UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo das interações entre fosfolipases A_2 e o inibidor vegetal,
ácido rosmarínico de *Cordia verbenacea* (Boraginaceae) por
cocrystalização e modelagem molecular**

Lorane Izabel da Silva Hage Melim

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo das interações entre fosfolipases A_2 e o inibidor vegetal,
ácido rosmarínico de *Cordia verbenacea* (Boraginaceae) por
cocrystalização e modelagem molecular**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia, área de concentração:
Toxicologia para obtenção do Título de
Doutor em Toxicologia.

Área de concentração Toxicologia

Orientada: Lorane Izabel da Silva Hage
Melim

Orientadora: Prof^a. Dra Suely Vilela

Co-orientador: Prof^o. Dr. Carlos Henrique
Tomich de Paula da Silva

<p>HAGE-MELIM, L. I. S.</p>	<p>Estudo das interações entre fosfolipases A₂ e o inibidor vegetal, ácido rosmarínico de <i>Cordia verbenacea</i> (Boraginaceae) por cocrystalização e modelagem molecular</p>		<p>DOUTORADO FCFRP/USP 2009</p>
--	---	--	--

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Hage-Melim, Lorane Izabel da Silva

Estudo das interações entre fosfolipases A_2 e o inibidor vegetal, ácido rosmarínico de *Cordia verbenacea* (Boraginaceae) por cocrystalização e modelagem molecular. Ribeirão Preto, 2009.

159 p. : il.; 30cm.

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Viela, Suely.

1. Inibidores de fosfolipase A_2 . 2. *Bothrops jararacussu*. 3. Peçonha de serpente. 4. Modelagem molecular. 5. "Docking".

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lorane Izabel da Silva Hage Melim

Estudo das interações entre fosfolipases A₂ e o inibidor vegetal, ácido rosmarínico de *Cordia verbenacea* (Boraginaceae) por cocristalização e modelagem molecular

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, área de concentração: Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Toxicologia.

Área de concentração Toxicologia

Orientadora: Prof^a. Dra Suely Vilela

Co-orientador: Prof^o. Dr. Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

À minha família

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu enorme significado em minha vida.

Aos meus pais, Lourival e Izabel, pelo apoio de sempre e por não medirem esforços para a realização do meu grande sonho. Muito obrigada!!!!

A alguém mais do que especial para mim, sei que você continua comigo sempre...

Às minhas irmãs, Lorena e Laura, que mesmo longe sempre se mantiveram presentes e deram total apoio para alcançar meu objetivo.

Aos meus sobrinhos, Jéssica, Rafael, Gabriel, Larissa e Ana Luiza, por todas as alegrias e tristezas, vocês me ensinaram a dar mais valor à vida e a cada minuto com vocês.

Ao meu marido, amigo, amante, conselheiro, psicólogo Jefferson, acredite você foi tudo isso nesses cinco anos. Obrigada pelo apoio desde o início, pelo ombro amigo nas horas difíceis, pelo colo amoroso quando me sentia completamente sozinha, pelos conselhos nos momentos de raiva e por todo seu amor.

À minha nova família, Wagner, Sonia, Willian, Sabrina, Elaine, Amâncio, Alcina, Carlinhos, Aparecida, Natália, Camila, Bruno, pelo apoio e incentivo durante esses anos.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Suely Vilela, por dividir comigo seus conhecimentos científicos e pelo incentivo durante meu doutorado, pode ter certeza que você me ajudou a ser uma pessoa melhor. Você é um exemplo de pessoa que luta pelos seus objetivos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Carlos Tomich, um exemplo de profissional. Um grande amigo que sempre me apoiou quando estava desanimada, não é à toa que é carioca!!!! Obrigada pela brilhante co-orientação.

Ao Prof. Dr. Andreimar Soares, pelo excelente pesquisador e pela pessoa grandiosa. Obrigada pela “co-orientação” durante meu doutorado, por sempre ter tempo para seus alunos e também para os “agregados”.

À técnica do Laboratório de Toxinologia Adélia, pela sua grande ajuda durante a realização deste estudo, pela sua experiência e pelos seus conhecimentos.

Ao técnico e amigo Franco por todo seu companheirismo com os alunos do laboratório, pelo seu humor e, principalmente, pela pessoa maravilhosa.

À minha amiga Elaine, uma pessoa brilhante que sempre tem uma palavra amiga para nos dizer nos momentos de alegria e tristeza. Uma amiga que posso contar sempre. Parabéns pela pessoa que você é!!!!

À amiga Raquel, uma pessoa que aprendi admirar. Você simplesmente me ensinou a não julgar as pessoas antes de conhecê-la realmente. Obrigada pela sua amizade, pelos seus conselhos como amiga e profissional.

À amiga Gilmara, uma pessoa que eu vi passar pelas maiores alegrias e maiores tristezas que alguém pode passar, mas sempre superando tudo com cabeça erguida. Parabéns, você merece tudo de bom em sua vida.

Aos colegas do laboratório de Toxinologia, Fábio, Carol, Maurício, Ana Paula, Wellington, Raquelzinha e Lanuze pelo apoio dado durante meu projeto.

Aos colegas do laboratório Computacional de Química Farmacêutica, Xita, Jonathan e, em especial, ao Vinicius pela sua “co-orientação” e por sempre está presente nos momentos de dificuldade com os programas.

À secretária da Seção de Pós-graduação Ana, que sempre me socorreu aos 45 minutos do segundo tempo, sempre com atenção e disposição.

À fundação FAPESP pelo auxílio financeiro fundamental para realização deste estudo.

“O pior cárcere não é aquele que aprisiona o corpo, mas o que asfixia a mente e algema a emoção.

Sem liberdade, as mulheres sufocam seu prazer.

Sem sabedoria, os homens se tornam máquinas de trabalhar.

Ser livre é não ser escravo das culpas do passado nem das preocupações do amanhã.

Ser livre é ter tempo para as coisas que se ama.

É abraçar, se entregar, sonhar, recomeçar tudo de novo.

É desenvolver a arte de pensar e proteger a emoção.

Mas, acima de tudo, ser livre é ter um caso de amor com a própria existência e desvendar seus mistérios.”

Augusto Cury

RESUMO

HAGE-MELIM, L. I. S. **Estudo das interações entre fosfolipases A₂ e o inibidor vegetal, ácido rosmarínico de *Cordia verbenacea* (Boraginaceae) por cocrystalização e modelagem molecular.** 2009. 159f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

As peçonhas de serpente do gênero *Bothrops* se caracterizam por induzir miotoxicidade, edema, coagulação e hemorragia. Por essa razão, alguns pesquisadores estão buscando por tratamentos alternativos contra os envenenamentos ofídicos com inibidores naturais e artificiais. O presente estudo tem como objetivo estudar as interações entre as PLA₂s (Asp49 e Lys49) de veneno de serpente *Bothrops jararacussu*, denominadas BthTX-I e BthTX-II, respectivamente, e o inibidor vegetal isolado da espécie *Cordia verbenacea*. *C. verbenacea* apresenta diversas atividades farmacológicas já demonstradas, sendo utilizada também pela população como antiofídica. O extrato hidroalcoólico das folhas preparado à seco, foi submetido a técnicas cromatográficas como Sephadex LH-20 e CLAE, obtendo-se a purificação do princípio ativo antiofídico da planta, denominado ácido rosmarínico. A peçonha de *B. jararacussu* foi submetida à cromatografia de filtração em gel Sephadex G-75 e, à cromatografia de troca iônica. O ácido rosmarínico (AR) foi isolado do extrato metanólico de *C. verbenacea* e apresentou inibição da hemorragia provocada pela peçonha bruta de *B. jararacussu*. Em comparação, o ácido rosmarínico[®] também inibiu o efeito hemorrágico causado pela peçonha bruta de *B. jararacussu*. A atividade edematogênica provocada pelas toxinas BthTX-I e II foi avaliada e testada com os inibidores. Ambos AR e AR[®] não inibiram significativamente a indução de edema. Resultados semelhantes foram obtidos com as atividades anticoagulante, e fosfolipásica. O ácido rosmarínico, AR e AR[®], demonstrou alto efeito inibitório sobre a citotoxicidade e miotoxicidade induzida pela peçonha bruta e pela toxina BthTX-I. Ambos inibidores apresentou um menor efeito sobre a atividade miotóxica induzida pela toxina BthTX-II. Simulações de “docking” realizadas com três PLA₂s e AR mostraram perfis de interações similares, reforçando as principais interações enzima-inibidor obtidas experimentalmente, relatadas na literatura. Os cálculos de derivação de farmacóforo baseados em diferentes inibidores relatados na literatura, assim como estudos de campos de interação molecular foram realizados, nos quais os resultados indicaram as principais modificações na estrutura do inibidor ácido rosmarínico necessárias para otimização. Nas simulações de “screening” virtual, novos potenciais inibidores de BthTX-I foram selecionados a partir de base de dados de compostos “drug-like”, direcionando os próximos passos aos testes biológicos, os quais serão realizados com esta fosfolipase e os novos candidatos a inibidores modelados.

Palavras-Chave: Inibidores de fosfolipase A₂; *Bothrops jararacussu*; peçonha de serpente; modelagem molecular, “docking”.

ABSTRACT

HAGE-MELIM, L. I .S. **Study of interactions between phospholipases A₂ and the plant inhibitor, rosmarinic acid from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae) by co-crystallization and molecular modeling.** 2009. 159f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Snake venoms from *Bothrops* genus are characterized by inducing myotoxicity, edema, thrombosis and hemorrhage. Thus, some researchers are searching for alternative treatments against ophidian poisoning with natural and artificial inhibitors. This work aimed study the interactions between PLA₂s (Asp49 e Lys49) from *Bothrops jararacussu* snake venom, named BthTX-I and BthTX-II, respectively, and the inhibitor isolated from *Cordia verbenacea* plant. *C. verbenacea* presents several pharmacological activities already demonstrated, and it is also used by the population by its antiophidic activity. The hydroalcoholic extract prepared from the dried leaves, was submitted to chromatographic techniques as Sephadex LH-20 and HPLC, resulting in the purification of the antiophidian compound active from the plant, named rosmarinic acid. *B. jararacussu* snake venom was submitted to gel filtration chromatography on Sephadex G-75 and ion exchange chromatography. Rosmarinic acid (RA) was isolated from the *C. verbenacea* methanolic extract and it presented hemorrhage inhibition caused by crude venom from *B. jararacussu*. In comparison with this, Rosmaric acid[®] also inhibited the hemorrhagic effect caused by crude venom from *B. jararacussu*. Edematogenic activity caused by BthTX-I and II was evaluated and tested with the inhibitors. Both, RA e RA[®] did not inhibit the edema induction significantly. Similar results were obtained with the anticoagulant and phospholipasic activity. The rosmarinic acid, RA e RA[®], presented high inhibitory effect for myotoxicity and cytotoxicity induced by crude venom and the toxin BthTX-I. Both inhibitors presented minor effect on myotoxicity activity induced by BthTX-II toxin. Docking simulations performed with three PLA₂ and RA have shown similar interactions profiles, corroborating the main enzyme-inhibitor interactions experimentally obtained, reported in literature. Pharmacophore perception calculations based on different inhibitors reported in literature as well as molecular interaction fields studies were here carried out, whose results indicate the main changes in the structure of the rosmarinic acid inhibitor necessary to optimization. In the virtual screening simulations, novel potential BthTX-I inhibitors were selected from drug-like compounds databases, thus guiding next steps towards biological tests, which will must be performed with this phospholipase and the new inhibitor candidates modeled.

Keywords: Phospholipase A₂ inhibitors; *Bothrops jararacussu*; Snake venom; molecular modeling; docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação típica de um monômero de PLA ₂ s diméricas.	5
Figura 2. A) Estruturas de Compostos químicos com atividade inibitória. B) Compostos fenólicos com atividade inibitória: Flavonoides.	11
Figura 3. Estruturas de Compostos fenólicos com atividade inibitória: A) Cumestanos; B) Pterocarpanos; C) Compostos Nitrogenados.	13
Figura 4. Estruturas de Outros Compostos fenólicos com atividade inibitória.	15
Figura 5. A) Estruturas químicas compostos esteroides e diterpenos com atividade inibitória; B) Triterpenos com atividade inibitória.	19
Figura 6. Representação esquemática da Curva de Solubilidade para proteínas.	20
Figura 7. Tipos de cristalização por difusão de vapor.	22
Figura 8. Etapas envolvidas no processo de obtenção de modelos proteínas-alvo através da utilização de modelagem molecular por homologia estrutural.	24
Figura 9. Etapas para resolução de uma estrutura proteica por difração de raios X de maneira simplificada.	48
Figura 10. Placa usada na cristalização.	49
Figura 11. “Microbridge”.	49
Figura 12. Fluxograma para fracionamento do extrato hidroalcoólico de <i>C. verbenacea</i> .	56
Figura 13. A) Filtração em gel de Sephadex G-75 de 500mg da peçonha bruta de <i>B. jararacussu</i> em tampão formiato de amônio 0,05M pH 3,5 à temperatura ambiente. B) Cromatografia em SP-Sephadex C-25 da fração correspondente ao pico S _{III} (Figura 13A).	58
Figura 14. Efeito do inibidor AR isolado e comercial sobre a atividade fosfolipásica da (A e B) peçonha bruta e das toxinas (C e D) BthTX-II e (E e F) BthA-I-PLA ₂ de <i>B. jararacussu</i> .	60
Figura 15. Efeito do inibidor AR sobre a atividade edematogênica da peçonha bruta de <i>B. jararacussu</i> . A) AR isolado; B) AR comercial.	62
Figura 16. Efeito do inibidor AR sobre a atividade edematogênica da BthTX-I. A) AR isolado; B) AR comercial.	63

Figura 17. Efeito do inibidor AR sobre a atividade edematogênica da BthTX-II. A) AR isolado; B) AR comercial.	64
Figura 18. Efeito do AR sobre atividade hemorrágica da peçonha bruta de <i>B. jararacussu</i> . A) AR isolado; B) AR comercial.	65
Figura 19. Efeito do AR sobre a atividade miotóxica da PB de <i>B. jararacussu</i> . A) AR isolado; B) AR comercial.	67
Figura 20. Efeito do AR sobre a atividade miotóxica da BthTX-I de <i>B. jararacussu</i> . A) AR isolado; B) AR comercial.	68
Figura 21. Efeito do AR sobre a atividade miotóxica da BthTX-II de <i>B. jararacussu</i> . A) AR isolado; B) AR comercial.	69
Figura 22. A) Análise da citotoxicidade em células HL60 tratadas com BthTX-I pelo ensaio do MTT. B) Análise da citotoxicidade em células HL60 tratadas com BthTX-I e ácido rosmarínico pelo ensaio do MTT.	71
Figura 23. Policristais de BthTX-I na forma nativa (cristais obtidos em 9 dias).	72
Figura 24. Policristal de BthTX-I obtido na presença do inibidor AR após um período de sete dias.	73
Figura 25. A) Alinhamento de sequências das toxinas BthTX-I e PrTX-I com 99% de identidade. B) Cristal de PrTX-I obtido na presença do inibidor AR após um período de sete dias.	74
Figura 26. Arquivo do alinhamento refinado final da toxina BthTX-I usado como “input” para o programa MODELLER .	77
Figura 27. “Ramachandran plot” do modelo da toxina BthTX-I gerado pelo PROCHECK .	78
Figura 28. Resumo dos principais indicadores de qualidade estereoquímica da cadeia principal do modelo obtido para a toxina BthTX-I, gerado pelo programa PROCHECK .	79
Figura 29. Gráfico final com os escores dos ambientes químicos definidos para cada resíduo do modelo escolhido da toxina BthTX-I obtido pelo VERIFY 3D .	80
Figura 30. A) Diagrama Ribbons do modelo final obtido por modelagem comparativa para a toxina BthTX-I presente na peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i> . B) Sobreposição do modelo final (cinza) obtido por modelagem comparativa para a toxina BthTX-I e a estrutura depositada no PDB: 2H8I (róseo).	81
Figura 31. Arquivo do alinhamento refinado final da toxina BthTX-II usado	83

como “input” para o programa **MODELLER**.

Figura 32. “Ramachandran plot” do modelo da toxina BthTX-II gerado pelo **PROCHECK**. 84

Figura 33. Resumo dos principais indicadores de qualidade estereoquímica da cadeia principal do modelo obtido para a toxina BthTX-II, gerado pelo programa **PROCHECK**. 85

Figura 34. Gráfico final com os escores dos ambientes químicos definidos para cada resíduo do modelo escolhido da toxina BthTX-II obtido pelo **VERIFY 3D**. 86

Figura 35. A) Diagrama Ribbons do modelo final obtido por modelagem comparativa para a toxina BthTX-II presente na peçonha de *Bothrops jararacussu*. B) Sobreposição do modelo final (cinza) obtido por modelagem comparativa para a toxina BthTX-II e a estrutura depositada no PDB: 2OQD (róseo). 87

Figura 36. Arquivo do alinhamento refinado final da toxina BthA-I-PLA₂ usado como “input” para o programa **MODELLER**. 89

Figura 37. “Ramachandran plot” do modelo da toxina BthA-I-PLA₂ gerado pelo **PROCHECK**. 90

Figura 38. Resumo dos principais indicadores de qualidade estereoquímica da cadeia principal do modelo obtido para a toxina BthA-I-PLA₂, gerado pelo programa **PROCHECK**. 91

Figura 39. Gráfico final com os escores dos ambientes químicos definidos para cada resíduo do modelo escolhido da toxina BthA-I-PLA₂ obtido pelo **VERIFY 3D**. 92

Figura 40. A) Diagrama Ribbons do modelo final obtido por modelagem comparativa para a toxina BthA-I-PLA₂ presente na peçonha de *Bothrops jararacussu*. B) Sobreposição do modelo final (cinza) obtido por modelagem comparativa para a toxina BthA-I-PLA₂ e a estrutura depositada no PDB: 1U73 (róseo). 93

Figura 41. A) Estruturas químicas dos compostos selecionados no “Screening” virtual realizado para BthTX-I usando o banco de dados **Ilbdiverse** B) Diagrama *Ribbons* da estrutura da BthTX-I com as melhores soluções de “docking” dos compostos selecionados e do inibidor ácido rosmarínico. 101

Figura 42. A) Estruturas químicas dos compostos selecionados no “Screening” virtual realizado para BthTX-II usando o banco de dados **Ilbdiverse** B) Diagrama *Ribbons* da estrutura da BthTX-II com as melhores soluções de “docking” dos compostos selecionados e do inibidor ácido rosmarínico. 102

Figura 43. A) Estruturas químicas dos compostos selecionados no “Screening” virtual realizado para BthA-I-PLA₂ usando o banco de dados **Ilbdiverse** B) Diagrama *Ribbons* da estrutura da BthA-I-PLA₂ com as melhores soluções de “docking” dos compostos selecionados e do inibidor ácido rosmarínico. 103

Figura 44. A) Estruturas químicas dos compostos selecionados no “Screening” virtual realizado para BthTX-I usando o banco de dados **Diverset**; B) Diagrama *Ribbons* da estrutura da BthTX-I com as melhores soluções de “docking” dos compostos selecionados e do inibidor ácido rosmarínico. 104

Figura 45. A) Estruturas químicas dos compostos selecionados no “Screening” virtual realizado para BthTX-II usando o banco de dados **Diverset**; B) Diagrama *Ribbons* da estrutura da BthTX-II com as melhores soluções de “docking” dos compostos selecionados e do inibidor ácido rosmarínico. 105

Figura 46. A) Estruturas químicas dos compostos selecionados no “Screening” virtual realizado para BthA-I-PLA₂ usando o banco de dados **Diverset**; B) Diagrama *Ribbons* da estrutura da BthA-I-PLA₂ com as melhores soluções de “docking” dos compostos selecionados e do inibidor ácido rosmarínico. 106

Figura 47. A) Estruturas químicas dos compostos selecionados no “Screening” virtual realizado para BthTX-I usando o banco de dados **iResearch Library**; B) Diagrama *Ribbons* da estrutura da BthTX-I com as melhores soluções de “docking” dos compostos selecionados e do inibidor ácido rosmarínico. 107

Figura 48. A) Estruturas químicas dos compostos selecionados no “Screening” virtual realizado para BthTX-II usando o banco de dados **iResearch Library**; B) Diagrama *Ribbons* da estrutura da BthTX-II com as melhores soluções de “docking” dos compostos selecionados e do inibidor ácido rosmarínico. 108

Figura 49. A) Estruturas químicas dos compostos selecionados no “Screening” virtual realizado para BthA-I-PLA₂ usando o banco de dados **iResearch Library**; B) Diagrama *Ribbons* da estrutura da BthA-I-PLA₂ com as melhores soluções de “docking” dos compostos selecionados e do inibidor ácido rosmarínico. 109

Figura 50. Alinhamentos e modelos de farmacóforo detectados para 12 dos 44 inibidores de PLA₂ conhecidos, incluindo o ácido rosmarínico. (A), somente os dois modelos calculados usando **Sybyl/GALAHAD**. (B), o melhor modelo calculado usando **Discovery Studio**. (C), o melhor modelo calculado usando o servidor **PharmaGist**. 111

Figura 51. Diagrama *Ribbons* do modelo da BthTX-I em fase com os campos de interação molecular (MIFs) e a melhor orientação do **GOLD** para 113

o ácido rosmarínico. A) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova carboxila é visualizado a -14 kcal/mol; B) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova hidroxila é visualizado a -9 kcal/mol; C) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova carbono aromático é visualizado a -4 kcal/mol; D) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova hidrofóbico é visualizado a -2 kcal/mol.

Figura 52. Diagrama *Ribbons* do modelo da BthTX-I em fase com os campos de interação molecular (MIFs) e a melhor orientação do **GOLD** para o ácido rosmarínico e os outros 16 inibidores selecionados. A) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova carboxila é visualizado a -14 kcal/mol; B) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova hidroxila é visualizado a -9 kcal/mol; C) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova carbono aromático é visualizado a -4 kcal/mol; D) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova hidrofóbico é visualizado a -2 kcal/mol.

114

Figura 53. Diagrama *Ribbons* do modelo da BthTX-I em fase com os campos de interação molecular (MIFs) e a melhor orientação do **GOLD** para o ácido rosmarínico (em representação de cilindro) e os 10 compostos (em representação de linhas) selecionados a partir da subcoleção **DIVERSet**. A) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova carboxila é visualizado a -14 kcal/mol; B) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova hidroxila é visualizado a -9 kcal/mol; C) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova carbono aromático é visualizado a -4 kcal/mol; D) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova hidrofóbico é visualizado a -2 kcal/mol.

115

Figura 54. Resultado obtido com **Q-SiteFinder** para o modelo da BthTX-I A) Sem inibidores, com o sítio ligante predito representado em “mesh” de cor azul.; B) Com o ácido rosmarínico (representação em cilindro), com o sítio ligante predito representado em “mesh” de cor verde; C) Com o ácido rosmarínico (representação em cilindro) e os 17 inibidores (em representação de linhas) selecionados, com o sítio ligante predito representado em “mesh” de cor azul.

116

Figura 55. Proposta de modificação na estrutura química do ácido rosmarínico (representação em cilindro) na posição R^1 . O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova hidroxila é visualizado a -9 kcal/mol (verde).

118

Figura 56. Proposta de modificação na estrutura química do ácido rosmarínico (representação em cilindro) na posição R^2 . contorno isoenergético obtido com o grupo de prova hidrofóbico é visualizado a -2 kcal/mol (amarelo).

119

Figura 57. Proposta de modificação na estrutura química do ácido rosmarínico (representação em cilindro) na carbonila (R^3) do ácido rosmarínico. O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova hidrofóbico é visualizado a -2 kcal/mol (amarelo).

120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Rendimento das frações CL1 a CL7 obtidas em CLAE	55
Tabela 2 – Dados de difração de raios-X e processamento inicial das imagens do cristal de PrTX-I obtido na presença do inibidor ácido rosmarínico.	75
Tabela 3 - Valores obtidos pela função “Goldscore” nas simulações de “docking” dos 17 inibidores selecionados com a BthTX-I	96
Tabela 4 - Valores obtidos pela função “Goldscore” nas simulações de “docking” dos 22 inibidores selecionados com a BthTX-II	97
Tabela 5 - Valores obtidos pela função “Goldscore” nas simulações de “docking” dos 14 inibidores selecionados com a BthA-I-PLA ₂	98
Tabela 6 - Valores obtidos pela função “Goldscore” nas simulações de “docking” dos 10 compostos selecionados nas simulações de “screening” virtual com a BthTX-I	100
Tabela 7 - Propriedades físico-químicas relacionadas à Regra dos Cinco para 17 inibidores de PLA ₂ selecionados	122
Tabela 8 - Propriedades físico-químicas relacionadas à Regra dos Cinco dos 10 compostos selecionados por “screening” virtual	123
Tabela 9 - Propriedades farmacocinéticas calculadas com ADME/Tox para os 17 inibidores de PLA ₂ selecionados	125
Tabela 10 - Propriedades farmacocinéticas calculadas com ADME/Tox para os compostos selecionados por “screening” virtual: adequada biodisponibilidade predita	126
Tabela 11 - Predições de toxicidade calculadas com DEREK para os 17 inibidores de PLA ₂ selecionados	127
Tabela 12 - Predições de toxicidade calculadas com DEREK para os compostos selecionados por “screening” virtual	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
AR	Ácido rosmarínico
Bt-CD	Diterpenoide clerodane
BthTX-I	Bothropstoxina-I
BthTX-II	Bothropstoxina-II
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CK	Creatina quinase
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido
GOLD	Genetic Optimisation for Ligand Docking
IC	Concentração inibitória
MIF	Molecular Interaction Field
MMV	12-metoxi-4-metilvoacalotina
NH ₄ Ac	Acetato de amônio
PBS	Solução salina tamponada em fosfato
PDB	Protein Data Bank
PLA ₂	Fosfolipases A ₂
PLIs	Inibidores de PLA ₂
pPLA ₂ s	Fosfolipases A ₂ de peçonha
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Fosfolipases A ₂ (PLA ₂ s)	2
1.2 Inibidores de Fosfolipase A ₂ (PLIs)	6
1.3 Estrutura química de Inibidores de Fosfolipase A ₂ (PLIs)	9
1.3.1 Proteínas	9
1.3.2 Compostos fenólicos	9
1.3.2.1 Flavonoides	9
1.3.2.2 Cumestanos	10
1.3.2.3 Pterocarpanos	10
1.3.2.4 Compostos nitrosos	12
1.3.2.5 Outros Compostos fenólicos	14
1.3.3 Compostos esteroides e terpenoides	17
1.3.3.1 Esteroides	17
1.3.3.2 Diterpenos	17
1.3.3.3 Triterpenos	17
1.4 Cristalização e Cocrystalização	18
1.5 Modelagem Molecular	23
1.5.1 Modelagem molecular de proteínas-alvo por homologia estrutural	23
1.5.2 Planejamento racional de fármacos “in silico”	28
2. OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo Geral	33
2.2 Objetivos específicos	33
3. MATERIAL	34
3.1 Vegetal	35
3.2 Ácido rosmarínico comercial	35
3.3 Peçanha	35
3.4 BthTX-I e II	35
3.5 Animais	35
3.6 Plasma	35
3.7 Aspectos éticos	35
3.8 Reagentes em geral	35
3.9 Resinas	36
4. MÉTODOS	37
4.1 Coleta e classificação do vegetal	38
4.2 Preparação do vegetal	38
4.3 Preparação do extrato de <i>Cordia verbenacea</i>	38
4.4 Fracionamento do extrato bruto metanólico de <i>C. verbenacea</i>	38
4.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	38
4.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	39

4.7 Purificação das toxinas BthTX-I e BthTX-II da peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i>	39
4.7.1 Preparação da amostra	39
4.7.2 Filtração em gel de Sephadex G-75	39
4.7.3 Cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-25	40
4.7.4 Dessalificação em Gel de Sephadex G-10	40
4.8 Preparação das soluções de peçonha e das toxinas BthTX-I e BthTX-II	41
4.9 Determinação da atividade fosfolipásica	41
4.9.1 Avaliação do efeito do inibidor ácido rosmarínico (AR), isolado e comercial, sobre a atividade fosfolipásica da peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i> e das toxinas BthTX-II e BthA-I-PLA ₂	41
4.10 Determinação da atividade anticoagulante	42
4.10.1 Avaliação do efeito do inibidor ácido rosmarínico (AR), isolado e comercial, sobre a atividade anticoagulante da toxina BthTX-II	42
4.11 Determinação da atividade edematogênica	42
4.11.1 Avaliação do efeito do inibidor ácido rosmarínico (AR), isolado e comercial, sobre a atividade edematogênica da peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i> e das toxinas BthTX-I e II	43
4.12 Determinação da atividade hemorrágica	43
4.12.1 Avaliação do efeito do inibidor ácido rosmarínico (AR), isolado e comercial, sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha bruta de <i>B. jararacussu</i>	44
4.13 Determinação da atividade miotóxica	44
4.13.1 Avaliação do efeito do inibidor ácido rosmarínico (AR), isolado e comercial, sobre a atividade miotóxica induzida pela peçonha bruta de <i>B. jararacussu</i> e pelas toxinas BthTX-I e II	44
4.14 Determinação da atividade citotóxica da BthTX-I e o inibidor ácido rosmarínico	45
4.14.1 Linhagens humanas	45
4.14.2 Meios de Cultura Celular	45
4.14.3 Manutenção da linhagem	45
4.14.4 Tratamento das células com a BthTX-I e ácido rosmarínico	46
4.14.5 Análise da atividade citotóxica da BthTX-I e o inibidor ácido rosmarínico	46
4.15 Cocristalização proteína-ligante	47
4.16 Estudos das interações entre enzima-inibidor através de modelagem molecular	51
4.17 Análise dos resultados	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Fracionamento do extrato bruto metanólico de <i>C. verbenacea</i>	55
5.2 Purificação das toxinas BthTX-I e BthTX-II da peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i>	57
5.3 Avaliação do efeito do inibidor ácido rosmarínico (AR), isolado e comercial, sobre a atividade fosfolipásica da peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i> e das toxinas BthTX-II e BthA-I-PLA ₂	57
5.4 Avaliação do efeito do inibidor ácido rosmarínico (AR), isolado e comercial, sobre a atividade anticoagulante da toxina BthTX-II	59
5.5 Avaliação do efeito do inibidor ácido rosmarínico (AR), isolado e comercial, sobre a atividade edematogênica da peçonha bruta de <i>Bothrops</i>	59

<i>jararacussu</i> e das toxinas BthTX-I e II	
5.5.1 Peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i>	59
5.5.2 Toxina BthTX-I	61
5.5.3 Toxina BthTX-II	61
5.6 Avaliação do efeito do inibidor ácido rosmarínico (AR), isolado e comercial, sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha bruta de <i>B. jararacussu</i>	61
5.7 Avaliação do efeito do inibidor ácido rosmarínico (AR), isolado e comercial, sobre a atividade miotóxica da peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i> e das toxinas BthTX-I e II	66
5.8 Determinação da Atividade citotóxica	70
5.9 Cocrystalização da BthTX-I com ácido rosmarínico e coleta de dados de difração de raios X	72
5.10 Estudos das interações entre enzima-inibidor por modelagem molecular	76
6. CONCLUSÕES	129
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
APÊNDICE	150

"Falar é completamente fácil, quando se tem palavras em mente que expressem sua opinião.

