



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



CAMILA CARANE BITENCOURT BRITO

**AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES DA ENZIMA
SUPERÓXIDO DISMUTASE DE TRIPANOSOMATÍDEOS**

Salvador

2013

CAMILA CARANE BITENCOURT BRITO

**AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES DA ENZIMA
SUPERÓXIDO DISMUTASE DE TRIPANOSOMATÍDEOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Santos Castilho

Salvador

2013

Apoio Financeiro: FAPESB pedido n° 1091/2011 BOL n° 302/2011
e CAPES.

Sistema de Bibliotecas da UFBA

Brito, Camila Carane Bitencourt.

Avaliação e identificação de inibidores da enzima superóxido dismutase de tripanosomatídeos /
Camila Carane Bitencourt Brito. - 2013.

81 f.: il.

Inclui anexo.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Santos Castilho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador,
2013.

1. Tripanosomatídeo. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Inibidores enzimáticos. 4. Moléculas.
I. Castilho, Marcelo Santos. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia.
IV. Título.

CDD - 616.9363

CDU - 616.937

A minha mãe, Neuza

Meu exemplo de força e dedicação

Aos meus irmãos, Paula e Eduardo

Por toda confiança e incentivo

AGRADECIMENTO

A minha família, minha base de vida, agradeço pelo amor, dedicação, confiança e apoio.

Ao meu orientador professor Marcelo Castilho, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos colegas do Laboratório de Bioinformática e Modelagem Molecular (LaBiMM) e Laboratório de Cristalografia de Macromoléculas (LaCriMa), pela colaboração e por tornarem meus dias de trabalho mais prazerosos.

A todos os amigos que de alguma forma contribuíram para a concretização de mais uma etapa em minha vida. Em especial, Odailson, Rose e Thamires pelo apoio durante a escrita deste trabalho.

Resumo

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), causadas por parasitas protozoários, estão entre as principais causas de mortalidade em países tropicais de todo o mundo. A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, ainda é um problema de saúde pública e uma das maiores causas de morbidade e mortalidade da América Latina. Os fármacos utilizados para doença de Chagas são pouco eficazes e apresentam inúmeros efeitos colaterais, sendo necessária a busca por novas alternativas terapêuticas. Uma das formas de superar as limitações de fármacos utilizados contra tripanosomatídeos é através da identificação de novos alvos macromoleculares que apresentem diferença estrutural suficiente para garantir sua inibição seletiva em detrimento das enzimas do hospedeiro. As superóxido dismutases (EC 1.15.1.1) são um grupo de metaloenzimas que eliminam radicais superóxidos dismutando-os em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Com o objetivo de identificar moléculas promissoras para o desenvolvimento de fármacos contra tripanosomatídeos realizou-se uma triagem *in vitro* de substâncias sintéticas e de origem natural frente a enzima superóxido dismutase de *Trypanosoma brucei* (*TbSODb2*). Identificou-se nos ensaios experimentais dois inibidores de *TbSODb2*: Fenantrenoquinona-4-fenil tiossemicarbazona e catequina em sua forma oxidada. Ambas as moléculas inibem *TbSODb2* em mais de 40% na concentração de 100µM. A fim de investigar o mecanismo de inibição dessas moléculas, utilizou-se a técnica de acoplamento molecular. Essa metodologia evidenciou a importância das hidroxilas ligadas ao anel pirano para a atividade biológica da catequina oxidada, enquanto as hidroxilas catecólicas parecem não influenciar a afinidade por *TbSODb2*. Em relação à fenantrenoquinona-4-fenil tiossemicarbazona não foi possível identificar o provável modo de interação desse inibidor em *TbSODb2*. A partir das informações provenientes dos ensaios experimentais e *in silico* é possível planejar inibidores mais potentes que possam ser considerados como compostos protótipos para o desenvolvimento de fármacos contra a doença de Chagas.

Palavras-chave: Tripanosomatídeos. Superóxido dismutase. Acoplamento molecular

Abstract

The Neglected Tropical Diseases (NTDs), caused by protozoan parasites, are among the main causes of mortality in tropical countries around the world. The Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is still a public health problem and a major cause of morbidity and mortality in Latin America. The drugs used to fight Chagas disease are inefficient and have several side effects, therefore, there is an urgent need for novel therapies against Chagas' disease. One way to overcome the limitations of available drugs is through the identification of new macromolecular targets that have enough structural difference to ensure their selective inhibition instead of the host counterpart. The superoxide dismutases (EC 1.15.1.1) are a group of metalloenzymes that dismutate superoxide radicals into hydrogen peroxide and molecular oxygen. In order to identify promising molecules for the development of drugs against trypanosomatids there was a screening *in vitro* with synthetic substances and natural origin against superoxide dismutase of *Trypanosoma brucei*. It was identified in experimental assays two *TbSODb2* inhibitors: Phenanthrenequinone-4-phenyl thiosemicarbazone and oxidized catechin. Both molecules inhibit *TbSODb2* more than 40% at a concentration of 100 μ M. In order to investigate the mechanism of inhibition of these molecules, we used the docking molecular. This methodology for oxidized catechin showed the importance of the pyran ring hydroxyls linked to biological activity, while the hydroxyl catechol not seem to affect significantly the affinity for *TbSODb2*. Regarding Phenanthrenequinone-4-phenyl thiosemicarbazone was not possible to identify the probable mode of interaction of this inhibitor in *TbSODb2*. The information from the experimental and *in silico* guide the design of more potent inhibitors which can be considered as lead compounds for the development of drugs against Chagas disease.

Keywords: Trypanosomatids. Superoxide dismutase. Docking

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
Cu	Cobre
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DO	Densidade Óptica
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
ESP	Espectroscopia de Spin Eletrônico
Fe	Ferro
GSH	Glutationa
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (Isopropil- β -D Tiogalactopiranosídeo)
LB	Luria Bertani
Mn	Manganês
NBT	Nitro-blue Tetrazolium (Nitro-azul de Tetrazólio)
NTR	Nitroreductase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDB	Protein Data Bank (Banco de Dados de Proteína)
RNAi	Ácido Ribonucléico de Interferência
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
SOD	Superóxido Dismutase
T(SH ₂)	Tripanotiona Reduzida
TR	Tripanotiona Redutase
TS ₂	Tripanotiona Oxidada
Zn	Zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura dos fármacos disponíveis para tratamento da doença de Chagas. (1) nifurtimox; (2) benzonidazol	17
Figura 2 - Biorredução de fármaco nitroaromáticos. NTR: nitroreductase; SOD: superóxido dismutase; T(SH ₂): tripanotiona reduzida; TS ₂ : tripanotiona oxidada; TR: tripanotiona reductase	18
Figura 3 - Fármacos utilizados para tratamento da doença do sono	19
Figura 4 - Sistema de defesa antioxidante dos tripanosomatídeos (esquerda) e do hospedeiro (direita)	21
Figura 5 - Derivado de benzofitalazina ativo contra Fe-SOD de <i>T. cruzi</i>	22
Figura 6 - Derivados de benzofitalazina ativos contra SOD de <i>Leishmania spp.</i>	22
Figura 7 - Alinhamento sequencial múltiplo de superóxido dismutase de <i>T. brucei</i> (gi: 62249431), <i>T. cruzi</i> (gi 2149612) e <i>H. sapiens</i> (gi 529150) utilizando matriz BLOSUM62. Figura gerada com programa BIOEDIT	24
Figura 8 Sobreposição dos resíduos encontrados no sítio ativo das enzimas <i>TcSOD</i> (azul) e <i>TbSOD</i> (amarelo). Figura gerada com o programa PYMOL	24
Figura 9 - Determinação da atividade de SOD através da redução do NBT	27
Figura 10 - Oxidação da adrenalina a adrenocromo	28
Figura 11 - Etapas da reação de oxidação de adrenalina a adenocromo	28
Figura 12 - Oxidação do pirogalol a purpurogalina	29
Figura 13 - Etapas para identificação de sítios de interação proteína-ligante utilizando sondas esféricas	31
Figura 14 - Etapas para identificação de sítios de interação proteína-ligante com base na conservação de resíduos entre proteínas	32
Figura 15 - Gel (SDS-PAGE) 15% com diferentes condições de expressão de <i>TbSODb2</i> a 37°C por 3 horas: (1) sobrenadante 1.0 mM IPTG; (2) precipitado – 1.0 mM IPTG ; (3) sobrenadante 0.5mM IPTG; (4) precipitado – 0.5mM IPTG; (5) sobrenadante - 0.1mM IPTG; (6) precipitado 0.1 mM IPTG; (7) sobrenadante – 0.0 mM IPTG; (8) precipitado - 0mM IPTG (9) Padrão de peso molecular	40

