



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



ESTUDO QUÍMICO DE LIQUENS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ANTITUMORAL

Luiz Fabrício Gardini Brandão

Orientadora: Profa. Dra. Neli Kika Honda

Campo Grande – 2011



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



ESTUDO QUÍMICO DE LIQUENS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ANTITUMORAL

Luiz Fabrício Gardini Brandão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado – da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Mestre em Química (Área de concentração: Química Orgânica).

Orientadora: Profa. Dra. Neli Kika Honda

Campo Grande – 2011



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



- Data da Apresentação: 01/04/2011

- Local: Departamento de Química - UFMS

Banca Examinadora:

- Profa. Dra. Neli Kika Honda (Orientadora)
- Profa. Dra. Glauca Braz Alcantara (IQ - UFG)
- Profa. Dra. Roberta Gomes Coelho (FAMEZ – UFMS)
- Profa. Dra. Rosenei Louzada Brum (Suplente – DQI – UFMS)

Agradecimento especial à CAPES, pela bolsa de Pós Graduação concedida e à FUNDECT pelo apoio financeiro.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha amada esposa, Camila Carnelós Petrelli Brandão, que permaneceu ao meu lado me apoiando para a execução do mesmo. Seu amor, carinho e paciência foram ingredientes essenciais para a conclusão desta obra.

Agradecimento especial

Agradeço especialmente à minha orientadora, Profa. Dra. Neli Kika Honda, pelo empenho excepcional na minha formação e crescimento profissional. Seus ensinamentos foram muito além da técnica necessária para se trabalhar em um laboratório de Produtos Naturais. Aprendi muito sobre ética e postura profissional, bem como análise crítica bibliográfica. A sua disposição, paciência e sinceridade foram fatores importantes para meu amadurecimento profissional e pessoal.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela natureza. “Os céus declaram a glória de Deus; o firmamento proclama a obra de suas mãos.” Salmos 19.1 (N.V.I.).

À minha orientadora, Profa. Dra. Neli Kika Honda, por não ser somente uma mentora acadêmica, mas sim uma “mãetora”.

À Profa. Dra. Maria de Fátima C. Matos e sua equipe pela realização dos ensaios biológicos em células.

À minha esposa, Camila C. P. Brandão, por acompanhar de perto cada dia dedicado a este trabalho suprimindo-me de ânimo e coragem.

Ao meu pai, Luiz Thadeu M. Brandão, por acreditar e me apoiar em minhas decisões.

À minha mãe, Lidia Stella G. M. Brandão, pelo esforço constante na construção do meu caráter e de minha educação.

À minha irmã, Letícia Stella G. Brandão, pelas discussões acadêmicas e companhia em Mato Grosso do Sul.

À minha irmã, Lana Marcela G. Brandão, pelo apoio psicológico.

Ao meu primo, Alexandre F. Brandão, por despertar em mim o interesse pela ciência.

Ao meu sogro e minha sogra, Antônio e Célia Petrelli, pela companhia e pelos almoços aos domingos que me proveram de energia para iniciar cada semana de trabalho.

Aos meus tios Célio e Leila Zanatta, por acompanharem de perto minha trajetória acadêmica em Campo Grande.

Aos técnicos do DQI/UFMS, Luciana M. Ravaglia, Edilene D. Rodrigues e Luiz Leonardo S. Viana, pela obtenção dos espectros apresentados neste trabalho.

Aos secretários do programa de Pós Graduação em Química - UFMS, Celestino e Maria Otávia, pelo auxílio burocrático.

Aos alunos de IC do LP2, Deisy, Kerolayne, Nathália, Corah, Gabriela, Cris, Thiago, Rodrigo, Liu, Diogo, Diego, Rafael Rial, Rafael Aparecido, Kazuo, Hugo, Marcelo, Jessé, pela companhia.

Aos professores da Pós Graduação em Química pelo subsídio teórico.

À Ana Camila Micheletti, pelos ensinamentos computacionais relacionados aos Softwares de Química.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

À PROPP/UFMS e à FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento de Ensino, Ciências e Tecnologia) pelo auxílio financeiro.

Aos membros da Banca examinadora Profa. Dra. Glaucia Braz Alcantara, Profa. Dra. Roberta Gomes Coelho e Profa. Dra. Rosenei Louzada Brum por aceitarem o convite.

A todos os demais que influenciaram estes meus dois anos de mestrado, direta ou indiretamente, meus sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	15
3. PARTE EXPERIMENTAL	17
3.1 Material Utilizado	18
3.2 Seleção de Espécies	19
3.3 Preparação das Amostras e Extração dos Compostos Fenólicos	19
3.4 Extração e Fracionamento dos Extratos e Identificação das Substâncias	20
3.5 Tratamento do extrato acetônico concentrado dos líquens – <i>Usnea sp.</i>, <i>C. verticillaris</i> e <i>Ramalina sp.</i>	22
3.6 Ensaio Enzimáticos	22
Ensaio de Bioautografia	22
Ensaio em Solução	23
Padronização da Técnica	23
Avaliação da Atividade de Inibição	23
3.7 Ensaio com Células de Melanoma	24
Preparo da suspensão de células	25
Teste de Citotoxicidade	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Confirmação Estrutural	29
Depsídeos	29
Depsidonas	37
Ácido Úsnico e Liquexantona	44

4.2 Ensaio Enzimático	47
Bioautografia	47
Ensaio em Solução	49
Padronização da Técnica	50
Efeito do Solvente	57
4.3 Moduladores Enzimáticos	58
4.4 Efeito do Ácido Fumarprotocetrárico na Cinética da Enzima Tirosinase	60
4.5 Efeito do Ácido Protocetrárico na Cinética da Enzima Tirosinase	64
4.6 Efeito do Ácido Psorômico na Cinética da Enzima Tirosinase	68
4.7 Relação Estrutura-Atividade (Ensaio Enzimático)	71
4.8 Ensaio com Células de Melanoma	72
5. CONCLUSÕES	76
6. REFERÊNCIAS	78
7. ANEXO	90

ÍNDICE DE SUBSTÂNCIAS

Ácido protoliqueterínico (1)	2
Ácido baeomicésico (2)	2
Ácido lobárico (3)	2
Ácido 4-O-metilcriptoclorofeico (4)	2
Tirosina (5)	4
L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA) (6)	4, 19, 22 - 24, 50 - 52, 55 - 58, 60, 62 - 64, 66, 67, 69, 70
Dopacromo (7)	4, 24, 25, 49, 54, 55, 57
Paclitaxel (8)	6
Vincristina (9)	6
Vimblastina (10)	6
Ácido polipórico (11)	8
S-(-)-ácido úsnico (12)	9
R-(+)-ácido úsnico (13)	2, 8, 9, 22, 28, 29, 44 - 49, 72 - 74, 77
Liquexantona (14)	10, 22, 28, 29, 44 - 49, 72, 73, 77
Ácido psorômico (15)	10, 11, 22, 23, 28, 29, 37 - 39, 43, 47 - 49, 52, 68 - 75, 77
Ácido protocetrárico (16)	10, 22, 23, 28, 29, 37 - 40, 47 - 49, 52, 64 - 67, 71 - 75, 77
Ácido fumarprotocetrárico (17)	10, 22, 23, 28, 29, 37 - 39, 41, 47 - 49, 52, 60 - 63, 68, 71 - 75, 77
Ácido norstítico (18)	11, 22, 28, 29, 37 - 39, 44, 47 - 49, 50, 72 - 74, 77
Ácido difractáico (19)	11, 22, 28, 29, 31 - 33, 47 - 49, 72, 73, 77
Ácido divaricático (20)	11, 12, 22, 28, 29 - 32, 35, 47 - 49, 72 - 74, 77
Atranorina (21)	12, 22, 28, 29, 31, 32, 34, 47 - 49, 72, 73, 77
Ácido perlatólico (22)	12, 22, 28, 29, 31, 32, 36, 47 - 49, 72 - 74, 77
Ácido orselínico (23)	29
Ácido β-metil-orselínico (24)	29, 31

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Nome do líquen, código da fração e composto identificado.	28
Tabela 2 – Cor, rotação óptica e ponto de fusão dos compostos identificados.	29
Tabela 3 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido difractáico.	33
Tabela 4 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do depsídeo atranorina.	34
Tabela 5 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido divaricático.	35
Tabela 6 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido perlatólico.	36
Tabela 7 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido protocetrário.	40
Tabela 8 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido fumarprotocetrário.	41
Tabela 9 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido norstítico.	42
Tabela 10 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido psorômico.	43
Tabela 11 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido úsnico.	46
Tabela 12 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da liquexantona.	47
Tabela 13 – Relação entre as concentrações de L-DOPA e seus valores de V_0 , $1/V_0$, $1/[S]$ e R^2 .	54
Tabela 14 – Parâmetros cinéticos da enzima tirosinase utilizada no presente trabalho.	56
Tabela 15 – Inibição da enzima tirosinase (expressa em %) pela ação do ácido fumarprotocetrário após 5 minutos de reação.	61
Tabela 16 – Efeito de concentração do ácido fumarprotocetrário nos parâmetros cinéticos da catálise enzimática da tirosinase com L-DOPA.	63
Tabela 17 – Parâmetros cinéticos da enzima tirosinase no ensaio com o ácido fumarprotocetrário.	63
Tabela 18 – Inibição / ativação da tirosinase (expressa em %) pela ação do ácido protocetrário após 5 minutos de reação.	65
Tabela 19 – Efeito de concentração do ácido protocetrário nos parâmetros cinéticos da catálise enzimática da tirosinase com a L-DOPA.	67
Tabela 20 – Parâmetros cinéticos da enzima tirosinase determinados no ensaio com o ácido protocetrário.	67

Tabela 21 – Inibição da enzima tirosinase (expressa em %) pela ação do ácido psorômico após 5 minutos de reação.	68
Tabela 22 – Efeito de concentração do ácido psorômico nos parâmetros cinéticos da catálise enzimática da tirosinase com L-DOPA.	70
Tabela 23 – Parâmetros cinéticos da enzima tirosinase no ensaio com o ácido psorômico.	70
Tabela 24 – Valores de K_M e V_{max} da enzima tirosinase nos ensaios com os ácidos fumarprotocetrárico, protocetrárico e psorômico.	72
Tabela 25 – Valores de CI_{50} e I.S. dos compostos 13 a 22 para as linhagens de células B16, UACC e 3T3.	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Rota biossintética da produção de melanina (SÁNCHEZ-FERRER et al., 1994).	5
Figura 2 – Compostos das classes dos 5-alkilresorcinóis e 4-alkilresorcinóis.	6
Figura 3 – Reação da tirosinase e seu substrato (L-DOPA) em placa de sílica na presença de 0,6 a 15,0 μg dos compostos fenólicos.	49
Figura 4 – Efeito da concentração de L-DOPA (0,075 a 0,900 mM) na atividade enzimática (3,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da enzima) medido pela variação de absorbância (em 475 nm) em função do tempo de reação.	50
Figura 5 – Efeito da concentração de L-DOPA (0,075 a 0,900 mM) na atividade enzimática (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da enzima) medido pela variação de absorbância (em 475 nm) em função do tempo de reação.	51
Figura 6 – Efeito da concentração de L-DOPA (0,075 a 0,900 mM) na atividade enzimática (2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da enzima) medido pela variação de absorbância (em 475 nm) em função do tempo de reação.	52
Figura 7 – Concentração de dopacromo formado (μM) na reação enzimática em função do tempo e das concentrações de L-DOPA.	54
Figura 8 – Gráfico duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) da reação da enzima tirosinase com seu substrato L-DOPA.	55
Figura 9 – Efeito do DMSO na reação da enzima tirosinase com seu substrato L-DOPA.	58
Figura 10 – Gráfico duplo-recíproco Lineweaver-Burk da cinética da reação de oxidação da L-DOPA catalisada pela enzima tirosinase na presença de diferentes concentrações de ácido fumarprotocetrárico.	62
Figura 11 – Gráfico duplo-recíproco Lineweaver-Burk da cinética da reação de oxidação de L-DOPA catalisada pela enzima tirosinase na presença de diferentes concentrações de ácido protocetrárico.	66
Figura 12 – Gráfico duplo-recíproco Lineweaver-Burk da cinética da reação de oxidação da L-DOPA catalisada pela enzima tirosinase na presença de diferentes concentrações de ácido psorômico.	69

ÍNDICE DE ESPECTROS

(Anexo)

Espectro 1a – Espectro de RMN de ^1H do ácido difractáico, em acetona-d ₆ .	91
Espectro 1b – Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135) do ácido difractáico, em acetona-d ₆ .	92
Espectro 1c – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido difractáico, em acetona-d ₆ .	93
Espectro 1d – Correlação ^1H e ^{13}C gHSQC do ácido difractáico, em acetona-d ₆ .	94
Espectro 1e – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC do ácido difractáico, em acetona-d ₆ .	95
Espectro 2a – Espectro de RMN de ^1H do atranorina, em CDCl_3 .	96
Espectro 2b – Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135) do atranorina, em CDCl_3 .	97
Espectro 2c – Espectro de RMN de ^{13}C do atranorina, em CDCl_3 .	98
Espectro 2d – Correlação ^1H e ^{13}C gHSQC do atranorina, em CDCl_3 .	99
Espectro 2e₁ – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC do atranorina, em CDCl_3 (parte 1).	100
Espectro 2e₂ – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC do atranorina, em CDCl_3 (parte 2).	101
Espectro 3a – Espectro de RMN de ^1H do ácido divaricático, em acetona-d ₆ .	102
Espectro 3b – Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135) do ácido divaricático, em acetona-d ₆ .	103
Espectro 3c – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido divaricático, em acetona-d ₆ .	104
Espectro 3d – Correlação ^1H e ^{13}C gHSQC do ácido divaricático, em acetona-d ₆ .	105
Espectro 3e – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC do ácido divaricático, em acetona-d ₆ .	106
Espectro 4a – Espectro de RMN de ^1H do ácido perlatólico, em CDCl_3 .	107
Espectro 4b – Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135) do ácido perlatólico, em CDCl_3 .	108
Espectro 4c – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido perlatólico, em CDCl_3 .	109
Espectro 4d – Correlação ^1H e ^{13}C gHSQC do ácido perlatólico, em CDCl_3 .	110

Espectro 4e₁ – Correlação à longa distância ¹ H e ¹³ C gHMBC do ácido perlatólico, em CDCl ₃ (parte 1).	111
Espectro 4e₂ – Correlação à longa distância ¹ H e ¹³ C gHMBC do ácido perlatólico, em CDCl ₃ (parte 2).	112
Espectro 5a – Espectro de RMN de ¹ H do ácido protocetrário, em DMSO-d ₆ .	113
Espectro 5b – Espectro de RMN de ¹³ C (DEPT-135) do ácido protocetrário, em DMSO-d ₆ .	114
Espectro 5c – Espectro de RMN de ¹³ C do ácido protocetrário, em DMSO-d ₆ .	115
Espectro 5d – Correlação ¹ H e ¹³ C gHSQC do ácido protocetrário, em DMSO-d ₆ .	116
Espectro 5e – Correlação à longa distância ¹ H e ¹³ C gHMBC do ácido protocetrário, em DMSO-d ₆ .	117
Espectro 6a – Espectro de RMN de ¹ H do ácido fumarprotocetrário, em DMSO-d ₆ .	118
Espectro 6b – Espectro de RMN de ¹³ C (DEPT-135) do ácido fumarprotocetrário, em DMSO-d ₆ .	119
Espectro 6c – Espectro de RMN de ¹³ C do ácido fumarprotocetrário, em DMSO-d ₆ .	120
Espectro 6d – Correlação ¹ H e ¹³ C gHSQC do ácido fumarprotocetrário, em DMSO-d ₆ .	121
Espectro 6e – Correlação à longa distância ¹ H e ¹³ C gHMBC do ácido fumarprotocetrário, em DMSO-d ₆ .	122
Espectro 7a – Espectro de RMN de ¹ H do ácido norstítico, em DMSO-d ₆ .	123
Espectro 7b – Espectro de RMN de ¹³ C (DEPT-135) do ácido norstítico, em DMSO-d ₆ .	124
Espectro 7c – Espectro de RMN de ¹³ C do ácido norstítico, em DMSO-d ₆ .	125
Espectro 7d – Correlação ¹ H e ¹³ C gHSQC do ácido norstítico, em DMSO-d ₆ .	126
Espectro 7e – Correlação à longa distância ¹ H e ¹³ C gHMBC do ácido norstítico, em DMSO-d ₆ .	127
Espectro 8a – Espectro de RMN de ¹ H do ácido psorômico, em DMSO-d ₆ .	128
Espectro 8b – Espectro de RMN de ¹³ C (DEPT-135) do ácido psorômico, em DMSO-d ₆ .	129

Espectro 8c – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido psorômico, em DMSO- d_6 .	130
Espectro 8d – Correlação ^1H e ^{13}C gHSQC do ácido psorômico, em DMSO- d_6 .	131
Espectro 8e – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC do ácido psorômico, em DMSO- d_6 .	132
Espectro 9a – Espectro de RMN de ^1H do ácido úsnico, em CDCl_3 .	133
Espectro 9b – Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135) do ácido úsnico, em CDCl_3 .	134
Espectro 9c – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido úsnico, em CDCl_3 .	135
Espectro 9d – Correlação ^1H e ^{13}C gHSQC do ácido úsnico, em CDCl_3 .	136
Espectro 9e₁ – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC do ácido úsnico, em CDCl_3 (parte 1).	137
Espectro 9e₂ – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC do ácido úsnico, em CDCl_3 (parte 2).	138
Espectro 9e₃ – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC do ácido úsnico, em CDCl_3 (parte 3).	139
Espectro 10a – Espectro de RMN de ^1H da liquexantona, em CDCl_3 .	140
Espectro 10b – Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135) da liquexantona, em CDCl_3 .	141
Espectro 10c – Espectro de RMN de ^{13}C da liquexantona, em CDCl_3 .	142
Espectro 10d – Correlação ^1H e ^{13}C gHSQC da liquexantona, em CDCl_3 .	143
Espectro 10e₁ – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC da liquexantona, em CDCl_3 (parte 1).	144
Espectro 10e₂ – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC da liquexantona, em CDCl_3 (parte 2).	145

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetona-d ₆	acetona deuterada
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CI ₅₀	concentração que causa 50% de inibição do crescimento de células tumorais
d	duplete
DMSO	sulfóxido de dimetila
DMSO-d ₆	sulfóxido de dimetila deuterado
gHMBC	“Heteronuclear Multiple-Bond Correlation” com utilização de gradiente de campo pulsado na coordenada z
gHSQC	“Heteronuclear Single Quantum Coherence” com utilização de gradiente de campo pulsado na coordenada z
[Inibidor]	concentração de inibidor
IS	índice de seletividade
J	constante de acoplamento (Hz)
K _M	constante de Michaelis
L-DOPA	L-3,4-diidroxifenilalanina
m	multiplete
PBS	tampão fosfato-salino
ppm	parte por milhão
R _f	fator de retardamento
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de ¹ C
RMN ¹³ C	ressonância magnética nuclear de ¹³ C
RMN ¹³ C DEPT	ressonância magnética nuclear de DEPT “Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”
rpm	rotações por minuto
s	singlete
[S]	concentração de substrato
[Substrato]	concentração de substrato
sl	singlete largo

SRB	sulforrodamina B
TCA	ácido tricloroacético
UV	ultravioleta
V_0	velocidade inicial
V_{\max}	velocidade máxima
%I	inibição percentual
δ	deslocamento químico

RESUMO

Os líquens, estruturas simbióticas entre algas e fungos, são vastamente distribuídos na natureza. A maior parte das substâncias sintetizadas por este grupo são compostos de natureza fenólica. Das espécies *Parmotrema dilatatum* (Vain.) Hale, *Usnea subcavata* Motyka, *Usnea* sp., *Ramalina* sp., *Cladonia confusa* (Sant.) Folmm. & Ahti, *Parmotrema lichexantonicum* Eliasaro & Adler, *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. e *Ramalina aspera* Häsänen foram isolados os compostos fenólicos *R*-(+)-ácido úsnico, liquexantona, atranorina, e os ácidos psorômico, protocetrário, fumarprotocetrário, norstítico, difractáico, divaricático e perlatólico. As estruturas foram confirmadas por técnicas espectrais de ressonância magnética nuclear.

Os compostos fenólicos foram submetidos a ensaio preliminar de bioautografia com a enzima tirosinase. Os ácidos protocetrário, fumarprotocetrário e psorômico apresentaram solubilidade em meio aquoso e foram também submetidos a ensaios em solução com a finalidade de quantificar e avaliar o tipo de inibição enzimática promovida por estes. Os ácidos fumarprotocetrário e psorômico inibiram a enzima de forma mista e incompetitiva, enquanto que o ácido protocetrário ativou a enzima.

Os compostos foram submetidos a ensaios de citotoxicidade com linhagens de células B16 (melanoma murino), UACC (melanoma humano) e 3T3 (fibroblasto de pulmão murino). O ácido protocetrário foi o que apresentou maior atividade contra a linhagem de melanoma UACC com CI_{50} de 4,17 μM . Já o ácido divaricático apresentou alta atividade contra as linhagens de melanomas B16 e UACC com CI_{50} de 7,83 e 8,01 μM , respectivamente. O ácido norstítico também se destacou, dentre os compostos avaliados, apresentando CI_{50} de 10,5 e 11,5 μM para as linhagens B16 e UACC, respectivamente.

Os resultados obtidos mostraram que dos compostos avaliados, alguns são promissores moduladores da enzima tirosinase e inibidores do crescimento de células de melanoma B16 e UACC.

PALAVRAS-CHAVE: Líquens, Substâncias Fenólicas, Tirosinase, Melanoma

ABSTRACT

Lichens are symbiotic structures between algae and fungi widely spread in nature. This group synthesizes mainly phenolic compounds. From the species *Parmotrema dilatatum* (Vain.) Hale, *Usnea subcavata* Motyka, *Usnea* sp., *Ramalina* sp., *Cladonia confusa* (Sant.) Folmm. & Ahti, *Parmotrema lichexantonicum* Eliasaro & Adler, *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. e *Ramalina aspera* Häsänen were isolated phenolic compounds such as *R*-(+)-usnic acid, lichexantone, atranorin, psoromic acid, protocetraric acid, fumarprotocetraric acid, norstictic acid, difractaic acid, divaricatic acid and perlatolic acid. The structures were confirmed through nuclear magnetic resonance techniques.

The compounds were preliminarily submitted to a TLC bioautography assay with the tyrosinase enzyme. Protocetraric acid, fumarprotocetraric acid and psoromic acid presented solubility in aqueous medium and were consequently submitted to enzyme solution assays to quantitatively verify and evaluate the type of inhibition. Fumarprotocetraric acid and psoromic acid inhibited the enzyme in a mixed and uncompetitively way. On the other hand, protocetraric acid activated the enzyme.

The compounds were submitted to cytotoxic assays with different cell-lines such as B16 (human melanoma), UACC (murine melanoma) and 3T3 (murine lung fibroblast). Protocetraric acid presented the best activity against UACC (IC₅₀ 4.17 μ M). Otherwise, divaricatic acid presented high activity against B16 and UACC (IC₅₀ 7.83 and 8.01 μ M, respectively). Among the lichen compounds tested, norstictic acid also presented good activity against both melanoma cells with an IC₅₀ of 10.5 and 11.5 μ M for B16 and UACC, respectively.

The results show that some of the isolated compounds are potentially tyrosinase modulators and melanoma (B16 and UACC) cell-growth inhibitors.

KEYWORDS: Lichens, Phenolic Compounds, Tyrosinase, Melanoma

Introdução

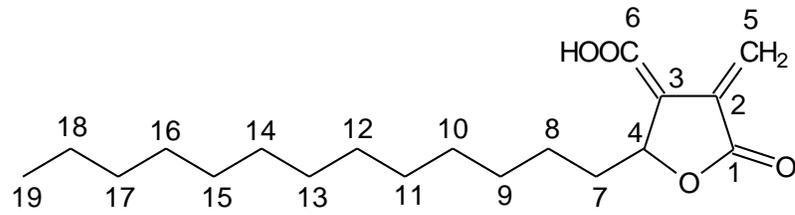
1 - INTRODUÇÃO

Líquens, uma complexa estrutura simbiótica entre algas ou cianobactérias e fungos, são vastamente distribuídos, desde as regiões polares às tropicais e das planícies às montanhas mais altas (GALLOWAY, 1996). Os estudos fitoquímicos deste grupo são importantes, pois a maior parte das substâncias sintetizadas pelos líquens são de natureza fenólica e exclusivas, não sendo encontradas em plantas superiores (AHMADJIAN, 1993; ELIX, 1996).

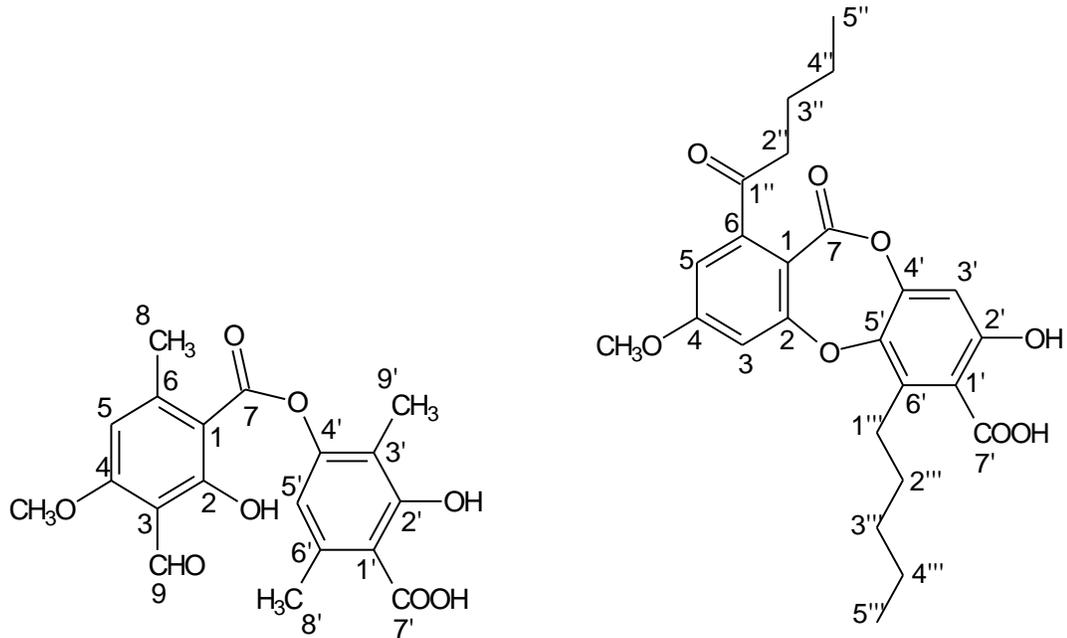
Em geral, a biossíntese destes compostos, ocorrem pela via poliketídica como é o caso das antraquinonas, naftoquinonas, xantonas, cromonas, dibenzofuranos, depsonas, depsidonas, depsídeos, fenóis monocíclicos e compostos relacionados ao ácido úsnico. Outros compostos como os derivados do ácido pulvínico são sintetizados pela via do ácido chiquímico e os esteróides / triterpenóides pela via do ácido mevalônico (HUNECK, 1999; ELIX, 1996).

Os compostos fenólicos se destacam pelas importantes atividades biológicas e/ou farmacológicas. Muitos apresentam atividade antimicrobiana, antitumoral, anti-HIV, de filtro de radiação, de inibição enzimática, entre outras (RANKOVIĆ et al., 2008; YAMAMOTO et al., 1995; HONG et al., 1997; FERNÁNDEZ et al., 1996; MATSUBARA et al., 1997).

Com relação à atividade de inibição enzimática, os ácidos protoliquesterínico (**1**), baeomicésico (**2**) e lobárico (**3**) são inibidores da 5-lipoxigenase, enzima importante na modulação do processo imunoinflamatório, pois está envolvida na produção de leucotrienos, enquanto que, o ácido 4-O-metilcriptoclorofoico (**4**) apresenta propriedade inibitória da enzima prostaglandina sintetase, que também é importante nos processos inflamatórios em animais (HARALDSDÓTTIR et al., 2004; INGÓLFSÓTTIR et al., 1997, SHIBUYA et al., 1983). O ácido protoliquesterínico (**1**), atua também como um inibidor da transcriptase reversa do vírus HIV (PENGSUPARP et al., 1995). Alguns estudos mostraram o potencial de alguns compostos fenólicos para a inibição da enzima tirosinase (HIGUCHI, et al., 1993; KINOSHITA et al., 1994; MATSUBARA et al., 1997).

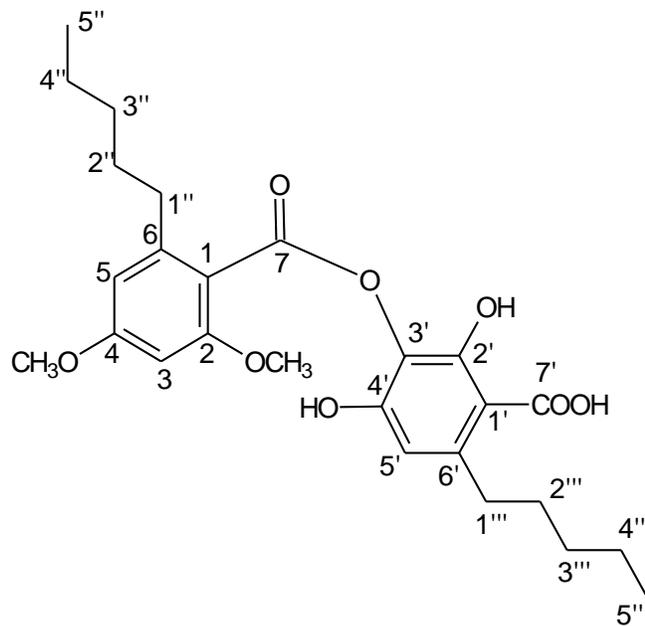


ácido protoliquisterínico (1)



ácido baecomésico (2)

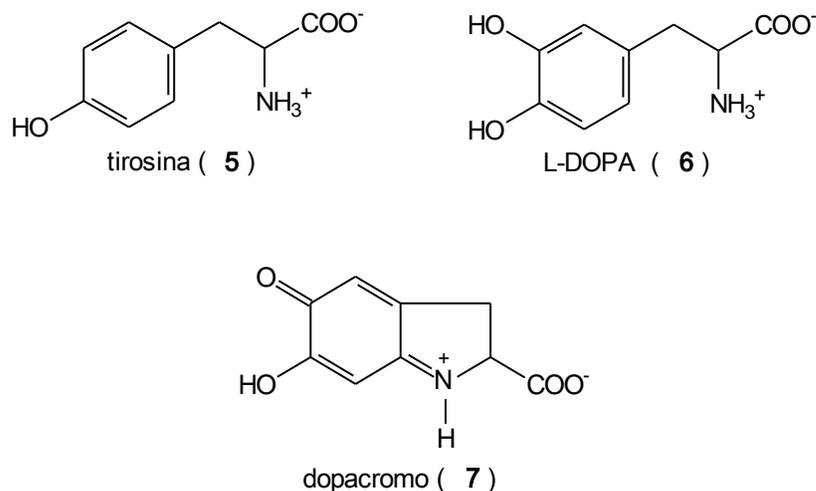
ácido lobárico (3)



ácido 4-O-metilcriptoclorofeico (4)

A tirosinase é uma enzima que apresenta dois tipos de atividades. Ela pode agir como monofenolase catalisando *orto*-hidroxilação de monofenóis ou como difenolase catalisando a oxidação de difenóis à quinonas. O mecanismo desta oxidação catalítica, bem como a elucidação estrutural da enzima por cristalografia de raio-X foram propostos por Matoba e colaboradores (2006). A enzima possui 2 átomos de cobre localizados no sítio ativo. O sequenciamento de aminoácidos da enzima tirosinase foi realizado constatando ser um heterotetrâmero com a presença de duas subunidades com duas cadeias polipeptídicas cada uma, sendo seu peso molecular 120.000 g/mol (STROTHKAMP et al., 1976; SEO et al., 2003).

A tirosinase desempenha diferentes funções nos seres em que se encontra presente. Em insetos, por exemplo, seu papel fundamental é enrijecer e pigmentar o exoesqueleto responsável pela proteção dos órgãos internos destes seres (KRAMER et al., 1997; SUGUMARAN et al., 1991). Em mamíferos, a enzima catalisa a oxidação de tirosina (**5**) (monofenol) e/ou a oxidação de L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA) (**6**) (*orto*-difeno) à sua correspondente *orto*-quinona (SÁNCHEZ-FERRER et al., 1995). Ou seja, o aminoácido tirosina é hidroxilado em reação catalisada pela tirosinase para formar L-DOPA que é oxidado em reação catalisada pela mesma enzima formando um precursor (dopacromo) (**7**) que após uma série de reações químicas e enzimáticas produz o pigmento melanina (**Figura 1**). Sendo assim, esta enzima tem um papel fundamental na coloração de pele e pêlos.



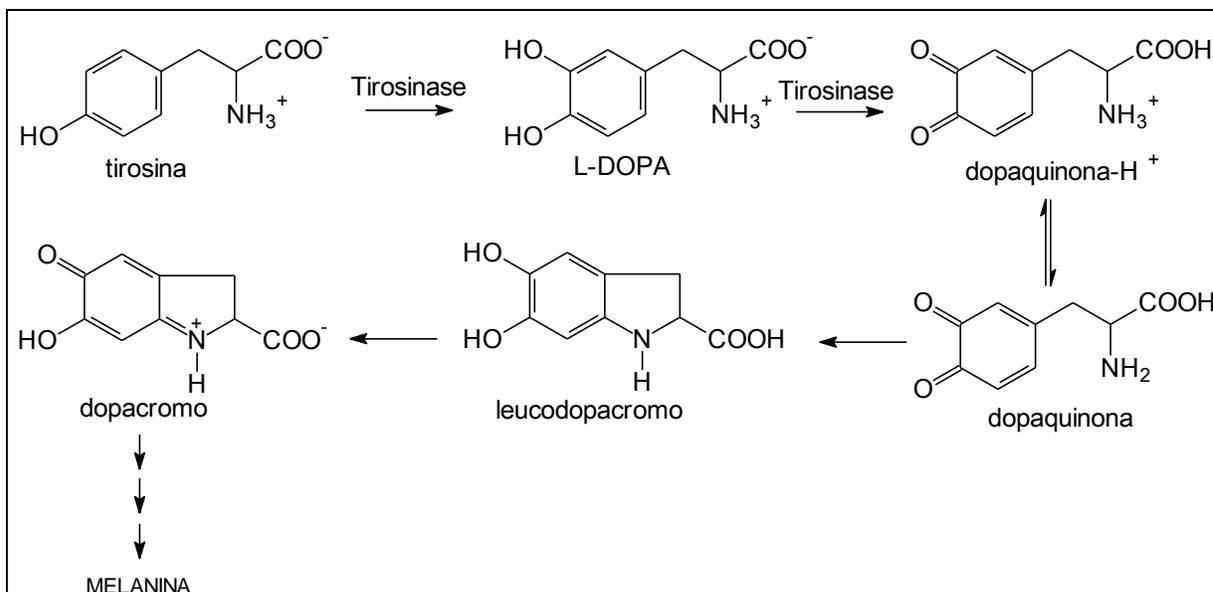


Figura 1 – Rota biossintética da produção de melanina (SÁNCHEZ-FERRER et al., 1994).

Se a tirosinase é inibida, não ocorre a produção de melanina e se for ativada, a produção é estimulada. A tirosinase pode ser inibida de três maneiras: 1) Através da interação do inibidor com o sítio ativo binuclear de cobre da enzima formando um complexo; 2) O inibidor pode desorganizar a estrutura terciária da enzima geralmente agindo de forma não competitiva; e 3) O inibidor pode interagir diretamente ou indiretamente com o substrato da enzima como um agente redutor para dopaquinona (KUBO, 2000). Os compostos fenólicos derivados de líquens podem interagir com a enzima inibindo-a ou ativando-a. Exemplo disto são os compostos das classes dos 5-alquilresorcinóis e 4-alquilresorcinóis (**Figura 2**) que inibiram a atividade da enzima tirosinase (MATSUBARA et al., 1997). No entanto, até o momento, não foi encontrado estudos de cinética enzimática com compostos isolados de líquens frente à enzima tirosinase nas bases de dados pesquisadas.

Muitos compostos fenólicos apresentam, também, atividade antitumoral. Um tumor é caracterizado por uma massa anormal de tecido que cresce excessivamente de uma forma desorientada do tecido normal (WILLIS, 1952). Câncer é o termo que se refere a todos os tumores malignos. Ele pode ser hereditário causado por um gene defeituoso herdado de um dos progenitores ou promovido por fatores ambientais. Quando a carcinogênese é quimicamente induzida, ela passa por dois estágios. O primeiro estágio é o iniciador que

transforma as células normais em células tumorais dormentes. O segundo estágio promove estas células para células tumorais propriamente ditas. Compostos capazes de agir a favor do primeiro ou do segundo estágio são chamados de iniciadores ou promotores, respectivamente. O DNA humano é alterado continuamente, mas as mutações são normalmente reparadas pelos mecanismos de defesa como a proteína decodificada pelo gene p53 (guardião do genoma) que suprime mitose e induz apoptose (ROBBINS et al., 2005). Quando os mecanismos de defesa falham, a célula mutante se replica e um tumor começa a se instalar no tecido. A alta taxa de mortalidade do câncer é bem conhecida, mas um decréscimo tem ocorrido nos últimos anos (SIMMONDS, 2003). As razões para esta melhora se devem ao diagnóstico precoce, às tecnologias avançadas de diagnóstico e à descoberta de novos compostos antitumorais (KAH et al., 2007; TANAKA & FUKASE, 2008; DIMITROULIS & STATHOPOULOS, 2005).

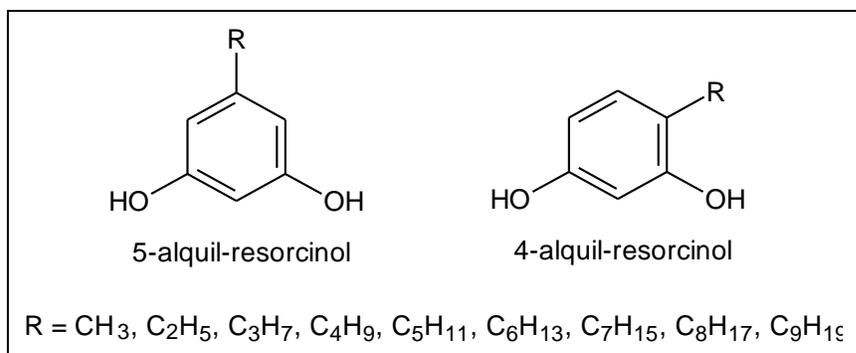
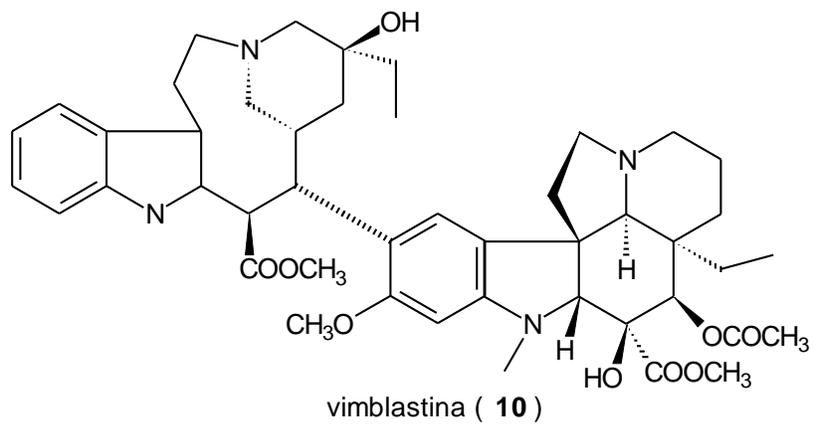
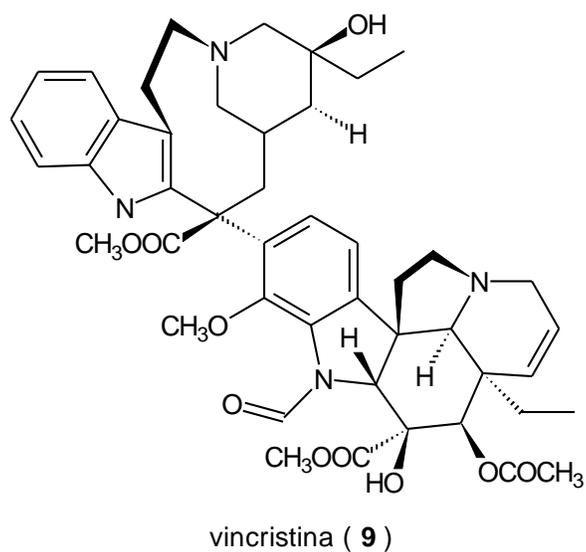
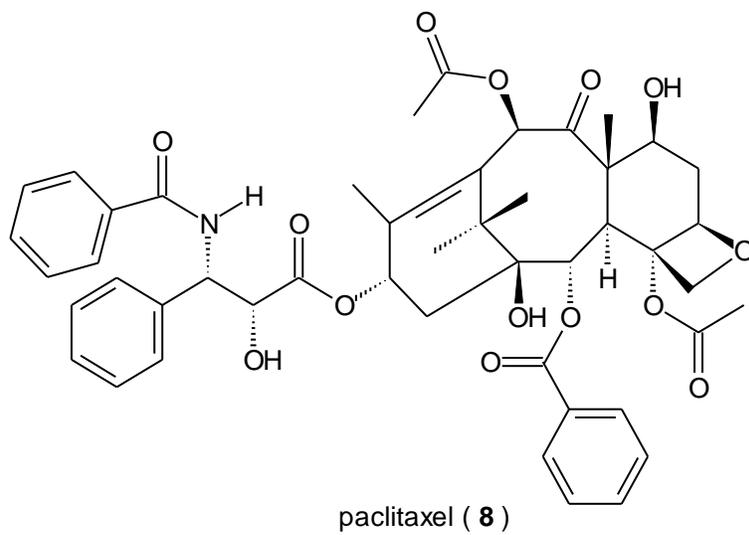


Figura 2 – Compostos das classes dos 5-alkilresorcinóis e 4-alkilresorcinóis.

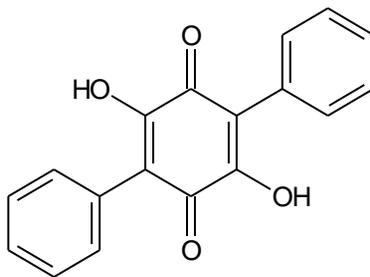
Além da radioterapia e cirurgias, a quimioterapia é comumente utilizada durante o tratamento de câncer. Muitos medicamentos têm sido obtidos de fontes naturais graças à uma grande variedade de estruturas complexas produzidas na natureza. Exemplos são paclitaxel (**8**), isolado de *Taxus brevifolia* utilizado no tratamento de carcinoma urotelial, de câncer de pulmão e mama (VAUGHN, 1999; RANSON & THATCHER, 1999; PEREZ, 1998), vincristina (**9**) e vimblastina (**10**) que são alcalóides isolados de *Vinca rosea* utilizados no tratamento de leucemias, câncer de mama, testículo e pulmão (CRAGG & NEWMAN, 2005). No entanto, a busca de novas drogas antitumorais não está limitada às plantas superiores. Os líquens têm se mostrado como uma fonte promissora de drogas antitumorais (MÜLLER, 2001; BOUSTIE & GRUBE, 2005).



Bézivin e colaboradores (2003) avaliaram extratos de diferentes polaridades obtidos de oito espécies de líquens (*Cladonia convoluta*, *Cladonia rangiformis*, *Evernia prunastri*, *Parmelia caperata*, *Parmelia perlata*, *Platismatia glauca*, *Ramalina cuspidata* e *Usnea rubicunda*) frente a seis linhagens de células tumorais (L1210 – leucemia murino, K562 – leucemia humano, 3LL – carcinoma de pulmão, DU145 – carcinoma de próstata, MCF-7 – adenocarcinoma de mama e U251 - glioblastoma) revelou que apenas três extratos não foram ativos sobre as células avaliadas. Nesse mesmo estudo, 50% dos extratos se mostraram citotóxicos seletivos para células de câncer quando comparados com células normais de rim de macaco. Pereira e colaboradores (1994), avaliaram o efeito das frações acetônica, metanólica e aquosa da partição do extrato éter dietílico de *Usnea fascicata* e verificaram que todas as frações foram ao menos moderadamente ativas contra Sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich implantado em camundongos. Lima e colaboradores (1990) também observaram que extratos brutos de *Cladonia substellata* e *Cladonia verticillaris* inibiram o crescimento de Sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich, *in vivo*.

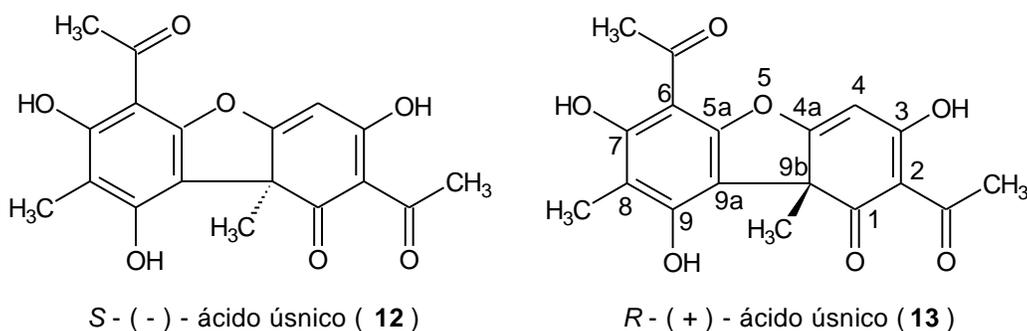
Yamamoto e colaboradores (1995) testaram o extrato acetônico de 29 espécies de líquens (cultura de tecido ou talo) quanto ao seu potencial de inibição do promotor de tumor induzido pelo vírus Epstein-Barr. Mais de 50% dos extratos mostraram uma atividade inibitória maior que o ácido 3-oxoursólico (controle positivo).

A maioria dos estudos com compostos de líquens focalizam nos compostos fenólicos. Cain (1961) investigou a atividade antileucêmica do ácido polipórico (**11**) que se demonstrou ativo em linhagem de leucemia murino L1210. Similarmente, estudos com ácido úsnico em células de leucemia L1210 e P388 e também carcinoma de pulmão de Lewis (este *in vivo*) demonstraram uma inibição quase completa do câncer (TAKAI et al., 1979).



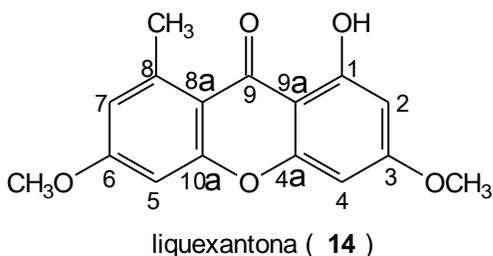
ácido polipórico (**11**)

Dentre os compostos de líquens, o ácido úsnico tem sido o composto mais estudado. Os enantiômeros *S*-(-)-ácido úsnico (**12**) e *R*-(+)-ácido úsnico (**13**) foram os compostos mais ativos na inibição do promotor de tumor induzido pelo vírus Epstein-Barr ($CI_{50} = 5,0 \mu\text{M}$ e $1,0 \mu\text{M}$, respectivamente) (YAMAMOTO et al., 1995). Ambos enantiômeros possuem atividade citotóxica e apoptótica em culturas de células de linfócitos humanos, células de fibroblasto de pulmão de camundongo chinês (V-79) e células epiteliais de carcinoma de pulmão humano (A549) (KOPARAL et al., 2006).

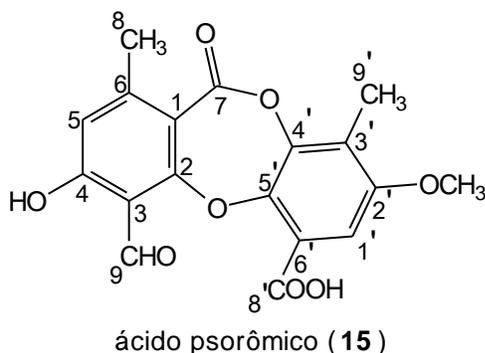


A nanoencapsulação de ácido úsnico proporcionou um efeito citotóxico em células de carcinoma de pulmão humano, bem como em sarcoma-180 de camundongos e linhagens de célula HEp-2 (SANTOS et al, 2005; RIBEIRO-COSTA et al., 2004). Sua atividade também foi demonstrada contra linhagens de células MCF7 de câncer de mama assim como MDA-MB-231 e linhagem de células de câncer de pulmão H1299 (MAYER et al., 2005). Cardarelli e colaboradores (1997) relataram a ação de inibição da mitose promovida pelo ácido úsnico sobre 3 linhagens de células tumorais (leucemia K-562, adenocarcinoma endotelial humano Ishikawa e adenocarcinoma endotelial humano HEC-50). Ação citotóxica moderada foi observada nas linhagens de câncer L1210 (leucemia murino), 3LL (carcinoma de pulmão), DU145 (carcinoma de próstata), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), K-562 (leucemia humano) e U251 (glioblastoma). Na linhagem de leucemia L1210, o ácido úsnico induziu apoptose (BEZIVIN et al., 2004). Kristmundsdóttir e colaboradores (2005) mostraram que o ácido úsnico tem atividade antiproliferativa contra as linhagens de células humanas malignas T-47D (mama), Panc-1 (pâncreas) e PC-3 (próstata).

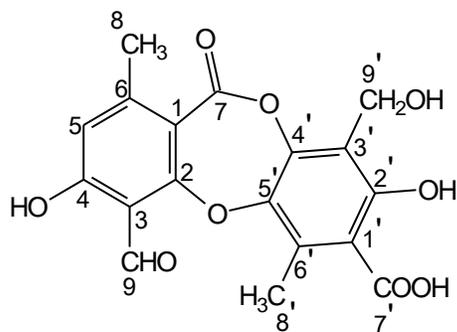
A liquexantona (**14**) é uma xantona rara (RAO et al, 2005). Ensaios antitumorais, *in vivo*, já foram realizados em células MCF-7 (adenocarcinoma de mama), X-17 (carcinoma de rim), HEP-2 (carcinoma de laringe), HEP-G2 (carcinoma de fígado), e LoVo (câncer de cólon), mas não houve citotoxicidade significativa (SUAREZ et al., 2004).



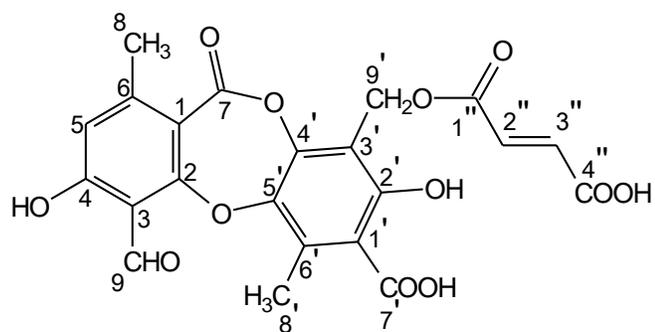
A depsidona, ácido psorômico (**15**), até o momento, foi pouco estudada. Sabe-se da sua atividade apoptótica significativa e que é efetiva ao inibir carcinoma de Ehrlich e sarcoma 180 *in vitro* e *in vivo*, mas sarcoma de Yoshida somente *in vitro*. A depsidona não demonstrou ser tóxica quando administrada cronicamente em camundongos, mas mostrou-se ser hemolítica contra sangue de coelhos (CORRECHE et al., 2004; NAKAZAWA et al., 1962).



