

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



MARLUCE XAVIER SANTOS

Liquido da castanha de caju: Obtenção dos constituintes químicos e avaliação *in silico* do potencial de inibição das enzimas Acetilcolinesterase e Histona Deacetilase

> JEQUIÉ-BA JULHO / 2019

MARLUCE XAVIER SANTOS

Liquido da castanha de caju: Obtenção dos constituintes químicos e avaliação *in silico* do potencial de inibição das enzimas Acetilcolinesterase e Histona Deacetilase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar

Coorientador: Prof. Dr. Gesivaldo Santos

JEQUIÉ-BA JULHO / 2019 S2371 Santos, Marluce Xavier.

Liquido da castanha de caju: Obtenção dos constituintes químicos e avaliação *in silico* do potencial de inibição das enzimas Acetilcolinesterase e Histona Deacetilase / Marluce Xavier Santos.- Jequié, 2019.

55f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação da Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar e coorientação do Prof. Dr. Gesivaldo Santos)

1.Liquido da castanha de caju 2.Ácido anacárdico 3.Acetilcolinesterase 4.Histona Deacetilase 5.Docking molecular I.Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.Título

CDD - 338.1745730981

Rafaella Câncio Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária - UESB - Jequié

TERMO DE APROVAÇÃO

MARLUCE XAVIER SANTOS

Líquido da castanha de caju: obtenção dos constituintes químicos e avaliação *in silico* do potencial de inibição das enzimas Acetilcolinesterase e Histona deacetilase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

COMISSÃO EXAMINADORA

Konane poura Aquiar

Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar (UFBA, Salvador - BA, 2008) (Orientadora)

hyton Quinz Shee Prof. Dr. Clayton Queiroz Alves

Prof. Dr. Clayton Queiroz Alves (UFBA, Salvador - BA, 2012)

Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira (UFMG, Belo Horizonte - MG, 2012)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química em 03 / 07 / 2018.

AGRADECIMENTOS

Deixo expressos meus agradecimentos:

A Deus por tudo que me foi concedido;

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e ao Programa de Pós-Graduação em Química da UESB pela minha formação acadêmica e pelo apoio e incentivo à pesquisa;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de minha bolsa de Mestrado;

Ao Laboratório de Óleos Essenciais por disponibilizar toda infraestrutura necessária para realização experimental deste trabalho;

Ao **Laboratório de Cromatografia da UESB**, especialmente ao professor Dr. Djalma Menezes de Oliveira, por viabilizar as análises por CG-EM e Infravermelho das amostras;

Ao professor **Dr. Clayton Queiroz Alves (UEFS)** pela realização das análises de Ressonância Magnética nuclear das amostras;

Ao Instituito René Rachou – Fiocruz, em especial a Professora Dr. Betânia Barros Cota, pela análise por CLAE-EM das amostras.

Ao Professor **Dr. Gesivaldo Santos** pela analise computacional das substâncias identificadas.

Aos colegas e ex-colegas de laboratório, especialmente a **Rafael e Maria**, pelo apoio em alguns procedimentos experimentais iniciais.

A **Vyvian** pela colaboração e compartilhamento de bons momentos durante o trabalho.

Agradecimentos especiais à minha orientadora, professora Dra. **Rosane Moura Aguiar**, pelo apoio e contribuição ao longo desses 2 anos de mestrado e pela confiança e oportunidade que me foi concedida. Gratidão.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.

Marthin Luther King

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anacardium occidentale L. var. nanum, cajueiro2
Figura 2. Caju, castanha e o LCC3
Figura 3. Estrutura dos principais componentes do LCC4
Figura 4. Estrutura de AChE humana mostrando a entrada da garganta (gorge) e os importantes resíduos de aminoácidos do sítio ativo10
Figura 5. Espectro de absorção por refletância total atenuada (ATR: " <i>Attenuated Total Reflectance</i> ") na região do infravermelho da amostra EH2
Figura 6. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da amostra EH2 e suas ampliações
Figura 7. Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da amostra EH2 e suas ampliações25
Figura 8. Espectro de DEPT 135° da amostra EH226
Figura 9. Ampliação do Mapa de contorno HMBC da amostra EH227
Figura 10. Ampliação do mapa de contorno HSQC da amostra EH227
Figura 11. Mapa de contorno COSY da amostra EH228
Figura 12. Espectro de absorção por refletância total atenuada (ATR: "Attenuated Total Reflectance") na região do infravermelho da amostra EH1
Figura 13. Perfil cromatográfico por CLAE da amostra EH1 e seus espectros de massas (a-d)
Figura 14. Espectro de absorção por refletância total atenuada (ATR: " <i>Attenuated Total Reflectance</i> ") na região do infravermelho das frações EH2CN e EH2CO35
Figura 15. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃), com ampliações, da mistura de cardol e cardanol
Figura 16. Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃), com ampliações, da mistura de cardol e cardanol

Figura 17. Espectro de DEPT 135° (100 MHz, CDCl ₃) da mistura de cardol e cardanol
Figura 18. Ampliação do mapa de contorno HSQC da mistura de cardol e cardanol40
Figura 19. Ampliação do cromatograma TIC (20 – 40 min)41
Figura 20: Principais fragmentos do cardanol mono-insaturado42
Figura 21: Espectro de massa proposto pela biblioteca NIST 1442
Figura 22. Principais fragmentos do ácido isooleico mono-insaturado42
Figura 23. Rearranjo de Mclafferty para o fragmento <i>m/z</i> 7443
Figura 24: Espectro de massa proposto pela biblioteca NIST 1443
Figura 25. Estrutura do Ácido oleico, palmítico e o ácido linoleico presente na amostra MAA43
Figura 26. Espectros de massa proposto pela biblioteca instalada NIST 14 do ácido oleico, palmítico e linoleico, respectivamente44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atribuições das principais bandas de absorção do espectro de IV da amostra
EH223
Tabela 2. Dados das análises dos espectros de RMN para a amostra EH226
Tebele 2 Atribuiçãos dos principais bandos de observão po IV/ novo os frações EUSON
Tabela 3. Athbulções das principais bandas de absorção no tv para as trações Em2CN
e EH2CO
Tabela 4 . Dados das análises dos espectros de RMN para as frações FH2CN e
EN20040
Tabela 5. Resultado do estudo in silico (Docking molecular) do Ácido Anacárdico
frente a enzima Acetilcolinesterase
Tabela 6. Resultado do estudo in silico (Docking molecular) do Cardol frente a enzima
Acetilcolinesterase
Tabela 7 Resultado do estudo <i>in silico</i> (Docking molecular) do Cardanol frente a
Tabela 8. Resultado do estudo in silico (Docking molecular) do Ácido anacárdico
frente a enzima Histona Deacetilase48
Tabela 9. Resultado do estudo in silico (Docking molecular) do Cardol frente a enzima
Histona Deacetilase
Tabela 10 . Resultado do estudo <i>in silico</i> (Docking molecular) do Cardanol frente a
enzima Histona Deacetilase
CIIZIIIIA I IISIOIIA DEALEIIIASE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LCC	Liquido da castanha do caju
AA	Ácido anacárdico
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
HDAC	Histona Deacetilase
ChAT	Colina Acetiltranferase
DA	Doenca de Alzheimer
TLC	Cromatografia em camada delgada (do inglês: " <i>Thin layer chromatography</i> ")
CC	Cromatografia em Coluna
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CLAE	Cromatografia Liquida de Alta Eficiência
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
COSY	Espectroscopia de Correlação ¹ H- ¹ H (do inglês: " ¹ H- ¹ H Correlation Spectroscopy")
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
S	singleto
dd	duplo dupleto
d	dupleto
t	tripleto
т	multipleto
eq	Equatorial
EH	Extrato hexânico
HMBC	Correlação Heteronuclear a Múltiplas Ligações (do inglês: "Heteronuclear Multiple Bond Correlation")
HSQC	Correlação Heteronuclear Quântica Simples (do inglês: "Heteronuclear Single Quantum Correlation")
IV	Infravermelho
EM	Ecpectro de massa

Liquido da castanha de caju: Obtenção dos constituintes químicos e avaliação *in silico* do potencial de inibição das enzimas Acetilcolinesterase e Histona Deacetilase

Autora: Marluce Xavier Santos Orientadora: Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar Coorientador: Prof. Dr. Gesivaldo Santos

RESUMO: A castanha de caju é matéria-prima para obtenção do líquido da castanha (LCC), uma mistura viscosa de coloração amarronzada, com importantes aplicações na indústria química e farmacêutica. Diversos compostos são encontrados no LCC, tais como, cardol, cardanol, metil-cardol e os ácidos anacárdicos. Os AA's são compostos considerados lipídeos fenólicos, pois possuem uma cadeia carbônica longa com diferentes graus de insaturação. Estudos comprovam que os AA's presentes no LCC têm sido eficientes no tratamento de diversas patologias. Suas atividades antimicrobiana, antitumoral, antioxidante e anti-inflamatória, são bem discutidas, o que justifica a relevância de estudos das estruturas químicas desses compostos, principalmente, para servir de arcabouço aos desenvolvedores de novos medicamentos. Neste sentido, o presente trabalho visa isolar e identificar os constituintes químicos presentes no LCC (Anacardium occidentale L. var. nanum), bem como, avaliar seu potencial de inibição frente as enzimas Acetilcolinesterase (AChE) e Histona Deacetilase (HDAC), pelo método in silico. O isolamento dos constituintes foi realizado em coluna cromatográfica acidificada, precipitação com hidróxido de cálcio e extrações liquido-liquido. Na identificação estrutural dos constituintes foram utilizados CLAE-EM, CG-EM, IV e RMN mono e bidimensional. Foi isolado o Ácido anacárdico tri-insaturado e identificado uma mistura de AA, também como uma mistura de cardol e cardanol tri-insaturado, cardanol mono-insaturado e ácidos graxos. O estudo do in silico para o potencial inibidor das enzimas Acetilcolinesterase e Histona Deacetilase foi realizado com os constituintes do LCC identificados neste trabalho, cuja cadeia carbônica lateral apresentava-se triinsaturada. O ácido anacárdico tri-insaturado teve maior afinidade pelas duas enzimas testadas (-9,6 e -8,3 Kcal/mol), devido a menor energia de ΔG e mudança na conformação espacial de quase zero, enquanto o cardol (-8,3 e -4.3 Kcal/mol) e o cardanol (-8,1 e -6.6 Kcal/mol) obteve maiores ΔG e consequentemente menores afinidades pelas enzimas.

Palavras-chave: Liquido da castanha de caju, Ácido anacárdico, Acetilcolinesterase, Histona Deacetilase, Docking molecular

Cashew nut liquid: Obtaining chemical constituents and in silico evaluation of inhibition potential of Acetylcholinesterase and Histone Deacetylase enzymes

Author: Marluce Xavier Santos Advisor: Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar Co-Advisor: Prof. Dr. Gesilvado Santos

ABSTRACT: Cashew nuts are the raw material for obtaining the nut liquid (LCC), a viscous mixture of brownish color, with important applications in the chemical and pharmaceutical industry. Several compounds are found in LCC, such as cardol, cardanol, methyl cardol and anacardic acids. AA's are compounds considered to be phenolic lipids because they have a long carbon chain with different degrees of unsaturation. Studies show that the AAs present in the LCC have been efficient in the treatment of several pathologies. Its antimicrobial, antitumor, antioxidant and antiinflammatory activities are well discussed, which justifies the relevance of studies of the chemical structures of these compounds, mainly to serve as a framework for the developers of new drugs. In this sense, the present work aims to isolate and identify the chemical constituents present in the LCC (Anacardium occidentale L. var. Nanum), as well as to evaluate their inhibition potential against the enzymes Acetylcholinesterase (AChE) and Histone Deacetylase (HDAC), by the method in silico. Isolation of the constituents was performed by acidified chromatographic column, calcium hydroxide precipitation and liquid-liquid extractions. In the structural identification of the constituents, HPLC-MS, GC-MS, IR and mono and twodimensional NMR were used. Tri-unsaturated anacardic acid was isolated and a mixture of AA was identified, also as a mixture of tri-unsaturated cardol and cardanol, monounsaturated cardanol and fatty acids. The study of in silico for the potential inhibitor of the enzymes Acetylcholinesterase and Histone Deacetylase was carried out with the components of the LCC identified in this work, whose side carbon chain was tri-unsaturated. Tri-unsaturated anacardic acid had higher affinity for the two enzymes tested (-9.6 and -8.3 Kcal / mol), due to lower energy of ΔG and change in spatial conformation of almost zero, while cardol (-8, 3 and -4.3 Kcal / mol) and cardanol (-8.1 and -6.6 Kcal / mol) had higher ΔG and consequently lower affinities for enzymes.