Figura 16 - Gel (SDS-PAGE) 15% com diferentes condições de expressão de <i>TbSODb2</i> a 25°C por 6 horas: 1) sobrenadante 1.0 mM IPTG; (2) precipitado – 1.0 mM IPTG ; (3) sobrenadante 0.5mM IPTG; (4) precipitado – 0.5mM IPTG; (5) sobrenadante - 0.1mM IPTG; (6) precipitado 0.1 mM IPTG; (7) sobrenadante – 0.0 mM IPTG; (8) precipitado - 0mM IPTG (9) Padrão de peso molecular	41
Figura 17 - Gel (SDS-PAGE) 15% com diferentes condições de expressão de <i>TbSODb2</i> 25°C por 24 horas: 1) sobrenadante 1.0 mM IPTG; (2)precipitado – 1.0 mM IPTG ; (3) sobrenadante 0.5mM IPTG; (4)precipitado – 0.5mM IPTG; (5) sobrenadante - 0.1mM IPTG; (6) precipitado 0.1 mM IPTG; (7) sobrenadante – 0.0 mM IPTG; (8) precipitado - 0mM IPTG (9) Padrão de peso molecular	42
Figura 18 - Cromatograma da purificação de <i>TbSODb2</i> . Em azul: picos referentes as frações coletadas; Em verde: gradiente de imidazol	43
Figura 19 - Gel (SDS-PAGE) 10% mostrando a pureza obtida após eluição com imidazol: (1) padrão de peso molecular; (2-4) eluição com 250mM imidazol; (5-9) eluição com 500mM imidazol	44
Figura 20 - Inibição da autooxidação do pirogalol (0,4mM) na presença de concentrações diferentes da enzima <i>TbSODb2</i> . a) P= 0,0001 entre 10 µg e 12,5 µg; b) P< 0,0001 entre 10 µg e 15 µg; c) P=0,045 entre 12,5 µg e 15 µg	46
Figura 21 - Atividade de SOD em diferentes faixas de pH. Condições reacionais: Pirogalol (0.4mM), Tampão Tris (100 mM) e <i>TbSODb2</i> 10µg	47
Figura 22 - Teste de estabilidade da enzima em 5% e 10% de DMSO usando tampão 100mM Tris-HCl pH8,0; 0,4mM pirogalol, <i>TbSODb2</i> 10µg. P=0,88 entre 0 e 5%DMSO; P= 0,38 entre 0 e 10% DMSO	48
Figura 23 - Interferência da forma oxidada e não oxidada da catequina na oxidação do pirogalol	50
Figura 24 - Reação de oxidação da catequina	50
Figura 25 - Atividade inibitória das formas oxidada e não oxidada da catequina frente a <i>TbSODb2</i>	51
Figura 26 - Análogos da catequina disponíveis comercialmente	51
Figura 27 - Curva dose-resposta de Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona frente a <i>TbSODb2</i> .	54
Figura 28 - Acoplamento de Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona e catequina oxidada no sítio ativo de <i>TbSODb2</i> , de acordo com o programa SurflexDock. Os resíduos do sitio ativo estão destacados em amarelo. Esquerda: em rosa estão representadas as poses de maior	

- pontuação para catequina oxidada; Direita: Em azul estão representadas as poses de maior pontuação para 4-fenil-fenantrenoquinona tiossemicarbazona 55
- Figura 29 - Identificação de sítios de interação através dos programas Surfnet, PASS, QsiteFinder no monômero A de *TbSOD* (código PDB: 3ESF). Os resíduos em destaque representam o novo sítio encontrado 56
- Figura 30 - Sobreposição de *TbSOD* e *TcSOD* evidenciando a conservação dos resíduos no potencial sítio identificado 57
- Figura 31 - Soluções encontradas com auxílio do programa AutoDockVina para o acoplamento cego de fenantrenoquinona-4-fenil tiossemicarbazona em *TbSODb2*. Esquerda: sítio de interação encontrado com 7 poses; Direita: sítio de interação encontrado com 2 poses 58
- Figura 32 - Soluções encontradas com auxílio do programa AutoDockVina para o acoplamento cego de catequina oxidada em *TbSODb2*. Em amarelo: resíduos do sítio de interação encontrado. Em lilás: poses geradas para catequina oxidada. Em verde: monômero de *TbSODb2* 58
- Figura 33 - Soluções obtidas com o acoplamento da catequina oxidada utilizando o programa AutoDockVina. Em amarelo: resíduos identificados pelo consenso entre o PASS, Surfnet, Qsitefinder. Em lilás: poses geradas incluindo a de maior pontuação para catequina oxidada. Em azul: segundo grupo de poses geradas para catequina oxidada apresentando pontuações menores. Em verde: Monômero de *TbSODb2* 59
- Figura 34 - Acoplamento da catequina oxidada utilizando o programa AutodockVina. Esquerda: Pose de maior pontuação evidenciando as interações com a proteína. Direita: Representação da superfície da proteína e encaixe da catequina oxidada. Em amarelo: os resíduos Gln194; Lys155; Leu149; Phe74; Glu56 e Glu57 do sítio identificado e Ala152 e Arg197 resíduos próximo ao sítio que fazem interação com o inibidor. Em lilás: Pose de melhor pontuação gerada para catequina oxidada. Em verde: Monômero de *TbSODb2*. Em cinza: representação da superfície de *TbSODb2* 60
- Figura 35 - Soluções obtidas com o acoplamento da catequina oxidada utilizando o programa SurfexDock. Em amarelo resíduos identificados pelos algoritmos PASS, QsiteFinder, Surfnet. Em lilás: poses geradas para catequina oxidada. Em verde: Monômero de *TbSODb2* 61
- Figura 36 - Soluções de acoplamento molecular para catequina oxidada segundo os programas SurfexDoxk e AutoDockVina na superfície da proteína *TbSODb2*. Em azul: acoplamento da catequina oxidada segundo o programa SurfexDock. Em lilás: acoplamento da catequina oxidada segundo o programa AutodockVina. Figura em duas orientações para

realçar a maior complementariedade do AutoDockVina.

62

Figura 37 - Soluções obtidas com o acoplamento da Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona utilizando o programa AutodockVina. Esquerda: Todas as poses para a Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona. Direita: Interações realizadas pela pose de maior pontuação. Resíduos em amarelo correspondem aos resíduos identificados pelo consenso entre os programas PASS, Surfnet, Qsitefinder. Em azul: poses de maior pontuação. Em laranja: poses de menor pontuação. Em verde: monômero de *TbSODb2*. Linha tracejada representa uma ligação de Hidrogênio

63

Figura 38 - Acoplamento da Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona utilizando o SurfexDock. Esquerda: poses geradas para Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona; Direita: Pose de maior pontuação para Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona; Em amarelo: resíduos identificados pelo consenso entre o PASS, Surfnet, Qsitefinder. Em azul: poses geradas pelo Surfex-Dock. Em verde: Monômero de *TbSODb2*. Linha tracejada representado ligação de Hidrogênio