Poucos estudos se têm sobre as atividades biológicas da depsidona ácido protocetrário (**16**). Sabe-se que ela inibe em torno de 80% o sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich (SANTOS, 1996) enquanto que seu derivado, ácido fumarprotocetrário (**17**) inibiu aproximadamente 40% o crescimento de ambos tumores (SANTOS, 1996).

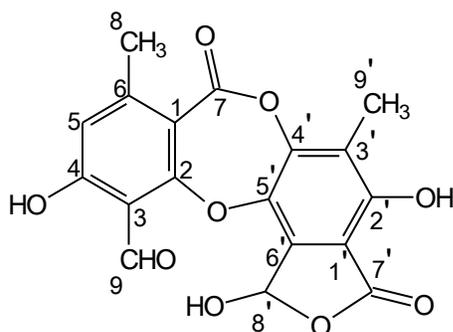


ácido protocetrário (16)



ácido fumarprotocetrário (17)

Nakazawa e colaboradores (1962) testaram o ácido norstético (18) juntamente com outros 32 compostos de líquens contra carcinoma de Ehrlich, sarcoma 180 e sarcoma de Yoshida, mas não foi ativo juntamente com outros 16 compostos. O composto mais ativo foi o ácido psorômico (15).

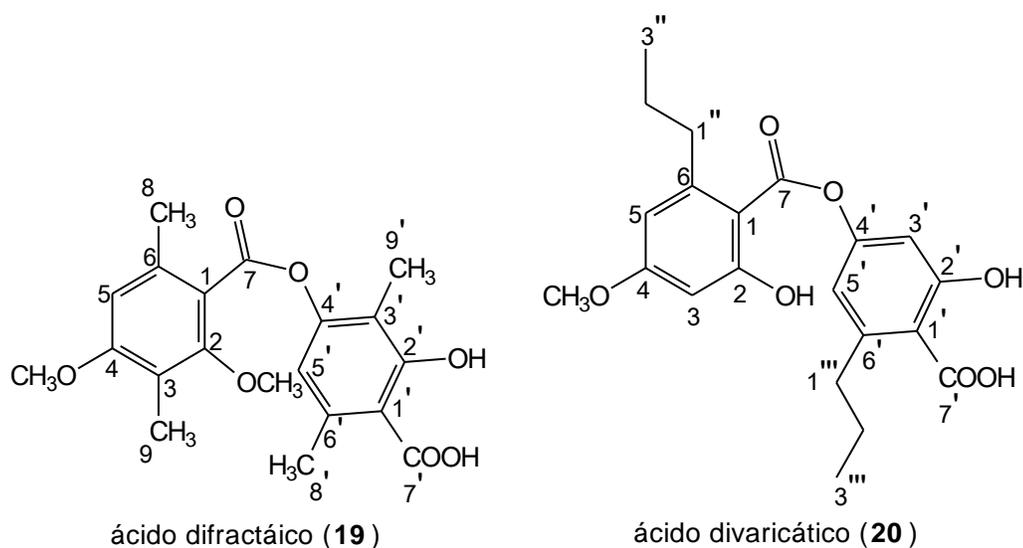


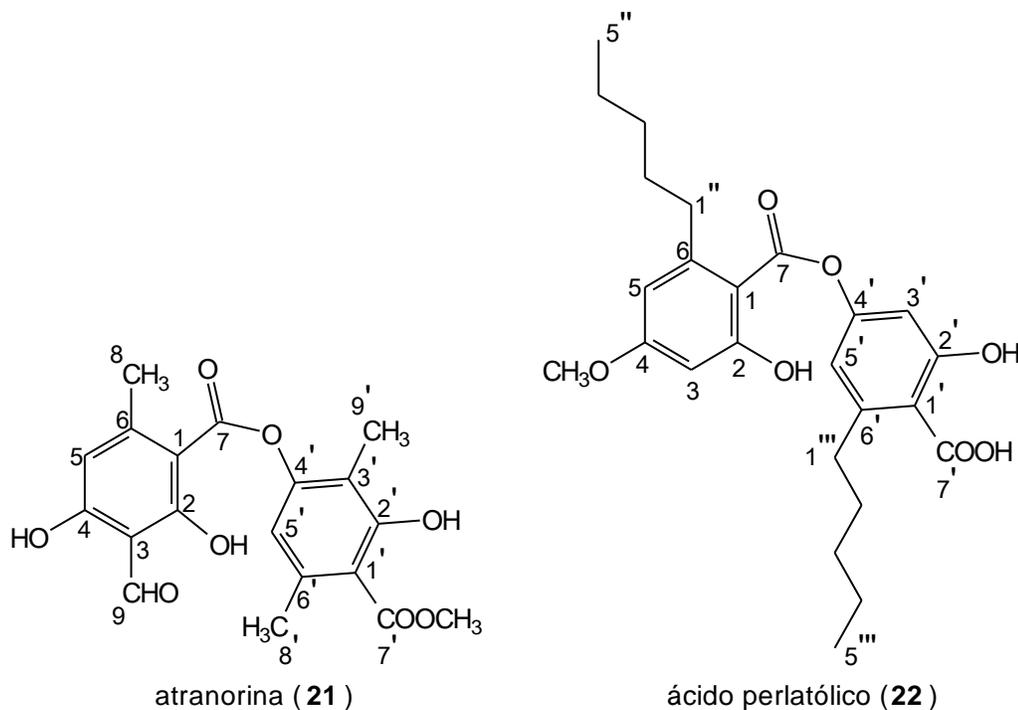
ácido norstético (18)

Além das depsídonas, os depsídeos também são importantes quanto às suas atividades antitumorais. A exemplo disso, estudos com o ácido difractáico (19) mostraram sua atividade inibitória do tumor induzido pelo vírus Epstein-Barr (YAMAMOTO et al., 1995). Ensaio realizado com carcinoma de Ehrlich, sarcoma 180 e sarcoma de Yoshida mostraram que o depsídeo ácido divaricático (20) também possui ação antitumoral, porém é menos ativo que o ácido psorômico (15) (NAKAZAWA et al., 1962). Correche e colaboradores (2004) demonstraram que o ácido divaricático (20) apresenta atividade apoptótica moderada em concentrações consideradas não citotóxica. Este depsídeo aparenta não atuar como protetor de radiação UV (BJERKE et al., 2002). No entanto, *in vivo*, uma

correlação positiva entre a temperatura na pele e fator de proteção solar foi observado mostrando que o ácido divaricático participa como protetor deste tipo de radiação, que é um dos fatores responsáveis por desencadear o câncer de pele (FERNANDES et al., 1996). O depsídeo atranorina (**21**) foi efetivo contra linhagem de células tumorais HL-60 em concentrações de 200 μM inibindo aproximadamente 65% do crescimento (BAČKOROVÁ et al., 2011). Já o ácido perlatólico (**22**), apresentou valores de CI_{50} maior que 25 $\mu\text{g/mL}$ sobre as células tumorais das linhagens MDA/MB-435 (mama-humano), HCT-8 (côlon-humano) e SF-295 (glioblastoma humano) (GIANINI, 2007).

O câncer de pele foi considerado como a epidemia silenciosa do século XX (STRATTON et al., 2000). O aumento intenso da produção de clorofluorcarbonos (CFCs) tem contribuído para o acréscimo da incidência desta doença. O aumento de CFCs na atmosfera tem destruído parte da camada de ozônio elevando assim a penetração de raios ultravioleta (UVR) na atmosfera terrestre. Estes raios, altamente energéticos, geram espécies reativas de oxigênio (ROS) ao entrarem em contato com a pele. ROS pode provocar aproximadamente 35 diferentes adutos no DNA que são potencialmente mutagênicos se não forem reparados pelos mecanismos de supressão tumoral (GARCÍA-BORES & AVILA, 2008).





Apesar da incidência do câncer de pele ser baixa em relação aos outros tipos de câncer, sua taxa de letalidade é alta. O melanoma representa somente 4% dos tipos de cânceres de pele, no entanto é o mais perigoso entre eles já que há um alto risco de ocorrer metástase. Os agentes quimioterápicos utilizados no tratamento deste câncer incluem dacarbazina, temozolomida, nitrosuréias, análogos da platina, as vincas e os taxanos (TOURINHO & BUZAID, 2004). O prognóstico para esta doença tem variado entre 56% à 69% de acordo com o nível sócio-econômico de cada país sendo a quimioterapia um dos tratamentos indicados (INCA, 2007). Dessa forma, o estudo de novos agentes antimelanoma e um melhor entendimento de seu mecanismo de ação torna-se importante na busca de novos medicamentos alternativos para o tratamento de pacientes que sofrem de melanoma.

Estudos já afirmam que distúrbios na produção de melanina podem ser um dos fatores responsáveis pelo aparecimento de melanomas (SONG, 1997). A biossíntese de melanina é realizada por meio da oxidação catalítica do aminoácido tirosina sob ação da enzima tirosinase (OOZEKI et al., 2008). Dentre os diversos compostos fenólicos, alguns apresentaram atividade de inibição da enzima tirosinase, assim como apresentam atividade antitumoral frente a diversas linhagens de células (KINOSHITA et al., 1994;

MATSUBARA et al., 1997; KOPARAL et al., 2006; YAMAMOTO et al., 1995; MAYER et al., 2005; BÉZIVIN et al., 2004; SANTOS, 1996). Considerando que até o momento poucas são as informações existentes sobre a bioatividade de substâncias fenólicas em células de melanoma, o presente trabalho teve como objetivo o isolamento de compostos fenólicos a partir de oito espécies de líquens e a avaliação quanto a atividade sobre a enzima tirosinase e células das linhagens B16 (melanoma murino), UACC (melanoma humano), 3T3 (pulmão murino).

Objetivos

2 - OBJETIVOS

Objetivos Gerais

O presente trabalho visou o isolamento e elucidação de compostos fenólicos de líquens e a avaliação dos mesmos frente à enzima tirosinase e células de melanoma.

Objetivos Específicos

- Isolamento e elucidação estrutural de compostos fenólicos presentes em 8 espécies de líquens.

- Avaliação da atividade de inibição da enzima tirosinase pelas substâncias isoladas.

- Avaliação dos compostos frente à proliferação de células de melanoma B16 (melanoma murino), UACC (melanoma humano) e 3T3 (células normais de pulmão murino).

Parte Experimental

3 - Parte Experimental

3.1 Material Utilizado

Os solventes utilizados para a realização deste trabalho foram das marcas Merck, Synth e Vetec de grau P.A. Todos foram destilados e secos com sulfato de magnésio.

As pesagens foram realizadas em balanças analíticas da marca BIOPRECISA, modelo FA-2104N com precisão $\pm 0,0001$ g e SHIMADZU, modelo AUW220D com precisão $\pm 0,00001$ g. Foi utilizada também balança de precisão da marca MARTE, modelo AS100C com precisão $\pm 0,01$ g.

O ponto de fusão / decomposição foi medido em aparelho UNISCIENCE DO BRASIL modelo 498. A centrífuga utilizada foi da marca FANEM, modelo 206 e o evaporador rotativo, da marca FISATON, modelo 802.

As leituras fotométricas foram realizadas em espectrofotômetro da marca BIOESPECTRO, modelo SP220.

As medidas de rotação óptica foram realizadas em um polarímetro da marca PERKIN ELMER, modelo 341 utilizando caminho óptico de 1,0 decímetro.

Os espectros de RMN foram obtidos em aparelho da marca BRUKER, modelo DPX300, de 7,05 Tesla. Os espectros de hidrogênio foram obtidos utilizando uma frequência de 300 MHz, enquanto que, os espectros de carbono-13, em frequência de 75 MHz.

Os programas computacionais utilizados para análise dos espectros foram TOPSPIN, SPINWORKS, e ACD LABS 6.0. Nas construções de gráficos e para as análises estatísticas foi utilizado o programa ORIGIN 6.0.

Os solventes deuterados utilizados na obtenção dos espectros foram da marca CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES.

As colunas cromatográficas foram preparadas com sílica-gel de 70 - 230 ou 230 - 400 MESH da marca MERCK.

Os eluentes utilizados na cromatografia em camada delgada foram tolueno/acetato de etila/ácido acético (6:4:1 v/v/v) ou hexano/acetato de etila (9:1 v/v). As placas utilizadas

foram da marca MACHEREY-NAGEL G/UV₂₅₄ e MERCK GF₂₅₄ e os reveladores foram Luz U.V. (365 e 254 nm), metanol/ácido sulfúrico e *p*-anisaldeído/ácido sulfúrico.

A enzima tirosinase e L-DOPA foram adquiridos da SIGMA-ALDRICH (enzima lote T3824-50KU/079K7000 com 3933 unidades/mg). A enzima foi mantida a uma temperatura de aproximadamente -10 °C.

A linhagem de células neoplásicas B16-F10 (ATCC – CRL-6322, células de melanoma murino) foi doada pelo Prof. Auro Nomizo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A linhagem UACC-62 (melanoma humano) foi doada pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - UNICAMP) e linhagem de células normais: 3T3 (ATCC –CRL 1658, pulmão murino) foi adquirida do Banco de células do Rio de Janeiro.

3.2 Seleção de Espécies

Os líquens selecionados para a realização deste trabalho foram as espécies: *Parmotrema dilatatum* (Vain.) Hale e *Usnea subcavata* Motyka coletadas no cerrado na região de Piraputanga próxima à cidade de Aquidauana-MS. As espécies *Usnea* sp., *Ramalina* sp., *Cladina confusa* (Sant.) Folmm. & Ahti e *Parmotrema lichexantonicum* Eliasaro & Adler adquiridas em loja de produtos para decoração. A espécie *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. e *Ramalina aspera* Häsänen coletadas em áreas próximas à cidade de Recife-PE pela Profa. Dra. Noemia P. Santos. As espécies foram identificadas pelo Dr. Marcelo Marcelli, Profa. Dra. Mariana Fleig e Profa. Dra. Eugênia Cristina Pereira.

3.3 Preparação das Amostras e Extração dos Compostos Fenólicos

A homogeneidade das amostras para análise química foi garantida mediante observação cuidadosa através de lupa. Após remoção de substratos e outros resíduos que acompanham as amostras, estas foram secas ao ar à temperatura ambiente e em seguida,

trituras em almofariz ou em moinho dependendo da quantidade de material disponível. O pó obtido (10,0 a 60,0 gramas) de cada amostra foi tratado com solventes (hexano, diclorometano, clorofórmio e acetona) à temperatura ambiente de modo exaustivo, ao abrigo da luz. Dependendo da espécie a extração com acetona foi conduzida à temperatura média de 45°C, em banho-maria. Após cada extração, o extrato obtido foi concentrado sob pressão reduzida em rotaevaporador e o processo de extração foi repetido até praticamente não permanecer qualquer resíduo no balão de evaporação, após eliminar todo o solvente.

3.4 Extração e Fracionamento dos Extratos e Identificação das Substâncias

Os extratos concentrados obtidos de cada líquen foram primeiramente avaliados por CCD. Aqueles provenientes da extração com hexano, diclorometano ou clorofórmio, foram fracionados através de cromatografia em coluna em gel de sílica 70-230 ou 230-400 MESH.

U. subcavata – O pó do líquen foi extraído com diclorometano. Após evaporação do solvente em rotaevaporador, o resíduo foi fracionado preliminarmente em coluna de gel de sílica (70-230 MESH) eluindo-se com diclorometano, clorofórmio, clorofórmio/acetona e acetona. As frações resultantes da eluição com clorofórmio foram reunidas, concentradas e novamente cromatografadas em gel de sílica. A eluição foi conduzida com gradiente crescente de polaridade, usando clorofórmio/acetona. As frações eluídas com clorofórmio/acetona 40% foram reunidas e à elas atribuída o código US01.

As frações resultantes da eluição com clorofórmio/acetona 50% (referente ao primeiro fracionamento) foram reunidas, concentradas e novamente cromatografadas em gel de sílica, e a eluição foi conduzida com clorofórmio e gradiente clorofórmio/acetona e acetona. As frações eluídas com clorofórmio/acetona 2% apresentaram uma substância (cristais incolores), que foi purificada por cristalizações sucessivas com clorofórmio/acetona. Essa substância foi codificada US02.

P. dilatatum – Os extratos de diclorometano reunidos, após evaporação, foi fracionado em gel de sílica 70-230 MESH com a mistura hexano/acetato de etila. As

frações eluídas com a mistura contendo 30% de acetato de etila foram reunidas e codificada PD01.

Após a evaporação, o extrato acetônico obtido foi tratado com pequenas porções de acetona gelada e a mistura foi centrifugada a 4.000 rpm. O processo foi repetido até a obtenção de pó isento de pigmentos e codificado PD02.

C. confusa – A extração foi conduzida de modo exaustivo com hexano, à temperatura de 35-40°C em banho-maria. Os extratos foram reunidos e após evaporação do solvente em rotaevaporador, o resíduo foi fracionado em coluna de sílica gel (230-400 MESH). A eluição foi feita inicialmente com hexano, seguindo com o aumento gradativo de polaridade com diclorometano. As frações coletadas, após evaporação do solvente foram cromatografadas em CCD de sílica gel e aquelas contendo o mesmo perfil foram reunidas. Destas reuniões, uma apresentou uma única mancha na cromatografia em CCD. Essa substância foi codificada CC01.

P. lichexanthonicum - O líquen *Parmotrema lichexanthonicum*, foi submetido a extrações exaustivas com clorofórmio e, posteriormente, com acetona, em banho-maria com temperatura aproximada de 40°C, obtendo-se, após evaporação do solvente em evaporador rotativo, o extrato clorofórmico e o extrato acetônico concentrados.

Extrato clorofórmico – Foi purificado com a adição de pequenas porções de CHCl_3 gelado e centrifugado, obtendo-se um pó amarelo (precipitado) codificado PL01.

R. aspera – A extração foi conduzida de modo exaustivo, primeiramente com hexano e em seguida com acetona à temperatura ambiente (28 a 30 °C) e os extratos concentrados em rotaevaporador. Os extratos apresentaram perfil cromatográfico semelhantes e foram reunidos e submetidos ao fracionamento em coluna contendo gel de sílica 70-230 mesh. Os eluentes utilizados foram hexano e acetato de etila em gradiente de polaridade crescente e as frações coletadas foram concentradas e cromatografadas em camada delgada de sílica-gel. As frações que apresentaram o mesmo perfis cromatográfico foram reunidas. Em seguida, algumas frações foram tratadas com diclorometano:hexano (1:2 v/v) gelado. Após a purificação, elas foram reunidas e a fração resultante codificada como RA01.

3.5 Tratamento do Extrato Acetônico Concentrado dos Líquens – *Usnea* sp., *P. dilatatum*, *C. verticillaris* e *Ramalina* sp.

Após a evaporação do extrato acetônico obtido, o sólido foi tratado com pequenas porções de acetona gelada e a mistura centrifugada a 4.000 rpm. O processo se repetiu até a obtenção do precipitado isento de pigmentos e codificado como U03 (*Usnea* sp.), PD02 (*P. dilatatum*), CV01 (*C. verticillaris*) e R01 (*Ramalina* sp.).

Os compostos foram identificados preliminarmente por CCD em sílica gel no eluente tolueno/acetato de etila/ácido acético (6:4:1 v/v/v) juntamente com padrões de compostos já isolados previamente no laboratório. O ponto de fusão dos compostos foi determinado e as estruturas confirmadas através de seus dados espectrais de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais).

3.6 Ensaio Enzimáticos

Ensaio de Bioautografia (Método de WANGTHONG et al., 2007 modificado)

Para avaliar, preliminarmente, o potencial de inibição dos compostos isolados *R*-(+)-ácido úsnico (**13**), liquexantona (**14**), ácido psorômico (**15**), ácido protocetrário (**16**), ácido fumarprotocetrário (**17**), ácido norstítico (**18**), ácido difractáico (**19**), ácido divaricático (**20**), atranorina (**21**) e o ácido perlatólico (**22**) frente à enzima tirosinase, os mesmos foram submetidos a um ensaio de bioautografia semiquantitativo. Uma placa de sílica gel de 20,0 cm² foi previamente tamponada com tampão fosfato (0,1 M, pH 5,0). 10 µL da solução de cada composto (em acetona ou diclorometano) foram aplicados na placa de forma que as massas depositadas variaram de 0,6 a 15,0 µg. Após a evaporação completa dos solventes, 9,0 mL de solução de tirosinase (75 mg/L) foi aplicada à placa. Após 5 minutos, foi aplicado 9,0 mL de solução de L-DOPA (2,0 g/L). A solução da enzima foi preparada em tampão fosfato 66,7 mM pH 6,8 e a solução de L-DOPA, em água destilada.

Após aplicar L-DOPA, a placa foi observada até que não ocorresse mais variação visual. O aparecimento de manchas claras indica a inibição, promovida pelo composto, da enzima tirosinase.

A atividade da enzima foi calculada por meio do gráfico de Lineweaver-Burk (COPELAND, 2005).

Os compostos mais ativos foram submetidos a um ensaio de solubilidade para avaliar a viabilidade em realizar ensaios quantitativos de cinética enzimática em solução. Os ácidos fumarprotocetrárico (**17**), protocetrárico (**16**) e psorômico (**15**) foram suficientemente solúveis em tampão fosfato 66,7 mM, pH 6,8 contendo 10% de DMSO.

Ensaio em Solução

Padronização da Técnica

Ensaio foram realizados variando a concentração da enzima e a concentração do substrato (L-DOPA) com a finalidade de definir as melhores concentrações, bem como o tempo de reação necessário para avaliar o poder de modulação enzimática dos ácidos fumarprotocetrárico, protocetrárico e psorômico mantendo a faixa de absorvância de 0,100 a 0,700.

Avaliação da Atividade de Inibição

O efeito dos ácidos psorômico (**15**) protocetrárico (**16**) e fumarprotocetrárico (**17**), na reação de oxidação de L-DOPA catalisada pela enzima tirosinase foi determinado da seguinte forma: 1,7 mL de solução dos compostos (em tampão fosfato 66,7 mM pH 6,8 com 10% DMSO) foi combinado com 0,1 mL de tirosinase (40 mg/L em tampão fosfato 66,7 mM pH 6,8). Após incubação durante 10 minutos na ausência de luz à temperatura ambiente (de 28 a 30 °C) foi adicionado 0,2 mL de solução aquosa de L-DOPA. As concentrações dos compostos **15**, **16** e **17** no sistema reacional variaram de 0,050 a 0,600

mM e de L-DOPA, de 0,1 a 0,6 mM. A análise foi feita em triplicata e a reação foi monitorada pelo aumento da absorbância em 475 nm, acompanhando a oxidação de substratos a produtos (dopacromo) com coeficiente de absorção molar de $3.700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (JIMÉNEZ et al., 2001), por 5 minutos à temperatura ambiente. O branco utilizado nos ensaios foi 1,7 mL de solução tampão contendo 10% de DMSO (ausência dos compostos) acrescido de 0,2 mL de solução aquosa de L-DOPA e 0,1 mL de solução de enzima. A atividade da enzima foi calculada a partir do ensaio com o branco e a concentração de 0,6 mM de L-DOPA em um intervalo de 5 minutos.

As percentagens de inibição ou ativação foram calculadas para os ensaios utilizando a fórmula:

$$\%I = (B - A) / B * 100$$

Onde **B** = absorbância em 475 nm do branco e **A** = absorbância em 475 nm da amostra.

As concentrações de produto formado foram calculadas utilizando a fórmula:

$$C = (A / \epsilon \cdot l) * 10^6$$

Onde **C** = Concentração de produto (dopacromo) formado (μM), ϵ = absorvidade molar do dopacromo ($3.700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e **l** = largura da cubeta (1,0 cm). (JIMÉNEZ et al., 2001).

Os gráficos foram construídos e as análises estatísticas realizadas utilizando o programa Origin 6.0. Os resultados foram considerados satisfatórios para análise quando os gráficos obtidos apresentaram regressão linear (R^2) acima de 0,99; desvio padrão (SD) menor que 0,01 e significância estatística (P) menor que 0,0001.

3.7 Ensaios com Células de Melanoma

A avaliação da atividade citotóxica foi realizada em cultivo da linhagem de células neoplásicas de melanoma (B16 e UACC), assim como células normais de pulmão murino

(3T3). As linhagens foram mantidas em meio completo em incubadora de CO₂, até o crescimento exponencial, sendo divididas em alíquotas, mantidas durante 24h a -86°C para congelamento gradual e transferidas para container de nitrogênio líquido (-196°C) para estocagem. Para os testes foram descongeladas rapidamente a 37 °C até o seu crescimento.

Preparo da Suspensão de Células

As células foram cultivadas em frascos estéreis na presença de Meio RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50 µg/mL de gentamicina de meio Schering-Plough (meio completo).

A seguir foram mantidas em incubadora a 37 °C em atmosfera úmida contendo CO₂ (5%). Uma vez que estas células são aderentes, a sua remoção foi feita com solução de tripsina (0,25% + EDTA 1mM) em tampão PBS pH 7,4. Em seguida, foram transferidas para tubos cônicos contendo meio de cultura completo e centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos. O meio com a tripsina foi desprezado e as células ressuspensas em pequeno volume de meio completo (FRESHNEY, 2005).

Teste de Citotoxicidade

O teste adotado baseia-se na coloração das proteínas pelo corante sulforrodamina B (SRB). Este corante possui dois grupos sulfônicos, e liga-se às proteínas previamente precipitadas pelo ácido tricloroacético (TCA) das células fixadas na placa. A dissolução do corante é realizada com Tris Base 10 mM e a leitura da absorbância realizada em leitor de microplacas a 540 nm (SKEHAN et al., 1990).

A contagem foi feita com uma alíquota dessas células em câmara de Neubauer para que em cada cavidade da placa de 96 poços fosse depositado um volume de 100 µL de meio contendo 10.000 células (100.000 células / mL). A placa de 96 poços foi mantida na incubadora por 24 horas. Em seguida foi adicionado um volume de 100 µL contendo as amostras-teste dissolvidas em DMSO de forma que a concentração final do solvente não

excedesse 0,4%. Foram utilizadas 4 concentrações de cada amostra (0,25; 2,50; 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$), sendo cada concentração adicionada em 3 cavidades (triplicata). No controle negativo, as células foram crescidas em 100 μL de meio, sendo adicionados após 24h, o volume de 100 μL de meio contendo DMSO em concentração de no máximo 0,4%. No branco, foram adicionados os mesmos volumes de meio e DMSO presentes no controle negativo, porém sem a presença de células. No branco da amostra foram utilizadas as mesmas concentrações, porém sem a presença de células. A placa de 96 poços foi então mantida por mais 48 horas na incubadora.

Ao final de 48 horas, o meio foi removido e substituído por 100 μL de ácido tricloroacético (TCA) 20%. A placa foi incubada por 30 minutos, a 4 °C em geladeira e posteriormente a solução de TCA foi removida e as placas lavadas 5 vezes com água corrente e seca. Em seguida, 50 μL de SRB 0,1% (diluída em ácido acético 1%) nas cavidades e novamente foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Após a remoção da solução de SRB, lavagem por 4 vezes com ácido acético 1% para retirada do excesso de corante e secas, o corante ligado às proteínas de membrana das células fixadas foi então dissolvido com Tris Base 10 mM (Sigma). Após agitação durante 10 minutos, foi determinada a absorbância a 540 nm. Foram realizados três experimentos independentes.

Foram obtidas as absorbâncias: amostras-teste (T), controle negativo (CN), branco das amostras-teste (B) e a leitura do início da incubação, ou seja, antes da adição das amostras-teste (T0). Em todos os experimentos foi incluído um controle positivo, doxorubicina.

A concentração necessária para inibir 50 % do crescimento (CI_{50}) foi calculada utilizando-se as fórmulas segundo Monks e colaboradores (1991). A dose que inibe 50% do crescimento celular (CI_{50}) foi determinada graficamente utilizando o programa Origin 6.0.

O Índice de Seletividade (IS) corresponde ao quociente entre o valor da CI_{50} de cada amostra-teste na linhagem de células normais 3T3 e o valor da CI_{50} de cada composto nas linhagens de células neoplásicas.

Resultados e Discussão

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das oito espécies de líquens selecionadas para a realização deste trabalho isolou-se dez compostos. A estrutura de cada composto foi confirmada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear. A **tabela 1** lista os líquens analisados, o código das frações isoladas e o nome dos compostos.

Tabela 1 – Nome do líquen, código da fração e composto identificado.

Nome do Líquen	Código da Fração	Composto Identificado
<i>Usnea subcavata</i> Motyka	US01	R-(+)-ácido úsnico (13)
	US02	ácido difractáico (19)
<i>Parmotrema lichexanthonicum</i> Eliasaro & Adler	PL01	liquexantona (14)
	U03	ácido psorômico (15)
<i>Parmotrema dilatatum</i> (Vain.) Hale	PD01	atranorina (21)
	PD02	ácido protocetrárico (16)
<i>Cladonia verticillaris</i> (Raddi) Fr	CV01	ácido fumarprotocetrárico (17)
<i>Ramalina</i> sp	R01	ácido norstítico (18)
<i>Ramalina aspera</i> Häsänen	RA01	ácido divaricático (20)
<i>Cladina confusa</i> (Sant.) Folmm. & Ahti	CC01	ácido perlatólico (22)

A cor, a rotação óptica e o ponto de fusão dos compostos identificados estão listados na **tabela 2**.

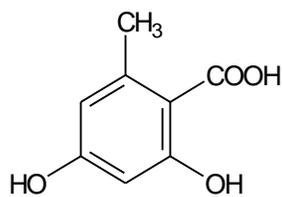
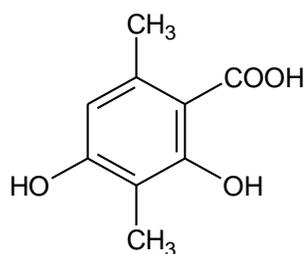
Tabela 2 – Cor, rotação óptica e ponto de fusão dos compostos identificados.

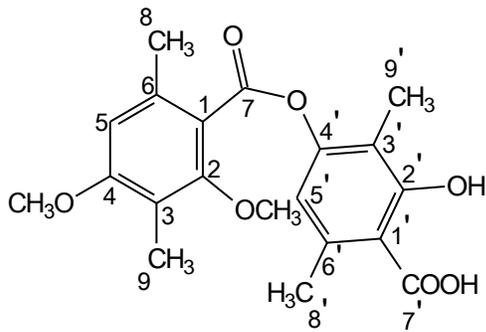
Composto identificado	P.F. (°C)	Rotação Óptica [α] _D	Cor
<i>R</i> -(+)-ácido úsnico (13)	204	502	cristais amarelados
liquexantona (14)	189	-	cristais amarelados
ácido psorômico (15)	246 (decomp.)	-	pó branco amorfo
ácido protocetrário (16)	244 (decomp.)	-	pó branco amorfo
ácido fumarprotocetrário (17)	287 (decomp.)	-	pó branco amorfo
ácido norstítico (18)	285 (decomp.)	-	pó branco amorfo
ácido difractáico (19)	199	-	pó branco amorfo
ácido divaricático (20)	137	-	pó branco amorfo
atranorina (21)	196 (decomp.)	-	pó branco amorfo
ácido perlatólico (22)	106	-	pó branco amorfo

4.1 Confirmação Estrutural

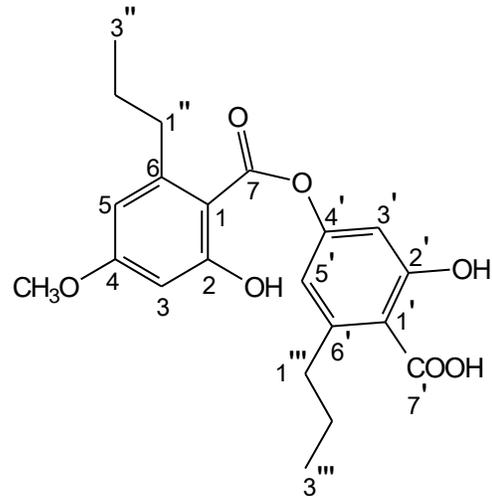
Depsídeos

De um total de dez substâncias isoladas, quatro são da classe dos depsídeos – os ácidos divaricático e perlatólico são derivados do ácido orselínico (**23**), o ácido difractáico e atranorina derivam do ácido β -metil-orselínico (**24**).

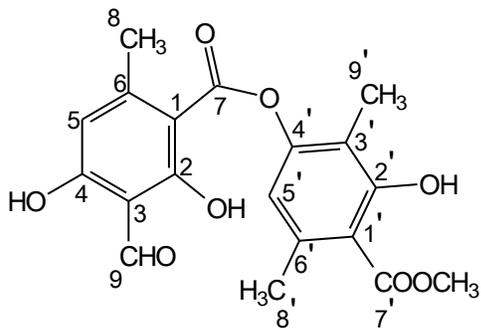
ácido orselínico (**23**)ácido β -metil-orselínico (**24**)



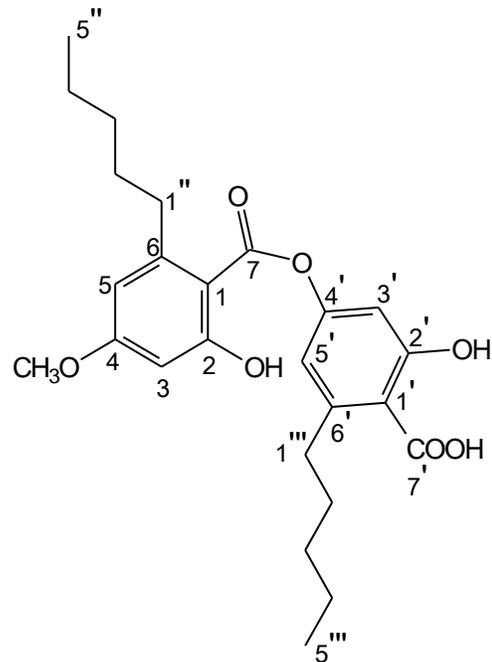
ácido difractáico (19)



ácido divaricático (20)



atranorina (21)



ácido perlatólico (22)

Os espectros de hidrogênio (**Espectros 1a, 2a, 3a e 4a**) dos depsídeos atranorina (**21**) e ácidos difractáico (**19**), divaricático (**20**) e perlatólico (**22**) apresentam algumas similaridades. Os depsídeos derivados do ácido β -metil-orselínico (**24**) (ácido difractáico e atranorina) apresentam dois singletes na região de hidrogênio de anel aromático (referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos 5 e 5'). Além disso, ambos compostos possuem metilas ligadas ao anel aromático que geram singletes entre 2,09 e 2,67 ppm. Os sinais (singletes) das metoxilas do ácido difractáico estão presentes em 3,83 e 3,89 ppm e o sinal do ester metílico da atranorina, em 3,96 ppm. Os singletes em 11,95; 12,49 e 12,53 ppm correspondem a hidrogênios dos grupos fenólicos da atranorina o hidrogênio aldeídico deste composto gera um singlete em 10,33 ppm.

Os depsídeos derivados do ácido orsenílico (**23**) (ácidos divaricático e perlatólico), por outro lado, apresentam dupletes na região de hidrogênios de anel aromático. Isto ocorre devido ao acoplamento meta entre os hidrogênios dos carbonos 3 com 5 e 3' com 5' (e vice versa). Os hidrogênios dos carbonos 3 e 5 do ácido perlatólico aparecem como um singlete largo no espectro em 6,36 ppm devido à sobreposição espectral entre eles. Os singletes dos hidrogênios das metoxilas aparecem em 3,82 e 3,86 ppm para os ácidos divaricático e perlatólico, respectivamente. Ambos compostos possuem duas cadeias alquílicas ligadas aos anéis aromáticos. Os hidrogênios ligados aos carbonos terminais das cadeias alquílicas justificam os sinais entre 0,85 e 1,00 ppm. Os hidrogênios referentes ao carbono mais próximo ao anel justificam os sinais entre 2,91 e 3,04 ppm. Os hidrogênios ligados aos carbonos em posição intermediária das cadeias alquílicas justificam sinais entre 1,23 e 2,46 ppm.

Os espectros de ^{13}C (DEPT-135) (**Espectros 1b e 2b**) dos depsídeos atranorina e ácido difractáico apresentam semelhanças entre si. Os sinais de carbono entre 9,1 e 25,6 ppm confirmam a presença das metilas ligadas ao anel aromático presentes em ambos compostos. As metoxilas do ácido difractáico podem ser confirmadas pelos sinais de CH_3 em 56,2 e 62,3 ppm e os carbonos terciários (CH) de anel aromático podem ser confirmados pelos sinais entre 109,1 e 117,1 ppm. Os sinais de carbonos terciários de anel aromático da atranorina também são confirmados em 112,8 e 116,0 ppm. O carbono aldeídico da atranorina apresenta um sinal (de CH) em 193,8 ppm e o sinal do ester metílico, em 52,3 ppm.

Já os espectros de ^{13}C (DEPT-135) (**Espectros 3b e 4b**) dos depsídeos ácido divaricático e perlatólico apresentam um número maior de sinais. Isto ocorre devido à cadeia alquílica (sinais de CH_3 e CH_2) entre 14,0 e 39,3 ppm. Estes compostos possuem também quatro carbonos aromáticos terciários cada um, justificando assim 4 sinais no espectro entre 99,0 e 116,6 ppm. O sinal do carbono da metoxila é observado em 55,4 ppm (ácido perlatólico) e 55,9 ppm (ácido divaricático).

Os sinais de ^{13}C (**Espectros 1c, 2c, 3c e 4c**) que não foram observados no experimento de DEPT-135, foram atribuídos como carbonos quaternários. Os sinais entre 99,9 e 169,1 ppm são referentes aos carbonos dos anéis aromáticos. Os substituintes mais eletronegativos (metoxila e fenol) ligados aos carbonos do anel justificam os sinais destes carbonos em torno de 160 ppm. Os carbonos do anel que estão em posição *orto* ou *para* à grupos retiradores de elétrons (aldeído, ácido carboxílico e ester) justificam sinais na região de 140, e os carbonos do anel que estão em posição *orto* ou *para* à grupos doadores de elétrons (metoxila ou hidroxila fenólica) justificam os sinais na região de 110 ppm. A presença e a posição destes grupos funcionais nos depsídeos foram confirmadas por experimentos de correlação carbono - hidrogênio gHSQC e gHMBC (**Espectros 1d, 1e, 2d, 2e₁, 2e₂, 3d, 3e, 4d, 4e₁ e 4e₂**). Os dados espectrais de ^1H e ^{13}C e suas correlações nos experimentos de gHSQC e gHMBC dos depsídeos estão apresentados nas **tabelas 3, 4, 5, 6**.

Através dos dados apresentados, foram confirmadas as estruturas dos depsídeos atranorina (**21**) e dos ácidos difractáico (**19**), divaricático (**20**) e perlatólico (**22**). Estes dados estão de acordo com aqueles já reportados na literatura (SUNDHOLM & HUNECK, 1981; KÖNIG & WRIGHT, 1999; GIANINI, 2007).

Tabela 3 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido difractáico.

Posições	$\delta ^1\text{H}$ – ppm	$\delta ^{13}\text{C}$ – ppm	DEPT-135	gHSQC	gHMBC
C	(multiplicidade)				
1	-	120,9	C	-	-
2	-	157,8	C	-	-
3	-	117,8	C	-	-
4	-	160,9	C	-	-
5	6,75 (s)	109,1	CH	109,1	19,9/ 117,8/ 120,9/ 160,9
6	-	136,0	C	-	-
7	-	166,4	C	-	-
8	2,44 (s)	19,9	CH ₃	19,9	109,1/ 136,0/ 120,9
9	2,13 (s)	9,0	CH ₃	9,0	117,8/ 157,8/ 160,9
1'	-	117,4	C	-	-
2'	-	164,0	C	-	-
3'	-	110,3	C	-	-
4'	-	154,4	C	-	-
5'	6,67 (s)	117,1	CH	117,1	23,9/ 117,1/ 117,4
6'	-	141,0	C	-	-
7'	-	174,3	C	-	-
8'	2,61 (s)	23,9	CH ₃	23,9	110,3/ 117,4/ 141,0
9'	2,13 (s)	9,3	CH ₃	9,3	154,6/ 164,0
2-OCH ₃	3,83 (s)	62,3	CH ₃	62,3	157,8
4-OCH ₃	3,89 (s)	56,9	CH ₃	56,9	160,9

Solvente utilizado: acetona-d₆; RMN ^{13}C (75MHz); RMN ^1H (300MHz); s = singlete.

Tabela 4 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do depsídeo atranorina.

Posições C	δ ^1H – ppm (multiplicidade)	δ ^{13}C – ppm	DEPT-135	gHSQC	gHMBC
1	-	102,8	C	-	-
2	-	169,1	C	-	-
3	-	108,5	C	-	-
4	-	167,4	C	-	-
5	6,38 (s)	112,8	CH	112,8	25,6/ 102,8/ 108,5/ 167,4
6	-	152,4	C	-	-
7	-	169,7	C	-	-
8	2,67 (s)	25,6	CH ₃	25,6	102,8/ 112,8/ 152,4
9	10,33 (s)	193,8	CH	193,8	167,4
1'	-	116,8	C	-	-
2'	-	162,9	C	-	-
3'	-	110,2	C	-	-
4'	-	151,9	C	-	-
5'	6,50 (s)	116,0	CH	116,0	24,0/ 110,2/ 116,8/ 151,9
6'	-	139,9	C	-	-
7'	-	172,2	C	-	-
8'	2,52 (s)	24,0	CH ₃	24,0	110,2/ 116,0/ 139,9
9'	2,09 (s)	9,3	CH ₃	9,3	110,2/ 116,8/ 139,9/ 151,9/ 162,6
7'-OCH ₃	3,96 (s)	52,3	CH ₃	52,3	172,2
2-OH	12,49 (s)	-	-	-	102,8/ 108,5/ 169,1
4-OH	12,53 (s)	-	-	-	108,5/ 112,8/ 167,4
2'-OH	11,95 (s)	-	-	-	116,8/ 162,9/ 110,2

Solvente utilizado: DMSO-d₆; RMN ^{13}C (75MHz); RMN ^1H (300MHz); s = singleto.

Tabela 5 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido divaricático.

Posições	$\delta ^1\text{H}$ – ppm	$\delta ^{13}\text{C}$ – ppm	DEPT-135	gHSQC	gHMBC
C	(multiplicidade)				
1	-	105,4	C	-	-
2	-	166,4	C	-	-
3	6,41 (d, J-2,5 Hz)	99,9	CH	99,9	105,4/ 111,6/ 165,6/ 166,4
4	-	165,6	C	-	-
5	6,46 (d, J-2,5 Hz)	111,6	CH	111,6	39,3/ 99,9/ 105,4/ 165,6
6	-	148,6 ou 149,1	C	-	-
7	-	169,9	C	-	-
1'	-	111,2	C	-	-
2'	-	165,2	C	-	-
3'	6,79 (d, J-2,3 Hz)	109,3	CH	109,3	111,2/ 116,6/ 155,0/ 165,2
4'	-	155,0	C	-	-
5'	6,77 (d, J-2,3 Hz)	116,6	CH	116,6	109,3/ 111,2/ 155,0
6'	-	148,6 ou 149,1	C	-	-
7'	-	173,3	C	-	-
1''	2,93 - 3,00 (m)	39,3	CH ₂	39,3	105,4/ 111,6
2''	1,61 - 1,77 (m)	25,7 ou 25,9	CH ₂	25,7/ 25,9	14,4/ 14,5/ 38,7/ 39,3/ 148,6/ 149,1
3''	0,93 - 1,00 (m)	14,4 ou 14,5	CH ₃	14,4/ 14,5	25,7/ 25,9/ 38,7/ 39,3
1'''	3,00 - 3,04 (m)	38,7	CH ₂	38,7	111,2/ 116,6
2'''	1,61 - 1,77 (m)	25,7 ou 25,9	CH ₂	25,7/ 25,9	14,4/ 14,5/ 38,7/ 39,3/ 148,6/ 149,1
3'''	0,93 - 1,00 (m)	14,4 ou 14,5	CH ₃	14,4/ 14,5	25,7/ 25,9/ 38,7/ 39,3
4-OCH ₃	3,86 (s)	55,9	CH ₃	55,9	165,6

Solvente utilizado: acetona-d₆; RMN ^{13}C (75MHz); RMN ^1H (300MHz); s = singlete; d = duplete; m = multiplete; J = Constante de acoplamento (Hz).

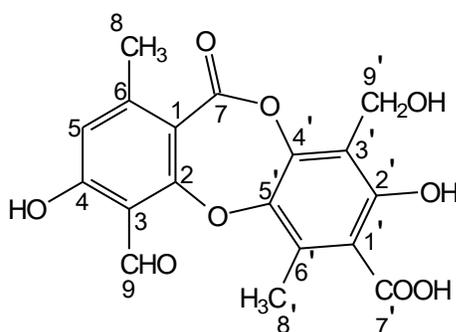
Tabela 6 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido perlatólico.

Posições	$\delta ^1\text{H}$ – ppm	$\delta ^{13}\text{C}$ – ppm	DEPT-135	gHSQC	gHMBC
C	(multiplicidade)				
1	-	103,6	C	-	-
2	-	166,5	C	-	-
3	6,36 (sl)	99,0	CH	99,0	37,2/ 99,0/ 103,6/ 164,9/ 111,4/ 166,5
4	-	164,9	C	-	-
5	6,36 (sl)	111,4	CH	111,4	37,2/ 99,0/ 103,6/ 164,9/ 111,4/ 166,5
6	-	148,4	C	-	-
7	-	169,4	C	-	-
1'	-	108,9	C	-	-
2'	-	165,2	C	-	-
3'	6,73 (d, J 2,2 Hz)	108,9	CH	108,9	108,9/ 116,1/ 154,9/ 165,2
4'	-	154,9	C	-	-
5'	6,61(d, J 2,2 Hz)	116,1	CH	116,1	36,5/ 108,9/ 154,9
6'	-	149,9	C	-	-
7'	-	174,9	C	-	-
1''	2,91 – 2,96 (m)	37,2	CH ₂	37,2	31,91/ 31,99/ 103,6/ 111,4/ 148,4
2''	1,23 – 1,62 (m)	31,91 ou 31,99	CH ₂	31,91/ 31,99	29,7/ 31,3/ 36,5/ 37,2
3''	1,23 – 1,62 (m)	29,7 ou 31,3	CH ₂	29,7/ 31,3	29,7/ 31,3/ 36,5/ 37,2
4''	1,23 – 1,62 (m)	22,4 ou 22,6	CH ₂	22,4/ 22,6	29,7/ 31,3/ 36,5/ 37,2
5''	0,83 – 0,91 (m)	14,0	CH ₃	14,0	29,7/ 31,3/ 36,5/ 37,2
1'''	2,96 – 3,01 (m)	36,5	CH ₂	36,5	31,91/ 31,99/ 108,9/ 116,1/ 149,3
2'''	1,23 – 1,62 (m)	31,91 ou 31,99	CH ₂	31,91/ 31,99	29,7/ 31,3/ 36,5/ 37,2
3'''	1,23 – 1,62 (m)	29,7 ou 31,3	CH ₂	29,7/ 31,3	29,7/ 31,3/ 36,5/ 37,2
4'''	1,23 – 1,62 (m)	22,4 ou 22,6	CH ₂	22,4/ 22,6	29,7/ 31,3/ 36,5/ 37,2
5'''	0,83 – 0,91 (m)	14,0	CH ₃	14,0	29,7/ 31,3/ 36,5/ 37,2
4-OCH ₃	3,82 (s)	55,4	CH ₃	55,4	164,9

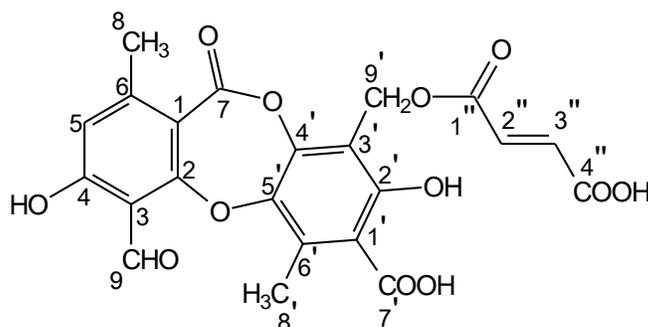
Solvente utilizado: CDCl₃; RMN ^{13}C (75MHz); RMN ^1H (300MHz); s = singleto; sl = singleto largo; d = duplete; m = multiplete; J = Constante de acoplamento (Hz).

Depsidonas

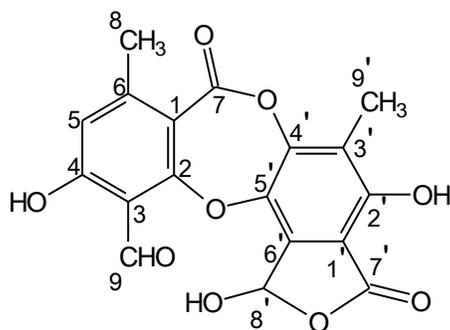
De um total de dez substâncias isoladas, quatro são da classe das depsidonas: os ácidos protocetrário, fumarprotocetrário, norstítico e psorômico.



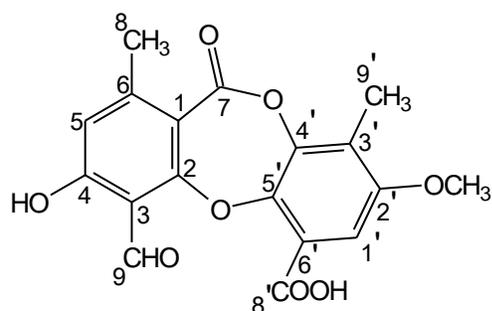
ácido protocetrário (16)



ácido fumarprotocetrário (17)



ácido norstítico (18)



ácido psorômico (15)

Os espectros de hidrogênio (**Espectros 5a, 6a, 7a e 8a**) das depsidonas, ácidos protocetrário (**16**), fumarprotocetrário (**17**), norstítico (**15**) e psorômico (**18**) possuem diversas semelhanças. Nestes espectros há a presença de dois singletes entre 2,20 e 2,46 ppm que são atribuídos aos hidrogênios das metilas 8 e 8' dos ácidos protocetrário e fumarprotocetrário e das metila 8 e 9' dos ácidos norstítico e psorômico. Outra semelhança nos espectros é a presença de um singlete entre 6,63 e 6,87 ppm. Este sinal, característico de hidrogênio ligado a anel aromático, pertence ao hidrogênio ligado ao C-5 dos respectivos ácidos. Além deste sinal, o ácido psorômico apresenta mais um singlete em 7,10 ppm referente ao hidrogênio ligado ao C-1'. Todas as depsidonas em questão também apresentam um singlete entre 10,45 e 10,56 ppm típica de hidrogênio de aldeído e um singlete entre 11,95 e 12,15 ppm de hidroxila fenólica.

O ácido protocetrário e fumarprotocetrário diferem entre si, no espectro de hidrogênio, pela presença de um singlete (referente a dois hidrogênios sobrepostos) em 6,64 ppm atribuído aos hidrogênios do C-2'' e C-3'' do grupo fumarato no ácido fumarprotocetrário. Além desta diferença, o singlete referente a dois hidrogênios ligados ao C-9' possuem deslocamentos químicos diferentes. No ácido fumarprotocetrário, este sinal encontra-se em 5,29 ppm e no ácido protocetrário, em 4,60.

Esta diferença se deve à esterificação com o grupo fumarato que desprotege os hidrogênios do C-9' do ácido fumarprotocetrário devido ao efeito retirador de elétrons exercido pela carbonila (C-1'').

No espectro de hidrogênio do ácido norstítico, há a presença de um duplete ($J = 7,5$ Hz) em 6,78 ppm referente ao hidrogênio do C-8' que se acopla com o H da hidroxila (C8'-OH) em 8,30 ppm (d, $J = 7,5$ Hz).