Difícil é expressar por gestos e atitudes o que realmente queremos dizer, o quanto queremos dizer, antes que a pessoa se vá.

Fácil é julgar pessoas que estão sendo expostas pelas circunstâncias.

Difícil é encontrar e refletir sobre os seus erros, ou tentar fazer diferente algo que já fez muito errado."

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fosfolipases A₂ (PLA₂s)

As fosfolipases A₂ (PLA₂s E. C. 3.1.1.4) são enzimas de grande interesse médico-científico devido ao envolvimento em inúmeras patologias humanas inflamatórias e no envenenamento por peçonhas de serpentes e abelhas. A atividade das PLA₂s foi observada pela primeira vez em peçonha de cobra (*Naja naja*) e em extratos pancreáticos de mamíferos (SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004).

As fosfolipases A₂ catalisam a hidrólise de glicerofosfolípídeos na posição *sn*-2 formando lisofosfolípídeos e ácidos graxos. Estas enzimas ocorrem amplamente na natureza em ambas as formas, intra e extracelular (DENNIS, 1994; da SILVA-GIOTTO et al., 1998; KINI, 2003). De acordo com a fonte, tamanho, efeitos patológicos, similaridade de sequência de aminoácidos, homologia estrutural, modelo da ponte dissulfeto e outros critérios, a superfamília de PLA₂s tem sido classificada em 15 grupos e 27 subgrupos. As PLA₂s dos grupos I, II e III são enzimas extracelulares, têm baixo peso molecular (13.000-18.000), são dependentes de Ca²⁺ para catálise e estruturalmente diferentes das PLA₂s do grupo IV. Estas últimas são intracelulares, citosólicas, dependentes de Ca²⁺ e têm alto peso molecular (85.000) (DENNIS, 1994; WARD; de AZEVEDO; ARNI, 1998; SIX; DENNIS, 2000; SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004; SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

As PLA₂s encontradas em mamíferos exercem papel importante na fertilização, proliferação celular, contração do músculo liso e doenças de hipersensibilidade e inflamação crônica. São também importantes nas funções celulares como transdução de sinais via biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos, e homeostase da membrana, incluindo a manutenção dos “pools” de fosfolípídeos celular e reparo da membrana através de deacilação e reacilação (DENNIS, 1994; KINI, 2003).

Entretanto, as enzimas de mamíferos, geralmente, não são tóxicas e não conseguem induzir efeitos farmacológicos potentes. Por outro lado, as PLA₂s de peçonhas de serpentes, além do possível papel na digestão da vítima, exibem grande variedade de efeitos farmacológicos (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; KINI, 2003).

As peçonhas de serpentes são fontes abundantes de PLA₂s (pPLA₂s) dos grupos I/II e, apesar de estas PLA₂s derivadas de peçonhas mostrarem um alto grau de conservação estrutural com as PLA₂s excretadas de mamíferos, as pPLA₂s de

peçonhas de serpentes apresentam diversidade notável no que se refere às atividades biológicas, uma PLA₂ pode apresentar efeitos biológicos múltiplos (da SILVA-GIOTTO et al., 1998; CHIOATO; WARD, 2003).

Apesar de numerosos estudos, a base molecular para ação farmacológica seletiva e específica de pPLA₂s é ainda incerta. Basicamente, os alvos primários de pPLA₂s podem estar localizados no lado externo da célula, e então o mecanismo de ação de PLA₂ pode envolver (VALENTIN; LAMBEAU, 2000):

- A atividade catalítica intrínseca de pPLA₂, por exemplo, a habilidade de liberar ácidos graxos e lisofosfolídeos biologicamente ativos e potentes a partir de lipídeos de membrana;
- A ligação interfacial de pPLA₂ à membrana bilipídica a qual, sem qualquer hidrólise de fosfolípido, pode afetar funções celulares pela perturbação da membrana celular;
- A ligação de pPLA₂ às proteínas específicas localizadas na membrana celular.

No Brasil, serpentes do gênero *Bothrops* (Viperidae) são responsáveis por mais de 80% de picadas, nas quais a serpente é identificada (ELLENHORN, 1997). O envenenamento causado por peçonhas deste gênero induz a liberação de substâncias farmacologicamente ativas com efeitos locais evidenciados, tais como, hemorragia, edema e necrose tecidual, além de efeitos sistêmicos como, coagulação sanguínea e choque. Necrose muscular é uma consequência séria de picadas de serpente *Bothrops* capaz de causar perda permanente de tecido ou função e requerer amputação do membro afetado. A mionecrose pode ser devida a uma ação indireta sendo uma consequência de degeneração vascular e isquemia causada por metaloproteases hemorrágicas ou por um efeito direto de PLA₂s miotóxicas homólogas nas membranas plasmáticas de células musculares (SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004).

Estas PLA₂s, referidas como miotoxinas, são isoladas de peçonhas de *Bothrops*, pertencem ao grupo IIA de PLA₂s e podem ser subdivididas em dois subgrupos: (i) miotoxinas Lys49, com praticamente nenhuma atividade hidrolítica em substratos artificiais e (ii) miotoxinas Asp49, com baixa atividade enzimática (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995).

Com relação às estruturas primárias, estas PLA₂s têm sido caracterizadas como PLA₂s homólogas básicas, como bothropstoxina-I (BthTX-I, Lys49, cataliticamente inativa em substratos artificiais) (CINTRA et al., 1993) e bothropstoxina-II (BthTX-II, Asp 49, mostrando baixa atividade catalítica) (PEREIRA et al., 1998) ambas isoladas de peçonha de *Bothrops jararacussu* (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988). Além da miotoxicidade, as PLA₂s Asp49 e Lys49 participam de efeitos farmacológicos/tóxicos tais como, edema, anticoagulação, neurotoxicidade, hemólise indireta, citotoxicidade, além de atividade bactericida, antiviral e antiparasitária (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; OWNBY et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2003).

A toxina BthTX-I possui alta atividade miotóxica, com estrutura PLA₂, mas não apresenta atividade fosfolipásica em lecitina de gema de ovo (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988). A BthTX-II é uma miotoxina e possui atividade fosfolipásica A₂ sobre lecitina de gema de ovo (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988).

Grande progresso tem sido obtido em relação aos mecanismos farmacológicos envolvidos na inflamação induzida por PLA₂s de peçonhas, principalmente, depois da descoberta das chamadas fosfolipases A₂ homólogas Lys49 com pouca ou nenhuma atividade enzimática sobre substratos artificiais. Nas Lys49-PLA₂s, o resíduo de ácido aspártico na posição 49 (Asp49) na região do sítio ativo é substituído por lisina (Lys49). Tal substituição de Asp por Lys afeta drasticamente a catálise enzimática, pois não ocorre a interação de PLA₂s com cálcio, um cofator essencial na estabilidade do intermediário tetraédrico na catálise (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988; CINTRA et al., 1993; PEREIRA et al., 1998; da SILVA-GIOTTO et al., 1998; OWNBY et al., 1999; CHIOATO; WARD, 2003; TEIXEIRA et al., 2003).

Em todas as estruturas de PLA₂s do grupo II, é comum haver 7 (sete) pontes dissulfeto e os elementos estruturais principais são conservados. As estruturas são compostas (WARD; de AZEVEDO; ARNI, 1998) de: N-Terminal α -hélice 1 (resíduos 2-13); "Loop" ligante de Ca⁺²; duas α -hélices 2 e 3 antiparalelas (resíduos 40-53 e 90-108); dois filamentos pequenos de folha- β antiparalelas, a asa- β (resíduos 75-84) e "Loop" C-Terminal (resíduos 109-133) (Figura 1).

Alguns resíduos que compõem o sítio catalítico (His48, Tyr52 e Asp99) são completamente conservados em miotoxinas de *Bothrops*. Entretanto, substituições

importantes ocorrem no sítio de ligação de Ca^{2+} como Asn28, Leu32 e Lys49 encontradas em Lys49-PLA₂s (SOARES et al., 2000; SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004).

Figura 1. Representação típica de um monômero de PLA₂s diméricas. Figura feita usando o programa Pymol (DELANO, 2002).

1.2 Inibidores de Fosfolipase A₂ (PLIs)

A conduta clínica com as picadas de serpentes peçonhentas continua provocando controvérsias. As medidas de primeiros-socorros deveriam ser determinadas, primeiramente, pelo tempo e distância dos cuidados médicos, a espécie da serpente envolvida e a resposta individual dos cuidados com a saúde. Em todas as instâncias, a vítima deveria ser tranquilizada, o membro picado imobilizado e providenciado um transporte rápido para uma instituição (KARALLIEDDE, 1995).

Os envenenamentos por picadas animais são frequentemente tratados pela administração parenteral de antipeçonha derivado de cavalo ou ovelha para a neutralização de toxinas (WARRELL, 1996). A administração de antipeçonha tem complicações em potencial. Em vários estudos a incidência de reações de hipersensibilidade foi de 5-33%. É necessário ser cuidadoso com o antipeçonha, pois este é, potencialmente, perigoso e não deveria ser administrado sem uma indicação definida (convicção de envenenamento sistêmico), e também não deveria ser rotina para toda instância em picada de serpente (KARALLIEDDE, 1995).

Entretanto, a soroterapia é ainda pouco eficiente para neutralizar ou reverter o quadro clínico, sendo, então, importante pesquisar diferentes inibidores de peçonhas, sintéticos ou naturais, que complementariam a ação dos antipeçonhas, particularmente na neutralização do dano local do tecido (BORGES et al., 2000). O antipeçonha botrópico polivalente neutraliza pobremente a peçonha de *B. jararacussu*, podendo ser devido à presença de miotoxinas imunologicamente diferentes daquelas presentes na peçonha usado para produzir o antipeçonha, ou uma variação de anticorpos destas miotoxinas no antipeçonha (ZAMUNÉR et al., 2004). Pesquisas comprovam que para um melhor efeito, deve-se fazer associação de antipeçonha botrópico com o crotálico. No tratamento de envenenamento por *B. jararacussu*, este resultado foi comparado com o uso de heparina que inibiu com menor intensidade do que a associação (OSHIMA-FRANCO et al., 2001).

A habilidade de PLA₂s em produzir substratos para a geração de mediadores inflamatórios lipídicos nos processos de lesão do tecido e artrite reumatoide faz desta classe de enzimas alvos muito importantes para a busca de novos inibidores de PLA₂ (PLIs) e a síntese de fármacos específicos (CHANDRA et al., 2002a).

Desde o primeiro relato do isolamento de uma proteína do sangue da serpente Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) por Kihara (1976), pesquisas com serpentes peçonhentas e não-peçonhentas têm permitido a caracterização de uma série de proteínas séricas globulares, as quais possuem habilidade de neutralizar os componentes enzimáticos e tóxicos de PLA₂s de peçonhas de serpentes. A presença destas proteínas inibitórias de PLA₂s tem sido associada com a resistência da serpente aos efeitos deletérios das PLA₂s da peçonha (FAURE, 2000), embora não impeça a possibilidade de desenvolver papéis fisiológicos adicionais (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003). Estes fatores neutralizantes naturais são classificados com base em suas estruturas (NOBUHISA, et al., 1997) e homologia sequencial com outras proteínas (INOUE, et al., 1991). Estes inibidores de PLA₂s têm sido isolados e caracterizados de *Agkistrodon*, *Trimeresurus*, *Bothrops*, *Crotalus*, *Naja*, *Laticaudata* e *Elaphe* (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003). Como exemplo, tem-se uma proteína ácida, crotapotina, isolada da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* que é capaz de inibir edema de pata de camundongo e atividade miotóxica induzidos por PLA₂s de três diferentes tipos de peçonhas de serpentes *Bothrops*, *B. jararacussu*, *B. pirajai* e *B. moojeni* (CECCHINI et al., 2004).

Outro estudo de imunidade natural contra as peçonhas demonstrou a resistência de outros animais como peixes, batráquios, invertebrados e mamíferos, alguns dos quais foram bem estudados, como o ouriço (*Erinaceus europaeus*), o mangusto (*Herpestes edwardsii*) e o gambá (*Didelphis marsupialis*). Estes estudos mostraram que, em muitos casos, a resistência de animais às peçonhas de serpentes pode ser explicada pela presença de fatores proteicos no sangue, os quais inibem a atividade de componentes tóxicos importantes. Pode-se citar o estudo em que fatores que inibem o efeito miotóxico e hemorrágico induzidos pelas peçonhas de *Bothrops* foram encontrados no soro de marsupiais *Didelphis marsupialis*, *D. albiventris* e *Philander opossum* (SOARES et al., 1997; TRENTO et al., 2001; LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003).

As plantas têm sido frequentemente usadas pelos humanos, algumas vezes com sucesso, contra numerosas doenças por diferentes agentes patológicos. Estudos farmacológicos têm demonstrado que extratos e frações de algumas destas plantas usadas na medicina tradicional possuem propriedades anti-inflamatória, antiviral e antiofídica (HART; ROSE; HAMER, 1989; PHILLIPSON; ANDERSON, 1989; MORS et al., 2000). A atividade antiofídica de várias espécies de plantas em

geral usadas em algumas comunidades brasileiras têm sido investigadas cientificamente (BATINA et al., 2000; BORGES et al., 2000, 2001; MORS et al., 2000; BIONDO et al., 2003, 2004; ALMEIDA et al., 2004; TICLI, et al., 2005; VERONESE et al., 2005).

O potencial terapêutico de plantas medicinais é tradicionalmente atribuído às classes de constituintes, incluindo flavonoides, alcaloides, sesquiterpenos, lignanas e outros. Estes inibidores isolados de plantas medicinais podem representar uma ajuda adicional na terapia sérica tradicional e podem ser úteis como modelos moleculares para novos fármacos de baixo preço, poucos efeitos colaterais e facilmente distribuídos nas comunidades de longe acesso, ou mesmo animais, desde que para eles a terapia sérica tradicional não seja completamente adequada (SOARES et al., 2005; MARCUSSI et al., 2007).

O extrato aquoso de *Mandevilla illustris* inibiu totalmente a atividade fosfolipásica da peçonha bruta e da toxina PLA₂ básica de *Crotalus durissus terrificus* (BIONDO et al., 2004). A espécie de *M. velutina* também apresentou inibição total da atividade fosfolipásica da peçonha de *C. durissus terrificus*, porém demonstrou inibição parcial de peçonhas de *Bothrops* (BIONDO et al., 2003).

O extrato aquoso de *Casearia sylvestris* inibe as atividades enzimática e tóxica de várias peçonhas de serpentes (BORGES et al. 2000). Além destes efeitos, o extrato aquoso de *C. sylvestris* possui compostos que neutralizam proteases presentes em peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* (BORGES et al. 2001). O efeito antiofídico dos extratos de *Mikania glomerata* foi mostrado por Maiorano e colaboradores (2005).

Angulo e Lomonte (2003) demonstraram que o fucoidan, um complexo polissacarídeo sulfatado extraído da alga marrom *Fucus vesiculosus*, inibe significativamente o dano muscular em rato, quando administrado localmente, imediatamente depois de envenenamento experimental com peçonha bruta da *Bothrops asper*.

Tem-se relato de complexos de PLA₂, da peçonha de *Daboia russelli pulchella*, com a vitamina E (Figura 2A) (CHANDRA et al., 2002b) e o ácido aristolóquico isolado de *Aristolochia* sp, (CHANDRA et al., 2002c) nos quais os grupos hidroxila destes inibidores formam ligações de hidrogênio com o átomo de oxigênio da Asp49 e de nitrogênio da His48, simultaneamente (CHANDRA et al., 2002a).

Outro inibidor é um sesquiterpenoide não-esteroidal isolado da esponja marinha *Luffariella variabilis* chamado manoalide (Figura 2A), que apresentou inibição irreversível de várias PLA₂s de peçonhas. O mecanismo de inibição pelo manoalide tem sido extensivamente estudado no caso de PLA₂ de abelha e de *Naja n. naja*. Manoalide inativa irreversivelmente e completamente a atividade da crotoxina da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (DORANDEU et al., 2002). Segundo Pommier et al. (2003), o manoalide reduz a expressão da enzima ciclooxigenase 2, e a ligação irreversível com a PLA₂ é consequente da formação de uma base de Schiff entre o tautômero aldeídico do anel hidroxifurano de duas moléculas de manoalide e dois resíduos remotos de lisina na superfície de reconhecimento da enzima.

Bernart et al. (1996) isolaram substâncias ativas do extrato de *Dendropanax arboreus* contra envenenamento de serpentes na Amazônia Boliviana, as quais são dehidrofalcarinol, falcarindiol, dehidrofalcarindiol e dois novos poliacetilenos (Figura 2A).

1.3 Estrutura química de Inibidores de Fosfolipase A₂ (PLIs)

1.3.1 Proteínas

Uma glicoproteína isolada de *Withania somnifera* (Ashwaganda) foi relatada ser ativa contra envenenamento por picada de escorpião. A *W. somnifera* é uma planta medicinal que possui efeitos farmacológicos múltiplos como antiúlcera, anti-hepatotóxico, anti-inflamatório, antitumor, imunomodulador. Estudos prévios têm mostrado que extratos aquosos desta planta neutraliza a atividade da PLA₂ da peçonha de *Naja naja* (MISHRA; SINGH; DAGENAIS, 2000; DEEPA; GOWDA, 2002).

1.3.2 Compostos fenólicos

1.3.2.1 Flavonoides

O efeito inibitório do flavonoide rutina (Figura 2B) isolado de *Phyllanthus klotzchianus* em PLA₂ do grupo I de *Naja naja* e grupo II de *Vipera russelli* e *Crotalus atrox* foi avaliado, mostrando que o rutina inibe eficientemente PLA₂s do grupo II, mas fracamente PLA₂s do grupo I (CHIPPAUX et al., 1997).

Flavonoides têm a habilidade de ligar-se aos polímeros biológicos, e têm mostrado inibir PLA₂. Alguns exemplos (Figura 2B) são primetina, um

constituente de *Primula denticulata*; quercetina, um potente inibidor de lipoxigenase; hesperidina, quercitrina, isoquercitrina, luteolina, canferol, e apigenina. Os flavonoides mencionados mostram a característica estrutural da proximidade e coplanariedade do grupo hidroxila fenólica no átomo de carbono 5 e a carbonila pironica (MORS et al., 2000). Entretanto, isoflavonoides não são frequentes em plantas antipeçonha. Tetoridina e iridina são somente mencionadas (SOARES et al., 2005).

1.3.2.2 Cumestanos

Wedelolactona (Figura 3A) foi encontrada por ser ativo contra peçonhas crotálicas da América do Sul, *C. d. terrificus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *Lachesis muta*, bem como os crotálicos da América do Norte, *C. viridis viridis* e *Agkistrodon contortrix* (MELO et al., 1994; MORS et al., 2000). Wedelolactona é um potente e seletivo inibidor de lipoxigenase 5, enquanto cumestrol (Figura 3A) é 40 vezes menos potente. Estes cumestanos, isolados de *Eclipta prostrata*, e alguns de seus derivados sintéticos estão entre os produtos mais ativos. Em concentração 30 μ M, todos os cinco análogos (Figura 3A) de wedelolactona antagonizaram a liberação de creatina quinase (CK) induzida pela peçonha de *B. jararacussu* no músculo esquelético (da SILVA et al., 2001).

1.3.2.3 Pterocarpanos

Pterocarpanos têm sido descritos como compostos muito ativos. Dois destes, cabenegrina A-I e A-II (Figura 3B), foram isolados de uma planta popularmente chamada “cabeça-de-negro” e são os principais ingredientes do “Específico pessoa”, um remédio usado popularmente no Nordeste do Brasil contra envenenamento por picada de serpente (NAKAGAWA et al., 1982). Outro pterocarpano, edunol, (Figura 3B) foi isolado de *Harpalyce brasiliiana*, outra planta encontrada no Nordeste Brasileiro e usada contra picada de serpente. Este composto apresenta atividade antimiotóxica e antiproteolítica contra peçonha de *B. jararacussu*, além de expressiva propriedade inibitória de PLA₂s (da SILVA et al., 2004).

Figura 2. A) Estruturas de Compostos químicos com atividade inibitória. B) Compostos fenólicos com atividade inibitória: Flavonoides. Figura feita usando o programa ACD/ChemSketch (www.acdlabs.com).

1.3.2.4 Compostos nitrogenados

O alcaloide ácido aristolóquico (Figura 3C) isolado de *Aristolochia radix* inibe as atividades enzimática e farmacológica de uma PLA₂ de peçonha de *Vipera russelli*. Este alcaloide inibe a atividade de indução de edema tão logo atinge o sítio, mas não ajuda na recuperação. Ácido aristolóquico falha ao inibir outras atividades tóxicas da enzima. Tais efeitos do ácido aristolóquico indicam que mecanismos diferentes podem estar envolvidos na atividade de indução de edema de enzimas PLA₂, e que os sítios catalítico e farmacológico estão separados na estrutura de PLA₂s (VISHWANATH; GOWDA, 1987).

Batina e colaboradores (2000) isolaram de *Tabernaemontana catharinensis* um alcaloide, 12-metoxi-4-metilvoacalotina, MMV (Figura 3C), o qual provou ser capaz de inibir a atividade letal de peçonha de *C. d. terrificus*. Este extrato também foi capaz de inibir a atividade letal da crotoxina, a principal toxina da peçonha de *C. d. terrificus* (ALMEIDA et al., 2004). O extrato aquoso de *T. catharinensis* neutraliza parcialmente os efeitos miotóxicos da peçonha de *B. jararacussu* e as miotoxinas BthTX-I e BthTX-II (VERONESE et al., 2005).

Anisodamina (Figura 3C), um fármaco efetivo para tratar picada de serpente, é um alcaloide natural isolado da planta *Anisodus tanguticus*. A estrutura química e ação farmacológica são idênticas às dos agentes bloqueadores de receptor colinérgico, atropina e escopolamina (LI et al., 1999).

Atropina (Figura 3C) é encontrada em algumas espécies da família Solanaceae e sua atividade inibitória tem sido testada contra as toxinas isoladas de serpentes mamba verde e preta (*Dendroaspis angusticeps* e *D. polylepis*). Estes venenos aumentam a liberação de neurotransmissores dos terminais nervosos colinérgicos; portanto é sugerido que um bloqueador colinérgico como atropina possa reduzir estes efeitos (LEE; CHEN; JOUBERT, 1982).

O extrato metanólico da casca do caule de *Schumanniohyton magnificum* e shumaniofoside (Figura 3C), um glicosídeo alcaloide isolado do mesmo extrato, reduziu o efeito letal da peçonha de *Naja melanoleuca* em camundongos (AKUNYILI; AKUBUE, 1986).

Figura 3. Estruturas de Compostos fenólicos com atividade inibitória: A) Cumestanos; B) Pterocarpanos; C) Compostos Nitrosos. Figura feita usando o programa ACD/ChemSketch (www.acdlabs.com).

1.3.2.5 Outros Compostos fenólicos

Entre vários compostos fenólicos com atividade antiofídica, um potente antipeçonha de nome ar-turmerona (Figura 4), com atividade sobre a hemorragia e letalidade causadas pela peçonha de *B. jararaca* e *C. d. terrificus*, respectivamente, foi isolado do extrato hexânico da planta *Curcuma longa* (Zingiberaceae), uma planta comumente utilizada pela população brasileira (FERREIRA et al., 1992).

O xantana quinoide eretianona (Figura 4), isolado de *Ehretia buxifolia*, mostra atividade antipeçonha de serpente. A IC_{50} da peçonha obtida foi 6,65 mg/Kg e o composto não mostrou qualquer efeito tóxico acima de 100 mg/Kg (SELVANAYAGAM et al., 1996).

Dois glicosídeos fenólicos, benzoilsalireposídeo e salireposídeo (Figura 4), têm sido isolados de *Symplocos racemosa* mostrando atividade contra fosfodiesterase I de peçonha de serpente. Benzoilsalireposídeo exerceu uma forte inibição com uma IC_{50} de 171 μ M, enquanto que salireposídeo mostrou uma atividade inibitória menor, com uma IC_{50} de 544 μ M (AHMAD et al., 2003).

Ácido clorogênico e ácido cafeico (Figura 4) podem agir como antídotos pela ligação às proteínas através de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Interações fortes entre estas moléculas têm sido mostradas, com consequente mudança conformacional na proteína (MORS et al., 2000).

O composto ácido 2-hidroxi-4-metoxi benzóico (Figura 4) isolado e purificado do extrato metanólico da raiz de *Hemidesmus indicus* neutralizou a inflamação induzida pela peçonha de *Vipera russelli*. Este composto puro potencializou a neutralização do efeito letal da peçonha pelo antissoro comercial equino polivalente em modelos experimentais (ALAM; GOMES, 1998).

Ácido elágico (Figura 4) isolado do extrato aquoso de *C. sylvestris* inibiu os efeitos miotóxicos e edematogênicos provocados pela PLA_2 , Asp49 BthTX-II, isolada da peçonha de *B. jararacussu* (da SILVA, 2008).

O sal potássico do ácido ginêmico (Figura 4) isolado de *Gymnema sylvestre* (Asclepiadaceae) inibiu a ATPase isolada dos venenos de *Naja naja* e *Vipera russelli* (KINI; GOWDA, 1982a,b). Outro composto testado em testes biológicos para envenenamento por picada de serpente foi o resveratrol (Figura 4) isolado de *Cissus assamica* (YANG; WANG; LIU, 1998).

Figura 4. Estruturas de Outros Compostos fenólicos com atividade inibitória. Figura feita usando o programa ACD/ChemSketch (www.acdlabs.com).

Pela primeira vez, em 2005, as atividades anti-inflamatória e antimiotóxica do extrato de *Cordia verbenacea* e o princípio ativo, ácido rosmarínico (Figura 4), foram relatadas contra os efeitos induzidos pela peçonha da serpente *B. jararacussu* e pelas principais PLA₂s isoladas (TICLI et al., 2005).

O ácido rosmarínico foi isolado primeiramente de *Rosmarinus officinalis* (SCARPATI; ORIENTE, 1958), mas recentemente uma preparação sintética foi descrita (PETERSEN; SIMMONDS, 2003). Ele possui efeitos farmacológicos em vários processos inflamatórios complemento-dependentes (SHETTY, 1997). As principais atividades são adstringente, antioxidante, anti-inflamatório, antimutagênico, antibactericida e antiviral (PETERSEN; SIMMONDS, 2003). Tem sido relatado que a biossíntese do ácido rosmarínico envolve dois aminoácidos aromáticos como precursores, a fenilalanina e tirosina (SHETTY, 1997).

O extrato hidroalcoólico de *Cordia verbenacea* (Boraginaceae) tem sido usado pelo povo brasileiro como cicatrizante e anti-inflamatório (SÉRTIE et al., 1988). Esta planta, popularmente conhecida como erva baleeira, já foi investigada e um componente ativo, mostrando efeito anti-inflamatório, foi isolado e identificado como um flavonoide, o qual foi nomeado artemetina (SÉRTIE et al., 1990).

O ácido rosmarínico está ligado a um grupo de substâncias ésteres e heterosídeos de ácidos fenólicos e do ácido cinâmico. Estas substâncias apresentam ampla distribuição no reino vegetal, sendo encontradas na forma de ésteres, glicosídeos e amidas. Neste grupo destacam-se os derivados do ácido cafeico. Este metabólito secundário é comumente encontrado na família Lamiaceae e Boraginaceae (AUF'MKOLK et al., 1984; PETERSEN; SIMMONDS, 2003).

Os principais efeitos do ácido rosmarínico estudados até o momento são efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antidepressivo e supressor (TAKEDA et al., 2002; MAKINO et al., 2002; CERVELLATI et al., 2002). Também foram realizados experimentos do ácido rosmarínico sobre ação anti-HIV e antiplaquetária (KIM et al., 1999; ZOU; XU; TIAN, 1993). Não foram realizados até o momento experimentos com modificações na fórmula estrutural deste composto, mas já foram avaliadas formas de obtenção utilizando síntese orgânica e estudos sobre o seu metabolismo em ratos (NAKAZAWA; OHSAWA, 1998; MATSUNO et al., 2001). O ácido rosmarínico apresenta fórmula estrutural, C₁₈H₁₆O₈, com PM = 360,315 e sua estrutura molecular pode ser observada na Figura 4.

Compostos fenólicos pertencem a uma classe que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático com um átomo de hidrogênio (H) substituído por uma hidroxila (OH). Estão amplamente distribuídos no reino vegetal e nos micro-organismos. Os animais são incapazes de sintetizar o anel aromático. Os vegetais têm a capacidade de sintetizar o anel benzênico, e a partir dele, compostos fenólicos, derivados da cumarina, pigmentos hidrossolúveis das flores, dos frutos e das folhas. Além disso, esta classe de substâncias abrange as lignanas e os taninos, polímeros com importantes funções nos vegetais (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2002).

1.3.3 Compostos esteroides e terpenoides

1.3.3.1 Esteroides

Os efeitos antimiotóxico e anti-hemorrágico de *Eclipta prostrata* (EP) e dois de seus constituintes, sitosterol e estigmasterol (Figura 5A), foram investigados contra as peçonhas de *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Lachesis muta* e miotoxinas purificadas (bothropstoxina-I, bothropasina e crotoxina) (MELO et al., 1994; MORS et al., 2000). O colesterol (Figura 5A) é outro esteroide que tem sido identificado em antídotos de peçonha de serpente. Esteroides são capazes de formar complexos, os quais são mantidos juntos por forças de van der Waals e efeito hidrofóbico (MORS et al., 2000).

1.3.3.2 Diterpenos

Um diterpenoide clerodane, Bt-CD, (Figura 5A), foi isolado de *Baccharis trimera* (Asteraceae). Este é um inibidor de metaloproteinases de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* com propriedade antiproteolítica e anti-hemorrágica (JANUÁRIO et al., 2004).

1.3.3.3 Triterpenos

Entre os triterpenoides, os triterpenos betulina e ácido betulínico (Figura 5B), extraídos de *Betula alba*, mostraram atividade antifosfolipásica. Estes resultados estão de acordo com o modelo farmacofórico, o qual descreve a importância do grupo carboxilato para a inibição da PLA₂. Estudos de “docking” mostraram que o ácido betulínico pode inserir-se dentro do sítio ligante da PLA₂ com valores de energia corretos (BERNARD et al., 2001).