64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Conversão do radical superóxido em oxigênio (O ₂) e peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂).	23
Quadro 2 – Derivados de tioxipirimidinas testados contra <i>TbSODb2</i>	52
Quadro 3 – Derivados de tiossemicarbazonas testados contra <i>TbSODb2</i>	53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	166
1.1 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS (DTNs).....	166
1.2 DOENÇA DE CHAGAS.....	166
1.3 DOENÇA DO SONO.....	18
1.4 ALVO TERAPÊUTICO: SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE.....	200
1.5 SUPERÓXIDO DISMUTASE	222
1.6 IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS	255
1.6.1 Ensaio cinético para superóxido dismutase	266
1.7 IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS SÍTIOS DE INTERAÇÃO E ACOPLAMENTO MOLECULAR	299
2. OBJETIVOS	344
2.1 OBJETIVO GERAL	344
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	344
3. MATERIAIS E MÉTODOS	355
3.1 EXPRESSÃO DE <i>TbSODb2</i>	355
3.2 PURIFICAÇÃO DE <i>TbSODb2</i>	355
3.3 PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS CINÉTICOS DE <i>TbSODb2</i>	366
3.4 TRIAGEM <i>in vitro</i> E DETERMINAÇÃO DE IC ₅₀ DE INIBIDORES DE <i>TbSODb2</i>	366
3.5 IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS SÍTIOS DE INTERAÇÃO EM <i>TbSODb2</i>	377
3.6 ACOPLAMENTO MOLECULAR	377
3.6.1 AutoDockVina	388
3.6.1.1 Identificação de sítios de interação por acoplamento molecular	388
3.6.1.2 Acoplamento no sítio potencial	388

3.6.2 SurflexDock.....	388
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	399
4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE <i>TbSODb2</i>	399
4.2 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO CINÉTICO DE <i>TbSODb2</i>	444
4.3 TRIAGEM DE INIBIDORES DE <i>TbSOD</i>	488
4.4 IDENTIFICAÇÃO DE SÍTIO E ACOPLAMENTO MOLECULAR	544
5. CONCLUSÃO.....	655
REFERÊNCIA	66
ANEXO	75

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS (DTNs)

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), causadas por parasitas protozoários, estão entre as principais causas de mortalidade em países tropicais de todo o mundo (FIDALGO; GILLE, 2011; SCHMIDT et al., 2012). As DTNs são definidas como tal pela Organização Mundial de Saúde (OMS) devido à falta de investimento financeiro, em pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, por grande parte da indústria farmacêutica (FIDALGO; GILLE, 2011; SCHMIDT et al., 2012), que por sua vez está atrelada ao retorno financeiro insuficiente gerado nessa área de estudo (DIAS; DESSOY, 2009). Nessa perspectiva, os programas de pesquisa e desenvolvimento realizados em universidades e centros de pesquisas são cruciais na identificação de novas alternativas terapêuticas para o controle e tratamento dessas doenças (GUIDO; ANDRICOPULO, 2010). Todavia, as atividades de pesquisa realizadas nessas instituições não são suficientes para desenvolver novas entidades químicas capazes de combater as doenças negligenciadas (MOREL, 2004). Assim, parcerias entre o setor público (universidades) e privado (indústria farmacêutica) têm-se destacado como ferramenta importante para sanar limitações de investimentos em doenças tropicais negligenciadas (BUSE; WALT, 2000). Nesse contexto, a pesquisa realizada na universidade está centrada em etapas básicas de planejamento de fármacos, como a validação de alvos biológicos, triagens experimentais, planejamento e síntese de novos compostos, enquanto, a indústria farmacêutica atua, prioritariamente, nas etapas de estudos pré-clínicos e clínicos (DIAS; DESSOY, 2009). Como exemplo de DTNs pode-se citar a doença de Chagas (agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*), doença do sono (agente etiológico: *Trypanosoma brucei*) e Leishmaniose (agente etiológico: *Leishmania spp.*) (FIDALGO; GILLE, 2011).

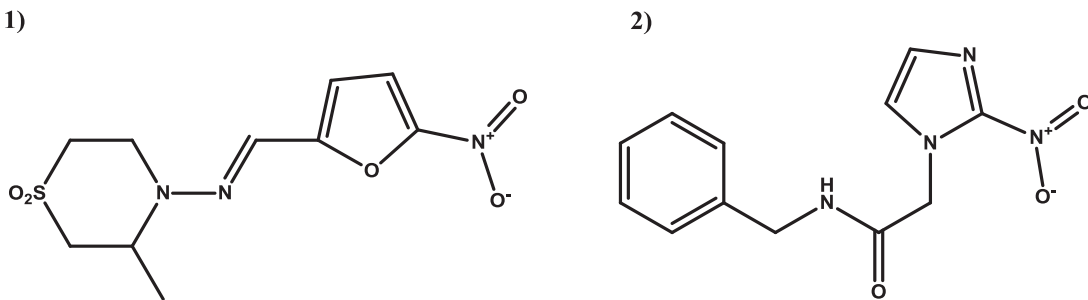
1.2 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas ainda é o maior problema de saúde pública e uma das maiores causas de morbidade e mortalidade na América Latina. Estima-se que aproximadamente 90 milhões de pessoas estejam sob risco de infecção e existam

mais de 8 milhões de pacientes infectados nos 18 países endêmicos (SALOMON, 2012).

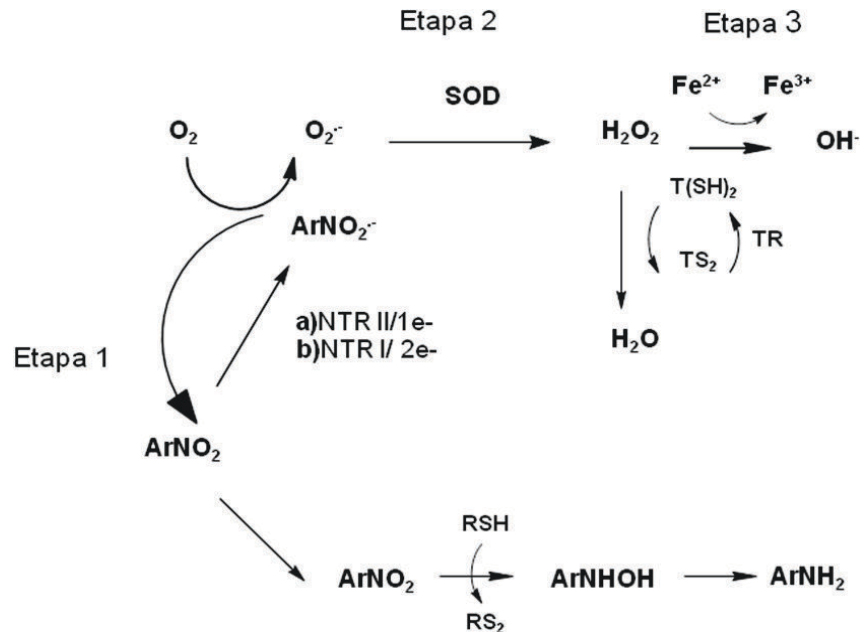
O agente causador da doença de Chagas é transmitido por triatomíneos (barbeiros) em áreas endêmicas, no entanto, a doença pode ser transmitida verticalmente de mãe para filho, em transfusões de sangue e transplantes de órgãos (PEREZ-MOLINA et al., 2009). Adicionalmente, áreas não-endêmicas como Europa e Estados Unidos também têm apresentado casos de pacientes infectados por *T. cruzi* (CORTEZ et al., 2012). O tratamento corrente é baseado na administração de nifurtimox e benzonidazol (Figura 1), compostos nitroheterocíclicos que atuam como pró-fármacos e sofrem ativação por meio da ação de nitroredutases do hospedeiro (WILKINSON; KELLY, 2009).

Figura 1 - Estrutura dos fármacos disponíveis para tratamento da doença de Chagas. (1) nifurtimox; (2) benzonidazol



A ativação desses fármacos leva a formação de espécies reativas de oxigênio (WILKINSON et al., 2006; BOIANI et al., 2010) (Figura 2), as quais são geradas através da redução dos grupos nitro a radicais nitro-ânion, em uma reação catalisada pela enzima NADPH/NADH⁻ nitroredutase (vide etapa 1 da figura 2). Os radicais gerados reagem com O₂, produzindo ânion superóxido e, subsequentemente, peróxido de hidrogênio, através da reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (vide etapa 2 da figura 2). Essas espécies, na presença de ferro formam um hidroxil, que age como forte oxidante, causando a morte do parasita (vide etapa 3 da figura 2) (BOIANI et al., 2010).

