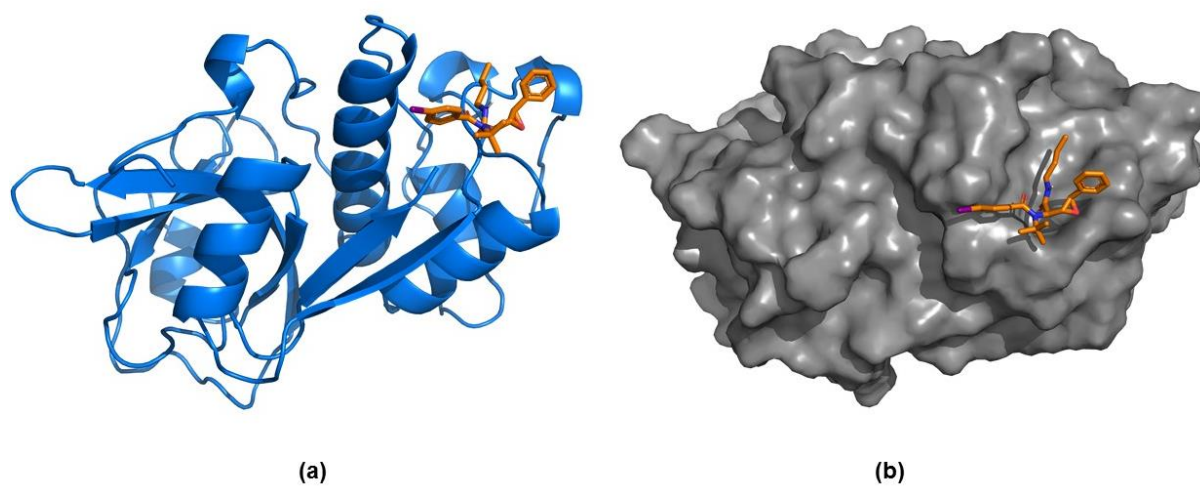


FIGURA 63: Modelo de ligação proposto para o complexo CatK/composto 17. Representação da estrutura tridimensional em *cartoon* (a) e por superfície (b).

Os estudos realizados com o composto 17 também foi possível observar interação hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. No entanto, a conformação do composto 17 no sítio de interação com a enzima é diferente da conformação do composto 14. Com isso, os resíduos de aminoácidos da proteína que interagem com o inibidor são praticamente os mesmos, porém, estes interagem com regiões diferentes da molécula de cada inibidor.

Na FIGURA 64 é possível observar que o átomo de iodo existente na molécula está projetado entre três resíduos de lisina (Lys40, Lys41 e Lys214), o que favorece a formação de ligação de hidrogênio entre o iodo e os grupos amino terminal das lisinas. Também é possível observar a possível interação entre o epóxido presente na molécula de inibidor e os resíduos de Arg79 e Arg108, formando ligação de hidrogênio entre eles.