Uma saponina triterpenoide, chamada bredemeirosida D (Figura 5B), tem sido isolada de *Bredemeyera floribunda* e mostrou uma significativa atividade antiletal de peçonha de *B. jararaca* (PEREIRA et al., 1996).

Outro composto que vem sendo investigado é o 4-nerolidilcatecol (Figura 5B), um terpenoide isolado de *Piper umbellatum* e *Piper godman*, o qual exibe efeitos antifosfolípica e antimiotóxico quando pré-incubado com miotoxinas purificadas de peçonhas *Bothrops* sp (NÚÑEZ et al., 2005).

Vários triterpenos pentacíclicos (Figura 5B) estão associados com atividade anti-peçonha, incluindo ácido oleanólico, lupeol, ácido ursólico, taraxerol, taraxasterol, α,β -amirina e friedelina. Entretanto, triterpenos tetracíclicos com atividade contra peçonha de serpente não tem sido encontrados em plantas, o sugere que, no caso de atividade anti-peçonha e anti-inflamatória, uma estrutura triterpênica com anel de 5 membros é essencial para o farmacóforo ativo (MORS et al., 2000).

1.4 Cristalização e Cocrystalização

A cristalização de macromoléculas biológicas tem como principal objetivo o estudo estrutural desta macromolécula por métodos de difração de raios X. Parâmetros como grau de pureza e concentração da amostra, temperatura, solução-tampão e pH, presença de sais e agentes precipitantes (DRENTH, 1995) são importantes e podem interferir no processo de cristalização. Por ser um processo empírico, experimentos de cristalização de determinada macromolécula frequentemente precisam ser realizados diversas vezes até que se consiga um cristal com tamanho e propriedades adequados à coleta dos dados de difração de raios X.

Figura 5. A) Estruturas químicas compostos esteroides e diterpenos com atividade inibitória; B) Triterpenos com atividade inibitória. Figura feita usando o programa ACD/ChemSketch (www.acdlabs.com).

Para o crescimento de cristais de proteína, estas devem alcançar um estado de supersaturação em solução, podendo resultar em uma fase cristalina ou amorfa, quando retorna ao equilíbrio (Figura 6). Em condições de supersaturação, no qual a proteína se encontra entre uma fase sólida e uma fase solúvel, ligações químicas novas e estáveis são energeticamente favoráveis. Pode-se, então, dizer que a proteína cristaliza porque sua energia livre diminui com o aumento das interações favoráveis (McPHERSON, 2003). É importante lembrar que o cristal apresenta ordem em sua estrutura interna e que esse arranjo é periódico.

A supersaturação pode ser obtida pela evaporação lenta do solvente ou pela variação de alguns parâmetros, como pH, força iônica, tipo de íon, temperatura e concentração do solvente orgânico, que podem ser usados para diminuir a solubilidade da proteína, tornando a solução saturada ou supersaturada (BLUNDELL; JOHNSON, 1976). A solução supersaturada eventualmente dá origem aos núcleos, alguns dos quais crescerão e se tornarão cristais maiores. O processo pode ser dividido em três estágios: nucleação, crescimento e cessação de crescimento (KOBÉ et al., 1999).

Figura 6. Representação esquemática da Curva de Solubilidade para proteínas. Fonte: dos SANTOS, 2007.

A nucleação, onde ocorre formação dos primeiros agregados ordenados, é o processo inicial na obtenção de cristais, os quais representam a fase sólida de uma proteína. Quando o núcleo atinge um tamanho crítico, começa a fase de crescimento. Um cristal pequeno pode crescer pela incorporação de átomos (moléculas) nas suas faces planas em duas dimensões ou em espiral, ou sobre defeitos na superfície do cristal, incorporando uma molécula via interações tridimensionais. O mecanismo dependerá da energia das interações entre os constituintes do cristal nas direções consideradas. A morfologia do cristal corresponde diretamente à taxa de crescimento de cada face: faces crescidas lentamente serão maiores e bem desenvolvidas, enquanto as que crescem mais rapidamente tendem a ser menores. A taxa de crescimento é, geralmente, diretamente proporcional à supersaturação da solução e à solubilidade da molécula num dado solvente, sendo também fortemente influenciada pela presença de impurezas, já que a nucleação pode ocorrer sobre as mesmas. O crescimento de um cristal cessa provavelmente quando há acúmulo de defeitos dentro da rede cristalina, impedindo desta forma a continuação do crescimento de suas faces (McPHERSON, 2003).

Existem diversos métodos de cristalização de proteínas, os quais são utilizados de acordo com o tipo da amostra e com as condições do laboratório. O método mais utilizado é o de difusão a vapor, por permitir o uso de pequenos volumes de amostra e, portanto, possibilitar uma varredura maior de possíveis condições para a cristalização de determinada proteína. Este método é um processo de equilíbrio entre duas soluções através da fase de vapor num meio fechado. A solução menos concentrada perde seu solvente volátil até que os potenciais químicos das duas soluções se igualem. Assim, uma gota contendo a proteína a ser cristalizada, com o tampão, agentes precipitantes e aditivos, é equilibrada contra um reservatório contendo uma solução do agente precipitante a uma concentração mais alta que a gota (DUCRUIX; GIEGÉ, 1992; McPHERSON, 2003).

O método de difusão de vapor pode ser utilizado de três maneiras diferentes (Figura 7): gota suspensa (“hanging drop”) no qual a gota contendo a proteína de interesse e a solução do reservatório é suspensa em uma lamínula siliconizada que veda o reservatório; gota sentada (“sitting drop”), a solução contendo a proteína de interesse pode ser colocada em um compartimento interno do reservatório, este é posteriormente fechado hermeticamente com lamínula de vidro; gota sanduíche

(“sandwich drop”), a solução contendo a proteína é colocada entre a lamínula e o reservatório (DUCRUIX; GIEGÉ, 1992; McPHERSON, 2003).

Cristais de complexos proteína-ligante podem ser obtidos por “soaking” ou por cocrystalização sob condições controladas. Há uma preferência pela cocrystalização, por conduzir mais facilmente a ocupação dos sítios ativos pelos ligantes (INKPEN; PALMER; LADD, 2003). Neste método, o ligante é adicionado à proteína para formar um complexo que é utilizado posteriormente em ensaios de cristalização. Este é o método de escolha quando os compostos são bastante insolúveis ou a proteína agrega facilmente. A cocrystalização é afetada pela temperatura, concentração da proteína, concentração do ligante, o uso de aditivos para melhorar a ligação do ligante, troca do ligante antes da cocrystalização e “cross-seeding” (HASSELL et al., 2007).

Figura 7. Tipos de cristalização por difusão de vapor. Fonte: MARTINI, 2007.

1.5 Modelagem Molecular

1.5.1 Modelagem molecular de proteínas-alvo por homologia estrutural

O conhecimento da estrutura tridimensional de uma proteína é de suma importância quando se planeja experimentos que visam compreender a sua função, bem como quando o objetivo é o planejamento de fármacos que possam interferir na atividade desta proteína. A elucidação experimental de uma estrutura tridimensional pode, muitas vezes, envolver dificuldades tais como não possuir quantidades suficientes de proteína pura, obter cristais que não difratem a uma boa resolução ou envolver, ainda, outros detalhes técnicos que dificultem a determinação das estruturas da proteína nativa e de seus complexos com inibidores.

Neste contexto, não é surpreendente o grande interesse que hoje existe em métodos de previsão de estrutura terciária de proteínas. A metodologia mais bem sucedida de predição de estruturas tridimensionais de proteínas é a modelagem por homologia, também conhecida como modelagem comparativa (SÁNCHEZ; SALI, 1999).

Esta abordagem consiste na construção de modelos do alvo macromolecular (proteína) por comparação da similaridade de sequências primárias com as de proteínas homólogas (ou outras proteínas similares) com estruturas resolvidas (DEANE; BLUNDELL, 2003).

Os métodos correntes de modelagem de proteínas por homologia implicam basicamente em quatro passos sucessivos (SÁNCHEZ; SALI, 1997): identificação e seleção de proteínas-molde depositadas no “Protein Data Bank” (PDB - www.pdb.org); alinhamento das sequências de resíduos; construção das coordenadas do modelo; validação e refinamento do modelo (Figura 8).

O primeiro passo na modelagem comparativa por homologia é a identificação de estruturas tridimensionais resolvidas, que possam atuar como uma base estrutural para a modelagem da sequência-alvo (proteína-alvo). Esta identificação pode ser realizada levando-se em consideração vários aspectos, como: informação estrutural, similaridade da função da proteína, expressão pelo mesmo grupo de genes, similaridade sequencial ou até correlação evolutiva (DEANE; BLUNDELL, 2003).

Figura 8. Etapas envolvidas no processo de obtenção de modelos proteínas-alvo através da utilização de modelagem molecular por homologia estrutural. Fonte: da SILVA, 2007.

Para gerar um alinhamento final entre as sequências-molde selecionadas na busca e a sequência-alvo a ser modelada, são utilizados programas com algoritmos mais adequados do que o **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool – www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) para identificação de similaridade sequencial, como por exemplo, o **MULTALIGN** (BARTON; STERNBERG, 1987). Por este outro algoritmo, o alinhamento é realizado com a sequência polipeptídica completa, sendo denominado, desta forma, de alinhamento global.

Com respeito à faixa aceitável de identidade sequencial para a execução da modelagem molecular por homologia, é bem conhecido e a literatura descreve como significativo um valor acima de 30% de identidade sequencial entre a(s) proteína(s)-molde e a proteína-alvo (D'ALFONSO; TRAMONTANO; LAHM, 2001; SALI, 1998; VITKUP et al, 2001). Este valor é dependente do número de resíduos da proteína que será modelada, sendo menos crítico quanto maior o comprimento da sequência.

Nayeem, Sitkoff e Junior (2006), comparando a precisão de modelos de proteínas de interesse farmacêutico gerados por vários programas disponíveis comercialmente ou de domínio público, verificaram que quando a identidade sequencial é maior do que 40%, os modelos gerados através da estratégia de modelagem por homologia possuem um alto nível de confiabilidade. Quando a identidade sequencial é menor, os resultados tendem a variar, com alguns programas apresentando resultados muito mais precisos que outros.

Com a diminuição da identidade sequencial entre alvo e molde, os erros na modelagem aumentam, podendo ser divididos em cinco categorias (SÁNCHEZ; SALI, 1997): erros no empacotamento das cadeias laterais; distorções e mudanças em regiões corretamente alinhadas; erros em regiões sem molde; erros devido a alinhamentos incorretos ou improváveis; modelos incorretos.

Diferentes métodos de modelagem por homologia usam distintas abordagens para construir um modelo 3D a partir de moldes e alinhamento múltiplo. O programa mais amplamente utilizado em modelagem comparativa, com melhores resultados, é o **MODELLER** (SALI; BLUNDELL, 1993). Este programa começa com um filamento extenso da proteína alvo, e então dobramentos são feitos no modelo para satisfazer às restrições espaciais derivadas do alinhamento entre a sequência-alvo e seus moldes. Em particular, ele busca preservar ângulos diédricos da cadeia principal ou características de ligação de hidrogênio das estruturas moldes. O

MODELLER usa também parâmetros de campos de força que visam minimizar os impedimentos estéricos entre os átomos. Nas regiões de “loop”, com “gaps” no alinhamento, o **MODELLER** usa informações estatísticas derivadas do alinhamento de várias proteínas de estrutura 3D conhecida. O modelo 3D final é obtido por otimização da estrutura, utilizando algoritmo gradiente conjugado e dinâmica molecular com “Simulated annealing”. Nesta técnica, a temperatura do sistema é inicialmente elevada a um patamar e depois resfriada gradualmente. Deste modo, o sistema poderá ter energia suficiente para ultrapassar todas as barreiras que porventura dificultem o acesso a todos os mínimos locais, incluindo o mínimo global de energia. Esta técnica pode conduzir as estruturas mais bem refinadas.

Uma importante etapa no processo de modelagem por homologia é a avaliação da qualidade dos modelos gerados, principalmente se diferentes orientações referentes aos resíduos do sítio ativo forem encontradas para os diferentes modelos gerados (SCHAFFERHANS; KLEBE, 2001). Esta é uma tarefa árdua, pois o nível de qualidade de um modelo gerado por homologia estrutural depende de um grande número de propriedades de diferentes graus de organização estrutural, como: estereoquímica, qualidade do empacotamento e confiabilidade do enovelamento (HÖLTJE et al., 2003). Existem vários programas disponíveis que realizam as análises e cobrem as três abordagens supracitadas. Dentre os mais usados estão: **PROCHECK** (LASKOWSKI; MACARTHUR; THORNTON, 1993), **WHATIF** (VRIEND; SANDER, 1993) e **VERIFY 3D** (LUTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992).

A qualidade estereoquímica das estruturas dos modelos construídos, incluindo a exatidão de parâmetros como comprimento das ligações, ângulos entre ligações, ângulos torsionais de cadeia principal e de ligação peptídica, além de quiralidade dos aminoácidos, precisam ser avaliadas (HÖLTJE et al., 2003). O programa **PROCHECK** (LASKOWSKI; MACARTHUR; THORNTON, 1993) avalia diversos parâmetros estereoquímicos, tais como ângulos torsionais da cadeia principal (Φ e Ψ), ângulos torsionais das cadeias laterais, maus contatos (ou impedimentos estéricos), energias das ligações de hidrogênio, planaridade das ligações peptídicas, desvios em relação à geometria tetraédrica dos carbonos- α , dentre outros. Uma média da qualidade relativa à maioria dos parâmetros avaliados é representada pelo “G-factor” e os cálculos baseiam-se em um banco de dados de proteínas que contém estruturas resolvidas a diferentes graus de resolução. A rigor,

o “G-factor” é sempre referido nos resultados a uma determinada resolução estrutural, na qual existe um valor médio de cada parâmetro associado às proteínas envolvidas na avaliação.

Existe uma variedade de métodos que usam uma grande quantidade de informação derivada de estruturas de proteínas resolvidas para estimar a qualidade do empacotamento de modelos de proteínas. Partindo da premissa de que as interações átomo-átomo são as principais determinantes da conformação proteica, Vriend e Sander (1993) desenvolveram um método, contido no programa **WHATIF**, que checa a qualidade do empacotamento de modelos de proteínas através de cálculos do chamado “índice da qualidade de contato”. Este índice é a medida da correlação entre a distribuição dos átomos ao redor de uma cadeia lateral de um aminoácido e as distribuições equivalentes observadas em proteínas com estruturas já resolvidas. Por esta razão, um banco de dados que contém uma distribuição de probabilidade de contato atômico para todas as cadeias laterais dos aminoácidos é utilizado. Neste banco de dados é descrita a probabilidade de certo átomo ocorrer em uma região particular ao redor da cadeia lateral. Os valores de probabilidade são usados para avaliar a qualidade dos contatos atômicos em um modelo de proteína. Quanto maior for a correlação entre as distribuições no modelo e as estruturas cristalizadas maior será a qualidade do índice.

O modelo proteico também pode ser avaliado com relação à qualidade dos ambientes químicos, com o objetivo de se determinar o nível de confiabilidade do enovelamento proteico do modelo virtual gerado. O programa **VERIFY 3D** (LUTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992), que pode ser utilizado para tal finalidade, determina os ambientes químicos de cada resíduo do modelo e atribui escores com referência a uma matriz construída a partir de uma análise estatística envolvendo estruturas de proteínas do PDB (www.pdb.org). Nesta matriz estão contidas três propriedades que cada resíduo apresenta dentro de cada um dos 18 ambientes químicos definidos. Finalmente, o programa realiza uma promediação na “janela” com o objetivo de detectar regiões de baixa qualidade. A soma dos escores obtidos é comparada ao valor ideal esperado para uma proteína de igual comprimento. O resultado da soma deve ser maior do que 45% do valor esperado (ideal), que é a faixa encontrada para estruturas de boa qualidade.

1.5.2 Planejamento racional de fármacos “in silico”

Existem diversas aplicações para informações estruturais a respeito de proteínas e, conseqüentemente, de modelos gerados por homologia, em vários estágios do processo de planejamento racional de fármacos baseado em estrutura. Os casos mais especiais são aqueles em que as informações estruturais do alvo terapêutico ajudam na identificação e otimização de compostos que se tornam candidatos a testes clínicos (HILLISCH; PINEDA; HILGENFELD, 2004).

O planejamento racional de fármaco baseado em estrutura é um processo iterativo e, muitas vezes, envolve vários ciclos antes do composto otimizado ir para a fase I de ensaios clínicos. O primeiro ciclo inclui a clonagem, purificação e determinação da estrutura da proteína-alvo ou do ácido nucleico por um dos três principais métodos: cristalografia de raios-X, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ou modelagem por homologia, como descrito anteriormente. Usando algoritmos específicos, compostos ou subestruturas de compostos selecionados “in silico” a partir de uma base de dados são posicionados em uma região definida da estrutura da proteína (ou ácido nucleico). Estes compostos são ranqueados e classificados com base nas interações van der Waals e eletrostática com o sítio alvo, além da avaliação dos maus contatos receptor-ligante. Os compostos mais promissores podem ser testados com ensaios de atividade. No segundo ciclo, a determinação da estrutura do alvo em complexo com um composto promissor do primeiro ciclo, com desejável inibição “in vitro” em faixa micromolar ou menor, revela sítios/grupos no composto que podem ser otimizados para aumentar a potência do protótipo. Ciclos adicionais incluem síntese do produto otimizado, determinação da estrutura do novo complexo alvo-composto e, ainda, a otimização do composto. Depois de vários ciclos do processo de planejamento racional de fármaco, os compostos otimizados, geralmente, mostram acentuada melhora na interação com o sítio receptor e, muitas vezes, na especificidade para o alvo (ANDERSON, 2003).

Simulações de “screening” (busca-varredura) virtual são constantemente aplicadas a estruturas de modelos tridimensionais elaborados a partir da estratégia de modelagem por homologia. Estas simulações ajudam na identificação de moléculas pequenas, advindas de bancos de dados, com grande potencial de interação com a proteína-alvo. Usualmente, estes bancos de dados são constituídos de moléculas que apresentam propriedades “drug-like” (KAIRYS; FERNANDES; GILSON, 2006), e podem ser construídos ou, posteriormente,

analisados por diferentes filtros (ou regras). Além disso, tais modelos de proteínas (ou ácido nucleico) podem ser empregados em simulações de “docking” em conjunto com a estrutura de moléculas ativas identificadas em ensaios biológicos, com o objetivo de prever o modo de ligação destes compostos com o sítio ativo da proteína, bem como extrapolar este poder de predição para explicar o sucesso/insucesso de outras moléculas as quais não foram submetidas a ensaios biológicos com a proteína-alvo.

Em “docking” molecular são investigadas as possíveis orientações que determinada molécula assume no interior do sítio ligante de um receptor biológico. Estes métodos incluem uma função de energia (a função de escore) contendo parâmetros eletrostáticos, de van der Waals, de ligações de hidrogênio e, algumas vezes, hidrofóbicos, gerando modelos matemáticos que predizem as melhores orientações segundo uma lista de escores de energia. O “Problema do ‘docking’” é assim concentrado na geração e avaliação (quase sempre por intervenção do usuário) de plausíveis estruturas de complexos intermoleculares (CODDING, 1998).

O problema supracitado envolve muitos graus de liberdade. Existem seis graus de liberdade rotacional e translacional de uma molécula, relativa à outra, bem como os próprios graus de liberdade de cada molécula. Os algoritmos de “docking” podem ser caracterizados de acordo com o número de graus de liberdade que eles ignoram. Assim sendo, os algoritmos mais simples tratam as duas moléculas como corpos rígidos e exploram somente os seis graus de liberdade rotacional e translacional. As mais recentes versões de **DOCK** (KUNTZ, 1992), **FlexX** (RAREY et al., 1996), **GOLD** (VERDONK et al., 2003) e **AutoDock** (GOODSELL; OLSON, 1990) consideram a flexibilidade do ligante. **GOLD** (Genetic Optimisation for Ligand Docking), por exemplo, é um programa de “docking” que utiliza um algoritmo genético para explorar toda a flexibilidade conformacional do ligante, com parcial flexibilidade da proteína. Os parâmetros utilizados em **GOLD** foram originalmente otimizados e o programa foi validado contra 305 diferentes complexos proteína-ligante do PDB, amplamente checados, alcançando cerca de 71% de sucesso na identificação da conformação cristalográfica do ligante (JONES et al., 1997).

Métodos de “docking” são computacionalmente muito eficientes, os quais permitem o “screening” de grandes bases de dados de compostos e o qual requer grande poder computacional, buscando-se por novos e diferentes conjuntos

de moléculas, as quais seriam hábeis de interagir com o alvo molecular. Nesta era pós-genômica, o “screening” virtual realmente complementa os conhecidos métodos experimentais de “screening” em larga escala no processo de descoberta de novos compostos ditos “de partida ou líderes” (KUNTZ, 1992). Porém, o sucesso deste “screening”, dito “in silico” e, em geral, das técnicas de “docking”, depende do conhecimento de detalhes estruturais finos do sítio de reconhecimento (CARLSON; MASUKAWA; McMAMMON, 1999).

Predizer interações moleculares é objetivo primordial da estratégia “análogo ativo” em planejamento racional de fármacos. Um modelo importante para alcançar este objetivo é o farmacóforo. O farmacóforo é o arranjo espacial de características essenciais para um grupo de moléculas interagir com um receptor alvo específico (DROR et al., 2004). A análise, por métodos computacionais, dos possíveis conjuntos de grupos farmacofóricos associados a cada molécula ativa, permite a derivação do padrão farmacofórico comum ao conjunto de análogos ativos em questão. Vários métodos computacionais para identificação/derivação do farmacóforo têm sido desenvolvidos, dentre os mais eficientes destacam-se **DiscoTech** e **GALAHAD** (SYBYL USER GUIDE, 2005).

PharmaGist é um servidor que pode ser utilizado para elucidar farmacóforos 3D a partir de um conjunto de moléculas que são conhecidas por ligar-se ao receptor alvo. Os farmacóforos candidatos são detectados por alinhamento flexível múltiplo dos ligantes utilizados (SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2008).

Uma diferente e robusta metodologia do planejamento racional de fármacos consiste em investigar as condições energéticas entre moléculas, as quais se aproximam uma da outra, gerando os “campos de interação molecular” (MIF, do inglês, “Molecular Interaction Field”), assim denominados. Estes campos descrevem a variação da energia de interação entre uma molécula alvo e um grupo de prova que se move confinado ao interior de uma “caixa” de energia (um “grid” 3D), o qual é posicionado de modo a mapear a região de interesse do alvo biológico (o sítio receptor). Os grupos químicos de prova refletem as características químicas de um componente ideal que pode interagir com o alvo molecular. Os programas de uso mais frequente que empregam esta metodologia são o **GRID** (GOODFORD, 1985) e, mais recentemente, o **CMIP** (BARRIL et al, 2001) e o **VolSurf** (CRAMER; PATTERSON; BUNCE, 1988).

O programa **GRID** contém 33 grupos de prova e sua importância remonta-se ao fato de ter sido ele o programa pioneiro na análise do campo de interação molecular, hoje na berlinda do planejamento racional de fármacos, tendo sido implementado, inclusive, em um dos métodos de maior sucesso em estudos que relacionam estrutura com atividade (QSAR): o **CoMFA** (Análise Comparativa do Campo Molecular) (CRAMER; PATTERSON; BUNCE, 1988).

Finalmente, na tentativa de tornar os compostos modelados mais semelhantes a um fármaco, é possível simular propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, bem como propriedades “drug-like” de moléculas, já anteriormente mencionadas. Propriedades relacionadas a absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), podem ser preditas a partir do “screening” de bases de dados contendo estas informações, as quais são computadas para uma grande variedade de compostos. Tudo isso contribui para agilizar o processo de descoberta de um novo medicamento, além de reduzir os custos financeiros inerentes ao processo. Entre os programas mais utilizados para estes fins, podem ser citados o **ADMET Predictor** (predições de ADMET – www.simulations-plus.com), **Meteor** (predições de metabolismo – TESTA et al., 2005) e **Derek** (predição de toxicidade – SANDERSON; EARNSHAW, 1991).

"Fácil é ser colega, fazer companhia a alguém, dizer o que ele deseja ouvir.

Difícil é ser amigo para todas as horas e dizer sempre a verdade quando for preciso. E com confiança no que diz.

Fácil é analisar a situação alheia e poder aconselhar sobre esta situação.

Difícil é vivenciar esta situação e saber o que fazer. Ou ter coragem pra fazer."

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Estudo das interações entre as Fosfolipases A₂, BthTX-I e II, (Lys49 e Asp49) da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu* e o inibidor, ácido rosmarínico.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e caracterizar funcionalmente o inibidor vegetal, ácido rosmarínico, do extrato metanólico de *Cordia verbenacea* e o já comercializado;
- Isolar e caracterizar funcionalmente as PLA₂ miotóxicas, Lys49 BthTX-I e Asp49 BthTX-II, de *Bothrops jararacussu*;
- Propor a melhor interação entre as PLA₂s Lys49 (bothropstoxina-I) e Asp49 (bothropstoxina-II) isoladas das peçonhas de *B. jararacussu* e o inibidor ácido rosmarínico via (i) cocristalização e (ii) modelagem molecular;
- Propor modificações na estrutura do ácido rosmarínico, em direção à proposta de um potencial novo fármaco, viável sinteticamente;
- Predizer as propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade do ácido rosmarínico;

"Fácil é demonstrar raiva e impaciência quando algo o deixa irritado.

Difícil é expressar o seu amor a alguém que realmente te conhece, te respeita e te entende. E é assim que perdemos pessoas especiais.

Fácil é mentir aos quatro ventos o que tentamos camuflar.

Difícil é mentir para o nosso coração."

3. MATERIAL

3.1 Vegetal

Folhas da planta *Cordia verbenacea* coletadas na época de floração no campus da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

3.2 Ácido rosmarínico comercial

O inibidor ácido rosmarínico comercial foi adquirido da Fluka (código: 44699) com grau de pureza superior a 95%.

3.3 Peçonha

Peçonha bruta liofilizada de *B. jararacussu* adquirido do Instituto Butantan de São Paulo.

3.4 BthTX-I e II

As miotoxinas BthTX-I e II foram obtidas a partir do fracionamento da peçonha bruta de *B. jararacussu*, no laboratório de toxinologia da FCFRP-USP, segundo o método descrito por Homsí-Brandeburgo et al. (1988).

3.5 Animais

Camundongos machos da linhagem Suíça com peso de 18-22g, procedentes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

3.6 Plasma

Plasma humano procedente do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto.

3.7 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais – (Protocolo nº 05.1.688.53.0) e também pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo para utilização de plasma humano fornecido pelo Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto.

3.8 Reagentes em geral

- Kit CK NAC Bioclin;

- Metanol (P.A) – Synth; Clorofórmio (P.A) – Synth; Metanol (HPLC) – Merck; demais reagentes de grau analítico.

3.9 Resinas

Sephadex G-75 – Merck; SP-Sephadex C-25 – Merck; Sephadex LH-20 – Merck; Sílica GF – Sigma Chem. Co.

"Fácil é ver o que queremos enxergar.

Difícil é saber que nos iludimos com o que achávamos ter visto.

Admitir que nos deixamos levar, mais uma vez, isso é difícil.

Fácil é dizer "oi" ou "como vai?"

Difícil é dizer "adeus". Principalmente quando somos culpados pela partida de alguém de nossas vidas..."

4. MÉTODOS

4.1 Coleta e classificação do vegetal

As amostras de *Cordia verbenacea* foram coletadas na época da floração no Campus da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). A identificação botânica foi realizada pelo Prof. Dr. Lin Chau Ming do Departamento de Botânica da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Botucatu e a excisata foi depositada no herbário da Unidade de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) com o nº de registro 259.

4.2 Preparação do vegetal

Após a coleta, as folhas de *Cordia verbenacea* foram secas em estufa de ar circulante à temperatura de 60°C. Em seguida, as folhas foram pulverizadas em moinho, para fornecer pó fino.

4.3 Preparação do extrato de *Cordia verbenacea*

As folhas secas e moídas (2.000g) foram maceradas com clorofórmio (1.800 mL) por 15 dias à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi filtrada e concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida. A solução concentrada foi diluída em 100mL de uma solução metanol/água (7:3), acrescida de 200mL de hexano e submetida a uma partição, onde se separaram a fase hidroalcoólica e a hexânea, que em seguida foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida.

4.4 Fracionamento do extrato bruto metanólico de *C. verbenacea*

O fracionamento foi realizado em coluna contendo Sephadex LH-20 (40 x 1,8 cm), utilizando como fase móvel o solvente metanol (300 mL).

4.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As frações obtidas no item anterior foram monitoradas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando-se placas de vidro revestidas com sílica gel GF (SIGMA). Em tubo “eppendorf” contendo 5 mg de extrato, adicionaram-se 200 µL de metanol. As amostras foram aplicadas nas cromatoplasas a 1 cm de uma das extremidades, deixando-se secar a temperatura ambiente.

A cromatografia foi realizada em cuba fechada, previamente saturada com a fase móvel: Clorofórmio/Metanol (8:2)

Para revelação dos componentes do extrato foram utilizados os reveladores: NP/PEG (difenilboriloxietilemina/polietilenoglicol) e luz UV (ultravioleta) com comprimentos de onda de 254 e 366 nm.

As frações que possuíam constituintes idênticos foram agrupadas obtendo-se três frações, F1, F2 e F3.

4.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A fração F3 obtida da filtração em Sephadex LH-20, foi submetida a uma coluna semipreparativa Supelcosil C-18 (25cm x 10mm), detector diodearray SPD M-10A, coletor de frações FRC-10A, duas bombas para fase móvel LC-10AD e comunicador CBM-10A da Shimadzu. A fase móvel utilizada foi metanol:água em gradiente 0:10 durante 60 minutos, aumentando a concentração de metanol até obter o gradiente 10:0 e em seguida voltar ao gradiente inicial. O tempo total de corrida da fase móvel foi de 110 minutos, utilizando fluxo a 2,0mL/min. Foram obtidas, sete frações do CLAE, denominadas de CL1, CL2, CL3, CL4, CL5, CL6 e CL7, sabendo-se que a fração correspondente ao inibidor ácido rosmarínico é a CL6 (TICLI et al., 2005).

4.7 Purificação das toxinas BthTX-I e BthTX-II da peçonha de *Bothrops jararacussu*

4.7.1 Preparação da amostra

Amostras de 500mg da peçonha bruta liofilizada de *B. jararacussu* foram suspensas em 5,0mL de tampão formiato de amônio (NH₄FO) 0,05M, pH 3,5. Alíquotas foram retiradas para dosagem de proteínas pelo método do microbiureto (ITZHAKI; GILL, 1964) e leitura da absorbância em 280nm.