Figura 2 - Biorredução de fármaco nitroaromáticos. NTR: nitroreductase; SOD: superóxido dismutase; T(SH)₂: tripanotiona reduzida; TS₂: tripanotiona oxidada; TR: tripanotiona redutase;



Fonte: BOIANI et al., 2010

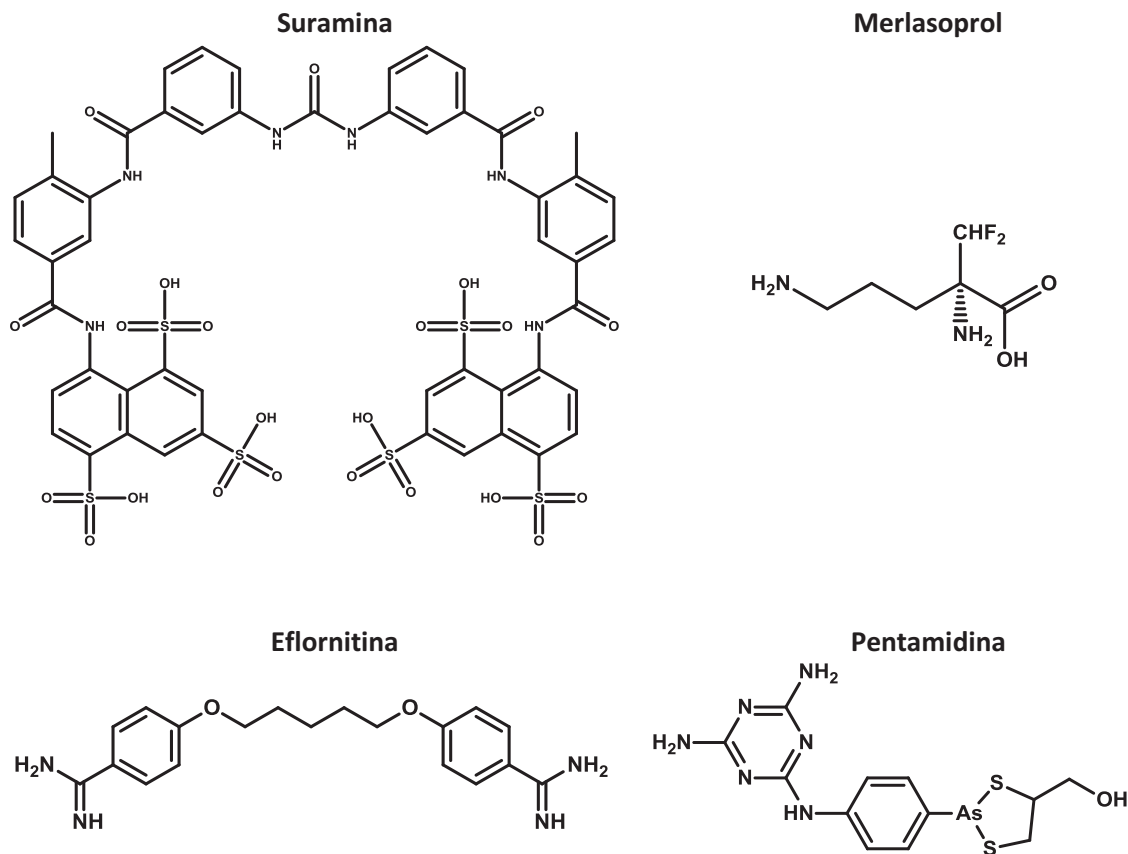
Devido ao seu mecanismo de ação, decorrente da biorredução de grupos nitro e geração de espécies reativas de oxigênio, esses fármacos apresentam diversos efeitos colaterais, pois as espécies reativas de oxigênio são capazes de interagir também com macromoléculas do hospedeiro (MURTA et al, 2008; MOLINA et al, 2009; VIOTTI et al., 2009; PAL;UDAY, 2012). Dessa forma, pode-se perceber que as opções terapêuticas disponíveis são limitadas e ineficientes (GUIDO; OLIVA, 2009; CAPRILES et al., 2010; RASSI et al, 2010).

1.3 DOENÇA DO SONO

A tripanossomíase africana, ou doença do sono, causada pelos *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*, afeta somente as áreas onde se encontra o vetor transmissor, mosca Tsé-tsé, razão pela qual seu impacto sobre a saúde pública é maior na África subsaariana (MALVY; CHAPPUIS, 2011). Embora o repertório de fármacos disponíveis para o tratamento dessa DTN seja maior (Figura 3), a incidência de efeitos tóxicos (WELBURN; MAUDLIN; SIMARRO, 2009; BRUN; BLUM, 2012; KENNEDY, 2013), associada ao aparecimento de resistência a alguns

fármacos (exemplo: melarsoprol (MALLARI et al., 2008)) evidencia a necessidade de se desenvolver novas alternativas terapêuticas para o tratamento da doença do sono.

Figura 3- Fármacos utilizados para tratamento da doença do sono



Fonte: KENNEDY, 2013

Uma das formas de superar as limitações de fármacos utilizados contra tripanosomatídeos é através da identificação de novos alvos macromoleculares que apresentem diferença estrutural suficiente para garantir sua inibição seletiva em detrimento das enzimas do hospedeiro (GALPERIN; WALKER; KOONIN, 1998; GUIDO; OLIVA, 2009; CAPRILES et al., 2010). Nesse sentido, uma das abordagens para se desenvolver fármacos contra DTNs se baseia na identificação de diferenças metabólicas entre células de mamíferos e dos parasitas, as quais podem tornar-se alvos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos (TURRENS; McCORD, 2006).

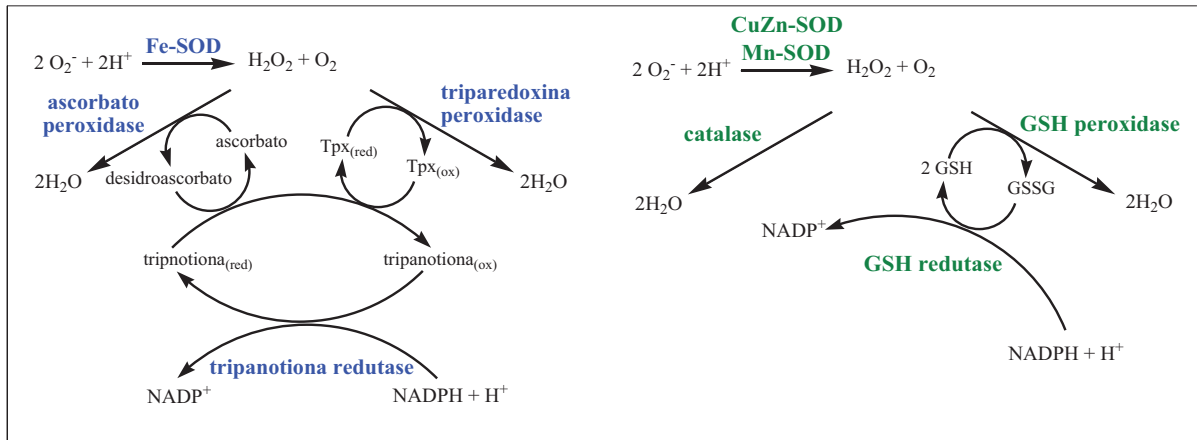
As enzimas destacam-se como alvos biológicos de grande importância para o planejamento de novos fármacos, devido as suas funções essenciais em vias bioquímicas associadas a doenças e disfunções (GUIDO; ANDRICOPULO, 2010). Considerando que tanto a sobrevivência do parasita quanto a virulência dependem do sistema de defesa antioxidante (FLOHE; HECHT; STEINERT, 1999; MULLER et al., 2003), essa via é considerada como promissora para o desenvolvimento de fármacos contra doença de Chagas.