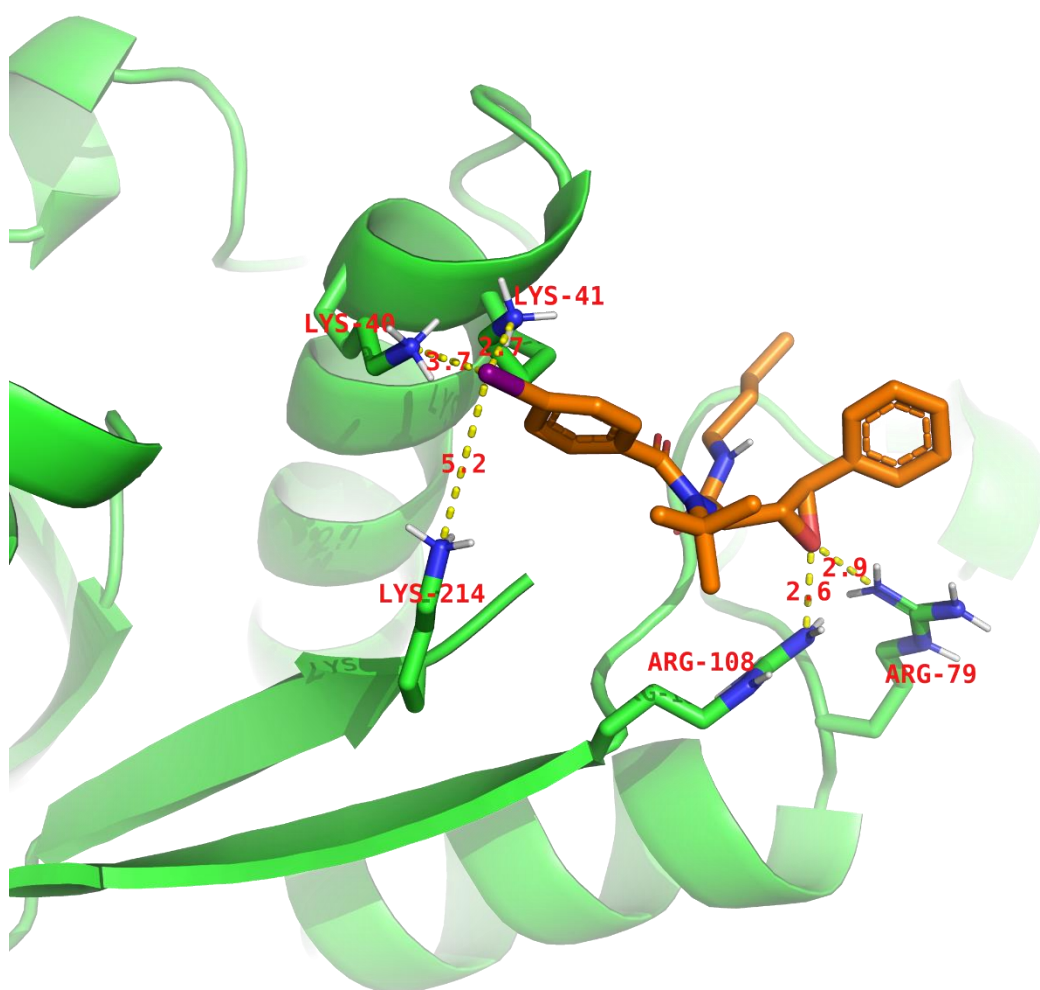


FIGURA 64: Interações observadas entre o composto 17 e a catepsina K.

Para o grupo isopropil ligado ao nitrogênio na posição 2 não é possível observar nenhuma interação efetiva deste substituinte com a proteína. Com isto podemos sugerir que a variação no valor de  $IC_{50}$  entre os compostos 16 e 17 FIGURA 65, está associada a presença do átomo de iodo presente no composto 17.

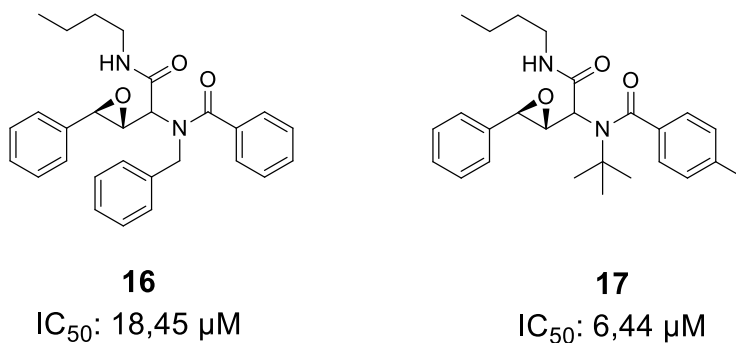


FIGURA 65: Compostos 16 e 17 e seus respectivos valores de  $IC_{50}$  para a catepsina K.

Interações hidrofóbicas também podem ocorrer para o composto 17, no entanto, conforme mencionado anteriormente, estas interações ocorrem em regiões diferentes para cada molécula de inibidor. Como mostrado na FIGURA 66, a cadeia carbônica ligada ao nitrogênio da posição 5 está voltado para o mesmo bolsão hidrofóbico existente nesta região da proteína, descritos para os outros inibidores.