O ácido psorômico possui uma metoxila ligada ao anel aromático. O singlete referente aos três hidrogênios desta metoxila aparece em 3,84 ppm no espectro.

Os espectros de ^{13}C (DEPT-135) (**Espectros 5b, 6b, 7b e 8b**) das depsidonas em estudo também apresentam semelhanças entre eles. Há dois sinais de CH_3 entre 9,6 e 21,7 ppm referente aos carbonos das metilas 8 e 8' dos ácidos protocetrário e fumarprotocetrário e 8 e 9' dos ácidos norstítico e psorômico, um sinal de CH em aproximadamente 117 ppm referente ao C-5, além da presença de um sinal de CH entre 191,7 e 194,2 ppm referente ao carbono do aldeído presente nas depsidonas.

O ácido psorômico difere dos demais, no espectro de ^{13}C (DEPT-135), pela presença de um sinal de CH_3 em 56,2 ppm referente ao carbono da metoxila e de mais um sinal de CH na região de carbono de anel aromático (107,7 ppm) referente ao C-1'. O espectro de ^{13}C (DEPT-135) do ácido norstítico difere pela presença de um sinal de CH em 95,0 ppm referente ao C-8' do anel lactol.

Há a presença de um sinal de CH_2 no espectro de ^{13}C (DEPT-135) dos ácidos fumarprotocetrário e protocetrário em 52,8 e 57,2 ppm, respectivamente, referente ao C-9'. No ácido fumaprotocetrário, observa-se dois sinais de CH em 132,6 e 135,4 referentes aos carbonos sp^2 do grupo fumarato (C-2'' e C-3'').

Os sinais de ^{13}C (**Espectros 5c, 6c, 7c e 8c**) que não foram observados no experimento de DEPT-135, foram atribuídos como carbonos quaternários. Os sinais entre 107,7 e 166,0 ppm são referentes aos carbonos dos anéis aromáticos. Os substituintes mais eletronegativos (metoxila, fenol, éter) ligados aos carbonos do anel justificam os sinais destes carbonos na região de 160 ppm. Os carbonos do anel que estão em posição *orto* ou *para* à grupos retiradores de elétrons (aldeído, ácido carboxílico e éster) justificam sinais na região de 140 ppm e os carbonos do anel que estão em posição *orto* ou *para* à grupos doadores de elétrons (metoxila ou hidroxila fenólica, éter) justificam sinais na região de 110 ppm. A presença e a posição destes grupos funcionais nas depsidonas foram confirmadas por experimentos de correlação carbono - hidrogênio gHSQC e gHMBC (**Espectros 5d, 5e, 6d, 6e, 7d, 7e, 8d e 8e**). Os dados espectrais de ^1H e ^{13}C e suas correlações nos experimentos de gHSQC e gHMBC das depsidonas estão apresentados nas **tabelas 7, 8, 9 e 10**.

Através dos dados apresentados, confirmamos as estruturas das depsidonas ácidos protocetrário (**16**), fumarprotocetrário (**17**), norstítico (**15**) e psorômico (**18**). Estes dados estão de acordo com aqueles já reportados na literatura (SU et al., 2003; SUNDHOLM & HUNECK, 1981).

Tabela 7 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido protocetrário.

Posições	δ ^1H – ppm	δ ^{13}C – ppm	DEPT-135	gHSQC	gHMBC
C	(multiplicidade)				
1	-	111,8	C	-	-
2	-	163,9	C	-	-
3	-	114,4	C	-	-
4	-	163,8	C	-	-
5	6,83 (s)	117,1	CH	117,1	21,4/ 111,8/ 163,8
6	-	152,0	C	-	-
7	-	161,2	C	-	-
8	2,38 (s)	21,4	CH ₃	21,4	111,8/ 117,1/ 152,0
9	10,57 (s)	191,7	CH	191,7	163,8/ 163,9
1'	-	116,7	C	-	-
2'	-	154,4	C	-	-
3'	-	118,8	C	-	-
4'	-	144,6	C	-	-
5'	-	141,9	C	-	-
6'	-	129,3	C	-	-
7'	-	170,2	C	-	-
8'	2,42 (s)	14,4	CH ₃	14,4	116,7/ 129,3/ 141,9
9'	4,60 (s)	52,8	CH ₂	52,8	118,8/ 144,6/ 154,4
-OH	11,95 (s)	-	-	-	-

Solvente utilizado: DMSO-d₆; RMN ^{13}C (75MHz); RMN ^1H (300MHz); s = singlete.

Tabela 8 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido fumarprotocetrárico.

Posições C	δ ^1H – ppm (multiplicidade)	δ ^{13}C – ppm	DEPT-135	gHSQC	gHMBC
1	-	112,5	C	-	-
2	-	166,0	C	-	-
3	-	112,4	C	-	-
4	-	165,0	C	-	-
5	6,83 (s)	117,6	CH	117,6	21,6/ 112,5/ 165,0
6	-	152,5	C	-	-
7	-	161,3	C	-	-
8	2,44 (s)	21,6	CH ₃	21,6	117,6/ 152,5
9	10,56 (s)	192,0	CH	192,0	112,4/ 165,0/ 166,0
1'	-	117,0	C	-	-
2'	-	155,9	C	-	-
3'	-	113,6	C	-	-
4'	-	146,0	C	-	-
5'	-	142,5	C	-	-
6'	-	132,4	C	-	-
7'	-	170,6	C	-	-
8'	2,42 (s)	15,0	CH ₃	15,0	117,0/ 132,4/ 142,5/ 155,9
9'	5,29 (s)	57,1	CH ₂	57,1	113,6/ 146,0/ 155,9
1''	-	164,4	C	-	-
2''	6,64 (s)	135,4	CH	135,4	132,6/ 135,4/ 164,4
3''	6,64 (s)	132,6	CH	132,6	132,6/ 135,4/ 164,4
4''	-	164,4	C	-	-
-OH	11,98 (s)	-	-	-	-

Solvente utilizado: DMSO-d₆; RMN ^{13}C (75MHz); RMN ^1H (300MHz); s = singlete.

Tabela 9 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido norstístico.

Posições	δ ^1H – ppm	δ ^{13}C – ppm	DEPT-135	gHSQC	gHMBC
C	(multiplicidade)				
1	-	111,9	C	-	-
2	-	166,2	C	-	-
3	-	110,7	C	-	-
4	-	164,0	C	-	-
5	6,87 (d, J 7,5)	117,4	CH	117,4	21,5/ 111,9/ 164,0
6	-	152,4	C	-	-
7	-	160,4	C	-	-
8	2,45 (s)	21,5	CH ₃	21,5	111,9/ 117,4/ 152,4
9	10,45 (s)	192,7	CH	192,7	164,0
1'	-	109,2	C	-	-
2'	-	152,0	C	-	-
3'	-	121,0	C	-	-
4'	-	147,9	C	-	-
5'	-	137,4	C	-	-
6'	-	135,9	C	-	-
7'	-	163,6	C	-	-
8'	6,78 (s)	95,0	CH	95,0	-
9'	2,20 (s)	9,7	CH ₃	9,7	121,0/ 147,9/ 152,0
8'-OH	8,30 (d, J 7,5)	-	-	-	-
-OH	10,26 (s)	-	-	-	-
-OH	12,06 (s)	-	-	-	-

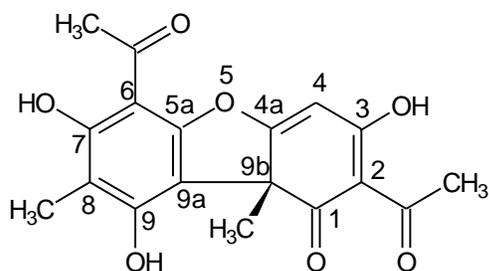
Solvente utilizado: DMSO-d₆; RMN ^{13}C (75MHz); RMN ^1H (300MHz); s = singleto; d = duplete; J = Constante de acoplamento (Hz).

Tabela 10 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido psorômico.

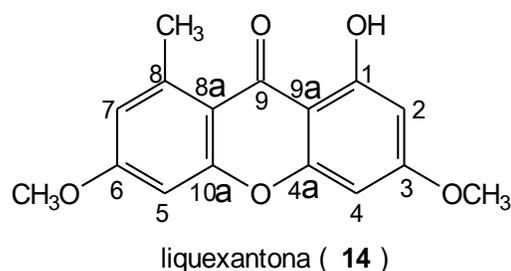
Posições	δ ^1H – ppm	δ ^{13}C – ppm	DEPT-135	gHSQC	gHMBC
C	(multiplicidade)				
1	-	111,9	C	-	-
2	-	164,8	C	-	-
3	-	110,9	C	-	-
4	-	164,2	C	-	-
5	6,84 (s)	117,3	CH	117,3	21,6/ 110,9/ 111,9/ 164,2
6	-	152,8	C	-	-
7	-	161,0	C	-	-
8	2,46 (s)	21,6	CH ₃	21,6	111,9/ 117,3/ 152,8
9	10,46 (s)	194,2	CH	194,2	110,9/ 117,3/ 164,2/ 164,8
1'	7,10 (s)	107,9	CH	107,9	122,8/ 142,6/ 154,7/ 166,1
2'	-	154,7	C	-	-
3'	-	122,8	C	-	-
4'	-	143,4	C	-	-
5'	-	142,6	C	-	-
6'	-	123,3	C	-	-
8'	-	166,1	C	-	-
9'	2,20 (s)	9,6	CH ₃	9,6	122,8/ 143,4/ 154,7
2'-OCH ₃	3,84 (s)	56,2	CH ₃	56,2	154,7
4-OH	12,15 (s)	-	-	-	-

Solvente utilizado: DMSO-d₆; RMN ^{13}C (75MHz); RMN ^1H (300MHz); s = singleto.

Ácido úsnico e Liquexantona



R - (+) ácido úsnico (**13**)



liquexantona (**14**)

O espectro de hidrogênio (**Espectro 9a**) do ácido úsnico (**13**) apresenta oito sinais. Destes sinais, quatro singletes são referentes a 12 hidrogênios de metilas, um singlete referente a um hidrogênio de anel aromático e três singletes referentes a três hidrogênios de hidroxila fenólica.

O espectro de ^{13}C (DEPT - 135) (**Espectro 9b**) apresenta cinco sinais de CH_3 ou CH, confirmando assim a presença de quatro metilas e um CH de anel aromático. Já o espectro de ^{13}C (**Espectro 9b**) mostrou-se com 18 sinais caracterizando assim os 18 carbonos do ácido úsnico. Os sinais que não aparecem no experimento de DEPT-135 correspondem a sinais de carbono quaternário. Os sinais na região entre 101,5 e 109,2 ppm são característicos de carbonos sp^2 substituído por átomos de carbono. A presença de um sinal em 59,0 ppm caracteriza a presença de um carbono tetrasubstituído por outros quatro carbonos. A presença de cinco sinais entre 155,2 e 191,7 ppm indica cinco carbonos sp^2 com substituinte contendo oxigênio, e os 3 sinais entre 198,0 e 201,8 ppm, indicam a presença de três carbonos carbonílicos.

A presença e a posição dos grupos funcionais do ácido úsnico foram confirmadas por experimentos de correlação carbono - hidrogênio gHSQC e gHMBC (**Espectros 9d**,

9e₁, 9e₂ e 9e₃). Os dados espectrais de ¹H e ¹³C e suas correlações nos experimentos de gHSQC e gHMBC do ácido úsnico estão apresentados na **tabela 11**.

O espectro de hidrogênio da xantona liquexantona (**14**) (**Espectro 10a**) apresenta oito sinais. Destes sinais, dois singletes são referentes a seis hidrogênios de metoxilas, um singlete correspondente a três hidrogênios de metila, quatro dupletes relativos a quatro hidrogênios de anel aromático e um singlete referente a um hidrogênio de hidroxila fenólica. As constantes de acoplamento para os dupletes referentes aos hidrogênios de anel aromático possuem valor de 2,3 Hz característico ao acoplamento de posição “meta” no anel aromático.

O espectro de ¹³C (DEPT - 135) (**Espectro 10b**) apresenta sete sinais de CH₃ ou CH confirmando assim a presença de duas metoxilas, uma metila e quatro carbonos (CH) ligados a anel aromático. Já o espectro de ¹³C (**Espectro 10c**) mostrou-se com 16 sinais caracterizando assim os 16 carbonos da liquexantona. Os sinais que não se revelaram no espectro de ¹³C (DEPT - 135) correspondem a cinco sinais de carbono quaternário na região entre 156,9 e 165,8 ppm característicos de carbonos de anel aromático ligados a um oxigênio. A presença de um sinal em 182,3 ppm indica um carbono carbonílico e sinais em 104,1; 112,9 e 143,4 ppm indicam a presença de três carbonos quaternários de anel aromático ligados a outros carbonos.

O espectro bidimensional gHMBC (**Espectro 10e₁ e 10e₂**) mostrou que os sinais de H das metoxilas correlaciona com os sinais dos carbonos do anel aromático em 163,7 e 165,8 ppm. A posição dos hidrogênios do anel aromático foram definidas também por esta técnica. O hidrogênio referente ao deslocamento em 6,26 ppm correlaciona com os carbonos em 92,0; 104,1 e 165,8 ppm e o hidrogênio referente ao deslocamento em 6,27 ppm correlaciona com os carbonos 96,7; 104,1 e 156,9 ppm. Com estas informações e com o fato de que ocorre um acoplamento de 2,3 Hz referente a acoplamento meta, foi possível definir a posição destes hidrogênios e a posição dos carbonos vizinhos ao CH.

A elucidação dos substituintes do outro anel aromático da liquexantona foi realizada com base na discussão anterior. O hidrogênio referente ao sinal em 6,62 ppm correlaciona com os carbonos em 112,9; 159,4 e 163,7 ppm. Este hidrogênio acopla com o hidrogênio em 6,60 ppm (2,3 Hz) que correlaciona (gHMBC) com os carbonos em 112,9; 159,4 e

163,7 ppm. Os dados espectrais de ^1H e ^{13}C e suas correlações nos experimentos de gHSQC e gHMBC da liquexantona estão apresentados na **tabela 11**.

Através da análise dos espectros de ^1H e ^{13}C apresentados, confirmamos as estruturas do ácido úsnico (**13**) e da liquexantona (**14**). Estes dados estão de acordo com aqueles já reportados na literatura (RASHID et al., 1999; MICHELETTI et al., 2009).

Tabela 11 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C do ácido úsnico.

Posições	$\delta ^1\text{H}$ – ppm (multiplicidade)	$\delta ^{13}\text{C}$ – ppm	DEPT-135	gHSQC	gHMBC
C					
1	-	198,0	C	-	-
2	-	105,2	C	-	-
3	-	191,7	C	-	-
4	5,95 (s)	98,3	CH	98,3	59,0/ 105,2/ 179,3
4a	-	179,3	C	-	-
5a	-	155,2	C	-	-
6	-	101,5	C	-	-
7	-	163,8	C	-	-
8	-	109,2	C	-	-
9	-	157,4	C	-	-
9a	-	103,9	C	-	-
9b	-	59,0	C	-	-
2-CO	-	201,8	C	-	-
2-COCH ₃	2,63 (s)	27,9	CH ₃	27,9	105,2/ 201,8
6-CO	-	200,3	C	-	-
6-COCH ₃	2,64 (s)	31,3	CH ₃	31,3	101,5/ 200,3
8-CH ₃	2,07 (s)	7,5	CH ₃	7,5	109,2/ 157,4/ 163,8
9b-CH ₃	1,73 (s)	32,1	CH ₃	32,1	59,02/ 103,9/ 179,3/ 198,0
3-OH	18,82 (s)	-	-	-	27,9/ 98,3/ 105,2/ 191,7/ 201,8
7-OH	13,28 (s)	-	-	-	101,5/ 109,2/ 163,8
9-OH	11,00 (s)	-	-	-	103,9/ 109,2/ 157,4

Solvente utilizado: CDCl₃; RMN ^{13}C (75MHz); RMN ^1H (300MHz), s = singleto.

Tabela 12 – Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da liquexantona.

Posições	δ ^1H – ppm	δ ^{13}C – ppm	DEPT-135	gHSQC	gHMBC
C	(multiplicidade)				
1	-	163,7	C	-	-
2	6,26 (d, 2,3)	96,7	CH	96,7	92,0/ 104,1/ 165,8
3	-	165,8	C	-	-
4	6,27 (d, 2,3)	92,0	CH	92,0	96,7/ 104,1/ 156,9/ 165,8
4a	-	156,9	C	-	-
5	6,62 (d, 2,3)	98,4	CH	98,4	112,9/ 159,4/ 163,7
6	-	163,7	C	-	-
7	6,60 (d, 2,3)	115,4	CH	115,4	112,9
8	-	143,4	C	-	-
8a	-	112,9	C	-	-
9	-	182,3	C	-	-
9a	-	104,1	C	-	-
10a	-	159,4	C	-	-
8-CH ₃	2,80 (s)	23,4	CH ₃	23,4	115,4/ 143,4
3-OCH ₃	3,84 (s)	55,6 ou 55,7	CH ₃	55,6/ 55,7	165,8
6-OCH ₃	3,86 (s)	55,6 ou 55,7	CH ₃	55,6/ 55,7	163,7
1-OH	13,35 (s)	-	-	-	-

Solvente utilizado: DMSO-d₆; RMN ^{13}C (75MHz); RMN ^1H (300MHz); s = singlete; d = duplete; J = Constante de acoplamento (Hz).

4.2 Ensaio Enzimáticos

Bioautografia

Os compostos *R*-(+)-ácido úsnico (**13**), liquexantona (**14**), ácido psorômico (**15**), ácido protocetrário (**16**), ácido fumarprotocetrário (**17**), ácido norstítico (**18**), ácido difractáico (**19**), ácido divaricático (**20**), ácido perlatólico (**22**) e atranorina (**21**) foram avaliados, preliminarmente, quanto ao potencial de inibição da enzima tirosinase por meio

do ensaio de bioautografia (**Figura 3**). O aparecimento de manchas claras indica que a substância avaliada promove a inibição da enzima tirosinase impedindo a reação da mesma com seu substrato. Isto ocorre, pois o produto da catálise enzimática, dopacromo, não é formado.

Observa-se que atranorina (**21**) e liquexantona (**14**) não inibiram a enzima, pois manchas claras não são observadas nos locais onde estes compostos foram aplicados, enquanto que o ácido difractáico (**19**) e o ácido norstítico (**18**) inibiram fracamente a enzima, pois nota-se o aparecimento de algumas manchas claras sutis. As manchas tornam-se mais claras na presença dos ácidos úsnico (**13**), protocetrárico (**16**), fumarprotocetrárico (**17**), divaricático (**20**) e perlatólico (**22**) mostrando que a partir de 2,5 μg estes compostos inibiram mais efetivamente a enzima, com exceção do ácido úsnico (**13**), onde este comportamento é observado a partir de 5,0 μg . Dentre os compostos avaliados o ácido psorômico (**15**) foi o mais ativo pois as aplicações acima de 5,0 μg proporcionaram a formação de manchas claras intensas.

Diante destes resultados, os compostos que apresentaram atividade inibitória foram submetidos a ensaios de solubilidade em meio tamponado (tampão fosfato 66,7 mM pH 6,8). Os ácidos fumarprotocetrárico (**17**), protocetrárico (**16**) e psorômico (**15**) apresentaram solubilidade suficiente no meio reacional apropriado para a realização de ensaios, em solução, de cinética enzimática.

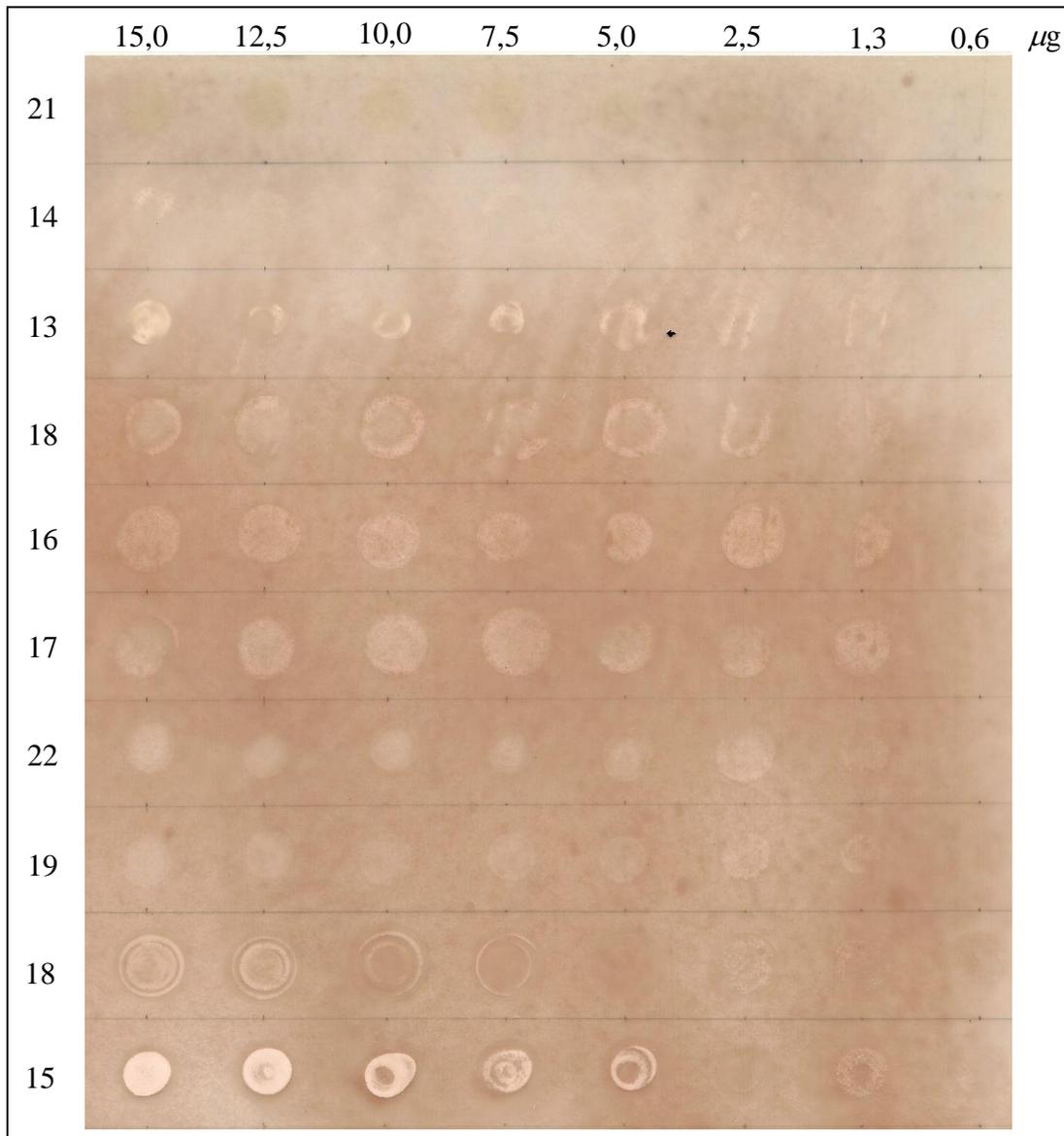


Figura 3 – Reação da tirosinase e seu substrato (L-DOPA) em placa de sílica na presença de 0,6 a 15,0 μg dos compostos **21**. atranorina; **14**. liquexantona; **13**. ácido úsnico; **18**. ácido difractáico; **16**. ácido protocetrárico; **17**. ácido fumarprotocetrárico; **22**. ácido perlatólico; **19**. ácido divaricático; **18**. ácido norstítico e **15**. ácido psorômico.

Ensaio em Solução

Os ensaios em solução foram realizados em triplicata na presença de um controle (meio reacional sem enzima) e um branco (meio reacional sem amostra), registrando a variação da absorbância em função do tempo. Antes de iniciar os ensaios com os

compostos fenólicos, foram realizados experimentos a fim de padronizar o método para definir as concentrações ideais da enzima e do substrato e verificar o efeito do solvente.

Padronização da Técnica

A **figura 4** mostra o resultado do efeito da concentração do substrato (L-DOPA) frente à enzima ($3,3 \mu\text{g/mL}$) medido pela variação de absorbância durante 10 minutos.

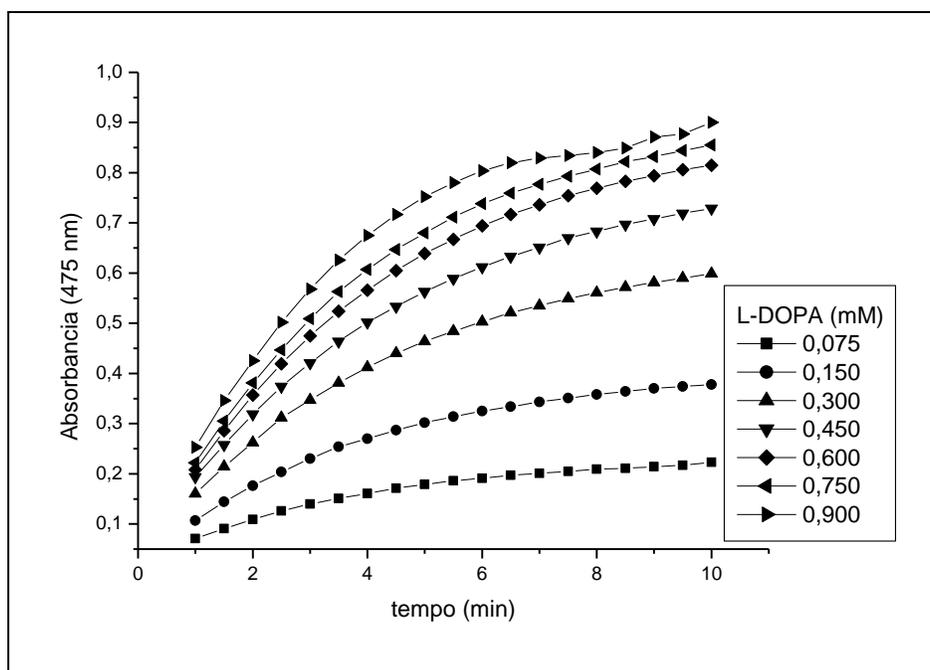


Figura 4 – Efeito da concentração de L-DOPA (0,075 a 0,900 mM) na atividade enzimática ($3,3 \mu\text{g/mL}$ da enzima) medido pela variação de absorbância (em 475 nm) em função do tempo de reação.

Neste gráfico (**Figura 4**), observa-se que a formação quase completa do produto ocorreu após aproximadamente 5 minutos para as concentrações de L-DOPA testadas. Esta interpretação é possível, pois o gráfico indica uma mudança do coeficiente angular nas curvas após este período. O coeficiente angular tende a zero (uma constante) após este intervalo de tempo. Além disso, observa-se registros de absorbância acima de 0,700 para as

concentrações mais altas de L-DOPA, o que prejudica a linearidade do método. Sendo assim foi realizado outros ensaios com concentrações mais baixas da enzima.

O gráfico da **figura 5** mostra os resultados obtidos com uma concentração de enzima de $2,5 \mu\text{g/mL}$.

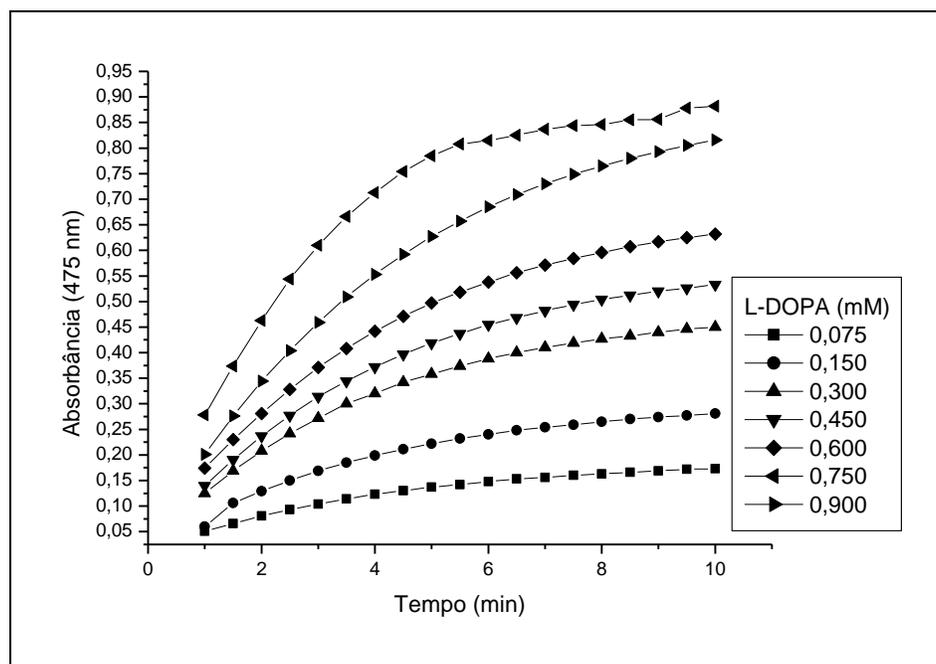


Figura 5 – Efeito da concentração de L-DOPA (0,075 a 0,900 mM) na atividade enzimática ($2,5 \mu\text{g/mL}$ da enzima) medido pela variação de absorbância (em 475 nm) em função do tempo de reação.

Os resultados apresentados na **figura 5** mostram o mesmo perfil daquele obtido na **figura 4**, indicando a necessidade de reduzir ainda mais a concentração da enzima. Os resultados apresentados na **figura 6** se referem a concentração da enzima de $2,0 \mu\text{g/mL}$.

Avaliando os gráficos acima (**figuras 4, 5 e 6**), optou-se por trabalhar com a solução da enzima na concentração de $2,0 \mu\text{g/mL}$ no meio reacional pois a faixa de absorção (absorbância) para as concentrações de L-DOPA não ultrapassa 0,7. Isto confere ao método uma linearidade maior.

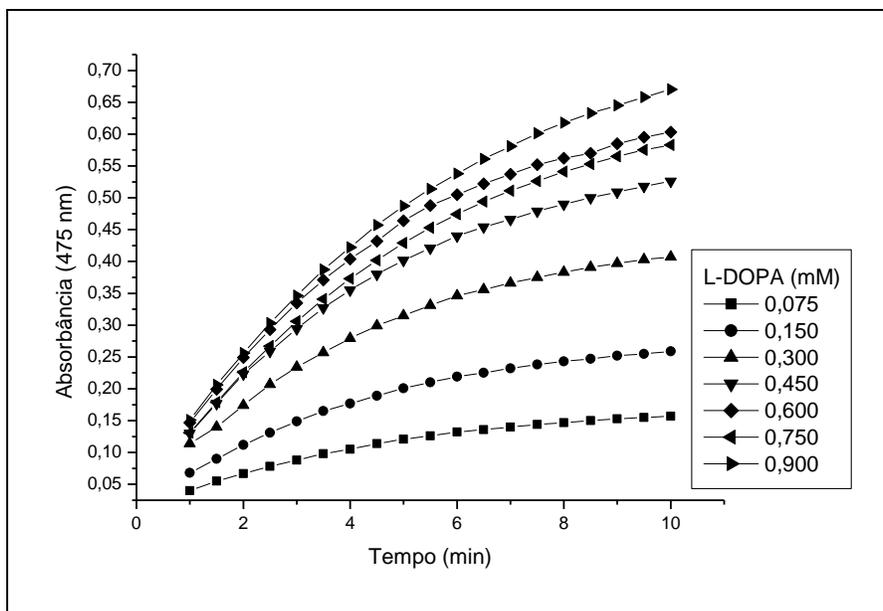


Figura 6 – Efeito da concentração de L-DOPA (0,075 a 0,900 mM) na atividade enzimática (2,0 $\mu\text{g/mL}$ da enzima) medido pela variação de absorbância (em 475 nm) em função do tempo de reação.

Os resultados indicam que não há uma variação significativa da velocidade da reação (coeficiente angular) para concentrações de L-DOPA acima de 0,6 mM. Portanto, nesta concentração, é possível considerar que a velocidade da reação enzimática é máxima. Acima desta concentração, não há mais variação de velocidade pois não é possível aumentar a velocidade da catálise enzimática. Sendo assim, as concentrações de L-DOPA escolhidas para os ensaios com os ácidos fumarprotocetrárico (17), protocetrárico (16) e psorômico (15) foram até 0,600 mM.

A análise do gráfico representado na **figura 6** indica também que o intervalo de tempo de reação mais adequado para realizar os ensaios de cinética enzimática é de 0 a 5 minutos, visto que neste intervalo, o comportamento da reação é linear, ou seja, a absorbância aumenta diretamente proporcional ao tempo em uma mesma razão. Após 5 minutos, esta razão muda alterando o coeficiente angular da reta, pois a reação enzima-substrato ocorre em uma velocidade menor devido à redução da concentração de L-DOPA disponível no meio.

A variação da absorbância é diretamente proporcional à quantidade de produto formado (dopacromo) na reação. A concentração de dopacromo formada no meio é possível ser determinada por meio da fórmula de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Onde, **A** = absorbância; ε = absortividade molar do produto (dopacromo em $M^{-1}.cm^{-1}$); **l** = largura da cubeta (distância do caminho óptico em cm); **c** = concentração do produto (dopacromo em mol/L).

Rearranjando a fórmula, podemos obter a concentração de dopacromo formado dividindo a absorbância pela absortividade molar do dopacromo ($3.700 M^{-1}.cm^{-1}$) multiplicado pela largura da cubeta (1,0 cm).

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot l}$$

O gráfico representado na **figura 7** mostra a relação de dopacromo formado em função do tempo de reação.

A análise por Regressão Linear foi realizada com o auxílio do programa Origin 6.0 para determinar o coeficiente angular de cada reta. O valor obtido corresponde a velocidade inicial da formação de dopacromo ($\mu M/min$). Esta velocidade é considerada a velocidade inicial já que não há uma variação significativa deste coeficiente nos primeiros 5 minutos de reação. A **tabela 13** relaciona a velocidade inicial de cada reta com seu respectivo coeficiente de correlação (R^2). Também está relacionado o inverso da velocidade ($1/V_0$) bem como o inverso da concentração do substrato ($1/[S]$) para a plotagem do gráfico de Lineweaver-Burk para a análise dos valores de K_M e V_{max} da enzima. K_M é um termo, referido também como Constante de Michaelis, que significa a metade da concentração (em molaridade) de substrato necessário para se obter a velocidade máxima da catálise enzimática. O termo V_{max} se refere à velocidade máxima da catálise enzimática quando a concentração de substrato é infinita em relação a enzima (COPELAND, 2005).

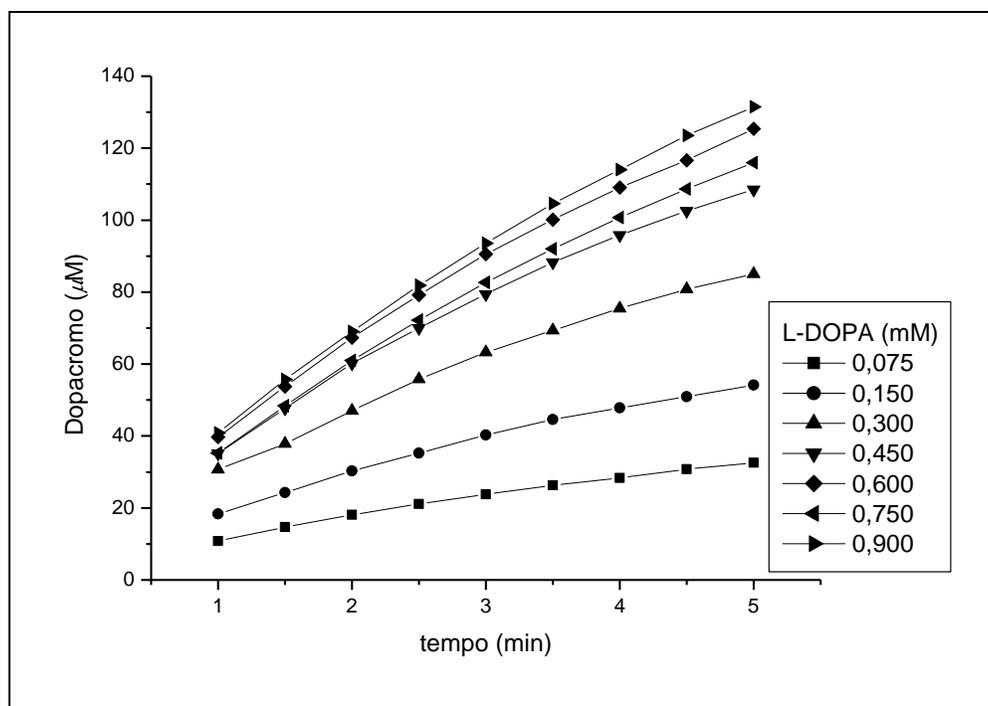


Figura 7 – Concentração de dopacromo formado (μM) na reação enzimática em função do tempo. As concentrações de L-DOPA foram de 0,075 a 0,900 mM e da enzima de 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tabela 13 – Relação entre as concentrações de L-DOPA e os valores de V_0 , $1/V_0$, $1/[S]$ e R^2 .

L-DOPA (mM)	0,075	0,150	0,300	0,450	0,600	0,750	0,900
V_0	5,37	8,92	13,9	18,3	21,2	20,1	22,6
$1/V_0$	0,186	0,112	0,072	0,054	0,047	0,049	0,044
$1/[S]$	13,3	6,67	3,33	2,22	1,67	1,33	1,11
R^2	0,994	0,992	0,994	0,993	0,994	0,995	0,996

Com estes dados, plotou-se o gráfico de duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) (**Figura 8**). O gráfico nos fornece uma estimativa dos valores de K_M e V_{max} da reação enzimática.

A equação da reta, fornecida pelo programa Origin 6.0 é $y = 0,03034 + 0,01181x$. Por extrapolação, podemos identificar o ponto onde a reta cruza as abscissas x e y . Estes valores correspondem respectivamente aos valores de $-1/K_M$ e $1/V_{max}$. Sendo assim o valor de K_M da enzima tirosinase utilizada é 0,39 mM e o valor de da sua velocidade máxima é 32,96 $\mu\text{M}/\text{min}$. O valor de K_M nos informa a quantidade de substrato necessária para que a enzima atinja metade da sua velocidade máxima de catálise. Dessa forma a quantidade de substrato teórico para que ocorra a catálise na velocidade máxima é de 0,78 mM de L-DOPA. A velocidade máxima nos indica a quantidade de produto formado por minuto pela catálise enzimática no meio reacional onde o substrato está presente em excesso (infinito) por unidade de tempo.

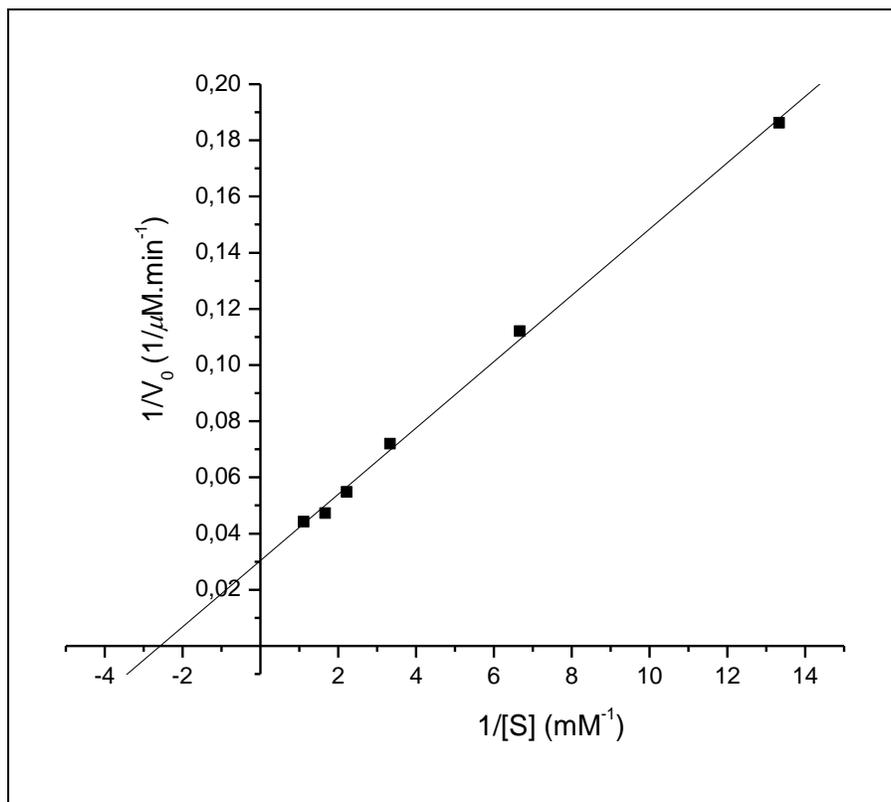


Figura 8 – Gráfico duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) da reação da enzima tirosinase com seu substrato L-DOPA.

De acordo com a **figura 7**, as concentrações de L-DOPA acima de 0,600 mM não apresentaram variação significativa na reação enzimática, apesar do cálculo teórico

demonstrar que a quantidade de L-DOPA para que a enzima catalise o substrato na velocidade máxima é 0,78 mM. Dessa forma, as concentrações escolhidas para trabalhar com L-DOPA foram de 0,050 a 0,600 mM. A **tabela 14** relaciona os parâmetros cinéticos da enzima tirosinase utilizada no presente trabalho.

Tabela 14 – Parâmetros cinéticos da enzima tirosinase utilizada no presente trabalho.

Parâmetros	A	B
Unidade Enzimática (mmol produto formado / min)	$6,6 \times 10^{-5} \text{ mmol.min}^{-1}$	$5,1 \times 10^{-5} \text{ mmol.min}^{-1}$
Atividade Enzimática Específica (unidade / mg enzima)	$1,6 \times 10^{-2} \text{ mmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$	$2,5 \times 10^{-2} \text{ mmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$
Constante Catalítica (unidade / mol de enzima*)	$1,98 \times 10^3 \text{ mol.min}^{-1}.\text{mol}^{-1}$	$1,53 \times 10^3 \text{ mol.min}^{-1}.\text{mol}^{-1}$
Número de Turnover (constante catalítica / número de sítio ativo)	$1,98 \times 10^3$	$1,53 \times 10^3$

* Peso molecular da enzima tirosinase = 120.000 g / mol (STROTHKAMP et al., 1976).

A - Cálculos realizados a partir do V_{max} (intersecção do eixo y) do branco do gráfico de Lineweaver-Burk.

B - Cálculos realizados a partir do coeficiente angular do gráfico com 0,600 mM de L-DOPA.

Os parâmetros cinéticos enzimáticos foram definidos como:

Unidade Enzimática: Quantidade de produto formado (dopacromo em mmol) por minuto. Este valor foi obtido através do coeficiente angular da reta ao plotar um gráfico da concentração de produto formado vs. tempo (minuto) (exemplo: **figura 7**)

Atividade Enzimática Específica: Quantidade de produto formado (dopacromo em mmol) por minuto por mg de enzima (unidade enzimática / mg de enzima). Este valor foi obtido dividindo o valor da unidade enzimática calculada (no item anterior) pela quantidade (mg) de enzima adicionada no ensaio.

Constante Catalítica: quantidade de produto formado (dopacromo em mmol) por minuto por mol de enzima. Este valor foi calculado dividindo o valor da unidade

enzimática calculada (acima) pela quantidade (mol) de enzima adicionada no ensaio, sendo que o P.M. da tirosinase é 120.000 g / mol (STROTHKAMP et al., 1976).

Número de Turnover: quantidade de produto formado (dopacromo em mmol) por minuto por mol de enzima por quantidade de sítios ativos. Este valor foi calculado com base no item anterior dividindo pelo número de sítios ativos da tirosinase, que possui somente um.

Efeito do Solvente

O uso de DMSO foi necessário para solubilizar os compostos fenólicos submetidos aos ensaios enzimáticos devido à baixa solubilidade destes compostos em meio aquoso. Foi determinado, então, a influência do solvente na reação entre a enzima e L-DOPA. Nota-se, pela análise da **figura 9**, que à medida que se aumenta a concentração de DMSO a absorvância diminui. Isto indica que ocorre uma diminuição na formação de produto (dopacromo) formado. O DMSO, portanto, diminui a velocidade da reação enzimática.

Uma hipótese para a explicação deste fenômeno é o efeito de desidratação que o DMSO pode provocar por ser uma substância muito higroscópica. Sendo assim, a hidratação da enzima é prejudicada podendo influenciar na sua conformação tridimensional prejudicando a interação e a reação com o substrato. Além disso, ligações de hidrogênio podem ocorrer entre o oxigênio do DMSO e os resíduos de aminoácidos modificando a conformação da enzima. A viscosidade do DMSO é outro importante fator que pode prejudicar a catálise enzimática, pois dificulta a mobilidade do substrato e a interação desse com o sítio ativo cuja flexibilidade também pode ser afetada (MATOBA et al., 2006).

A maioria dos trabalhos que tratam de compostos que modulam a cinética da enzima tirosinase utilizam de 3,0 a 10,0% de DMSO ou etanol na concentração final referente ao meio reacional para a solubilizar as amostras em estudo (JIMÉNEZ et al., 2001; NERYA et al., 2004; KUBO et al., 1999; QIU et al., 2009). Para os compostos que foram submetidos aos ensaios em solução, foi necessário utilizar 10,0% de DMSO em tampão fosfato para solubilizá-los.

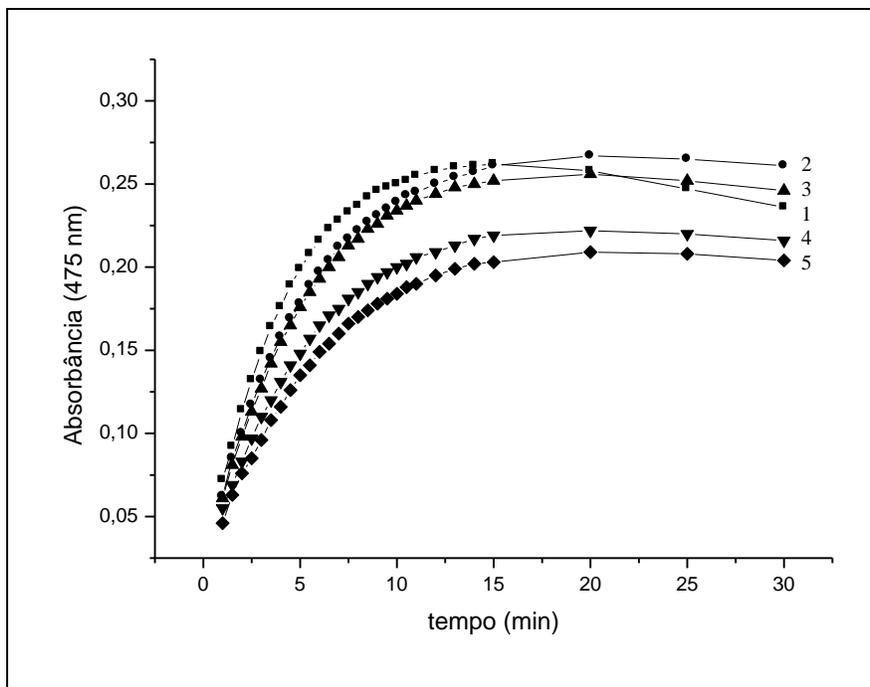


Figura 9 – Efeito do DMSO na reação da enzima tirosinase com L-DOPA. As curvas representam diferentes concentrações de DMSO utilizadas: **1.** branco (ausência de DMSO); **2.** 2,5%; **3.** 5,0%; **4.** 7,5%; **5.** 10,0%.

4.3 Moduladores Enzimáticos

Compostos que alteram de alguma forma a atividade de uma enzima são denominados moduladores enzimáticos. Eles podem alterar a atividade catalítica da enzima inibindo-a ou ativando-a.

Inibidores enzimáticos são compostos que interferem diminuindo a velocidade da catálise enzimática, podendo ser reversíveis ou irreversíveis. Os inibidores irreversíveis são aqueles que formam ligações covalentes com as enzimas inviabilizando-as de suas funções catalíticas permanentemente. Já os reversíveis podem ser classificados em quatro tipos.

1. Competitivo: O inibidor compete com o substrato pelo sítio ativo enzimático. Em geral, estes inibidores formam um complexo com a enzima, na região do sítio ativo, sem provocar catálise (COPELAND, 2005). Como o inibidor se liga de forma reversível à enzima, a competição com o substrato pode ser desfavorecida se a quantidade de substrato

aumentar, pois a probabilidade do inibidor se ligar à enzima ou permanecer ligado a ela é minimizada (NELSON & COX, 2005).

2. Não-competitivo: O inibidor e o substrato se ligam à enzima simultaneamente, mas não competem pelo sítio ativo devido à diferença estrutural entre os compostos. A presença do inibidor ligado à enzima dificulta a catálise do substrato (COPELAND, 2005). Sendo assim, o grau de inibição não é afetado com mudanças nas concentrações do substrato.

3. Incompetitivo: O inibidor se liga à enzima após a ligação da enzima com seu substrato, pois o substrato causa uma mudança na conformação enzimática expondo sítios para o inibidor se ligar. Após a ligação do inibidor à enzima, a finalização da catálise do substrato torna-se mais difícil de acontecer. Dessa forma, uma mudança na concentração do substrato pode aumentar o grau de inibição.

4. Misto: O tipo de inibição mista, não se refere a dois tipos de inibições que acontecem simultaneamente (SABOURY, 2009). Este tipo é uma variação de inibição não-competitiva, e é classificado à parte. Neste caso, ocorre a ligação simultânea do substrato e do inibidor com a enzima em sítios diferentes, sem competir pelo sítio ativo, similarmente a um inibidor não-competitivo. No entanto, o grau de inibição é afetado com mudanças na concentração do substrato dependendo da interação entre os sítios onde ocorrem as ligações da enzima com o substrato e com o inibidor.

Um ativador enzimático reversível também pode ser classificado em 4 tipos diferentes em função da forma como ocorre a ativação. Para isto, dois parâmetros são considerados: a constante catalítica (k_p ou β) e a afinidade de ligação enzima-substrato (α). A ativação enzimática depende da relevância do papel que estes dois parâmetros desempenham na catálise enzimática (SABOURY, 2009).

1. ($\alpha > \beta > 1$): Se o modulador diminuir a afinidade da ligação entre o substrato e a enzima ($\alpha > 1$) mas aumentar a constante catalítica ($\beta > 1$), ocorrerá inibição enzimática quando as concentrações do substrato forem baixas e ativação em altas concentrações do substrato. No entanto se o valor de β aumentar, poderá ocorrer ativação enzimática mesmo com baixas concentrações de substrato.

2. ($\alpha = \beta > 1$): Se o modulador diminuir a afinidade da ligação entre o substrato e a enzima ($\alpha > 1$) e aumentar a constante catalítica ($\beta > 1$) mas ambos os parâmetro possuírem

a mesma relevância para o sistema ocorrerá uma ativação enzimática diminuindo o valor de K_M e aumentando o valor de V_{max} à medida que se aumenta a concentração do ativador.

3. ($\alpha = 1$ e $\beta > 1$): Neste caso, o modulador não age na afinidade de ligação enzima-substrato mas aumenta a constante catalítica da reação.

4. ($\beta = 1$ e $\alpha < 1$): O modulador não influencia na constante catalítica, mas aumenta a afinidade da enzima com o substrato.

Os tipos de inibidores e ativadores reversíveis podem ser estudados por meio de gráficos de Lineweaver-Burk que relacionam o inverso da velocidade da reação catalítica com o inverso da concentração do substrato. Estes gráficos são úteis para estimar o valor da velocidade máxima (V_{max}) da reação e o valor da constante de Michaelis (K_M). Na presença de diferentes concentrações de um inibidor / ativador enzimático, é possível verificar se há alterações nos valores de V_{max} e de K_M já que no gráfico, $X = 0$ corresponde ao inverso do valor de V_{max} e $Y = 0$ corresponde ao inverso do valor de $-K_M$.