Keywords: Cashew nut liquid, Anacardic acid, Acetylcholinesterase, Histone deacetylase, Molecular docking.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Aplicações Farmacológicas dos Ácidos Anacárdicos	5
2 - OBJETIVO	14
2.1- Objetivo geral	14
2.2 - Objetivos específicos	14
3 - PARTE EXPERIMENTAL	15
3.1 - Equipamentos e reagentes	15
3.2 - Coleta do material vegetal	16
3.3 - Obtenção do Liquido da castanha do caju (LCC)	16
3.4 - Isolamento dos ácidos anacárdicos	16
3.4.1- Obtenção do AA por cromatografia em coluna	16
3.4.2 - Obtenção do AA por precipitação	17
3.5- Separação do cardol e cardanol	17
3.5.1- Separação do cardanol	17
3.5.2 - Separação do cardol	17
3.6 - Esterificação	17
3.6.1 - Esterificação com trifluoreto de boro metanólico (BF ₃ /metanol)	18
3.7 - Identificação estrutural	18
3.8 - Estudo <i>in silico</i> – Docking Molecular	18
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1- Identificação do constituinte da fração EH2	22
4.2 - Identificação dos constituintes da fração EH1	29
4.3 - Identificação dos constituintes das frações em EH2CN e EH2CO	35

4.4 - Identificação dos constituintes da fração MAA	41
4.5 - Estudo <i>in silico</i> - Docking Molecular	45
5 - CONCLUSÃO	50
6 - REFERENCIAS	51

1 - INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para fins alimentício e medicamentoso é comum a várias culturas ao longo da história da humanidade e, ainda hoje, representa uma importante via. A aplicação de estudos científicos na busca pela comprovação da aplicação tradicional terapêutica representa uma área de pesquisa com um grande volume de trabalhos publicados. O Brasil destaca-se mundialmente em relação a sua biodiversidade e cada dia as plantas vêm sendo utilizadas como objeto de estudo em busca de alternativas terapêuticas e desenvolvimento de novos fármacos. Apesar disso, existe ainda um considerável número de espécies sem registro de estudos de sua aplicação ou que, mesmo já estudadas, não apresentam estudos acerca das mais diferentes aplicações.

A espécie *Anacardium occidentale* (FIGURA 1) pertencente à família *Anacardiaceae*, é uma planta tropical nativa do Nordeste do Brasil, sendo encontrada principalmente nas zonas costeiras, fazendo parte da vegetação de praias, dunas e restinga. Sua cultura é perene e o gênero está disperso por quase todo território nacional. Somente na região Nordeste, a cajucultura compreende uma área plantada superior a 650 mil hectares (KIAMETIS, 2012). O cajueiro tem sido descrito, há séculos, como uma ótima fonte medicinal, com relatos de aplicações como analgésico, diurético, líquido para higiene bucal, tratamento de astenia, problemas respiratórios, gripe, bronquite, tosse, escorbuto infantil, eczema, infecções genitais, sarna, doenças de pele, verrugas e feridas (MAZZETTO et al., 2009). O cajueiro anão precoce (Anacardium occidentale L. var. *nanum*) tem sido cultivado na região Nordeste do Brasil, pois apresenta porte reduzido das plantas, facilitando a colheita manual do pedúnculo, apresenta pedúnculos com elevados teores de açúcares, menor teor de taninos oligoméricos e produtividade satisfatória.



Figura 1. Anacardium occidentale L. var. nanum, cajueiro (Fonte: Vyvian Soares)

O fruto do caju, popularmente conhecido como castanha de caju ou castanhado-Brasil, representa importante atividade econômica para o Brasil. Cerca de 95% da produção nacional encontra-se na região do Nordeste onde é atribuído as maiores plantações de cajueiro trazendo benefícios ao país e gerando empregos à população. A produção de amêndoa da castanha do caju destina-se tradicionalmente a exportação, produzindo uma receita anual de US\$ 145 milhões de dólares e gerando 36 mil empregos diretos no campo e 15 mil empregos na indústria (KIAMETIS, 2012). Outras partes do cajueiro também são aproveitadas, como o pedúnculo, riquíssimo em vitamina C é consumido *in natura* ou utilizados na fabricação de doces, sucos, vinhos e vinagre de ótima qualidade, além do valor nutricional.

Embora o Brasil esteja colocado entre os três maiores produtores de castanha de caju do mundo, um dos principais derivados deste produto – O líquido da casca da castanha de caju (LCC), devido seu baixo valor agregado, não representa um volume significativo em termos de exportação. Observando esta contradição, vários grupos de pesquisa têm dedicado seu tempo para investigar a química e aplicação do LCC, e de seus derivados, em diferentes áreas como, indústrias automobilísticas, farmacêuticas e cosméticos.



Figura 2. Caju, castanha e o LCC (Fonte: MAZZETTO, 2009)

O Liquido da casca Castanha do Caju (LCC), presente no mesocarpo da castanha (**FIGURA 2**), compreende por um óleo viscoso, cáustico, de cor marrom escuro e constitui cerca de 20 a 25% do peso da castanha de caju. Seus constituintes químicos apresentam um anel aromático contendo uma cadeia alquílica lateral com 15 átomos de carbono. Quanto ao grau de instauração, a cadeia lateral pode ser: saturada (C₁₅H₃₁) ou insaturada com uma (C₁₅H₂₉), duas (C₁₅H₂₇) ou três (C₁₅H₂₅) insaturações, sendo o primeiro carbono olefínico na posição C8. A cadeia lateral contendo 3 insaturações está presente em maior proporção, enquanto o saturado aparece em menor quantidade. No entanto, a quantidade de monoeno é maior do que a de dieno no ácido anacárdico e no cardanol, e menor no cardol. O principal componente do LCC é o ácido anacárdico (ácido 3-n-pentadecilsalicílico), presente em 80-90%, enquanto o cardol (3-n-pentadecilresorcinol), o cardanol (3-n-pentadecilfenol) e o metilcardol (2-metil-5-n-pentadecilresorcinol) estão presentes em menores quantidades (**FIGURA 3**) (AGOSTINI-COSTA et al., 2003).



Figura 3. Estrutura dos principais componentes do LCC. Fonte: Autoria Própria

O LCC é considerado fonte natural de lipídeos fenólicos e pode ser classificado como natural e técnico. Os componentes do LCC variam muito com o processo de extração, ao qual pode ser inicialmente extraído com o uso de solvente orgânico, por meio de imersão das cascas íntegras ou maceradas, onde obtém-se o LCC Natural cujo componente majoritário (**FIGURA 3**) será o ácido anacárdico (65 - 90%), seguido de cardol (15-31%), cardanol (10-22%) e traços de metil-cardol. Porém, a extração que houver incidência de temperatura, ocorrerá variação na composição do LCC devido à instabilidade térmica do ácido anacárdico que é facilmente descarboxilado durante o processo de extração a quente. A esse processo o LCC é denominado LCC Técnico com composição majoritária de cardanol (60 a 95%), cardol (4 a 19%), ácido anacárdico (1 a 2%), e 2-metilcardol (1,2 a 4,1%) (PARAMASHIVAPPA et al., 2001; LUBI et al., 2000; RODRIGUES et al., 2011; GANDHI et al., 2012).

A fonte mais conhecida de ácidos anacárdicos é a castanha de caju (*Anacardium occidentale*), mas ocorrem também nas folhas e nozes da *Ginkgo biloba* e em outros materiais vegetais (GELLERMAN et al., 1968). A extração do ácido anacárdico a partir da castanha de caju é mais frequente devido ao cajueiro ser facilmente encontrado em quase todo o pais, diferente da *Ginkgo biloba*.

Os derivados fenólicos do LCC são muito versáteis para várias transformações químicas, devido ao seu caráter aromático e acíclico e a existência de grupos

funcionais no anel aromático (KIAMETIS, 2012) o que não só lhes conferem comportamento anfipático, como torna o LCC uma matéria prima bastante versátil do ponto de vista sintético, visando a obtenção de fármacos (VIEIRA, 2007). O tamanho da cadeia lateral e a variação das insaturações influenciam diretamente na atividade biológica dos ácidos anacárdicos. (KUBO et al., 2005)

1.1 - Aplicações Farmacológicas dos Ácidos Anacárdicos

Estudos comprovam que os ácidos anacárdicos presentes no LCC *Anacardium occidentale* têm sido eficientes no tratamento de diversas patologias. Suas atividades antimicrobiana, antitumoral, antioxidante e anti-inflamatória, são bem discutidas, o que justifica a relevância de estudos das estruturas químicas dos ácidos anacárdicos, principalmente, para servir de arcabouço aos desenvolvedores de novos medicamentos. Outras situações clínicas, que possuem pesquisas mais recentes, como no tratamento ação anticonvulsivante e ansiolítica abordam a necessidade de resultados científicos que elucidem os mecanismos de ação dessas moléculas e, consequentemente possa servir como novas alternativas de terapias medicamentosas para essas e outras patologias.

Atividade antitumoral

Os ácidos anacárdicos foram avaliados quanto aos efeitos anticancerígenos no apoptose celular do câncer prostático e os mecanismos moleculares desse fenômeno. Como resultado, demonstraram que essa substância induz a apoptose celular do câncer prostático através de autofagia pela via de sinalização do estresse ER / DAPK3 / Akt. Portanto, ao apresentar potencial, esse estudo sugere ao constituinte majoritário do LCC como possível novo fármaco para o tratamento do câncer prostático (TAN et al., 2017). Tais substâncias foram ainda testadas quanto aos efeitos e mecanismos do ácido anacárdico no ciclo celular de células LNCaP de câncer de próstata humano. Os autores concluíram que o ácido anacárdico pode inibir a proliferação de células LNCaP, que é mediada pela regulação positiva da proteína P27 relacionada ao ciclo celular, e regulação negativa de CDK4, CDK6 e ciclina D1, interrompendo assim as células na fase G0 / G1 (LIU et al., 2015).

Estudos apontam a ação do ácido anacárdico (AA) sobre as células do câncer de mama triplo negativo (TNBC), que é um tipo de tumor mais agressivo devido a sua

maior chance de retorno após o tratamento. Os resultados de seu estudo mostraram que o AA inibiu a proliferação celular, provocou a interrupção do ciclo celular na fase G0 / G1, suprimiu a invasão e migração celular e induziu a apoptose nas células MDA-MB-23. Portanto, propõem-se que o AA tem certa atividade antitumoral e merece uma investigação mais aprofundada podendo servir de base para o desenvolvimento de combinações de medicamentos racionais para o tratamento de TNBC (ZHAO et al., 2018).