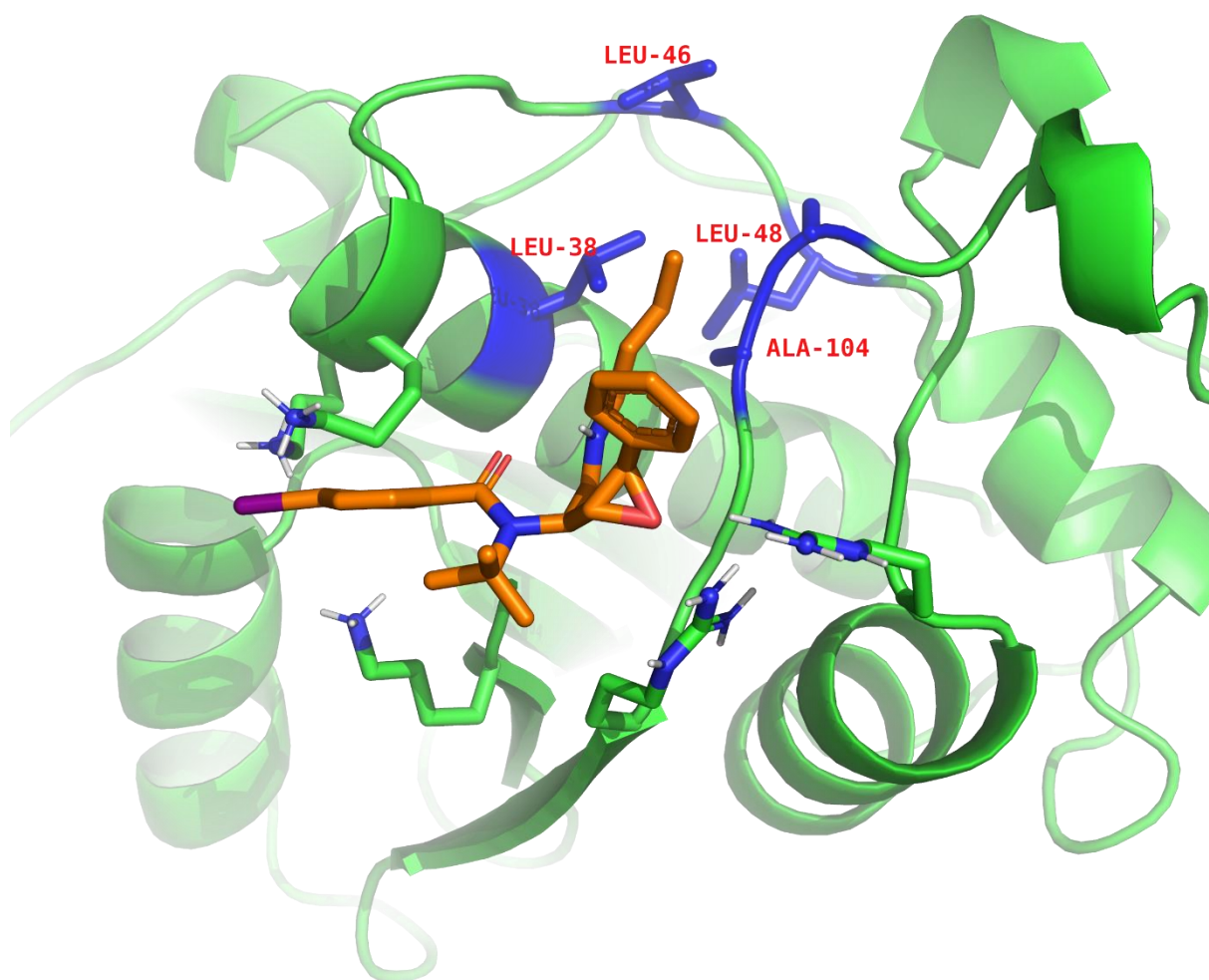


FIGURA 66: Interações hidrofóbicas entre o composto 14 e a catepsina K.

## 9 – Conclusão

O uso de enzimas como receptores moleculares é uma abordagem bastante promissora na busca por compostos bioativos.

A realização deste trabalho trouxe informações relevantes no âmbito da ecologia química e da química de produtos naturais. Onde o estudo químico com *F. proliferatum*, isolado de *Ananas comosus* (abacaxi), uma planta rica em proteases *papain-like*, possibilitou o isolamento de metabólitos que inibem a atividade da papaína. O que corrobora com a ideia, de que os fungos que contaminam plantas ricas em proteases, produzem compostos que conseguem inibir a ação destas enzimas.

Dos extratos obtidos do cultivo de *F. proliferatum* foram isolados nove metabólitos, sendo a beuvericina o composto majoritário destes extratos. Os ensaios enzimáticos deste composto, mostraram atividade inibitória dele frente a papaína e também a duas cisteíno proteases humanas, CatV e CatB. Para as três enzimas ocorreu atividade inibitória moderada, sendo o IC<sub>50</sub> para a CatB o menor deles.

Na parte II deste trabalho foram avaliados dezesseis novos compostos sintéticos como inibidores de catepsina K, sendo eles pertencentes a três classes distintas. E foram utilizadas duas diferentes abordagens de busca de inibidores desta enzima.

Foram determinadas as potências dos inibidores, sendo elas moderadas para a CatK, com IC<sub>50</sub> a baixos valores de micro molar. Dentre as classes avaliadas, as quinolinas-ftalonitrilas apresentaram as melhores atividades inibitórias.