1.4 ALVO TERAPÊUTICO: SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

Todos os organismos aeróbicos são expostos a espécies reativas de oxigênio (ânions superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxil (OH^{\cdot}) contra as quais desenvolveram mecanismos de proteção (TURRENS; McCORD, 2006; PAL; ODAY, 2012). Em condições fisiológicas, os radicais livres encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (HANDY; LOSCALZO, 2012; PAL; ODAY, 2012). No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS; DAVID, J.M; DAVID, J.P., 2006). Portanto, o equilíbrio entre a produção e remoção dessas espécies é essencial para manter as funções celulares normais (HANDY; LOSCALZO, 2012).

Os tripanosomatídeos são altamente susceptíveis ao estresse oxidativo induzido por radicais de oxigênio livre (SOULERE et al., 2003). Comparando o sistema de defesa antioxidante do hospedeiro e do parasita é possível observar diferenças significativas entre eles (Figura 4).

Figura 4 - Sistema de defesa antioxidante dos tripanosomatídeos (esquerda) e do hospedeiro (direita)



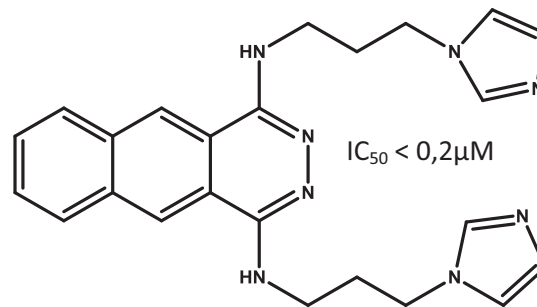
Fonte: TURRENS, 2004

Tanto no parasita quanto no hospedeiro, a enzima superóxido dismutase atua na primeira etapa da via antioxidante detoxificando radicais superóxidos, a partir daí se observa diferenças entre as vias bioquímicas: no ser humano as enzimas glutathiona peroxidase e catalase são a linha de frente no metabolismo do peróxido. Entretanto, ambas as enzimas estão ausentes nos tripanosomatídeos, sendo substituídas em seu papel bioquímico pelas peroxidoxinas (WILKINSON; MEYER; KELLY, 2000; HANDY; LOSCALZO, 2012). Adicionalmente, os tripanosomatídeos possuem um sistema tiol-redox baseado na tiol-tripanotona e tripanotona redutase, que inclui também triparedoxina e triparedoxina peroxidase (ARIYANAYAGAM; FAIRLAMB, 2001).

Embora a enzima superóxido dismutase esteja presente no parasita e no homem, ela é um alvo promissor pois já foi relatado que sua inibição leva a morte do parasita (SANZ et al., 2008). Entre os inibidores dessa enzima destacam-se as benzofitalazinas (Figura 5) que inibem Fe-SOD de *T. cruzi* e apresentam toxicidade inferior ao benzonidazol (SANZ et al., 2008). Estudos de Sanchez-Moreno e colaboradores (2012) reforçam a relevância de inibidores de SOD ao mostrarem atividade inibitória seletiva de derivados de benzofitalazinas frente a Fe-SOD de *Leishmania infantum* (IC_{50} entre 1,8 – 108,9 μM) e *Leishmania braziliensis* (IC_{50} entre 12,9 – 64,9 μM) em comparação a inibição da enzima humana CuZn-SOD (IC_{50} entre 120 – 350,3 μM) (Figura 6).

Em conjunto, essas evidências sugerem que a superóxido dismutase seja um alvo promissor para o desenvolvimento de fármacos contra tripanosomatídeos.

Figura 5 - Derivado de benzofitalazina ativo contra Fe-SOD de *T.cruzi*

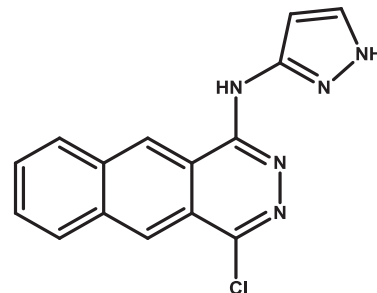
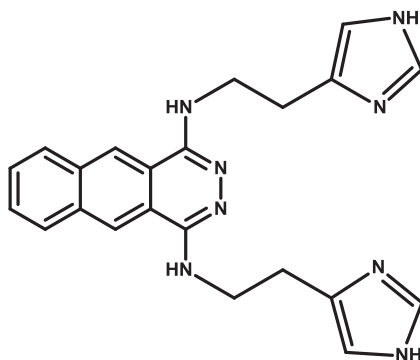


Fonte: SANZ et al., 2008.

Figura 6 - Derivados de benzofitalazina ativos contra SOD de *Leishmania spp.*

IC_{50} (*Leishmania infantum*) = 1,8 μM

IC_{50} (*Leishmania braziliensis*) = 12,9 μM



Fonte: Sanchez-Moreno, 2012.

1.5 SUPERÓXIDO DISMUTASE

As superóxido dismutases (EC 1.15.1.1) são um grupo de metaloenzimas que eliminam radicais superóxidos dismutando-os em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (DUFERNEZ et al., 2006; DOLASHKA et al., 2011). A produção de oxigênio molecular ocorre quando o metal está na forma oxidada (Quadro 1- etapa 1) e de peróxido de hidrogênio quando ele encontra-se na forma reduzida (Quadro 1 - etapa 2) (ABREU; CABELLI, 2010).

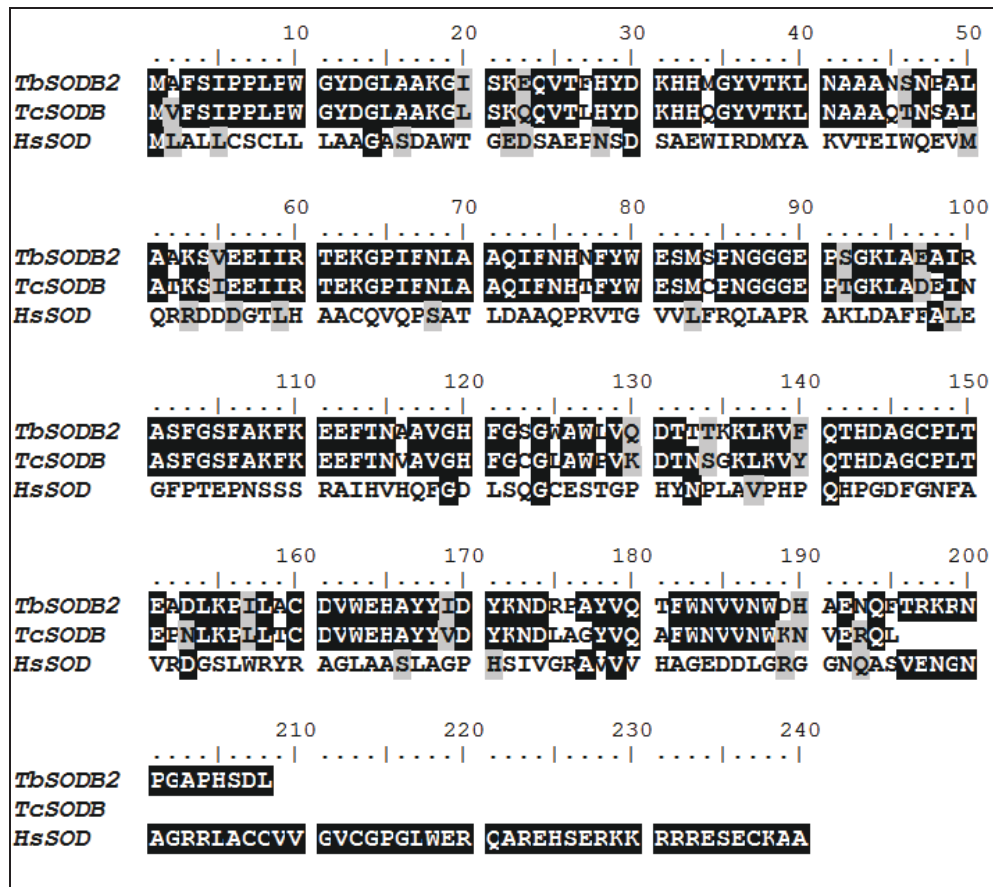
Quadro 1: Conversão do radical superóxido em oxigênio (O₂) e peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) .