Observa-se ainda o registro do efeito terapêutico do ácido anacárdico no câncer de pâncreas *in vitro* e a elucidação de seu mecanismo básico. É Demonstrado que, o ácido anacárdico induziu um efeito anticancerígeno nas linhagens celulares de câncer de pâncreas de maneira dose-dependente e aumentou a citotoxicidade de 5-Fluorouracil ou Gencitabina pela via sinalização com as biomoléculas Proteína Modificadora da Cromatina 1A (Chmp1A), Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM) e p53. Em resumo, os dados sugerem que o ácido anacárdico pode ser um suplemento complementar promissor para retardar o início ou a progressão do câncer de pâncreas (PARK et al., 2018).

Atividade antimicrobial

Os AA's apresentam comprovado atividade antimicrobial, observa-se o efeito da impregnação desses sobre as superfícies dos cateteres para a prevenção de contaminação de *Staphylococcus aureus* e formações de biofilme. O AA quando atravessa a bicamada lipídica da membrana bacteriana causa o rompimento da mesma, bloqueando desta forma a atividade da enzima NADH oxidase e, consequentemente, o transporte de elétrons para respiração celular induzindo a apoptose. Os autores sugerem ainda em seus resultados que os cateteres de silicone impregnados com ácido anacárdico podem ajudar na prevenção de infecções estafilocócicas com esses implantes (SAJEAVAN et al., 2018).

Os AA's apresentam alta atividade contra metacestóides de *Echinococcus multilocularis* e *Echinococcus granulosus* sensu stricto (*E. granulosus* ss) *in vitro* e *in vivo*. Tendo como possível mecanismo de ação contra espécies de *Echinococcus* a supressão da angiogênese na massa do metacestóide através da inibição das vias de sinalização induzidas pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), apresentando assim, os AA's como potenciais candidatos promissores para o tratamento de equinococose (YUAN et al., 2019).

Outras atividades

Os AA's exibem atividades anticonvulsivantes e antioxidantes significativas e podem ser usados como um produto natural promissor para o tratamento da epilepsia. Estudo aponta o efeito anticonvulsivante, em modelos murinos, bem como suas ações antioxidantes em *Saccharomyces cerevisiae* mutado para superóxido dismutase (SOD) (GOMES JÚNIOR et al., 2018a).

Tem-se ainda a avaliação da eficácia dos AA's para o tratamento da ansiedade, bem como seu papel no estresse oxidativo em camundongos. Os dados obtidos numa análise estatística por correlação de Pearson, indicaram correlação positiva entre o efeito ansiolítico do AA, atividade antioxidante e inibitória da peroxidação lipídica. Além disso, o aumento da atividade da CAT e as concentrações de GSH no hipocampo e no córtex frontal de camundongos, também foram complementares ao dano genotóxico reduzido observado no estudo. Um fator importante é que o AA não produziu efeitos miorrelaxantes e sedativos, nem causou a diminuição na atividade locomotora (GOMES JÚNIOR et al., 2018b).

Devido às características estruturais dos AA's e seu pontencial antioxidante, os pesquisadores avaliam a viabilidade de incorpora-lo a membrana celular, assim como a vitamina E, reforçando a barreira contra as espécies reativas do metabolismo do oxigênio, diminuindo a incidência daquelas espécies no meio intracelular (VIEIRA, 2007).

Estudo computacional: modelagem molecular

A busca por novos fármacos tem sido um desafio para pesquisadores e para indústria farmacêutica, uma vez que o desenvolvimento de um produto passa por um complexo sistema de etapas clínicas e pré-clínicas, as quais demandam tempo de pesquisa e custos elevados. Diante deste cenário, a utilização de métodos computacionais (*in silico*) no estudo e planejamento de moléculas bioativas tem se tornado uma prática cada vez mais frequente. O desenvolvimento de testes *in silico* permite a simulação da eficácia, atividade, toxicidade e bioavaliabilidade, antes mesmo do composto ser submetido a ensaios *in vivo* direcionando as pesquisas a fármacos com alvos clínicos determinados (ZHENG, THORNE, McKEN 2013).

Os Programas de química computacional e os bancos de dados em redes, tornam-se, a cada dia, ferramentas essenciais para a descoberta de moléculas bioativas e planejamento de novos fármacos, pois possibilitam o estudo teórico das interações relacionadas a estrutura-atividade de forma tridimensional (GUIDO, ANDRICOPULO, OLIVA 2010).

Os dados de mapeamento de estruturas 3D de alvos moleculares (enzimas, receptores, proteínas, DNA e RNA) a seus ligantes (moléculas orgânicas sintéticas, semissintéticas ou originadas de produtos naturais) possibilitam o estudo da afinidade e seletividade ao alvo selecionado. Sendo os produtos naturais uma fonte extensa de moléculas, os estudos *in silico*, permitem apresentar essa variedade de estruturas, em suas mais diferentes potencialidades biológicas, auxiliando na descoberta de novos fármacos (RODRIGUES et al., 2012; BERLINK, 2017).

Acetilcolinesterase (AChE)

Além das atividades biológicas citadas anteriormente, os constituintes do LCC, lipídeos fenólicos não-isoprenóides, estão sendo estudados com a perspectiva de atuarem como novos candidatos a agentes terapêuticos com perfil de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE).

A acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) é um componente chave das sinapses cerebrais colinérgicas e das junções neuromusculares. O principal papel biológico da enzima é o término da transmissão do impulso pela rápida hidrólise do neurotransmissor catiônico acetilcolina (ACh) em colina e acetato, como mostrado no esquema abaixo (TOUGU, 2001).



Esquema 1. Reação de biossíntese e degradação da acetilcolina

As enzimas acetilcolinesterase e a colina acetiltransferase (ChAT) compõe o sistema colinérgico e são responsáveis pela hidrolise e pela biossíntese da acetilcolina (ACh), respectivamente e, pelos receptores colinérgicos chamados de muscarínicos e nicotínicos. Estes receptores quando ativados pelo neurotransmissor colinérgico

ACh são essenciais para as mais variadas funções no sistema nervoso central e periférico (SILVA, 2017).

A ACh é um neurotransmissor formado na região terminal dos neurônios, chamada de axônio terminal. Ela permanece armazenada em vesículas sinápticas e, quando um impulso nervoso chega no axônio terminal, é liberada pelo neurônio para a região sináptica, onde é atraída pelos receptores colinérgicos que estão localizados no próximo neurônio. Quando a ACh interage com os receptores regenera o impulso nervoso no neurônio, levando assim a continuidade da transmissão (PETRONILHO,2011).

A redução nos níveis normais de acetilcolina acarreta a diminuição da neurotransmissão colinérgica cortical, ocasionando também alterações em outros neurotransmissores, como noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato entre outros (VIEIRA, 2007; TABARRINI, et al., 2001).

Essa disfunção atribuída a alterações na neurotransmissão colinérgica está associada a um dos fatores agravante da doença de Alzheimer (DA), embora o déficit de neurônios colinérgicos seja causado por outros fatores como toxicidade das placas β -amilóides e emaranhados neurofibrilares (MANUEL et al., 2016). Contudo, os principais tipos de drogas que receberam aprovação da FDA para o tratamento a DA são voltados para a inibição da acetilcolinesterase (AChE) (JIN et al., 2010)

De natureza crônica e progressiva, o Doença de Alzheimer compromete gravemente a qualidade de vida dos portadores, cuja evolução da doença envolve múltiplas perturbações incluindo memória, atenção e aprendizado, pensamento, orientação, compreensão, cálculo, linguagem e julgamento além da perda do controle emocional, comportamento social ou motivação (VIEIRA, 2007).

Na perspectiva de uma melhora no perfil cognitivo e comportamental, a hipótese colinérgica tem servido de base para a maioria das estratégias de tratamento e abordagens de desenvolvimento de fármacos para a DA, como os inibidores reversíveis de acetilcolinesterase que consiste na tentativa de restabelecer os níveis normais de acetilcolina, precursores colinérgicos, agonistas de receptores colinérgicos, bloqueadores dos receptores NMDA (VIEIRA, 2007; SILVA, 2017).



Figura 4. Estrutura de AChE humana mostrando a entrada da garganta (gorge) e os importantes resíduos de aminoácidos do sítio ativo. Fonte: BENNION et al., 2015

A estrutura cristalina da AChE confirma o mecanismo de ação do sítio ativo ou catalítico. O sítio ativo da AChE é composto por uma tríade catalítica composta por resíduos de aminoácidos serina (Ser200), histidina (His-440) e glutamato (Glu-327) na parte inferior de um estreitamento semelhante a uma garganta (*gorge*) com profundidade de 20 Å (**FIGURA 4**) revestida pelos anéis de 14 resíduos aromáticos. O mecanismo de hidrólise de AChE envolve o ataque nucleofílico da serina ao carbono carbonílico da ACh, gerando um intermediário tetraédrico estabilizado por ligações de hidrogênio, o qual produz colina livre e serina acetilada. Ao final, a hidrólise do grupo acetila da serina pela água recupera o sítio catalítico da enzima (VIEGAS et al., 2004; SOUZA, 2011; SUSSMAN et al., 1991). Além da tríade catalítica outros resíduos de aminoácidos funcionais são identificados na AChE como o sitio aromático (Trp84, Tyr133, Tyr330, Phe331), o sítio periférico (Trp279, Tyr334) e o bolso acil (Phe288, Phe290) (ARIEL et al., 1998)

É importante ressaltar que o orifício oxianiônico (átomos de nitrogênio da cadeia principal de Gly121, Gly122 e Ala204) proporciona uma estabilização crucial dos estados de transição de acilação e desacilação estabilizando o acúmulo de carga negativa no oxigênio carbonílico (BENNION et al., 2015).

Após o reconhecimento molecular pelos resíduos aromáticos Asp72 e Tyr70, situados entre o sitio aniônico periférico e o sitio catalítico, a ACh move-se para o fundo do gorge ligando-se a tríade catalítica, onde a AChE hidrolisa a ACh em acetato e colina. Ainda entre o sítio aniônico periférico e o sitio catalítico, a ACh interage com os resíduos Phe330, Tyr70 e Tyr121, que atuam por meio de interações hidrofóbicas-aromáticas com espaçadores metilênicos contendo o máximo de 8 carbonos. O sítio

aromatico e uma subunidade hidrofóbica na qual o grupo amino terciário da ACh interage com o resíduo aromatico Trp84 via cation- π . O resíduo Phe331, também pertencente ao sítio aromático, pode atuar por meio de interações apolares ou π stacking, dependendo do substrato (KIAMETIS, 2012; BENNION et al., 2015; XU, et al., 2008).

Oliveira et al. (2011) em seu estudo avaliou, através de teste qualitativo, a inibição da enzima AChE por TLC de acordo com a metodologia descrita por Elmann, que foi posteriormente adaptada por Rhee et al. (2001). Este bioensaio consiste na aplicação da amostra em placas de TLC e pulverização da placa com o reagente de Ellman. Segundo os autores, o Carbacol é utilizado como padrão de comparação pois é um carbamato cujo mecanismo de reação com AChE é importante porque é um análogo isostérico de acetilcolina. Como resultado, o Cardol e Cardanol exibiram as zonas de inibição maiores que o padrão carbacol e o ácido anacárdico apresentou menor inibição para AChE.

Kiametis et al (2017) em seu artigo trabalhou a modelagem molecular de novos agentes terapêuticos adotando para estudo a hipótese colinérgica de potenciais inibidores da acetilcolinesterase para o tratamento da doença de Alzheimer. De acordo com os autores, para modular positivamente a função colinérgica através da inibição da acetilcolinesterase, um conjunto de candidatos foi desenhado a partir de um composto natural extraído do líquido do cajueiro, o ácido anacárdico. Como resultado, o acoplamento protéico-ligante mostrou modos de ligação estáveis e a energia livre de ligação calculada para o sítio ativo do receptor sugerindo que seu ligante apresenta uma resposta biológica potencial.