O modo de ação incompetitivo e os valores de K<sub>i</sub> foram determinados para os inibidores mais promissores de cada classe. Além disso, estudos de *docking* molecular foram realizados e permitiram melhor entendimento das interações existentes entre os inibidores e a proteína, corroborando com os testes de mecanismos de inibição realizados.

Os estudos buscando inibidores de exossítio da catepsina K, é uma abordagem nova, que nunca havia sido utilizada anteriormente pelo grupo.

Com os estudos realizados foi possível observar que as três classes de compostos avaliados são inibidoras da atividade do sítio ativo, e não dos exossítios da CatK. No entanto, estes compostos não se ligam diretamente ao sítio catalítico. Eles se ligam a um sítio alostérico e interferem na atividade catalítica desta protease.

Todas as classes de compostos avaliados se mostraram promissoras na busca por inibidores de CatK.

Assim, os resultados obtidos com este trabalho também contribuem para a busca de inibidores de cisteíno proteases humanas.

## 10 – Referências Bibliográficas

- ABDEL-MAGID, A. F. "Inhibition of cathepsin K: a novel and promising treatment for osteoporosis.". ACS Med. Chem. Lett., 2015.
- AGGARWAL, N. & SLOANE, B. F. "Cathepsin B: multiple roles in cancer". Proteomics Clin. Appl., 8(5-6) : 427, 2014.
- AGUDA, A. H.; PANWAR, P.; DU, X.; NGUYEN, N. T.; BRAYER, G. D. & BRÖMME, D. "Structural basis of collagen fiber degradation by cathepsin K.". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 111(49) : 17474, 2014.
- ALFORD, R. F.; LEAVER-FAY, A.; JELIAZKOV, J. R.; O'MEARA, M. J.; DIMAIO, F. P.; PARK, H.; ... GRAY, J. J. "The rosetta all-atom energy function for macromolecular modeling and design". IN: J. Chem. Theory Comp. Vol. 13, p. 3031–3048, 2017.
- ALMEIDA, P. C.; NATES, I. L.; CHAGAS, J. R.; RIZZI, C. C. A.; FALJONI-ALARIO, A.; CARMONA, E.; JULIANO, L.; NADER, H. B. & TERSARIOL, I. L. S. "Cathepsin B activity regulation". J. Biol. Chem, 276(2) : 944, 2001.
- ALSHAIBANI, M.; MOHAMADZIN, N.; JALIL, J.; SIDIK, N.; AHMAD, S.; KAMAL, N. & EDRADA-EBEL, R. "Isolation, purification and characterization of five active diketopiperazine derivatives from endophytic *Streptomyces* SUK 25 with antimicrobial and cytotoxic activities". J. Microbiol. Biotechnol., 27(7) : 1249, 2017.
- BAKER, D.; MOCEK, U. & CHERYL, G. "Natural products vs. combinatorials: a case study.". Biodiversity: new leads for pharmaceutical and agrochemical industries. Cambridge, United Kingdom, 2000.
- BARRETT, A. J.; KEMBHAVI, A. A.; BROWN, M. A.; KIRSCHKE, H.; KNIGHT, C. G.; TAMAIT, M. & HANADAT, K. "L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L". Biochem. J., 201(1) : 189, 1982.
- BONNET, N.; BRUN, J.; ROUSSEAU, J. C.; DUONG, L. T. & FERRARI, S. L. "Cathepsin K controls cortical bone formation by degrading periostin". J. Bone Miner. Res., 32(7) : 1432, 2017.
- BOONEN, S.; ROSENBERG, E.; Claessens, F.; VANDERSCHUEREN, D. & Papapoulos, S. "Inhibition of cathepsin K for treatment of osteoporosis". Curr. Osteoporos. Rep., 10(1) : 73, 2012.
- BRÖMME, D. & KALETA, J. "Thiol-dependent cathepsins: cathophysiological implications and recent advances in inhibitor design". Curr. Pharm. Des., 8 : 1639, 2002.
- BRÖMME, D. & LECAILLE, F. "Cathepsin K inhibitors for osteoporosis and potential off-target effects". Expert. Opin. Investig. Drugs, 18(5) : 585, 2009.