4.4 Efeito do Ácido Fumarprotocetrárico na Cinética da Enzima Tirosinase

Os resultados da atividade do ácido fumarprotocetrárico (17) sobre a enzima tirosinase, em inibição percentual (%I), estão indicados na **tabela 15**. Para valores de %I positivos atribuí-se ao composto a condição de inibidor enzimático, enquanto que para valores %I negativos, considera-se ativante. Os valores, neste caso, são todos positivos, portanto pode-se afirmar que o ácido fumarprotocetrárico atua como um inibidor da tirosinase. À medida que se aumenta a concentração do inibidor, o percentual de inibição enzimática também aumenta. No entanto, a medida em que se aumenta a concentração do substrato (L-DOPA), não ocorre um efeito de inibição proporcional. Para cada concentração de substrato, ocorre um grau diferente de inibição. Não é possível prever o tipo de inibição que está ocorrendo somente com estas informações devido à falta de proporcionalidade do percentual inibitório promovido pela variação do inibidor e do substrato.

Tabela 15 – Inibição da enzima tirosinase (expressa em %) pela ação do ácido fumarprotocetrárico após 5 minutos de reação.

[Substrato]	0,1 mM	0,2 mM	0,3 mM	0,4 mM	0,5 mM	0,6 mM
[Inibidor]						
0,200 mM	13,1	20,4	5,2	2,0	7,2	12,5
0,300 mM	18,5	18,1	12,9	10,7	13,9	23,4
0,500 mM	22,2	21,5	18,1	30,5	16,9	32,2
0,600 mM	44,4	32,6	24,6	39,9	26,0	39,8

A forma mais utilizada para avaliar o tipo de inibição que está ocorrendo no meio reacional é plotando um gráfico de Lineweaver-Burk. Segundo Saboury (2009), o gráfico $1/V_0$ contra $1/[S]$, onde as curvas plotadas para a reação com diferentes concentrações do inibidor são paralelas à curva referente à reação sem inibidor (Branco) caracteriza um comportamento de inibição incompetitiva. Nas concentrações de 0,2 a 0,5 mM do ácido fumarprotocetrárico, tanto o K_M quanto o V_{max} diminuem à medida que se aumenta a concentração deste ácido (**Tabela 16**). No entanto, o ensaio com a concentração de 0,6 mM de inibidor proporcionou uma inibição do tipo mista ($\alpha < 1$), Neste caso, K_M e V_{max} também variam em relação ao branco, no entanto, a curva desta reação intersecta o branco no quadrante III do plano cartesiano. Nos ensaios realizados, o ácido fumarprotocetrárico se comportou como um inibidor incompetitivo nas concentrações de 0,2 a 0,5 mM e na concentração de 0,6 mM passou a se comportar como um inibidor do tipo misto (**Figura 10**).

Na inibição do tipo mista, o fenômeno que rege o quadrante em que as curvas se intersectam é a afinidade de ligação (α) do substrato e do inibidor com a enzima. Quando $\alpha < 1$ a ligação do substrato na enzima aumenta a afinidade do inibidor com a enzima e *vice-versa* e a intersecção das curvas ocorre no quadrante III. A este comportamento, dá-se o nome de Cooperativismo, já que a ligação da enzima com um composto aumenta a força da ligação da enzima com o outro composto. Quando $\alpha > 1$, a ligação do substrato na enzima diminui a afinidade do inibidor com a enzima e *vice-versa* e a intersecção das curvas ocorre no quadrante II. A este comportamento dá-se o nome de Anticooperativismo,

já que a ligação da enzima com um composto diminui a força da ligação da enzima com o outro composto (SABOURY, 2009). Como indicado no gráfico representado na **figura 10**, a curva da concentração 0,6 mM de inibidor intersecta a curva do branco no quadrante III (indicado pela seta). Isto indica que o ácido fumarprotocetrárico, nesta concentração, promove uma ligação do tipo cooperativa aumentando a afinidade da enzima com seu substrato (ou *vice versa*).

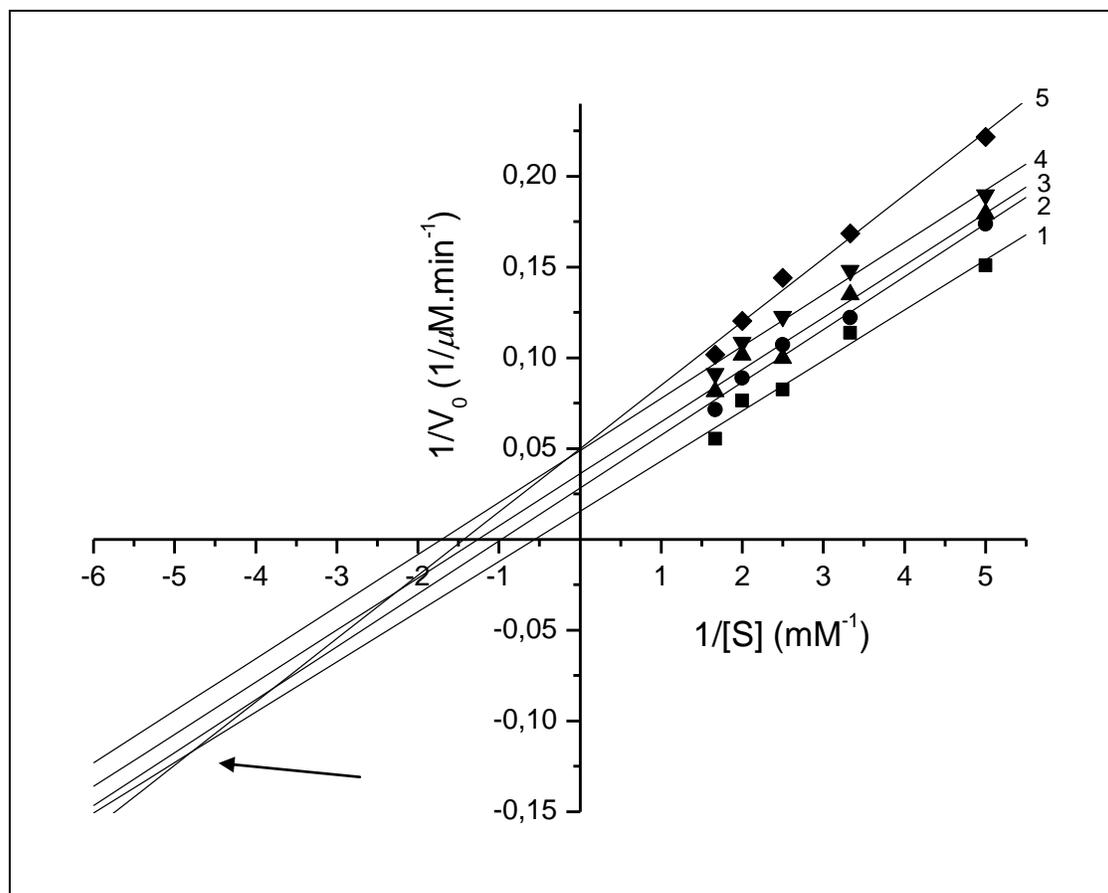


Figura 10 – Gráfico duplo-recíproco Lineweaver-Burk da cinética da reação de oxidação da L-DOPA catalisada pela enzima tirosinase na presença de diferentes concentrações de ácido fumarprotocetrárico, para as curvas de 1 a 5: **1** (branco); **2** (0,2 mM); **3** (0,3 mM); **4** (0,5 mM) e **5** (0,6 mM). A seta indica o local da intersecção da curva referente ao branco com a curva referente ao ensaio com 0,6 mM do ácido fumarprotocetrárico. Todas curvas possuem R^2 acima de 0,99.

Tabela 16 – Efeito de concentração do ácido fumarprotocetrárico nos parâmetros cinéticos da catálise enzimática da tirosinase com L-DOPA.

Ácido fumarprotocetrárico	K_M (mM)	V_{max} (μ M/min)
Branco	1,78	64,5
0,200 mM	1,03	35,4
0,300 mM	0,79	27,7
0,500 mM	0,58	20,4
0,600 mM	0,70	20,0

Os parâmetros cinéticos da tirosinase utilizada nos ensaios com o ácido fumarprotocetrárico foram calculados e estão descritos na **tabela 17**.

Tabela 17 – Parâmetros cinéticos da enzima tirosinase no ensaio com o ácido fumarprotocetrárico.

Parâmetros	A	B
Unidade Enzimática (mmol produto formado / min)	$1,3 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1}$	$3,6 \times 10^{-5} \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1}$
Atividade Enzimática Específica (unidade / mg enzima)	$3,3 \times 10^{-2} \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	$9,0 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$
Constante Catalítica (unidade / mol de enzima*)	$3,90 \times 10^3 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$	$1,08 \times 10^3 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$
Número de Turnover (constante catalítica / número de sítio ativo)	$3,90 \times 10^3$	$1,08 \times 10^3$

* Peso molecular da tirosinase = 120.000 g / mol (STROTHKAMP et al., 1976).

A - Cálculos realizados a partir do valor de V_{max} (intersecção do eixo y) do branco do gráfico de Lineweaver-Burk.

B - Cálculos realizados a partir do coeficiente angular do gráfico (**Figura 10**) com 0,600 mM de L-DOPA.

4.5 Efeito do Ácido Protocetrárico na Cinética da Enzima Tirosinase

Os resultados da atividade do ácido protocetrárico (**16**) sobre a enzima tirosinase, em inibição percentual (%I), estão indicados na **tabela 18**. Os valores, neste caso, variam entre positivo e negativo principalmente em função da concentração do substrato. Sendo assim, este ácido pode atuar como ativante ou como inibidor. Nas concentrações, 0,3 a 0,5 mM de L-DOPA observa-se somente valores negativos indicando que, nestas concentrações, o ácido protocetrárico age como um ativante enzimático. Na maior concentração de L-DOPA testada (0,6 mM) os valores de %I são todos positivos caracterizando assim uma inibição enzimática.

Um composto pode agir como ativante atuando de duas maneiras na reação enzima-substrato. A primeira maneira é aumentando a afinidade da enzima com seu substrato ($\alpha < 1$) e a segunda é aumentando a constante catalítica (k_p) ($\beta > 1$).

O gráfico de Lineweaver-Burk reafirma que o ácido protocetrárico atua, de maneira geral, como um ativante da tirosinase. Esta afirmação é feita pois as curvas que representam as reações realizadas na presença do ácido protocetrárico intersectam a curva que representa a reação do branco no quadrante I. As quatro curvas que representam as concentrações de 0,3 a 0,6 mM de ácido protocetrárico praticamente intersectam a curva referente ao branco em um mesmo ponto do gráfico (**Figura 11**). As curvas referentes aos ensaios contendo o ácido protocetrárico encontram-se todas à direita (no quadrante II) da curva referente ao branco. Este tipo de comportamento não foi observado para nenhum tipo de ativante, pois os relatos mostram que as curvas referente ao ativante devem estar à esquerda da curva do branco (no quadrante I), pois desta forma, V_{max} e K_M aumentariam na presença do ativante (KRUPYANKO, 2010; SHABANI & SARIRI, 2010).

O ácido protocetrárico parece ser a primeira substância a ser relatada como ativante enzimático diminuindo o valor de K_M e V_{max} (**tabela 19**). Os 4 tipos de ativadores reversíveis clássicos apresentados anteriormente (SABOURY, 2009) são ativadores que aumentam a V_{max} e o K_M da enzima, ou mantém o K_M da enzima, mas aumenta V_{max} , ou ainda, mantém V_{max} e diminui o K_M . Um estudo realizado mais recentemente mostra um outro tipo de ativador. Ácidos graxos saturados e insaturados (12 a 18 carbonos) ativam o efeito da tirosinase de forma mista. Ou seja, o ativador pode tanto se ligar à enzima livre ou

ao complexo enzima-substrato. O gráfico de Lineweaver-Burk dos ensaios enzimáticos com estes ácidos mostra um comportamento de diminuição do K_M enzimático e aumento de V_{max} sendo que ocorre um aumento da ativação enzimática com o aumento da cadeia. No entanto, este aumento não é linear (SHABANI & SARIRI, 2010). No caso do ácido protocetrárico, a linearidade não é observada com o aumento da concentração do ácido. O problema da falta de proporcionalidade e linearidade aparenta ser comum nos ensaios enzimáticos, principalmente no caso de ativadores.

Tabela 18 – Inibição / ativação da tirosinase (expressa em %) pela ação do ácido protocetrárico após 5 minutos de reação.

[Substrato]	0,1 mM	0,2 mM	0,3 mM	0,4 mM	0,5 mM	0,6 mM
[Inibidor]						
0,300 mM	8,5	-2,6	-8,7	-13,6	-12,3	10,1
0,400 mM	6,6	3,2	-6,8	-18,8	-10,2	4,2
0,500 mM	-5,7	-5,8	-9,3	-14,1	-9,4	10,4
0,600 mM	2,8	-4,5	-4,3	-15,0	-12,8	11,7

Há poucos trabalhos que apresentam gráficos de Lineweaver-Burk, para avaliar o tipo de ativação, no estudo de substâncias ativadoras da enzima tirosinase. Isto provavelmente ocorre devido a dificuldade de interpretar dados já que a proporcionalidade ou linearidade da ativação não ocorre na maioria dos casos. Além disso, parece que há um interesse industrial maior pelos inibidores da tirosinase, em função dos benefícios medicinais, do controle de pragas e da preservação dos alimentos que estes proporcionam. Sendo assim, os estudos cinéticos enzimáticos concentram-se mais na busca nos inibidores (SHABANI & SARIRI, 2010). No entanto, agentes ativadores podem ser importantes para o tratamento da doença de Parkinson e vitiligo (FALK et al., 2009; GREGG et al., 2010).

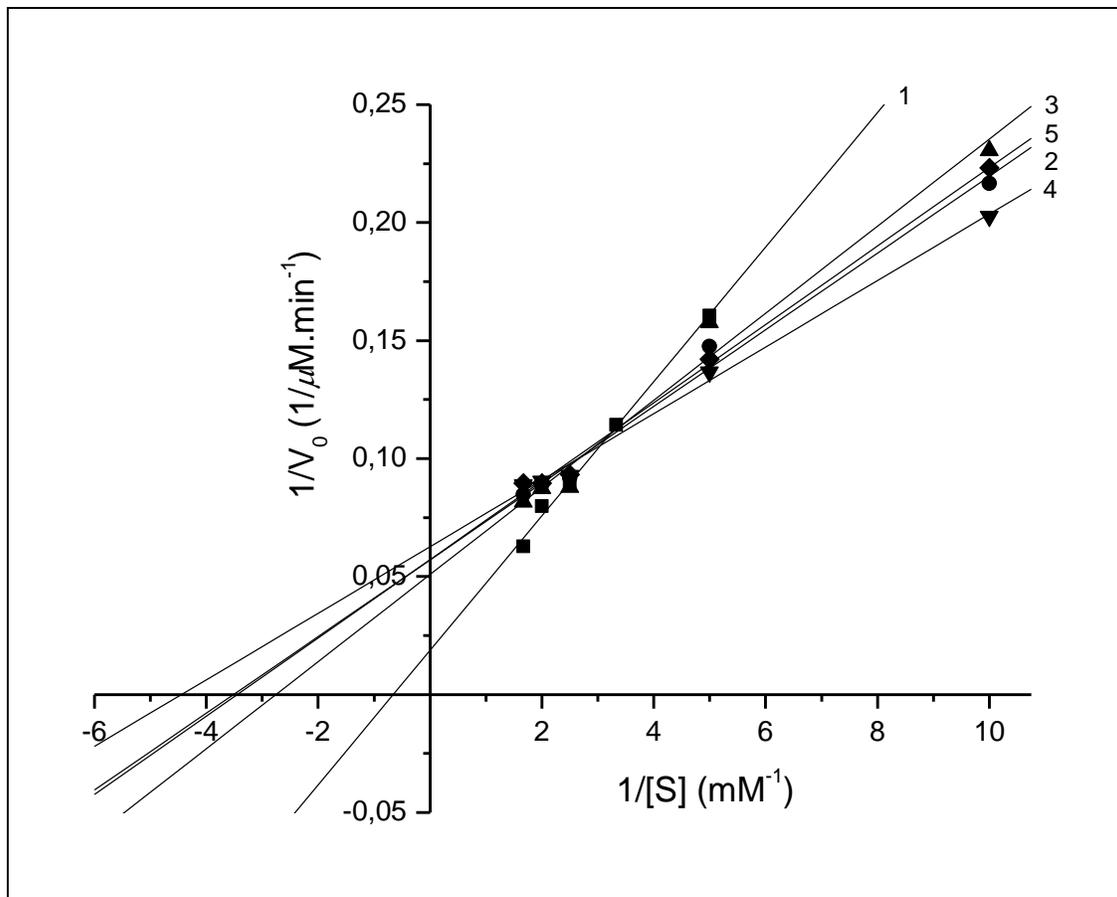


Figura 11 – Gráfico duplo-recíproco Lineweaver-Burk da cinética da reação de oxidação de L-DOPA catalisada pela enzima tirosinase na presença de diferentes concentrações de ácido protocetrárico, para as curvas de 1 a 5: **1** (branco); **2** (0,3 mM); **3** (0,4 mM); **4** (0,5 mM) e **5** (0,6 mM). Todas as curvas possuem R^2 acima de 0,99.

A **tabela 19** relaciona o valor de K_M e V_{max} para cada concentração do ácido protocetrárico. Apesar dos valores não serem proporcionais em função da concentração do inibidor aplicado, observa-se que todos os valores de K_M e V_{max} referentes às concentrações de ácido protocetrárico são menores que os valores referentes ao branco. Este tipo de comportamento é, normalmente, observado para compostos inibidores da ação enzimática. No entanto, como discutido anteriormente, o gráfico de Lineweaver-Burk (**Figura 11**) e o cálculo de % de inibição (**tabela 18**), mostram que este composto atua como um ativante enzimático.

Tabela 19 – Efeito de concentração do ácido protocetrárico nos parâmetros cinéticos da catálise enzimática da tirosinase com a L-DOPA.

Ácido protocetrárico	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)
Branco	1,54	53,4
0,300 mM	0,28	17,5
0,400 mM	0,36	19,7
0,500 mM	0,23	16,0
0,600 mM	0,29	17,5

Os parâmetros cinéticos da enzima tirosinase utilizada nos ensaios com o ácido protocetrárico foram calculados e estão descritos na **tabela 20**.

Tabela 20 – Parâmetros cinéticos da enzima tirosinase determinados no ensaio com o ácido protocetrárico.

Parâmetros	A	B
Unidade Enzimática (mmol produto formado / min)	$1,1 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1}$	$3,2 \times 10^{-5} \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1}$
Atividade Enzimática Específica (unidade / mg enzima)	$2,8 \times 10^{-2} \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	$8,0 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$
Constante Catalítica (unidade / mol de enzima*)	$3,30 \times 10^3 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$	$9,60 \times 10^2 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$
Número de Turnover (constante catalítica / número de sítio ativo)	$3,30 \times 10^3$	$9,60 \times 10^2$

* Peso molecular da tirosinase = 120.000 g / mol (STROTHKAMP et al., 1976).

A - Cálculos realizados a partir do valor de V_{max} (intersecção do eixo y) do branco do gráfico de Lineweaver-Burk.

B - Cálculos realizados a partir do coeficiente angular do gráfico (**Figura 11**) com 0,600 mM de L-DOPA.

4.6 Efeito do Ácido Psorômico na Cinética da Enzima Tirosinase

Os resultados da atividade do ácido psorômico (**15**) sobre a enzima tirosinase, em inibição percentual (%I), estão indicados na **tabela 21**. Os valores, neste caso, são positivos caracterizando assim um efeito inibitório da catálise enzimática. Nas concentrações mais altas de ácido psorômico (0,4 a 0,6 mM), o composto inibiu a catálise em aproximadamente 40%. Este valor é similar ao efeito do ácido fumarprotocetrárico (**17**).

Tabela 21 – Inibição da enzima tirosinase (expressa em %) pela ação do ácido psorômico após 5 minutos de reação.

[Substrato]	0,1 mM	0,2 mM	0,3 mM	0,4 mM	0,5 mM	0,6 mM
[Inibidor]						
0,050 mM	2,3	8,0	8,9	-1,4	17,6	9,7
0,075 mM	26,1	9,5	0,5	13,1	18,5	12,5
0,300 mM	3,4	14,6	16,8	17,8	29,5	27,0
0,600 mM	29,5	27,0	27,2	41,3	38,4	41,0

O gráfico de Lineweaver-Burk (**Figura 12**) confirma que o ácido psorômico atua como um inibidor da tirosinase. As curvas que representam as reações feitas na presença deste ácido (0,050 e 0,075 mM) intersectam a curva que representa a reação do Branco no quadrante III. Isto caracteriza um comportamento de inibição do tipo mista cooperativa (similar aos resultados com ácido fumarprotocetrárico em altas concentrações). Já as concentrações mais altas de ácido psorômico (0,300 e 0,600 mM) mostram-se como retas mais paralelas em relação ao branco no gráfico de Lineweaver-Burk (**Figura 12**) caracterizando assim uma inibição do tipo incompetitiva.

Sendo assim, o ácido fumarprotocetrárico (**17**) inibe a tirosinase de forma incompetitiva em baixas concentrações e de forma mista cooperativa em altas concentrações, enquanto que, o ácido psorômico (**15**) inibe de forma mista cooperativa em baixas concentrações e de forma incompetitiva em altas concentrações.

A **tabela 22** mostra os valores de K_M e V_{max} dos ensaios como o ácido psorômico. Ao aumentar a concentração do ácido, ocorreu uma diminuição nos valores de K_M e V_{max} . Isto é esperado para inibidores do tipo incompetitivo ou misto.

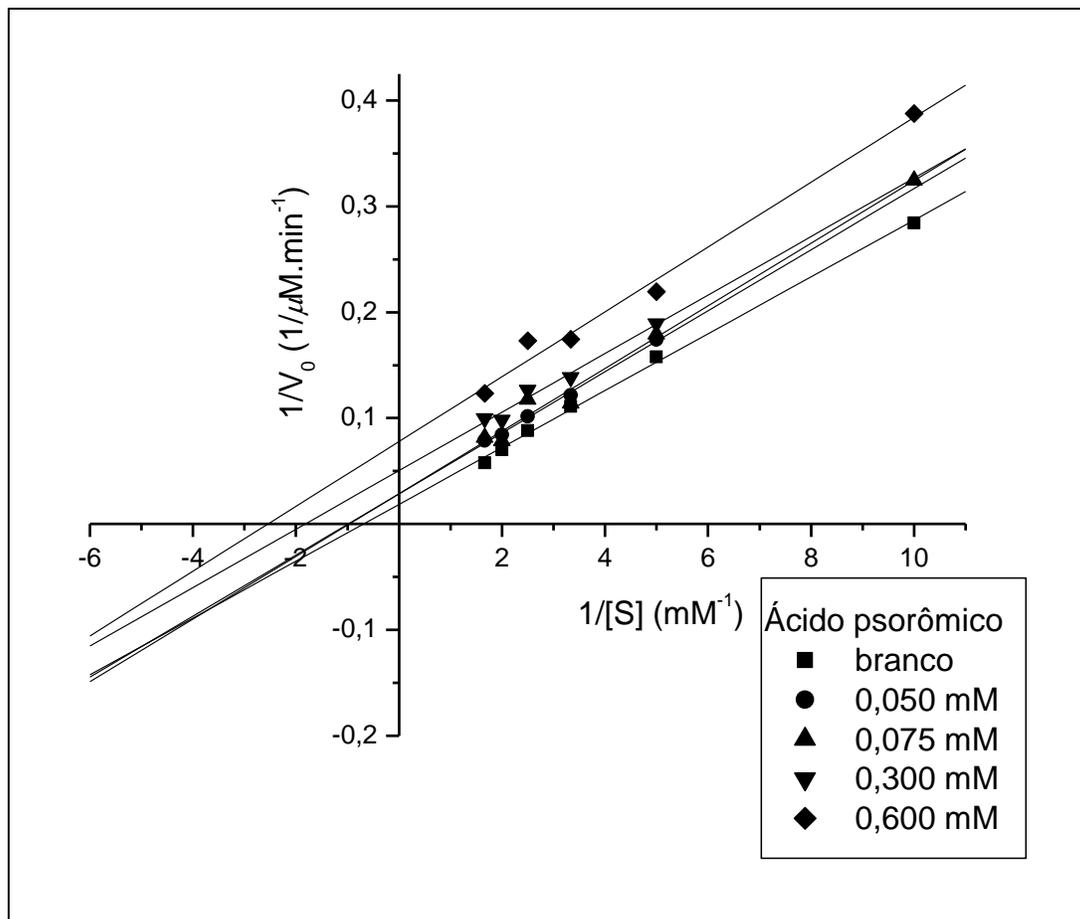


Figura 12 – Gráfico duplo-recíproco Lineweaver-Burk da cinética da reação de oxidação da L-DOPA catalisada pela enzima tirosinase na presença de diferentes concentrações de ácido psorômico (0,050 a 0,600 mM). Todas as curvas possuem R^2 acima de 0,99.

Tabela 22 – Efeito de concentração do ácido psorômico nos parâmetros cinéticos da catálise enzimática da tirosinase com L-DOPA.

Ácido psorômico	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)
Branco	1,44	53,8
0,050 mM	1,02	35,2
0,075 mM	1,04	35,2
0,300 mM	0,55	19,8
0,600 mM	0,39	12,8

Os parâmetros cinéticos da tirosinase utilizada nos ensaios com o ácido psorômico foram calculados e estão descritos na **tabela 23**.

Tabela 23 – Parâmetros cinéticos da enzima tirosinase no ensaio com o ácido psorômico.

Parâmetros	A	B
Unidade Enzimática (mmol produto formado / min)	$1,1 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1}$	$3,5 \times 10^{-5} \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1}$
Atividade Enzimática Específica (unidade / mg enzima)	$2,8 \times 10^{-2} \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	$8,0 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$
Constante Catalítica (unidade / mol de enzima*)	$3,30 \times 10^3 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$	$1,05 \times 10^3 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$
Número de Turnover (constante catalítica / número de sítio ativo)	$3,30 \times 10^3$	$1,05 \times 10^3$

* Peso molecular da tirosinase = 120.000 g / mol (STROTHKAMP et al., 1976).

A - Cálculos realizados a partir do valor de V_{max} (intersecção do eixo y) do branco do gráfico de Lineweaver-Burk.

B - Cálculos realizados a partir do coeficiente angular do gráfico (**Figura 12**) com 0,600 mM de L-DOPA.

4.7 Relação Estrutura-Atividade (Ensaio Enzimáticos)

As depsidonas ácidos fumarprotocetrárico, protocetrárico e psorômico possuem o mesmo padrão de substituição no anel A. As três depsidonas possuem um grupo aldeído ligado ao C-3, uma hidroxila ligada ao C-4 e uma metila ao C-6. A diferença entre as despironas encontra-se no anel B. O padrão de substituição do anel B do ácido protocetrárico e fumarprotocetrárico são iguais. Na posição C-6' ocorre a presença de uma metila, na posição C-3' um álcool, na posição C-2' uma hidroxila e na posição C-7' um ácido carboxílico. A diferença entre elas está no C-9', no ácido fumarprotocetrárico, ocorre a presença de um grupo fumarato esterificado ao oxigênio do grupo alcoólico. Já o anel B do ácido psorômico possui um padrão de substituição diferente, com um ácido carboxílico na posição C-6', uma metoxila na posição C-2' e uma metila na posição C-3'.

São estas diferenças no anel B que possivelmente conferem à estes compostos a diferença na forma de modular a enzima tirosinase. O ácido fumarprotocetrárico comportou-se de maneira geral, como um inibidor incompetitivo, enquanto que, o ácido protocetrárico agiu como um ativante. A única diferença entre eles é o grupo fumarato que confere ao ácido fumarprotocetrárico um volume estérico maior. Um inibidor incompetitivo se liga à enzima após esta ter se ligado ao substrato. Isto ocorre, pois ao acontecer a interação inicial enzima-substrato, ocorre uma modificação na estrutura protéica, disponibilizando assim sítios para que o inibidor incompetitivo interaja também com a enzima dificultando assim a velocidade (finalização) da catálise. Provavelmente, esta inibição catalítica ocorre devido ao volume estérico do grupo fumarato do ácido fumarprotocetrárico que dificulta a liberação do produto catalisado pela enzima e por isso age como um inibidor incompetitivo. Esta conclusão pode ser considerada devido ao ácido protocetrárico não ter se comportado como um inibidor enzimático, mas sim, como um ativador. No entanto, para que esta hipótese possa ser confirmada são necessários estudos posteriores de docagem molecular, *in silico*, com estes compostos a fim de se observar os possíveis sítios de interação entre a enzima e o ácido fumarprotocetrárico, pois este deve interagir com a enzima próximo ao sítio ativo para que o grupo fumarato interaja de alguma forma com o sítio ativo dificultando o processo final da catálise. A **tabela 24** resume os valores de K_M e V_{max} da enzima tirosinase frente aos ácidos fumarprotocetrárico, protocetrárico e psorômico.

Tabela 24 – Valores de K_M (em mM) e V_{max} (em $\mu\text{M}/\text{min}$) da enzima tirosinase nos ensaios com os ácidos fumarprotocetrárico, protocetrárico e psorômico (em mM).

Composto	Ácido fumarprotocetrárico		Ácido protocetrárico		Ácido psorômico	
	K_M	V_{max}	K_M	V_{max}	K_M	V_{max}
Concentração						
Branco	1,78	64,5	1,54	53,4	1,44	53,8
0,050	-	-	-	-	1,02	35,2
0,075	-	-	-	-	1,04	35,2
0,200	1,03	35,4	-	-	-	-
0,300	0,79	27,7	0,28	17,5	0,55	19,8
0,400	-	-	0,36	19,7	-	-
0,500	0,58	20,4	0,23	16,0	-	-
0,600	0,70	20,0	0,29	17,5	0,39	12,8

4.8 Ensaio com Células de Melanoma

Os compostos *R*-(+)-ácido úsnico (**13**), liquexantona (**14**), ácido psorômico (**15**), ácido protocetrárico (**16**), ácido fumarprotocetrárico (**17**), ácido norstítico (**18**), ácido difractáico (**19**), ácido divaricático (**20**), ácido perlatólico (**22**) e atranorina (**21**) foram avaliados quanto a citotoxicidade em células de melanoma murino e humano, B16 e UACC, respectivamente e células normais de fibroblasto murino (3T3). Doxorubicina foi também avaliada analogamente como um controle positivo. Os resultados dos ensaios foram expressos em CI_{50} (concentração necessária, em μM , para inibir o crescimento de 50% das células), assim como I.S. (Índice de Seletividade: CI_{50} células normais (3T3) / CI_{50} células de melanoma (B16 ou UACC)). Os resultados estão apresentados na **tabela 25**.

O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), em seu programa de triagem de drogas anti-tumoral, considera forte atividade antineoplásica substâncias com valores de CI_{50} menor ou igual a $4,0 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Suffness & Pezzuto, 1991). Apesar dos valores de CI_{50} estarem expressos tanto em μM e $\mu\text{g}/\text{mL}$ na **tabela 25**, é preferível discutir os resultados em concentração molar já que os compostos analisados neste trabalho possuem massas molares que variam de 286,27 (liquexantona) a 472,35 (ácido fumarprotocetrárico) g/mol.

Dos compostos avaliados, o ácido protocetrário (**16**) foi o que apresentou maior atividade contra a linhagem de melanoma UACC com CI_{50} de 4,17 μM . Já o ácido divaricático (**20**) foi o que apresentou maior atividade contra a linhagem de melanoma B16 com CI_{50} de 7,83 μM . Sua citotoxicidade também foi alta para a linhagem UACC (CI_{50} 8,01 μM). O ácido perlatólico (**22**), por sua vez, apresentou CI_{50} de 12,3 μM para a mesma linhagem. O ácido norstítico (**18**) também se destacou, dentre os compostos líquênicos, apresentando CI_{50} de 10,5 e 11,5 μM para as linhagens B16 e UACC, respectivamente.

Apesar de todos os compostos de líquens avaliados apresentarem uma atividade citotóxica menor que o controle positivo (doxorubicina), é importante destacar que alguns compostos apresentaram um índice de seletividade mais significativo. Segundo Suffness e Pezzuto (1991 apud HOUGHTON et al., 2007) é considerado significativo um valor acima de dois para este índice. Isto mostra que o composto é pelo menos duas vezes mais citotóxico em células de câncer (neste caso, melanoma) que em células normais. A doxorubicina apresentou um I.S. de 1,04 para a linhagem de melanoma B16. Isto indica que este composto possui uma baixa seletividade, inibindo tanto células de melanoma (B16) como células normais de pulmão (3T3). Os ácidos *R*-(+)-úsico (**13**), divaricático (**20**) e norstítico (**18**), por sua vez, apresentaram I.S. de 3,32, 6,03 e 6,43, respectivamente. Ou seja, estes compostos são pelo menos três vezes mais seletivos para a linhagem de células malignas B16. Já para a linhagem UACC, os compostos que apresentaram I.S. significativos foram os ácidos *R*-(+)-úsico (**13**), psorômico (**15**), perlatólico (**22**), divaricático (**20**), norstítico (**18**) e o ácido protocetrário (**16**) que apresentou I.S. de 16,4 sendo este o maior dentre todos os compostos ensaiados.

O valor de Log P teórico (**tabela 25**) estima o grau de polaridade de uma molécula. Sendo que quanto maior este valor, mais apolar é a molécula, e quanto menor, mais polar. Os valores de Log P calculado para os compostos avaliados variou de 1,18 (ácido úsico) a 9,28 (ácido perlatólico). Não foi possível observar uma correlação entre a atividade antitumoral e a polaridade dos compostos avaliados.

Tabela 25 – Valores de CI₅₀, I.S. e Log P dos compostos **13** a **22** para as linhagens de células B16, UACC e 3T3.

Composto	B16*		I.S.	UACC**		I.S.	3T3***		Log P****
	CI ₅₀			CI ₅₀			CI ₅₀		
	μM	μg/mL		μM	μg/mL		μM	μg/mL	
R-(+)-ácido úsnico (13)	74,1	25,5	3,32	119	41,7	2,07	246	84,9	1,18 ±0,75
Liquexantona (14)	893	256	0,98	1310	376	0,67	873	250	4,07 ±0,51
Ácido psorômico (15)	698	250	0,99	162	58,3	4,27	692	248	3,44 ±0,63
Ácido protocetrário (16)	78,3	29,3	0,88	4,17	1,56	16,4	68,6	25,7	3,29 ±0,67
Ácido fumarprotocetrário (17)	978	462	0,41	600	283	0,67	400	189	3,49 ±0,70
Ácido norstítico (18)	10,5	39,2	6,43	11,1	41,3	6,08	67,5	251	3,05 ±0,85
Ácido difractáico (19)	67,2	25,2	1,29	65,3	24,4	1,33	86,8	32,5	5,48 ±0,42
Ácido divaricático (20)	7,83	3,04	6,03	8,01	3,11	5,89	47,2	18,6	7,15 ±0,42
Atranorina (21)	688	257	1,07	548	205	1,34	735	275	5,75 ±0,49
Ácido perlatólico (22)	43,9	19,5	1,30	12,3	5,46	4,64	57,1	25,4	9,28 ±0,42
Doxorrubicina	0,46	0,25	1,04	0,06	0,03	8,66	0,48	0,26	3,07 ±0,93

* Linhagem B16 – células de melanoma murino.

** Linhagem UACC – células de melanoma humano.

*** Linhagem 3T3 – células normais de pulmão (fibroblasto) murino.

**** Valor teórico calculado pelo programa ACD Labs 6.0.

Os ácidos *R*-(+)-úsnicico (**13**), psorômico (**15**), protocetrário (**16**), fumarprotocetrário (**17**), divaricático (**20**) e perlatólico (**22**) mostraram-se ativos como inibidores da enzima tirosinase (**Figura 3**). Nos ensaios em solução, o ácido fumarprotocetrário e psorômico inibiram a enzima tirosinase em aproximadamente 40% (**Tabelas 15 e 21**). Avaliando estes resultados, aparentemente, não há uma correlação entre os ensaios de cinética enzimática e atividade anti-tumoral realizados para estes compostos fenólicos. Ou seja, um composto que inibe a ação da enzima tirosinase não necessariamente reduz o crescimento de células de melanoma das linhagens testadas. O ácido fumarprotocetrário e psorômico, por exemplo, tiveram baixa atividade citotóxica apesar da alta inibição que promoveram na atividade da enzima tirosinase.

O ácido protocetrário, em comparação com o ácido psorômico e fumarprotocetrário, foi o mais ativo nos ensaios com as células de melanoma com CI_{50} de 4,17 μ M para a linhagem B16 e UACC, respectivamente. No entanto, no ensaio com a enzima tirosinase, o ácido protocetrário promoveu uma ativação da enzima de aproximadamente 19% (**Tabela 18**).

Conclusões

5 - CONCLUSÕES

O *R*-(+)-ácido úsnico (**13**), a liquexantona (**14**), o ácido psorômico (**15**), o ácido protocetrário (**16**), o ácido fumarprotocetrário (**17**), o ácido norstítico (**18**), o ácido difractáico (**19**), o ácido divaricático (**20**), o depsídeo atranorina (**21**) e o ácido perlatólico (**22**) foram isolados a partir das espécies de líquens *Parmotrema dilatatum* (Vain.) Hale, *Usnea subcavata* Motyka, *Usnea* sp., *Ramalina* sp., *Cladonia confusa* (Sant.) Folmm. & Ahti, *Parmotrema lichexantonicum* Eliasaro & Adler, *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. e *Ramalina aspera* Häsänen. As estruturas foram elucidadas por técnicas espectrais de ressonância magnética nuclear.

Com base no ensaio de bioautografia com a enzima tirosinase, os compostos foram avaliados quanto à solubilidade em meio aquoso. Os ácidos fumarprotocetrário, protocetrário e psorômico, apresentaram solubilidade suficiente em meio aquoso contendo DMSO e foram selecionados para ensaios de cinética com a enzima tirosinase. Nestes ensaios, os ácidos fumarprotocetrário e psorômico inibiram a enzima de forma incompetitiva e mista. Já o ácido protocetrário ativou a enzima.

Todos os compostos (**13** a **22**) foram submetidos a ensaios com células de melanoma das linhagens B16 e UACC. Os resultados mostraram que o ácido protocetrário foi o mais ativo para a linhagem UACC, com CI_{50} de 4,17 μM e I.S. de 16,4. O ácido divaricático foi o mais ativo para a linhagem B16 apresentando CI_{50} de 7,83 μM e I.S. de 6,03. No entanto, o ácido norstítico foi o mais seletivo (I.S. 6,43) para esta linhagem.

Os resultados obtidos mostraram que alguns dos compostos de líquens são promissores moduladores da enzima tirosinase e inibidores do crescimento de células de melanoma B16 (murino) e UACC (humano).

Referências

6 - REFERÊNCIAS

- AHMADJIAN, V. The Lichen Symbiosis. *Willey & Sons*, New York. **1993**.
- BAČKOROVÁ, M.; BAČKOR, M.; MIKEŠ, J.; JENDŽELOVSKÝ, R.; FEDOROČKO, P. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyroforic acid. *Toxicology in Vitro*. **2011**, 25, 37-44.
- BÉZIVIN, C.; TOMASI, S.; DÉVÉHAT, F. L-L; BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*. **2003**, 10, 499-503.
- BÉZIVIN, C.; TOMASI, S.; ROUAUD, I.; DELCROS, J-G.; BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of compounds from the lichen: *Cladonia convoluta*. *Planta Medica*. **2004**, 70(9), 874-877.
- BJERKE, J. W.; LERFALL, K.; ELVEBAKK, A. Effects of ultraviolet radiation and PAR on the content of usnic and divaricatic acids in two arctic-alpine lichens. *Photochemical & Photobiological Sciences*. **2002**, 1(9), 678-685.
- BOUSTIE, J.; GRUBE, M. Lichens – A promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources*. **2005**, 3(2), 273-287.
- CAIN, B. F. Potential anti-tumor agents. I. Polyporic acid series. *Journal of the Chemical Society*. **1961**, 936-40.
- CARDARELLI, G. S.; SERINO, G.; CAMPANELLA, L.; ERCOLE, F.; DE CICCO NARDONE, F.; ALESIANI, O.; ROSSIELLO, F. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. *Cellular Molecular Life Science*. **1997**, 53(8), 667-672.

CARLOS, I. Z.; QUILLES, M. B.; CARLI, C. B. A.; MAIA, D. C. G.; BENZATTI, F. P.; LOPES, T. I. B.; GIANNI, A. S.; BRUM, R. L.; VILEGAS, W. S.; LOUDES, C.; HONDA, N. K. Lichen metabolites modulate hydrogen peroxide and nitric oxide in mouse macrophages. *Zeitschrift für Naturforschung, C*. **2009**, 64(9/10), 664-672.

CHEN, J. S.; WEI, C-I.; ROLLE, R. S.; OTWELL, W. S.; BALABAN, M. O.; MARSHALL, M. R. Inhibitory effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenol oxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1991**, 39(8), 1396-401.

COCCHIETTO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P. L.; SAVA, G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften*. **2002**, 89, 137-146.

COPELAND, R. A. Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery. *John Wiley & Sons*, New York. **2005**.

CORRECHE, E. R.; ENRIZ, R. D.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J.; GOMEZ-LECHON, M. J. Cytotoxic and apoptotic effects on hepatocytes of secondary metabolites obtained from lichens. *ATLA, Alternatives to Laboratory Animals*. **2004**, 32(6), 605-615.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*. **2005**, 100(1/2), 72-79.

DIMITROULIS, J.; STATHOPOULOS, G. P. Evolution of non-small cell lung cancer chemotherapy (review). *Oncology Reports*. **2005**, 13(5), 923-930.

ELIX, J. A. Biochemistry and Secondary metabolites. In *Lichen Biology*. Thomas H. Nash III (Editor). *Cambridge University Press*, Cambridge. **1996**.

FALK, T.; ZHANG, S.; SHERMAN, S. J. Pigment epithelium derived factor (PEDF) is neuroprotective in two in vitro models of Parkinson's disease. *Neuroscience*. **2009**, 458, 49-52.

FERNANDEZ, E.; QUILHOT, W.; GONZALEZ, I.; HIDALGO, M. E.; MOLINA, X.; MENESES, I. Lichen metabolites as UVB filters. Lichen metabolites show photoprotector capacity. *Cosmetics & Toiletries*. **1996**, 111(12), 69.

FRESHNEY, I.R. Culture of animal cells. A manual of Basic Technique. 5^o ed. *Wiley-Liss*, New York. **2005**.

GALLOWAY, D. J. Lichen Biogeography. In *Lichen Biology*. Thomas H. Nash III (Editor). *Cambridge University Press*, Cambridge. **1996**.

GARCÍA-BORES, A. M.; AVILA, J. G. Natural Products: Molecular Mechanisms in the photochemoprevention of skin cancer. *Revista Latinoamericana de Química*. **2008**, 36(3), 83-102.

GIANINI, A. S. Alquilresorcinóis – Preparação a partir de depsídeos de líquens. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Dissertação de Mestrado. **2007**.

GREGG, R. K.; NICHOLS, L.; CHEN, Y.; LU, B.; ENGELHARD, V. H. Mechanisms of spatial and temporal development of autoimmune vitiligo in tyrosinase-specific TCR transgenic mice. *The Journal of Immunology*. **2010**, 184, 1909-1917.

HARALDSDÓTTIR, S.; GUOLAUGSDÓTTIR, E.; INGÓLFSDÓTTIR, K.; ÖGMUNDSDÓTTIR, H. M. Anti-proliferative effects of lichen-derived lipoxygenase inhibitors on twelve human cancer cell lines of different tissue origin *in vitro*. *Planta Medica*. **2004**, 70(11), 1098-1100.

HIGUCHI, M.; MIURA, Y.; BOOHENE, J.; KINOSHITA, Y.; YAMAMOTO, Y.; YOSHIMURA, I.; YAMADA, Y. Inhibition of tyrosinase activity by cultured lichen tissues and bionts. *Planta Medica*. **1993**, 59(3), 253-255.

HONG, H.; NEAMATI, N.; WANG, S.; NICKLAUS, M. C.; MAZUMDER, A.; ZHAO, H.; BURKE, T. R. Jr.; POMMIER, Y.; MILNE, G. W. A. Discovery of HIV-1 integrase inhibitors by pharmacophore searching. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1997**, 40, 930-936.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J.; LEE, C. C. The sulphorhodamide (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anti cancer activity. *Methods*. **2007**, 42, 377-387.

HUNECK, S.; YOSHIMURA, I. Identification of Lichen Substances. *Springer*. Germany. **1996**.

HUNECK, S. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften*. **1999**, 86, 559-570.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335. Acesso em fevereiro de 2011.

INGÓSDÓTIR, K.; WIEDEMANN, B.; BIRGISDÓTIR, M.; NENNINGER, A.; JÓNSDÓTTIR, S.; WAGNER, H. Inhibitory effects of baecomycesic acid from the lichen *Thamnia subuliformis* on 5-lipoxygenase *in vitro*. *Phytomedicine*. **1997**, 4, 125.

ITHARAT A.; HOUGHTON, P.J.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P.J.; SAMPSON, J.H.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology*. **2004**, 90, 33-38.

JIMÉNEZ, M.; CHAZARRA, S.; ESCRIBANO, J.; CABANES, J.; GARCIA-CARMONA, F. Competitive Inhibition of Mushroom Tyrosinase by 4-Substituted Benzaldehydes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**, 49(8), 4060-4063.

KAH, J. C. Y.; KHO, K. W.; LEE, C. G. L.; SHEPPARD, C. J. R.; SHEN, Z. X.; SOO, K. C.; OLIVO, M. C. Early diagnosis of oral cancer based on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. **2007**, 2(4), 785-798.

KINOSHITA, K.; MATSUBARA, H.; KOYAMA, K.; TAKAHASHI, K.; YOSHIMURA, I.; YAMAMOTO, Y.; MIURA, Y.; KINOSHITA, Y.; KAWAI, K. I. Topics in the chemistry of lichen compounds. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory*. **1994**, 76, 227-233.

KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D. ¹H and ¹³C-NMR and biological activity investigations of four lichen-derived compounds. *Phytochemistry Annals*. **1999**, 10, 279-284.

KOPARAL, A. T.; AYAZ TUYLU, B.; TURK, H. *In vitro* cytotoxic activities of (+)-usnic acid and (-)-usnic acid on V79, A549, and human lymphocyte cells and their non-genotoxicity on human lymphocytes. *Natural Products Research, Part B*. **2006**, 20(14), 1300-1307.

KRAMER, K.J.; HOPKINS, T.L. Tyrosinase for Insect Cuticle Tanning. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. **1987**, 6, 279-301.

KRISTMUNDSDÓTTIR, T.; JÓNSDÓTTIR, E.; ÖGMUNDSDÓTTIR, H. M.; KRISTÍN, I. Solubilization of poorly soluble lichen metabolites for biological testing on cell lines. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2005**, 24(5), 539-543.

KUBO, I. Tyrosinase inhibitors from plants. *Revista Latinoamericana de Química*. **2000**, 28/1, 7-20.

KRUPYANKO, V. I. Perspectives of data analysis of enzyme inhibition and activation, Part 4: Equations for calculation of constants of enzyme activation and inhibition. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. **2010**, 24(3), 145-154.

LIMA, R. C.; NASCIMENTO, S. C.; PEREIRA, E. C. G.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Atividade citotóxica e antitumoral de extratos liquênicos. *Boletim da Sociedade Broteriana*. **1990**, 63(2), 339-348.

MAYER, M.; O'NEILL, M. A.; MURRAY, K. E.; SANTOS-MAGALHAES, N. S.; CARNEIRO-LEAO, A. M. A.; THOMPSON, A. M.; APPLEYARD, V. C. L. Usnic acid: A non-genotoxic compound with anti-cancer properties. *Anti-Cancer Drugs*. **2005**, 16(8), 805-809.

MATOBA, Y.; KUMAGAI, T.; YAMAMOTO, A.; YOSHITSU, H.; SUGYIAMA, M. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *Journal of Biological Chemistry*. **2006**, 281, 13, 8981-8990.

MATSUBARA, H.; KINOSHITA, K.; KOYAMA, K.; TAKAHASHI, K.; YOSHIMURA, Y.; YAMAMOTO, Y.; MIURA, Y. KINOSHITA, Y. Anti-tyrosinase activity of lichen metabolites and their synthetic analogues. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory*. **1997**, 83, 179-185.

MICHELETTI, A. C.; BEATRIZ, A.; LIMA, D. P.; HONDA, N. K.; PESSOA, C. O.; MORAES, M. O.; LOTUFO, F. V.; MAGALHÃES, H. I. F.; CARVALHO, N. C. P. Chemical constituents of *Parmotrema lichexanthonicum* Eliasaro & Adler - isolation, structure modification and evaluation of antibiotic and cytotoxic activities. *Química Nova*. **2009**, 32(1), 12-20.

MOLLINEDO, P.; VILA, J. L.; STERNER, O. Antioxidant and photoprotective activity of secondary metabolites isolated from lichens. *Revista Boliviana de Química*. **2003**, 20(1), 21-27.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; RAY_GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug

Screen Using Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *Journal of National Cancer Institute*. **1991**, 83(11), 757-766.

MÜLLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2001**, 56, 9-16.

NAKAZAWA, S.; KOMATSU, N.; YAMAMOTO, I.; FUJIKAWA, F.; HARAI, K. Antitumor activity of components of lichens. 1. Effect of psoromic acid. *Journal of Antibiotics*. **1992**, 15(Ser. B), 282-289.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. *W. H. Freeman and Company*. New York. **2005**. 4th Edition.

NERYA, O.; MUSA, R.; KHATIB, S.; TAMIR, S.; VAYA, J. Chacones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers. *Phytochemistry*. **2004**, 65, 1389-1395.

OOZEKI, H.; TAJIMA, R.; NIHEI, K. Molecular design of potent inhibitors having the bibenzyl skeleton. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2008**, 18, 5252-5254.

PENGSUPARP, T.; CAI, L.; CONSTANT, H.; FONG, H. H. S.; LIN, L-Z.; KINGHORN, A. D.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A.; INGOLFSDOTTIR, K.; WAGNER, H.; HUGHES, S. H. Mechanistic evaluation of new plant-derived compounds that inhibit HIV-1 reverse transcriptase. *Journal of Natural Products*. **1995**, 58,1024.

PEREIRA, E. C.; NASCIMENTO, S. C.; LIMA, R. C.; SILVA, N. H.; SILVA, N. H.; OLIVEIRA, A. F. M.; BANDEIRA, E.; BOITARD, M.; BERIEL, H.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. Analysis of *Usnea fascicata* Crude Extract with Antineoplastic Activity. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*. **1994**, 19(1/2), 47-52.

PEREZ, E. A. Paclitaxel in breast cancer. *Oncologist*. **1998**, 3(6), 373-389.

QIU, L.; CHEN, Q-H.; ZHUANG, J-X.; ZHONG, X.; ZHOU, J-J.; GUO, Y-J.; CHEN, Q-X. Inhibitory effects of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid on the activity of mushroom tyrosinase. *Food Chemistry*. **2009**, 112, 609-613.

RANKOVIĆ, B.; MISIĆ, M.; SUKDOLAK, S. The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **2008**, 24, 1239-1242.

RANSON, M.; THATCHER, N. Paclitaxel: a hope for advanced non-small cell lung cancer? *Expert Opinion on Investigational Drugs*. **1999**, 8(6), 837-848.