Histona deacetilase (HDAC)

O DNA da célula eucariótica está compactado em torno de octâmeros de histonas altamente conservadas, uma estrutura proteica constituída por duas moléculas de cada um dos quatro tipos histonas sendo elas H2A, H2B, H3 e H4. O complexo histonas/DNA é chamado de nucleossoma que, por sua vez, são empacotados uns sobre os outros de variadas formas englobando proteínas adicionais que, como um todo constituem a unidade estrutural da cromatina (AUSIO et al., 2003).

Roger D. Kornberg, ganhador do prêmio Nobel de Química de 2006 concedido pela Academia Real de Ciências da Suécia, em Estocolmo, motivado pelos seus estudos sobre as bases moleculares da transcrição gênica em eucariotos, contribuiu fundamentalmente para os estudos das funções moleculares envolvendo a transcrição do DNA (MALNIC, 2006). Em 1977 Kornberg publicou um dos estudos pioneiros que descreve a estrutura da cromatina evidenciando a existência, composição e estrutura dos nucleossomos (KORNBERG, 1977).

O evento dinâmico pelo qual ocorre a acetilação das histonas, mediado pelas enzimas histonas acetiltransferase (HAT) e histonas deacetilase (HDAC), envolve os processos de adição e remoção dos grupos acetila presentes nos resíduos de lisina das caudas *N*-terminais das histonas (TRISCIUOGLIO et al., 2018; SUN et al., 2006). As histonas deacetilases são um grupo de enzimas que retiram os grupos acetil das histonas, assim como em proteínas não histonas. Elas são conhecidas como moduladores da transcrição gênica e estão associados à proliferação e diferenciação de vários tipos de células e à patogênese de algumas doenças graves como o câncer (TANG; YAN; ZHUANG, 2013).

As HDACs são divididas em quatro classes: I (HDAC1, -2, -3 e -8), II (HDAC4, -5, -6, -7, -9 e -10), III (Sirt1, -2, -3, -4, -5, -6 e -7) e IV (HDAC11). As HDACs de classe I amplamente expressas são localizadas exclusivamente no núcleo, enquanto as HDACs de classe II, mais restritas, circulam entre o núcleo e o citoplasma (DE RUIJTER et al., 2003). Evidências discutidas por Peterson (2002) demonstram que essas diferentes HDACs têm como alvo diferentes padrões de acetilação e regulam diferentes genes.

A remoção dos grupos acetil das proteínas é realizada a partir de dois mecanismos diferentes. A "família clássica" que compreende as classes I, II e IV, se refere as amino-hidrolases dependente de Zn²⁺, em que o íon estabiliza o substrato acetilado no centro catalítico da enzima e polariza o grupo carbonila tornando o carbono mais suscetível ao ataque nucleofílico de moléculas de água (FINNIN et al, 1999). Por outro lado, as enzimas de classe III dependem do Dinucleótido de Nicotinamida-Adenina (NAD+) para sua catálise (SCHEMIES et al, 2010).

Finnin et al. (1999) em seu trabalho descreveram a estrutura do núcleo catalítico da enzima histona deacetilase, evidenciado pela estrutura cristalina de um homólogo da bactéria hipertermofílica Aquifex aeolicus, que compartilha 35,2% de

identidade com HDAC1 humana ao longo de 375 resíduos, desacetila histonas *in vitro* e é inibida por tricostatina A (TSA) e o ácido hidroxâmico suberoilanilida (da sigla em inglês SAHA). De acordo com os autores, nos resultados obtidos o sítio ativo das interações consiste em uma bolsa tubular e contém resíduos na borda da bolsa (Pro 22, Tyr 91, Phe 141). Como conclusão do trabalho, foi observado que, com exceção do Tyr 91 dos resíduos, a interação de TSA é idêntica em HDAC1, sugerindo que TSA pode ligar e inibir HDAC1 de uma maneira similar.

A utilização de inibidores das enzimas histonas deacetilase vem sendo aplicada, principalmente, no tratamento do câncer. As neoplasias mieloproliferativas BCR-ABL-negativas (MPNs), por exemplo podem ser farmacologicamente manipuladas com inibidores da histona desacetilase (HDACIs), que provaram ser clinicamente eficazes no tratamento de MPNs mas exibem toxicidade limitante da dose (CARDOSO et al., 2019).

2 - OBJETIVO

2.1- Objetivo geral

O presente trabalho visa isolar e identificar os constituintes químicos presentes no líquido da castanha de caju (*Anacardium occidentale L.* var. *nanum*), bem como, avaliar seu potencial de inibição frente as enzimas Acetilcolinesterase e Histona Deacetilase, pelo método *in silico*.

2.2 - Objetivos específicos

- Obter o LCC natural a partir da castanha de caju (*Anacardium occidentale L. var. nanum*), através de extração à frio em hexano;

 Fracionar o LCC em seus constituintes por técnicas de cromatografia em coluna, extração líquido-liquido e precipitação;

 Determinar a estrutura das substâncias isoladas através de métodos espectrométricos como RMN de ¹H, de ¹³C e outros experimentos (DEPT, HMBC, HMQC, COSY), além de CLAE-EM, IV e EM e comparação com dados da literatura;

Identificar os derivados metilados obtidos por cromatografia gasosa acoplada
a espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia líquida acoplada a
espectrometria de massas (CLAE-EM);

 Avaliar o potencial inibidor das substâncias identificadas frente as enzimas acetilcolinesterase e histona deacetilase, pelo método *in silico*.

3 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1 - Equipamentos e reagentes

O processo de separação por cromatografia em coluna (CC) foi realizado utilizando-se sílica gel 60 (0,063–0,040 mm) da Macherey-Nagel, ácido cítrico e ácido fórmico da marca Neon. Os solventes e reagentes utilizados para o preparo do extrato, separações por CC, esterificação e isolamento por precipitação foram todos de grau analítico das marcas Vetec, Synth, Cromoline, Chemco e Aldrich. A eliminação dos solventes dos extratos e das frações obtidas no seu fracionamento foi realizada sob pressão reduzida em evaporador rotativo da marca Fisaton. A centrifugação da amostra esterificada foi conduzida utilizando o aparelho da marca Quimis modelo Q222T284.

Os experimentos de RMN uni (¹H e ¹³C) e bidimensionais (¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HSQC e ¹H-¹³C HMBC) foram adquiridos a 23°C utilizando CDCl₃ e conduzidos em aparelho espectrômetro BrukerTM 400 MHz ASCEND III, operando a 9,4 Tesla, observando os núcleos de ¹H e ¹³C a 400,13 e 100,13 MHz, respectivamente, equipado com sonda de detecção direta de 5 mm e gradiente de campo no eixo *z*. Os experimentos de correlações direta e a longa distância ¹H-¹³C HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*) tiveram suas constantes de acoplamento médias otimizadas ¹*J*(H,C) e ^{LD}*J*(H,C) de 140 e 8 Hz, respectivamente. Os deslocamentos químicos de RMN de ¹H e de ¹³C foram expressos em relação ao sinal do TMS em δ 0,00 (composto de referência) e as constantes de acoplamento (*J*) foram expressas em Hz. As análises por CG-EM foram realizadas em aparelho da Shimadzu modelo QP2010 SE.

As condições de análise por CG-EM foram: temperaturas do injetor e da interface, 280 °C, Temp. inicial da coluna 100 °C, durante 1 min, sendo aumentada 4 °C/min, até atingir 280 °C; fluxo do gás de arraste (He) foi de 1,8 mL/min. Os espectros na região do Infravermelho foram obtidos em aparelho da Perkin Elmer modelo Spectrum Two ATR-FTIR. As análises em CLAE-EM foram realizadas na Universidade de FIOCRUZ – Minas Gerais no instrumento ESI-qTOF (maXis, Bruker) acoplado com uma UHPLC (Nexera, Shimadzu). Condições de análise: Coluna Supelco Discovery BIO widepore, 300^a, C5um, 150x2.1mm; fluxo de 400ul/min; Eluente A 0,1% ácido fórmico (HFO) em dH₂O, Eluente B 0,1% ácido fórmico (HFO)

em ACN; Temperatura de 65 °C; detector PDA, 190-450nm; solvente de lavagem 50% 2-Propanol; gradientes dos solventes em 0.5 min 5% B, 10.5 min 100% B, 12 min 100% B, 12.5 min 5% B e 15 min 5% B.

3.2 - Coleta do material vegetal

As castanhas submetidas a este estudo foram coletadas no cajueiro (*Anacardium occidentale* L. var. *nanum*) do jardim da universidade estadual do sudoeste da Bahia (UESB), Campus de Jequié. Foram selecionadas as castanhas inteiras com boa aparência seguida de lavagem e secagem antes de iniciar a extração do LCC.

3.3 - Obtenção do Liquido da castanha do caju (LCC)

A extração do LCC foi conduzida em balão de extração, onde as castanhas de caju trituradas (1,2 Kg) foram maceradas utilizando hexano (2 L) como solvente extrator. Foram realizadas duas extrações consecutivas, por 48 h cada, à temperatura ambiente. A cada extração houve a remoção e renovação do solvente. Após esse tempo, os solventes combinados foram filtrados e concentrados a vácuo, fornecendo 570g de LCC natural (extrato bruto, EH), que foi armazenado em freezer a -20°C e utilizado de acordo a necessidade.

3.4 - Isolamento dos ácidos anacárdicos

Foram realizadas duas técnicas para o isolamento dos AA presentes no LCC. Visando verificar métodos com bons rendimento e pureza.

3.4.1- AA por cromatografia em coluna: Com o intuito de isolar o AA, o LCC (10 g) foi fracionado em coluna cromatográfica, empacotada com 250g de sílica gel 60, diâmetro de partícula entre 0,063-0,200 nm, acidificada com 5% de ácido cítrico anidro. Tendo como fase móvel hexano/ácido fórmico a 1% (hex:AF 1%), seguido de éter etílico 13% em hex:AF 1%.

Visando a purificação do AA a fração obtida anteriormente foi submetida a uma nova coluna empacotada com 20 g de sílica gel 60, acidificada com ácido cítrico 5% e eluídas com 150mL de éter etílico 5% em hex:AF 1%. O ácido fórmico presente na fração foi eliminado por extração líquido-líquido com água, até pH neutro. O solvente

foi evaporado a vácuo, obtendo no final, aproximadamente 4g da amostra EH1 (FLUXOGRAMA 1).

3.4.2- AA por precipitação: Para a precipitação dos ácidos anacárdicos, 10 g do LCC foi dissolvido em 63 mL de metanol. Em seguida foram adicionadas, sob agitação, pequenas porções de hidróxido de cálcio (5,25 g). A mistura foi aquecida a 50°C e agitada por 3 horas. Após o término da reação, o precipitado do anacardato de cálcio foi filtrado e completamente lavado com 200 mL de metanol.

A massa foi cuidadosamente armazenada para evaporação total do solvente. O filtrado foi preservado para isolamento do cardol e cardanol. O anacardato de cálcio (10,9 g) foi suspenso em 46 mL de água destilada e 7 mL HCl (11M), o sistema foi agitado por 1 hora. A mistura resultante foi extraída com acetato de etila (3 x 50 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em rota evaporador obtendo 3g da amostra EH2 (**FLUXOGRAMA 2**).

3.5- Separação do cardol e cardanol

3.5.1- Separarão do cardanol: A solução metanólica obtida após a filtração do anacardato de cálcio foi concentrada em rota evaporador e redissolvido em 200 mL de hidróxido de amônio a 25%, agitado por 15 minutos. A solução foi extraída com uma mistura hexano: acetato de etila (98:2) (3 x 67 mL). A fase orgânica foi lavada com solução de NaOH a 2,5% (200 mL), seguida por solução de HCI a 5% (100 mL) e água destilada (100 mL). A fase orgânica foi seca sob sulfato de sódio anidro e concentrado para obtenção do cardanol (40,3 mg) (EH2CN) (**FLUXOGRAMA 3**).