$O_2^{\cdot -} + \text{Metal}_{\text{oxidado}} \rightarrow \text{Metal}_{\text{reduzido}} + O_2$ (Etapa 1)
$O_2^{\cdot -} + \text{Metal}_{\text{reduzido}} \rightarrow \text{Metal}_{\text{oxidado}} + O_2^{\equiv}$ (Etapa 2)
$O_2^{\equiv} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$

Diferentes metais (cobre e zinco (Cu/Zn), ferro (Fe) ou manganês (Mn)) podem ser encontrados no sítio ativo das SODs: Cu/Zn-SOD é encontrada principalmente em eucariotos, cloroplastos e bactérias; Mn-SOD ocorre em procariotos e mitocôndrias de eucariotos; Fe-SOD é encontrada em procariotos e cloroplastos (BACHEGA et al., 2009; BAFANA et al., 2011). Nos tripanosomatídeos existem 4 isoformas de Fe-SOD. As Fe-SODA e Fe-SODC são encontradas na mitocôndria (TOMAS; CASTRO, 2012), enquanto as isoformas *TbSODb1* e *TbSODb2* estão localizadas no glicossomo, organela semelhante ao peroxissomo, de eucariotos (DURFENEZ et al., 2006). Foi demonstrado através de experimentos com RNAi que a baixa expressão das isoformas *TbSODb1* e *TbSODb2* ocasionam morte do parasita (WILKINSON et al., 2006). Destaca-se assim a importância dessas isoformas para sobrevivência destes parasitas.

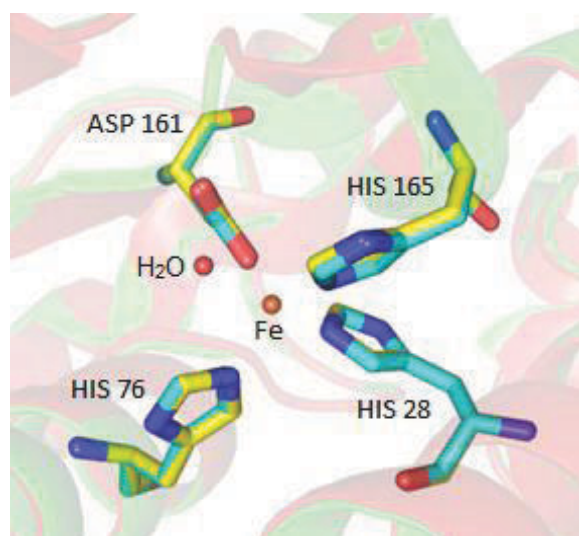
As SODs de *T. brucei* (*TbSODb2*) e *T. cruzi* (*TcSODb*) apresentam alta similaridade sequencial (Figura 7) a qual se reflete na conservação da estrutura tridimensional. De fato, os resíduos que compõem o sítio ativo são idênticos em ambas as enzimas (Figura 8). Sendo assim, acredita-se que moléculas capazes de inibir *TbSOD* também inibirão *TcSOD*. Outro fator interessante é que existe uma baixa similaridade sequencial entre as enzimas dos parasitas e a do hospedeiro (aproximadamente 10%), sugerindo ser possível identificar moléculas que tenham maior afinidade pelas enzimas do parasita e assim planejar fármacos mais eficazes e seletivos para o tratamento da doença de Chagas e/ou doença do sono.

Figura 7 - Alinhamento sequencial múltiplo de superóxido dismutase de *T. brucei* (gi: 62249431), *T. cruzi* (gi 2149612) e *H. sapiens* (gi 529150) utilizando matriz BLOSUM62. Figura gerada com o programa BIOEDIT



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 8 - Sobreposição dos resíduos encontrados no sítio ativo das enzimas *TcSOD* (azul) e *TbSOD* (amarelo). Figura gerada com o programa PYMOL



Fonte: Elaborada pelo autor

1.6 IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS

O sucesso do planejamento de fármacos depende da identificação de micromoléculas quimicamente diversas que possam modular o alvo macromolecular de interesse através de diferentes mecanismos bioquímicos (inibidores competitivos, não-competitivos e incompetitivos) (COPELAND, 2005). Produtos de origem natural constituem uma das principais fontes de moléculas bioativas por possuírem grande diversidade estrutural, decorrente do maior número de centro quirais e complexidade em comparação aos compostos sintéticos (KOEHN, 2012). Como consequência disso, dentre os fármacos aprovados, cerca de 64% são derivados de produtos naturais (YUE et al., 2012; VALLI et al., 2013).

Diante desses dados é natural que o Brasil explore sua biodiversidade para identificar novas moléculas bioativas. Entre os biomas de destaque no país temos a floresta amazônica que contém cerca de 20% das espécies vegetais do mundo e a região do semi-árido, onde, devido as condições inóspitas do ambiente, metabólitos secundários inéditos podem ser encontrados (VALLI et al., 2013). Um exemplo bem sucedido de aproveitamento da biodiversidade brasileira está no uso do alcalóide pilocarpina, isolado de *Pilocarpus sp.*, para desenvolver o fármaco Salagen®, indicado para tratar hipofunção das glândulas salivares (BOLZANI et al., 2012).

Mesmo quando um produto natural não tem a atividade biológica necessária para ser utilizado como fármaco, seu esqueleto molecular serve de base para modificações moleculares que possam ter atividade satisfatória (VALLI et al., 2012). Essa estratégia mostra claramente a importância da síntese orgânica no processo de identificação e otimização de moléculas bioativas.

Como exemplo de moléculas sintéticas com atividade antiparasitária descrita pode-se mencionar a classe das tiossemicarbazonas (Quadro 3), que têm sido avaliadas como antivirais, antineoplásicas, bem como por sua ação antiparasitária contra *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* (GREENBAUM et al., 2004; HARAGUCHI et al., 2011). Embora o mecanismo de ação dessas moléculas, como antiparasitárias, não tenha sido elucidado, sua baixa citotoxicidade, aliada as suas propriedades farmacocinéticas favoráveis (baixo peso molecular, $\log P < 5$, capacidade de atuarem como doadores e aceptores de ligação de hidrogênio) e baixo custo sintético (LOZANO et al., 2012) as colocam como moléculas

promissoras para o desenvolvimento de fármacos contra doenças parasitárias (MALLARI et al., 2008).

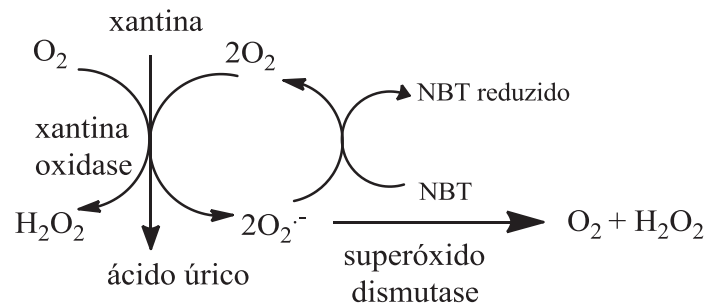
Entretanto, cabe mencionar que a identificação e caracterização cinética de inibidores frente a seus alvos macromoleculares constitui uma etapa determinante para estabelecer quais ferramentas e estratégias poderão ser empregadas no desenvolvimento de moléculas candidatas a fármacos. Por essa razão, uma das primeiras etapas dos projetos voltados para descoberta de novos inibidores enzimáticos é a escolha do teste cinético mais adequado para o alvo macromolecular estudado.