- BRÖMME, D.; LI, Z.; BARNES, M. & MEHELER, E. "Human cathepsin V functional expression , tissue distribution , electrostatic surface potencial, enzymatic characterization, and chromosomal localization". *Biochem.*, 39(8) : 2377, 1999.
- BRÖMME, D. & OKAMOTO, K. "Human cathepsin O2, a novel cysteine protease highly expressed in osteoclastomas and ovary molecular cloning, sequencing and tissue distribution.". *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 376(6) : 379, 1995.
- BRÖMME, D.; OKAMOTO, K.; WANG, B. B. & BIROC, S. "Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts: functional expression of human cathepsin O2 in spodoptera frugiperda and characterization of the enzyme". *J. Biol. Chem.*, 271(4) : 2126, 1996.
- BÜHLING, F.; WALDBURG, N.; GERBER, A.; HÄCKEL, C.; KRÜGER, S.; REINHOLD, D.; BRÖMME, D.; WEBER, E.; ANSORGE, S. & WELTE, T. "Cathepsin K expression in human lung.". *Adv. Exp. Med. Biol.*, **477** : 281, 2000.
- CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L. & ZANELLA, R. "Modern techniques of sample preparation for pesticide residues determination in water by liquid chromatography with detection by diode array and mass spectrometry". *Quim. Nov.*, 34(9) : 1604, 2011.
- CHEN, D.; OEZGUEN, N.; URVIL, P.; FERGUSON, C.; DANN, S. M. & SAVIDGE, T. C. "Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing". *Sci. Adv.*, **2** : 1, 2016.
- CHERNEY, M. M.; LECAILLE, F.; KIENITZ, M.; NALLASETH, F. S.; LI, Z.; JAMES, M. N. G. & BRÖMME, D. "Structure-activity analysis of cathepsin K/chondroitin 4-sulfate interactions". *J. Biol. Chem.*, 286(11) : 8988, 2011.
- CHIELLINI, C.; COSTA, M.; NOVELLI, S. E.; AMRI, E. Z.; BENZI, L.; BERTACCA, A.; COHEN, P.; DEL PRADO, S.; FRIEDMAN, J. M. & MAFFEI, M. "Identification of cathepsin K as a novel marker of adiposity in white adipose tissue". *J. Cell. Physiol.*, 195(2) : 309, 2003.
- COMBS, S. A.; DeLUCA, S. L.; DeLUCA, S. H.; LEMMON, G. H.; NANNEMANN, D. P.; NGUYEN, E. D.; WILLIS, J. R.; SHEEHAN, J. H. & MEILER, J. "Small-molecule ligand docking into comparative models with Rosetta.". *Nat. Protoc.*, 8(7) : 1277, 2013.
- CONWAY, P.; TYKA, M. D.; DIMAIO, F.; KONERDING, D. E. & BAKER, D. "Relaxation of backbone bond geometry improves protein energy landscape modeling". *Protein Sci.*, 23(1) : 47, 2013.
- COPELAND, R. A. "Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery". New Jersey: Wiley, 2013.
- CRAGG, G. M. & NEWMAN, D. J. "Natural products: A continuing source of novel drug leads". *Biochim. Biophys. Acta*, 1830(6) : 3670, 2013.
- DAME, Z. T.; SILIMA, B.; GRYZENHOUT, M. & VAN REE, T. "Bioactive compounds