RAO, B. V.; RAO, C. V.; SUBRAHMANYAM, C.; JAIRAJ, M. A. Chemical constituents of *Rhizophora mucronata* of Andaman and Nicobar Islands. *Journal of the Indian Chemical Society*. **2005**, 82(2), 155-157.

RASHID, M. A.; MAJID, M. A.; QUADER, M. A. Complete NMR assignments of (+)-usnic acid. *Fitoterapia*. **1999**, 113-115.

RIBEIRO-COSTA, R. M.; ALVES, A. J.; SANTOS, N. P.; NASCIMENTO, S. C.; GONÇALVES, E. C. P.; SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. *In vitro* and *in vivo* properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. *J. Microencapsulation*. **2004**, 21(4), 371-384.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; NELSON, F. Patologia – Bases Patológicas das Doenças. *Elsevier*. Rio de Janeiro. **2005**. 7ª Ed.

SABOURY, A. A. Enzyme Inhibition and Activation: A General Theory. *Journal of the Iranian Chemical Society*. **2009**, 6(2), 219-229.

SÁNCHEZ-FERRER, A.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; GARCÍA-CARMONA, R. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1994**, 1247, 1-11.

SANTOS, N. P. Estudo Comparativo da Ação Antitumoral dos Extratos e Frações Purificadas de *Cladonia verticillaris* (líquen) Contra Diferentes Tumores Sólidos Experimentais. Preparação a partir de depsídeos de líquens. Universidade Federal de Pernambuco. **1996**.

SANTOS, N. P.; NASCIMENTO, S. C.; SILVA, J. F.; PEREIRA, E. C. G.; SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; SANTOS-MAGALHAES, N. S. Usnic acid-loaded nanocapsules: An evaluation of cytotoxicity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. **2005**, 15(5), 355.

SEO, S-Y.; SHARMA, V. K.; SHARMA, N. Mushroom Tyrosinase: Recent Prospects. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **2003**, 51, 2837-2853.

SHABANI, F.; SARIRI, R. Increase of melanogenesis in the presence of fatty acids. *Pharmacologyonline*. **2010**, 1, 314-323.

SHIBUYA, M.; EBIZUKA, Y.; NOGUCHI, H.; IITAKA, Y.; SANKAWA, U. Inhibition of prostaglandin biosynthesis by 4-O-methylcryptochlorophaeic acid; synthesis of monomeric arylcarboxylic acids for inhibitory activity testing and X-ray analysis of 4-O-methylcryptochlorophaeic acid. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **1983**, 31, 407.

SIMMONDS, M. A. Cancer Statistics, 2003: further decrease in mortality rate, increase in persons living with cancer. *Cancer Journal for Clinicians*. **2003**, 53(4).

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New Colorimetric

Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute*. **1990**, 82, 1107-1112.

SONG, Y-H. Why tyrosinase for treatment of melanoma. *Lancet*. **1997**, 350, 82-83.

STRATTON, S. P.; DORR, R. T.; ALBERTS, D. S. The state-of-the-art in chemoprevention of skin cancer. *European Journal of Cancer*. **2000**, 36, 1292-1297.

STROTHKAMP, K. G.; JOLLEY R. L.; MASON, H. S. Quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **1976**, 70, 519-524.

SU, B-N.; CUENDET, M.; NIKOLIC, D.; KRISTINSSON, H.; INGÓLFSDÓTTIR, K.; BREEMEN, R. B.; FONG, H. H. S.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. NMR Study of fumarprotocetraric acid, a complex lichen depsidone derivative from *Cladonia furcata*. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **2003**, 41, 391-394.

SUAREZ, A. I.; BLANCO, Z.; DELLE MONACHE, F.; COMPAGNONE, R. S.; ARVELO, F. Three new glutarimide alkaloids from *Croton cuneatus*. *Natural Product Research*. **2004**, 18(5), 421-426.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays for Bioactivity. In *Methods in Plant Biochemistry*. K. Hostettmann (Editor). *Academic Press*, London. **1991**, vol.6.

SUGUMARAN, M. Molecular mechanisms for mammalian melanogenesis. Comparison with insect cuticular sclerotization. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. **1991**, 293, 1(2), 4-10.

SUNDHOLM, R. G.; HUNECK, S. ¹³C NMR-Spectra of Lichen Depsides, Depsidones and Depsones. 2. Compounds of the β -orcinol series. *Chemica Scripta*. **1981**, 18, 233-236.

TAKAI, M.; UEHARA, Y.; BEISLER, J. A. Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1979**. 22, 1380-1384.

TANAKA, K.; FUKASE, K. Recent advances in positron-emission tomography (PET) imaging of biomolecules: from chemical labeling to cancer diagnostics. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. **2008**, 5(3), 153-162.

TOURINHO, A.; BUZAID, C. Fotemustina no tratamento de melanoma metastático. *Prática Hospitalar*. **2004**, 4(33).

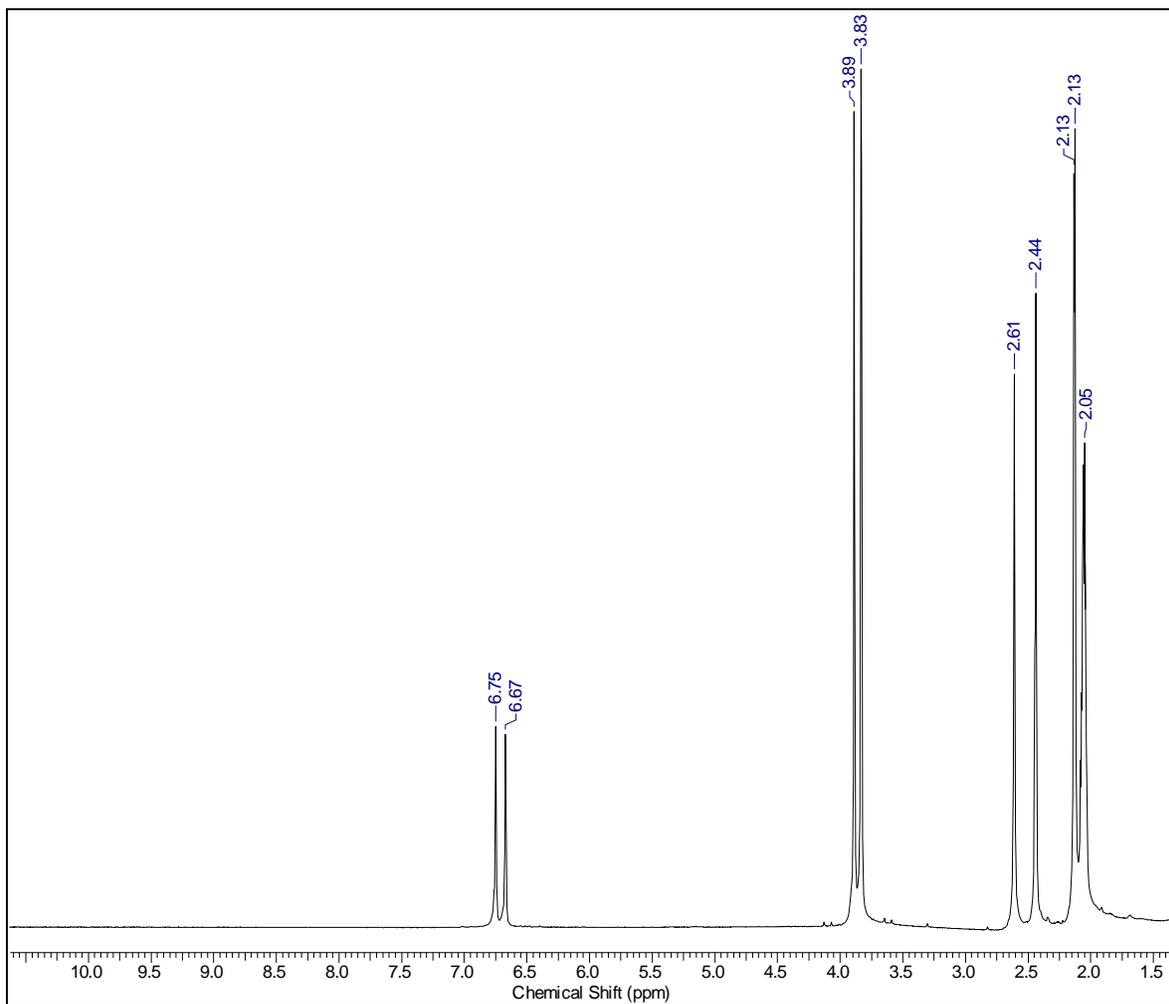
VAUGHN, D. J. Review and outlook for the role of paclitaxel in urothelial carcinoma. *Seminars in Oncology*. **1999**, 26(1/2), 117-122.

WANGTHONG, S.; TONSIRIPAKDEE, I.; MONHAPHOL, D.; NONTHABENJAWAN, R.; WANISHWECHARUNGRUANG, S. P. Post TLC developing technique for tyrosinase inhibition detection. *Biomedical Chromatography*. **2007**, 21, 94-100.

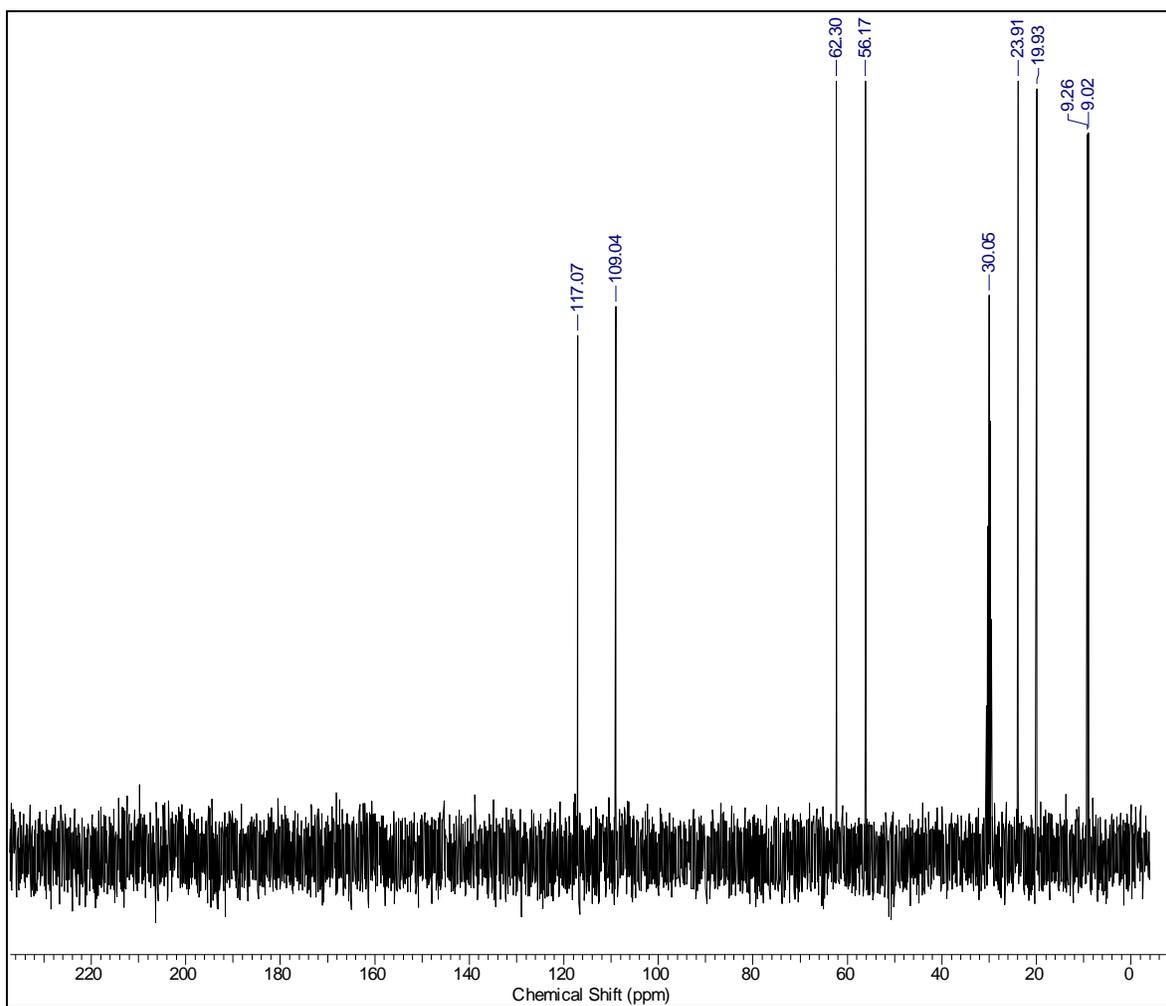
WILLIS, R. A. The Spread of Tumors in the Human Body. *Butterworth & Co.* London. **1952**.

YAMAMOTO, Y.; MIURA, M.; KINOSHITA, Y.; HIGUCHI, M.; YAMADA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H.; KOSHIMIZU, K. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **1995**, 43(8), 1388-1390.

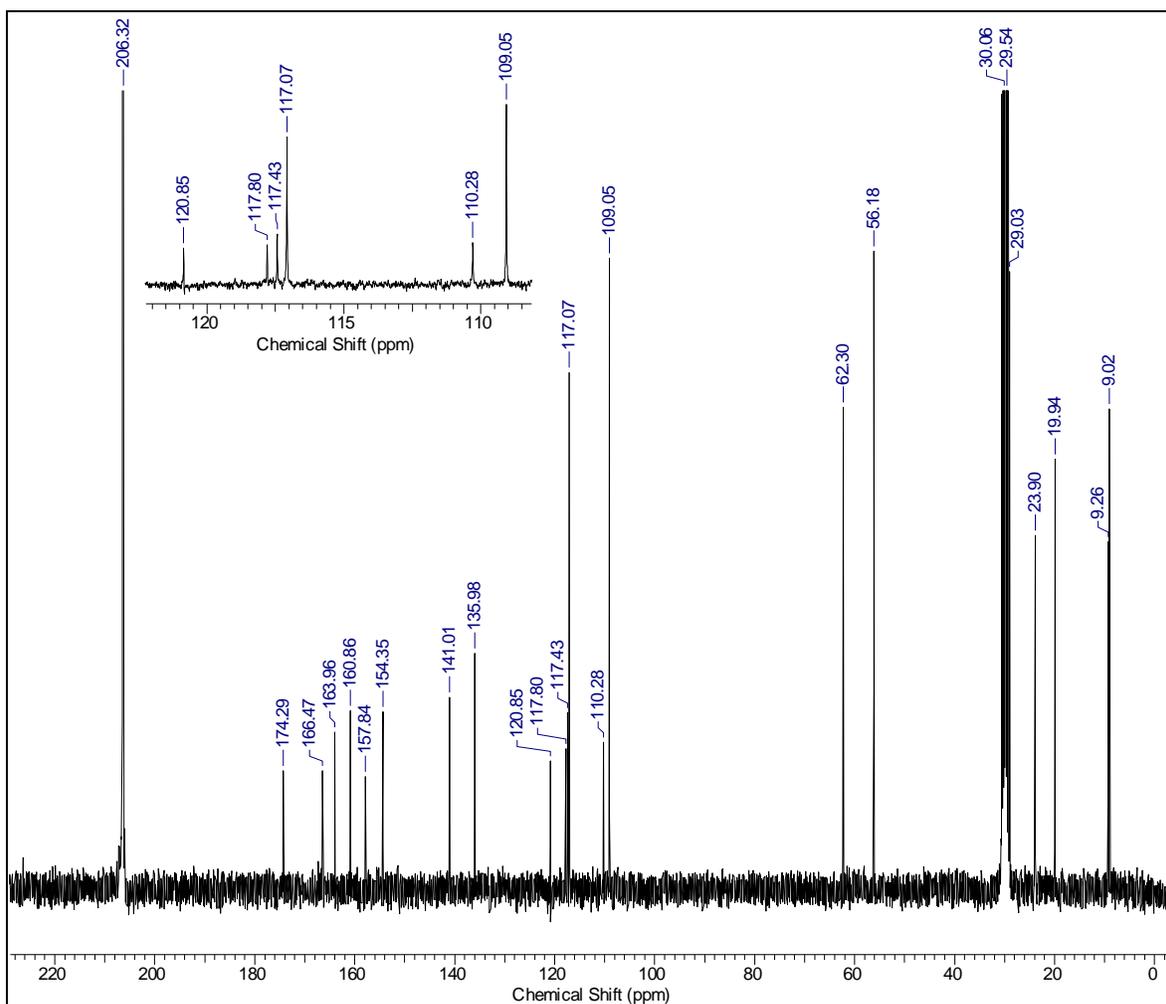
Anexo



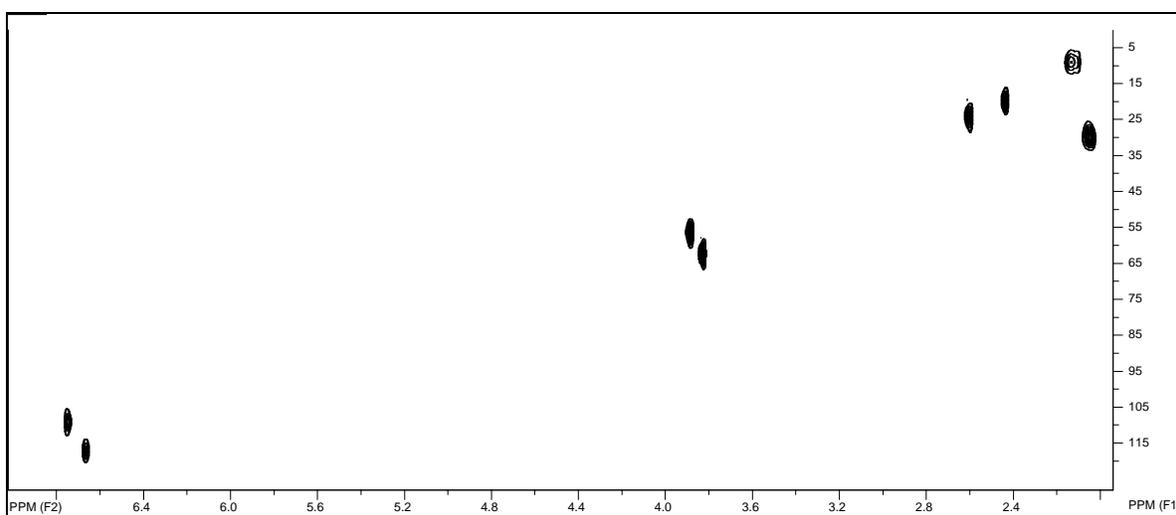
Espectro 1a – Espectro de RMN de ^1H do ácido difractáico, em acetona- d_6 .



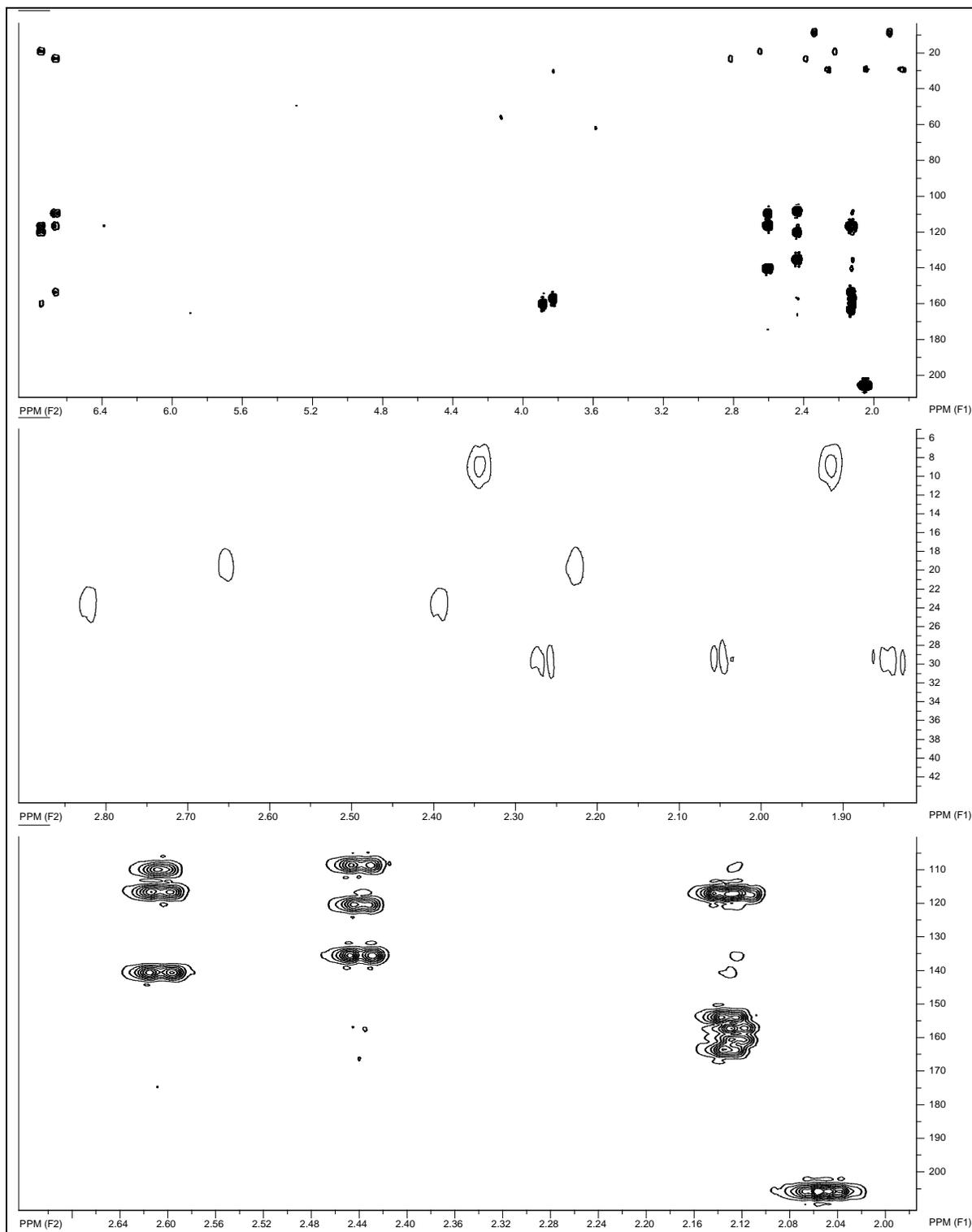
Espectro 1b – Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135) do ácido difractáico, em acetona- d_6 .



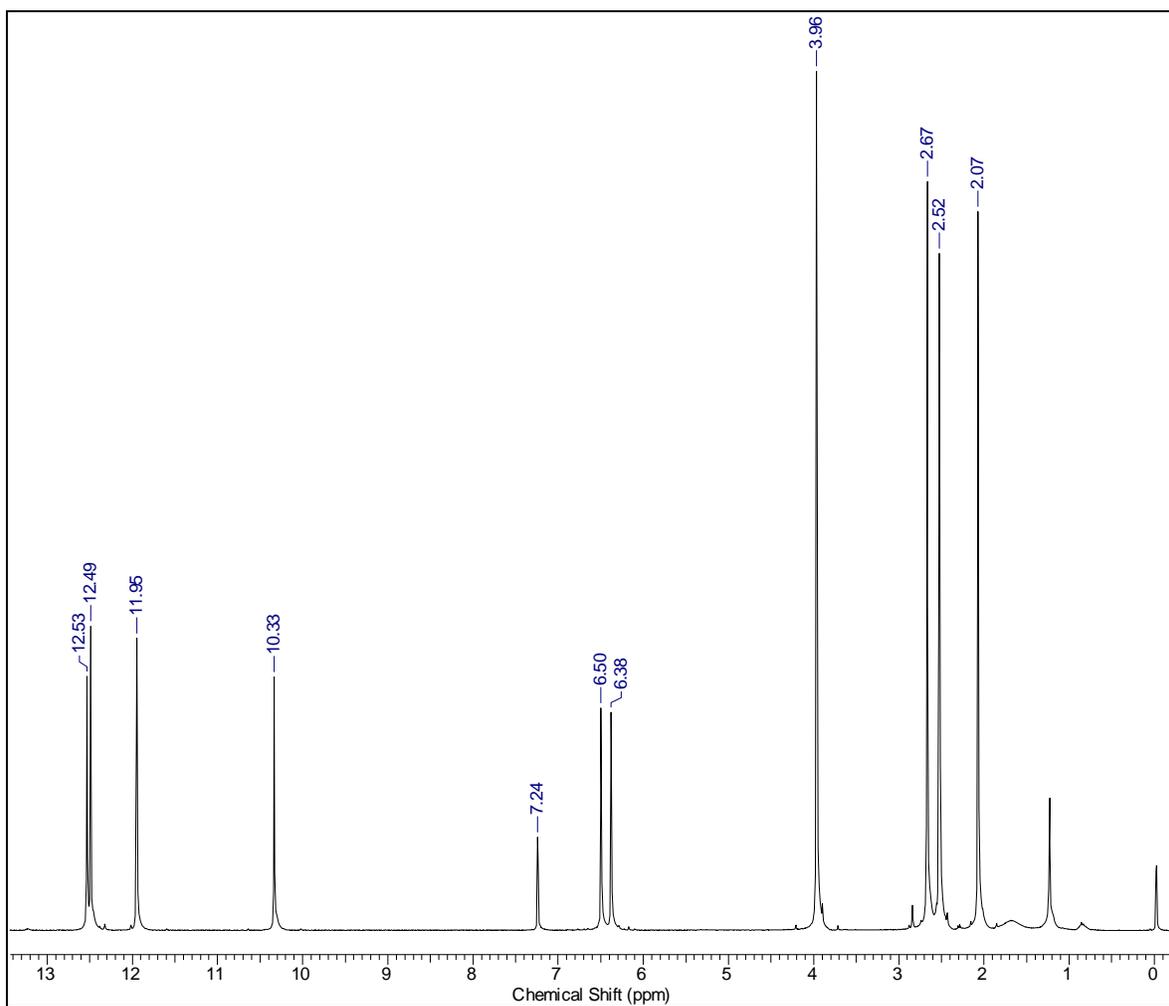
Espectro 1c – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido difractáico, em acetona- d_6 .



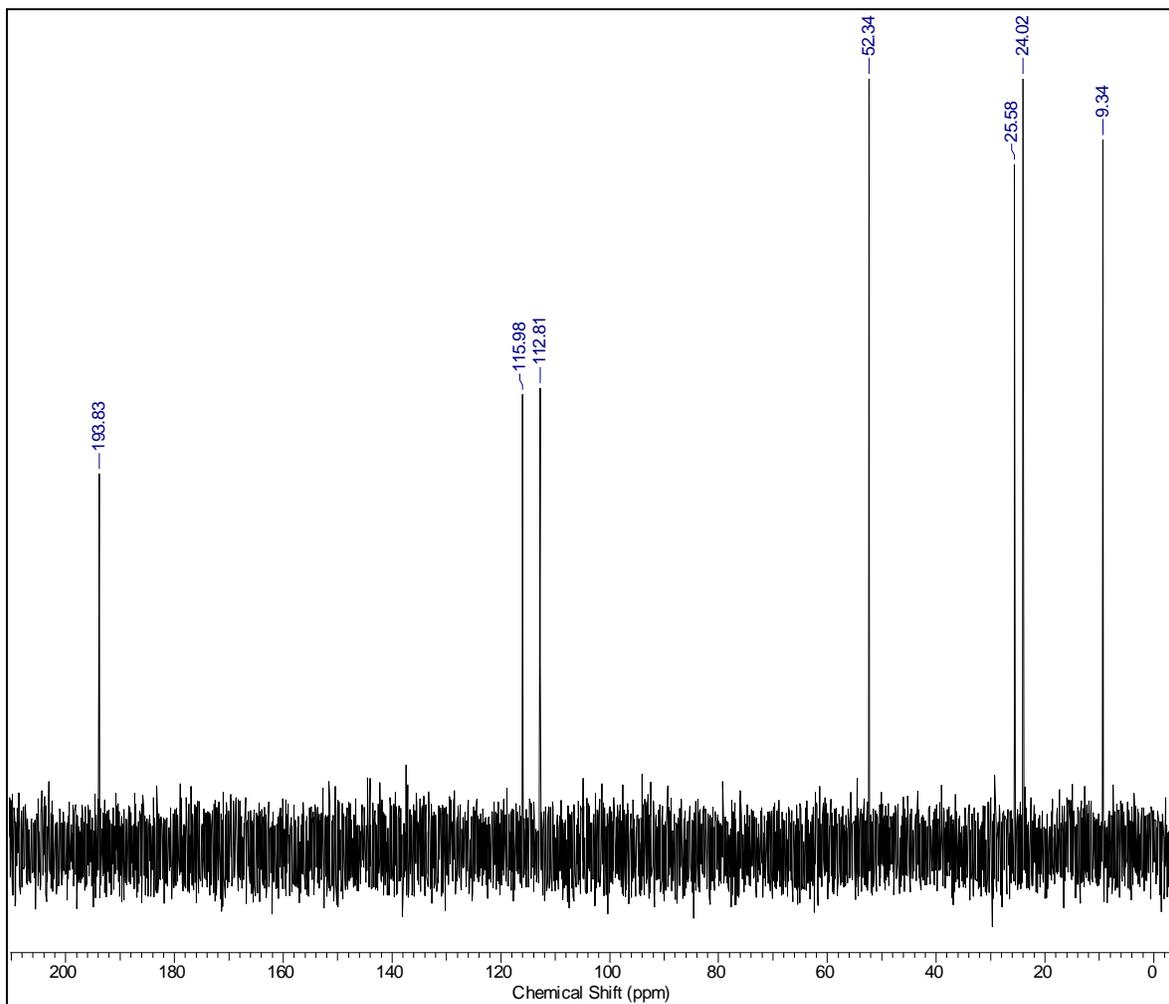
Espectro 1d – Correlação ^1H e ^{13}C gHSQC do ácido difractáico, em acetona- d_6 .



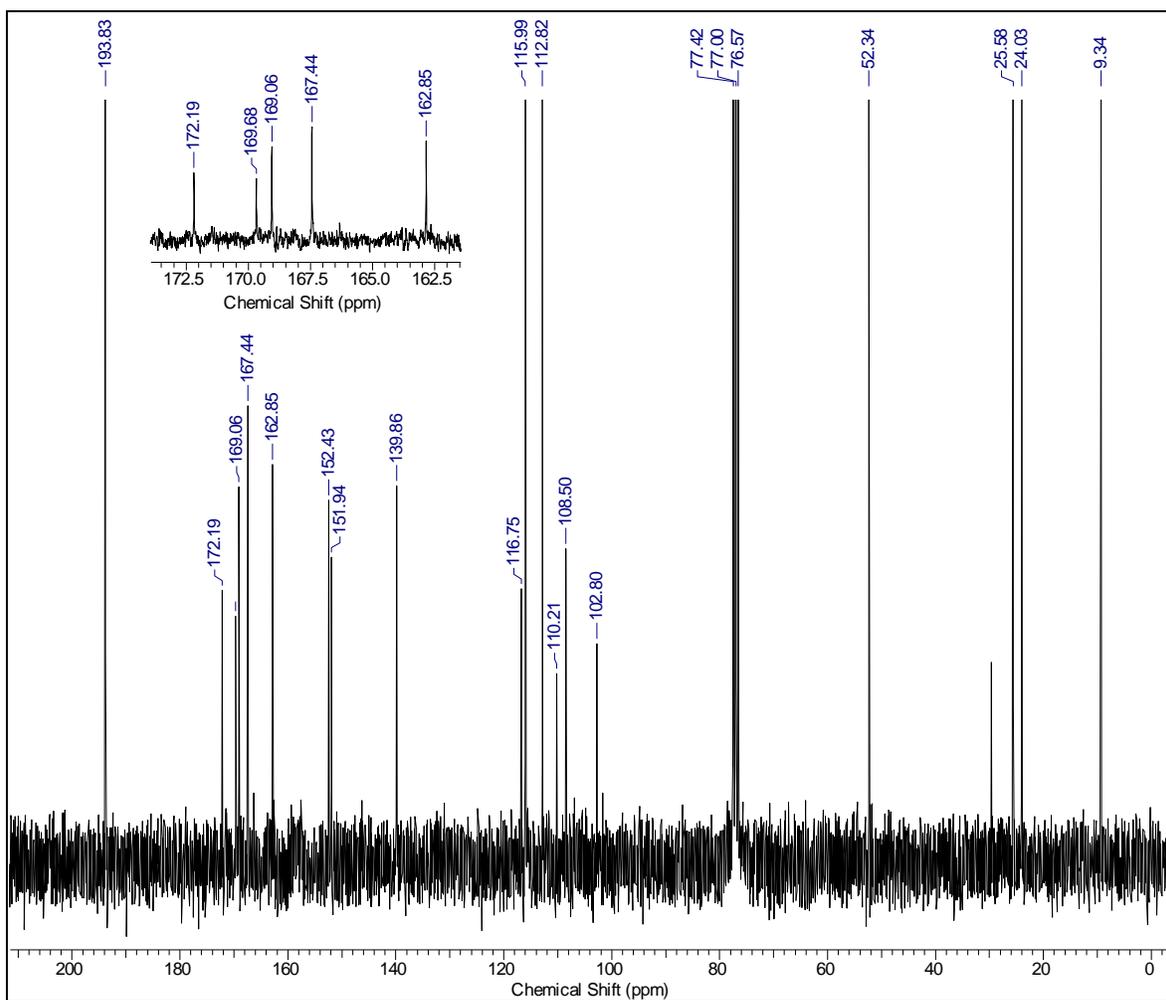
Espectro 1e – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC do ácido difractáico, em acetona- d_6 .



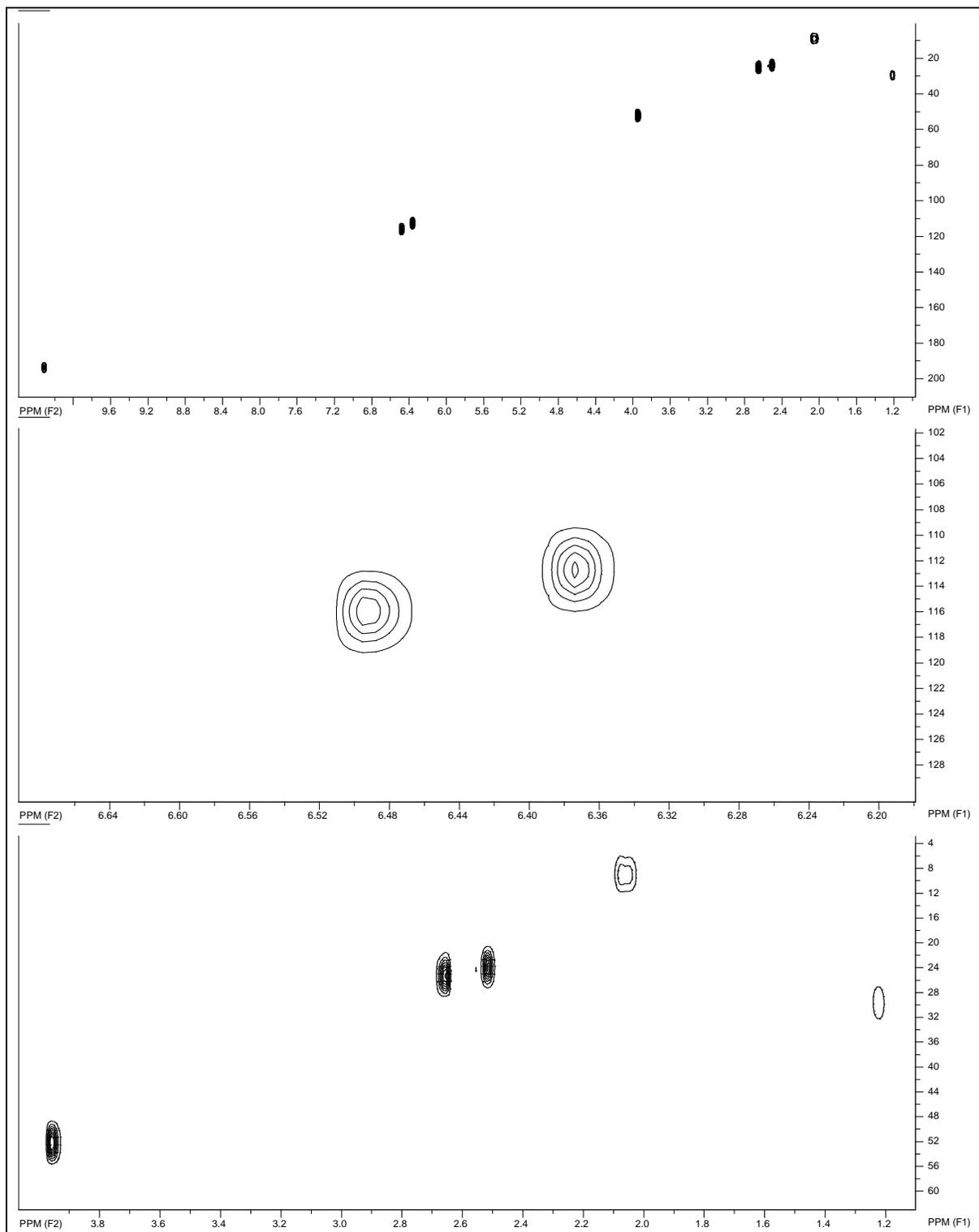
Espectro 2a – Espectro de RMN de ^1H do depsídeo atranorina, em CDCl_3 .



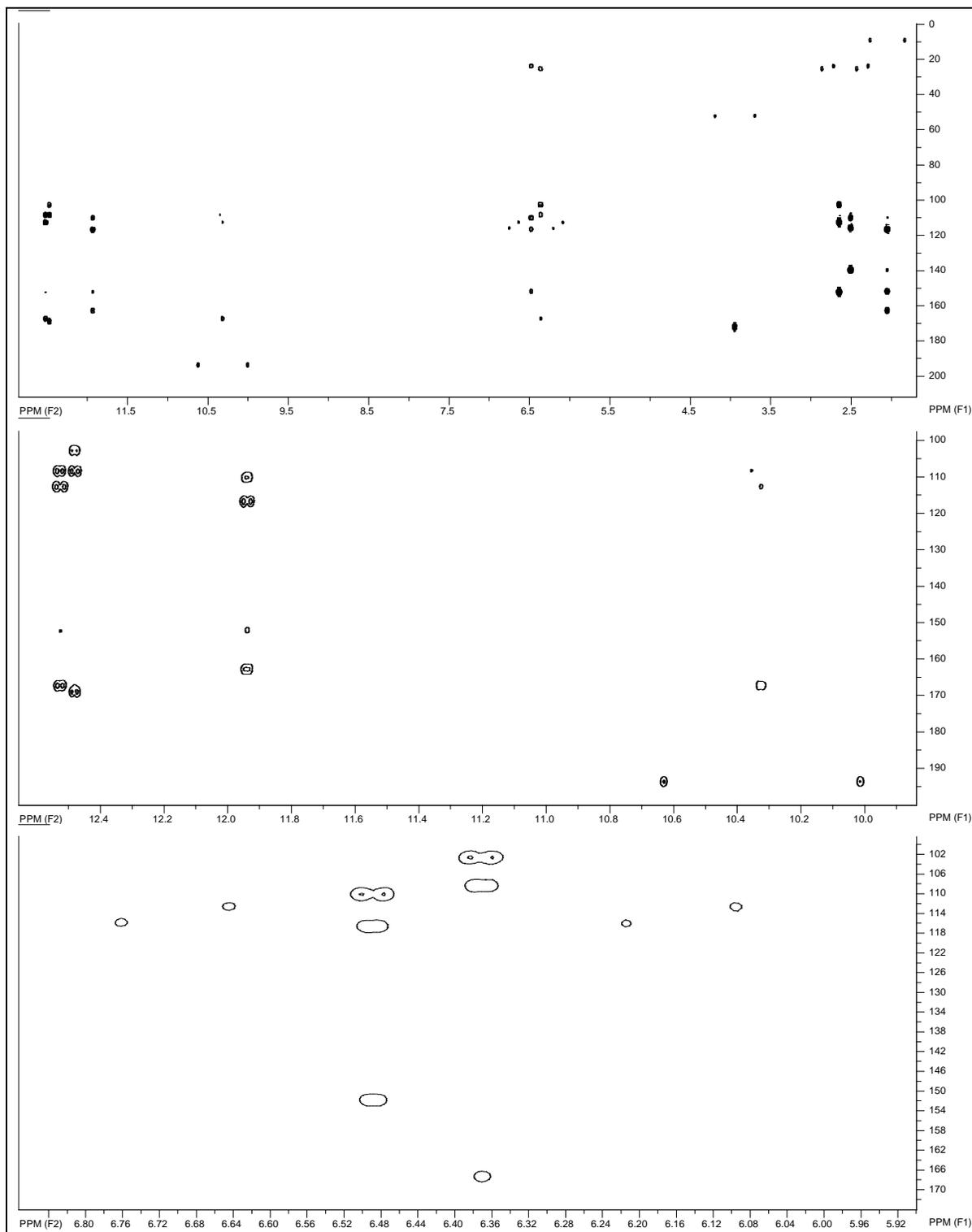
Espectro 2b – Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135) do depsídeo atranorina, em CDCl_3 .



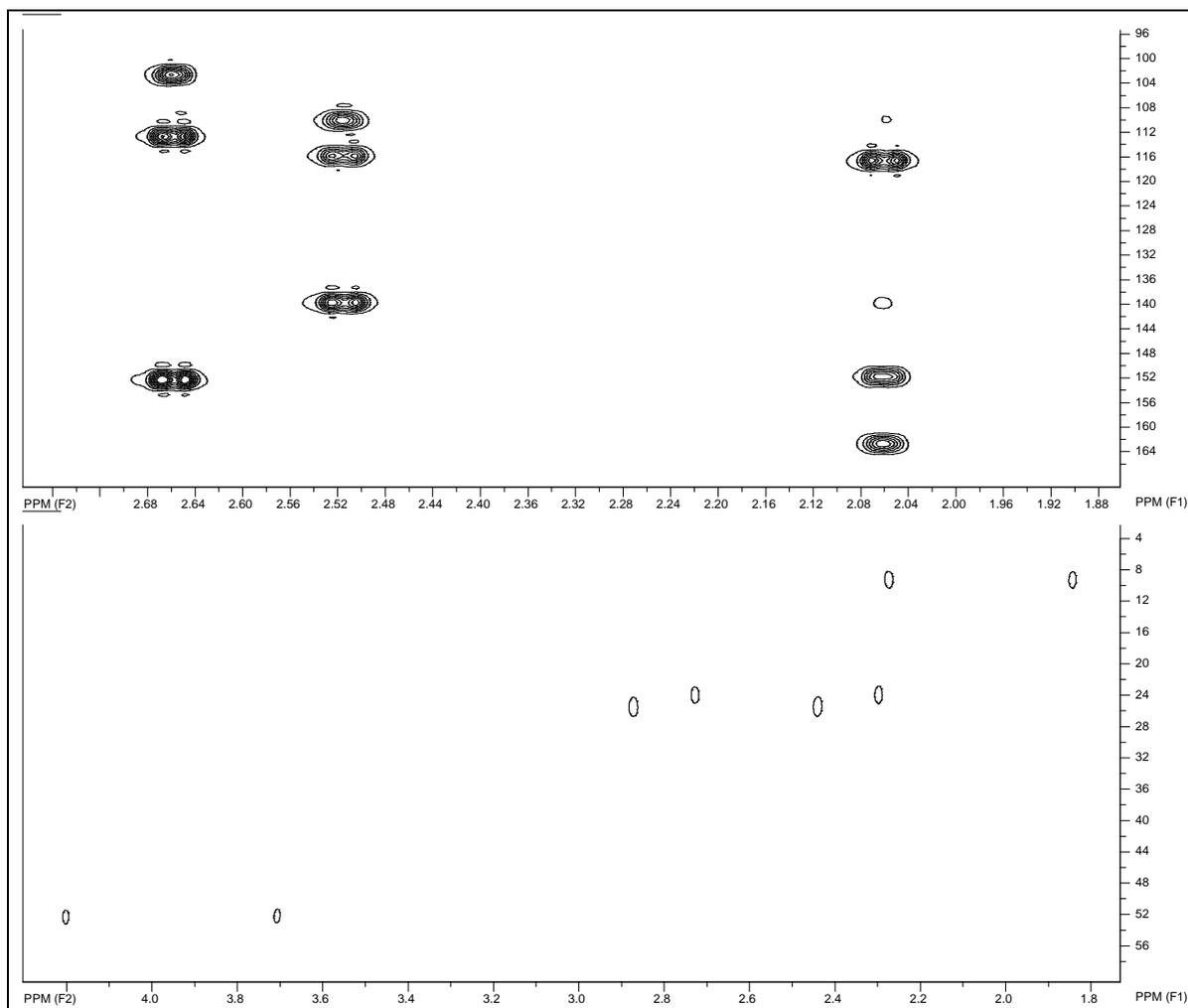
Espectro 2c – Espectro de RMN de ^{13}C do depsídeo atranorina, em CDCl_3 .



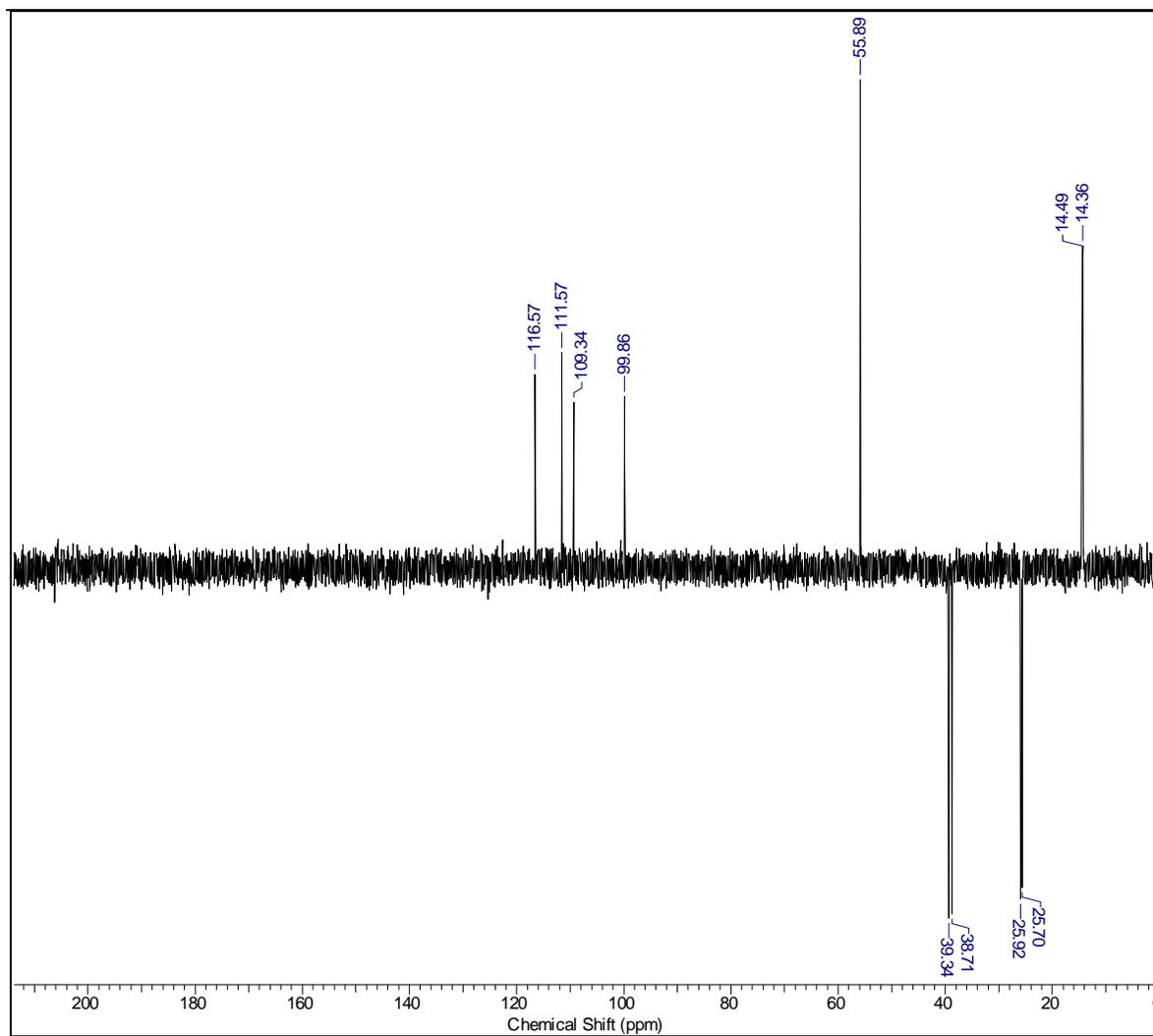
Espectro 2d – Correlação ^1H e ^{13}C gHSQC do depsídeo atranorina, em CDCl_3 .



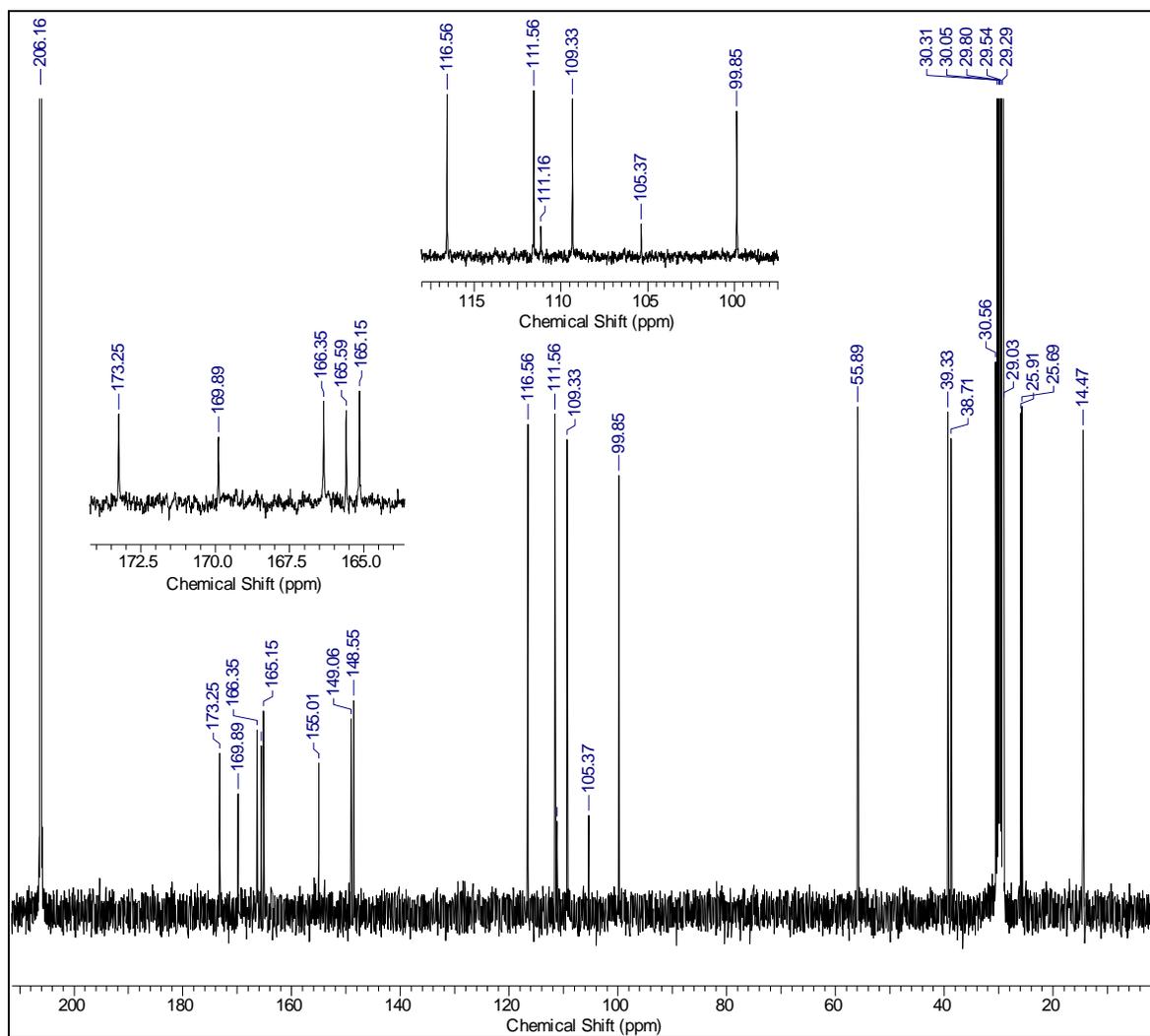
Espectro 2e₁ – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC do depsídeo atranorina, em CDCl_3 (parte 1).