1.6.1 Ensaios cinéticos para superóxido dismutase

Os ensaios cinéticos para superóxido dismutase podem ser realizados por métodos diretos e indiretos. Entre os métodos diretos estão a radiólise de pulso e a espectroscopia de ressonância de spin eletrônico (ESP, do inglês *Electron Spin Resonance Spectroscopy*) (ENDO, 2002). No método de radiólise de pulso, os radicais são gerados, sob condições controladas, por radiação ionizante, e as absorções destes radicais são observadas por espectroscopia de ultravioleta visível (SARAN; BORS, 1991). A espectroscopia de ressonância de spin eletrônico, por sua vez, baseia-se na detecção de espécies com elétrons desemparelhados, característica encontrada nas espécies radicalares. Uma limitação da ressonância de spin eletrônico é o tempo necessário para realização de cada medida, uma vez que uma única leitura pode levar vários segundos, permitindo a detecção, somente, de radicais com meia vida longa (SARAN; BORS, 1991). Devido as limitações listadas acima, esses métodos são pouco utilizados para detecção quantitativa do radical superóxido, que apresenta meia vida curta e alta reatividade (ENDO, 2002). Outrossim, estudos cinéticos com SOD dependem largamente de ensaios indiretos (KLUG; RABANI, 1972), ou seja, métodos que requerem uma fonte de superóxido acoplada com um indicador cromogênico (OKADO-MATSUMOTO; FRIDOVICH, 2001). No método indireto, o superóxido pode ser gerado enzimaticamente ou quimicamente e depois reage com uma molécula sinalizadora, formando um produto que pode ser detectado espectrofotometricamente (GOLDSTEIN, 1988; VINATIER et al., 2010).

Como exemplo de metodologia para detecção indireta pode-se citar o sistema xantina-xantina oxidase, no qual o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) reduz o cromóforo *Nitro-blue Tetrazolium* (NBT) promovendo a formação de um composto de coloração azul no meio reacional (Figura 9). Na presença de SOD o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) sofre dismutação em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), diminuindo a formação do composto de coloração azul (ZHOU; PROGNON, 2006). A principal desvantagem do ensaio com NBT é a baixa concentração de superóxido gerado pela fonte bioquímica (GOLDSTEIN, 1988).

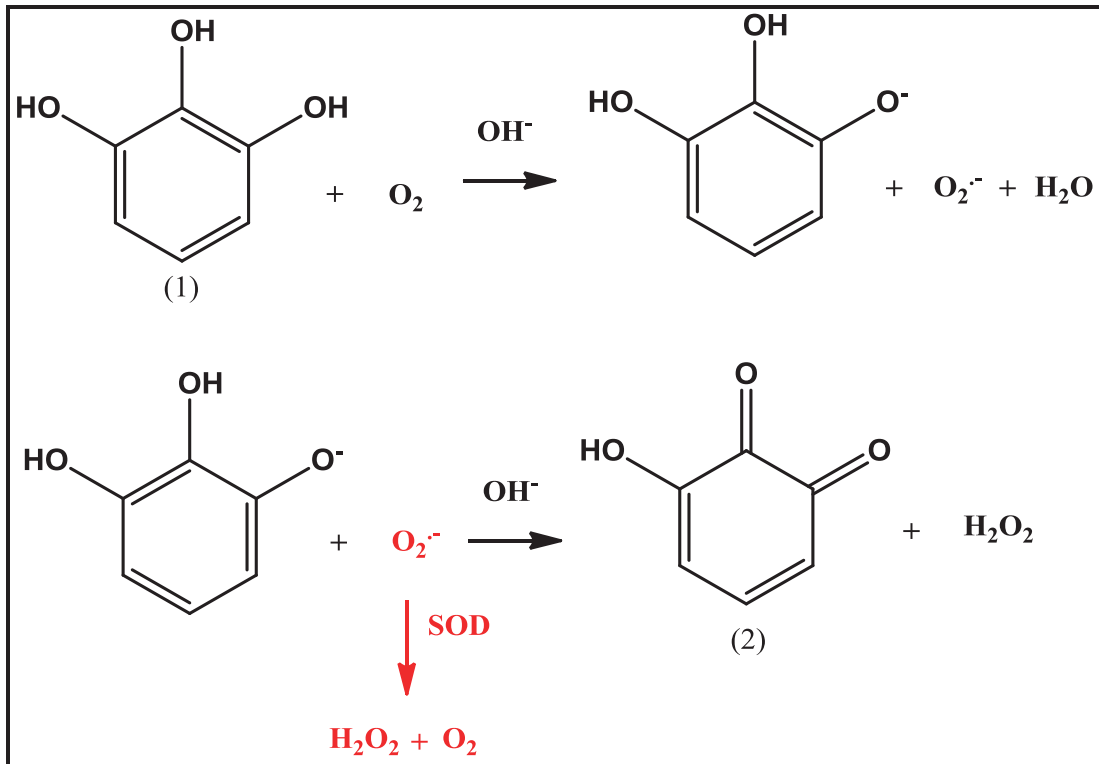
Figura 9 - Determinação da atividade de SOD através da redução do NBT



Fonte: ZHOU; PROGNON, 2006.

Outro teste indireto utilizado para medir atividade da SOD se baseia na oxidação da adrenalina a adenocromo: soluções de adrenalina sofrem autooxidação por ação de superóxidos gerando um produto de coloração rosa, denominado adenocromo (Figura 10 e 11) (WESER; SCHUBOTZ, 1978; BINDOLI et al., 1999). A SOD atua neste sistema capturando os radicais superóxidos (etapas 2 e 5) e inibindo assim a produção de adenocromo (SIROTA, 2011).

Figura 12 - Oxidação do pirogalol a purpurogalina



Fonte: Adaptado de LI, 2012

Apesar de essenciais, os dados cinéticos não indicam com quais resíduos da enzima o inibidor está interagindo, a menos que se façam testes com enzimas mutantes (AYABE et al., 2000). Uma alternativa para conseguir esse tipo de informação é através de métodos computacionais que simulem o acoplamento molecular dos inibidores com seu respectivo alvo macromolecular.

1.7 IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS SÍTIOS DE INTERAÇÃO E ACOPLAMENTO MOLECULAR

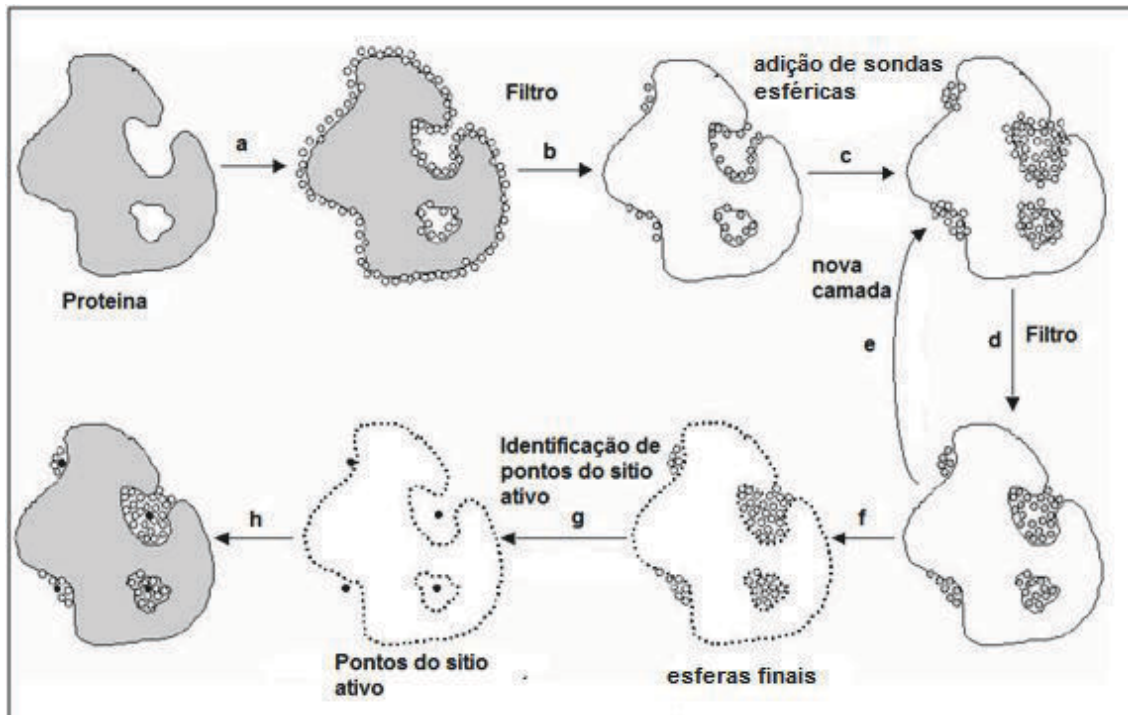
A integração de métodos experimentais e computacionais é essencial na identificação e no desenvolvimento de novos fármacos (GUIDO; ANDRICOPULO, 2010). O acoplamento molecular é uma estratégia computacional que tem por objetivo prever o modo e a afinidade de um ligante por seu alvo macromolecular, cuja estrutura tridimensional é conhecida (HUANG; ZOU, 2010). Para que seja possível realizar o acoplamento é necessário definir o espaço onde a busca