3.5.2 - Separarão do cardol: A solução metanólica amoniacal foi extraída com uma mistura de acetato/hexano (80:20) (200 mL). A fase orgânica foi lavada com HCl a 5% (100 mL) seguida por água destilada (100 mL), e seco sob sulfato de sódio anidro, e concentrado para obter cardol (16,2 mg) (EH2CO) (**FLUXOGRAMA 3**).

3.6 - Esterificação

O processo de esterificação foi realizando visando a obtenção de uma fração analisável por CG-EM.

3.6.1 - Esterificação com trifluoreto de boro metanólico (BF₃/metanol)

Foram adicionados a 50 mg da amostra (EH1), cerca de 500 µL de BF₃/MeOH 14% sob agitação a 80°C por 15 minutos. A amostra esterificada foi purificada por extração líquido-líquido com solvente ativo. O extrato foi redissolvido em 3 mL de acetato de etila, seguido de três extrações com KOH aquoso a 5%. A fase orgânica foi ainda extraída, por três vezes, com HCl aquoso a 5%. A fração orgânica foi lavada com 3 mL de água, sendo então centrifugado durante 10 min a 6000 rpm. O solvente foi evaporado à secura e codificada como MAA (**FLUXOGRAMA 1**).

3.7 - Identificação estrutural

Os constituintes obtidos foram identificados através das análises espectrométricas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H, de ¹³C e outros experimentos (DEPT, HMBC, HMQC, COSY), espectroscopia na região do Infravermelho (IV), Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de Massas (CG-EM), além da Cromatografia Liquida de Alta eficiência acoplada a espectrometria de Massas (CLAE-EM) utilizando gradiente isocrático de 100% acetonitrila para identificação do AA e comparação com dados da literatura.

3.8 - Estudo in silico – Docking Molecular

A estrutura de cada molécula alvo (transcrições entre genes) foi obtida a partir do PDB⁵. Todas as estruturas de compostos do Liquido da Castanha de Caju (LCC) foram desenhados no ACD/Chemsketch e salvas no formato sdf. Além disso, estruturas de ligantes foram previamente verificadas por Marvin 15.4.20⁷ para estudos de ancoragem. Antes dos cálculos do docking, usamos o Autodock Tools 1.5.6 para preparar as estruturas de proteínas e ligantes de acordo com as seguintes etapas: (1) definir uma grade para cada proteína alvo, considerando cada sítio ativo previamente descrito por estudos cristalográficos; (2) verificar cada estrutura do ligante para torções, bem como a adição de hidrogênios polares, cargas de Gaigster e Kollman e (3) salvar todas as moléculas no formato pdbqt. Autodock Vina foi utilizado para calcular as energias de afinidade para cada complexo.

FLUXOGRAMA 1- Marcha fitoquímica para isolamento do ácido anacárdico por coluna cromatográfica



FLUXOGRAMA 2- Marcha fitoquímica para isolamento do ácido anacárdico por precipitação



FLUXOGRAMA 3 - Marcha fitoquímica para o isolamento do cardol e cardanol.



4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Identificação do constituinte da fração EH2



A substância em EH2 foi isolada na forma de um óleo viscoso acastanhado solúvel em solventes orgânicos. A elucidação estrutural foi baseada na análise dos dados espectrofotométricos de IV, RMN mono e bidimensionais. O constituinte presente na fração EH2 foi confirmado como sendo o ácido anacárdico *tri*eno – {**ácido 2-hidroxi-6-[(8'Z,11'Z)-pentadeca-8',11',14'-trienil]benzóico**}.

As atribuições das principais bandas características no espectro de IV (**FIGURA 5)** revelou a presença do estiramento da ligação de O-H em 3250 cm⁻¹, 3008,7 cm⁻¹ (vC-H, aromático), 2923,2 cm⁻¹ (v_{as} CH₂), 2853,7 cm⁻¹ (v_s CH₂), 1607-1577 cm⁻¹ (vC=C) aromático, 1449 cm⁻¹ (δ_s CH₂, δ_{as} CH₃), 1301,5 cm⁻¹ (vC-O) de ácido, 1647,2 cm⁻¹ (vC=O) de ácido carboxílico, 1245-1207 cm⁻¹ (vC-O) fenol e δ s CH₂ da cadeia alquilica, 991,93 cm⁻¹ (δ CH₂) alqueno terminal, 721,93-707,48 (δ C-H) aromático, sendo consideradas bandas *fingerprint* para ácidos anacárdicos (**TABELA 1**).



Figura 5. Espectro de absorção por refletância total atenuada (ATR: "Attenuated Total Reflectance") na região do Infravermelho da amostra EH2

Frequência	Intensidade	Atribuições	
(cm ⁻¹)		-	
3250	f	OH grupo fenólico associado por ligação de	
		Hidrogênio	
3008,7	f	vCH aromático	
2923,2	F	v _{as} do grupo CH ₂ Alifático	
2853,7	Μ	vs do grupo CH₂ Alifático	
1743,9	Mf		
1647,2	Μ	C=O de ácido carboxílico complexado	
1607	f	vC=C aromático	
1577	Mf	vC=C aromático	
1449	Μ	δ_s (CH ₂), δ_{as} (CH ₃) da cadeia alquílica	
1301,5	f	C-O de ácido carboxílico	
1245	f	v (C-O) fenol + T (CH ₂), ω (CH ₂) da cadeia	
		alquÍlica	
1207	f	C-O fenol	
991,93	Mf	Deformação angular CH ₂ de alqueno	
		terminal	
911,26	Mf		
823,18	Mf	R2C=CHR deformação angular CH fora do	
		plano	
721,93	Mf	Deformação angular CH aromático (3H	
		adjacente)	
707,48	Mf	Deformação angular CH aromático (3H	
		adiacente)	

Tabela 1. Atribuições das principais bandas de absorção do espectro de IV da amostra EH2

F= forte; f= fraca; Mf= muito fraca

O espectro de RMN de ¹H (**FIGURA 6, TABELA 2**) apresentou sinais característico de ácido anacárdico (C15:3) com cadeia alifática apresentando 3 insaturações. Os sinais observados em δ 7,36 (1H, *t*, *J*=8Hz, H4), δ 6,86 (1H, *d* largo, *J*=8Hz, H3) e δ 6,77 (1H, *d* largo, *J*=7,5Hz, H5), relativos a três prótons aromáticos, sendo esse 1,2,3-trissubstituído indicando a presença do ácido anacárdico. O mapa de contornos COSY ¹H-¹H (**FIGURA 11**) confirmou a substituição do anel nas posições 1, 2 e 6. Isto é verificado pelo acoplamento entre H4 e os hidrogênios H3 e H5. Os sinais observados no espectro de RMN de ¹H em δ 5,46-5,31 (4H, *m*, H8', H9', H11' e H12') e δ 5,81 (1H, m, H14'), além de dois duplos dubletos, atribuídos aos hidrogênios metilênicos (H15'), em δ 5,08-503 (1H, *dd*, *J*=1,2 e 10 Hz (*gem* e *cis*)) e em δ 5,00-4,98 (1H, *dd*, *J*=1,2 e 16 Hz (*gem* e *trans*)). Tais atribuições permitiram verificar que a estrutura da molécula isolada possuía a cadeia carbônica lateral *tri*eno, nas posições 8',11' e 14'. Também foram identificados os hidrogênios metilênico (CH₂) observando em δ 2,99 (2H, *t*, *J*=2 Hz, H1'), em δ 2,81 (4H, *m*, H10' e H13'), em δ 2,04 (2H, *m*, H7'), em δ 1,61 (2H, *m*, H2') e um multipleto entre δ 1,38-1,27 (H3' a H6').



Figura 6. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da amostra EH2 e suas ampliações

A análise associada dos espectros de RMN de ¹³C (**FIGURA 7**), DEPT 135 (**FIGURA 8**), HMBC (**FIGURA 9**) e HSQC (**FIGURA 10**) permitiram concluir a atribuição estrutural da substância isolada em EH2. Informações obtidas da análise dos espectros de RMN de ¹³C e DEPT 135 foram observados 22 sinais, destes dez carbonos metilênicos, oito carbonos metínicos e quatro não hidrogenados (C). Na atribuição dos sinais observa-se: três sinais característicos de carbonos metínicos aromáticos δ 122,5 (C5), δ 115,8 (C3) e δ 135,3 (C4), sinal relativo a carbono aromático oxigenado em δ 163,8 (C2); além de dois sinais de carbono aromático substituído em δ 110,5 (C1) e δ 147,7 (C6). Tais atribuições permitiram confirmar, que a estrutura possui um anel aromático trissubstituído. Essa análise permitiu ainda, a identificação dos sinais do carbono carbonilico (δ 176,25) e quinze carbonos da cadeia alquila lateral, entre esses cinco metínicos olefínicos em δ 130,4 – 127,6 (C8', C9', C11' e C12') e δ 136,8 (C14'), além do carbono metilênico olefínico em δ 114,7 (C15').

Permitindo comprovar que a estrutura possui sua cadeia alquila lateral composta por quinze carbonos e *tri*eno (C₁₅H₂₅).

A análise do mapa de contorno HSQC (**FIGURA 10**) confirmou o padrão 1,2,3trissubstituido, pela observação da correlação direta do sinal do próton em δ 7,36 (*t*, *J*= 8 Hz (2x)) ao carbono em δ 135,3, posição 4; o sinal em δ 6,77 (*d*, *J*= 8 Hz) ao carbono em δ 122,5, posição 5 e a correlação entre o sinal em δ 6,86 (*d*, *J*= 8 Hz) ao carbono em δ 115,8, posição 3. A inequívoca posição da cadeia alquilica lateral foi possível graças a análise do espectro de HMBC, onde a correlação entre o sinal do H1' em δ 2,99 acopla com o sinal do C1 em δ 110,5. Outras correlações podem aqui ser destacadas, sendo o sinal de H3 (δ 6,86) correlacionado ao sinal do C1; o sinal em H4 (δ 7,36) correlacionado aos sinais de C6 (δ 147,7) e C2 (δ 163,8), além dos apresentados na **TABELA 2**.



Figura 7. Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) da amostra EH2 e suas ampliações



Figura 8. Espectro de DEPT 135° da amostra EH2

Posição	δ ¹³ C	δ ¹ H (multi.)	COSY	НМВС
1	110,5			
2	163,6			
3	115,8	6,86 (1H, d)	H-(C4)	
4	135,3	7,36 (1H, t)	H-(C5); H-(C3)	C6; C2
5	122,5	6,77 (1H, d)		C1', C1
6	147,7			
1'	36,4	2,99 (2H, t)	H-(C2')	C1; C3'; C5
2'	32,0	1,61 (m)		
3' – 6'	29,7-29,2	1,38-1,27 (m)		C7'; C8'
7'	27,2	2,04 (m)	H-(C6')	C5'; C9'
8' 9' 11' 12'	130,4-127,6	5,46-5,31 (m)	H-(C7')	C10'; C13'
10'	31,7	2,81 (m)		C8'; C12'
13'	25,5	2,81 (m)		C11'
14'	136,8	5,87-5,77 (m)	H-(C15'); H-(C10'); H-(C13')	C12'
15'	114,7	5,08-4,98 (2H, dd)		
COOH	176,0			

Tabela 2. Dados das análises dos espectros de RMN para a amostra EH2



Figura 9. Ampliação do Mapa de contorno HMBC da amostra EH2



Figura 10. Ampliação do mapa de contorno HSQC da amostra EH2



Figura 11. Mapa de contorno COSY da amostra EH2

4.2 - Identificação dos constituintes da fração EH1



A fração semipurificada EH1 foi obtida na forma de um óleo viscoso amarelado, por CC em sílica gel acidificada e eluída com hexano/ácido fórmico. Tal fração foi destinada ainda a outros processos de derivatização e purificação visando a obtenção de outros constituintes químicos, porém sua análise imediata por CLAE-EM permitiu a identificação de uma mistura de ácidos anacárdicos, cuja variação estrutural encontra-se no padrão de saturação da cadeia alquila lateral.