4.7.2 Filtração em gel de Sephadex G-75

As amostras anteriormente citadas foram aplicadas a uma coluna contendo Sephadex G-75 (110 x 4,0cm), previamente equilibrada, e eluídas com tampão formiato de amônio 0,05M, pH 3,5 (CINTRA et al., 1993). Foram coletadas frações de 10mL, em coletor de frações num fluxo de 30mL à temperatura ambiente.

A absorbância das frações coletadas foi determinada em 280nm, em espectrofotômetro Beckman DU-640. As frações obtidas resultaram em 5 picos, os quais foram liofilizados.

4.7.3 Cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-25

Em primeiro lugar foi feita a ciclização da resina SP-Sephadex C-25, suspendendo-se a mesma em uma solução de NaOH 0,5M, filtrada em funil de placa sinterizada sob pressão reduzida e lavada com água destilada até pH neutro. Em seguida, foi suspensa em HCl 0,5M e lavada inúmeras vezes com água destilada até atingir pH neutro. A resina foi então suspensa em tampão acetato de amônio (NH_4Ac) 0,1M pH 5,0 e deaerada.

A fração correspondente ao pico S_{III} obtido da filtração em gel de Sephadex G-75 foi submetida à cromatografia de troca iônica. A fração foi, então, dissolvida em 5,0mL de tampão acetato de amônio 0,1M, pH 5,0 e aplicada à coluna (45 x 2,0cm) contendo SP-Sephadex C-25, previamente preparada e equilibrada. Alíquotas foram retiradas para dosagem de proteínas e para leitura de absorbância em 280nm.

A amostra foi eluída com um gradiente de concentração de acetato de amônio 0,1M, 1,0M, e 2,0M, pH 5,0. Os valores numéricos da concentração molar foram obtidos através da medida de condutividade nos tubos e lançados na reta padrão traçada com concentrações molares conhecidas de acetato de amônio. A condutividade foi medida em um condutivímetro Digimed CD 20.

Frações de 5,0mL foram coletadas, num fluxo de 10mL/h em temperatura ambiente e suas absorbâncias determinadas em 280nm. As frações foram dializadas e liofilizadas. Foram obtidas seis frações, sendo as duas últimas, $S_{III}SP_{IV}$ e $S_{III}SP_V$, a BthTX-II e BthTX-I, respectivamente.

4.7.4 Dessalificação em Gel de Sephadex G-10

As frações $S_{III}SP_{IV}$ e $S_{III}SP_V$ (BthTX-II e I, respectivamente), obtidas da cromatografia em SP-Sephadex C-25, após liofilização, foram dissolvidas em 5,0mL de bicarbonato de amônio 0,3M, aplicados à coluna (190x2,5cm) contendo Sephadex G-10 e então eluídas com o mesmo tampão, num fluxo de 24mL/h. Alíquotas foram retiradas para leitura da absorbância em 280nm e a dosagem de proteínas foi feita segundo o método do microbiureto (ITZHAKI; GILL, 1964).

Frações de 5,0mL por tubo foram coletadas em temperatura ambiente e suas absorbâncias determinadas em 280nm.

4.8 Preparação das soluções de peçonha e das toxinas BthTX-I e BthTX-II

A peçonha da serpente *Bothrops jararacussu* e as toxinas foram dissolvidas em PBS (solução salina tamponada em fosfato) na dose de 1,25mg de peçonha/Kg/25µL PBS ou 2,5mg de BthTX-I ou BthTX-II/Kg/25µL PBS e centrifugados a 12.000 x g por 5 minutos.

4.9 Determinação da atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi determinada *in vitro*, em meio de cultura com gema de ovo (6 gemas/L), CaCl₂ (0,56g/L) e agar (20g/L), com base na metodologia de Haas et al. (1968). Foram inoculados a peçonha bruta (1µg), uma fosfolipase A₂ básica, a toxina BthBX-II (1µg) e uma ácida, a BthA-I-PLA₂ (1µg) da peçonha de *B. jararacussu* por um período de 24 horas, sendo o diâmetro dos halos formados medidos em mm.

A determinação da quantidade de peçonha e toxinas utilizadas foi analisada em experimentos anteriores variando a dose da peçonha de *B. jararacussu* (1 a 10 µg), medindo-se os halos formados pela atividade fosfolipásica em diferentes tempos (1, 2, 4 e 24 horas após a inoculação da peçonha), variando o pH do meio (5, 6, 7 e 8) e a temperatura de incubação do meio (25, 30 e 37°C).

4.9.1 Avaliação do efeito do inibidor ácido rosmarínico (AR), isolado e comercial, sobre a atividade fosfolipásica da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e das toxinas BthTX-II e BthA-I-PLA₂

Nesta etapa, foi fixada a dose de 1,0 µg/50µL de peçonha bruta ou BthTX-II ou BthA-I-PLA₂ para a indução da atividade fosfolipásica e de AR em 5; 10 e 50 µg para a inibição da atividade fosfolipásica.

Em tubos “eppendorf” foram misturados 25 µL da peçonha ou BthTX-II ou BthA-I-PLA₂ (1,0µg/25µL PBS) com 25 µL de AR, isolado e comercial (5; 10 ou 50 µg/25µL PBS) e imediatamente após foram aplicados ao meio de cultura dos grupos 1:5, 1:10 e 1:50. Foram utilizados cinco grupos controles, sendo um administrado com PBS (50µL), outro com peçonha ou BthTX-II ou BthA-I-PLA₂ (1µg/25µL PBS),

misturado com 25µL de PBS para atingir o volume final de 50µL e outro com AR (50µg/50µL).

4.10 Determinação da atividade anticoagulante

A atividade anticoagulante (VALENTIN; LAMBEAU, 2000) foi realizada utilizando plasma humano (200µL), CaCl_2 (0,25mM) e BthTX-II (0,5µg). O plasma foi colocado em um tubo de ensaio em banho-maria a 37°C por 5min. Após este intervalo de tempo foi adicionado 0,5µg de BthTX-II e após 10min aplicou-se 25µL de CaCl_2 . Após 45min se o plasma não estiver coagulado então considera-se incoagulável. Para teste controle de plasma não se adiciona a BthTX-II mas PBS, onde o plasma deve coagular no intervalo de 3 a 6h.

Para determinar a quantidade adequada de BthTX-II a ser adicionada ao plasma foram realizados ensaios com diferentes concentrações (0,1; 0,25; 0,5 e 1µg). Por este teste ser muito sensível, qualquer variação da quantidade de BthTX-II torna o plasma coagulável. Para garantir o controle do plasma incoagulável foi utilizado o dobro da D.A.M. (Dose anticoagulante mínima).

4.10.1 Avaliação do efeito do inibidor ácido rosmarínico (AR), isolado e comercial, sobre a atividade anticoagulante da toxina BthTX-II

Nesta etapa, foi fixada a concentração de 0,5µg/50µL de BthTX-II para a indução da atividade anticoagulante e de AR, isolado e comercial, em 0,5; 5,0; 15 e 25µg para a inibição da atividade anticoagulante.

Em tubos de “eppendorf” foram misturados 25µL de BthTX-II (1µg/25µL PBS) com 25µL de AR (0,5; 5,0; 15 ou 25,0µg/25µL PBS) e imediatamente após, administrou-se 50µL desta mistura aos animais dos grupos AR (1:1), AR (1:10), AR (1:30) e AR (1:50), por via i.m. Foram utilizados três grupos controles, sendo um administrado com PBS (50µL), outro com BthTX-II (1µg/25µL PBS), misturado com 25µL de PBS para atingir o volume final de 50µL e outro com AR (25mg/Kg/50µL).

4.11 Determinação da atividade edematogênica

Para esta etapa foram utilizados camundongos, os quais foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 5 animais, que permaneceram em repouso para adaptação por 24h. Cada grupo recebeu um tratamento diferente.

O edema foi induzido através de injeção intradérmica na região subplantar da pata posterior direita, sendo avaliado com um paquímetro de baixa pressão 0,01mm (MYTUTOYO, Japão) nos intervalos de 0; 0,5; 1; 2; 4 e 24h após a injeção.

4.11.1 Avaliação do efeito do inibidor ácido rosmarínico (AR), isolado e comercial, sobre a atividade edematogênica da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e das toxinas BthTX-I e II

Nesta etapa, foram fixadas as doses de peçonha bruta em 1,25mg/Kg (25µg/animal) e das toxinas em 2,5mg/Kg para a indução do edema e AR, isolado e comercial, em 1,25; 6,25 e 12,5mg/Kg para a inibição do edema induzido pela peçonha bruta e em 2,5; 12,5 e 25mg/Kg para a inibição do edema induzido pelas toxinas.

Em tubos de “eppendorf” foram misturados 25µL da peçonha (1,25mg/Kg), ou BthTX-I, ou BthTX-II (2,5mg/Kg) com 25µL de AR (1,25; 6,25 e 12,5mg/Kg) para os grupos administrados com peçonha e 2,5; 12,5 e 25mg/Kg, com as toxinas e imediatamente após, administrou-se 50µL desta mistura aos animais dos grupos AR (1:1), AR (1:5) e AR (1:10), por via i.d.. Foram utilizados cinco grupos controles, sendo um administrado com PBS (50µL), outro com peçonha (1,25mg/Kg), ou BthTX-I, ou BthTX-II (2,5mg/Kg), misturado com 25µL de PBS para atingir o volume final de 50µL e outro com AR (25mg/Kg/50µL).

4.12 Determinação da atividade hemorrágica

Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 4 animais, permanecendo em repouso para adaptação por 24h. Cada grupo recebeu um tratamento diferente.

A hemorragia foi induzida através de injeção intradérmica na região dorsal, sendo a pele retirada 3h após a injeção. O halo hemorrágico formado foi medido em milímetros (mm) segundo método de Kondo et al. (1960).

4.12.1 Avaliação do efeito do inibidor ácido rosmarínico (AR), isolado e comercial, sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha bruta de *B. jararacussu*

Nesta etapa, foi fixada a dose de peçonha bruta em 1,0mg/Kg (de ROODT et al, 2000) para a indução da hemorragia e AR, isolado e comercial, em 1; 5 e 10 mg/Kg para a inibição da atividade hemorrágica.

Em tubos de “eppendorf” foram misturados 25µL da peçonha (1,0mg/Kg/25µL) com 25µL de AR (1; 5 ou 10mg/Kg/25µL) e imediatamente após, administrou-se 50µL desta mistura aos animais dos grupos AR (1:1), AR (1:5) e AR (1:10), por via intradérmica. Foram utilizados quatro grupos controles, sendo um administrado com PBS (50µL), outro com peçonha (1,0mg/Kg/25µL) misturada com 25µL de PBS para atingir o volume final de 50µL, outro com AR isolado (10mg/Kg/25µL) e outro com AR comercial (10mg/Kg/25µL).

4.13 Determinação da atividade miotóxica

Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 5 animais, que permaneceram em repouso para adaptação por 24h. Cada grupo recebeu um tratamento diferente.

A miotoxicidade foi induzida através de injeção intramuscular no músculo gastrocnemius direito, sendo o sangue colhido, pela veia cava, 3 horas após a injeção. O sangue foi centrifugado a 12.000 xg por 6min e o plasma obtido foi utilizado para dosagem de CK (SOARES et al., 2000) em espectrofotômetro Gênesis 2 a 340nm, utilizando Kit CK NAC Bioclin.

4.13.1 Avaliação do efeito do inibidor ácido rosmarínico (AR), isolado e comercial, sobre a atividade miotóxica induzida pela peçonha bruta de *B. jararacussu* e pelas toxinas BthTX-I e II

Nesta etapa, foram fixadas as doses de peçonha bruta e das toxinas em 2,5mg/Kg para a indução da miotoxicidade e AR, isolado e comercial, em 2,5; 12,5 e 25mg/Kg para a inibição da atividade miotóxica.

Em tubos de “eppendorf” foram misturados 25µL da peçonha, ou BthTX-I, ou BthTX-II (2,5mg/Kg) com 25µL de AR (2,5; 12,5 ou 25mg/Kg) e imediatamente após, administrou-se 50µL desta mistura aos animais dos grupos AR (1:1), AR (1:5) e AR (1:10), por via intramuscular (i.m.). Foram utilizados cinco

grupos controles, sendo um administrado com PBS (50µL), um com peçonha, ou BthTX-I, ou BthTX-II (2,5mg/Kg), misturado com 25µL de PBS para atingir o volume final de 50µL, um com AR (25mg/Kg/50µL) isolado e outro com o AR (25mg/Kg/50µL) comercial.

4.14 Determinação da atividade citotóxica da BthTX-I e o inibidor ácido rosmarínico

4.14.1 Linhagens humanas

Foi utilizada linhagem humana HL60 (leucemia promielocítica aguda). A linhagem tumoral foi obtida da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC, “American Type Culture Collection”, Rockville, MD, USA). Esta linhagem foi mantida criopreservada em nitrogênio líquido a -195°C em solução de congelamento que consiste em: meio RPMI 1640, suplementado com 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 90% de soro bovino fetal.

Para fazer os ensaios de atividade citotóxica da BthTX-I e do inibidor ácido rosmarínico, estas células foram descongeladas e expandidas em frascos de cultura celular, à temperatura de 37°C, em estufa incubadora umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂.

4.14.2 Meios de Cultura Celular

Para a manutenção da linhagem humana, dissolução da BthTX-I e do ácido rosmarínico e realização dos ensaios de atividade citotóxica, utilizamos o meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 20mM de L-glutamina, 7,5% de bicarbonato de sódio e 10µg/mL de gentamicina (meio RPMI completo). Este meio é preparado na hora do uso e esterilizado por filtração em membranas de 0,22µm.

4.14.3 Manutenção da linhagem

A linhagem celular foi armazenada em nitrogênio líquido (-195°C) em alíquotas de 1×10^6 células/mL em uma solução de congelamento. Para a realização dos experimentos, as células foram descongeladas e cultivadas em monocamada, em frascos de 25cm² com 10mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementados com

10% de soro equino fetal e 5% de soro bovino fetal, incubadas em estufa a 37°C, até atingirem o estado de confluência ($\sim 5 \times 10^6$ células), sendo subcultivadas a cada três dias.

4.14.4 Tratamento das células com a BthTX-I e ácido rosmarínico

A proteína foi diluída em diversas concentrações a fim de se estabelecer a IC₅₀ (Concentração Inibitória) na cultura da linhagem HL60. Após ter sido determinada a IC₅₀, foram realizados experimentos com a proteína juntamente com o inibidor. As amostras foram diluídas em PBS 1X estéril e colocadas em cultura. Permaneceram em cultura por 24 horas.

4.14.5 Análise da atividade citotóxica da BthTX-I e o inibidor ácido rosmarínico

Para o ensaio da atividade citotóxica a linhagem tumoral em crescimento logarítmico foi removida dos frascos de cultura celular, transferidas para tubos plásticos de 15mL, lavadas 1 vez através da centrifugação a 1000 r.p.m / 5 minutos em meio completo, contadas em Câmara de Neubauer e ressuspensas à concentração final de 10^6 células / mL em meio completo. As células foram então plaqueadas em placas de 96 poços nas concentrações apropriadas (10^5 células/poço) e mantidas em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar por 24 horas. Findo este período, as células tumorais foram incubadas na presença de BthTX-I e/ou ácido rosmarínico por 24 horas.

Para avaliar a atividade citotóxica da BthTX-I e do ácido rosmarínico, utilizamos o método colorimétrico de citotoxicidade (MOSMANN, 1983). Este método consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Quando as células estão vivas as desidrogenases mitocondriais são capazes de agir sobre substratos como o 3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT) levando a redução desta molécula formando assim o Azul de Formazan. Portanto, quanto maior a viabilidade celular em uma determinada amostra, mais Azul de Formazan é formado. O Azul de Formazan é solubilizado com dodecilsulfato de sódio ou Isopropanol em meio ácido. A leitura da quantidade de Azul de formazan formado é medida através do espectrofotômetro em 540nm.

Deste modo, após a incubação de 24h das linhagens tumorais com as diferentes concentrações de BthTX-I e/ou ácido rosmarínico, foram adicionadas aos poços de cultivo celular, 10µL de MTT na concentração de 5mg/mL. A placa foi então incubada por mais 3 horas em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂ à 37°C. Após este período, foram acrescentados 100µL de solução a 10% de dodecil sulfato de sódio/HCl 0,01N, para dissolver os sais de formazan. As placas de cultivo celular foram mantidas por 2 horas na estufa a 37°C até o momento da leitura. A avaliação de sais de formazan nas amostras foi medida em espectrofotômetro em 540nm. Todos os experimentos foram feitos em três repetições com triplicatas para cada concentração. As células não tratadas foram consideradas controle negativo (CN) e as culturas tratadas com ciplastina (100µg/mL) foram consideradas controle positivo (CP). A citotoxicidade sobre a linhagem tumoral foi calculada conforme a seguinte fórmula:

$$(A) \% \text{ de Crescimento} = \frac{[(D.O \text{ Tumor} + \text{substância teste}) - (D.O \text{ Basal MTT/ SDS})] \times 100}{[(D.O \text{ Tumor} + \text{meio de cultura}) - D.O \text{ Basal MTT/SDS}]}$$

$$\% \text{ citotoxicidade da substância teste} = 100 - \% \text{ de crescimento celular (A)}$$

4.15 Cocrystalização proteína-ligante

Os estudos de cocrystalização proteína-ligante foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Marcos Roberto M. Fontes, no Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu/SP, sendo realizado como parte do projeto da doutoranda Juliana Izabel dos Santos.

As etapas para resolução de uma estrutura proteica ou de um complexo proteína-ligante por difração de raios X (DRENTH, 1995), de maneira simplificada, são mostradas no fluxograma a seguir:

Figura 9. Etapas para resolução de uma estrutura proteica por difração de raios X de maneira simplificada.

As etapas até então realizadas foram: cocrystalização, coleta de dados de difração de raios X, processamento dos dados de difração de raios X e caracterização inicial dos cristais. Atualmente, o modelo estrutural do complexo proteína / inibidor se encontra em fase inicial de refinamento.

Para a cocrystalização foi utilizado o princípio “salting-out”, que consiste na preparação de uma solução de um agente precipitante (sal, polietilenoglicol – PEG, ou solvente orgânico) e proteína, com posterior aumento gradativo da concentração do agente precipitante até se alcançar o ponto de supersaturação do complexo proteína-ligante, ocorrendo, então, precipitação ou cristalização. A cristalização ocorrerá somente se o processo for bastante lento; é importante lembrar que, em termos termodinâmicos, o estado de menor energia para o complexo é a forma cristalina.

Em um primeiro momento, a técnica utilizada foi a Difusão de Vapor, sistema gota suspensa (“hanging drop”). Neste método a gota contendo a proteína de interesse é colocada sobre uma lamínula de vidro siliconizada e, posteriormente fixada com graxa na parte superior do poço, de forma que a gota fique interna ao reservatório.

Os cristais obtidos inicialmente com o “hanging drop” apresentavam-se sob a forma de pequenos feixes cristalinos, cujo tamanho impossibilitava a realização da difração de raios X dos mesmos. Assim, optou-se pela utilização do sistema “sitting drop” (gota sentada), já que esta técnica permite um melhor contato entre a proteína e o seu inibidor (ácido rosmarínico) e sua utilização proporcionou a obtenção de cristais maiores. Em ambos os casos foram utilizados placas de cristalização (Figura 10) e no “sitting drop” foram também utilizadas “microbridges” (Figura 11).

Figura 10. Placa usada na cristalização.

Figura 11. “Microbridge”.

O procedimento para utilização da técnica de “sitting drop” se dá da seguinte forma: a solução preparada, contendo o agente precipitante, é inserida em um dos poços; o ácido rosmarínico é então colocado em contato com a “microbridge” de forma a espalhar-se pela superfície da mesma; em seguida, a proteína é colocada sobre o ácido rosmarínico, ambos permanecendo em contato por certo tempo à temperatura controlada para que ocorra uma maior interação entre o inibidor e a proteína em questão, possibilitando, assim, um maior contato entre ambos; após, um certo volume da solução do poço é colocada sobre a solução proteína + inibidor. Após este procedimento, a “microbridge” é inserida no poço, o qual é tampado com uma lamínula de vidro, vedando-se o sistema com uma graxa especial para que as trocas que ocorrerão a partir de então se deem somente entre os componentes do sistema – com isso elimina-se a interferência do ambiente.

A coleta de dados de difração de raios X é muito importante, pois constitui a única fonte de dados através da qual podemos obter a estrutura cristalográfica. Os dados são obtidos quando um feixe de raios X, após incidir sobre um material cristalino, sofre difração. Estes dados podem ser obtidos através da utilização de uma fonte de raios X convencional, com um ânodo rotatório, ou raios X de um síncrotron (como o existente no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas - SP). A coleta de dados é feita por placas de imagens reutilizáveis com leitura a laser ligadas através de uma interface a uma estação, na qual as imagens de difração de raios X podem ser visualizadas (através da intensidade das difrações) e então ocorre o processamento dos dados. Inicialmente, pode-se determinar a partir deste conjunto de dados informações como grupo espacial, parâmetros de rede do cristal, número de monômeros da proteína na unidade assimétrica e previsão da porcentagem de água no cristal.

Após a coleta de dados de difração de raios X, estes têm que ser processados e a partir de então, os dados obtidos são utilizados para dar início à determinação estrutural. A determinação de uma estrutura proteica pode ser feita através do método de Substituição Molecular, utilizando-se o programa AMoRe – “Automated Package for Molecular Replacement” (NAVAZA, 1994). Porém, uma restrição para o uso deste método consiste na necessidade de uma alta homologia sequencial entre a proteína em estudo e a proteína que servirá de modelo, cuja estrutura deve ser conhecida. O procedimento baseia-se no fato de proteínas com

sequência semelhante de aminoácidos possuírem enovelamentos similares (McREE, 1993; DRENTH, 1995).

Após o processamento dos dados provenientes da coleta de dados de difração de raios X, é gerado um mapa de densidade eletrônica e inicia-se o refinamento da estrutura. O modelo gerado pela substituição molecular é, então, refinado até a máxima concordância entre dados experimentais e a estereoquímica da molécula, o que pode ser feito utilizando-se os programas CCP4 (para refinamento de corpo rígido) e o CNS (ciclos de refinamento de posição dos átomos e do fator de temperatura B) (BRÜNGER et al., 1998). Durante as etapas de refinamento, faz-se também ajustes manuais do modelo à densidade eletrônica utilizando o programa gráfico “O” (JONES et al., 1990).

4.16 Estudos das interações entre enzima-inibidor através de modelagem molecular

Realizou-se uma busca no PDB (www.pdb.org) por estruturas de PLA₂s resolvidas, utilizando os servidores BLASTp e PSI-BLAST. Entre as idênticas, foram selecionadas as estruturas de maior resolução e grau de refinamento, restando somente 8 sequências. Então, um alinhamento “pairwise” (aos pares) usando o módulo **MULTALIGN** (BARTON; STERNBERG, 1987) do pacote **AMPS** foi realizado envolvendo estas 8 sequências, seguido de um alinhamento múltiplo, agora também com a sequência da toxina BthTX-I, outro com a sequência da toxina BthTX-II e mais um com a toxina BthA-I-PLA₂ presente na peçonha de *B. jararacussu*, fixando-se os elementos de estrutura secundária das proteínas usadas como moldes (o “block file”). Um refinamento do alinhamento gerado por **AMPS** foi realizado, superpondo-se as 8 estruturas-molde.

Para obter os modelos foi utilizado o programa **MODELLER**. Foi utilizado o alinhamento das 8 sequências, com e sem alterações, para obtenção dos modelos, dos quais o melhor foi selecionado por critérios de qualidade estereoquímica (avaliada com o programa **PROCHECK**), de empacotamento de resíduos (avaliada com o módulo **Coarse Packing Quality Control** do programa **WHATIF**) e ambientes químicos (avaliada com **VERIFY 3D**, implementado no programa **INSIGHT II**).

Simulações de “docking” foram realizados para propor um modo de ligação entre o ácido rosmarínico e 53 inibidores de PLA₂ com as toxinas BthTX-I, II e BthA-

I-PLA₂. Os cálculos foram realizados com o programa **GOLD 3.1.1** (VERDONK et al., 2003), o qual utiliza um algoritmo genético para explorar toda a flexibilidade conformacional do ligante, com parcial flexibilidade da proteína.

Para a simulação de “docking”, átomos de hidrogênio foram adicionados ao modelo estrutural das enzimas. Para a BthTX-I foi selecionado o átomo de nitrogênio zeta (ζ) do resíduo Lys122 como átomo central do sítio ativo e, a partir dele, gerou-se uma esfera de 12 Å de raio. Para a BthTX-II foi selecionado o átomo de carbono epsilon (ϵ) do resíduo His48 como átomo central do sítio ativo e gerado uma esfera de 11 Å de raio. Em relação à BthA-I-PLA₂ o átomo escolhido foi o mesmo do anterior, carbono ϵ do resíduo His48, como átomo central do sítio ativo e criado uma esfera de 13 Å de raio de ligação.

Dez orientações de melhor escore foram selecionadas pela função “GoldScore” para cada composto, e a melhor destas foi considerada para as análises. “GoldScore” classifica as orientações das moléculas em ordem decrescente de afinidade (escore) com o sítio ligante do receptor. Todas as estruturas foram otimizadas por métodos químico-quânticos a nível B3LY/6-31G* de cálculo, com o objetivo de gerar estruturas de mais alta qualidade. As figuras foram preparadas utilizando-se o programa **PyMOL** (DELANO, 2002).

Adicionalmente, um “screening” virtual preliminar foi executado para BthTX-I, II e BthA-I-PLA₂ com o programa **GOLD 3.1.1** usando as seguintes bases de dados: Ilibdiverse (<http://www.inteligand.com/ilibdiverse/>), contendo cerca de 4.000 compostos disponíveis comercialmente, com propriedades “drug-like”; dentre as coleções de compostos disponíveis no **ChemBridge** (<http://chembridge.com/chembridge/>), a **DIVERSet** foi escolhida, contendo 52.000 pequenas moléculas, as quais apresentam propriedades “drug-like”; uma subdivisão da base **iResearch Library** (<http://www.chemnavigator.com/>) contendo 114.000 compostos disponíveis comercialmente e contendo propriedades “drug-like”. O método mostra-se eficiente para a seleção racional de novas estruturas. O método utilizado para o “screening” virtual é um “docking” do tipo “search” no sítio ativo da enzima com milhares de potenciais inibidores da base de dados. Todas as orientações obtidas no processo de “docking” para os compostos selecionados a partir do “screening” virtual com as toxinas BthTX-I, II e BthA-I-PLA₂ foram submetidas a um posterior “docking” flexível como refinamento, denominado “rescore”, utilizando o programa **GOLD 3.1.1**.

Hipóteses de farmacóforo foram geradas por três diferentes procedimentos para os 54 inibidores de PLA₂ relatados na literatura. Com os programas **Sybyl/GALAHAD** (RICHMOND et al., 2006) e **Discovery Studio**, 12 de 54 inibidores foram alinhados e selecionados por critérios de similaridade estruturais e funcionais. Para o servidor **PharmaGist** (SCHNEIDMAN-DUHOVNY, 2008) foram selecionados 32 de 54 inibidores por critérios de similaridade estruturais, sendo este o número máximo aceito pelo servidor.

Análises de campos de interação molecular (MIFs) foram realizadas usando o programa **GRID** (GOODFORD, 1985) na região do sítio de interação da BthTX-I. Quatro grupos de provas foram utilizados para o mapeamento estereoquímico: hidrofóbico (DRY), carbono aromático, carboxila e hidroxila.

Com o objetivo de detectar os sítios ligantes na proteína, a toxina BthTX-I foi submetida ao programa **Q-SiteFinder** (<http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/qsitefinder/>). Estes sítios seriam possíveis locais onde os ligantes se posicionariam para interagir com maior afinidade, segundo interação de van der Waals, com o sítio receptor. O programa detecta cavidades na superfície de proteína, particularmente na região do sítio receptor, tipicamente onde os compostos se ligariam. Este programa pode confirmar os sítios ligantes da BthTX-I, especulados ou descritos na literatura (LAURIE; JACKSON, 2005).

Descritores moleculares foram calculados com o programa **Tsar** (www.accelrys.com) para os inibidores de PLA₂ selecionados, bem como os compostos selecionados por “screening” virtual

Propriedades farmacocinéticas e predições toxicológicas foram calculadas usando o programa **DEREK** e o servidor **ADME/Tox WEB** (www.pharma-algorithms.com/webboxes) para os inibidores de PLA₂ selecionados, bem como para os compostos selecionados por “screening” virtual e sugeridos como potenciais ligantes PLA₂.

4.17 Análise dos resultados

Os resultados foram expressos pela média +/- desvio padrão (SD). A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) “one-way” com o uso do programa GraphPad Prism (versão 4 Prism, GraphPad, USA) e os níveis de significância dentro do intervalo de confiança $0,1 < p < 0,05$.

"Fácil é abraçar, apertar as mãos, beijar de olhos fechados.

Difícil é sentir a energia que é transmitida. Aquela que toma conta do corpo como uma corrente elétrica quando tocamos a pessoa certa. Difícil é amar completamente só. Amar de verdade, sem ter medo de viver, sem ter medo do depois. Amar e se entregar. E aprender a dar valor somente a quem te ama.

Fácil é ouvir a música que toca.

Difícil é ouvir a sua consciência. Acenando o tempo todo, mostrando nossas escolhas erradas."

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Fracionamento do extrato bruto metanólico de *C. verbenacea*

O isolamento do ácido rosmarínico foi realizado segundo metodologia descrita por Ticli et al. (2005). Após as três extrações com o solvente metanol foram obtidos 13,2 g de extrato bruto metanólico, que demonstra um rendimento de 3,51%. O fracionamento do extrato bruto metanólico (1g) em coluna cromatográfica contendo Sephadex LH-20, apresentou 3 frações: a F1 sendo a mais rentável (81,5%), a F2 a menos rentável (7,8%) e a F3 que apesar do pouco rendimento (8,7%) apresentou estar mais pura, que a F1. Este método apresentou 2% de perda de material. Cerca de 40mg da fração F3 foram submetidos a uma Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) obtendo-se as frações CL1, CL2, CL3, CL4, CL5, CL6 e CL7 (Figura 12), das quais a fração CL6 mostrou ter maior rendimento (47%). O rendimento obtido neste último passo cromatográfico para cada fração, pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Rendimento das frações CL1 a CL7 obtidas em CLAE

FRAÇÕES	QUANTIDADE (mg)	RENDIMENTO (%)
F3	40	100
CL1	8,00	20
CL2	0,88	2,2
CL3	1,00	2,5
CL4	1,40	3,5
CL5	0,96	2,4
CL6	18,80	47
CL7	4,80	12

Figura 12. Fluxograma para fracionamento do extrato hidroalcoólico de *C. verbenacea*.