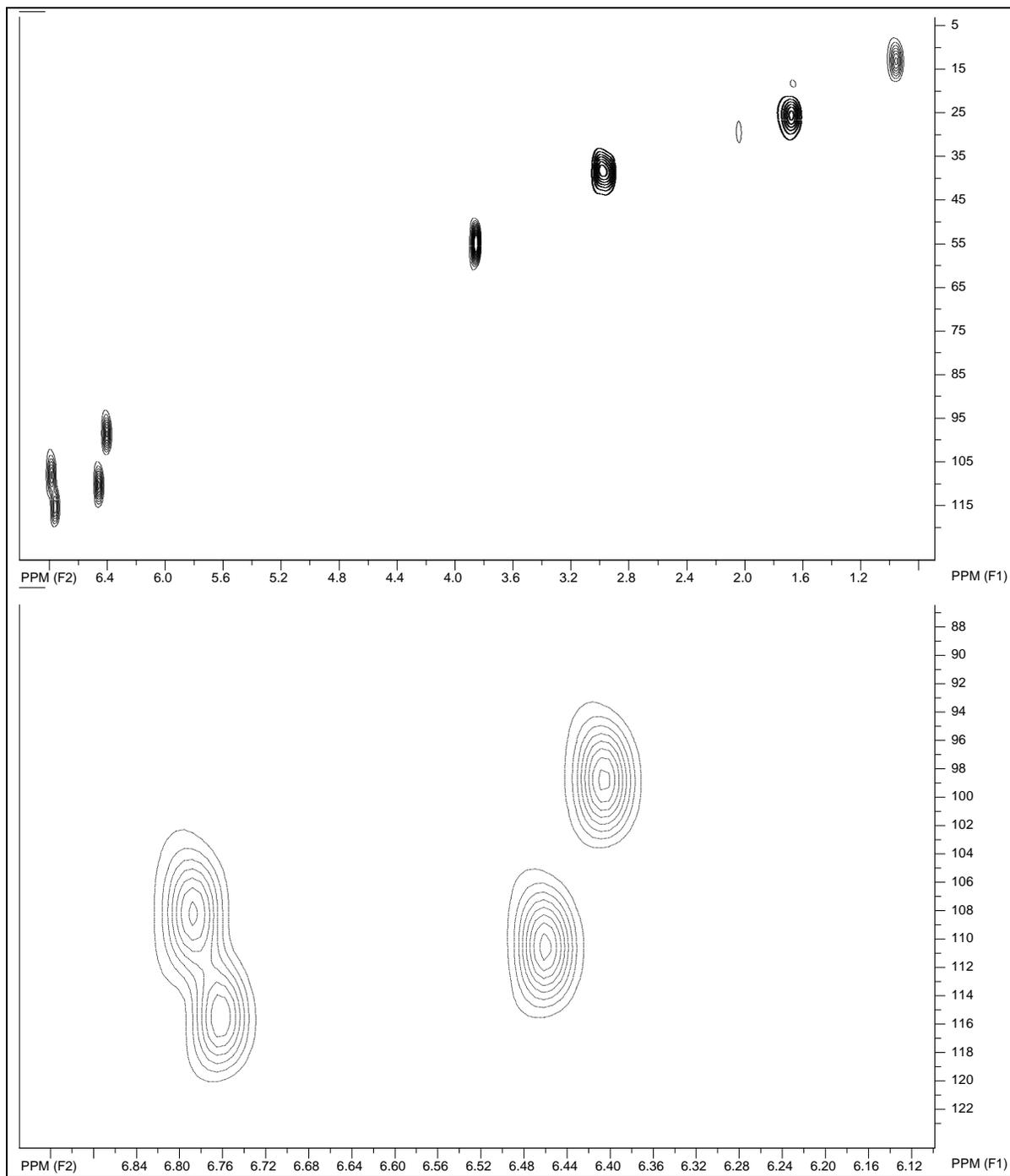
Espectro 2e₂ – Correlação à longa distância ¹H e ¹³C gHMBC do depsídeo atranorina, em CDCl₃ (parte 2).



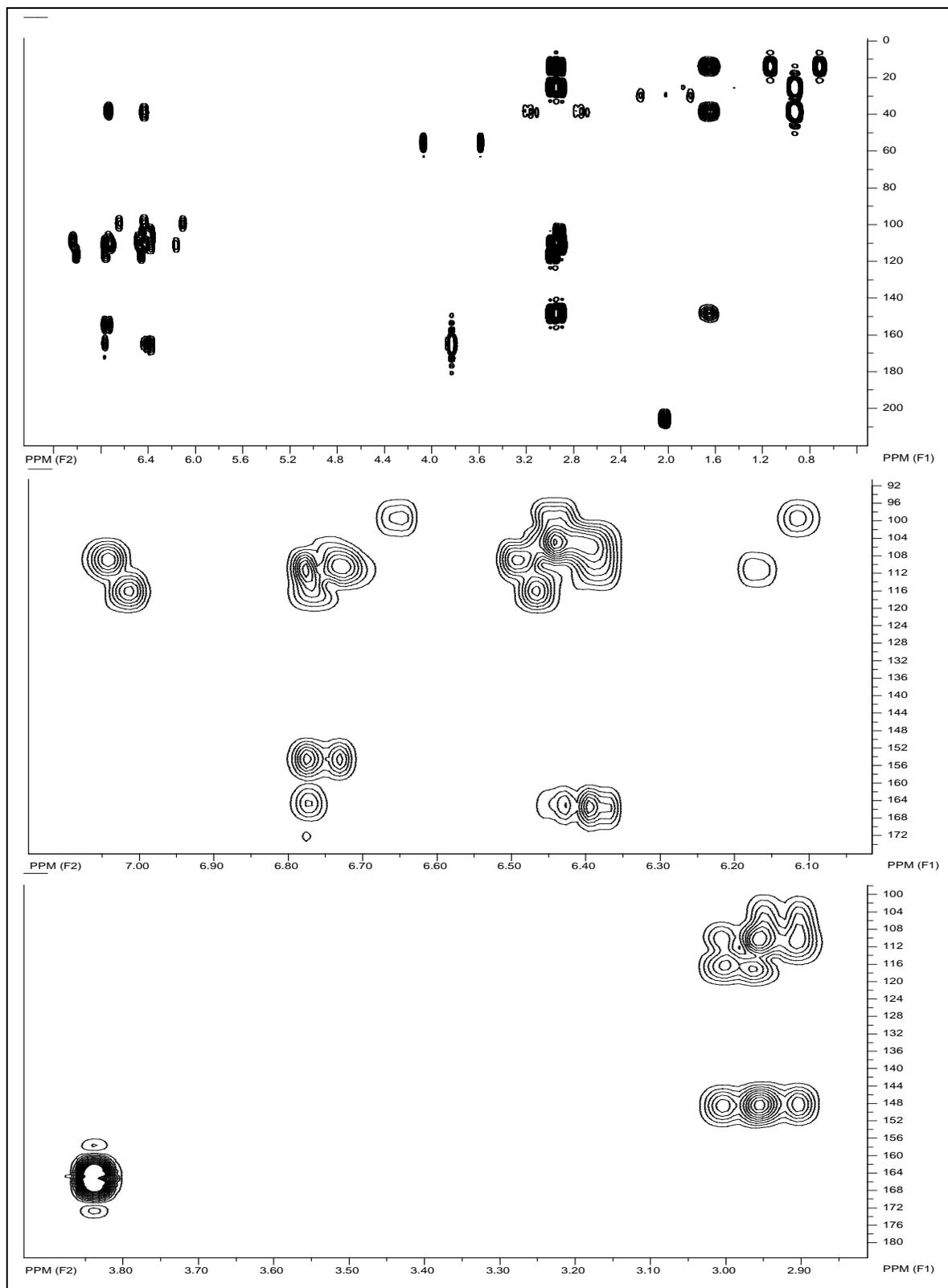
Espectro 3b – Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135) do ácido divaricático, em acetona- d_6 .



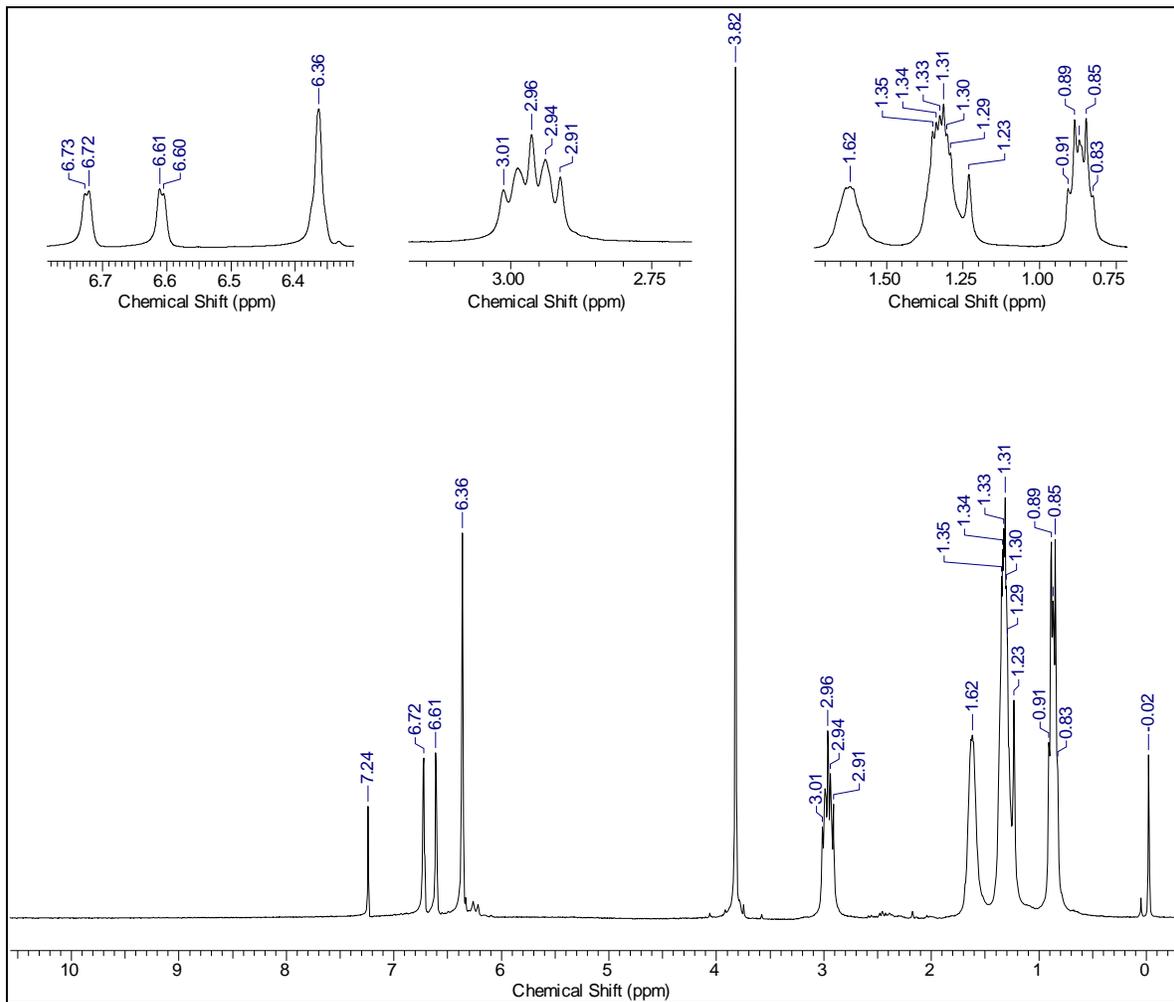
Espectro 3c – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido divaricático, em acetona- d_6 .



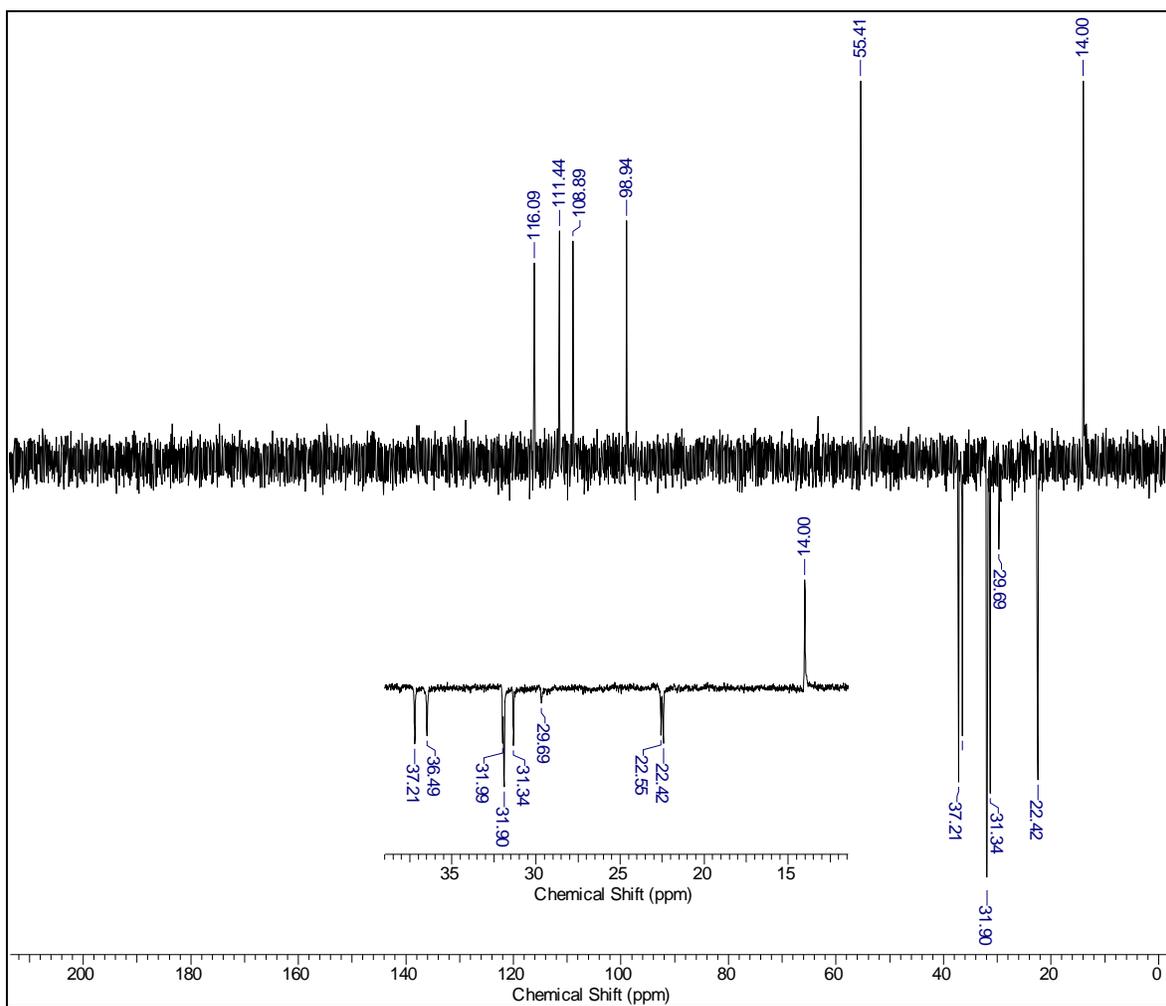
Espectro 3d – Correlação ¹H e ¹³C gHSQC do ácido divaricático, em acetona-d₆.



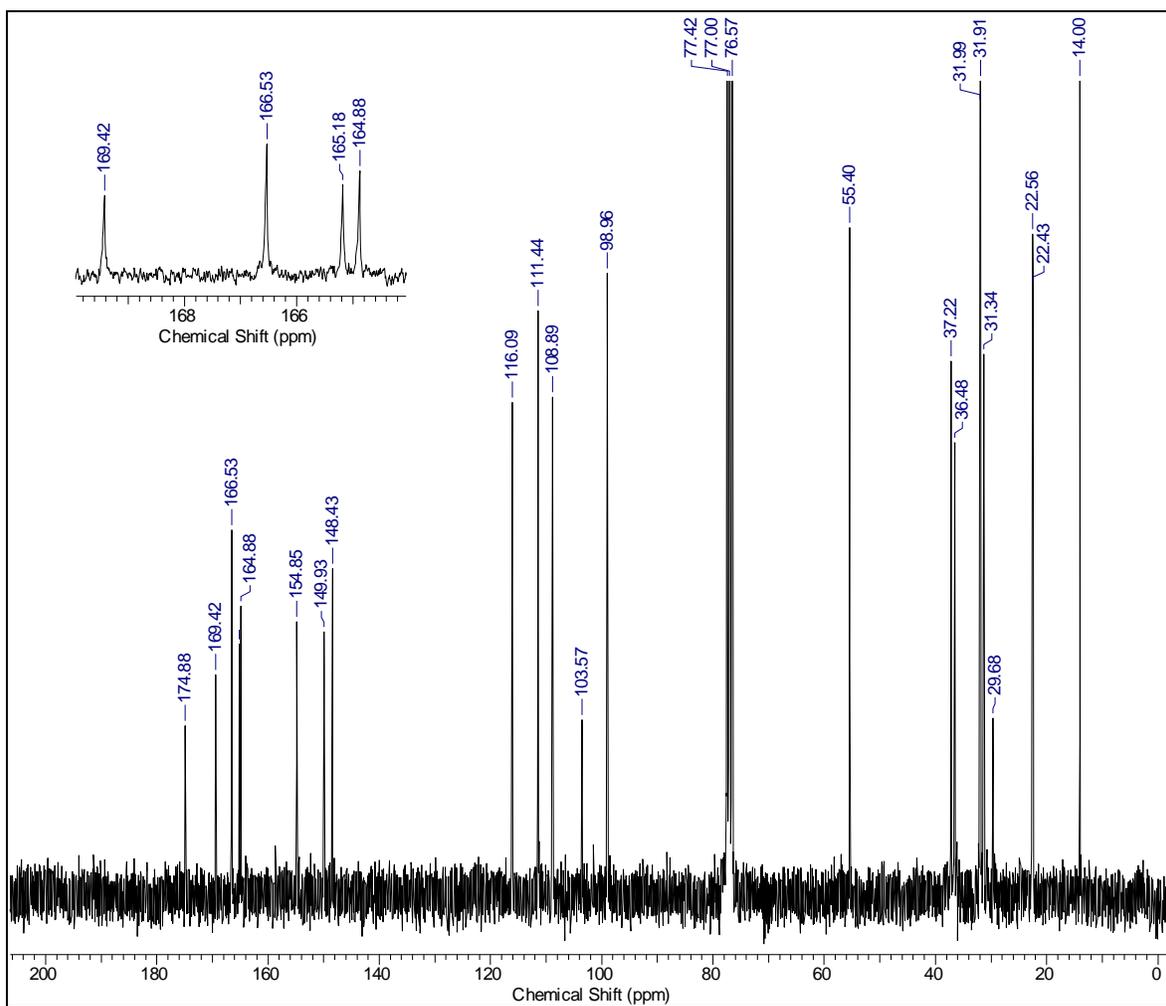
Espectro 3e – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC do ácido divaricático, em acetona- d_6 .



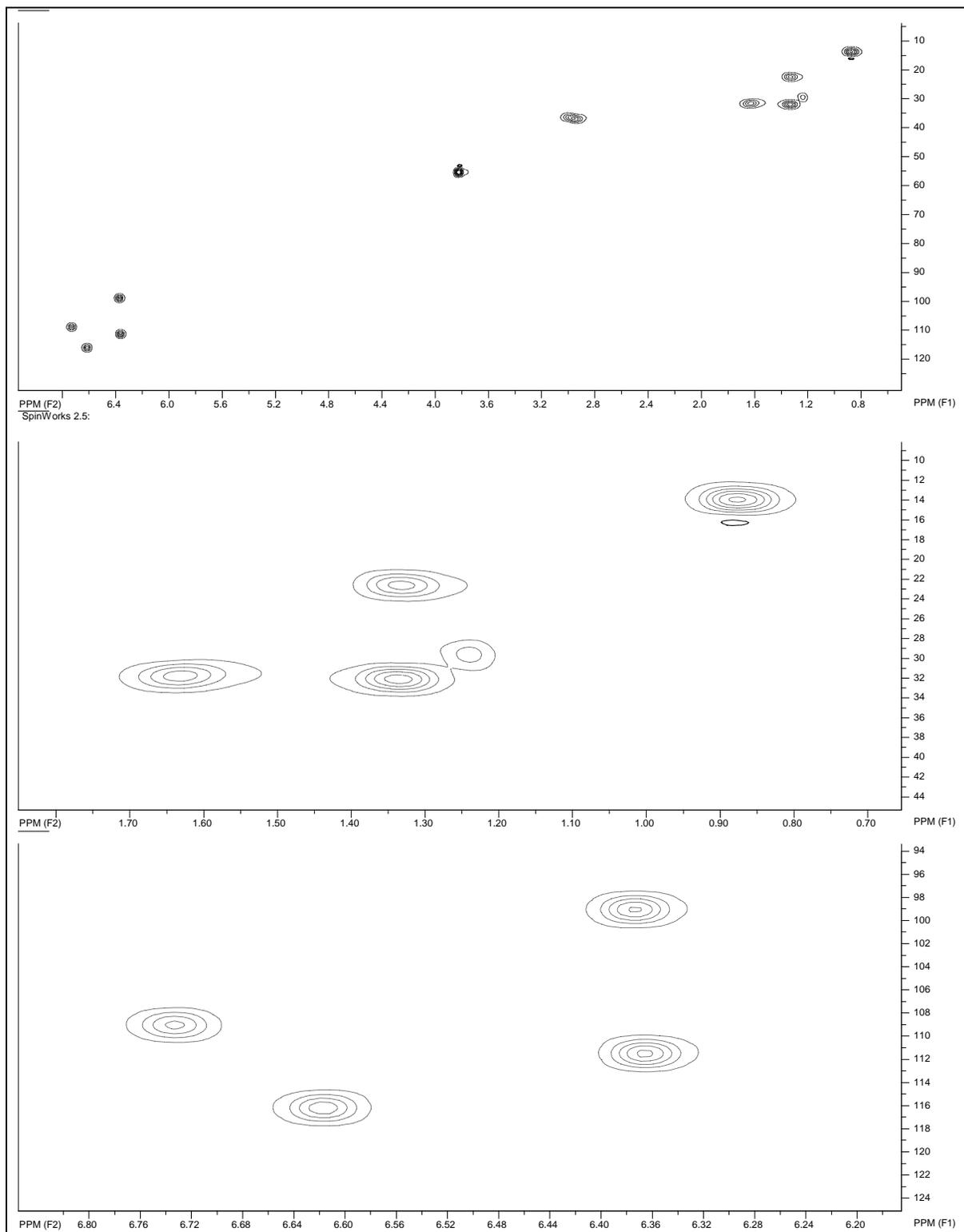
Espectro 4a – Espectro de RMN de ^1H do ácido perlatólico, em CDCl_3 .



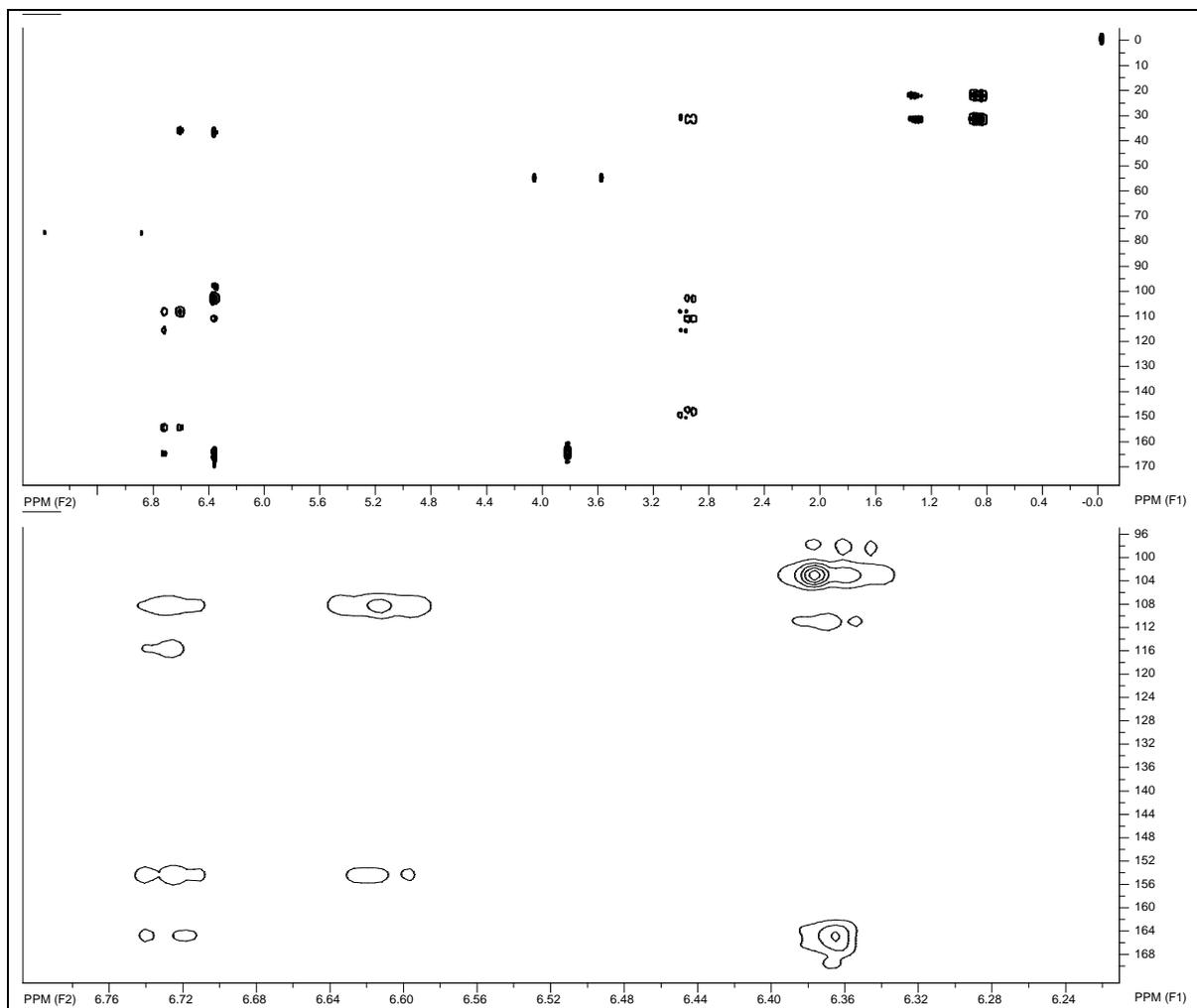
Espectro 4b – Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135) do ácido perlatólico, em CDCl_3 .



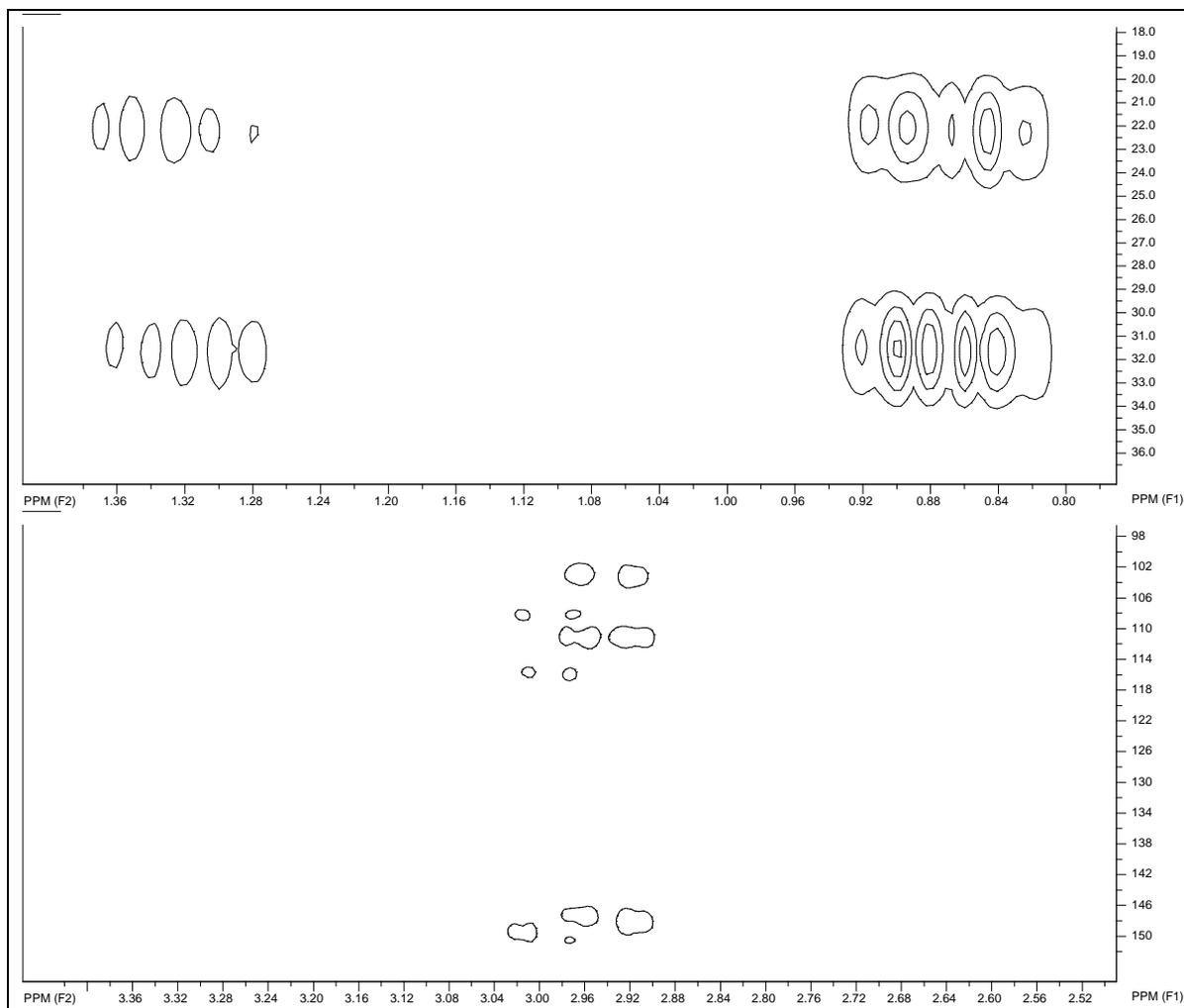
Espectro 4c – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido perlatólico, em CDCl_3 .



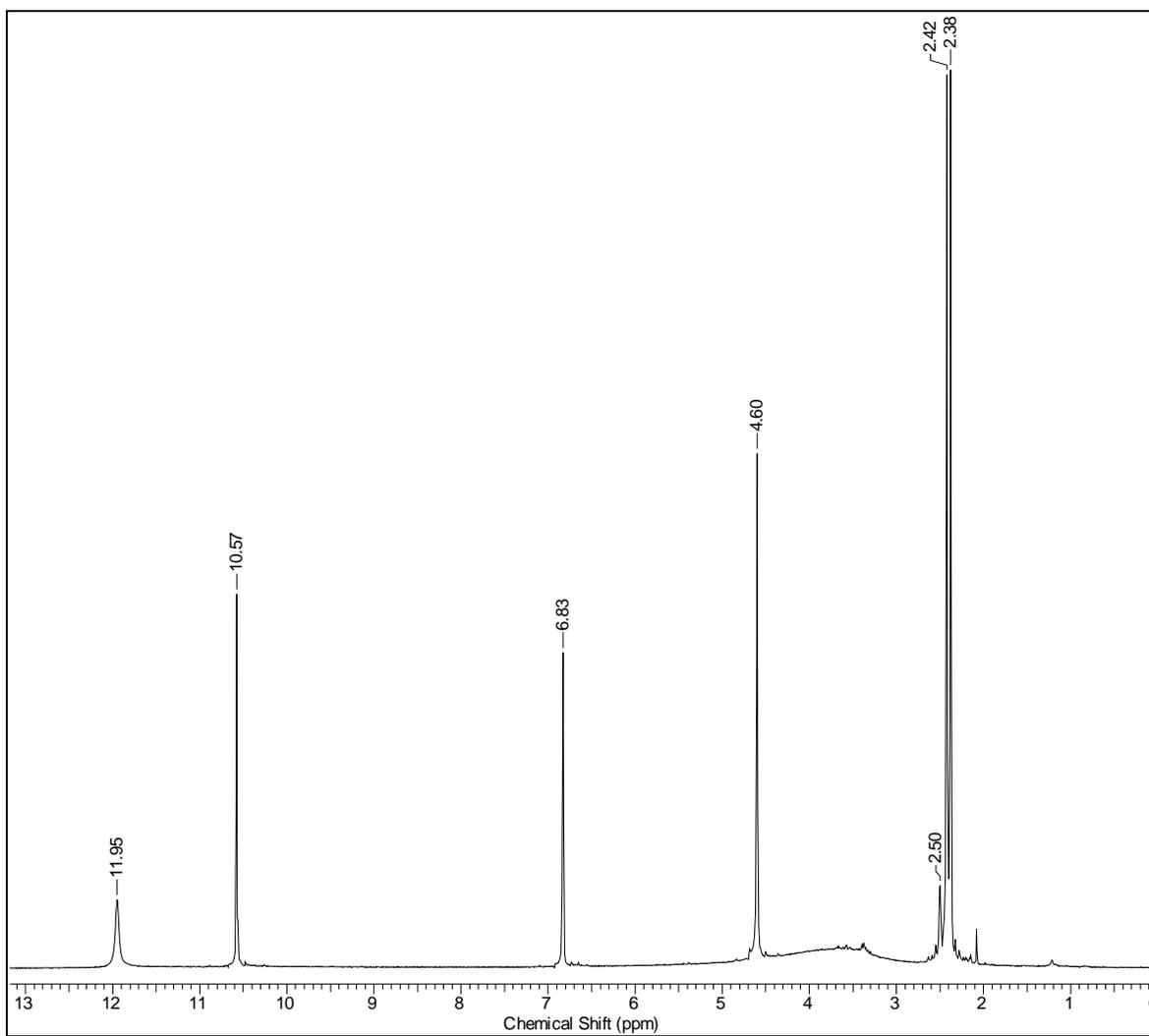
Espectro 4d – Correlação ^1H e ^{13}C gHSQC do ácido perlatólico, em CDCl_3 .



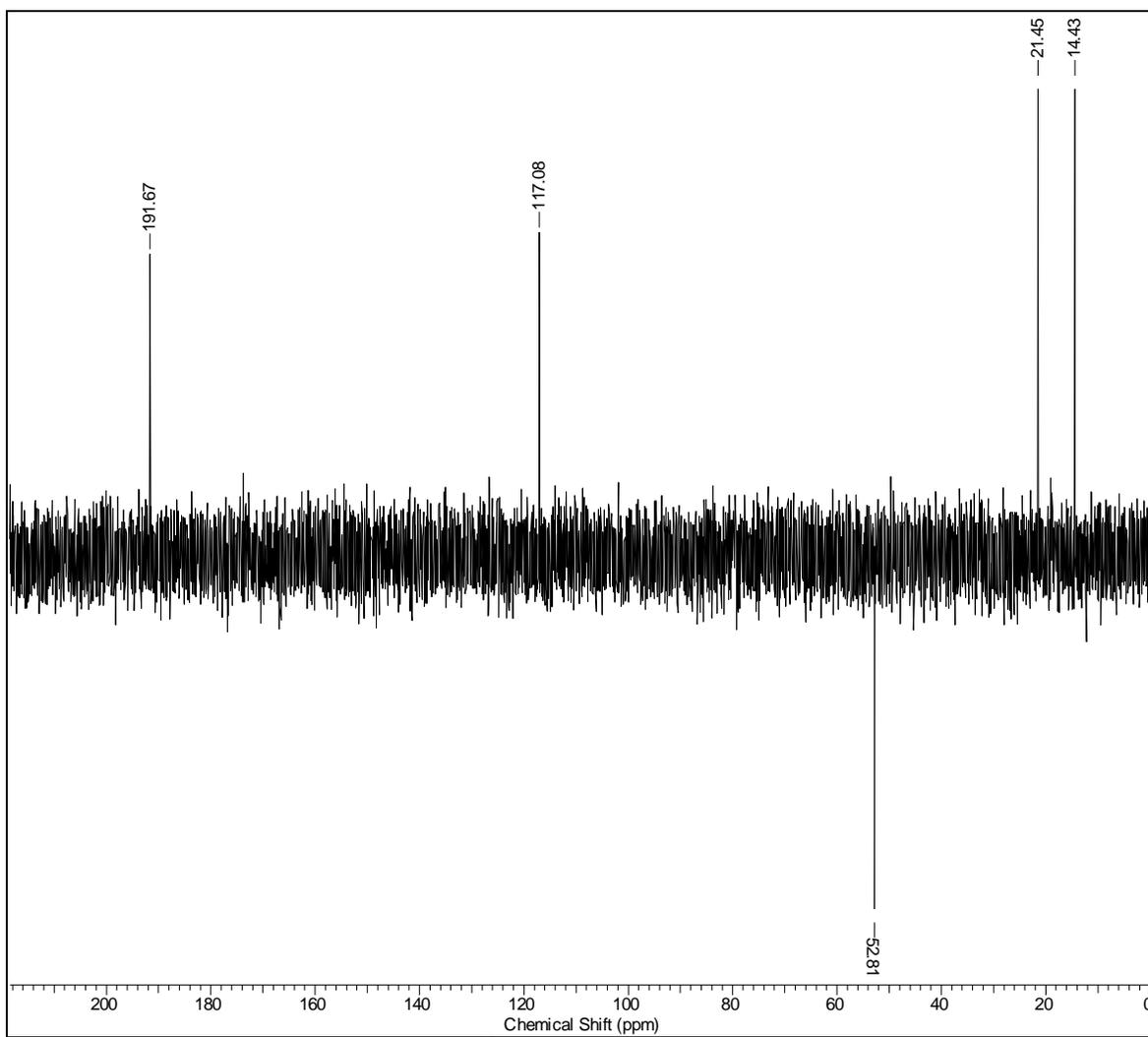
Espectro 4e₁ – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC do ácido perlatólico, em CDCl_3 (parte 1).



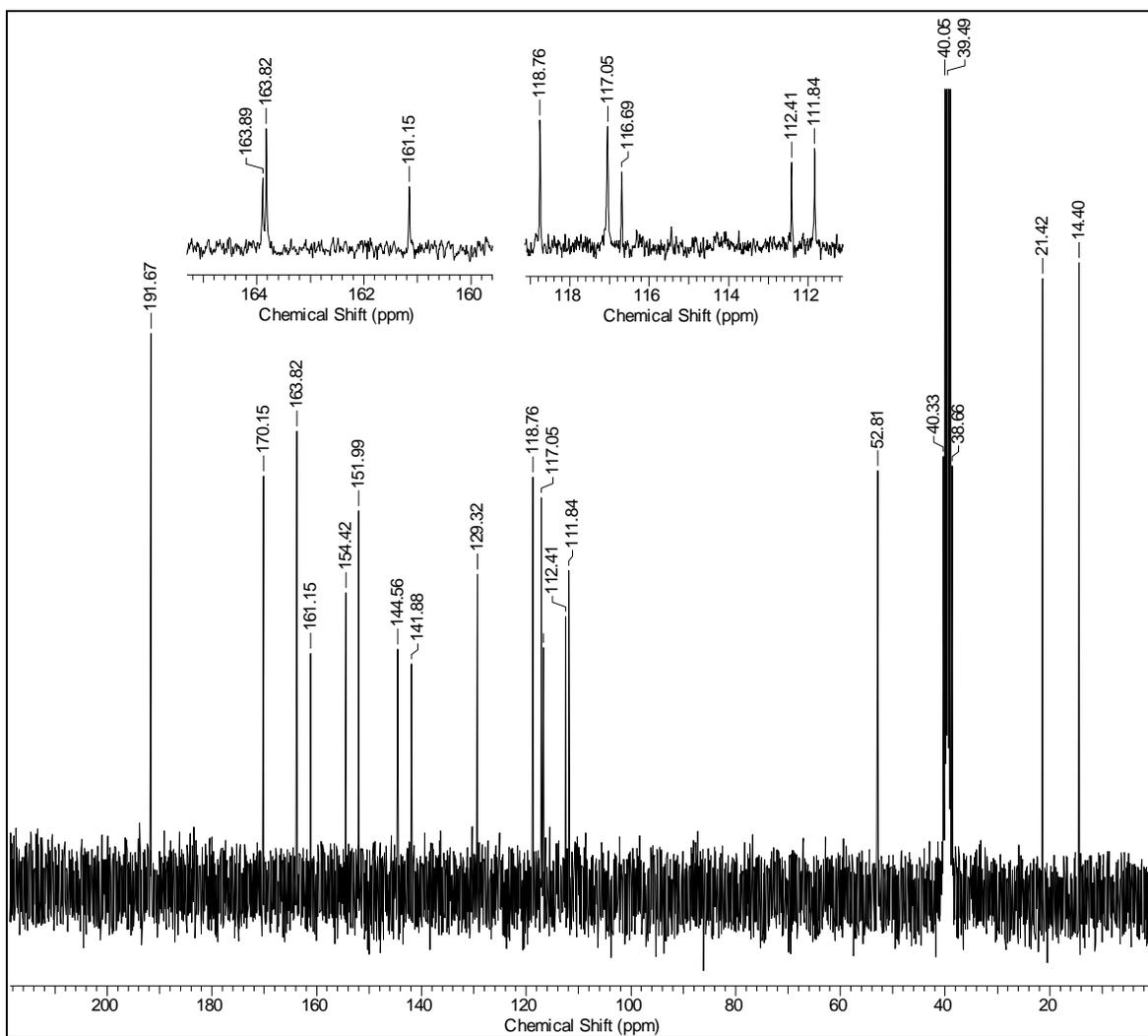
Espectro 4e₂ – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC do ácido perlatólico, em CDCl_3 (parte 2).



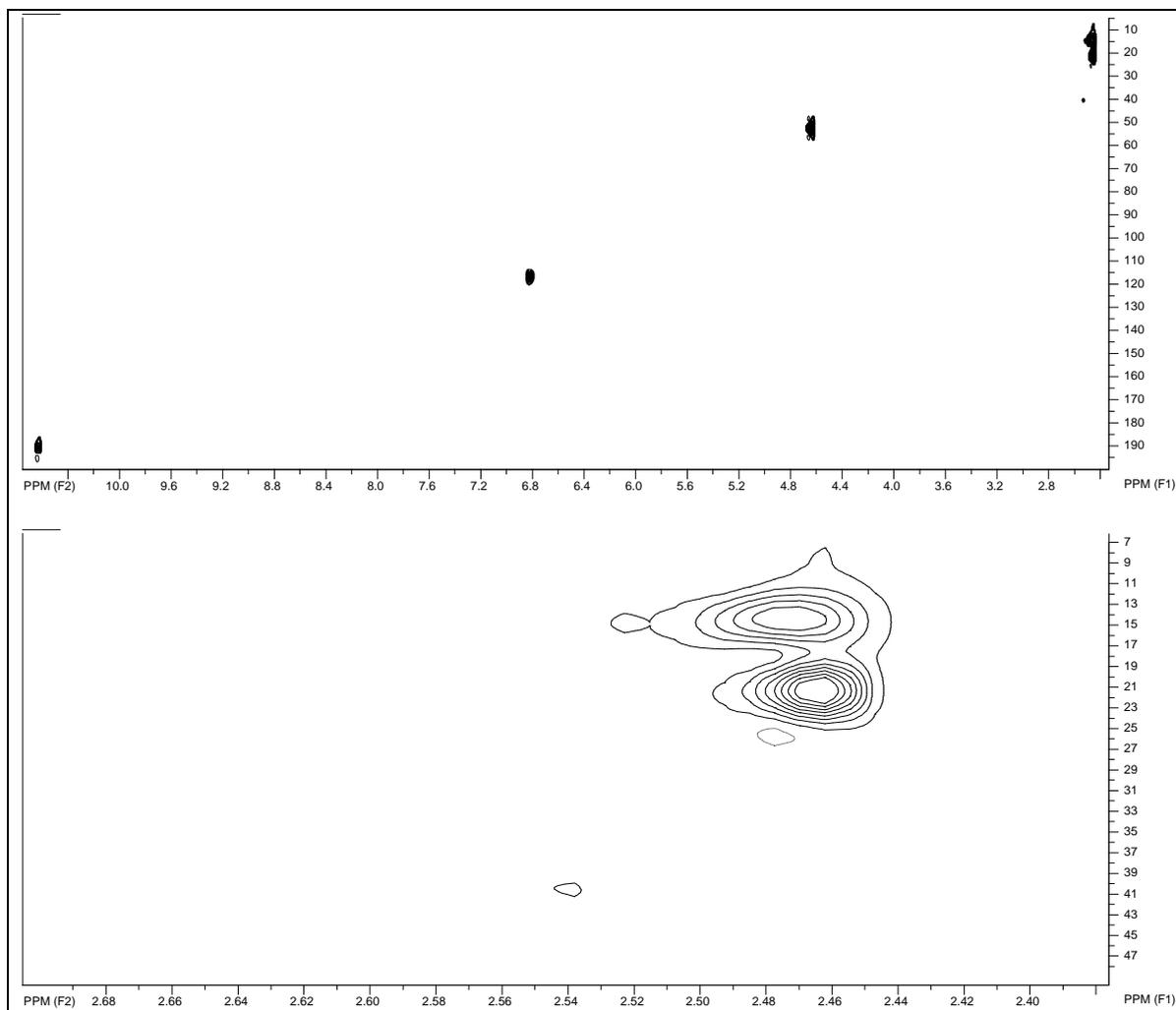
Espectro 5a – Espectro de RMN de ^1H do ácido protocetrário, em DMSO-d_6 .



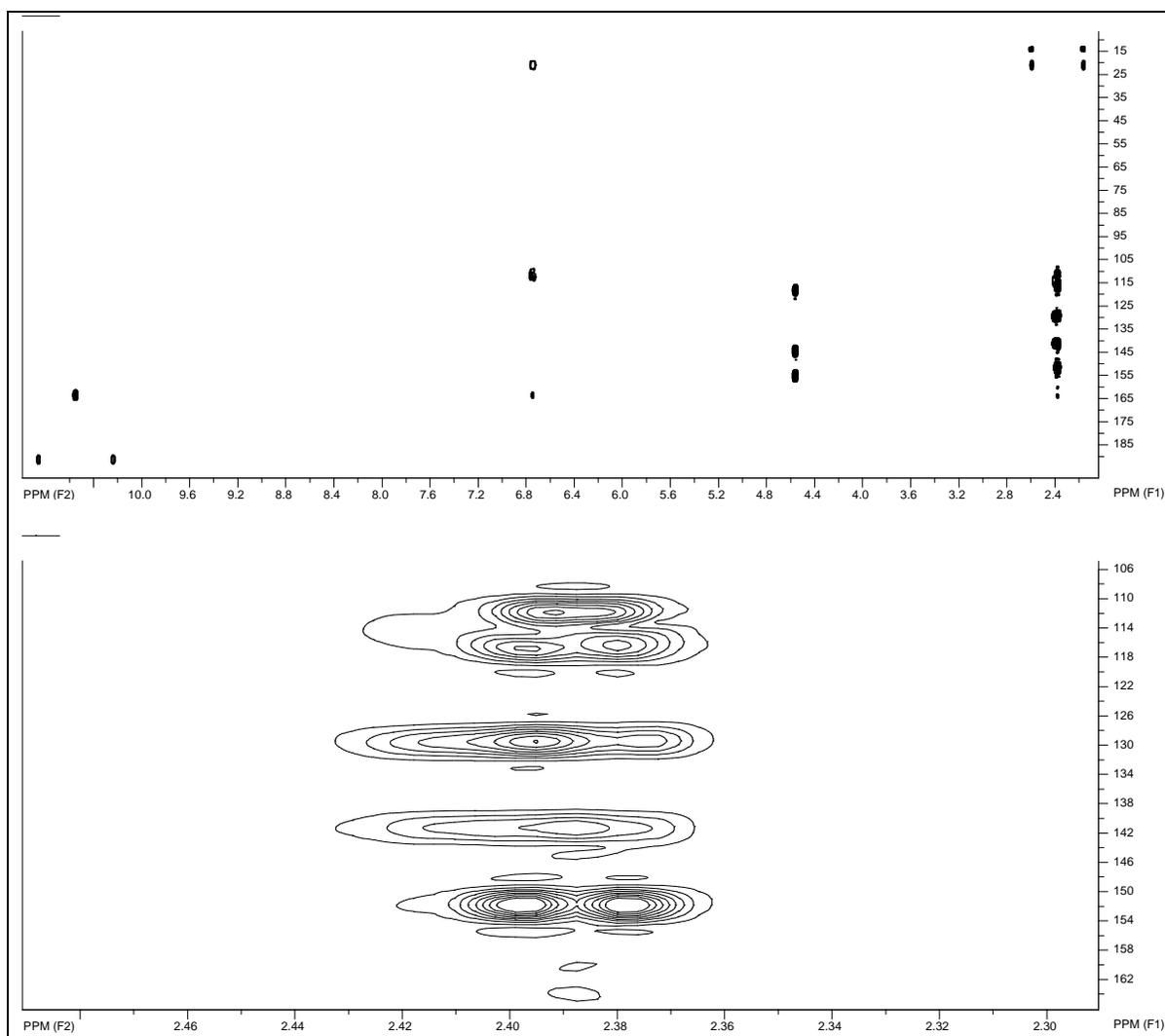
Espectro 5b – Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135) do ácido protocetrário, em DMSO-d_6 .