A análise por CLAE-EM de EH1 mostrou no perfil cromatográfico no modo negativo, quatro sinais majoritários com tempos de retenção de 3,00; 3,31; 3,83 e 4,83 min (**FIGURA 13**). Entre esses, o sinal de maior intensidade em 3,00 min, apresentou no espectro de massa o pico do íon molecular m/z 341,1 [M-H], além de m/z 705 [2M+Na-2H] íon relativo a dimerização e m/z 1069 [3M+2Na-3H] íon relativo ao trímero, correspondendo assim a presença do ácido anacárdico *tri*eno (**FIGURA 13-a**). Os dois outros sinais em 3,31 e 3,83 min, apresentaram no espectro de massas os picos dos íons moleculares com m/z 343,3 e 345,4, bem como, os íons relativos a dímeros e trímeros, sendo atribuídos aos ácidos anacárdicos *di* e *mono*eno (**FIGURA 13-b-c**), respectivamente. Em adicional, o sinal de menor intensidade, 4,83 min, com íon molecular m/z 347,5, relativo ao ácido anacárdico de cadeia lateral saturada (**FIGURA 13-d**). Essas analises levaram a concluir que EH2 compõe de uma mistura de ácidos anacárdicos.

Tem-se ainda para a comprovação da composição química de EH1, como preponderantemente formado por uma mistura de ácidos anacárdicos, a análise por espectroscopia de Infravermelho. As atribuições das bandas características mais representativas no espectro de IV (**FIGURA 12**): 3250 cm⁻¹ (vOH), 3008,7 cm⁻¹ (v CH, aromático); 2923,2 cm⁻¹ (v_{as} CH₂), 2853,7 cm⁻¹ (v_s CH₂, cadeia alquilica); 1577–1607 cm⁻¹ (vC=C, aromático); 1449 cm⁻¹ (δ_s CH₂, δ_{as} CH₃, cadeia carbônica alquilica); 1301,5 cm⁻¹ (vC-O) e 1647,2 cm⁻¹ (vC=O) de ácido carboxílico; 1207-1245 cm⁻¹ (vC-O)

O) fenol; (δs CH₂, δas CH₂), 991,93 cm⁻¹ (δas CH), 707,4 -721,93 cm⁻¹ (δs,as CH, aromático).



Figura 12. Espectro de absorção por refletância total atenuada (ATR: "*Attenuated Total Reflectance*") na região do Infravermelho da amostra EH1



Figura 13. Perfil cromatográfico por CLAE da amostra EH1 e seus espectros de massas (a-d)



a. EM do Ácido anacárdico trieno (Tr = 3,00 min)





b. EM do Ácido anacárdico *di*eno (Tr = 3,31 min)



c. EM do Ácido anacárdico monoeno (Tr = 3,83 min)



d. EM do Ácido anacárdico saturado (Tr = 4,83 min)

4.3 - Identificação dos constituintes das frações EH2CN e EH2CO



As frações EH2CN e EH2CO foram obtidas no processo de extração líquidolíquido com solvente ativo, visando a separação entre cardol {**5-(8'Z,11'Z)-penta-8',11',14'-***tri***enilbezeno-1,3-diol)**}, cardanol {**3-(8'Z,11'Z)-pentadec-8',11',14'***tri***enilfenol**} e demais constituintes químicos. Porém, as análises espectrométricas de IV, RMN (mono e bidimensionais) das frações indicaram que, apesar de livres de outros constituintes, os alvos cardólicos não foram separados entre si. Tem-se então uma discussão da identificação de cardol e cardanol em mistura, realizadas em ambas frações. Como nota, apenas para efeito de discussão, a numeração do anel aromático do cardol foi mantida igual ao do cardanol, sem considerar a regra IUPAC.

Na análise do espectro de IV (**FIGURA 14, TABELA 3**) observou-se uma banda larga na região de 3600-3100 cm⁻¹ característica de estiramento de ligações O-H e bandas na região de 1607–1590 cm⁻¹, condizentes com estiramento C=C de anéis aromáticos. O espectro também apresentou estiramento simétrico e assimétrico de grupos alifáticos na região de 2926-2850 cm⁻¹, vC=C de olefinas em 1716 cm⁻¹ e em 1366-1231 cm⁻¹ estiramento C-O fenólico.



Figura 14. Espectro de absorção por refletância total atenuada (ATR: "*Attenuated Total Reflectance*") na região do Infravermelho das frações EH2CN e EH2CO

Frequência (cm ⁻¹)	Intensidade	Atribuições
3405	F	OH grupo fenólico associado por ligação de Hidrogênio
3080,3	Mf	v(CH)
3008,7	f	vCH aromático
2926,7	F	v _{as} Alifatico do grupo CH ₂
2855,4	М	v_s Alifatico do grupo CH ₂
1716,3	Mf	vC=C alqueno
1607	f	vC=C aromático
1596,3	f	vC=C aromático
1431,3	F	δ_s (CH ₂), δ_{as} (CH ₃) da cadeia alquílica
1366	М	v (C-O) fenol + T(CH ₂), ω (CH ₂) da cadeia alquÍlica
1231	Mf	C-O fenol
993,6	Mf	Deformação angular CH ₂ de alqueno terminal
860,64	Mf	R2C=CHR deformação angular fora do plano (CH)
838,35	Mf	Deformação angular CH aromático (3H adjacente)
720,24	Mf	Deformação angular CH aromático (3H adjacente)

Tabela 3. Atribuições das principais bandas de absorção no IV para as frações EH2CN e EH2CO

F= forte; f= fraca; Mf= muito fraca

A análise do espectro de RMN de ¹H (**FIGURA 15, TABELA 4**) ofereceu indícios que as amostras se tratavam de uma mistura de dois compostos alquílicos aromáticos, com padrões de substituição diferentes. Foram então diferenciados dois grupos de sinais de prótons metínicos aromáticos, o primeiro constituído pelos sinais em δ 7,13 (1H, t, J= 8 Hz) relativo a posição H5, δ 6,98 (1H, s) posição H2, δ 6,75 (1H, d, J= 8 Hz) posição H6 e δ 6,65 (1H, d, J~ 8 Hz) posição H4, padrão de deslocamentos e acoplamentos característico de um anel aromático 1,3-dissubstituído, o que indicou a presença do cardanol nas amostras analisadas. O segundo grupo de sinais observase dois singletos, um em δ 6,23 (2H, s) e em δ 5,01 (1H, s), relativos as posições H2-H4 e H6, respectivamente. Padrão de deslocamento e acoplamentos sugestivo de um anel aromático 1,3,5-trissubstituido, os quais foram atribuídos ao cardol.

No espectro de RMN de ¹H foram observados ainda outros sinais relativos a cadeia alquílica lateral das estruturas, não havendo diferença no grau de insaturações das substâncias da mistura. Observou-se o sinal de carbonos metínicos olefínicos em δ 5,44-5,30 (4H, m) relativo aos hidrogênios das posições H8', H9', H11' e H12', atribuído às duas insaturações. O sinal em δ 5,83 (1H, m) relativo a posição H14', além de dois duplos dupletos, atribuído aos hidrogênicos metilênicos (H15'), em δ 5,07 (1H, dd, J=1,2 e 10 Hz (gem e *cis*)) e em δ 4,97 (1H, dd, J=1,2 e 16 Hz (gem e *trans*)). Tais atribuições permitiram verificar que as estruturas das moléculas na mistura possuíam a cadeia carbônica lateral *tri*eno, nas posições 8',11' e 14'.

A análise associada dos espectros de RMN de ¹³C (FIGURA 16), DEPT 135 (FIGURA 17) e HSQC (FIGURA 18) permitiram concluir a atribuição estrutural da mistura de cardol e cardanol. No espectro de RMN de ¹³C, DEPT 135 e HSQC foram observados os três sinais de carbono metínicos aromáticos em δ 129,3, correlacionado ao sinal do próton em δ 7,13 da posição C5; δ 122,3 correlacionado ao sinal de próton em δ 6,65 da posição C4, δ 115,4 correlacionado a δ 6,99 posição C2 e δ 112,4 correlacionado ao próton em δ 6,75, posição C6. Além dos carbonos não hidrogenados aromáticos em δ 156,9 (C1), δ 145,8 (C3). Tais sinais foram atribuídos ao anel aromático da estrutura do cardanol. Para identificação do cardol foram diferenciados outro conjunto de sinais de carbonos metínicos aromáticos, com deslocamento em δ 100,2, com correlação direta ao sinal do próton em δ 5,01 (1H, s), atribuídos a posição C2 e δ 107,7, correlacionado ao sinal do próton em δ 6,23 (2H, s), posições C4 e C6. Além dos carbonos aromáticos não hidrogenados, em δ 158,9, atribuído as posições C1 e C5, δ 147,2 relativo a posição C3. Essa análise permitiu ainda, a identificação de guinze carbonos da cadeia alguila lateral, entre esses cinco metínicos olefínicos entre δ 130,4 – 126,8 (C8', C9', C11' e C12') e δ 136,8 (C14'), além do carbono metilênico olefínico em δ 114,7 (C15'). Permitindo comprovar que as estruturas possuíam cadeia alguila lateral composta por guinze carbonos e trieno (C₁₅H₂₅).



Figura 15. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃), com ampliações, da mistura de cardol e cardanol



cardol e cardanol



Figura 17. Espectro de DEPT 135° (100 MHz, CDCl₃) da mistura de cardol e cardanol

	Porção aromática			
	Cardanol		Car	dol
Posição	δ ¹³ C	δ ¹ H (mult. J)	δ ¹³ C	δ ¹ Η (mult.
				J)
1	156,9		158,9	
2	115,4	6,99(1H, <i>s</i>)	100,2	5,01 (1H, s)
3	145,8		147,2	
4	122,3	6,65 (1H, <i>d</i>)	107,7	6,23 (2H, s)
5	129,3	7,14 (1H, <i>t</i>)	158,9	
6	112,4	6,75 (1H, <i>d</i>)	107,7	6,23 (2H, <i>s</i>)
	Cadeia alquílica late	eral cardanol e cardol		
	δ ¹³ C	δ ¹ Η (mult. <i>J</i>)		
1'	34,2	2,46 (2H, <i>t</i>)		
2'	31,5	1,44 (<i>m</i>)		
3'-6'	29,6-29,2	1,40-1,26 (<i>m</i>)		
7'	27,2	2,05 (<i>m</i>)		
8'9'11'12'	130,4-126,8	5,44-5,30 (<i>m</i>)		
10'	30,3	2,80 (<i>m</i>)		
13'	25,5	2,80 (<i>m</i>)		
14'	136,8	5,83 (<i>m</i>)		
15'	114,7	5,07-4,97 (<i>m</i>)		

Tabela 4. Dados das análises dos espectros de RMN para as frações EH2CN E EH2CO



Figura 18. Ampliação do mapa de contorno HSQC da mistura de cardol e cardanol



A análise do cromatograma permitiu identificar 5 substâncias sendo, quatro ésteres metílicos de ácidos graxos e o cardanol, com similaridade na biblioteca NIST 14 de 83% (FIGURA 19).