5.2 Purificação das toxinas BthTX-I e BthTX-II da peçonha de *Bothrops jararacussu*

As etapas envolvidas no processo de fracionamento da peçonha de *B. jararacussu* visando a purificação das toxinas BthTX-I e II constituem um processo relativamente fácil. Consiste basicamente em uma filtração em gel de Sephadex G-75 e uma cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-25, possibilitando assim a obtenção das subfrações SIIISPI a SIIISPV.

Na primeira etapa do fracionamento da peçonha de *B. jararacussu* foram obtidas cinco frações designadas SI, SIIA, SIIB, SIII e SIV (Figura 13A), sendo que a fração SIII (onde encontram-se as toxinas BthTX-I e II) representou cerca de 41% da peçonha bruta. A etapa seguinte de purificação consistiu na cromatografia de troca iônica da fração SIII, obtendo-se seis frações, SIIISPI a SIIISPV, sendo as frações SIIISPIV e SIIISPV as toxinas BthTX-II e I, respectivamente (Figura 13B).

Estudos realizados por Homsí-Brandeburgo et al. (1988) mostraram que somente as frações SIII e SIV provaram ser termoestáveis e somente SIII revelou ter atividade fosfolipásica.

5.3 Avaliação do efeito do inibidor ácido rosmarínico (AR), isolado e comercial, sobre a atividade fosfolipásica da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e das toxinas BthTX-II e BthA-I-PLA₂

A Figura 14 demonstra o tamanho do halo, em milímetros, promovido pela atividade fosfolipásica sobre o substrato de gema de ovo em meio sólido, após administração da peçonha bruta (Figura 14A e B), ou BthTX-II (Figuras 14C e D), ou BthA-I-PLA₂ (Figuras 14E e F) (1 µg/50 µL) de *B. jararacussu* misturado ao AR (1; 5 e 10 µg). A atividade fosfolipásica não foi realizada com a toxina BthTX-I por esta ser desprovida de tal atividade (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988).

O que se observa é que os meios tratados com AR, tanto isolado quanto o comercial, nas concentrações (1; 5 e 10 µg) não apresentaram diminuição significativa no tamanho do halo promovido pela atividade fosfolipásica quando comparado aos grupos controle da peçonha bruta e das toxinas BthTX-II e BthA-I-PLA₂.

Figura 13. A) Filtração em gel de Sephadex G-75 de 500mg da peçonha bruta de *B. jararacussu* em tampão formiato de amônio 0,05M pH 3,5 à temperatura ambiente. Coluna 110 x 40cm, fluxo de 30mL/h, volume coletado por tubo 10mL. B) Cromatografia em SP-Sephadex C-25 da fração correspondente ao pico SIII (Figura 13A). Amostra 328mg da fração SIII (5mL). A eluição foi realizada inicialmente com tampão acetato de amônio 0,1M e em seguida com gradiente de concentração de acetato de amônio de 1 e 2M, pH 5,0 à temperatura ambiente. Coluna 45 x 2cm; fluxo: 18mL/h; volume por tubo: 5mL. ▲ Concentração molar de NH_4Ac .

5.4 Avaliação do efeito do inibidor ácido rosmarínico (AR), isolado e comercial, sobre a atividade anticoagulante da toxina BthTX-II

Nesta etapa, foi fixada a concentração de 0,5µg/50µL de BthTX-II para a indução da atividade anticoagulante e de AR, isolado e comercial, em 0,5; 5,0; 15 e 25µg para a inibição da atividade anticoagulante.

O que se observa é o que o plasma tratado com ácido rosmarínico, tanto isolado quanto comercial nas concentrações estudadas (0,5; 5,0; 15 e 25µg) não apresentaram inibição da atividade anticoagulante promovida pela toxina BthTX-II, ou seja, o plasma continuou incoagulável mesmo com o ácido rosmarínico misturado a toxina.

5.5 Avaliação do efeito do inibidor ácido rosmarínico (AR), isolado e comercial, sobre a atividade edematogênica da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e das toxinas BthTX-I e II

Apesar de o extrato hidroalcoólico de *C. verbenacea* ter apresentado, desde os primeiros testes, conter substâncias que promovem a inibição do edema provocado pelas toxinas da peçonha de *B. jararacussu*, neste projeto, os resultados obtidos com o AR isolado não foram positivos com o edema provocado pela peçonha bruta de *B. jararacussu*, provavelmente pelo fato da peçonha bruta atuar em vários sistemas farmacológicos devido à presença de diferentes proteínas e enzimas, tais como metaloproteases, LAAOs, serinoproteases, nucleotídeases e outras (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000).

5.5.1 Peçonha bruta de *Bothrops jararacussu*

O efeito do inibidor AR, isolado e comercial, sobre a atividade edematogênica da peçonha bruta de *B. jararacussu* pode ser observado na Figura 15.

Os resultados apresentados para o AR isolado demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos PB + AR (1), PB + AR (5) e PB + AR (10) e o grupo controle peçonha nos tempo 0,5; 1; 2; 4 e 24h (Figura 15A).

Os resultados apresentados para o AR comercial demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos PB + AR (1), PB + AR (5) e PB + AR (10) e o grupo controle peçonha nos tempo 0,5; 1; 2; 4 e 24h. No entanto, a

porcentagem de edema nos animais administrados com PB + AR (10) apresentou melhor resultado (Figura 15B).

Figura 14. Efeito do inibidor AR isolado e comercial sobre a atividade fosfolipásica da (A e B) peçonha bruta e das toxinas (C e D) BthTX-II e (E e F) BthA-I-PLA₂ de *B. jararacussu*.

A e B: PBS = 50 µL; PB = PB 1 µg/50 µL; PB + AR (1): PB 1 µg + AR 1 µg/50 µL; PB + AR (5): PB 1 µg + AR 5 µg/50 µL; PB + AR (10): PB 1 µg + AR 10 µg/50 µL; AR = AR 50 µg/50 µL.

C e D: PBS = 50 µL; BthTX-II = BthTX-II 1 µg/50 µL; BthTX-II + AR (1): BthTX-II 1 µg + AR 1 µg/50 µL; BthTX-II + AR (5): BthTX-II 1 µg + AR 5 µg/50 µL; BthTX-II + AR (10): BthTX-II 1 µg + AR 10 µg/50 µL; AR = AR 50 µg/50 µL.

E e F: PBS = 50 µL; BthA-I = BthA-I 1 µg/50 µL; BthA-I + AR (1): BthA-I 1 µg + AR 1 µg/50 µL; BthA-I + AR (5): BthA-I 1 µg + AR 5 µg/50 µL; BthA-I + AR (10): BthA-I 1 µg + AR 10 µg/50 µL; AR = AR 50 µg/50 µL. N = 5. Os resultados representam a média ± DP. Letras iguais para grupos estatisticamente iguais (p < 0,05).

5.5.2 Toxina BthTX-I

O efeito do inibidor AR, isolado e comercial, sobre a atividade edematogênica da toxina BthTX-I pode ser observado na Figura 16.

Os resultados apresentados para o AR isolado demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos BthTX-I + AR (1), BthTX-I + AR (5) e BthTX-I + AR (10) e o grupo controle BthTX-I nos tempos 1; 2, 4 e 24h. No entanto, os animais tratados com o inibidor em todas as concentrações apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) da porcentagem de edema, quando comparados ao grupo controle da toxina, no tempo de 0,5h (Figura 16A).

Os resultados apresentados para o AR comercial demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos BthTX-I + AR (1), BthTX-I + AR (5) e BthTX-I + AR (10) e o grupo controle BthTX-I nos tempos 0,5; 1; 2; 4 e 24h (Figura 16B).

5.5.3 Toxina BthTX-II

O efeito do inibidor AR, isolado e comercial, sobre a atividade edematogênica da toxina BthTX-II pode ser observado na Figura 17.

Os resultados apresentados para o AR, tanto isolado (Figura 17A) quanto comercial (Figura 17B), demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos BthTX-II + AR (1), BthTX-II + AR (5) e BthTX-II + AR (10) e o grupo controle BthTX-II nos tempo 0,5; 1; 2; 4 e 24h.

5.6 Avaliação do efeito do inibidor ácido rosmarínico (AR), isolado e comercial, sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha bruta de *B. jararacussu*

A Figuras 18 demonstra o tamanho do halo hemorrágico em milímetros, após administração da peçonha (1,0 mg/Kg) e da peçonha bruta misturada ao AR, isolado e comercial (1; 5 e 10 mg/Kg) por via intradérmica.

O que se observa é que os animais tratados com AR, tanto isolado (Figura 18A) quanto comercial (Figura 18B) na concentração 10 mg/Kg apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) no tamanho do halo hemorrágico quando comparado ao grupo controle da peçonha. Deve-se ressaltar que o AR comercial apresentou além da diminuição do halo hemorrágico, uma diminuição nítida na intensidade da coloração referente à atividade hemorrágica da peçonha bruta,

demonstrando ser um potente antagonista da atividade hemorrágica desta peçonha, em uma dose considerada baixa (10mg/Kg).

Este resultado contraria os obtidos por Ticli et al. (2005), onde a inibição da atividade hemorrágica foi atingida em uma concentração extremamente alta (50mg/Kg) para um princípio ativo isolado.

Figura 15. Efeito do inibidor AR sobre a atividade edematogênica da peçonha bruta de *B. jararacussu*. A) AR isolado; B) AR comercial.

Tratamentos: **PBS** = 50µL. N = 5; **PB** = 1,25mg/Kg/50µL PBS; **PB + AR (1)**: 1,25mg peçonha/Kg/25µL PBS + 1,25mg AR/Kg/25µL PBS; **PB + AR (5)**: 1,25mg peçonha/Kg/25µL PBS + 6,25mg AR/Kg/25µL PBS; **PB + AR (10)**: 1,25mg peçonha/Kg/25µL PBS + 12,5mg AR/Kg/25µL PBS; **AR** = 25mg/Kg/50µL. Os resultados representam a média ± DP. Letras iguais no mesmo intervalo de tempo são grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

Figura 16. Efeito do inibidor AR sobre a atividade edematogênica da BthTX-I. A) AR isolado; B) AR comercial.

Tratamentos: **PBS** = 50 μ L. N = 5; **BthTX-I** = 2,5mg/Kg/50 μ L PBS; **BthTX-I + AR (1)**: 2,5mg BthTX-I/Kg/25 μ L PBS + 2,5mg AR/Kg/25 μ L PBS; **BthTX-I + AR (5)**: 2,5mg BthTX-I/Kg/25 μ L PBS + 12,5mg AR/Kg/25 μ L PBS; **BthTX-I + AR (10)**: 2,5mg BthTX-I/Kg/25 μ L PBS + 25mg AR/Kg/25 μ L PBS; **AR** = 25mg/Kg/50 μ L. Os resultados representam a média $\pm$ DP. Letras iguais no mesmo intervalo de tempo são grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

Figura 17. Efeito do inibidor AR sobre a atividade edematogênica da BthTX-II. A) AR isolado; B) AR comercial.

Tratamentos: **PBS** = 50 μ L. N = 5; **BthTX-II** = 2,5mg/Kg/50 μ L PBS; **BthTX-II + AR (1)**: 2,5mg BthTX-II/Kg/25 μ L PBS + 2,5mg AR/Kg/25 μ L PBS; **BthTX-II + AR (5)**: 2,5mg BthTX-II/Kg/25 μ L PBS + 12,5mg AR/Kg/25 μ L PBS; **BthTX-II + AR (10)**: 2,5mg BthTX-II/Kg/25 μ L PBS + 25mg AR/Kg/25 μ L PBS; **AR** = 25mg/Kg/50 μ L. Os resultados representam a média $\pm$ DP. Letras iguais no mesmo intervalo de tempo são grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

Figura 18. Efeito do AR sobre atividade hemorrágica da peçonha bruta de *B. jararacussu*. A) AR isolado; B) AR comercial.

Tratamentos: **PB**: 1,0mg/Kg/50 μ L PBS; **AR (1)**: 1,0mg PB/Kg/25 μ L PBS + 1,0mg AR/Kg/25 μ L PBS; **AR (5)**: 1,0mg PB/Kg/25 μ L PBS + 5mg AR/Kg/25 μ L PBS; **AR (10)**: 1,0mg PB/Kg/25 μ L PBS + 10mg AR/Kg/25 μ L PBS; **AR**: 10mg AR/Kg/50 μ L. Os resultados representam a média $\pm$ DP. Letras iguais para grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

5.7 Avaliação do efeito do inibidor ácido rosmarínico (AR), isolado e comercial, sobre a atividade miotóxica da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e das toxinas BthTX-I e II

O ensaio biológico mais promissor para o AR foi a inibição da miotoxicidade da peçonha bruta e da toxina BthTX-I, o que indica uma provável inibição de alterações sobre a membrana plasmática e consequentemente as fibras musculares esqueléticas. O estudo da atividade miotóxica foi realizado através da metodologia de dosagem de CK no plasma. Aumento nos níveis de CK é observado no sangue quando as células que contêm a enzima são lesadas (NOAKES, 1987). Portanto, a liberação de CK é um indicador de degeneração muscular, podendo também ocorrer em quadro de hemorragia grave (MEBS; OWNBY, 1990).

A peçonha de *B. jararacussu* é bastante estudada por sua ação miotóxica, ou seja, aumento da liberação da enzima CK no organismo e destruição do tecido muscular. Queiroz et al. (1985) observaram necrose das fibras musculares 10 minutos após injeção da peçonha desta serpente em ratos.

Estudos *in vitro*, realizados em músculos isolados também demonstram que tanto a peçonha bruta quanto as toxinas BthTX-I e II induzem aumento de liberação da enzima CK ao meio (MELO et al., 1994).

A peçonha bruta de *B. jararacussu* e a toxina BthTX-II possuem atividade fosfolipásica que podem influenciar na liberação da enzima CK (MELO et al., 1994). A toxina BthTX-I possui estrutura homóloga à PLA₂ e embora ausente desta atividade apresenta ação sobre os mastócitos (LANDUCCI et al. 1998), que podem aumentar os níveis de CK no plasma.

A Figura 19 mostra os níveis de CK no plasma após a administração, por via i.m., da mistura de PB com AR. Observa-se que os animais tratados com ácido rosmarínico, isolado e comercial, tiveram diminuição significativa dos níveis de creatina cinase (CK), quando comparado ao grupo controle da peçonha.

A Figura 20 mostra que os animais tratados com ácido rosmarínico, isolado e comercial, tiveram diminuição significativa dos níveis de creatina cinase (CK), quando comparado ao grupo controle da toxina BthTX-I.

Os resultados obtidos demonstram que é preciso doses baixa (2,5mg/Kg) de AR, isolado e comercial, para ocorrer a inibição significativa ($p < 0,05$) da miotoxicidade promovida pela peçonha bruta e pela toxina BthTX-I.

A Figura 21 mostra que os animais tratados com ácido rosmarínico, isolado e comercial, tiveram pequena, mas significativa diminuição dos níveis de creatina cinase (CK), quando comparado ao grupo controle da toxina BthTX-II.

Figura 19. Efeito do AR sobre a atividade miotóxica da PB de *B. jararacussu*. A) AR isolado; B) AR comercial.

Tratamentos: **PBS** = 50µL. N = 5; **PB** = 2,5mg/Kg/50µL PBS; **PB + AR (1)**: 2,5mg peçonha/Kg/25µL PBS + 2,5mg AR/Kg/25µL PBS; **PB + AR (5)**: 2,5mg peçonha/Kg/25µL PBS + 12,5mg AR/Kg/25µL PBS; **PB + AR (10)**: 2,5mg peçonha/Kg/25µL PBS + 25mg AR/Kg/25µL PBS; **AR** = 25mg AR/Kg/50µL. Os resultados representam a média ± DP. Letras iguais para grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

Figura 20. Efeito do AR sobre a atividade miotóxica da BthTX-I de *B. jararacussu*. A) AR isolado; B) AR comercial.

Tratamentos: **PBS** = 50 μ L. N = 5; **BthTX-I** = 2,5mg/Kg/50 μ L PBS; **BthTX-I + AR (1)**: 2,5mg BthTX-I/Kg/25 μ L PBS + 2,5mg AR/Kg/25 μ L PBS; **BthTX-I + AR (5)**: 2,5mg BthTX-I/Kg/25 μ L PBS + 12,5mg AR/Kg/25 μ L PBS; **BthTX-I + AR (10)**: 2,5mg BthTX-I/Kg/25 μ L PBS + 25mg AR/Kg/25 μ L PBS; **AR** = 25mg AR/Kg/50 μ L. Os resultados representam a média $\pm$ DP. Letras iguais para grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

Figura 21. Efeito do AR sobre a atividade miotóxica da BthTX-II de *B. jararacussu*. A) AR isolado; B) AR comercial.

Tratamentos: **PBS** = 50 μ L. N = 5; **BthTX-II** = 2,5mg/Kg/50 μ L PBS; **BthTX-II + AR (1)**: 2,5mg BthTX-II/Kg/25 μ L PBS + 2,5mg AR/Kg/25 μ L PBS; **BthTX-II + AR (5)**: 2,5mg BthTX-II/Kg/25 μ L PBS + 12,5mg AR/Kg/25 μ L PBS; **BthTX-II + AR (10)**: 2,5mg BthTX-II/Kg/25 μ L PBS + 25mg AR/Kg/25 μ L PBS; **AR** = 25mg AR/Kg/50 μ L. Os resultados representam a média $\pm$ DP. Letras iguais para grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

5.8 Determinação da Atividade citotóxica

Na Figura 22A é possível observar que após 24 horas de tratamento com a BthTX-I nas concentrações que variaram de 5-100µg/mL as células HL60 apresentaram uma citotoxicidade que foi de $17,7 \pm 1,28\%$ a $89,5 \pm 1,1\%$ para a maior concentração. Estes dados mostraram-se estatisticamente significativos em relação ao controle negativo (culturas não tratadas). Para os tratamentos realizados a IC_{50} , concentração que inibe a proliferação celular até 50%, para BthTX-I ficou em torno de 50µg/mL.

A BthTX-I inibiu o crescimento das células HL60 em aproximadamente 90% na maior concentração testada, indicando um efeito antiproliferativo bastante eficiente. Isto pode ser um indicativo do expressivo efeito miotóxico desta proteína evidenciada em muitos estudos (TAMAROZZI et al., 2006; CAVALCANTE et al., 2005; VERONESE et al., 2005).

A atividade citotóxica do ácido rosmarínico foi avaliada da mesma maneira (Figura 22B). A concentração da proteína utilizada foi de 50µg/mL. O inibidor ácido rosmarínico foi avaliado em três concentrações 1:1 (50µg/mL); 1:5 (250µg/mL) e 1:10 (500µg/mL).

O resultado demonstrou que o ácido rosmarínico inibiu a atividade citotóxica da proteína BthTX-I em 55% já na concentração mais baixa (1:1). Além disso, o ácido rosmarínico apresentou atividade citotóxica em aproximadamente 50% das células tumorais. Este resultado sugere a possibilidade de um sítio ligante do ácido rosmarínico, uma vez que este impede a interação da proteína com as células tumorais.

Uma hipótese para este sítio ligante é uma região molecular diferente do sítio catalítico. Esta região é formada provavelmente pela combinação de aminoácidos básicos e hidrofóbicos próximos da região C-terminal da proteína, permitindo interações eletrostáticas na bicamada lipídica. Estudos evidenciam esta hipótese, pois fosfolipases miotóxicas demonstraram que, mesmo após a atividade fosfolipásica ser inibida, ocorriam danos musculares e citólise (GUTIERREZ; LOMONTE, 1995).

Figura 22. A) Análise da citotoxicidade em células HL60 tratadas com BthTX-I pelo ensaio do MTT. B) Análise da citotoxicidade em células HL60 tratadas com BthTX-I e ácido rosmarínico pelo ensaio do MTT. Os dados foram agrupados e expressos em média±desvio padrão de três experimentos independentes e cada concentração em triplicata. CN = controle negativo; CP = controle positivo. * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo.

5.9 Cocrystalização da BthTX-I com ácido rosmarínico e coleta de dados de difração de raios X

Para que se desse início ao processo de cocrystalização da BthTX-I com o ácido rosmarínico foi utilizada, como ponto de partida, uma condição na qual se obtiveram cristais desta proteína na sua forma nativa. A concentração proteica utilizada inicialmente foi de 12mg/ml.

Os melhores cristais de BthTX-I na forma nativa (Figura 23) foram encontrados na condição de cristalização contendo 30% PEG 4000; 0,1 M Tris HCl pH 8,5; 0,20 M Li_2SO_4 (Figura 23).

Figura 23. Policristais de BthTX-I na forma nativa (cristais obtidos em 9 dias).

Devido à reprodutibilidade da condição de cristalização, a mesma foi utilizada como ponto de partida na tentativa de se obter cristais do complexo BthTX-I / ácido rosmarínico. Para tanto, ácido rosmarínico na proporção 5 moléculas do inibidor : 1 molécula de proteína foi adicionado à gota. Devido ao não crescimento de cristais, novas buscas foram iniciadas na tentativa de obtenção de cristais do complexo (diversos testes e emprego de variadas técnicas de cristalização e de parâmetros como utilização de diferentes temperaturas, diversos screens comerciais comercializados pela Hampton Research, dentre outras tentativas, foram testados). Após extensiva busca, cristais em forma de feixe foram obtidos em uma das soluções do kit I da Hampton Research (Figura 24).

Figura 24. Policristal de BthTX-I obtido na presença do inibidor AR após um período de sete dias.

Devido a impossibilidade de realização de experimentos de difração de raios X com os cristais obtidos inicialmente visto que os mesmos não possuem tamanho adequado para apresentarem um padrão de difração que possibilite a resolução da estrutura do complexo em questão, diversas tentativas de otimização da condição de cristalização foram realizadas. Uma destas tentativas foi a utilização da proteína PrTX-I (piratoxina-I, toxina isolada da peçonha de *Bothrops pirajai* que apresenta alta identidade com a BthTX-I – Figura 25A) em substituição à proteína BthTX-I. Os resultados desta tentativa foi a que propiciou os melhores resultados (Figura 25B).

Levando-se em consideração o alto grau de identidade entre as proteínas PrTX-I e BthTX-I, as interações que forem observadas entre o inibidor e a PrTX-I poderão ser consideradas as mesmas que ocorrem entre a BthTX-I e o ácido rosmarínico. Deste modo, o foco do trabalho está sendo então o refinamento da estrutura obtida a partir dos dados de difração de raios X obtidos com o cristal apresentado na Figura 25B.

A

BthTX-I	1	SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCNPKKDRYSYSWKDKTIIVCGENNP	80
PrTX-I	1	SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCNPKKDRYSYSWKDKTIIVCGENNP	80
BthTX-I	81	CLKELCECDKAVAICLRENLGTYNKKYRYHLKPFCKKADPC	121
PrTX-I	81	CLKELCECDKAVAICLRENLGTYNKKYRYHLKPFCKKADDC	121

B

Figura 25. A) Alinhamento de sequências das toxinas BthTX-I e PrTX-I com 99% de identidade. B) Cristal de PrTX-I obtido na presença do inibidor AR após um período de sete dias.

Após aproximadamente nove meses de trabalho, o melhor conjunto de dados coletado na linha MX-2 do LNLS (Lab. Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, SP, Brasil) apresenta resolução de 2,26Å e estatísticas que podem ser observadas na Tabela 2. A tabela apresenta, ainda, o resultado do primeiro conjunto de dados obtido nos testes de cocrystalização de PrTX-I na presença do inibidor ácido rosmarínico.

A observação dos dados apresentados na Tabela 2 mostra que o segundo conjunto de dados, além de possuir melhor resolução, apresenta ainda maior completeza nos dados para a última camada (faixa de resolução) e melhor R_{merge} , parâmetros que certamente conferirão uma maior confiabilidade ao modelo final do complexo em questão.

Tabela 2 – Dados de difração de raios-X e processamento inicial das imagens do cristal de PrTX-I obtido na presença do inibidor ácido rosmarínico.

DADOS	1ª COLETA PrTX-I + AR	2ª COLETA PrTX-I + AR
Cela unitária (Å)	a=51,19 b=63,37 c=88,34 $\alpha=\beta=\gamma=90,00$	a=49,88 b=66,62 c=86,20 $\alpha=\beta=\gamma=90,00$
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Resolução (Å)	40,0-2,55 (2,64-2,55) ^a	40,0-2,26 (2,35-2,26) ^a
Reflexões únicas	17102(1447) ^a	12971(1400) ^a
Completeza (%)	97,6 (90,1) ^a	93,0 (93,3) ^a
R_{merge} ^b (%)	15,8 (55,5) ^a	9,3 (53,6) ^a
Sigma <i>cutoff</i> (I) (processamento de dados) ^c	-3,0	-3,0
I/ σ (I)	7,9 (2,04) ^a	22,72 (2,05) ^a
Redundância	3,0 (3,8) ^a	4,4 (4,4) ^a

^a Números entre parênteses representam a faixa de mais alta resolução.

^b $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} (\sum_i (|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|)) / \sum_{hkl,i} \langle I_{hkl} \rangle$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual da reflexão com os índices de Miller h, k and l, e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a intensidade média de cada reflexão. Calculado para $I > -3\sigma(I)$.

^c Processamento dos dados realizado com o pacote de programas HKL.

5.10 Estudos das interações entre enzima-inibidor por modelagem molecular

Inicialmente, construiu-se os modelos das toxinas BthTX-I e II, por homologia estrutural. Recentemente, as estruturas das toxinas BthTX-I e II tiveram suas coordenadas depositadas no PDB, contudo, a modelagem molecular por homologia foi realizada pois as coordenadas da BthTX-I referem-se ao complexo com polietilenoglicol (PDB: 2H8I) e as BthTX-II (PDB: 2OQD) foram depositadas posteriormente à execução da modelagem. Para a modelagem da toxina BthTX-I da peçonha de serpente *B. jararacussu*, foi realizada previamente uma busca no PDB por proteínas homólogas com estruturas resolvidas, utilizando os servidores BLASTp e PSI-BLAST. Selecionou-se 8 estruturas homólogas, segundo critérios de maior identidade sequencial, maior resolução cristalográfica e grau de refinamento. Fez-se o alinhamento (Figura 26), e seu subsequente refinamento foi realizado após análise comparativa das estruturas das toxinas superpostas. O arquivo final deste alinhamento refinado foi utilizado como “input” para o programa **MODELLER**, obtendo-se 3 modelos. Entre estes, um foi selecionado contendo os melhores índices de qualidade, segundo parâmetros estereoquímicos (programa **PROCHECK**), empacotamento de resíduos (índice Quality do programa **WHAT IF**) e ambientes químicos (programa **VERIFY 3D**, implementado em InsightII).

A qualidade estereoquímica, avaliada com o programa **PROCHECK**, apresentou um “G-factor”, índice que resume a qualidade estereoquímica do modelo, de 0,05. O modelo apresentou 92,2% de resíduos em regiões favoráveis (Figura 27) e com os principais parâmetros estereoquímicos dentro do desvio da idealidade (Figura 28).

A qualidade do empacotamento de resíduos, avaliada com o módulo **Coarse Packing Quality Control** do programa **WHATIF**, apresentou um índice de -0,978.

A qualidade dos ambientes químicos, avaliada com **VERIFY 3D**, implementado no programa **INSIGHT II**, não apresentou região problemática, ou seja, com escores negativos, como mostra a Figura 29.

O modelo final obtido para a toxina BthTX-I da peçonha de *Bothrops jararacussu* está representado na Figura 30A. A sobreposição do modelo e da estrutura da BthTX-I (PDB: 2H8I) pode ser observada na Figura 30B.

1	>1QLL	123	121	PHOSPHOLIPASE A2
2	>1PAO	123	121	PHOSPHOLIPASE A2
3	>1Y4L	123	121	PHOSPHOLIPASE A2
4	>1XXS	123	122	PHOSPHOLIPASE A2
5	>1GOD	123	121	PHOSPHOLIPASE A2
6	>1PPA	123	121	PHOSPHOLIPASE A2
7	>1S8I	123	121	PHOSPHOLIPASE A2
8	>1MC2	123	122	PHOSPHOLIPASE A2

Sequences defined in SEQ file:

Index	Identifier	Length	Name	File order	Score	with
9	>BthTX-I		121 Bothropstoxin-I, BthTX-I			

1>1QLL	1	SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCNPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENL
2>1PAO	1	SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGQPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCDPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENL
3>1Y4L	1	SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCNPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNSCLKELCECDKAVAICLRENL
4>1XXS	1	SLFELGKMILQETGKNPAKSYGVYGCNCGVGRGPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCDPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNSCLKELCECDKAVAICLRENL
5>1GOD	1	SMYQLWKMILQETGKNAVPSYGLYGCNCGVSRGPKDATDRCCFVHKCCYKKLTDCSPKTDYSYSWKDKTIVCGDNNPCLQEMCECDKAVAICLRENL
6>1PPA	1	SVLELGKMILQETGKNAITSYGSYGCNCGWHRGQPKDATDRCCFVHKCCYKKLTDCNHKTDYSYSWKNAKAIICEEKNPCLKEMCECDKAVAICLRENL
7>1S8I	1	SLLELGKMILQETGKNAITSYGSYGCNCGWHRGQPKDATDRCCFVHKCCYKKLTDCNHKTDYSYSWKNAKAIICEEKNPCLKEMCECDKAVAICLRENL
8>1MC2	1	SLFELGKMIWQETGKNPVKNYGLYGCNCGVGRGEPLDATDRCCFVHKCCYKKLTDCSKKDRYSYKWNKAIVCGKNQPCMQEMCECDKAFICLRENL
9>BthTX-I	1	SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCNPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENL

1>1QLL	101	GTYNKKYRY	HLKPFCKK	ADKC
2>1PAO	101	GTYNKKYRY	HLKPFCKK	ADPC
3>1Y4L	101	NTYNKKYRY	YLKPLCKK	ADAC
4>1XXS	101	DTYNKKYRY	NYLKPACKK	ADPC
5>1GOD	101	DTYNKNYKI	YPKPLCKK	ADAC
6>1PPA	101	DTYNKKYKA	YFKLKCKK	PDTC
7>1S8I	101	DTYNKKYKA	YFKFKCKK	PETC
8>1MC2	101	DTYNKSFYR	HLKPSCKKT	SEQC
9>BthTX-I	101	GTYNKKYRY	HLKPFCKK	ADPC

Figura 26. Arquivo do alinhamento refinado final da toxina BthTX-I usado como “input” para o programa **MODELLER**.