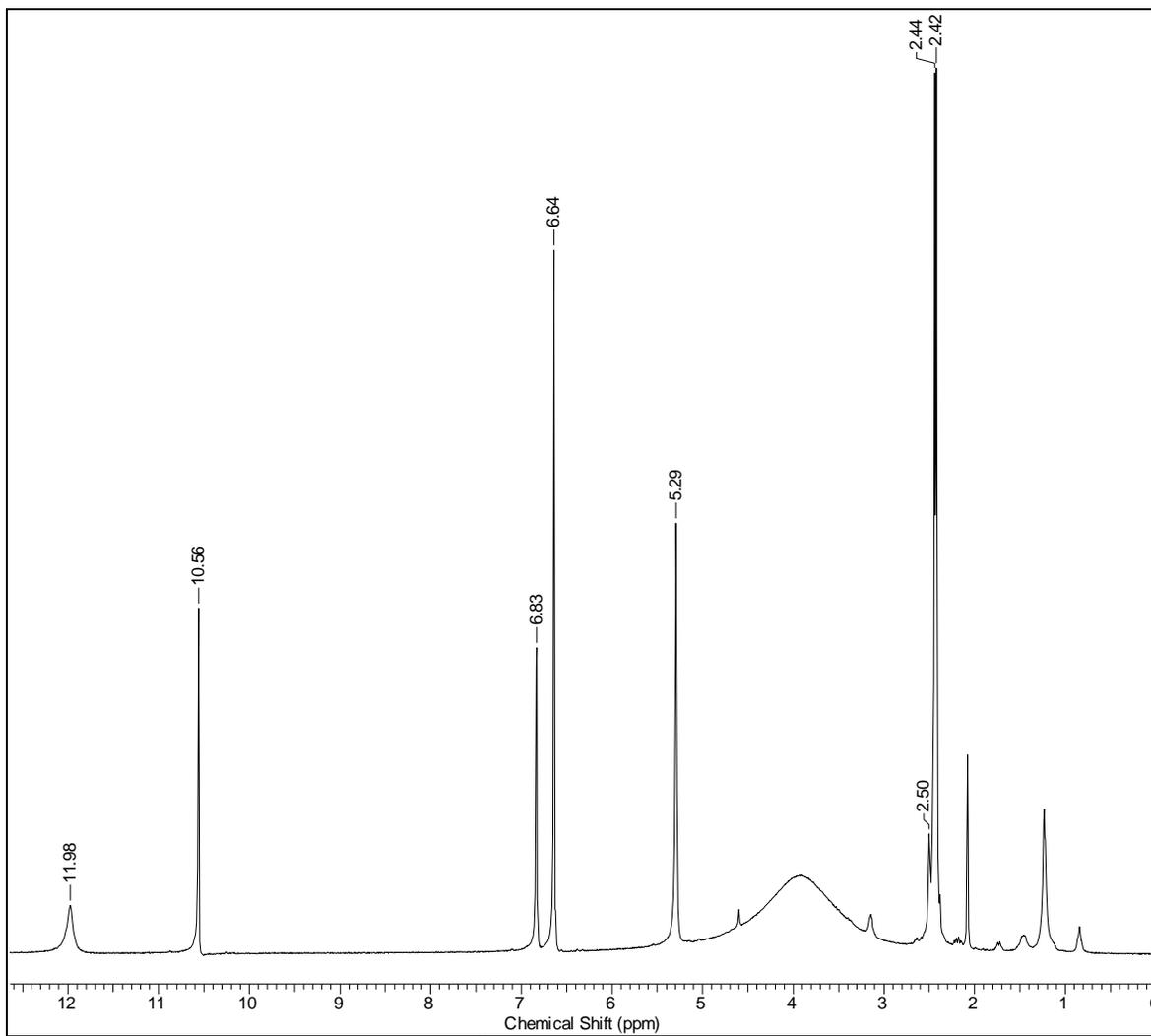
Espectro 5c – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido protocetrário, em DMSO- d_6 .



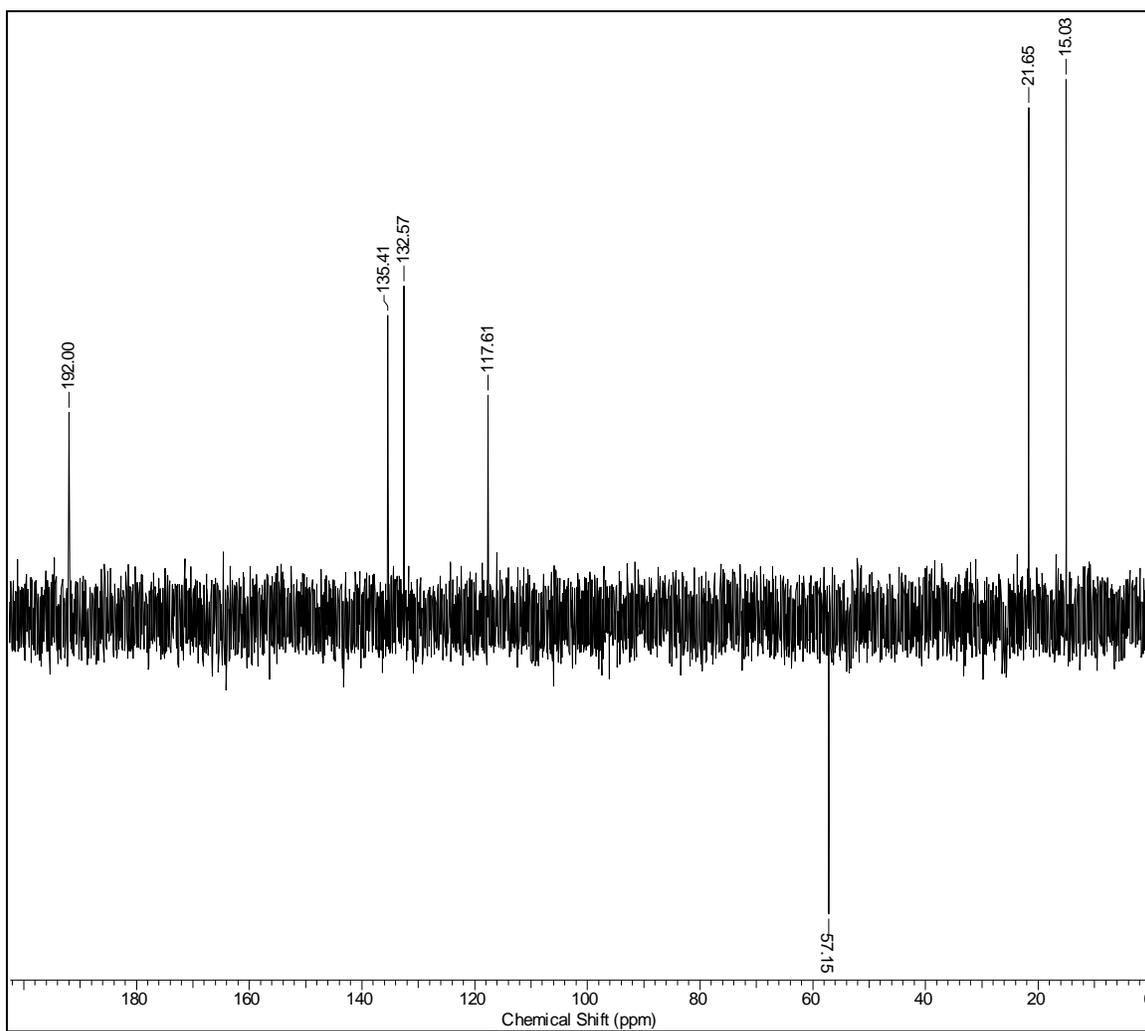
Espectro 5d – Correlação ^1H e ^{13}C gHSQC do ácido protocetrário, em DMSO-d₆.



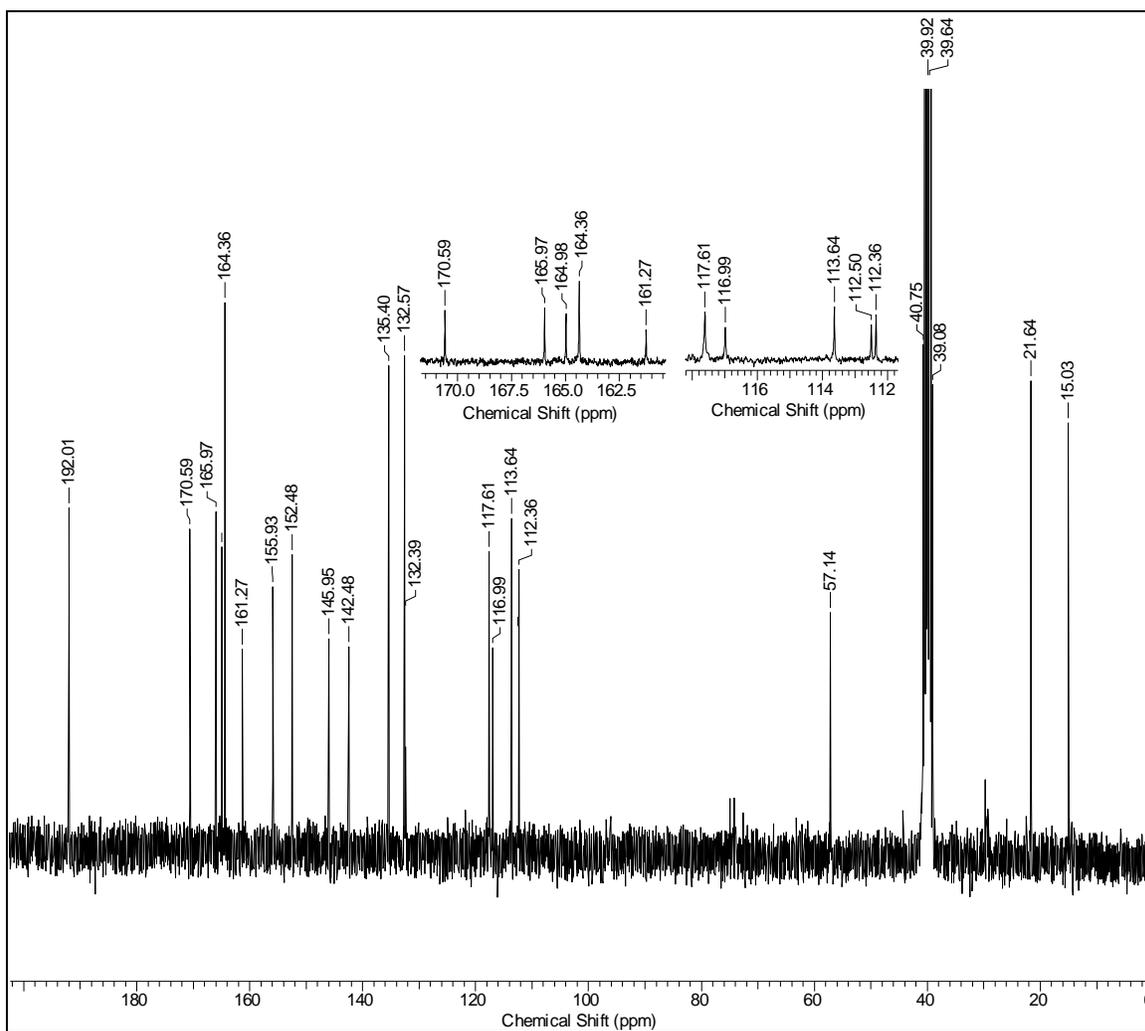
Espectro 5e – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC do ácido protocetrárico, em DMSO-d_6 .



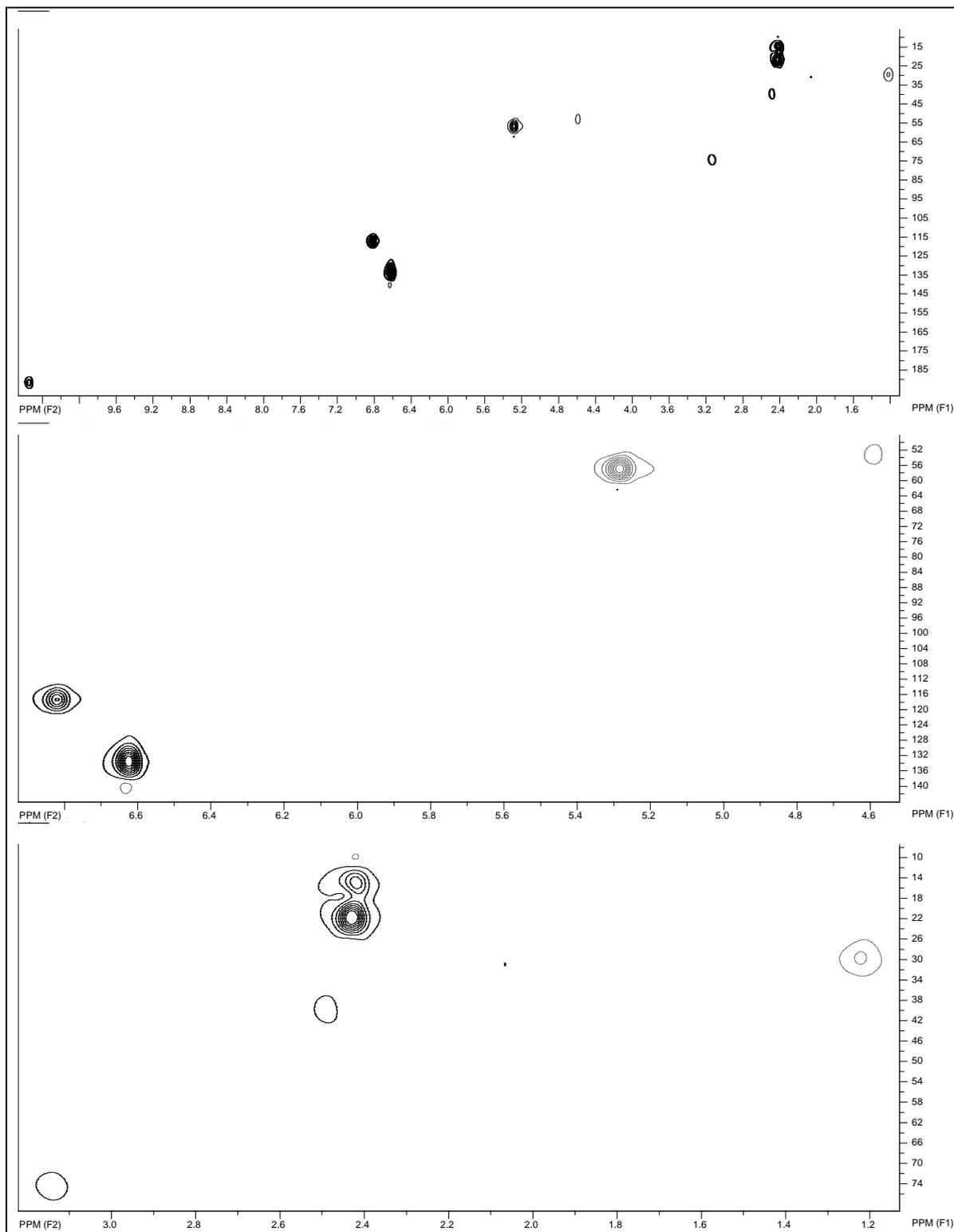
Espectro 6a – Espectro de RMN de ^1H do ácido fumarprotocetrário, em DMSO-d_6 .



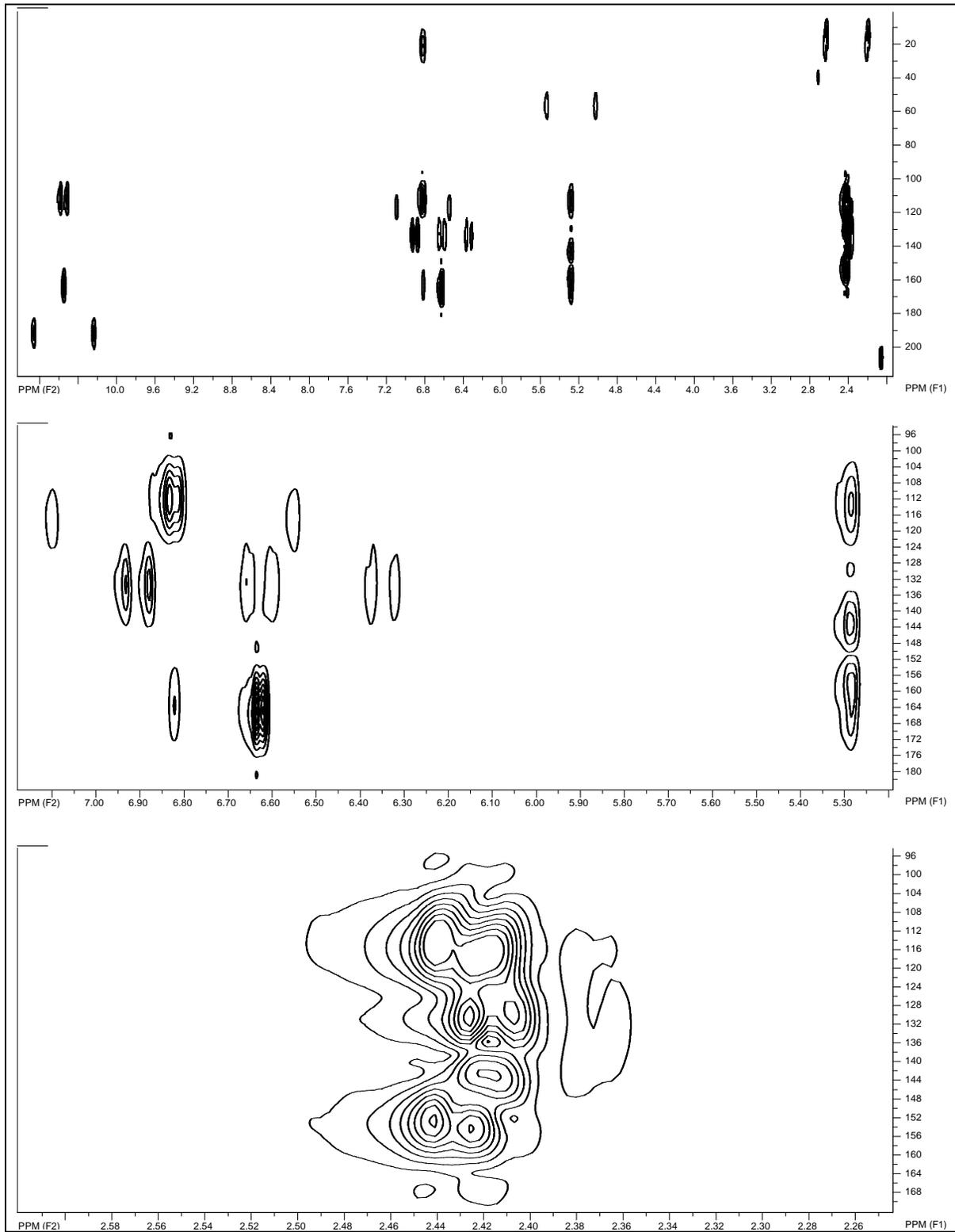
Espectro 6b – Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135) do ácido fumarprotocetrárico, em DMSO-d₆.



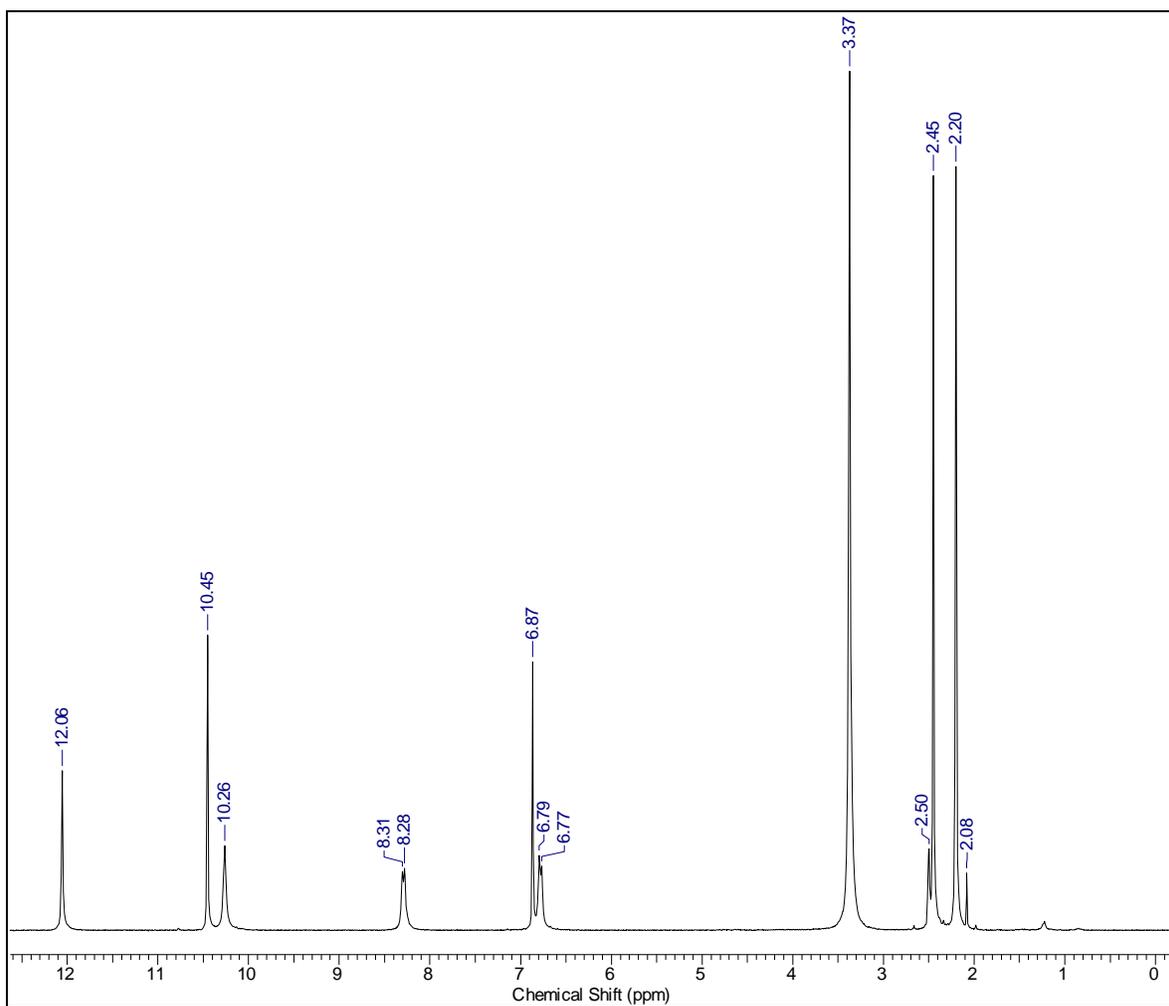
Espectro 6c – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido fumarprotocetrário, em DMSO-d_6 .



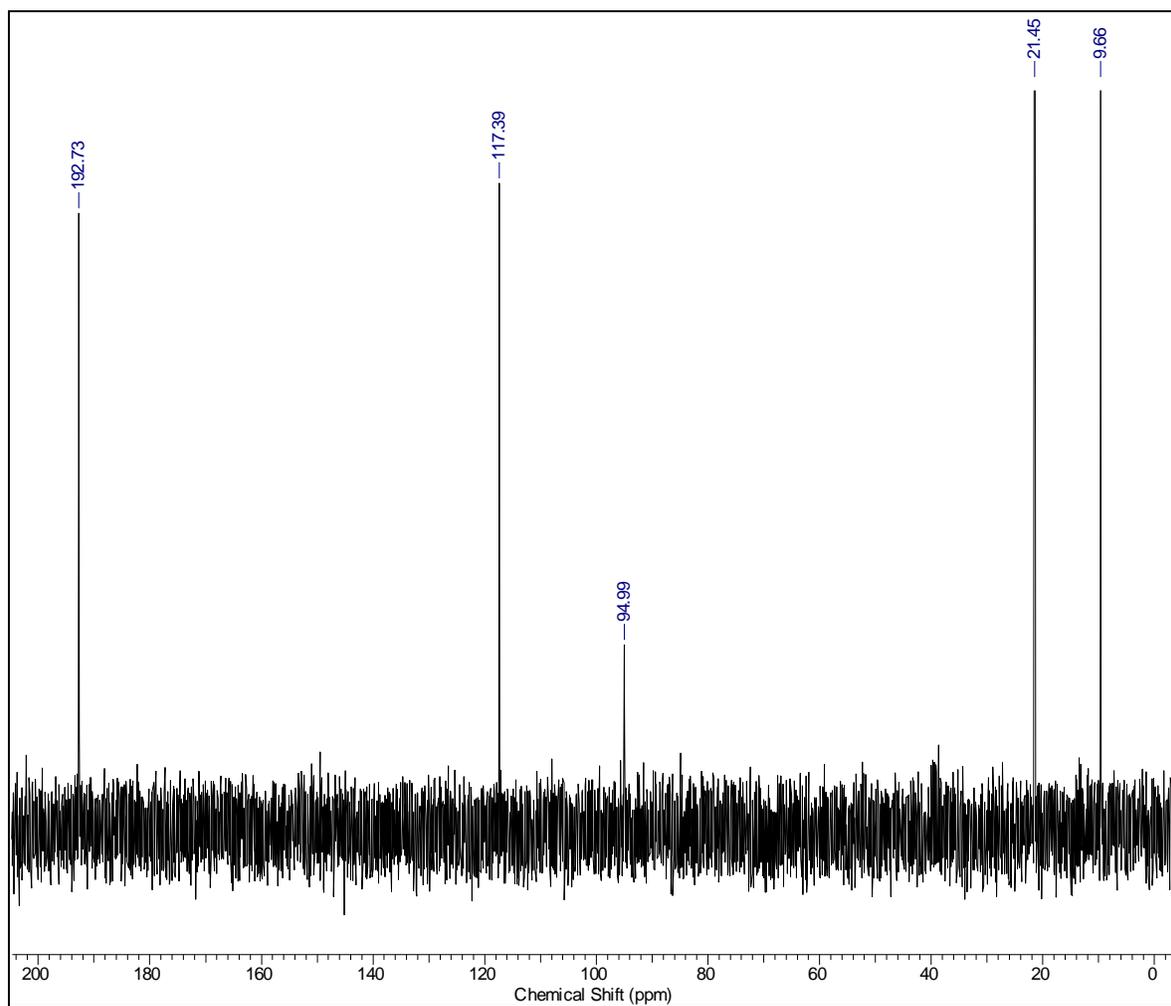
Espectro 6d – Correlação ¹H e ¹³C gHSQC do ácido fumarprotocetrário, em DMSO-d₆.



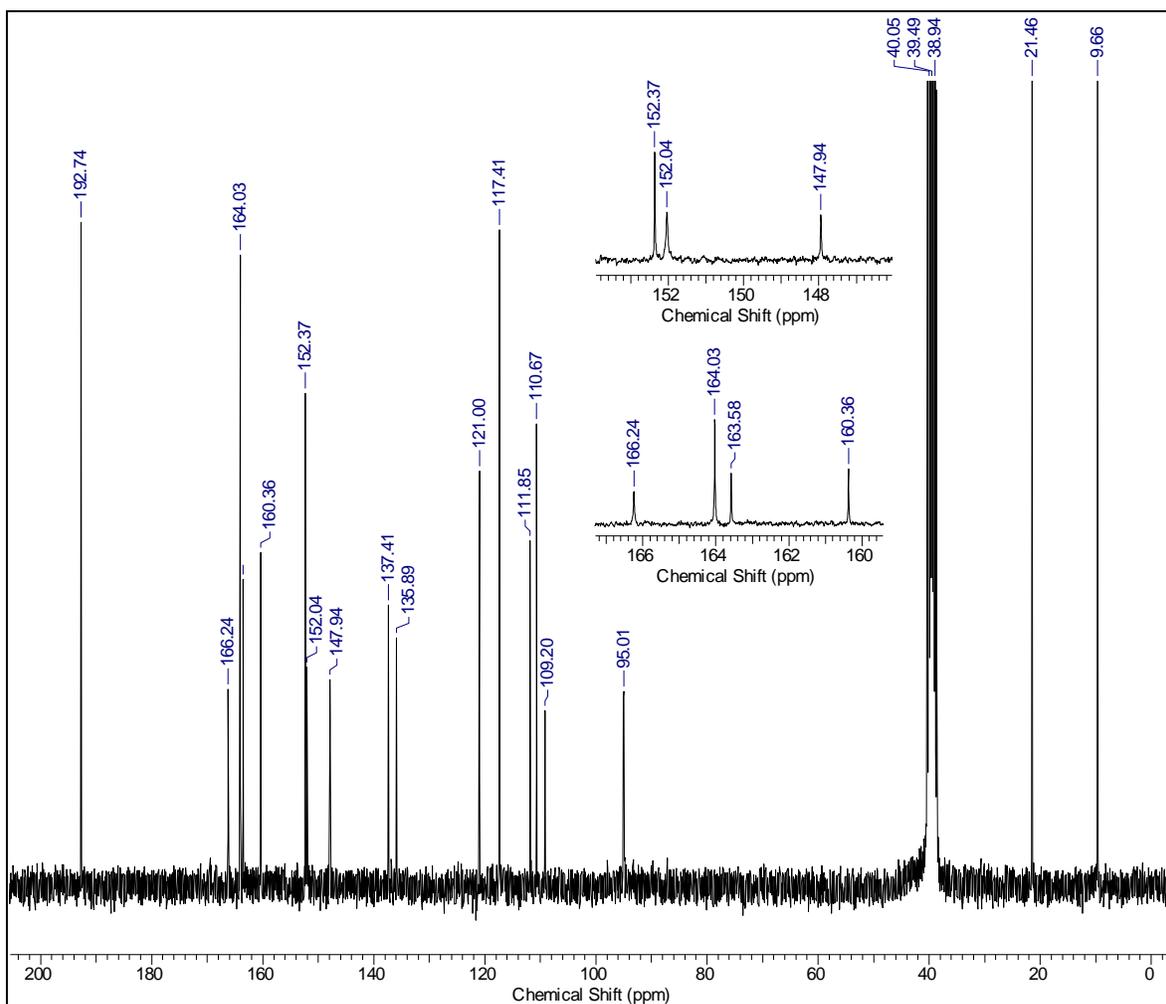
Espectro 6e – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC do ácido fumarprotocetrárico, em DMSO- d_6 .



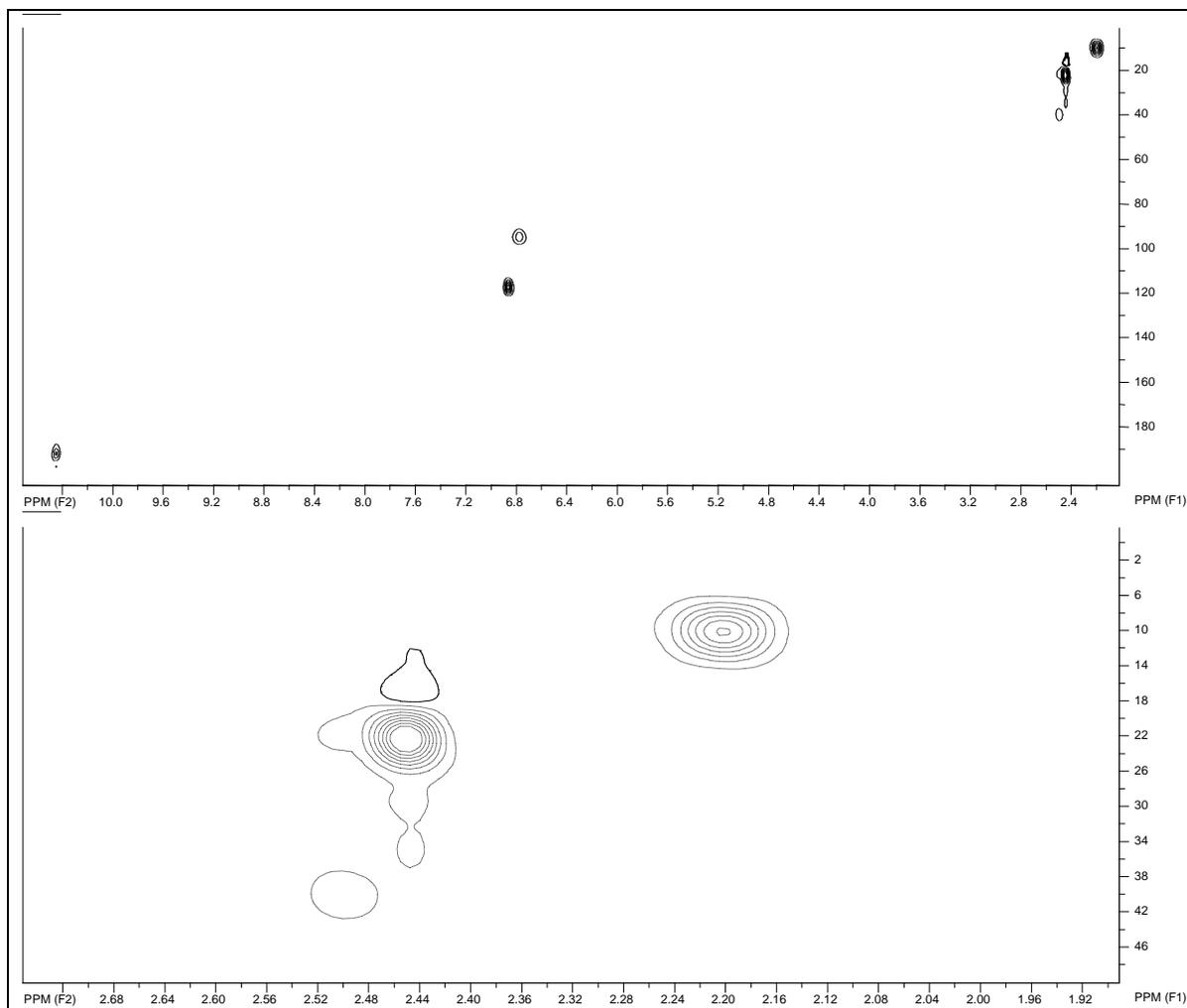
Espectro 7a – Espectro de RMN de ^1H do ácido norstictico, em DMSO-d_6 .



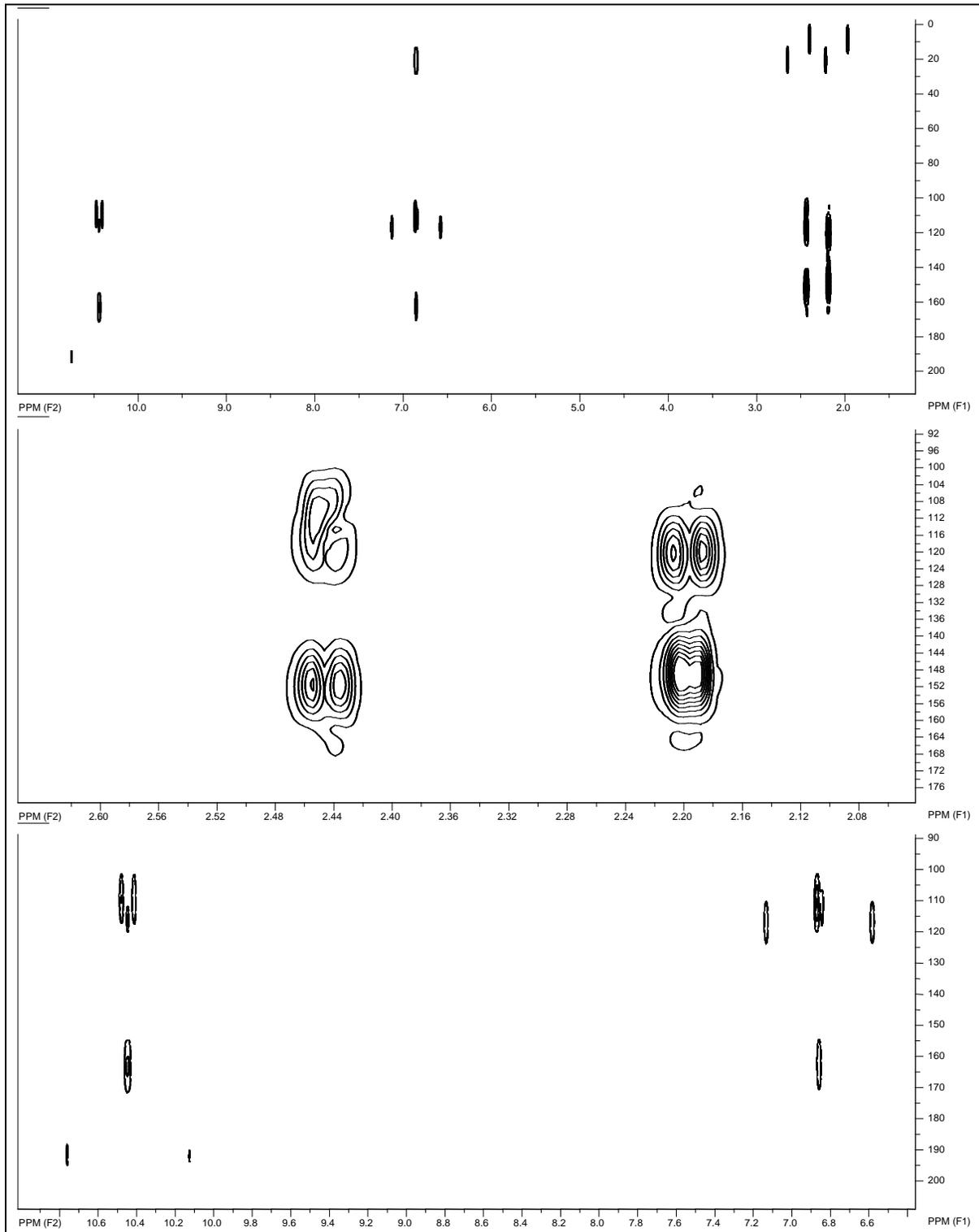
Espectro 7b – Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135) do ácido norstítico, em DMSO-d_6 .



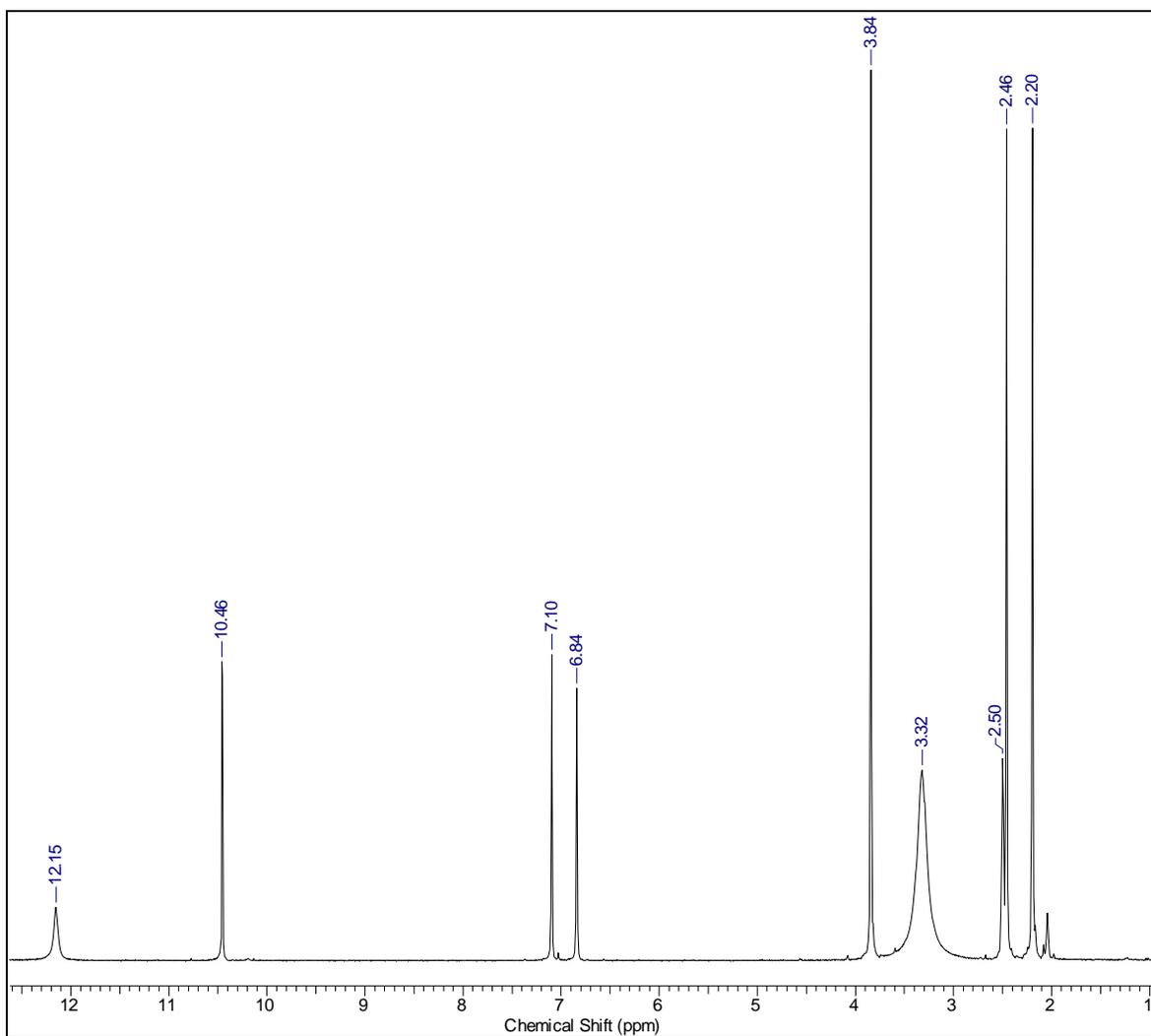
Espectro 7c – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido norstictico, em DMSO-d_6 .



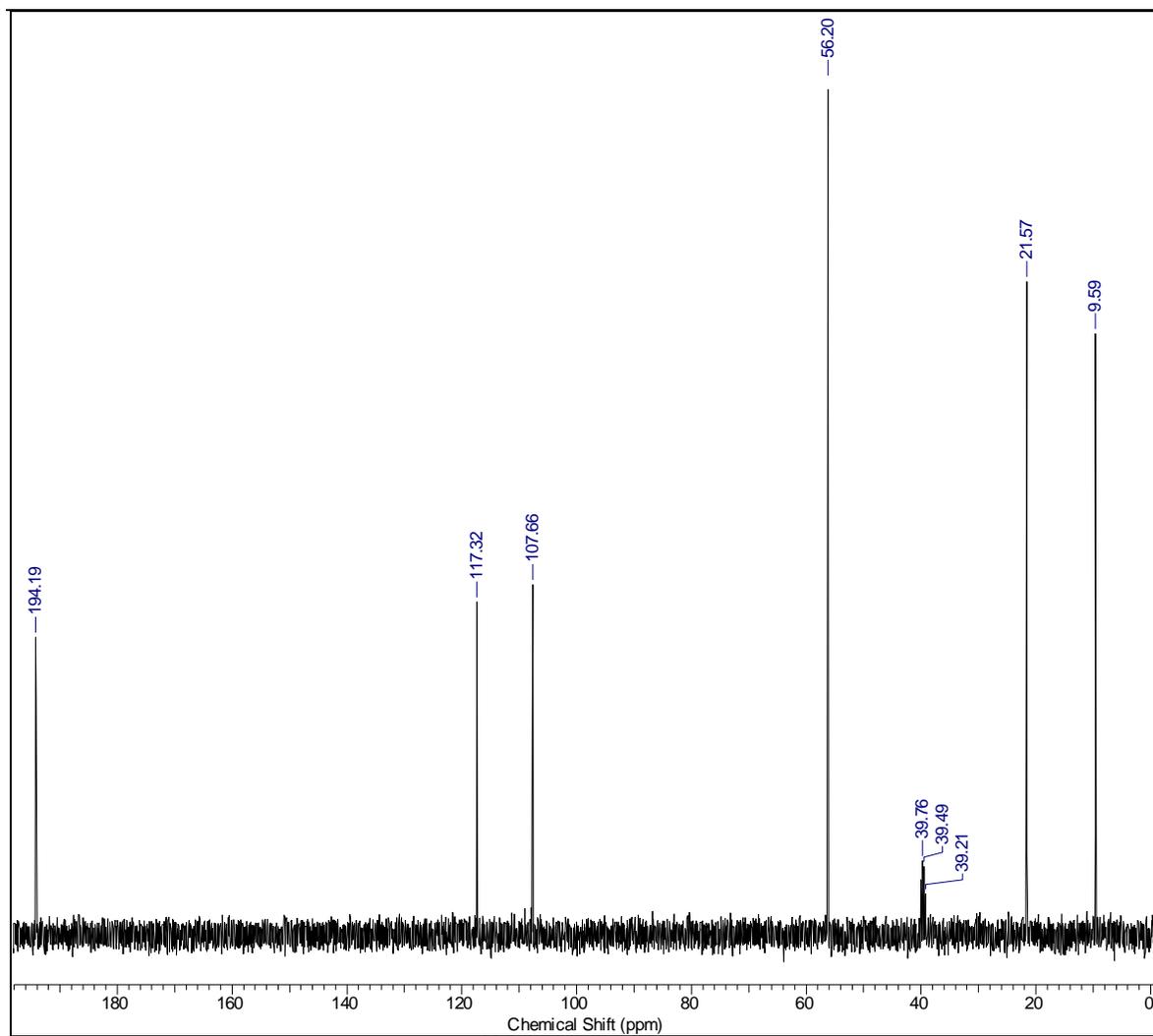
Espectro 7d – Correlação ¹H e ¹³C gHSQC do ácido norstístico, em DMSO-d₆.



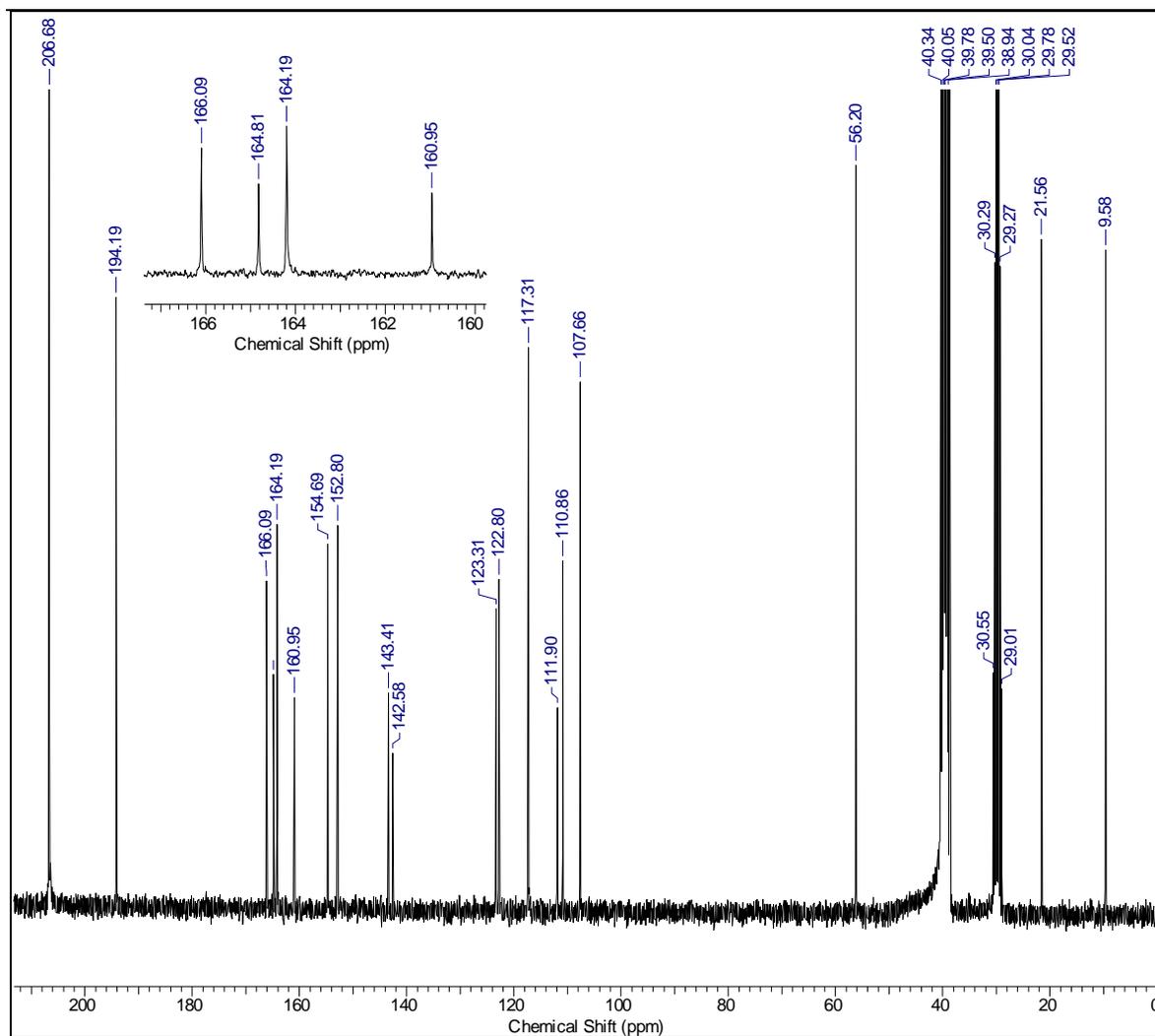
Espectro 7e – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC do ácido norstúptico, em DMSO- d_6 .



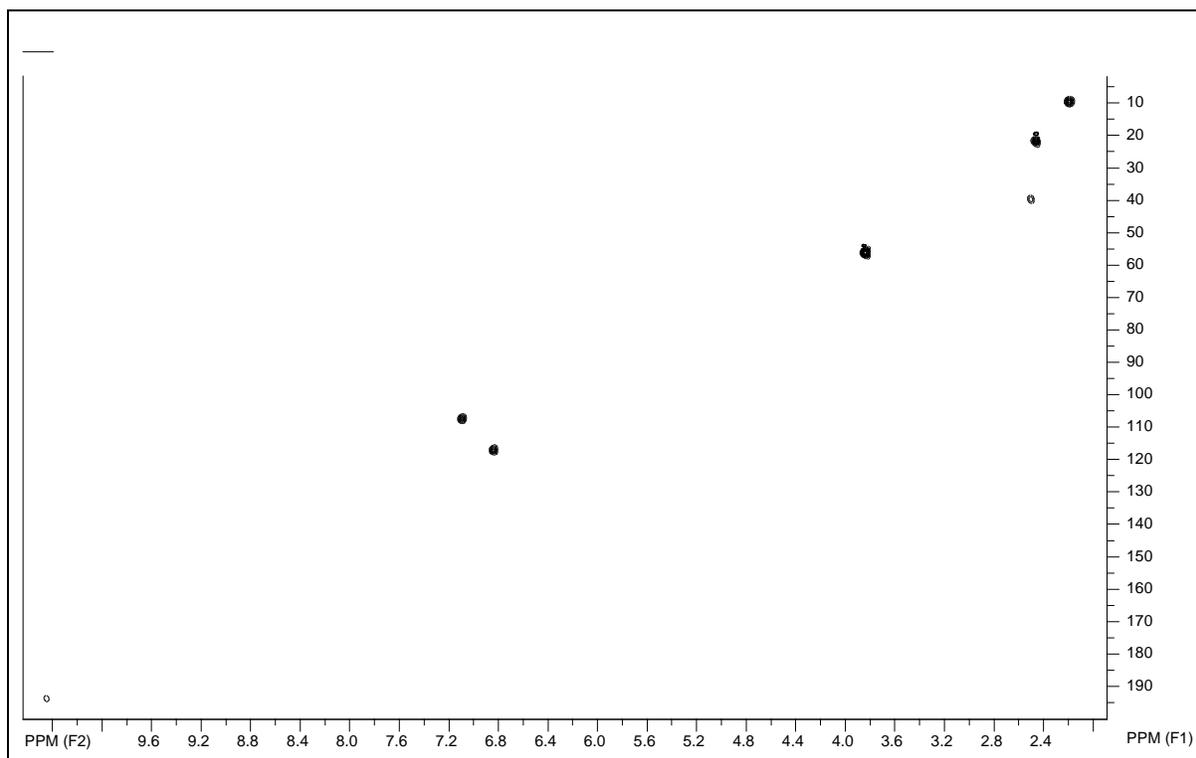
Espectro 8a – Espectro de RMN de ^1H do ácido psorômico, em DMSO-d_6 .