- from the endophytic fungus *Fusarium proliferatum*". Nat. Prod. Res., 30(11) : 1301, 2015.
- DAVY, A.; SVENDSEN, I.; SØRENSEN, S. O.; SØRENSEN, M. B.; ROUSTER, J.; MELDAL, M.; SIMPSON, D. J. & CAMERON-MILLS, V. "Substrate specificity of barley cysteine endoproteases EP-A and EP-B 1". Plant Physiol., 117(2) : 255, 1998.
- DEMAIN, A. L. & SANCHEZ, S. "Microbial drug discovery: 80 years of progress.". J. Antibiot., 62(1) : 5, 2009.
- DOMSALLA, A. & MELZIG, M. F. "Occurrence and properties of proteases in plant latices". Planta Med., 74(7) : 699, 2008.
- DRAG, M. & SALVESEN, G. S. "Emerging principles in protease-based drug discovery". Nat. Rev. Drug. Discov., 9(9) : 690, 2010.
- DRAKE, M. T.; CLARKE, B. L.; OURSLER, M. J. & KHOSLA, S. "Cathepsin K inhibitors for osteoporosis: biology, potential clinical utility, and lessons learned". Endocr. Rev., 38(4) : 325, 2017.
- FLEISHMAN, S. J.; LEAVER-FAY, A.; CORN, J. E.; STRAUCH, E. M.; KHARE, S. D.; KOGA, N.; ASHWORTH, J.; MURPHY, P.; RICHTER, F.; LEMMON, G.; MEILER, J. & BAKER, D. "Rosettascripts: a scripting language interface to the rosetta macromolecular modeling suite". PLoS One, 6(6) : 1, 2011.
- FRIEDRICH, B.; TEPEL, C.; REINHECKEL, T.; DEUSSING, J.; FIGURA, K. von; VOLKER, H.; PETERS, C.; SAFTIG, P. & BRIX, K. "Thyroid functions of mouse cathepsins B, K and L". J. Clin. Invest., 111(11) : 1733, 2003.
- GELB, B. D.; SHI, G. P.; CHAPMAN, H. A. & DESNICK, R. J. "Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency". Science (80-. ), 273(5279) : 1236, 1996.
- HE, R.; WANG, B.; WAKIMOTO, T.; WANG, M.; ZHU, L. & ABE, I. "Cyclodipeptides from metagenomic library of a japanese marine sponge". J. Braz. Chem. Soc., 24(12) : S1, 2013.
- HOORN, R. A. L. van der & JONES, J. D. G. "The plant proteolytic machinery and its role in defence". Curr. Opin. Plant Biol., 7 : 400, 2004.
- HU, L. & RYCHILIK, M. "Biosynthesis of <sup>15</sup>N<sub>3</sub>-labeled enniatins and beauvericin and their application to stable isotope dilution assays". J. Agric. Food Chem., 60(29) : 7129, 2012.
- JIMÉNEZ, M.; LOGRIECO, A. & BOTTALICO, A. "Occurrence and pathogenicity of *Fusarium* species in banana". J. Phytopathol., 137(3) : 214, 1993.
- KELLER, N. P.; TURNER, G. & BENNETT, J. W. "Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics". Nat. Rev. Microbiol., 3(12) : 937, 2005.

- KONNO, K.; HIRAYAMA, C.; NAKAMURA, M.; TATEISHI, K.; TAMURA, Y.; HATTORI, M. & KOHNO, K. "Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex". *Plant J.*, 37(3) : 370, 2004.
- KOTHIWALE, S.; MENDENHALL, J. L. & MEILER, J. "BCL::Conf: small molecule conformational sampling using a knowledge based rotamer library". *J. Cheminformatics*, 7(1) : 47, 2015.
- LECAILLE, F.; BRÖMME, D. & LALMANACH, G. "Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity". *Biochimie*, 90(2) : 208, 2008.
- LECAILLE, F.; KALETA, J. & BRÖMME, D. "Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design". *Chem. Rev.*, 102(12) : 4459, 2002.
- LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; LOGRIECO, A.; MULÈ, G.; MORETTI, A. & RITIENI, A. "Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex strains isolated from native prairie grasses in kansas". *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(4) : 2254, 2004.
- LI, Y.; FANG, J. & AO, G. "Cathepsin B and L inhibitors: a patent review (2010 - present)". *Expert Opin Ther Pat.*, 27(6) : 643, 2016.
- LI, Z.; HOU, W. S.; ESCALANTE-TORRES, C. R.; GELB, B. D. & BRÖMME, D. "Collagenase activity of cathepsin K depends on complex formation with chondroitin sulfate.". *J. Biol. Chem.*, 277(32) : 28669, 2002.
- LI, Z.; KIENETZ, M.; CHERNEY, M. M.; JAMES, M. N. G. & BRÖMME, D. "The crystal and molecular structures of a cathepsin K: chondroitin sulfate complex". *J. Mol. Biol.*, 383(1) : 78, 2008.
- LINDSTRÖM, E.; RIZOSKA, B.; HENDERSON, I.; TERELIUS, Y.; JERLING, M.; EDENIUS, C. & GRABOWSKA, U. "Nonclinical and clinical pharmacological characterization of the potent and selective cathepsin K inhibitor MIV-711". *J. Transl. Med.*, 16(1) : 1, 2018.
- LINNERVERS, C. J.; MCGRATH, M. E.; ARMSTRONG, R.; MISTRY, F. R.; BARNES, M. G.; KLAUS, J. L.; PALMER, J. T.; KARTZ, B. A. & BRÖMME, D. "Expression of human cathepsin K in *Pichia pastoris* and preliminary crystallographic studies of an inhibitor complex". *Protein Sci.*, 6(4) : 919, 1997.
- LIU, J.; SHARMA, A.; NIEWIARA, M. J.; SINGH, R.; MING, R. & YU, Q. "Papain-like cysteine proteases in *Carica papaya*: lineage-specific gene duplication and expansion". *BMC Genomics*, 19(1) : 1, 2018.
- LOGRIECO, A.; MORETTI, A.; CASTELLA, G.; KOSTECKI, M.; GOLINSKI, P.; RITIENI, A. & CHELKOWSKI, J. "Beauvericin production by *Fusarium* species". *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(8) : 3084, 1998.
- LV, Z.; CHU, Y. & WANG, Y. "HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity.". *HIV AIDS (Auckl)*, 7 : 95, 2015.