Figura 27. “Ramachandran plot” do modelo da toxina BthTX-I gerado pelo PROCHECK.

Figura 28. Resumo dos principais indicadores de qualidade estereoquímica da cadeia principal do modelo obtido para a toxina BthTX-I, gerado pelo programa PROCHECK.

Figura 29. Gráfico final com os escores dos ambientes químicos definidos para cada resíduo do modelo escolhido da toxina BthTX-I obtido pelo **VERIFY 3D**.

Figura 30. A) Diagrama Ribbons do modelo final obtido por modelagem comparativa para a toxina BthTX-I presente na peçonha de *Bothrops jararacussu*. B) Sobreposição do modelo final (cinza) obtido por modelagem comparativa para a toxina BthTX-I e a estrutura depositada no PDB: 2H8I (róseo).

O outro modelo foi obtido para a toxina BthTX-II da peçonha de serpente *Bothrops jararacussu*. Selecionou-se 8 estruturas homólogas, segundo critérios de maior identidade sequencial, maior resolução cristalográfica, majoritariamente. Fez-se o alinhamento (Figura 31), e seu subsequente refinamento foi realizado por análise comparativa das estruturas das toxinas superpostas. O arquivo com este alinhamento refinado foi utilizado como “input” para o programa **MODELLER**, obtendo-se 3 modelos. Dentre estes, um foi selecionado contendo os melhores índices de qualidade, segundo parâmetros estereoquímicos (programa **PROCHECK**), empacotamento de resíduos (índice Quality do programa **WHAT IF**) e ambientes químicos (programa **VERIFY 3D**, implementado em InsightII).

A qualidade estereoquímica, avaliada com o programa **PROCHECK**, apresentou um “G-factor” igual a -0,16. O modelo apresentou 91,0% de resíduos em regiões favoráveis (Figura 32) e com os principais parâmetros estereoquímicos dentro do desvio da idealidade (Figura 33).

A qualidade do empacotamento de resíduos, avaliada com o módulo **Coarse Packing Quality Control** do programa **WHATIF**, apresentou um índice de -1,416.

A qualidade dos ambientes químicos, avaliada com **VERIFY 3D**, implementado no programa **INSIGHT II**, apresentou a maior parte da proteína em região não problemática, como mostra a Figura 34.

O modelo final obtido para a toxina BthTX-II da peçonha de *Bothrops jararacussu* está representado na Figura 35A. A boa sobreposição do modelo com a estrutura da BthTX-II (PDB: 2OQD) pode ser observada na Figura 35B.

```

1 >1QLL          123 121 PHOSPHOLIPASE A2
2 >1PAO          123 121 PHOSPHOLIPASE A2
3 >1Y4L          123 121 PHOSPHOLIPASE A2
4 >1XXS          123 122 PHOSPHOLIPASE A2
5 >1GOD          123 121 PHOSPHOLIPASE A2
6 >1MC2          123 122 PHOSPHOLIPASE A2
7 >1S8I          123 121 PHOSPHOLIPASE A2
8 >1GMZ          123 122 PHOSPHOLIPASE A2
-----
Sequences defined in SEQ file:
-----
Index  Identifier  Length  Name  File order  Score  with

9 >BthTX-II      120 Bothropstoxin-II, BthTX-II

1>1QLL          1 SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCNPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENL
2>1PAO          1 SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCDPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENL
3>1Y4L          1 SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCNPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNSCLKELCECDKAVAICLRENL
4>1XXS          1 SLFELGKMILQETGKNPAKSYGVYGCNCGVGRGPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCDPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNSCLKELCECDKAVAICLRENL
5>1GOD          1 SMYQLWKMILQETGKNAPPSYGLYGCNCGVGRGPKDATDRCCFVHKCCYKKLTDCSPKTDYSYSWKDKTIVCGDNNPCLQEMCECDKAVAICLRENL
6>1MC2          1 SLFELGKMIWQETGKNPVKNYGLYGCNCGVGRGEPLDATDRCCFVHKCCYKKLTDCDSKKDRYSYKWKNAIIVCGKNQPCMQEMCECDKAFaiclrenl
7>1S8I          1 SLLELGKMILQETGKNNAITSYGSYGCNCGWHRGQPKDATDRCCFVHKCCYKKLTDCNHKTDRYSYSWKNAIICEEKNPCLKEMCECDKAVAICLRENL
8>1GMZ          1 DLWQFGKMILKETGKLPPFPYYTTYGCYCGVGRGGPKDATDRCCFVHDCCYGKLTSCPKTDYSYSRKDGTIVCGENDPCRKEICECDKAAAVCFRENL
9>BthTX-II      1 DLWQWGQMILKETGKLPPFPYYTTYGCYCGWGRGKPVDPDRCCFVHDCCYKVTNYCPKKNDRYSYSRVSYNY C LGGPCDRQICECDKAIAVCFRENL

1>1QLL          101 GTYNKKYRYH LKPFCKKA DKC
2>1PAO          101 GTYNKKYRYH LKPFCKKA DPC
3>1Y4L          101 NTYNKKYRYH LKPLCKKA DAC
4>1XXS          101 DTYNKKYRYNYLKPAckKA DPC
5>1GOD          101 DTYNKNYKIY PKPLCKKA DAC
6>1MC2          101 DTYNKSFryH LKPSCKKTSEQC
7>1S8I          101 DTYNKKYKAY FKFKCKKP ETC
8>1GMZ          101 DTYNKKYMSY LKSLCKKXADDC
9>BthTX-II      101 GTYNKKAYYH LKPFCKEPAETC

```

Figura 31. Arquivo do alinhamento refinado final da toxina BthTX-II usado como “input” para o programa **MODELLER**.

Figura 32. “Ramachandran plot” do modelo da toxina BthTX-II gerado pelo PROCHECK.

Figura 33. Resumo dos principais indicadores de qualidade estereoquímica da cadeia principal do modelo obtido para a toxina BthTX-II, gerado pelo programa PROCHECK.

Figura 34. Gráfico final com os escores dos ambientes químicos definidos para cada resíduo do modelo escolhido da toxina BthTX-II obtido pelo **VERIFY 3D**.

Figura 35. A) Diagrama Ribbons do modelo final obtido por modelagem comparativa para a toxina BthTX-II presente na peçonha de *Bothrops jararacussu*. B) Sobreposição do modelo final (cinza) obtido por modelagem comparativa para a toxina BthTX-II e a estrutura depositada no PDB: 2OQD (róseo).

O modelo para a toxina BthA-I-PLA₂ da peçonha de serpente *Bothrops jararacussu* foi obtido pela seleção de 8 estruturas homólogas, segundo critérios de maior identidade sequencial, maior resolução cristalográfica e grau de refinamento. Fez-se o alinhamento (Figura 36), e seu subsequente refinamento foi realizado por análise comparativa das estruturas das toxinas superpostas. O arquivo com este alinhamento refinado foi utilizado como “input” para o programa **MODELLER**, obtendo-se 3 modelos. Entre estes, um foi selecionado contendo os melhores índices de qualidade, segundo parâmetros estereoquímicos (programa **PROCHECK**), empacotamento de resíduos (índice Quality do programa **WHAT IF**) e ambientes químicos (programa **VERIFY 3D**, implementado em InsightII).

A qualidade estereoquímica, avaliada com o programa **PROCHECK**, apresentou um “G-factor” igual a 0,09. O modelo apresentou 93,1% de resíduos em regiões favoráveis (Figura 37) e com os principais parâmetros estereoquímicos dentro do desvio da idealidade (Figura 38).

A qualidade do empacotamento de resíduos, avaliada com o módulo **Coarse Packing Quality Control** do programa **WHATIF**, apresentou um índice de -0,888.

A qualidade dos ambientes químicos, avaliada com **VERIFY 3D**, implementado no programa **INSIGHT II**, apresentou a maior parte da proteína em região não problemática, como mostra a Figura 39.

O modelo final obtido para a toxina BthA-I-PLA₂ da peçonha de *Bothrops jararacussu* está representado na Figura 40A. A boa sobreposição do modelo com a estrutura da BthA-I-PLA₂ (PDB: 1U73) pode ser observada na Figura 40B.

1	>1U73:A	124	122	PHOSPHOLIPASE A2			
2	>1UMV:A	124	122	PHOSPHOLIPASE A2			
3	>1VAP:A	124	123	PHOSPHOLIPASE A2			
4	>1IJL:A	124	123	PHOSPHOLIPASE A2			
5	>1PSJ:A	124	124	PHOSPHOLIPASE A2			
6	>1M8R:A	124	124	PHOSPHOLIPASE A2			
7	>1PP2:A	124	122	PHOSPHOLIPASE A2			
8	>1JIA:A	124	122	PHOSPHOLIPASE A2			

Sequences defined in SEQ file:							

Index	Identifier	Length	Name	File order	Score	with	
9	>Btha		122 PHOSPHOLIPASE A2				
1>1U73:A		1	SLWQFGKMINYVMGESGVLQYLSYGCYCGLGGQGQPTDATDRCCFVHDCCYGKVTGCDPKIDSYTYSKKNGDVVCGGDDPCKKQICECDRVATTTCFRDNK				
2>1UMV:A		1	SLWQFGKMINYVMGESGVLQYLSYGCYCGLGGQGQPTDATDRCCFVHDCCYGKVTGCNPKIDSYTYSKKNGDVVCGGDNPCCKQICECDRVATTTCFRDNK				
3>1VAP:A		1	NLFQFEKLIKMTGKSGMLWYSAYGCYCGWGGQGRPKDATDRCCFVHDCCYGKVTGCNPKMDIYTYSDVNGNIVCGGTNPCKKQICECDRAAAICFRDNL				
4>1IJL:A		1	SLIQFETLIMKVVKKSGMFWYSAYGCYCGWGGHGRPQDATDRCCFVHDCCYGKVTGCDPKMDSYTYSEENGDIVCGGDDPCKREICECDRVAADCFRDNL				
5>1PSJ:A		1	SLIQFETLIMKVAKKSGMFWYSNYGCYCGWGGQGRPKDATDRCCFVHDCCYGKVTGCDPKMDVYSFSEENGDIVCGGDDPCKKEICECDRAAAICFRDNL				
6>1M8R:A		1	SLVQFETLIMKVAKKSGMQWYSNYGCYCGWGGQGRPKDATDRCCFVHDCCYGKVTGCDPKMDVYSFSEENGDIVCGGDDPCKKEICECDRAAAICFRDNL				
7>1PP2:A		1	SLVQFETLIMKIAGRSGLLWYSAYGCYCGWGGHGLPQDATDRCCFVHDCCYGKATDCNPKTVSITYSEENGELICGGDDPCGTQICECDKAAAICFRDNI				
8>1JIA:A		1	HLLQFRKMIKKMTGKEPVVSYAFYGCYCGSGGRGKPKDATDRCCFVHDCCYEKVTGCDPKWDDYTYSWKNGTIVCGGDDPCKKEVCECDKAAAICFRDNL				
9>Btha		1	SLWQFGKMINYVMGESGVLQYLSYGCYCGLGGQGQPTDATDRCCFVHDCCYGKVTGCDPKIDSYTYSKKNGDVVCGGDDPCKKQICECDRVATTTCFRDNK				
1>1U73:A		101	DTYDIK YWFGAKNC QEKSEPC				
2>1UMV:A		101	DTYDIK YWFGAKNC QEKSEPC				
3>1VAP:A		101	KTYDSKTYWKYPKKNC KEESEPC				
4>1IJL:A		101	DTYNSDTYWRYPRQDC EESPEPC				
5>1PSJ:A		101	TLYNDKKYWAFGAKNCPQEESEPC				
6>1M8R:A		101	NTYNDKKYWAFGAKNCPQEESEPC				
7>1PP2:A		101	PSYDNK YWLFPPKDC REEPEPC				
8>1JIA:A		101	KTYKKR YMAYPDILC SSKSEKC				
9>Btha		101	DTYDI KYWFGAKNC QEKSEPC				

Figura 36. Arquivo do alinhamento refinado final da toxina BthA-I-PLA₂ usado como “input” para o programa **MODELLER**.

Figura 37. “Ramachandran plot” do modelo da toxina BthA-I-PLA₂ gerado pelo PROCHECK.

Figura 38. Resumo dos principais indicadores de qualidade estereoquímica da cadeia principal do modelo obtido para a toxina BthA-I-PLA₂, gerado pelo programa PROCHECK.

Figura 39. Gráfico final com os escores dos ambientes químicos definidos para cada resíduo do modelo escolhido da toxina BthA-I-PLA₂ obtido pelo **VERIFY 3D**.

Figura 40. A) Diagrama Ribbons do modelo final obtido por modelagem comparativa para a toxina BthA-I-PLA₂ presente na peçonha de *Bothrops jararacussu*. B) Sobreposição do modelo final (cinza) obtido por modelagem comparativa para a toxina BthA-I-PLA₂ e a estrutura depositada no PDB: 1U73 (róseo).

Os modelos aqui obtidos foram baseados em uma porcentagem de identidade sequencial superior a 70% para as sequências alinhadas com a BthTX-I, superior a 50% com a BthTX-II e superior a 57% com a BthA-I-PLA₂. Este resultado está de acordo com a faixa aceitável de identidade sequencial para a execução de modelagem molecular por homologia que é acima de 30% (D'ALFONSO; TRAMONTANO; LAHM, 2001; SALI, 1998; VITKUP et al, 2001). Na situação em que existem sequências homólogas contendo estruturas resolvidas experimentalmente e estas apresentam um grau de identidade sequencial aceitável com a proteína a ser modelada, a construção do modelo é realizada com maior grau de sucesso. Para determinar o grau de confiabilidade dos modelos gerados foram realizadas análises de validação, por critérios estereoquímicos, bem como de empacotamento de resíduos e ambientes químicos, comparando os modelos às estruturas das proteínas moldes. Tais análises mostraram que os modelos aqui construídos foram considerados satisfatórios.

A qualidade estereoquímica, avaliada com o programa **PROCHECK**, apresentou um “G-factor” superior ao índice médio observado em estruturas de proteínas resolvidas a 1,1 Å (“G-factor” de -0,03) em todos os modelos obtidos.

A qualidade do empacotamento de resíduos, avaliada com o módulo **Coarse Packing Quality Control** do programa **WHATIF**, apresentou índices que podem ser considerados bastante satisfatórios considerando-se os valores indicados pelo programa, a seguir. De 180 estruturas de proteínas de alta resolução e bem refinadas, o índice médio é de -0,9 a -0,1.

- Índice maior que -1,0: estrutura condizente com a de uma proteína globular ou modelos de alta qualidade
- De -2,0 a -1,0: estrutura não-refinada, de baixa resolução ou modelos de qualidade de intermediária a boa
- De -3,0 a -2,0: estrutura ou modelo errado
- Índice menor que -3,0: estrutura não-condizente com a de uma proteína globular

A disponibilidade de modelos precisos tem aplicação em problemas biologicamente significantes, tais como a investigação da especificidade de substratos e ligantes com vistas ao planejamento de fármacos baseado na estrutura

de alvos moleculares. Modelos moleculares de proteínas que são atrativos alvos terapêuticos têm sido utilizados como base para simulações de “screening” virtual usando bases de dados de compostos orgânicos (potenciais ligantes), com o objetivo de selecionar compostos promissores, estimando sua afinidade por simulações de “docking”, além de avaliar a afinidade da interação proteína-ligante tão precisamente quanto possível. Por isso, os modelos obtidos neste projeto têm sido de suma importância para os estudos de interações enzima-inibidor.

Dentre as atividades provocadas pelas toxinas BthTX-I e II, o efeito do ácido rosmarínico mostrou ser maior sobre a atividade miotóxica. Chioato e colaboradores (2007) identificaram o sítio miotóxico da BthTX-I sendo os resíduos nas posições de 117 a 122, os quais compõem a região C-terminal, sendo esta determinante estrutural da atividade miotóxica. Em outro estudo, peptídeos sintéticos da região C-terminal derivados de PLA₂s Asp49 de *Bothrops asper* e *Agkistrodon piscivorus piscivorus* não apresentaram qualquer efeito tóxico. Isto sugere que PLA₂s, Lys49 e Asp49, podem exercer suas ações miotóxicas através de diferentes mecanismos moleculares, implicando que a última não pode utilizar sua região C-terminal com elementos principais para desestabilizar a membrana (NÚÑEZ; ANGULO; LOMONTE, 2001). Diante destes achados, para as simulações de “docking” e “screening” virtual a região C-terminal foi utilizada para BthTX-I e o sítio ativo para BthTX-II e BthA-I-PLA₂.

O “docking” de um ligante em um receptor, podendo ser uma proteína, é uma das mais importantes técnicas utilizadas como uma ferramenta de modelagem molecular em biologia estrutural. De maneira geral, os programas de “docking” são formados por uma combinação de dois componentes: um algoritmo de busca e uma função de escore (VERDONK, et al, 2003). O algoritmo é utilizado na busca de possíveis modos de ligação e permite explorar os graus de liberdade translacional e rotacional do ligante, bem como, os graus de liberdade conformacional de ambos, ligante e proteína. A função de escore é aplicada para tentar distinguir os modos de ligação teoricamente mais próximos dos obtidos experimentalmente entre os demais modos de ligação explorados pelo algoritmo de busca e, dessa forma, classificar os diferentes modos de ligação apresentados. As funções de escore podem ser estabelecidas de acordo com os campos de força de mecânica molecular, parâmetros empíricos de cálculos de energia livre ou até de acordo com parâmetros denominados “knowledge-based”, que são conhecimentos prévios da estrutura.

Simulações de “docking” foram realizadas com o objetivo de propor um modo de ligação para o ácido rosmarínico e 53 inibidores de PLA₂ com a BthTX-I, II e BthA-I-PLA₂. Os cálculos foram realizados com o programa **GOLD 3.1.1** (VERDONK, et al, 2003), o qual utiliza um algoritmo genético para realizar “docking” flexível.

Dez orientações de melhor escore foram selecionadas com base na função “GoldScore” para cada composto. Os inibidores que obtiveram escore maior do que 45,00 foram selecionados, juntamente com o ácido rosmarínico (Tabelas 3-5).

Tabela 3 - Valores obtidos pela função “Goldscore” nas simulações de “docking” dos 17 inibidores selecionados com a BthTX-I

INIBIDORES	“GOLDScore”
Ácido aristolóquico	46,07
Ácido rosmarínico	46,03
Anisodamina	46,90
Benzoilsalireposídeo	47,88
Cabenegrina A-I	61,70
Cabenegrina A-II	45,83
Cumestrol	46,78
Dehidrofalcarinol	53,47
Edunol	52,71
Falcarindiol	50,37
Hesperidina	51,07
Iridina	53,44
Isoquercitrina	46,89
Manoalide	49,53
Quercitrina	47,35
Salireposídeo	57,89
Tetoridina	46,75

Tabela 4 - Valores obtidos pela função “Goldscore” nas simulações de “docking” dos 22 inibidores selecionados com a BthTX-II

INIBIDORES	“GOLDScore”
Ácido aristolóquico	45,15
Ácido rosmarínico	44,73
Análogo A	44,86
Análogo C	45,20
Anisodamina	50,49
Atropina	47,11
Benzoilsalireposídeo	50,63
Cabenegrina A-I	51,61
Cinarina	47,84
Dehidrofalcarinol	52,38
Edunol	49,77
Eretianona	48,89
Falcarindiol	48,93
Hesperidina	57,88
Iridina	52,49
Isoquercitrina	45,66
Manoalide	48,13
Nerolidilcatecol	45,38
Quercetina	46,48
Quercitrina	48,27
Salireposídeo	52,07
Tetoridina	5,47

Tabela 5 - Valores obtidos pela função “Goldscore” nas simulações de “docking” dos 14 inibidores selecionados com a BthA-I-PLA₂

INIBIDORES	“GOLDScore”
Ácido rosmarínico	41,29
Análogo A	53,97
Análogo C	49,21
Análogo D	46,41
Benzoilsalireposídeo	49,35
Cabenegrina A-I	48,12
Cumestrol	47,10
Dehidrofalcarinol	53,97
Edunol	45,96
Falcarindiol	54,00
Hesperidina	48,34
Iridina	45,01
Rutina	56,77
Salireposídeo	47,38

Adicionalmente, um “screening” virtual foi realizado com o programa **GOLD 3.1.1** (VERDONK et al., 2003) para BthTX-I, II e BthA-I-PLA₂ usando as bases de dados **Ilbdiverse**; a subcoleção **DIVERSet** da **ChemBridge** e **iResearch Library**. Em um primeiro momento, estas bases de dados foram utilizadas com o objetivo de selecionar compostos com potencial de se ligarem às toxinas BthTX-I; BthTX-II e BthA-I-PLA₂ através da abordagem de “docking” flexível, presente do programa **GOLD 3.1.1** (VERDONK et al., 2003).

Para cada uma das bases de dados, foi selecionada a orientação de melhor escore para vinte compostos filtrados pelo programa pela função “GoldScore”.

Na **libdiverse**, dois destes compostos que tiveram escore acima de 69,00 foram escolhidos para análise quando realizado “docking” com BthTX-I (Figura 41); além de dois que tiveram escore acima de 80,00 quando realizado “docking” com BthTX-II (Figura 42) e outros dois com escore acima de 49,00 quando realizado “docking” com BthA-I-PLA₂ (Figura 43). Para preparar as figuras foi selecionada a orientação do inibidor ácido rosmarínico obtida pelo procedimento de “docking” **GOLD** anteriormente citada, contendo o maior escore.

Na **DIVERSet**, dois destes compostos que tiveram escore acima de 54,00 foram escolhidos para análise quando realizado “docking” com BthTX-I (Figura 44); além de dois que tiveram escore acima 59,00 quando realizado “docking” com BthTX-II (Figura 45) e outros dois com escore acima de 50,00 quando realizado “docking” com BthA-I-PLA₂ (Figura 46).

Na **iResearch Library**, dois compostos que tiveram escore acima de 64,00 foram escolhidos para análise quando realizado “docking” com BthTX-I (Figura 47); além de dois que tiveram escore acima 69,00 quando realizado “docking” com BthTX-II (Figura 48) e outros dois com escore acima de 58,00 quando realizado “docking” com BthA-I-PLA₂ (Figura 49).

Sendo um dos objetivos a validação dos resultados obtidos *in silico*, um fator importante que deve ser levado em consideração é a disponibilidade dos compostos selecionados. Esta facilidade existe quando se refere à subcoleção **DIVERSet**. Assim, realizou-se um “rescore” com os 20 melhores compostos de desta subcoleção, em que foram obtidas as 10 melhores orientações de melhor escore para cada estrutura. Dessa forma, 10 estruturas que obtiveram escore de interação acima de 45,00 com o sítio ligante de cada toxina BthTX-I foram selecionadas para melhor análise. A maioria dos 20 melhores compostos desta subcoleção obtidos para BthTX-II e BthA-I-PLA₂ apresentaram escore inferior a 45,00. Os compostos selecionados para BthTX-I serão comprados com intuito de validar os resultados obtidos no “screening” virtual (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores obtidos pela função “Goldscore” nas simulações de “docking” dos 10 compostos selecionados nas simulações de “screening” virtual com a BthTX-I

COMPOSTOS	ESTRUTURA QUÍMICA	RESCORE
Composto 1		46,63
Composto 2		47,92
Composto 3		47,21
Composto 4		47,92
Composto 5		53,59
Composto 6		48,51
Composto 7		48,00
Composto 8		57,05
Composto 9		51,97
Composto 10		51,12

Figura 41. A) Estruturas químicas dos compostos selecionados no “Screening” virtual realizado para BthTX-I usando o banco de dados **libdiverse** B) Diagrama *Ribbons* da estrutura da BthTX-I com as melhores soluções de “docking” dos compostos selecionados e do inibidor ácido rosmarínico.

Figura 42. A) Estruturas químicas dos compostos selecionados no “Screening” virtual realizado para BthTX-II usando o banco de dados **libdiverse** B) Diagrama *Ribbons* da estrutura da BthTX-II com as melhores soluções de “docking” dos compostos selecionados e do inibidor ácido rosmarínico.

Figura 43. A) Estruturas químicas dos compostos selecionados no “Screening” virtual realizado para BthA-I-PLA₂ usando o banco de dados **libdiverse** B) Diagrama *Ribbons* da estrutura da BthA-I-PLA₂ com as melhores soluções de “docking” dos compostos selecionados e do inibidor ácido rosmarínico.

Figura 44. A) Estruturas químicas dos compostos selecionados no “Screening” virtual realizado para BthTX-I usando o banco de dados **Diverset**; B) Diagrama *Ribbons* da estrutura da BthTX-I com as melhores soluções de “docking” dos compostos selecionados e do inibidor ácido rosmarínico.

Figura 45. A) Estruturas químicas dos compostos selecionados no “Screening” virtual realizado para BthTX-II usando o banco de dados **Diverset**; B) Diagrama *Ribbons* da estrutura da BthTX-II com as melhores soluções de “docking” dos compostos selecionados e do inibidor ácido rosmarínico.

Figura 46. A) Estruturas químicas dos compostos selecionados no “Screening” virtual realizado para BthA-I-PLA₂ usando o banco de dados **Diverset**; B) Diagrama *Ribbons* da estrutura da BthA-I-PLA₂ com as melhores soluções de “docking” dos compostos selecionados e do inibidor ácido rosmarínico.

Figura 47. A) Estruturas químicas dos compostos selecionados no “Screening” virtual realizado para BthTX-I usando o banco de dados **iResearch Library**; B) Diagrama *Ribbons* da estrutura da BthTX-I com as melhores soluções de “docking” dos compostos selecionados e do inibidor ácido rosmarínico.

Figura 48. A) Estruturas químicas dos compostos selecionados no “Screening” virtual realizado para BthTX-II usando o banco de dados **iResearch Library**; B) Diagrama *Ribbons* da estrutura da BthTX-II com as melhores soluções de “docking” dos compostos selecionados e do inibidor ácido rosmarínico.

Figura 49. A) Estruturas químicas dos compostos selecionados no “Screening” virtual realizado para BthA-I-PLA₂ usando o banco de dados **iResearch Library**; B) Diagrama *Ribbons* da estrutura da BthA-I-PLA₂ com as melhores soluções de “docking” dos compostos selecionados e do inibidor ácido rosmarínico.

Usando três abordagens diferentes, foram calculados modelos farmacofóricos para os 54 inibidores de PLA₂ relatados na literatura. Uma vez identificado, um farmacóforo comum a uma série de ligantes/fármacos pode servir como um modelo útil para o planejamento racional de novos ligantes/fármacos, assim como para estudos de farmacogenômica. **PharmaGist** é um servidor usado para detectar farmacóforos a partir de um conjunto de moléculas que são conhecidas por ligar-se ao mesmo receptor-alvo. O método analisa possíveis farmacóforos e os organiza em ordem decrescente de escore. Os farmacóforos candidatos são detectados por alinhamento flexível múltiplo dos ligantes utilizados, onde a flexibilidade das moléculas é tratada explicitamente e de uma maneira determinística no processo de alinhamento. Neste alinhamento, características comuns são encontradas nas moléculas, as quais são propriedades físico-químicas importantes dos átomos para a interação ligante-receptor (aromaticidade, carga, ligação de hidrogênio ou hidrofobicidade) (SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2008).

O programa **GALAHAD** realiza alinhamentos múltiplos pela construção interativa de hipermoléculas que mantêm o agregado, assim como os atributos individuais dos ligantes (RICHMOND et al., 2006). Uma hipermolécula é uma representação em 3D de um conjunto de dados que visa maximizar o grau de sobreposição entre as estruturas moleculares, preservando simultaneamente a geometria e conectividade molecular de cada molécula do conjunto de dados. É definida por um conjunto de hiperátomos juntamente com sua interconexão, bem como associada às hipercaracterísticas. Cada hiperátomo e hipercaracterística são caracterizados por um vetor codificando as propriedades dos átomos ou características que representam. Esta hipermolécula em 3D identifica e codifica as mais importantes subestruturas e conformações de grupos comuns de uma série de moléculas, e pode, portanto, fornecer uma regra racional para o alinhamento de moléculas (RICHMOND et al., 2006).

Por duas abordagens, apenas 12 de 54 inibidores foram alinhados e selecionados por critérios de similaridade estruturais e funcionais, os quais incluem o inibidor de PLA₂ de referência, o ácido rosmarínico. **GALAHAD** gerou como resultado dois modelos semelhantes, conservando a similaridade estrutural dos ligantes e identificando duas características comuns a eles: um grupo hidrofóbico/aromático e um grupo aceptor de ligação de hidrogênio (Figura 50A). O programa **Discovery Studio** identificou, similarmente, um grupo

hidrofóbico/aromático e um grupo aceptor de ligação de hidrogênio (Figura 50B). Do mesmo modo, para o **PharmaGist** foram utilizados os 17 inibidores selecionados para BthTX-I nas simulações de “docking”, os quais resultaram nas mesmas duas características farmacofóricas, que correspondem, no ácido rosmarínico, ao grupo catecol do grupamento éster acrílico e à carbonila do grupo carboxila (Figura 50C).

Figura 50. Alinhamentos e modelos de farmacóforo detectados para 12 dos 54 inibidores de PLA₂ conhecidos, incluindo o ácido rosmarínico. (A), somente os dois modelos calculados usando **Sybyl/GALAHAD**. (B), o melhor modelo calculado usando **Discovery Studio**. (C), o melhor modelo calculado usando o servidor **PharmaGist**.

As análises no **GRID** e no **Q-Site Finder** são úteis para prever sítios ligantes de compostos e grupos funcionais. Estudos de campos de interação molecular (MIFs) foram realizados para determinar sítios de ligação energeticamente favoráveis no sítio ativo da BthTX-I, complementando o planejamento racional baseado na estrutura de novos inibidores de PLA₂. Foram usados quatro grupos de prova química: carbono aromático, oxigênio de carboxila, hidroxila e hidrofóbico. Estas provas simulam os principais grupos químicos encontrados em todos os inibidores aqui investigados, incluindo os 54 conhecidos na literatura.

Além disso, a importância da Lys49 para interação com ligantes foi confirmada com tais estudos baseados em energia. O grupo de prova oxigênio de carboxila realiza a interação em níveis energéticos mais baixos (- 14 kcal/mol) com o sítio ativo da BthTX-I, a qual é devido à Lys49 (Figura 51A), seguido pelo grupo de prova hidroxila (- 9 kcal/mol), mostrado na Figura 51B, o grupo de prova carbono aromático (- 4 kcal/mol) representado na Figura 51C, e o grupo hidrofóbico (- 2 kcal/mol), representado na Figura 51D. Nestas figuras é possível observar a concordância obtida entre os MIFs e os grupos carboxila, hidroxila, assim como, anéis aromáticos do ácido rosmarínico. Interessantemente, os resultados obtidos nos estudos de MIFs estão também de acordo com as duas características encontradas nos cálculos de percepção de farmacóforo para os 54 inibidores conhecidos relatados na literatura.