Figura 19. Ampliação do cromatograma TIC (20 – 40 min)

A análise do EM (**FIGURA 21**) com íon molecular em *m/z* 302 corresponde ao (A) Cardanol {**3-(8'Z,11'Z)-pentadec-8',11',14'-***tri***enilfenol**} monoinsaturado. Os principais fragmentos (**FIGURA 20**) observados foram o pico base em *m/z* 108 atribuído a clivagem em α [M - 194]⁺, o fragmento com clivagem em β com pico em *m/z* 120 [M - 180]⁺, o fragmento em *m/z* 93 que confirma a perda total da cadeia lateral [M - 208]⁺ e o fragmento *m/z* 273 [M - 29]⁺.



Figura 20: Principais fragmentos do cardanol mono-insaturado



Figura 21: Espectro de massa proposto pela biblioteca NIST 14

Ainda nessa amostra foram identificados alguns ácidos graxos ao qual destacamos os fragmentos (**FIGURA 22**) do (B) ácido isooleico (Ácido Octadec-10en-1-oico, metil ester), com similaridade na biblioteca NIST 14 de 94%. O pico base em *m/z* 55 atribui-se ao íon hidrocarbônico [M-241]⁺. Outros fragmentos foram observados em *m/z* 87 [M – 209]⁺, *m/z* 74 referente ao rearranjo de Mclafferty [M -222]⁺ (**FIGURA 23**), *m/z* 59 [M – 237]⁺ e em *m/z* 264 refere-se a perda de metanol [M - 32]⁺.



Figura 22. Principais fragmentos do ácido isooleico mono-insaturado



Figura 23. Rearranjo de Mclafferty para o fragmento m/z 74



Figura 24: Espectro de massa proposto pela biblioteca NIST 14

Também foram identificados outros ácidos graxos (FIGURA 24) na amostra MAA que segue o mesmo padrão de fragmentação do ácido isooleico.



Figura 25. Estrutura do Ácido oleico, palmítico e o ácido linoleico presente na amostra MAA



Figura 26: Espectros de massa proposto pela biblioteca NIST 14 do ácido oleico, palmítico e linoleico, respectivamente

4.5 – ESTUDO IN SILICO - DOCKING MOLECULAR

A partir da identificação do ácido anacardico, Cardol e Cardanol foi realizado o docking molecular que é um procedimento computacional que prever a ligação não covalente de macromoléculas ou, mais frequentemente, de uma macromolécula (receptor) e uma pequena molécula (ligante) eficientemente. O objetivo é prever as conformações e a afinidade de ligação (TROTT et al. 2009)

A afinidade é dada por ΔG ao qual é verificada a espontaneidade de ligação através dos valores negativos, ou seja, quanto menor os valores de ΔG maior a afinidade. O cálculo é realizado utilizando o programa AutoDock Vina onde são dadas as possíveis conformações e afinidades entre a enzima e a substância de interesse através das funções de pontuações:

 ΔG ligação = ΔG gauss + ΔG repulsão + ΔG ligação de H + ΔG hidrofóbico + ΔG torção

Equação 2. Funções de pontuações do Autodock Vina Fonte: KIAMETIS et al. 2017

Onde Δ Ggauss é o termo atrativo para dispersão, Δ Grepulsão é o quadrado da distância (se mais perto do valor limite), Δ Gligação de H e Δ Ghidrofóbico são rampas de funções e Δ Gtorção é proporcional ao número de giro das ligações.

Foi realizado o docking molecular das enzimas AChE e HDAC para avaliar a afinidade com o ácido anacárdico, Cardol e Cardanol tri-insaturado. Os resultados deste estudo são a favor da forte inibição da AChE pelo ácido anacárdico, Cardol e Cardanol (-9,6, -8,3 e -8,1 Kcal/mol) (**TABELA 5, 6,7**). Porém o ácido anacárdico exibiu a maior afinidade de ligação da AChE com uma pontuação de encaixe de -9,6 Kcal/mol. Observou-se que o aumento no número de substituições aromáticas no ligante, como o ácido anacardico, levou a um aumento no número de pontes de hidrogênio com os resíduos. A presença do grupo carboxílico pode ser responsável por alta afinidade de ligação com a AChE.

Devido ao envolvimento de HDACs no neurodesenvolvimento, formação de memória e processos cognitivos, os HDACIs assim como AChE, têm sido sugeridos como agentes inovadores no contexto de distúrbios neurodegenerativos (SIMONE et al., 2019). Da mesma forma com a enzima AChE, o ácido anacárdico (-8,3 Kcal/mol) demostrou mais afinidade pela enzima HDAC que o Cardanol (-6.6 Kcal/mol) e o cardol (-4.3 Kcal/mol) e o (**TABELA 8,9,10**).

Assim, a possibilidade de verificar a eficácia de certas substâncias presentes naturalmente em plantas nativas da nossa região, com capacidade de potencializar atividades cognitivas, como aprendizagem e memória, abrem grandes possibilidades para realização de tratamentos, e acima de tudo, prevenção, não apenas de doenças neurodegenerativas como o Alzheimer e Parkinson, mas também outros transtornos cognitivos como déficit de atenção, dificuldade de aprendizagem e correlatos.

Modo Afinidade Dist para melhor modo (kcal/mol) rmsd l.b. rmsd u.b. 1 -9.6 0.000 0.000 2 -9.4 2.223 2.461 3 -8.8 3.672 4.460 4 -8.3 1.994 3.066 5 -7.7 10.977 3.846 -7.7 11.651 6 4.786 7 -7.6 3.105 3.960 8 -7.6 3.579 10.499 9 -6.9 13.311 13.733

Tabela 5. Resultado do estudo in silico (Docking molecular) do Ácido Anacárdicofrente a enzima Acetilcolinesterase

Modo	Afinidade	Dist para melhor modo	
	(kcal/mol)	rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-8.3	0.000	0.000
2	-8.3	2.841	3.635
3	-8.2	2.602	3.192
4	-7.9	3.219	5.542
5	-7.8	3.502	4.275
6	-7.2	3.313	3.999
7	-7.2	3.128	5.046
8	-6.9	1.647	3.272
9	-6.0	28.379	29.983

Tabela 6. Resultado do estudo *in silico* (Docking molecular) do Cardol frente aenzima Acetilcolinesterase

Tabela 7. Resultado do estudo *in silico* (Docking molecular) do Cardanol frente a
enzima Acetilcolinesterase

Modo	Afinidade	Dist para melhor modo	
	(kcal/mol)	rmsd I.b.	rmsd u.b.
1	-8.1	0.000	0.000
2	-7.6	2.447	5.590
3	-7.4	4.087	7.144
4	-7.2	2.462	5.734
5	-7.1	1.955	3.901
6	-7.1	3.958	7.728
7	-7.0	5.319	7.748
8	-6.8	5.988	8.435
9	-6.6	2.224	5.206

Modo	Afinidade	Dist para melhor modo	
	(kcal/mol)	rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-8.3	0.000	0.000
2	-7.9	1.679	1.939
3	-7.4	0.902	1.371
4	-7.0	1.985	2.890
5	-7.0	5.382	9.599
6	-6.9	2.210	3.229
7	-6.9	4.415	7.066
8	-6.9	5.723	9.460
9	-6.9	5.331	8.206

Tabela 8. Resultado do estudo *in silico* (Docking molecular) do Ácido anacárdico frente a
enzima Histona Deacetilase

Tabela 9. Resultado do estudo *in silico* (Docking molecular) do Cardol frente aenzima Histona Deacetilase

Modo	Afinidade	Dist para melhor modo	
	(kcal/mol)	rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-4.3	0.000	0.000
2	-4.3	2.525	4.632
3	-4.1	1.358	2.166
4	-4.0	3.029	4.489
5	-4.0	2.750	3.864
6	-3.8	2.866	4.194
7	-3.6	3.673	4.613
8	-3.4	4.296	5.548
9	-3.4	3.540	4.234

Afinidade	Dist para melhor modo	
(kcal/mol)	rmsd l.b.	rmsd u.b.
-6.6	0.000	0.000
-5.9	2.565	6.622
-5.8	2.003	5.046
-5.8	2.405	6.456
-5.7	1.902	4.459
-5.6	2.627	7.684
-5.6	2.168	7.209
-5.6	2.274	7.092
-5.5	2.895	6.003
	Afinidade (kcal/mol) -6.6 -5.9 -5.8 -5.8 -5.7 -5.6 -5.6 -5.6 -5.6 -5.6 -5.5	Afinidade Dist para m (kcal/mol) rmsd l.b. -6.6 0.000 -5.9 2.565 -5.8 2.003 -5.8 2.405 -5.7 1.902 -5.6 2.627 -5.6 2.168 -5.6 2.274 -5.5 2.895

Tabela 10. Resultado do estudo *in silico* (Docking molecular) do Cardanol frente a enzimaHistona Deacetilase

5 - CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a viabilidade dos diferentes métodos de extração, os quais mostraram-se eficientes, na obtenção dos AA's. A necessidade de realização de CC acidificada, precipitação e extração líquido-líquido com solvente ativo permitiram a realização do estudo da composição química do LCC. Esse estudo ainda mostra como cada método possui particularidade no isolamento dos constituintes do LCC, como a CC acidificada que isolou os ácidos anacárdicos saturado, mono di e tri-insaturado, assim como a precipitação que foi isolado o ácido anacárdico tri-insaturado e a extração líquido-líquido com solvente ativo que isolou o cardol e cardanol tri-insaturado, cardanol mono-insaturado e ácidos graxos. Todavia, o isolamento das classes químicas cardol e cardanol, bem como, a separação entre os compostos, diferenciados apenas pelo grau de instauração, necessitam de uma revisão metodológica que permita uma separação mais eficiente entre eles.

Através dos resultados obtidos foi possível identificar o ácido anacárdico, cardol e cardanol, como diferentes insaturações na cadeia alquílica lateral, a partir das análises dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear mono e bidimensional, como a Cromatografia Liquida de Alta Eficiência e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas. Essas técnicas levaram a estrutura exata de 11 compostos presente no LCC, tais como: os ácidos anacárdicos saturado, mono di e tri-insaturado, assim como cardol tri-insaturado e cardanol mono e tri-insaturado e os ácidos graxos isooleico, palmítico, oleico e linoleico.

No Docking molecular observou-se a maior afinidade pelas enzimas Acetilcolinesterase e Histona deacetilase atribuída ao ácido anacárdico tri-insaturado devido a menor energia de ΔG e mudança na conformação espacial de quase zero. Somando-se a isto, há a viabilidade imediata de exploração desse estudo no campo da farmacologia, inclusive com geração de patentes, visto que, estavam trabalhando com compostos naturais, que podem ser intencionalmente modificados para maximizar a bioatividade de cada um deles, impactando diretamente no campo acadêmico, abrindo novas vertentes de estudo e também na geração de Royalties para o estado.

6 – REFERENCIAS

AGOSTINI-COSTA, T. S.; JALES, K. A; ABREU, L. N.; LIMA, A.; ROSSETTI, A. G.; SILVEIRA, E. R. Determinação de ácido anacárdico em pedúnculos de caju. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.5, n.2, p.77-81, 2003.

ARIEL, N., ORDENTLICH, A., BARAK, D., BINO, T., VELAN, B., SHAFFERMAN, A. The 'aromatic patch' of three proximal residues in the human acetylcholinesterase active centre allows for versatile interaction modes with inhibitors. **Biochem. J.** Vol. 335, p. 95-102, 1998.

AUSIÓ, J.; LEVIN, D. B.; DE AMORIM, G. V.; BAKKER, S.; MACLEOD, P. M. Syndromes of disordered chromatin remodeling. **Clinical Genetics**, v. 64, p. 83-95, 2003.

BENNION, J. B., ESSIZ, G. S., LAU, Y. E., FATTERBERT, J-L., EMIGH, A., LIGHTSTONE, C. F. A Wrench in the Works of Human Acetylcholinesterase: Soman Induced Conformational Changes Revealed by Molecular Dynamics Simulations. **PLOS ONE.** Vol 10, nº 4, 2015.