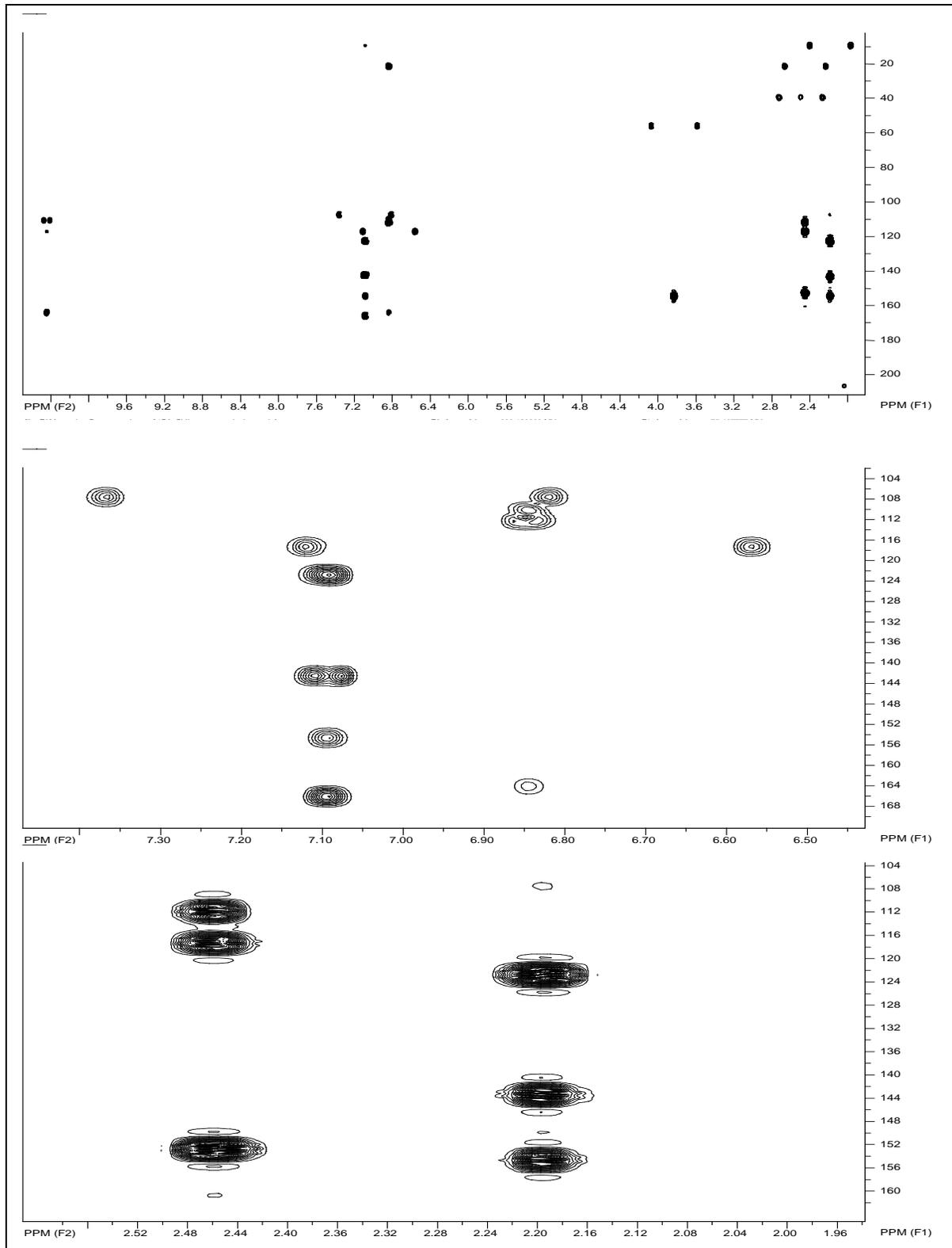
Espectro 8b – Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135) do ácido psorômico, em DMSO-d₆.



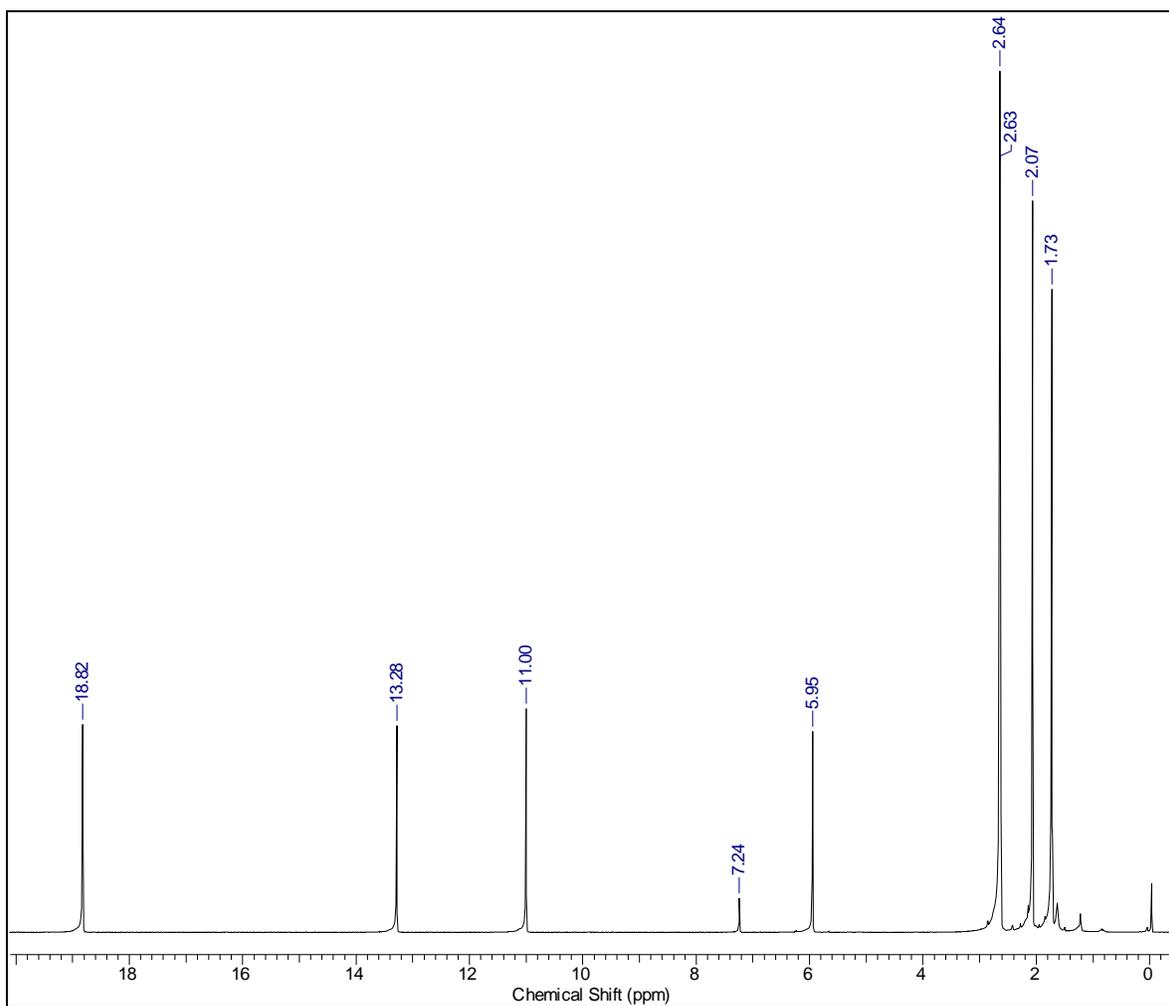
Espectro 8c – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido psorômico, em DMSO-d_6 .



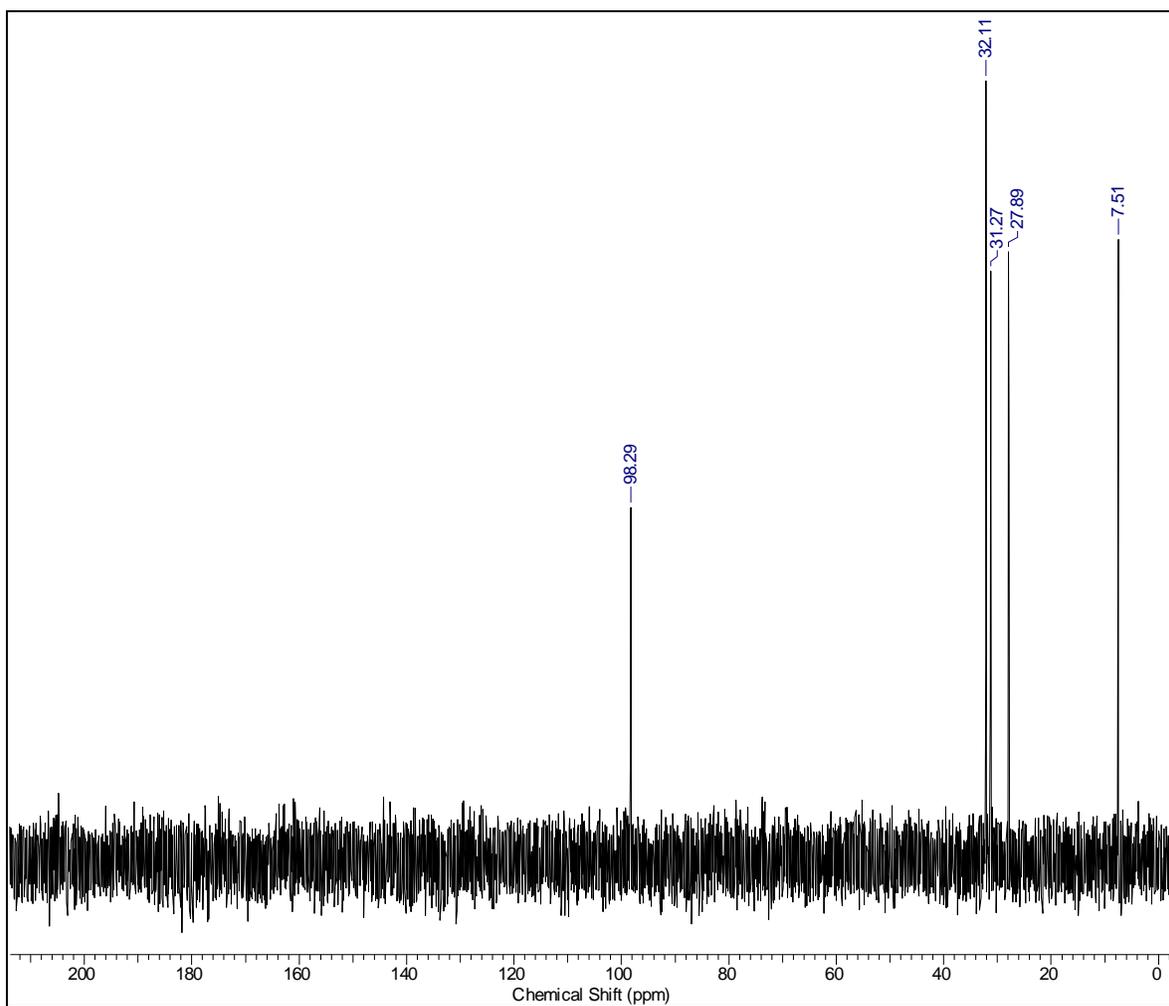
Espectro 8d – Correlação ^1H e ^{13}C gHSQC do ácido psorômico, em DMSO- d_6 .



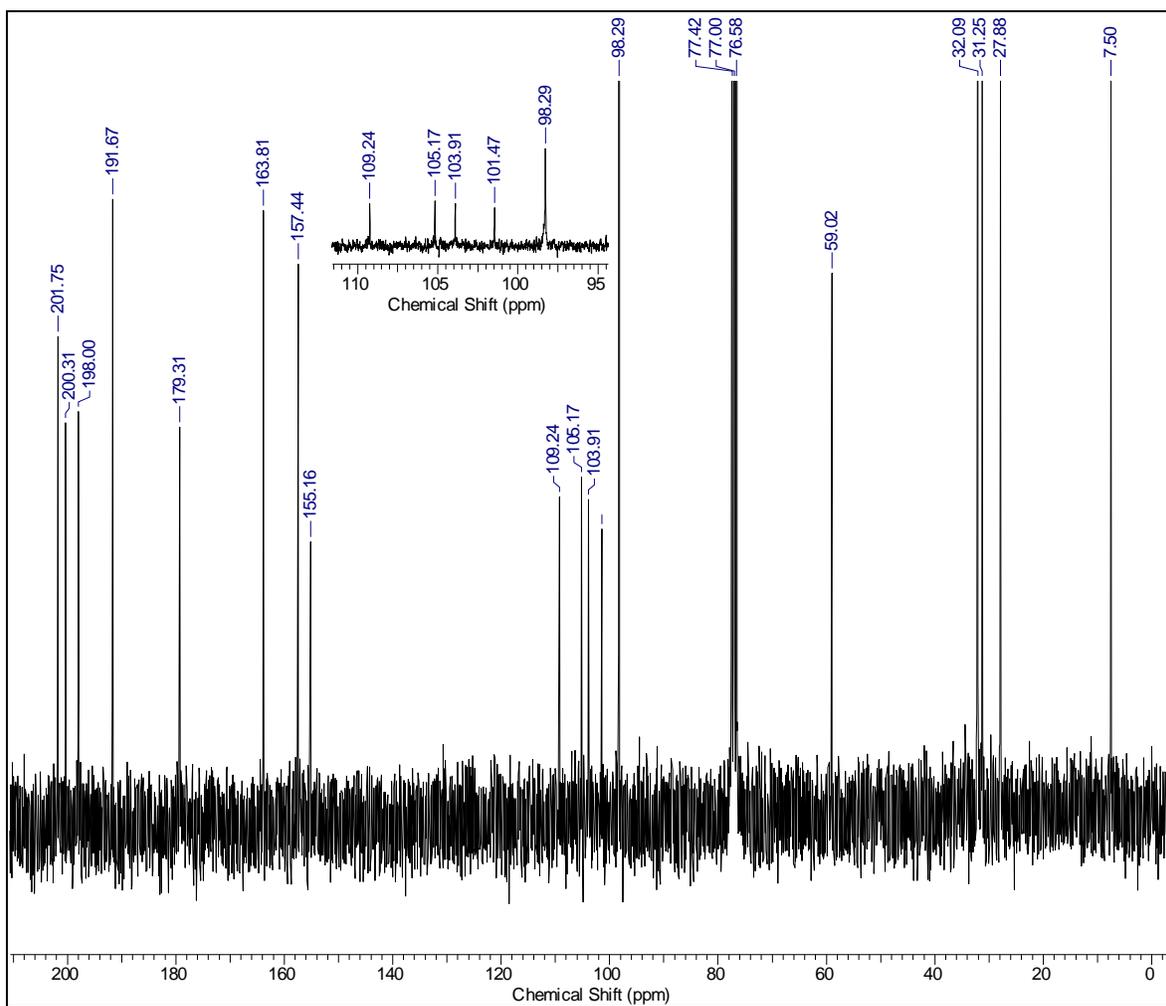
Espectro 8e – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC do ácido psorômico, em DMSO- d_6 .



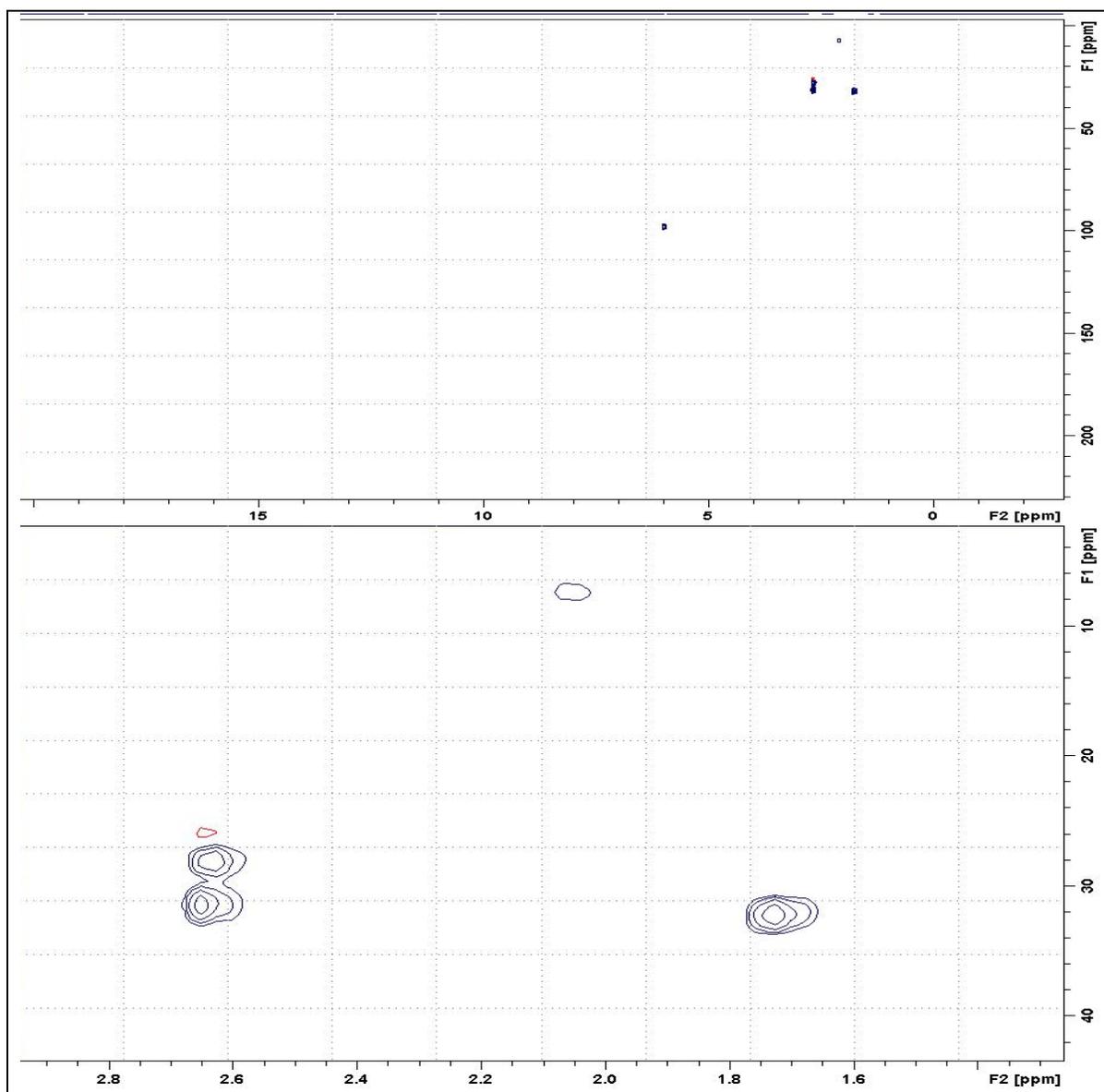
Espectro 9a – Espectro de RMN de ^1H do ácido úsnico, em CDCl_3 .



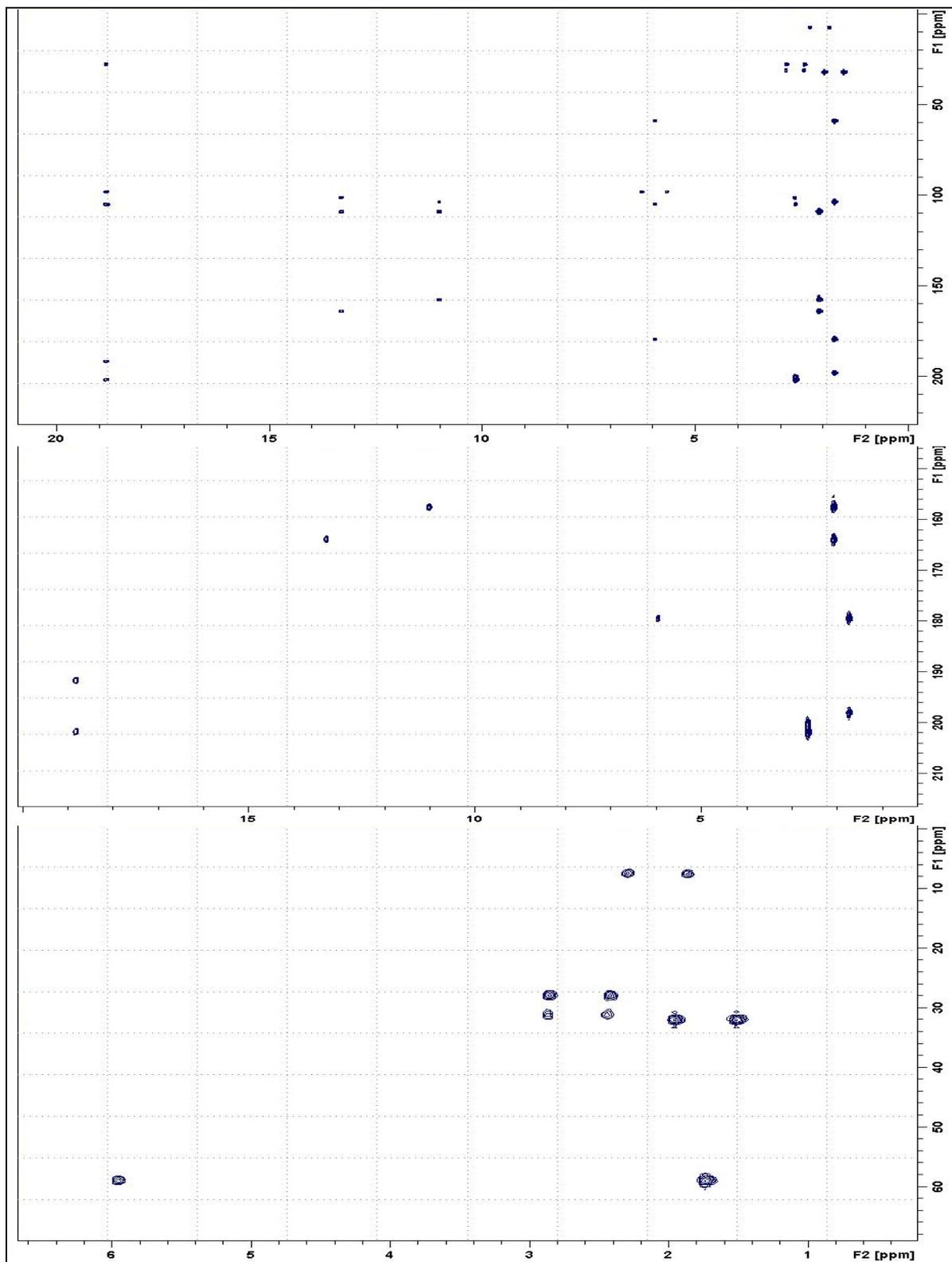
Espectro 9b – Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135) do ácido úsnico, em CDCl_3 .



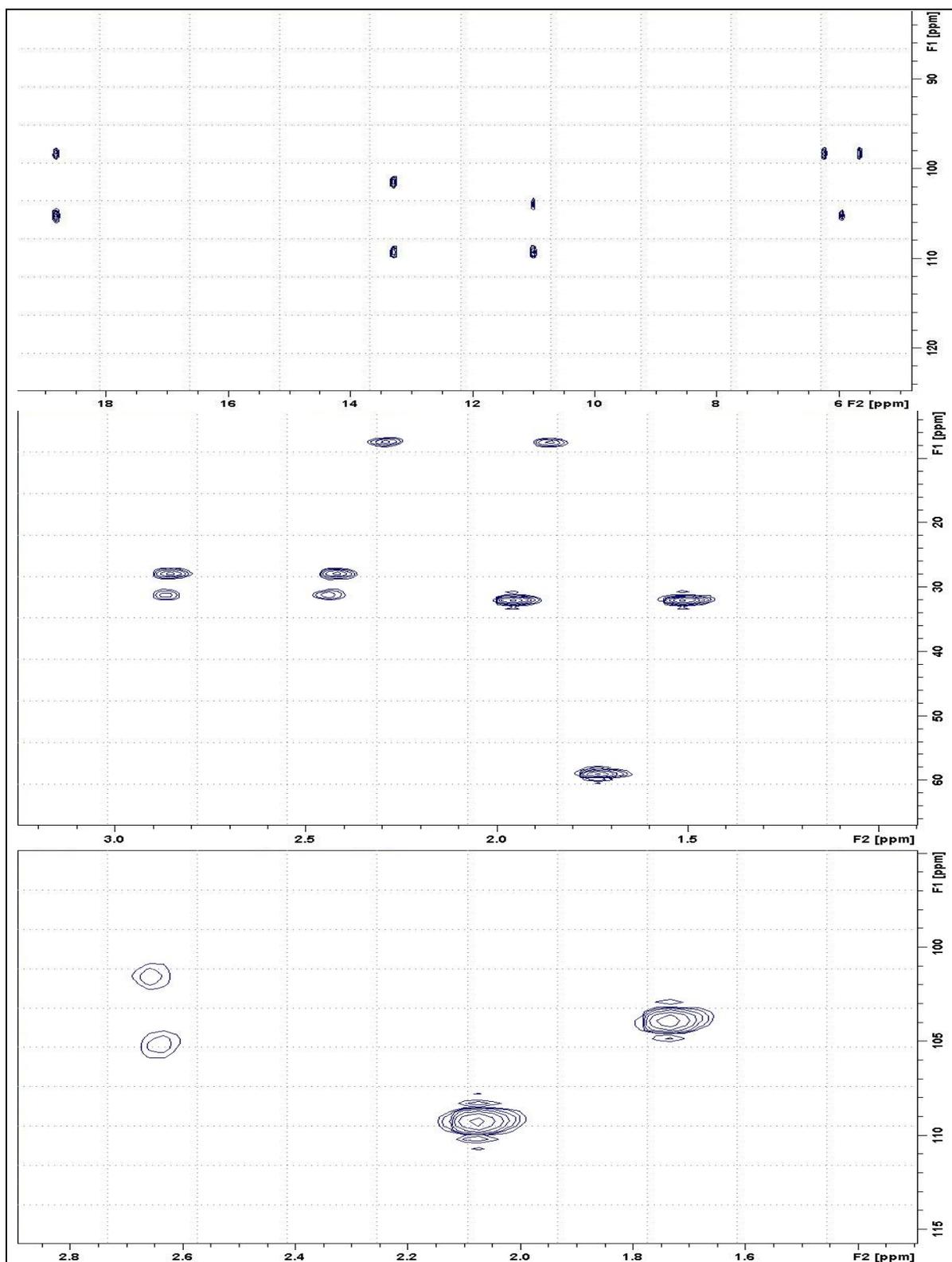
Espectro 9c – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido úsnico, em CDCl_3 .



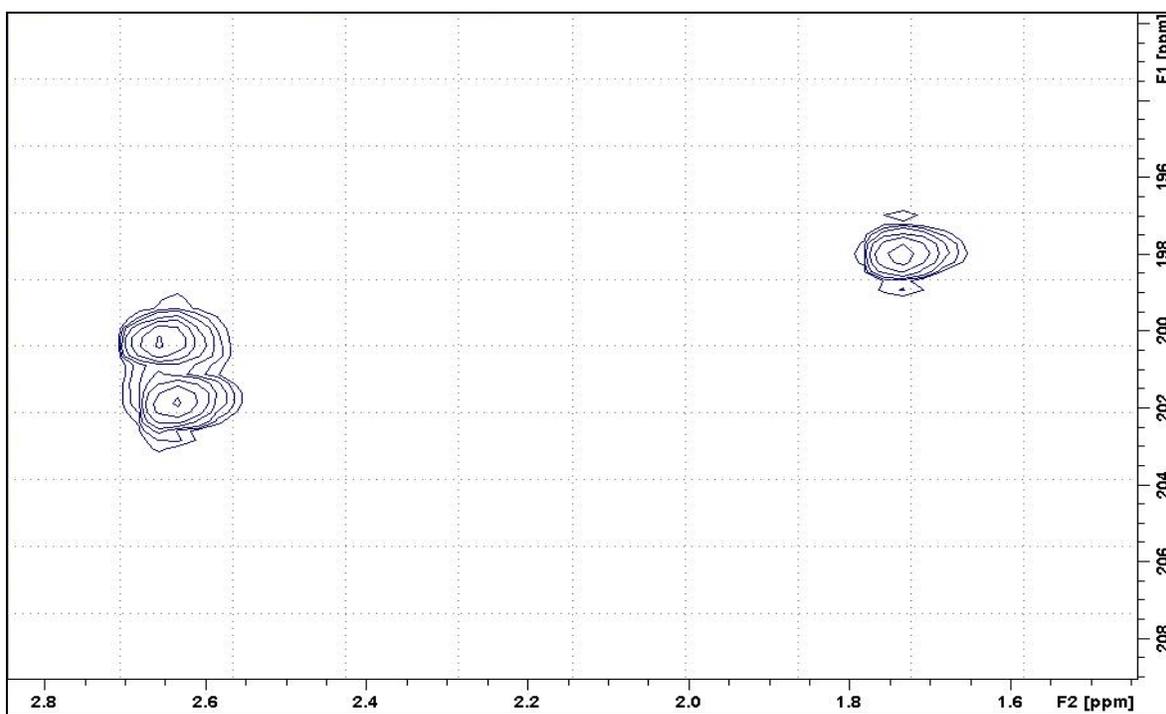
Espectro 9d – Correlação ^1H e ^{13}C gHSQC do ácido úsnico, em CDCl_3 .



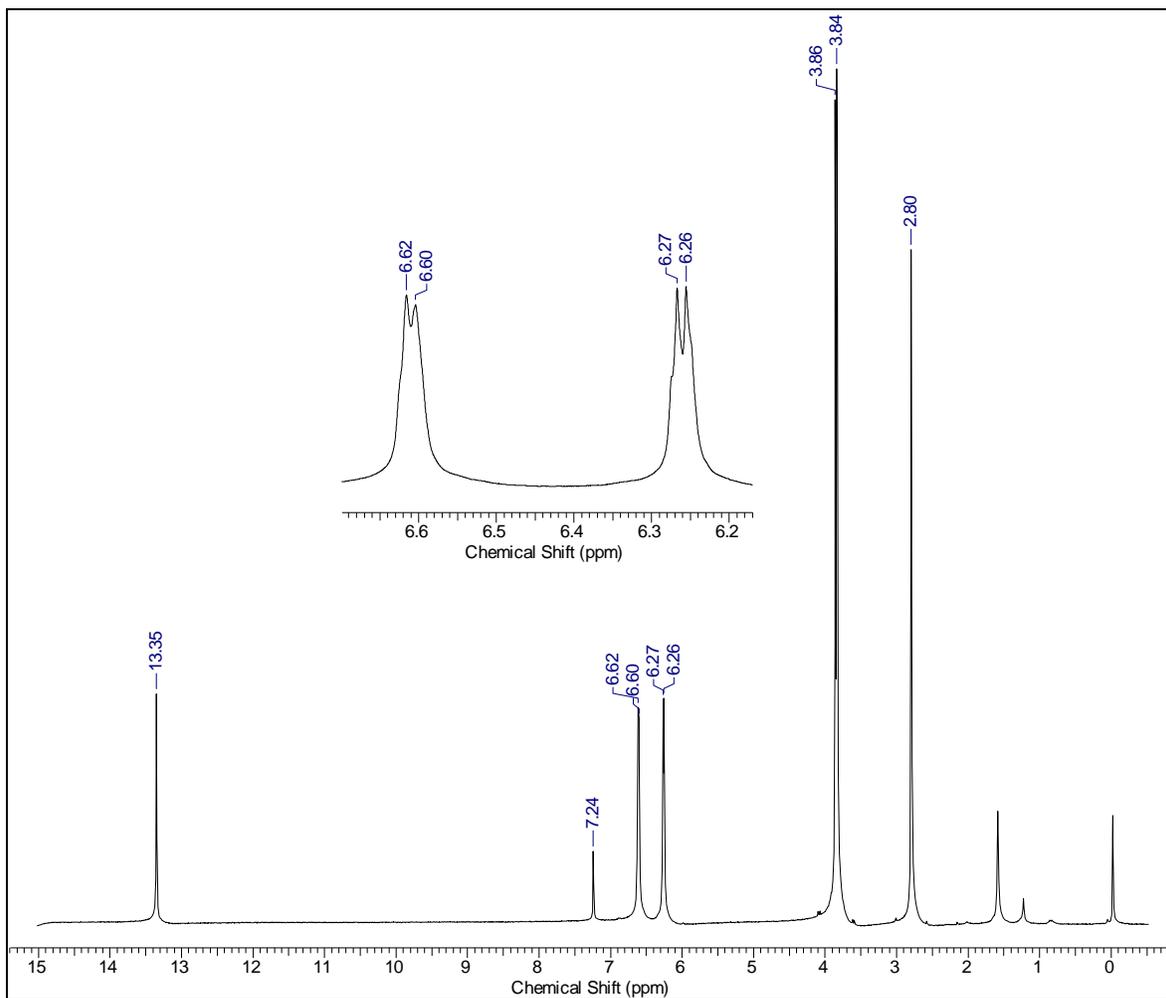
Espectro 9e₁ – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC do ácido úsnico, em CDCl_3 (parte 1).



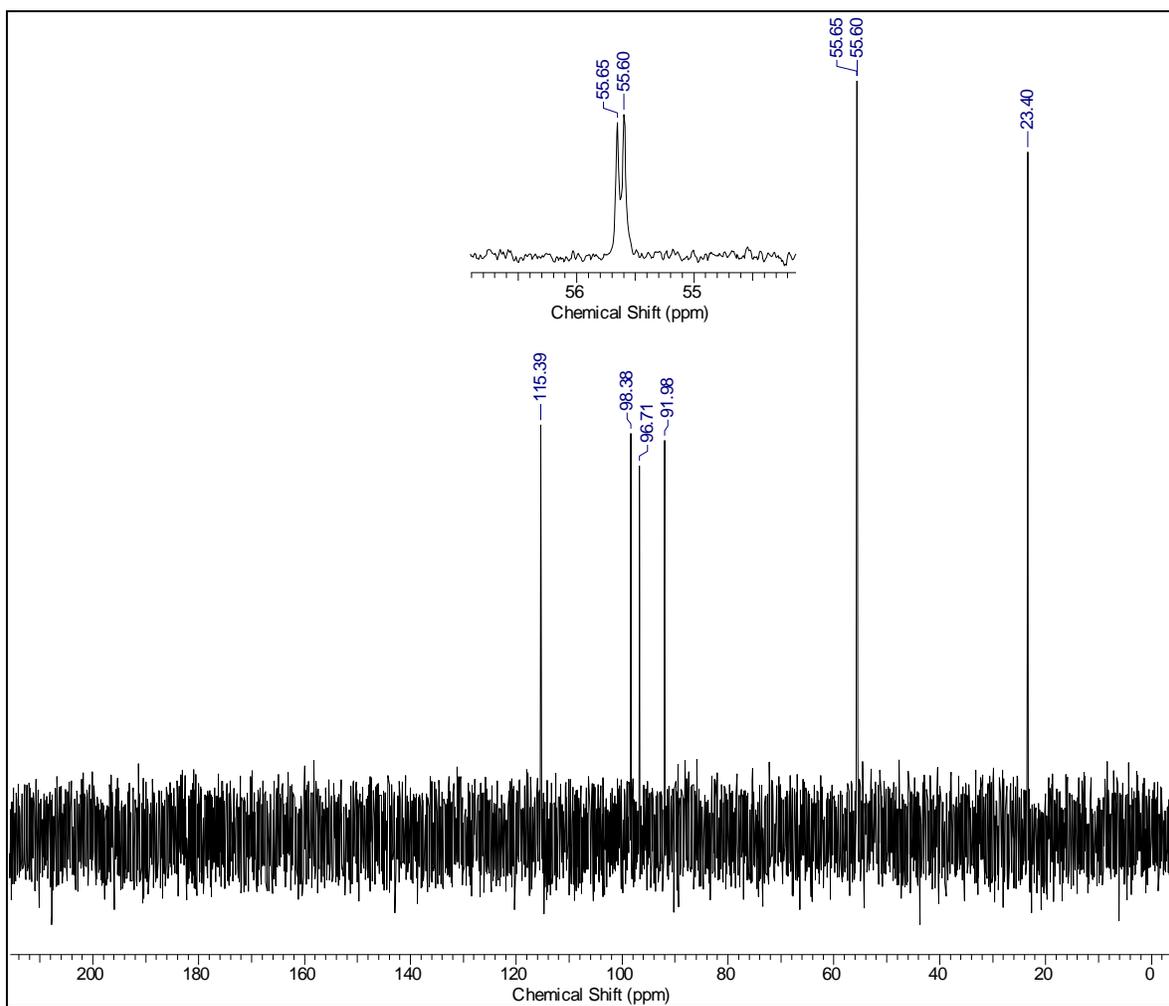
Espectro 9e₂ – Correlação à longa distância ¹H e ¹³C gHMBC do ácido úsnico, em CDCl₃ (parte 2).



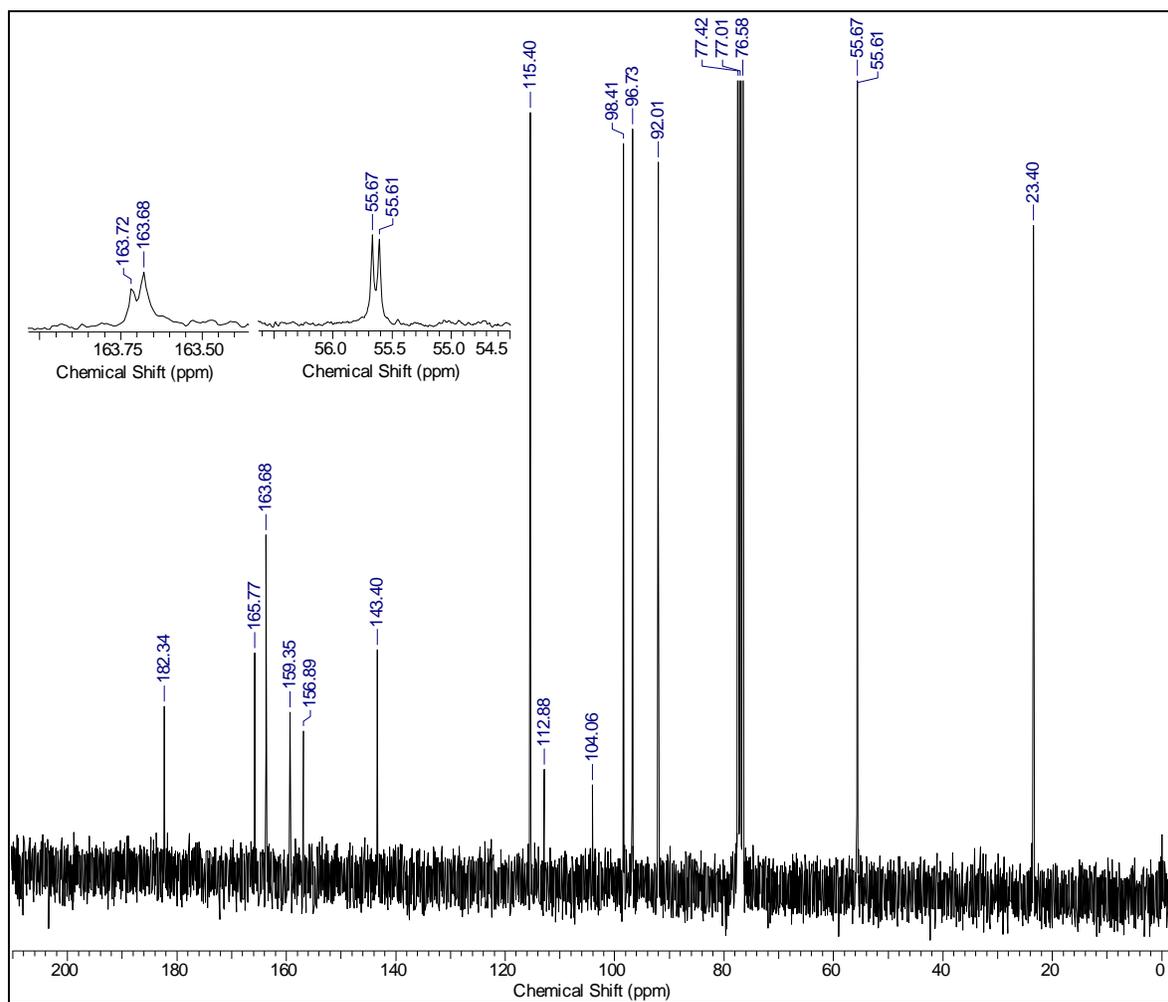
Espectro 9e₃ – Correlação à longa distância ¹H e ¹³C gHMBC do ácido úsnico, em CDCl₃ (parte 3).



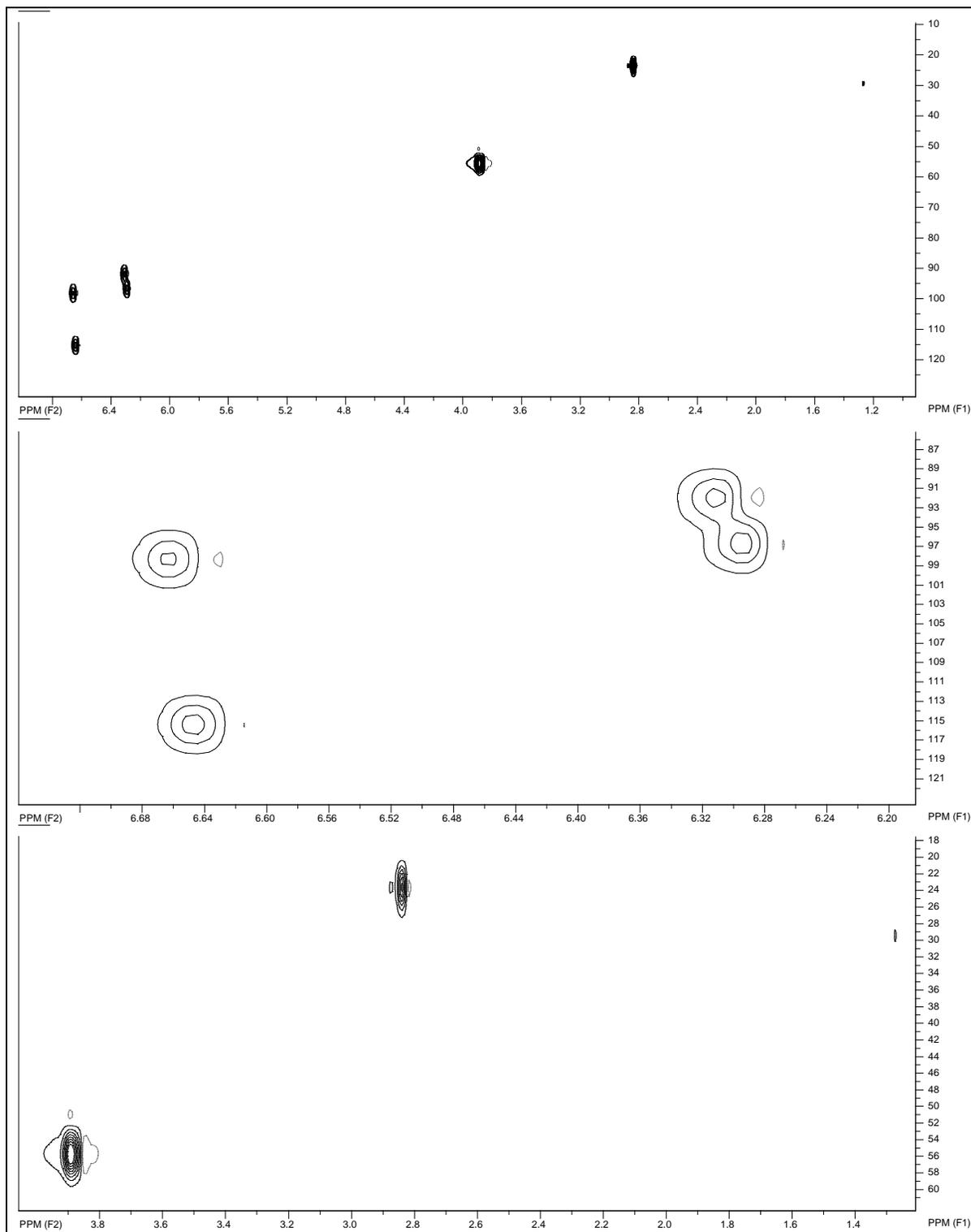
Espectro 10a – Espectro de RMN de ^1H da liquexantona, em CDCl_3 .



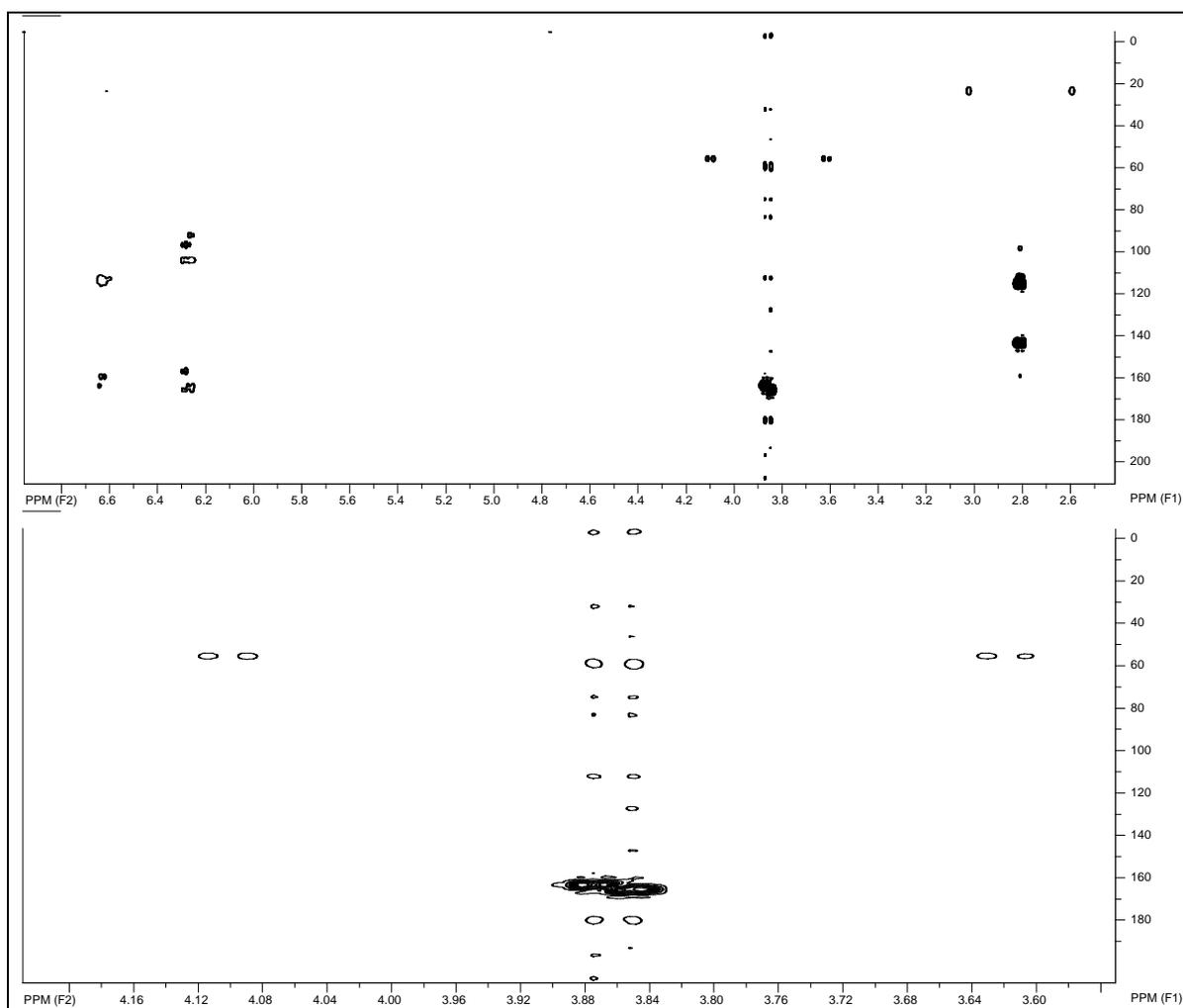
Espectro 10b – Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT-135) da liquexantona, em CDCl_3 .



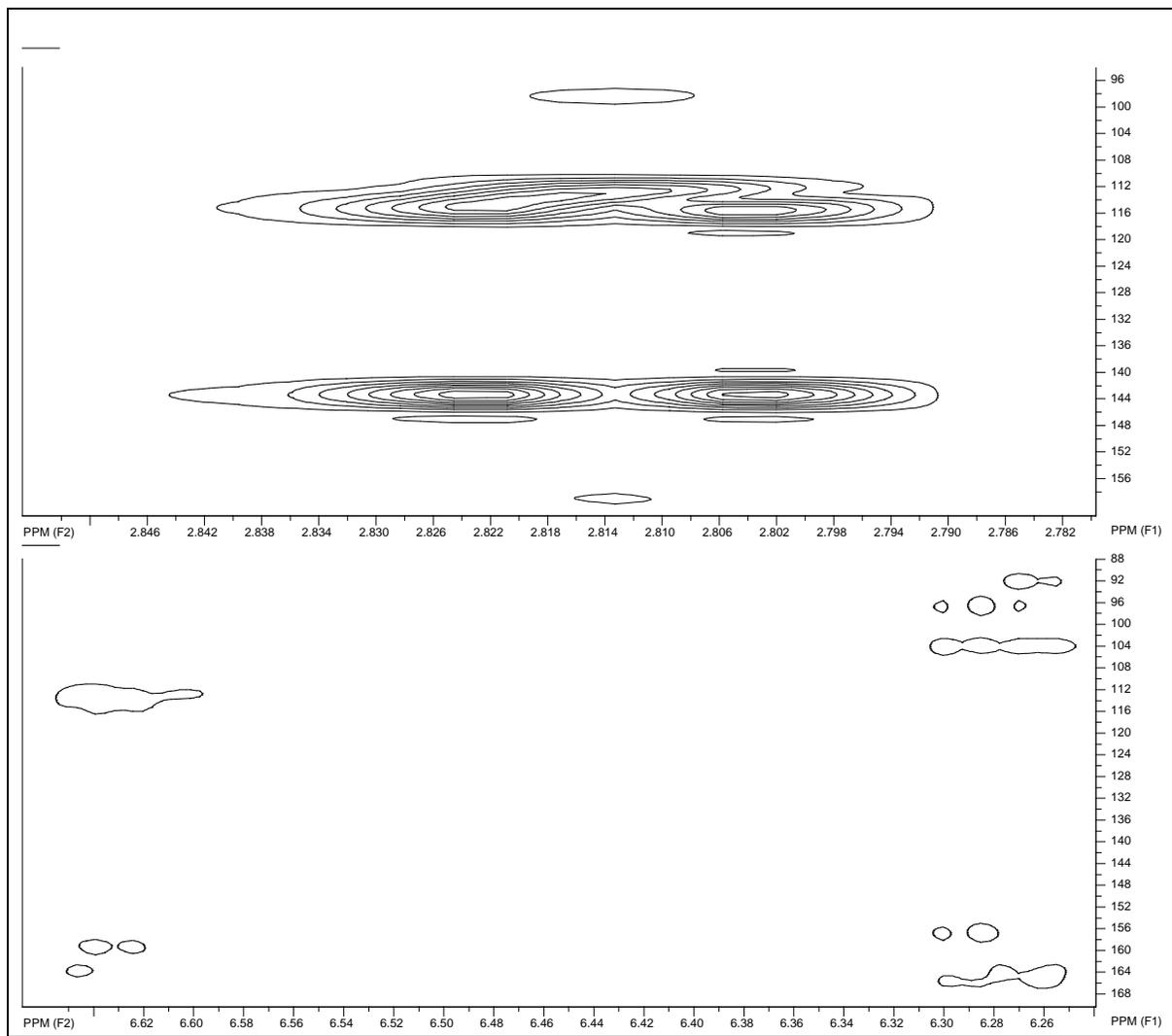
Espectro 10c – Espectro de RMN de ^{13}C da liquexantona, em CDCl_3 .



Espectro 10d – Correlação ¹H e ¹³C gHSQC da liquexantona, em CDCl₃.



Espectro 10e₁ – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC da liquexantona, em CDCl_3 (parte 1).



Espectro 10e₂ – Correlação à longa distância ^1H e ^{13}C gHMBC da liquexantona, em CDCl_3 (parte 2).