Análises de campos de interação molecular também foram realizadas com os 17 inibidores (Figura 52) e os 10 compostos selecionados a partir da subcoleção **DIVERSet** (Figura 53). Os estudos com os inibidores ajudaram a propor modificações na estrutura química do ácido rosmarínico, sendo um dos objetivos deste trabalho. Além disso, os compostos selecionados nas simulações de “screening” virtual foram também avaliados com o intuito de aquisição destes compostos para futuros testes biológicos e assim, validando os resultados obtidos *in silico*.

Figura 51. Diagrama *Ribbons* do modelo da BthTX-I em fase com os campos de interação molecular (MIFs) e a melhor orientação do **GOLD** para o ácido rosmarínico. A) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova carboxila é visualizado a -14 kcal/mol; B) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova hidroxila é visualizado a -9 kcal/mol; C) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova carbono aromático é visualizado a -4 kcal/mol; D) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova hidrofóbico é visualizado a -2 kcal/mol.

Figura 52. Diagrama *Ribbons* do modelo da BthTX-I em fase com os campos de interação molecular (MIFs) e a melhor orientação do **GOLD** para o ácido rosmarínico e os outros 16 inibidores selecionados. A) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova carboxila é visualizado a -14 kcal/mol; B) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova hidroxila é visualizado a -9 kcal/mol; C) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova carbono aromático é visualizado a -4 kcal/mol; D) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova hidrofóbico é visualizado a -2 kcal/mol.

Figura 53. Diagrama *Ribbons* do modelo da BthTX-I em fase com os campos de interação molecular (MIFs) e a melhor orientação do **GOLD** para o ácido rosmarínico (em representação de cilindro) e os 10 compostos (em representação de linhas) selecionados a partir da subcoleção **DIVERSet**. A) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova carboxila é visualizado a -14 kcal/mol; B) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova hidroxila é visualizado a -9 kcal/mol; C) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova carbono aromático é visualizado a -4 kcal/mol; D) O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova hidrofóbico é visualizado a -2 kcal/mol.

A proteína BthTX-I foi analisada com o programa **Q-SiteFinder** (LAURIE et AL. 2005), o qual detecta na estrutura da proteína sítios de interação (sítios ligantes) (Figura 54A).

Os 17 inibidores foram sobrepostos ao modelo BthTX-I por suas orientações selecionadas por “docking”, em fase com o “output” gerado pelo **Q-SiteFinder** (Figuras 54B e 54C). Os resultados revelam os ligantes ocupando o principal e maior sítio ligante identificado no sítio catalítico da enzima.

Figura 54. Resultado obtido com **Q-SiteFinder** para o modelo da BthTX-I. A) Sem inibidores, com o sítio ligante predito representado em “mesh” de cor azul; B) Com o ácido rosmarínico (representação em cilindro), com o sítio ligante predito representado em “mesh” de cor verde; C) Com o ácido rosmarínico (representação em cilindro) e os 17 inibidores (em representação de linhas) selecionados, com o sítio ligante predito representado em “mesh” de cor azul.

As propostas de modificações na estrutura química do ácido rosmarínico foram sugeridas após análises dos resultados dos modos de ligação sugeridas com o programa **GOLD** para os inibidores conhecidos da literatura no sítio ligante da BthTX-I. Os campos de interação molecular computados para mapear a estrutura da BthTX-I serviram de sustentação para validar os modos de ligação para cada inibidor e, também, para guiar a natureza química das modificações sugeridas baseadas nas energias de interação de fragmentos moleculares, presentes nas estruturas dos inibidores, com o sítio ligante da enzima.

A primeira sugestão de modificação é na posição R^1 , onde sugere-se a substituição da hidroxila por hidroxi-metileno. Esta substituição deixará a hidroxila mais próxima da carbonila da cadeia principal do resíduo de prolina na posição 68, criando condições para otimizar uma ligação de hidrogênio entre a hidroxila do grupo R^1 e este resíduo. Além disso, a hidroxila nesta nova posição irá coincidir com o grupo de prova hidroxila calculado a - 9 kcal/mol para BthTX-I (Figura 55).

A segunda sugestão é na posição R^2 , onde ocorreria uma simplificação molecular, sendo o grupo OH substituído por um hidrogênio. Esta simplificação deixaria a molécula um pouco mais hidrofóbica, contemplando assim o resultado obtido pelo grupo de prova hidrofóbico (Figura 56). Assim, as interações hidrofóbicas poderiam ser maximizadas e conferir maior potência à nova substância. Seguindo esta tendência, outra sugestão de modificação seria novamente nesta posição R^2 , havendo substituição da hidroxila por uma metila. Com isso, a molécula ficaria também mais hidrofóbica, corroborando o resultado obtido pelo grupo de prova hidrofóbico e, adicionalmente, favoreceria ainda mais a interação deste substituinte com os carbonos do resíduo de prolina na posição 68 (Figura 56).

A quarta sugestão é a substituição da carbonila do ácido rosmarínico por uma metila, deixando assim, a molécula mais lipofílica, pois o grupamento carbonila se posiciona no espaço em uma posição que favorece a acomodação de grupamentos mais hidrofóbicos de acordo com os resultados obtidos com o **GRID** para o grupo de prova hidrofóbico. Esta modificação é favorecida pelo fato de que o anel imidazol do resíduo de His48 tende a se alinhar ao resíduo de Asp99 por intermédio de uma ligação de hidrogênio reforçada, deixando seus átomos de carbono voltados para o sítio ativo da enzima, fato que favorece a acomodação de grupamentos hidrofóbicos de um ligante (Figura 57).

$R^1 = \text{CH}_2\text{OH}$ $R^2 = \text{OH}$ $R^3 = \text{O}$

Figura 55. Proposta de modificação na estrutura química do ácido rosmarínico (representação em cilindro) na posição R^1 . O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova hidroxila é visualizado a -9 kcal/mol (verde).

$R^1 = \text{OH}$

$R^2 = \text{H ou CH}_3$

$R^3 = \text{O}$

Figura 56. Proposta de modificação na estrutura química do ácido rosmarínico (representação em cilindro) na posição R^2 . O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova hidrofóbico é visualizado a -2 kcal/mol (amarelo).

$R^1 = \text{OH}$ $R^2 = \text{OH}$ $R^3 = \text{CH}_3$ $R^4 = \text{H}$

Figura 57. Proposta de modificação na estrutura química do ácido rosmarínico (representação em cilindro) na carbonila (R^3) do ácido rosmarínico. O contorno isoenergético obtido com o grupo de prova hidrofóbico é visualizado a -2 kcal/mol (amarelo).

Uma análise hierárquica dos compostos e suas propriedades vem sendo realizada com o propósito de classificar/agrupar os compostos por similaridade e racionalizar diferentes atividades. Isto tudo em vista da subsequente otimização das propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas dos compostos, os quais serão otimizados inicialmente “in silico”.

Foram investigados tanto propriedades ADME (relativas à Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção), bem como toxicidade para os 17 inibidores de PLA₂ conhecidos e selecionados, além de 10 compostos de melhor escore obtidos no “screening” virtual realizado para BthTX-I usando a subcoleção **DIVERSet** da base de dados **ChemBridge**. Tradicionalmente, fármacos foram descobertos durante as últimas décadas por meio de testes de compostos sintetizados em processos de múltiplos passos, consumindo grande tempo, e os ensaios haveriam de ser realizados “in vivo” (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003). Outros compostos promissores foram posteriormente estudados, onde as suas propriedades farmacocinéticas, metabólicas e potencial toxicidade foram também investigadas. Resultados adversos também foram, frequentemente, observados nesta fase. Com isso, o projeto haveria de ser interrompido ou reiniciado para se encontrar outro candidato clínico - um ônus inaceitável sobre o orçamento de investigação e desenvolvimento em qualquer indústria farmacêutica (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003). Este paradigma tem sido enfrentado com a crescente necessidade de bons instrumentos para a previsão de propriedades ADMET, servindo dois objetivos fundamentais. Em primeiro lugar, na fase de planejamento racional de novos compostos, incluindo o uso de bases de dados de compostos, de forma a reduzir o risco de desgaste nesta fase final. Em segundo lugar, para otimizar o “screening” e ensaios, analisando apenas os compostos mais promissores, reduzindo assim o custo e o tempo consumido, assim como para evitar ou minimizar o uso de modelos animais (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003).

Estudos de propriedades físico-químicas relacionadas aos parâmetros da Regra dos Cinco (RO5) de Lipinski et al. (1997) foram realizados utilizando o programa **Tsar 3.3**. Segundo a regra, a maioria dos fármacos que apresentam biodisponibilidade por via oral obedece pelo menos três dos seguintes parâmetros:

- Peso molecular ≤ 500 ;
- Número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 ;

- Número de grupos doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5 ;
- $\log P \leq 5$.

A regra preconiza que baixa absorção ou permeação é mais provável se houver violação por dois ou mais parâmetros, com exceção para antibióticos, antifúngicos e substratos de transportadores (peso molecular > 500 , $\log P > 5$, aceptores de ligação de hidrogênio > 10).

De acordo com a Tabela 7, a maioria dos inibidores selecionados não violaram a RO5. Pela primeira propriedade, o peso molecular, apenas o composto Benzoilsalireposídeo violou a regra. Pelo número de aceptores de ligação de hidrogênio maior que 10, apenas os inibidores Isoquercitrina e Quercitrina violaram a regra, sendo que, este último também violou a regra pelo número de grupos doadores de ligação de hidrogênio. Para $\log P$ menor ou igual a 5, todos os inibidores apresentaram valores dentro da faixa aceitável para compostos biodisponíveis.

Tabela 7 - Propriedades físico-químicas relacionadas à Regra dos Cinco para 17 inibidores de PLA₂ selecionados

Inibidores	Peso molecular	Aceptores de ligação de H	Doadores de ligação de H	$\log P$
Ácido aristolóquico	341,29	7	1	2,78
Ácido rosmarínico	360,34	8	5	2,81
Anisodamina	291,38	5	3	0,49
Benzoilsalireposídeo	510,53	10	4	3,26
Cabenegrina A-I	382,39	7	2	2,19
Cabenegrina A-II	384,41	7	2	2,55
Cumestrol	284,23	6	3	1,96
Dehidrofalcarinol	242,39	1	1	4,80
Edunol	366,39	6	1	3,19
Falcarindiol	260,41	2	2	4,25
Hesperidina	302,3	6	3	1,73
Iridina	344,34	7	2	1,49
Isoquercitrina	464,61	12	8	-1,18
Manoalide	416,61	5	2	4,44
Quercetrina	448,41	11	7	-0,40
Salireposídeo	406,42	9	5	1,52
Tetoridina	284,28	5	2	1,99

Para os compostos selecionados a partir de subcoleção **DIVERSet** (Tabela 8), a RO5 foi violada apenas pelo log P para com composto 9. Confirma-se a seleção dos 10 compostos a serem testados, validando os resultados obtidos do “screening” virtual.

As propriedades farmacocinéticas foram calculadas pelo servidor **ADME/Tox WEB**, e os resultados são mostrados nas Tabelas 9 e 10.

Para um fármaco ser considerado biodisponível, deve cumprir os seguintes requisitos:

- Ser solúvel no estômago ou intestino pelo pH variável;
- Resistir a hidrólise ácida em pH <2;
- Resistir ao metabolismo de primeira passagem no fígado;
- Resistir ao refluxo da P-glicoproteína de acordo com as enzimas metabólicas no intestino;
- Permeiar através da membrana intestinal, por transporte ativo ou passivo.

Tabela 8 - Propriedades físico-químicas relacionadas à Regra dos Cinco dos 10 compostos selecionados por “screening” virtual

Inibidores	Peso molecular	Aceptores de ligação de H	Doadores de ligação de H	Log P
Composto 1	237,36	2	2	0,30
Composto 2	317,36	4	2	3,24
Composto 3	411,25	3	1	4,47
Composto 4	346,83	3	0	3,66
Composto 5	325,4	5	1	0,38
Composto 6	282,5	3	0	2,86
Composto 7	398,49	3	1	4,34
Composto 8	407,57	3	1	4,43
Composto 9	449,98	3	1	5,81
Composto 10	380,48	4	0	0,50

Para a maioria dos inibidores reportados na literatura e selecionados pelos maiores valores de escore, o servidor **ADME / Tox WEB** indicou biodisponibilidade oral provavelmente baixa (<30%), incluindo neste grupo o ácido rosmarínico. Os inibidores Iridina e Tetoridina foram os únicos que apresentaram alta biodisponibilidade oral. A solubilidade em água não tamponada foi predita ser boa (Tabela 9 - verde) para a maioria dos compostos, incluindo o ácido rosmarínico. Apenas a Manoalide apresentou solubilidade em água não tamponada muito baixa. Os inibidores Ácido aristolóquico, Dehidrofalcarinol, Edunol e Falcarindiol apresentaram solubilidade moderada.

Todos os compostos apresentaram estabilidade em pH ácido, sendo resistentes à hidrólise ácida no estômago, em pH menor que 2. Dos 17 inibidores selecionados, doze teriam absorção passiva, que é a habilidade de atravessar a membrana intestinal por difusão passiva. Esta habilidade foi predita ser baixa quando calculada para o Ácido rosmarínico

Quanto ao metabolismo de primeira passagem, ou seja, a susceptibilidade para transformações metabólicas catalisadas pelas enzimas no fígado e no intestino, seis inibidores apresentaram alta probabilidade do metabolismo de primeira passagem ser maior que 50% (Tabela 9 - vermelho), cinco inibidores provavelmente não sofrem metabolismo de primeira passagem significativo (Tabela 9 - verde). Para os seis inibidores restantes, não houve predição desta propriedade (Tabela 9 - branco).

Com exceção da Anisodamina, para qual o servidor não fez predição, os outros inibidores não seriam substratos da P-glicoproteína. Além disso, todos os inibidores não seriam susceptíveis ao transporte ativo através da membrana intestinal.

Com base nos resultados obtidos com o servidor **ADME/Tox WEB**, nove dos dez dos compostos selecionados a partir de base de dados de compostos “drug-like” apresentaram biodisponibilidade oral moderadas, todos seriam quimicamente estáveis em condições ácidas, a maioria sem significativo metabolismo de primeira passagem no fígado e/ou intestino. Todos os compostos selecionados não seriam substratos da P-glicoproteína, nem teriam transporte ativo através da membrana (Tabela 10)

Tabela 9 - Propriedades farmacocinéticas calculadas com **ADME/Tox** para os 17 inibidores de PLA₂ selecionados

Inibidores	Biodisponibilidade oral	Solubilidade em água pura 25°C	Estabilidade (pH<2)	Absorção passiva	Metabolismo por efeito de 1ª passagem	P-glicoproteína	Transporte ativo
Ácido aristolóquico	<30%	LogSw = -4,98	Estável	Boa (>70%)	Não significativo	Não é substrato	Não
Ácido rosmarinico	<30%	LogSw = -3,08	Estável	Pobre (<30%)		Não é substrato	Não
Anisodamina	<30%	LogSw = -1,86	Estável	Moderada (Entre 30% e 70%)	Significativo (>50%)		Não
Benzoilsalireposídeo	<30%	LogSw = -4,23	Estável	Boa (>70%)	Significativo (>50%)	Não é substrato	Não
Cabenegrina A-I	<30%	LogSw = -4,53	Estável	Boa (>70%)	Significativo (>50%)	Não é substrato	Não
Cabenegrina A-II	<30%	LogSw = -4,68	Estável	Boa (>70%)	Significativo (>50%)	Não é substrato	Não
Cumestrol	Entre 30% e 70%	LogSw = -4,12	Estável	Boa (>70%)	Não significativo	Não é substrato	Não
Dehidrofalcarinol	Entre 30% e 70%	LogSw = -4,02	Estável	Boa (>70%)		Não é substrato	Não
Edunol	<30%	LogSw = -4,80	Estável	Boa (>70%)	Significativo (>50%)	Não é substrato	Não
Falcarindiol	Entre 30% e 70%	LogSw = -3,84	Estável	Boa (>70%)		Não é substrato	Não
Herperidina	<30%	LogSw = -3,24	Estável	Boa (>70%)	Significativo (>50%)	Não é substrato	Não
Iridina	>70%	LogSw = -4,15	Estável	Boa (>70%)	Não significativo	Não é substrato	Não
Isoquercitrina	<30%	LogSw = -3,64	Estável	Pobre (<30%)	Significativo (>50%)	Não é substrato	Não
Manoalide	Entre 30% e 70%	LogSw = -4,17	Estável	Boa (>70%)	Não significativo	Não é substrato	Não
Quercitrina	<30%	LogSw = -3,69	Estável	Moderada (Entre 30% e 70%)		Não é substrato	Não
Salireposídeo	<30%	LogSw = -2,95	Estável	Moderada (Entre 30% e 70%)		Não é substrato	Não
Tetoridina	>70%	LogSw = -3,81	Estável	Boa (>70%)	Não significativo	Não é substrato	Não

Tabela 10 - Propriedades farmacocinéticas calculadas com **ADME/Tox** para os compostos selecionados por “screening” virtual:
adequada biodisponibilidade predita

Compostos	Biodisponibilidade oral	Solubilidade em água pura 25°C	Estabilidade (pH<2)	Absorção passiva	Metabolismo por efeito de 1ª passagem	P-glicoproteína	Transporte ativo
Composto 1	Entre 30% e 70%	LogSw = -3,85	Estável	Boa (>70%)		Não é substrato	Não
Composto 2	Entre 30% e 70%	LogSw = -4,35	Estável	Boa (>70%)	Não significativo	Não é substrato	Não
Composto 3	>70%	LogSw = -4,98	Estável	Boa (>70%)	Não significativo	Não é substrato	Não
Composto 4	Entre 30% e 70%	LogSw = -4,96	Estável	Boa (>70%)	Não significativo	Não é substrato	Não
Composto 5	Entre 30% e 70%	LogSw = -3,45	Estável	Pobre (<30%)	Não significativo	Não é substrato	Não
Composto 6	Entre 30% e 70%	LogSw = -3,55	Estável	Boa (>70%)		Não é substrato	Não
Composto 7	Entre 30% e 70%	LogSw = -5,45	Estável	Boa (>70%)	Não significativo	Não é substrato	Não
Composto 8	Entre 30% e 70%	LogSw = -4,11	Estável	Boa (>70%)	Não significativo	Não é substrato	Não
Composto 9	Entre 30% e 70%	LogSw = -5,46	Estável	Boa (>70%)	Não significativo	Não é substrato	Não
Composto 10	Entre 30% e 70%	LogSw = -4,58	Estável	Boa (>70%)		Não é substrato	Não

Predições de toxicidade foram feitas com **DEREK** para os inibidores selecionados (Tabela 11) que apresentaram maior escore de “docking” bem como os compostos selecionados das bases de dados (Tabela 12).

Tabela 11 - Predições de toxicidade calculadas com **DEREK** para os 17 inibidores de PLA₂ selecionados

Inibidores	Sensibilização da pele	Carcinogenicidade em mamíferos	Nefropatia em mamíferos	Fotoalergenicidade	Mutagenicidade
Ácido aristolóquico	Plausível				
Ácido rosmarínico		Plausível			
Benzoil salireposídeo	Plausível		Duvidosa		
Cabegrina A-I	Plausível				
Cabegrina A-II	Plausível		Duvidosa		
Cumestrol	Plausível		Duvidosa		
Edunol	Plausível				
Herperidina	Equívocal		Duvidosa	Duvidosa	
Iridina	Plausível		Duvidosa		
Isoquercitrina	Plausível	Plausível	Duvidosa		Plausível
Manoalida	Plausível		Duvidosa		
Quercitrina	Plausível	Plausível	Duvidosa		Plausível
Salireposídeo	Plausível		Duvidosa		
Tetoridina	Plausível		Duvidosa		

Tabela 12 - Predições de toxicidade calculadas com **DEREK** para os compostos selecionados por “screening” virtual

Compostos	PREDIÇÃO DE TOXICIDADE
Composto 1	Não há relatos
Composto 2	Dano no cromossomo em mamíferos → plausível Sensibilização da pele → plausível
Composto 3	Carcinogenicidade em mamíferos → plausível Nefropatia em mamíferos → duvidosa
Composto 4	Não há relatos
Composto 5	Não há relatos
Composto 6	Não há relatos
Composto 7	Nefropatia em mamíferos → duvidosa
Composto 8	Nefropatia em mamíferos → duvidosa
Composto 9	Nefropatia em mamíferos → duvidosa Metahemoglobinemia em mamíferos → plausível
Composto 10	Nefropatia em mamíferos → duvidosa

A presença de um alerta estrutural de sensibilização da pele dentro de uma molécula indica que a molécula tem o potencial para causar sensibilização da pele. Se a molécula será ou não um agente sensibilizante, também irá depender de sua absorção percutânea. Geralmente, as pequenas moléculas lipofílicas são mais facilmente absorvidas pela pele e, portanto, são mais susceptíveis de causar sensibilização (BASKETTER; SCHOLLES, 1992).

Para o ácido rosmarínico o sistema indica carcinogenicidade plausível em mamíferos. Compostos que fornecem alerta de carcinogenicidade plausível que incluem um grupo de catecóis substituídos, e podem produzir tal efeito após exposição oral crônica repetida por irritação do estômago associada à carcinogenicidade em roedores.

O alerta de dano cromossômico descreve a genotoxicidade de vinil cetonas substituídas. Os inibidores Isoquercitrina e Quercitrina forneceram o alerta de mutagenicidade, o qual é ativado pela subunidade cromossômica 2-fenil.

"Fácil é ditar regras.

**Difícil é segui-las. Ter a noção exata de nossas próprias vidas,
ao invés de ter noção das vidas dos outros.**

Fácil é perguntar o que deseja saber.

**Difícil é estar preparado para escutar esta resposta. Ou querer
entender a resposta."**

6. CONCLUSÕES

Neste estudo comprovou-se a eficácia das toxinas BthTX-I e BthTX-II e da peçonha de serpente *B. jararacussu* na indução do edema e da hemorragia. Com a toxina BthTX-II comprovou-se o efeito anticoagulante e sua atividade fosfolipásica e com a toxina BthA-I-PLA₂ comprovou-se sua elevada atividade fosfolipásica.

As avaliações realizadas com o AR, tanto o isolado quanto o comercial, demonstram não ter efeito inibitório significativo da atividade fosfolipásica da peçonha bruta e das toxinas BthTX-II e BthA-I-PLA₂. Para a atividade anticoagulante, ambas apresentações do AR, não inibiram esta atividade promovida pela toxina BthTX-II. Em relação à atividade edematogênica, o AR na apresentou os mesmos resultados obtidos preliminarmente. Isto reforça o fato da peçonha bruta atuar em vários sistemas farmacológicos.

A característica inibitória do AR, quando avaliado na atividade hemorrágica, sugere que há uma interação entre princípio ativo e metaloproteinases presentes na peçonha, envolvendo sítios de ligação destas enzimas essenciais para a atividade.

O resultado da avaliação miotóxica e citotóxica demonstrou que o ácido rosmarínico inibiu a atividade da proteína BthTX-I, sugerindo assim um sítio ligante diferente do sítio catalítico, localizado próximo a região C-terminal.

Com o objetivo de determinar experimentalmente o modo de ligação do AR com a toxina BthTX-I, estudos de cocristalização vêm sendo realizados. Embora as coordenadas do ácido rosmarínico ainda não tenham sido determinadas em relação à toxina, pode-se inferir, baseado num recente artigo que avalia a conformação oligomérica de diferentes Lys49-PLA₂s nativas e complexadas (dos SANTOS; SOARES; FONTES, 2009), que a presença do inibidor foi capaz de induzir modificação na estrutura quaternária da PrTX-I, já que as estruturas nativas de Lys49-PLA₂s apresentam grupo espacial P3₁21. Após a conclusão do refinamento do complexo em questão e determinação do modo de interação entre a toxina e o inibidor, importantes informações poderão ser obtidas sobre como a modificação da estrutura quaternária da proteína leva à inibição de sua atividade.

Embora as coordenadas da estrutura das toxinas BthTX-I, II BthA-I-PLA₂ estivessem depositadas no PDB, tornou-se importante a construção dos modelos dessas proteínas por modelagem comparativa, uma vez que a BthTX-I está complexada ao polietilenoglicol (código PDB 2H8I) e a estrutura da BthTX-II (PDB: 2OQD) foi resolvida posteriormente à realização da modelagem. Os modelos obtidos

foram validados levando em consideração parâmetros estereoquímicos, de contatos atômicos e de ambientes químicos.

Nos estudos de “docking” envolvendo o ácido rosmarínico e as toxinas BthTX-I, II e BthA-I-PLA₂, os resultados confirmaram a importância das interações entre os resíduos catalíticos His48 e Tyr52, além do resíduo Lys49.

Tanto nas simulações de “docking single” quanto no “screening” virtual, todos os inibidores ficaram inseridos no canal hidrofóbico e quase todos os resíduos deste canal participaram de interações enzima-inibidor.

A derivação do padrão farmacofórico comum aos 54 inibidores resultou na identificação, segundo as três abordagens utilizadas aqui, de duas características comuns aos inibidores: um grupo hidrofóbico/aromático e um grupo aceptor de ligação de hidrogênio. No ácido rosmarínico, estas características correspondem ao grupo catecol do grupamento éster acrílico e à carbonila do grupo carboxila.

O mapeamento do sítio de ligação usando grupos químicos de prova foi feito por estudos de campos de interação molecular (MIFs). Estes estudos determinaram sítios de ligação favoráveis energeticamente no sítio ativo da BthTX-I e ainda confirmaram a importância da Lys49 para ligação de inibidores. Os grupos de prova utilizados simulam os principais grupos químicos encontrados nos 54 inibidores conhecidos e reportados na literatura. Os resultados obtidos nos estudos de MIFs confirmam as duas características encontradas nos cálculos de percepção de farmacóforo para os 54 inibidores: uma região que receber hidrogênio e outra hidrofóbica.

As orientações dos compostos geradas pelas simulações de “screening” virtual foram selecionadas utilizando os critérios de maior escore em consenso com mapeamento estéreo-eletrônico do sítio ativo da enzima.

No estudo de propriedades físico-químicas realizado, um dos critérios, o de não-violação da Regra dos Cinco, foi satisfeito, sem violação de mais do que uma das propriedades, sugerindo que os inibidores reportados na literatura têm características estruturais adequadas à absorção, bem como à distribuição.

Para os compostos selecionados a partir da subcoleção **DIVERSet** da base de dados **ChemBridge**, apenas um composto violou a regra, e somente pelo log P. As propriedades farmacocinéticas calculadas indicaram, em relação à biodisponibilidade oral, boa solubilidade em água, estabilidade química e insignificante metabolismo de primeira passagem no fígado e/ou intestino para a

maioria dos inibidores relatados na literatura e com orientação de “docking” de mais alto escore. Todos os compostos selecionados a partir da subcoleção **DIVERSet** da base de dados **ChemBridge**, analisando a biodisponibilidade oral, seriam quimicamente estáveis em condições ácidas, com a maioria sem apresentar significativo metabolismo de primeira passagem no fígado e/ou intestino. No entanto, a maioria dos compostos apresentou insolubilidade em água pura.

Predições de toxicidade realizadas para os inibidores selecionados que apresentaram maior escore de “docking”, bem como para os compostos selecionados da coleção **DIVERSet**, não apontaram resultados dignos de nota. Os únicos ‘alertas’ de toxicidade foram obtidos para os inibidores ácido rosmarínico (o sistema indicou carcinogenicidade plausível), Isoquercitina e Quercitina (carcinogenicidade plausível e mutagenicidade). A maioria dos compostos selecionados da coleção **DIVERSet** não apresenta relatos da presença de grupos toxicofóricos. Contudo, para o composto 2, o programa indicou dano cromossômico plausível, e para o composto 3, carcinogenicidade plausível. Para o composto 9, o programa indicou metahemoglobinemia plausível.

Além da identificação de um padrão farmacofórico comum aos os inibidores relatados na literatura, os quais são descritos inibir peçonhas de serpentes, neste trabalho propôs-se modificações na estrutura química do ácido rosmarínico, com a finalidade de melhorar a interação deste inibidor com as toxinas presentes na peçonha da serpente *Bothrops jararacussu*. Além disso, dez compostos promissores foram identificados e selecionados para compra e posteriores ensaios de atividade com a BthTX-I. A perspectiva futura é que a realização de ensaios de atividade com estes dez compostos guiem e ajudem a otimizar o planejamento racional de um futuro candidato a fármaco contra o envenenamento de serpente.

"Fácil é chorar ou sorrir quando der vontade.

Difícil é sorrir com vontade de chorar ou chorar de rir, de alegria.

Fácil é dar um beijo.

Difícil é entregar a alma. Sinceramente, por inteiro.

Fácil é sair com várias pessoas ao longo da vida.

Difícil é entender que pouquíssimas delas vão te aceitar como você é e te fazer feliz por inteiro."

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHAMD, V. U; ABBASI, M. A.; HUSSAIN, H.; AKHTAR, M. N.; FAROOQ, U.; FATIMA, N.; CHOUDHARY, M. I. Phenolic glycosides from *Symplococos racemosa*: natural inhibitors of phosphodiesterase I. **Phytochemistry**, v. 63, n.2, p. 217-220, 2003.

AKUNYILI, D. N.; AKUBUE, P. I. Schumanniofoside, the antisnake venom principle from the stem bark of *Schumanniphyton magnificum* Harms. **J. Ethnopharmacol.**, v. 18, n. 2, 167-172, 1986.

ALAM, M. I.; GOMES, A. Adjuvant effects and antiserum action potentiation by a (herbal) compound 2-hydroxy-4-methoxy benzoic acid isolated from the root extract of the Indian medicinal plant 'sarsaparilla' (*Hemidesmus indicus* R. Br.). **Toxicon**, v. 36, n. 10, p. 1423-1431, 1998.

ALMEIDA, L.; CINTRA, A. C. O.; VERONESE, E. L. G.; NOMIZO, A.; FRANCO, J. J.; ARANTES, E. C.; GIGLIO, J. R.; SAMPAIO, S. V. Anticrotalic and antitumoral activities of gel filtration fractions of aqueous extract from *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae). **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 137, p. 19-27, 2004.

ANDERSON, A. C. The process of structure-based drug design. **Chem. Biol.**, v. 10, n. 9, p. 787-797.

ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotaline snake venom myotoxic phospholipase A₂. **Biochem. Pharmacol.**, v. 66, n. 10, p. 1993-2000, 2003.