CARDOSO, B. A.; RAMOS, T. L.; BELO, H.; VILAS-BOAS, F.; REAL, C.; ALMEIDA, A.M. Vorinostat synergizes with antioxidant therapy to target myeloproliferative neoplasms. **Experimental hematology**. v.72, p.60-71, 2019.

DE RUIJTER, A. J. M.; GENNIP, A. H.; CARON, H. N.; KEMP, S.; KUILENBURG, A. B. P. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. **Biochemical Journal**, v.3, p.737–749, 2003.

ECKSCHLAGER, T.; PLCH, J.; STIBOROVA, M.; HRABETA, J. Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. **International journal of molecular sciences**, v.18, p.1-25, 2017.

FINNIN, M.S.; DONIGIAN, J.R.; COHEN, A.; RICHON, V.M.; RIFKIND, R.A.; MARKS, P.A.; BRESLOW R.; PAVLETICH N.P. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. **Nature**. v.401, p.188–193, 1999.

GANDHI, T.; PATEL, M.; DHOLAKIYA, K. B. Studies on effect of various solvents on extraction of cashew nut shell liquid (CNSL) and isolation of major phenolic constituents from extracted CNSL. **Scholars Research Library. J. Nat. Prod. Plant Resour.,** v. 2 (1): p. 135-142, 2012

GEDAM, P. H; SAMPATHKUMARAN, P.S. Cashew nut shell liquid: extraction, chemistry and applications. **Progress in Organic Coatings**. Vol. 14, p. 115 - 157, 1986.

GELLERMAN, J. L.; SCHLENK, H. Methods for Isolation and Determination of Anacardic Acids. vol. 40, nº 4, p. 739-743, 1968.

GOMES JÚNIOR, A. L. et al. Anxiolytic effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) nut shell in mice. **IUBMB Life**. v.70, p.420-431, 2018. B) GOMES JÚNIOR, A. L. et al., Anticonvulsant effect of anacardic acid in murine models: Putative role of GABAergic and antioxidant mechanisms. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v.9, p.1686-1695, 2018.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A D; OLIVA G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estud. av.**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

IZZO, T. P.; DAWSON, R. C. Cashew nut shell liquid. vi. the olefinic nature of anacardic acid. vol. 6, p. 1039-1047

JIN Z., YANG L., LIU S. J., WANG J., LI S., LIN H. Q. Synthesis and biological evaluation of 3,6-diaryl-7*H*-thiazolo[3,2-b]-[1,2,4]triazin-7-one derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. **Arch. Pharm. Res.** Vol 33, n° 10, p. 1641-1649, 2010.

KIAMETIS, S. A. **Modelagem molecular de potenciais candidatos a inibidores da acetilcolinesterase**. 90f. Tese doutorado – Instituto de Física, Universidade de Brasilia, Brasília, 2012.

KIAMETIS, S. A., SILVA, A. M., ROMEIRO, S. A. L., MARTINS, L. B. J., GARGANO, R. Potential acetylcholinesterase inhibitors: molecular docking, molecular dynamics, and in silico prediction. **J Mol Model.** Vol. 23, nº 67, 2017.

KORNBERG, R. D. Structure of Chromatin. **Annual Review of Biochemistry**. v.46, p. 931–954, 1977.

KUBO, I; MASUOKA, N.; HA, J. T.; TSUJIMOTO, K. Antioxidant activity of anacardic acids. **Food Chemistry.** 99, p. 555-562, 2005.

LIU, N.N.; DONG, X.; HUA, X.; LIAO, Y.; HUANG, H. Effects and mechanism of anacardic acid on cell cycle of human prostate cancer LNCaP cells. **Guangdong Yixue**, v.36, p.657-659, 2015.

LUBI, M. C.; THACHILL, E. B. Cashew nut shell liquid (CNSL) - a versatile monomer for polymer synthesis. **Des. Monomers Polym.** vol. 3, nº 2, p. 123–153, 2000.

LUO, J.; NIKOLAEV, A.Y.; IMAI, S.; CHEN, D.; SU, F.; SHILOH, A.; GUARENTE, L.; GU, W. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. **Cell** v.130, p.137–148, 2001.

MALNIC, B. Prêmio Nobel de Química 2006: Os Mecanismos Estruturais da Transcrição em Eucariotos. **Química Nova na Escola**. v.24, p.3-6, 2006.

MANUEL, I., LOMBARDERO, L., LAFERLA, M. F., LLORT-G, L., PUERTAS-R, R. Activity of muscarinic, galanin and cannabinoid receptors in the prodromal and advanced stages in the triple transgenic mice model of Alzheimer's disease. **Neuroscience.** p. 10, 2016.

MAZZETTO, S. E.; LOMONACO, D. Óleo da Castanha de Caju: Oportunidades e Desafios no Contexto do Desenvolvimento e Sustentabilidade Industrial. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 732-741, 2009.

MORAIS, M.S.; SILVA, A. K.; ARAUJO, H.; VIEIRA, P. G. I.; ALVES, R. D.; FONTENELLE, S. O. R.; SILVA, S. M. A. Anacardic Acid Constituents from Cashew Nut Shell Liquid: NMR Characterization and the Effect of Unsaturation on Its Biological Activities. **Pharmaceuticals**, v. 10, n 31, 2017.

OLIVEIRA, C. S. M., MORAIS, M. S., MAGALHÃES, V. D., BATISTA, P. W., VIEIRA, P. G. I., CRAVEIRO, A. A., MENEZES, A. S. E. J., CARVALHO, U. F. A., LIMA, G. P. G. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. **Acta Tropica.** v.177, p. 165-170, 2011.

PARAMASHIVAPPA, R.; KUMAR, P. P.; VITHAYATHIL, P. J.; RAO, A. S. Novel Method for Isolation of Major Phenolic Constituents from Cashew (Anacardium occidentale L.) Nut Shell Liquid. **Jornal Agric. Food Chem**, v. 49, p. 2548–2551, 2001.

PARK, M.; UPTON, D.; BLACKMON, M.; DIXON, V.; CRAVER, S.; NEAL, D.; PERKINS, D. Anacardic acid inhibits pancreatic cancer cell growth, and potentiates chemotherapeutic effect by Chmp1A - ATM - p53 signaling pathway. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 2018.

PETERSON, C.L. HDAC's at work: everyone doing their part. **Molecular Cell**. v.9, p.921-922, 2002.

PETRONILHO, C. E., PINTO C. A., VILLAR, F. D. J. Acetilcolinesterase: alzheimer e guerra química. 12f. C&T. Grupo de Química Medicinal, Departamento de Química, Instituto Militar de Engenharia. Rio de Janeiro, 2011. RODRIGUES, F. H. A.; FRANÇA, F. C. F.; SOUZA, R. R. J. Comparison Between Physico-Chemical Properties of the Technical Cashew Nut Shell Liquid (CNSL) and those Natural Extracted from Solvent and Pressing. **Polímeros**, vol. 21, n^o 2, p. 156-160, 2011

SAJEEVAN, S.E.; CHATTERJEE, M.; PAUL, V.; BARANWAL, G.; KUMAR, V.A.; BOSE, C.; BANERJI, A.; NAIR, B.G.; PRASANTH, B.P.; BISWAS, R. Impregnation of catheters with anacardic acid from cashew nut shell prevents *Staphylococcus aureus* biofilm development. **Journal of Applied Microbiology.** v.125, p.1286-1295, 2018.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de Modelagem Molecular para Estudo e Planejamento de Compostos Bioativos: Uma Introdução. **Revista Virtual de Química**. v.1, p.49-57, 2009.

SCHEMIES, J.; UCIECHOWSKA, U.; SIPPL, W.; JUNG, M. NAD+-dependent histone deacetylases (sirtuins) as novel therapeutic targets. **Medicinal Research Reviews**. v.30, p.861–889, 2010.

SILVA, A. M. **Modelos Preditivos Baseados em Descritores Moleculares e Modos de Interação Receptor-Ligante para Inibidores da Acetilcolinesterase.** 154f. Tese (Doutorado em Física) – Instituto de Física, Universidade de Brasília, 2017.

SIMONE, A.; MILELLI A. Histone Deacetylase Inhibitors as Multitarget Ligands: New Players in Alzheimer's Disease Drug Discovery?. **ChemMedChem.** p. 1-10, 2019.

SOUZA, M. P., **Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma cerrado**. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2011.

SUSSMAN, L. J., HAREL, M., FROLOW, F., OEFNER, C., GOLDAM, A., TOKER, L., SILMAN, I., Atomic Structure of Acetyicholinesterase from *Torpedo californica*: A Prototypic Acetyicholine-Binding Protein. **SCIENCE**, Vol. 253, p. 872-879, 1991.

TABARRINI, O., CECCHETTI, V., TEMPERINI, A., FILIPPONI, E., LAMPERTI, G. M., FRAVOLINI, A. Velnacrine Thiaanalogues as Potential Agents for Treating Alzheimer's Disease. **Bioorg. Med. Chem**. Nº 9, p. 2921-2928, 2001.

TAN, J.; JIANG, X.; YIN, G.; HE, L.; LIU, J.; LONG, Z.; JIANG, Z.; YAO, K. Anacardic acid induces cell apoptosis of prostatic cancer through autophagy by ER stress/DAPK3/Akt signaling pathway. **Oncology Reports**. v.38, p.1373-1382, 2017.

TANG, J.; YAN, H.; ZHUANG, S. Histone deacetylases as targets for treatment of multiple diseases. **Clinical Science**. v.124, p.651–662, 2013.

TÕUGU, V. Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition. **Curr. Med. Chem. – Central Nervous System Agents**, Vol. 1, N^o. 2, p. 155-170, 2001.

TRISCIUOGLIO, D.; DI MARTILE, M.; DEL BUFALO, D. Emerging Role of Histone Acetyltransferase in Stem Cells and Cancer. **Stem Cells International**. v.1, p.1-11, 2018.

TROTT, O.; OLSON, J. A. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. **Journal of Computational Chemistry.** vol. 31, nº 2, p. 456-461, 2009.

TYMAN, H. J. Determination of the Component Phenols in Natural and Technical Cashew Nut-Shell Liquid by Gas-Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, vol. 48, nº 1, p. 30-34, 1976.

VIEGAS JR. C., BOLZANI V. S., FURLAN M. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Quim. Nova**, Vol. 27, nº 4, p. 655-660, 2004

VIEIRA, S. T. Estudos visando à síntese de novos derivados do LCC com potencial atividade no tratamento da doença de Alzheimer. 100f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

VIEIRA, S. T. Estudos visando à síntese de novos derivados do LCC com potencial atividade no tratamento da doença de Alzheimer. 100f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

XU, Y., COLLETIER, J-P., WEIK, M., JIANG, H., MOULT, J., SILMAN, I., SUSSMAN, L. J. Flexibility of Aromatic Residues in the Active-Site Gorge of Acetylcholinesterase: X-ray versus Molecular Dynamics. **Biophysical Journal.** Vol. 95, p. 2500-2511, 2008.

YUAN, M.; CANÇÃO, X.; LV, W.; XIN, Q.; WANG, L.; GAO, Q.; ZHANG, G.; LIAO, W.; LIAN.; JING, T. Effect of anacardic acid against echinococcosis through inhibition of VEGF-induced angiogenesis. **Veterinary Research.** v.50, 2019.

ZHAO, Q.; ZHANG, X.; CAI, H.; KONG, D.; GE, X.; DU, M.; LIANG, R.; DONG, W. Anticancer effects of plant derived Anacardic acid on human breast cancer MDA-MB-231 cells. **American Journal of Translational Research**. v.10, p.2424-2434, 2018.

ZHENG, W.; THORNE, N.; MCKEW, J. C. Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 18, n. 21-22, p. 1067-1073, 2013.