- MISAS-VILLAMIL, J. C.; HOORN, R. A. L. van der & DOEHLEMANN, G. "Papain-like cysteine proteases as hubs in plant immunity". *New Phytol.*, 212(4) : 902, 2016.
- MISHRA, B. B. & TIWARI, V. K. "Natural products: an evolving role in future drug discovery.". *Eur. J. Med. Chem.*, 46(10) : 4769, 2011.
- MOLDOVEANU, T.; CAMPBELL, R. L.; CUERRIER, D. & DAVIES, P. L. "Crystal structures of calpain-E64 and -leupeptin inhibitor complexes reveal mobile loops gating the active site". *J. Mol. Biol.*, 343(5) : 1313, 2004.
- MORETTI, A.; LOGRIECO, A.; BOTTALICO, A.; RITIENI, A. & RANDAZZO, G. "Production of beauvericin by *Fusarium proliferatum* from maize in Italy". *Mycotoxin Res.*, **10** : 73, 1994.
- NEUMANN, M. J.; BACKHOUSE, D.; CARTER, D. A.; SUMMERELL, B. A. & BURGUESS, L. W. "Genetic structure of populations of *Fusarium proliferatum* in soils associated with *Livistona mariae* palms in little palm creek, northern territory, Australia". *Aust.J. Bot.*, 52(4) : 543, 2004.
- NEWMAN, D. J. & CRAGG, G. M. "Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014". *J. Nat. Prod.*, 79(3) : 629, 2016.
- NIVÓN, L. G.; MORETTI, R. & BAKER, D. "A pareto-optimal refinement method for protein design scaffolds". *PLoS One*, 8(4) : e59004, 2013.
- NIWA, Y.; SUZUKI, T.; DOHMAE, N.; UMEZAWA, K. & SIMIZU, S. "Determination of Cathepsin V Activity and Intracellular Trafficking by N-glycosylation.". *FEBS Lett.*, 586(20) : 3601, 2012.
- PANWAR, P.; SØE, K.; GUIDO, R. V. C.; BUENO, R. V. C.; DELAISSE, J. M. & BRÖMME, D. "A novel approach to inhibit bone resorption: exosite inhibitors against cathepsin K". *Br. J. Pharmacol.*, 173(2) : 396, 2016.
- PAVLÁT, P.; HALAMA, A.; WEIDLICH, T.; FIALA, B. & BEKÁREK, V. "Medium effect on <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C- NMR spectra of melatonin". *Acta Univ Palacki Olomuc*, **38** : 59, 1999.
- PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L. & VIRET, O. "Ecology , metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi .". *Nat.Toxins*, **1** : 185, 1992.
- POLGÁR, L. "Catalytic mechanisms of cysteine peptidases". IN: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Vol. 2, p. 1773–1784, 2013.
- QUINTANILLA-DIECK, M. J.; CODRIANSKY, K.; KEADY, M.; BGAWAN, J. & RÜNGER, T. M. "Expression and regulation of cathepsin K in skin fibroblasts". *Exp. Dermatol.*, 18(7) : 596, 2009.
- ROBERTSON, J. G. "Enzymes as a special class of therapeutic target: clinical drugs and modes of action". *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 17(6) : 674, 2007.
- SAFTING, P.; HUNZIKER, E.; WEHMEYER, O.; JONES, S.; BOYDE, A.; ROMMERSKIRCH, W.; MORITZ, J. D.; SCHU, P. & FIGURA, K. von. "Impaired

- osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(23) : 13453, 1998.
- SANDOVAL-DENIS, M.; GUARNACCIA, V.; POLIZZI, G. & CROUS, P. W. "Symptomatic citrus trees reveal a new pathogenic lineage in *Fusarium* and two new *Neocosmospora* species". *Persoonia*, **40** : 1, 2018.
- SANTINI, A.; RITIENI, A.; FOGLIANO, V.; RANDAZZO, G.; MANNINA, L.; LOGRIECO, A. & BENEDETTI, E. "Structure and absolute stereochemistry of fusaproliferin, a toxic metabolite from *Fusarium proliferatum*". J. Nat. Prod., 59(2) : 109, 1996.
- SANTOS, D. A.; DEOBALD, A. M.; CORNELIO, V. E.; ÁVILA, R. M. D.; CORNEA, R. C.; BERNASCONI, G. C. R.; PAIXÃO, M. W.; VIEIRA, P. C. & CPRRÊA, A. G. "Asymmetric synthesis and evaluation of epoxy- $\alpha$ -acyloxycarboxamides as selective inhibitors of cathepsin L". *Bioorg. Med. Chem.*, 25(17) : 4620, 2017.
- SCHNEIDMAN-DUHOVNY, INBAR, Y.; NUVISSINOV, R. & WOLFSON, H. J. "PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking". *Nucleic Acids Res*, 33(2) : W363, 2005.
- SEVERINO, R. P. "Busca de produtos naturais como inibidores específicos de enzimas". Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, São Carlos, 2008.
- SHARMA, V.; PANWAR, P.; O'DONOGHUE, A. J.; CUI, H.; GUIDO, R. V. C.; CRAIK, C. S. & BRÖMME, D. "Structural requirements for the collagenase and elastase activity of cathepsin K and its selective inhibition by an exosite inhibitor.". *Biochem. J.*, 465(1) : 163, 2015.
- SLOANE, B. F.; ROZHIN, J.; JOHNSON, K.; TAYLOR, H.; CRISSMAN, J. D. & HONN, K. V. "Cathepsin B: association with plasma membrane in metastatic tumors". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83(8) : 2483, 1986.
- SMEDSGAARD, J. "Micro-sclae extraction procedure for standadized screening of fungal metabolite production in cultures". *J. Chromatogr. A*, **760** : 264, 1997.
- SMITH, C. G. & VANE, J. R. "The discovery of captopril". *FASEB J.*, 17(8) : 788, 2003.
- SOMOZA, J. R.; ZHAN, H.; BOWMAN, K. K.; YU, L.; MORTARA, K. D.; PALMER, J. T.; CLARK, J. M. & MCGRATH, M. E. "Crystal Structure of Human Cathepsin V". *Biochemistry*, 39(41) : 12543, 2000.
- STEPIÉN, Ł.; KOCZYK, G. & WAŚKIEWICZ, A. "Diversity of *Fusarium* species and mycotoxins contaminating pineapple". *J. Appl. Genet.*, 54(3) : 367, 2013.
- STIPANOVIC, R. D.; WHEELER, M. H.; PUCKHABER, L. S.; LIU, J.; BELL, A. A. & WILLIAMS, H. J. "Nuclear magnetic resonance (NMR) studies on the biosynthesis of fusaric acid from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*". *J. Agric. Food Chem.*, 59(10) : 5351, 2011.
- STOCH, S. A.; ZAJIC, S.; STONE, J. A.; MILLER, D. L.; BORTELI, L. van; LASSETER, K. C.; PRAMANIK, B.; CILISSEN, C.; LIU, Q.; LIU, L.; SCOTT, B. B.;

- PANEBIANCO, D.; DING, Y.; GOTTESDIENER, K. & WAGNER, J. A. "Odanacatib, a selective cathepsin K inhibitor to treat osteoporosis: Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics - results from single oral dose studies in healthy volunteers". *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 75(5) : 1240, 2013.
- TULP, M. & BOHLIN, L. "Unconventional natural sources for future drug discovery". *Drug. Discov. Today*, 9(10) : 450, 2004.
- TURK, D. & GUNCAR, G. "Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets". *Acta Cryst. D*, 59 : 203, 2003.
- TURK, V.; STOKA, V.; VASILJEVA, O.; RENKO, M.; SUN, T.; TURK, B. & TURK, D. "Cysteine Cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers". *Biochim. Biophys. Acta*, 1824(1) : 68, 2012.
- TURK, V.; TURK, B.; GUNČAR, G.; TURK, D. & KOS, J. "Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer". *Advan. Enzym. Regul.*, 42 : 285, 2002.
- WALKER, C.; MACIEL, C. G.; MILANESI, P. M.; MUNIZ, M. F. B.; MEZZONO, R. & POLLET, C. S. "Caracterização morfológica, molecular e patogenicidade de *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides* a cordia americana". *Ci. Fl.*, 26(2) : 463, 2016.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. & TAYLOR, J. "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics". IN: *PCR Protocols: A guide to methods and Applications*. p. 315–322, 1990.
- YASUDA, Y.; LI, Z.; GREENBAUM, D.; BOGYO, M.; WEBER, E. & BRÖMME, D. "Cathepsin V, a novel and potent elastolytic activity expressed in activated macrophages". *J. Biol. Chem.*, 279(35) : 36761, 2004.