AUF'MKOLK, M.; KOHRLE, J.; GUMBINGER, H.; WINTERHOFF, H.; HESCH, R. D. Antihormonal effects of plant extracts: iodothyronine deiodinase of rat liver is inhibited by extracts and secondary metabolites of plants. **Horm. Metab. Res.**, Stuttgart, v.16, p.188-192, 1984.

BARRIL, X.; GELPÍ, J. L.; LÓPEZ, J. M.; OROZCO, M.; LUQUE, F. J. How accurate can molecular dynamics/linear response and Poisson-Boltzmann/solvent accessible surface calculations be for predicting relative binding affinities? Acetylcholinesterase huprine inhibitors as a test case. **Theor. Chem. Acc.**, v. 106, n. 1-2, p. 2-9, 2001.

BARTON, G. J.; STERNBERG, M. J. E. A strategy for the rapid multiple alignment of protein sequences. **J. Mol. Biol.**, v. 198, p. 327-337, 1987.

BASKETTER D. A.; SCHOLLES E. W. Comparison of the local lymph-node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens. **Food Chem. Toxicol.**, v. 30, p. 65-69, 1992.

BATINA, M. F.; CINTRA, A. C. O.; VERONESE, E. L.; LAVRADOR, M. A.; GIGLIO, J. R.; PEREIRA, P. S.; DIAS, D. A.; FRANÇA, S. C.; SAMPAIO, S. V. Inhibition of the lethal and myotoxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom by *Tabernaemontana catharinensis*: identification of one of the active components. **Planta Med.**, v. 66, n. 5, p. 424-428, 2000.

BERNARD, P.; SCIOR, T.; DIDIER, B.; HIBERT, M.; BERTHON, J. Ethnopharmacology and bioinformatics combination for leads discovery: application to phospholipase A₂ inhibitors. **Phytochemistry**, v. 58, n. 6, p.865-74, 2001.

BERNART, M. W.; CARDELLINA, J.; BALASCHAK, M.; ALEXANDER, M.; SHOEMAKER, R.; BOYD, M. Cytotoxic falcarinol oxylipins from *Dendropanax arboreus*. **J. Nat. Prod.**, v. 59, n. 8, p. 748-753, 1996.

BIONDO, R.; PEREIRA, A. M. S.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract. **Biochimie**, v. 85, n. 10, p. 1017-1025, 2003.

BIONDO, R.; SOARES, A. M.; BERTONI, B. W.; FRANCA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Direct organogenesis of *Mandevilla illustris* (Vell) Woodson and effects of its aqueous extract on the enzymatic and toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Plant Cell Rep.**, v. 22, n. 8, p. 549-552, 2004.

BLUNDELL, T. L.; JOHNSON, L. N. Protein Crystallography: New York, 1976, 565p.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipase A₂. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 127, n. 1, p. 21-30, 2000.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; OLIVEIRA, F.; FRANSCHESCHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, v. 39, n. 12, p. 1863-1869, 2001.

BRÜNGER, A. T.; ADAMS, P. D.; CLORE, G. M.; DELANO, W. L.; GROS, P.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; JIANG, J. S.; KUSZEWSKI, J.; NILGES, M.; PANNU, N. S.; READ, R. J.; RICE, L. M.; SIMONSON, T.; WARREN, G. L. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. **Acta Crystallogr.**, v. 54D, p. 905-921, 1998.

CARLSON, H. A.; MASUKAWA, K. M.; McMAMMON, J. A. Method for including the dynamic fluctuations of a protein in Computer-aided Drug Design. **J. Phys. Chem. A.**, v. 103, n. 49, p. 10213-10219, 1999.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos In: SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. UFRGS, 4 ed., Porto Alegre, p.833, 2002.

CAVALCANTE, W. L.; SILVA, M. D.; GALLACCI, M. Influence of temperature upon paralyzing and myotoxic effects of bothropstoxin-I on mouse neuromuscular preparations. **Chem. Biol. Interact.**, v. 151, n. 2, p. 95-100, 2005.

CECCHINI, A. L.; SOARES, A. M.; CECCHINI, R.; de OLIVEIRA, A. H. C.; WARD, R. J.; GIGLIO, J. R.; ARANTES, E. C. Effect of crotapotin on the biological activity of Asp49 and Lys49 phospholipase A₂ from *Bothrops* snake venoms. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 138, n. 4, p. 429-436, 2004.

CERVELLATI, R.; RENZULI, C.; GUERRA, M. C.; SPERONI, E. Evaluation of antioxidant activity of some natural polyphenolic compounds using the briggsrauscher reaction method. **J. Agric. Food Chem.**, Los Angeles, v. 50, p. 7504-7509, 2002.

CHANDRA, V.; JASTI, J.; KAUR, P.; DEY, S.; SRINIVASAN, A.; BETZEL, CH.; SINGH, T. P. Design of specific peptide inhibitors of phospholipase A₂ and a designed peptide Leu-Ala-Ile-Tyr-Ser (LAIYS). **Acta Crystallogr. D**, v. 58, pt 10 pt2, p. 1813-1819, 2002a.

CHANDRA, V.; JASTI, J.; KAUR, P.; SRINIVASAN, A.; BETZEL, CH.; SINGH, T. P. First Structural Evidence of a Specific Inhibition of Phospholipase A₂ by α -Tocopherol (Vitamin E) and its Implications in Inflammation: Crystal Structure of the Complex Formed Between Phospholipase A₂ and α -Tocopherol at 1.8 Å Resolution. **J. Mol. Biol.**, v. 320, n. 2, p. 215-222, 2002b.

CHANDRA, V.; JASTI, J.; KAUR, P.; SRINIVASAN, A.; BETZEL, CH.; SINGH, T. P. Structural basis of phospholipase A₂ inhibition for the synthesis of prostaglandins by

the plant alkaloid aristolochic acid from a 1.7 Å crystal structure. **Biochemistry**, v. 41, n. 36, p. 10914-10919, 2002c.

CHIOATO, L.; ARAGÃO, E. A.; FERREIRA, T. L.; de MEDEIROS, A. I.; FACCIOLI, L. H.; WARD, R. J. Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipases A₂ by scanning alanine mutagenesis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1768, p. 1247-1257, 2007.

CHIOATO, L.; WARD, R. J. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 869-883, 2003.

CHIPPAUX, J. P.; RAKOTONIRINA, V. S.; RAKOTONIRINA, A.; DZIKOUK, G. Drug or plant substances which antagonize venoms or potentiate antivenins. **Bull Soc. Pathol. Exot.**, v. 90, n. 4, p. 282-285, 1997.

CINTRA, A. C.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GILGIO, J. R. Bothropstoxin I: amino acid sequence and function. **J. Protein Chem.**, v. 12, n. 1, p. 57-64, 1993.

CODDING, P. W. **Structure-Based Drug Design**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1998, 289p.

CRAMER, R. D.; PATTERSON, D. E.; BUNCE, J. D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 110, n. 18, pp 5959-5967, 1988.

da SILVA, A. J. M.; COELHO, A. L.; SIMA, A. B. C.; MORAES, R. A. M.; PINHEIRO, D. A.; FERNANDES, F. F. A.; ARRUDA, E. Z.; COSTA, P. R. R.; MELO, P. A. Synthesis and pharmacological evaluation of prenylated and benzylated pterocarpanes against snake venom. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.14, p.431-435, 2004.

da SILVA, A. J. M.; MELO, P. A.; SILVA, N. M.; BRITO, F. V.; BUARQUE, C. D.; de SOUZA, D. V.; RODRIGUES, V. P.; POÇAS, E. S.; NOËL, F.; ALBUQUERQUE, E. X.; COSTA, P. R. Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of coumestans with different patterns of oxygenation. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 11, n. 3, p. 283-286, 2001.

da SILVA, S. L.; CALGAROTTO, A. K.; CHAAR, J. S.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA₂ activity. **Toxicon**, v. 52, p. 655-666, 2008.

da SILVA, V. B.; SILVA, C. H. T. P. Modelagem Molecular de proteínas-alvo por homologia estrutural. **Rev. Eletro. Farm**, v. 4, n. 1, p. 15-26, 2007.

da SILVA-GIOTTO, M. T.; GARRAT, R. C.; OLIVA, G.; MASCARENHAS, Y. P.; GIGLIO, J. R.; CINTRA, A. C. O.; AZEVEDO JR., W. F.; ARNI, R. K.; WARD, R. J. Crystallographic and spectroscopic characterization of molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue. **Proteins**, v. 30, n. 4, p. 442-454, 1998.

D'ALFONSO, G.; TRAMONTANO, A.; LAHM, A. Structural conservation in single-domain proteins: implications for homology modeling. **J. Struct. Biol.**, v. 134, p. 246-256, 2001.

DE HAAS, G. H.; POSTEMA, N. M.; NIUWENHUIZEN, W.; VAN DEENEN, L. L. Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 159, n. 1, p. 103-117, 1968.

de ROODT, A. R.; DOLAB, J. A.; DOKMETJIAN, J. C.; LITWIN, S.; SEGRE, L.O; VIDAL, J. C. A comparasion of different methods to assess the hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms. **Toxicon**, Amsterdam, v. 38, p. 865-873, 2000.

DEANE, C. M.; BLUNDELL, T. L. Protein comparative modelling and drug discovery. In Wermuth, C. G. The Practice of Medicinal Chemistry. London: Elsevier Academic Press, p. 445-458, 2003.

DEEPA, M.; GOWDA, T. V. Purification and characterization of a glycoprotein inhibitor of toxic phospholipase from *Withania somnifera*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 408, n. 1, p. 42-50, 2002.

DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA., 2002

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 18, p. 13057-13060, 1994.

DORANDEU, F.; HESTERS, R.; GIRARD, F.; FOUR, E.; FOQUIN, A.; BON, C.; LALLEMENT, G.; FAURE, G. Inhibition of crotoxin phospholipase A₂ activity by manoalide associated with inactivation of crotoxin toxicity and dissociation of the heterodimeric neurotoxic complex. **Biochem. Pharmacol.**, v. 63, n. 4, p. 755-761, 2002.

dos SANTOS, J. I. **Estudos estruturais com Fosfolipases A₂ homólogas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*: proposição de um novo sítio miotóxico**. Botucatu, 2007

dos SANTOS, J. I.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A₂ from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. **J. Struct. Biol.**, 2009. "in press"

DRENTH, J. Principles of protein X-ray crystallography. 2 ed. New York, Chornow Editorial Services, inc 1995.

DROR, O.; SHULMAN-PELEG, A.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. Predicting molecular interactions in silico: I. A guide to pharmacophore identification and its applications to drug design. **Curr. Med. Chem.**, v. 11, n. 1, p. 71-90, 2004.

DUCRUIX, A.; GIEGÉ, R. Crystallization of nucleic acids and proteins – a practical approach. Oxford University Press, 1992. 331p.

ELLENHORN, J. M. **Ellenhorn's Medical Toxicology**: diagnosis and treatment of human poisoning. 2. ed. USA: Williams & Wilkins, 1997, p.1757.

FAURE, G. Natural inhibitors of toxic phospholipase A₂. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 833-40, 2000.

FERREIRA, L. A. F.; HENRIQUES, O. B.; ANDREONI, A. A. S.; VITAL, G. R. F.; CAMPOS, M. M. C.; HABERMEHL, G. G.; MORAES, V. L. G. Antivenom and biological effects of ar-turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberiaceae). **Toxicon**, v. 30, p. 1211-1218, 1992.

GOODFORD, P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. **J. Med. Chem.**, v. 28, n.7, p. 849-857, 1985.

GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing. **Proteins**, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1990.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, Paris, v. 8, p. 841-850, 2000.

HART, R. P.; ROSE, C. S.; HAMER, R. M. Neuropsychological effects of occupational exposure to cadmium. **J. Clin. Exp. Neuropsychol.**, v. 11, n. 6, p. 933-943, 1989.

HASSELL, A. M.; AN, G.; BLEDSOE, R. K.; BYNUM, J. M.; CARTER, H. L. 3rd; DENG, S. J.; GAMPE, R. T.; GRISARD, T. E.; MADAUSS, K. P.; NOLTE, R. T.; ROCQUE, W. J.; WANG, L.; WEAVER, K. L.; WILLIAMS, S. P.; WISELY, G. B.; XU, R.; SHEWCHUK, L. M. Crystallization of protein-ligand complexes. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.**, v. 63, p. 72-79, 2007.

HILLISCH, A.; PINEDA, L. F.; HILGENFELD, R. Utility of homology models in the drug discovery process. **Drug Discov. Today**, v. 9, p. 659-669, 2004.

HÖLTJE, H. -D.; SIPPL, W.; ROGNAN, D.; FOLKERS, G. Introduction to comparative protein modeling. In *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, p. 87-143, 2003.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 615-627, 1988.

INKPEN, M.; PALMER, R. A.; LADD, M. F. C. Structure determination by X-ray crystallography. 4.ed. Boston: Kluwer, 2003, 864p.

INOUE, S.; KOGAKI, H.; IKEDA, K.; SAMEJIMA, Y.; OMORI-SATOH, T. Amino acid sequences of the two subunits of a phospholipase A₂ inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. Sequence homologies with pulmonary surfactant apoprotein and animal lectins. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 1001-1007, 1991.

ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A micro-biuret method for estimating proteins. **Anal. Biochem.**, v. 121, p. 401-410, 1964.

JANUÁRIO, A. H.; SANTOS, S. L.; MARCUSSI, S.; MAZZI, M. V.; PIETRO, R. C. L.; SATO, D. N.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chem.-Biol. Interactions**, v. 150, p. 243-251, 2004.

JONES, T.A., BERGDOLL, M., KJULDGAARD, M. **O: a macromolecule modeling environment**. New York: Springer-Verlag. p.189-95, 1990.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **J. Mol. Biol.**, v. 267, n. 3, p. 727-748, 1997.

KAIRYS, V.; FERNANDES, M. X.; GILSON, M. K. Screening drug-like compounds by docking to homology models: a systematic study. **J. Chem. Inf. Model**, v. 46, p. 365-379, 2006.

KARALLIEDDE, L. Animal Toxins. **Br. J. Anaesth.**, v. 74, n. 3, p. 319-327, 1995.

KIHARA, H. Studies on Phospholipase A in *Trimeresurus flavoviridis* Venom III. Purification and Some Properties of Phospholipase A Inhibitor in Habu Serum. **J. Biochem.**, v. 80, n. 2, p. 341-349, 1976.

KIM, H. K.; LEE, H. K.; SHIN, C. G; HUH, H. HIV integrase inhibitory activity of *Agastache rugosa*. **Ach. Pharm. Res.**, New York, v. 22, p. 520-523, 1999.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake phospholipase PLA₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2003.

KINI, R. M.; GOWDA, T. V. Studies on snake venom enzymes: Part 1 - Purification of ATPase, a toxic component of *Naja naja* venom and its inhibition by potassium gymemate. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 19, n. 2 , p. 152-154, 1982a.

KINI, R.M.; GOWDA, T.V. Studies on snake venom enzymes: Part 2 - Partial characterization of ATPases from Russell's viper (*Vipera russelli*) and their interaction with potassium gymemate. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 19, n. 5, p. 342-346, 1982b.

KOBE, B.; GLEICHMANN, T.; TEH, T.; HEIERHORST, J.; KEMP, B.E. Crystallization of protein kinases and phosphatases. In: HARDIE D.G. (Ed). Protein phosphorylation: a practical approach. 2nd Ed. Oxford: Oxford University Press. 1999. p.127- 151.

KONDO, H.; KONDO, S.; IKEZAWA, H.; MURATA, R.; OHSAKA, A. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.**, Tokyo, v. 13, p. 43-52, 1960.

KUNTZ, I. D. Structure-based strategies for drug design and discovery. **Science**, v. 257, n. 5073, p. 1078-1082, 1992.

LANDUCCI, E. C. T.; CASTRO, R. C.; PEREIRA, M. F.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: Dissociation between enzymatic and biological activities. **European J. Pharm.**, Amsterdam, v. 343, p. 257-263, 1998.

LASKOWSKI, R.A.; MACARTHUR, M.W.; THORNTON, J.M. Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Cryst.**, v. 26, p. 283-291, 1993.

LAURIE, A. T. R.; JACKSON, R. M. Q-SiteFinder: an energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites. **Bioinformatics**, v. 21, n. 9, p. 1908-1916, 2005.

LEE, C.-Y.; CHEN, Y. M.; JOUBERT, F.J. Protection by atropine against synergistic lethal effects of the *Angusticeps* type toxin F, from eastern green mamba and toxin I from black mamba venom. **Toxicon**, v. 20, p. 665-667, 1982.

LI, Q. B.; PAN, R.; WANG, G. F.; TANG, S. X. Anisodamine as an effective drug to treat snakebites. **J. Nat. Toxins**, v. 8, n. 3, p. 327-330, 1999.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug Discovery and development settings. **Adv. Drug. Del. Revs.**, v. 23, p. 3-25, 1997.

LIZANO, S.; DOMONT, G.; PERALES, J. Natural phospholipase A₂ myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 963-977, 2003.

LUTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v. 356, p. 83-85, 1992.

MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; DAHER, M. A.; OLIVEIRA, C. Z.; COUTO, L. B.; GOMES, O. A.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M.; PEREIRA, P. S. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 102, p. 364-370, 2005.

MAKINO, T.; ONO, T.; LIU, N.; NAKAMURA, T.; MUSO, E.; HONDA, G. Suppressive effects of rosmarinic acid on mesangioproliferative glomerulonephritis in rats. **Nephron**, Basel, v. 92, p. 898-904, 2002.

MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C. D.; OLIVEIRA, C. Z.; RUEDA, A. Q.; MENALDO, D. L.; BELEBONI, R. O.; STÁBELI, R. G; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R.; SOARES, A. M. Snake venom phospholipase A₂ inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 7, n. 8, p. 743-756, 2007.

MARTINI, V. P. **Determinação e Estudos de estruturas de complexos enzima-ligantes relevantes à biologia das pteridinas em parasitas: base para o desenvolvimento racional de drogas terapêuticas contra doença do sono.** Ponta Grossa, 2007.

MATSUNO, M.; NAGATSU, A.; OGIHARA, Y.; MIZUKAMI, H. Sintesis of 2-O-(4-coumaroyl)-3-(4-hydroxyphenyl)lactic acid an important intermediate os rosmarinic acid biosíntesis. **Chem. Pharm. Bull**, Hiroshima, v. 49, p. 1644-1646, 2001.

McPHERSON, A. Introduction to Macromolecular Crystallography. New Jersey: Wiley-Liss, 2003. 237p.

McREE, D.E. **Practical protein crystallography.** San Diego: Academic Press, 1993. 477p.

MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmac. Ther.**, New York, v. 48, p. 263-236, 1990.

MELO, P. A.; NASCIMENTO, M. C. do; MORS, W. B.; SUAREZ-KURTZ, G. Inhibition of myotoxic and haemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrate*(Asteraceae) extracts and constituents. **Toxicon**, Amsterdam, v. 32, p. 595-603, 1994.

MISHRA, L. C.; SINGH, B. B.; DAGENAIS, S. Scientific basis for the therapeutic use of *Withania somnifera* (ashwagandha): a review. **Altern. Med. Rev.**, v. 5, n. 4, p. 334-346, 2000.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake-bite the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 627-642, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods.*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAKAGAWA, M.; NAKANISHE, K.; DARKO, L. L.; VICK, J. A. Structures of cabenegrins A-I and A-II, potent anti-snake venoms. **Tetrahedron Lett.**, v. 23, p. 3855-3858, 1982.

NAKAZAWA, T., OHSAWA, K. Metabolism of rosmarinic acid in rats. **J. Nat. Prod.**, Washington, v. 61, p. 993-996, 1998.

NAVAZA, J. **Acta Cryst.**, v. 50A, p. 157-63, 1994.

NAYEEM, A.; SITKOFF, D.; JUNIOR, S.K. A comparative study of available software for high accuracy homology modeling: from sequence alignments to structural models. **Protein Sci.**, v.15, p. 808-824, 2006.

NOAKES, T. D. Effects of exercise on serum enzyme activities in humans. **Sports Medicine**, Toronto, v. 4, p. 245-267, 1987.

NOBUHISA, I.; INAMASU, S.; NAKAI, M.; TATSUI, A.; MIMORI, T.; OGAWA, T.; SHIMOHIGASHI, Y.; FUKUMAKI, Y.; HATTORI, S.; KIHARA, H.; OHNO, M. Characterization and evolution of a gene encoding a *Trimeresurus flavoviridis* serum protein that inhibits basic phospholipase A₂ isoenzymes in the snake's venom. **Eur. J. Biochem.**, v. 249, p. 838-845, 1997.

NÚÑEZ, C. E.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. **Toxicon**, v. 39, p. 1587-1594, 2001.

NÚÑEZ, V.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; PONCE-SOTO, L. A.; MERFORT, I.; LOMONTE, B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops* snake venoms: isolation of 4-nerolidylcathecol as active principle. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1017-1025, 2005.

OSHIMA-FRANCO, Y.; LEITE, G. B.; SILVA, G. H.; CARDOSO, D. F.; HYSLOP, S.; GIGLIO, J. R.; da CRUZ-HOFFING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neutralization of the pharmacological effects of bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom by crotoxin antiserum and heparin. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1477-1485, 2001.

OWNBY, C. L.; SELISTRE de ARAUJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, v. 37, n. 3, p. 411-445, 1999.

PEREIRA, B. M. R.; DAROS, M. R.; PARENTE, J. P. Bredemeyeroside D, a novel triterpenoid saponin from *Bredemeyera floribunda*: a potent snake venom antidote activity on mice. **Phytother. Res.**, v. 10, p. 666-669, 1996.

PEREIRA, M. F.; NOVELLO, J. C.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; LANDUCCI, E. T.; OLIVEIRA, B.; MARANGONI, S. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, na Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom with low phospholipase A₂ activity. **J. Protein Chem.**, v. 17, n. 4, p. 381-386, 1998.

PETERSEN, M.; SIMMONDS, M. S. I. Rosmarinic Acid. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 121-125, 2003.

PHILLIPSON, J. D.; ANDERSON, L. A. Ethnopharmacology and Western medicine. **J. Ethnopharmacol.**, v. 25, n. 1, p. 61-72, 1989.

POMMIER, A.; STEPANENKO, V.; JAROWICKI, K.; KOCIENSKI, P. J. Synthesis of (+)-Manoalide via a Copper (I)-Mediated 1,2-Metalate Rearrangement. **J. Org. Chem.**, v. 68, n. 10, p. 4008-4013, 2003.

QUEIROZ, L. S.; SANTO NETO, H.; ASSAKURA, M. T.; REICHE, A. P.; MANDELBAUN, F. R. Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, Amsterdam, v. 23, p. 341-345, 1985.

RAREY, M.; KRAMER, B.; LENGAUER, T.; KLEBE, G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. **J. Mol. Biol.**, v. 261, n. 3, p. 470-89, 1996.

RICHMOND, N. J.; ABRAMS, C. A.; WOLOHAN, P. R. N.; ABRAHAMIAN, E.; WILLETT, P.; CLARK, R. D. GALAHAD: 1. Pharmacophore identification by hypermolecular alignment of ligands in 3D. **J. Comput-aided Mol. Des.**, v. 20, p. 567-587, 2006.

SALI, A. 100,000 protein structures for the biologist. **Nat. Struct. Biol.**, v. 5, p. 1029-1032, 1998.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.**, v. 234, 779-815, 1993.

SÁNCHEZ R, SALI A. Comparative protein structure modeling as an optimization problem. **J. Mol. Struct. (Theochem)**, v. 398-399, p. 489–496 1997.

SÁNCHEZ, R.; SALI, A. Comparative protein structure modeling in genomics. **J. Comput. Phys.**, v. 151, p. 388-401, 1999.

SANDERSON, D. M.; EARNSHAW, C. G. Computer prediction of possible toxic action from chemical structure: The DEREK system. **Hum. Exp. Toxicol.**, v.10, p. 261-273, 1991.

SCARPATI, M. L.; ORIENTE, G. Isolamento costituzione dell'acido rosmarinico (dal *rosmarinus off*). **Ric. Sci.**, v. 28, p. 2329-2333, 1958.

SCHAFFERHANS, A.; KLEBE, G. Docking ligands onto binding site representations derived from proteins. **J. Mol. Biol.**, v. 307, p. 407-427, 2001.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1761, 1246–1259, 2006.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; DROR, O.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection. **Nucleic Acids Research**, v. 36, W223-W228, 2008.

SELVANAYAGAM, Z. E.; GNANAVENDHAN, S. G.; BALAKRISHNA, K.; RAO, R. B.; SIVARAMAN, J.; SUBRAMANIAN, K.; PURI, R.; PURI, R. K. Ehretianone, a novel quinonoid xanthene from *Ehretia buxifolia* with antisnake venom activity. **J. Nat. Prod.**, v. 59, n. 7, p. 664-667, 1996.

SÉRTIE, J. A. A.; BASILE, A. C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A. K.; ZELNIK, R. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea*; Part1. Anti-inflammatory activity and toxicity of the crude extract of the leaves. **Planta Med.**, v. 54, n. 1, p. 7-10, 1988.

SÉRTIE, J. A. A.; BASILE, A. C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A. K.; ZELNIK, R. Antiinflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. **Planta Med.**, v. 56, n. 1, p. 36-40, 1990.

SHETTY, K. Biotechnology to harness the benefits of dietary phenolics; focus on *Lamiaceae*. **Asia Pacific. J. Clin. Nutr.** v. 6, n. 3, 1997. Disponível em: <http://www.monash.edu.au/APJCN/Vol6/Num3/63p162.htm>. Acesso em 20/09/2004.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1488, n. 1-2, p. 1-19, 2000.

SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; BORGES, M. H.; ANDRILAO-ESCARSO, S. H.; CUNHA, O. A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Inhibition of proteases, myotoxins and phospholipases A₂ from *Bothrops* venoms by the heteromeric protein complex of *Didelphis albiventris* opossum serum. **Biochem Mol Biol Int.**, v. 43, n. 5, p. 1091-1099, 1997.

SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, V.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys-49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 378, p. 201-209, 2000.

SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R. Chemical modifications of phospholipases A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 855-868, 2003.

SOARES, A. M.; FONTES, M. R.; GIGLIO, J. R. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops jararacussu* snake venoms: Structure-Function Relationship. **Curr. Organ. Chem.**, v. 8, n. 17, p. 1677-1690, 2004.

SOARES A. M.; JANUÁRIO, A. H.; LOURENÇO, M. V.; PEREIRA, A. M. S.; PEREIRA, P. S. Neutralizing effects of Brazilian plants against snake venoms. **Drugs Future**, v. 29, n. 11, p. 1105-1117, 2004.

SOARES, A. M.; TICLI, F. K.; MARCUSSI, S.; LOURENÇO, M. V.; JANUÁRIO, A. H.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R.; LOMONTE, B.; PEREIRA, P. S. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, n. 22, p. 2625-2641, 2005.

Sybyl User Guide. Verson 7.1, Tripos Inc: USA, 2005.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; INAZU, M.; EGASHIRA, T.; MATSUMIYA, T. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 449, p. 261-267, 2002.

TAMAROZZI, M. B.; SOARES S. G.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; BARBOSA, J. E. Expression of recombinant human antibody fragments capable of inhibiting the phospholipase and myotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1760, n. 9, p. 1450-1457, 2006.

TEIXEIRA, C. F. P.; LANDUCCI, E. C. T.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 947-962, 2003.

TESTA, B.; BALMAT, A. L.; LONG, A.; JUDSON, P. Predicting drug metabolism – an evaluation of the expert system METEOR. **Chem. Biodivers.**, v. 2, n. 7, p. 872-885, 2005.

TICLI, F. K.; HAGE, L. I. S.; CAMBRAIA, R. S.; PEREIRA, P. S.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R. M.; STÁBELI, R. G.; GIGLIO, J. R.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Rosmarinic acid, a new snake venom Phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): Antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, v. 46, n. 3, p. 318-327, 2005.

TRENTO, E. P.; GARCIA, O. S.; RUCAVADO, A.; FRANCA, S. C.; BATALINI, C.; ARANTES, E. C.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Inhibitory properties of the anti-bothropic complex from *Didelphis albiventris* serum on toxic and pharmacological actions of metalloproteases and myotoxins from *Bothrops asper* venom. **Biochem. Pharmacol.**, v. 62, n. 11, p. 1521-1529, 2001.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂? **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 815-831, 2000.

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHOM, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins**, v. 52, n. 4, p. 609-623, 2003.

VERONESE, E. L.; ESMERALDINO, L. E.; TROMBONE, A. P.; SANTANA, A. E.; BECHARA, G. H.; KETTELHUT, I.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; SAMPAIO, S. V. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae). **Phytomedicine**, v. 12, n. 1-2, p. 123-130, 2005.

VISHWANATH, B. S.; GOWDA, T. V. Interaction of aristolochic acid with *Vipera russelli* phospholipase A₂: its effect on enzymatic and pathological activities. **Toxicon**, v. 25, n. 9, p. 929-937, 1987.

VITKUP, D.; MELAMUD, E.; MOULT, J.; SANDER, C. Completeness in structural genomics. **Nat. Struct. Biol.**, v. 8, p. 559-566, 2001.

VRIEND, G.; SANDER, C. Quality control of protein models: Directional atomic contact analysis. **J. Appl. Cryst.**, v. 26, p. 47-60, 1993.

WARD, R. J.; de AZEVEDO JR, W. F.; ARNI, R. K. At the interface: Crystal structures of phospholipase A₂. **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1623-1633, 1998.

WARRELL, D. A. Clinical features of envenoming from snake bites. In: Bom, C., Goyffon, M. (Eds), *Envenomings and Their Treatments*. Editions Foundation Marcel Mérieux, Lyon, p. 67-227, 1996.

WATERBEEMD, H. Van de; GIFFORD, E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? **Nature Reviews**, v. 2, p. 192-204, 2003.

YANG, L. C.; WANG, F.; LIU, M. A study of an endothelin antagonist from a Chinese anti-snake venom medicinal herb. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 31, Suppl 1, p. S249-50, 1998.

ZAMUNÉR, S. R.; DA CRUZ-HOFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial anyivenom. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 259-271, 2004.

ZOU, Z. W.; XU, L. N.; TIAN, J. Y. Antithrombotic and antiplatelet effects of rosmarinic acid, a water-soluble component isolated from radix *Salviae miltiorrhizae* (danshen). **Yao Xue Xue Bao**, Pequim, v. 28, p. 241-245, 1993.

"Fácil é ocupar um lugar na caderneta telefônica.

Difícil é ocupar o coração de alguém. Saber que se é realmente amado.

Fácil é sonhar todas as noites.

Difícil é lutar por um sonho. Eterno, é tudo aquilo que dura uma fração de segundo, mas com tamanha intensidade, que se petrifica, e nenhuma força jamais o resgata."

Carlos Drummond de Andrade