conformacional dos ligantes será realizada. Geralmente essa região coincide com o sítio ativo da proteína, todavia outros sítios de modulação alostérica podem ser explorados. A identificação dessas cavidades/bolsões alternativos se baseia em critérios geométricos, energéticos ou evolutivos (PÉROT et al., 2010; ZHANG et al., 2011) que levam em conta propriedades estereais e eletrônicas específicas relacionadas ao volume, forma e hidrofobicidade (FAUMAN; RAI; HUANG, 2011), bem como a conservação da sequência primária para identificar regiões de interação entre a proteína e seus ligantes (LEIS; SCHNEIDER; ZACHARIAS, 2010).

Nos métodos baseados em critérios relacionados a energia de interação, se utiliza uma carga de prova (CH_3), que percorre toda a superfície da proteína, para identificar regiões hidrofóbicas que possam ser consideradas como potenciais sítios de ligação (HENRICH et al., 2009). Dessa forma, o programa Qsitefinder identifica prováveis regiões de interação com base na proximidade de cargas de provas com regiões hidrofóbicas da proteína (LAURIE; JACKSON, 2005).

Os métodos baseados em geometria buscam por cavidades na proteína utilizando sondas esféricas que preenchem as cavidades. Somente as esferas com baixa exposição ao solvente estão presentes em bolsões/cavidades com características adequadas para interagir com micromoléculas (BRADY; STOUTEN, 2000). Com base nessa hipótese o programa PASS (Figura 13) identifica potenciais sítios de interação a partir do conjunto de sondas localizadas em cavidades/bolsões não expostos ao solvente (a,b). A seguir, essas cavidades são preenchidas com novas sondas esféricas até que elas comecem a chocar-se entre si ou com os resíduos da proteína (c-f). Por fim, o centro de cada cavidade é identificado, com base na posição das esferas, e passa a ser considerado um sítio potencial de interação (g,h) (BRADY; STOUTEN, 2000).

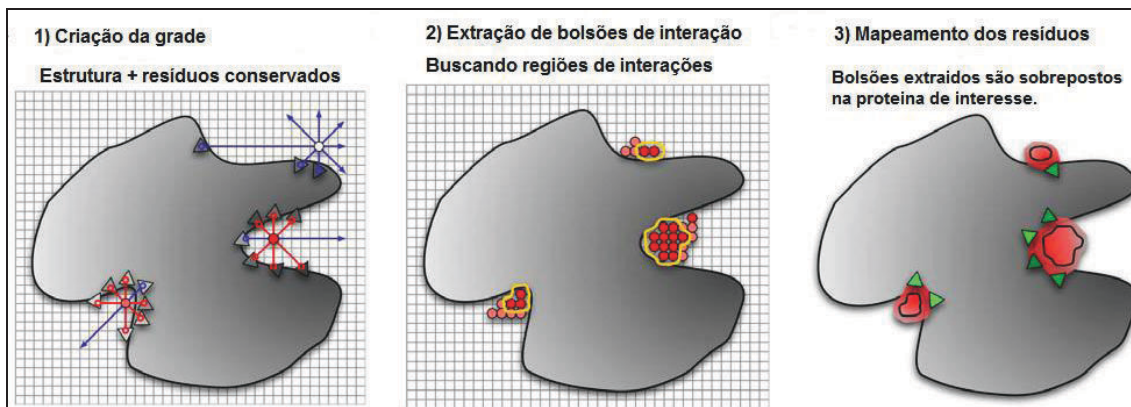
Figura 13 – Etapas para identificação de sítios de interação proteína-ligante utilizando sondas esféricas.



Fonte: Adaptado de Brady, 2011

A abordagem baseada em princípios evolutivos explora a ideia de que sítios funcionais importantes em família de proteínas normalmente exibem alto nível de conservação (MCLNNES, 2007). Este método compara sítios de ligação entre duas proteínas homólogas e identifica as regiões similares (LAURIE; JACKSON, 2005). Como exemplo de programa que utiliza essa metodologia é possível citar o Concavity (Figura 14), no qual uma pontuação é associada a cada ponto do espaço (grade) levando em consideração a probabilidade de sobreposição de resíduos idênticos ou conservados. Regiões que apresentam pontuação elevada e apresentam resíduos rotineiramente presentes em sítios ativos são considerados como potenciais sítios de interação (CAPRA, 2009).

Figura 14 - Etapas para identificação de sítios de interação proteína-ligante com base na conservação de resíduos entre proteínas



Fonte: Adaptado de CAPRA, 2009

Independente da abordagem utilizada, após a identificação dos potenciais sítios de interação na proteína pode-se simular o acoplamento molecular de ligantes nesta região. Cada composto é encaixado virtualmente ao sítio de ligação no alvo macromolecular com base na complementariedade das propriedades estéricas e eletrônicas do ligante com o sítio (CHENG et al., 2012). O acoplamento molecular pode ser dividido em duas etapas principais: busca conformacional e a pontuação das conformações geradas (DIAS; AZEVEDO, 2008; HUANG; ZOU, 2010). Na busca conformacional, as ligações simples do ligante são rotacionadas afim de encontrar as conformações adotadas pela molécula no sitio (KALYAANAMOORTHY; CHEN, 2011). Os métodos de busca podem ser divididos em: sistemáticos (ex. construção incremental); métodos estocásticos (ex. Algoritmo genético, Monte Carlo) e métodos de simulação (ex. Dinâmica molecular) (KITCHEN et al., 2004).

As diversas conformações geradas (poses) são ranqueadas de acordo com uma determinada função de pontuação, que estima a energia de interação do ligante com a proteína (SCHULZ-GASCH; STAHL, 2003). As funções de pontuação podem ser agrupadas em três classes: campos de força, funções empíricas e baseadas no conhecimento (CHENG et al., 2012). As funções da primeira classe utilizam os potenciais de campos de força clássico para calcular as interações intermoleculares não covalentes, de acordo, basicamente, com os potenciais de Lennard-Jones (interações estéricas) e de Coulomb (interações eletrostáticas) (SCHULZ-GASCH; STAHL, 2003). As funções empíricas calculam a energia livre global através da

introdução de parâmetros de ajuste que multiplicam termos que descrevem a energia de interação, ligações de hidrogênio, contribuições entrópicas, etc. (ELDRIDGE et al., 1997; HUANG; ZOU, 2010; CHENG et al., 2012). Como exemplo desse último tipo de função, pode-se citar a função ChemScore que estima a penalidade entrópica com base no número de ligações simples dos ligantes que perdem liberdade rotacional em função da interação com o alvo macromolecular (KITCHEN, 2004).

As funções com base no conhecimento calculam as interações do ligante com a macromolécula como a soma de dados estatísticos dos potenciais de pares atômicos de ligação entre o alvo e o ligante. Esses dados são obtidos a partir de complexos cristalográficos proteína-ligante ou ligante-ligante. As funções PMF e DrugScore são exemplos clássicos da aplicação dessa abordagem (CAPRA et al., 2009).

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar inibidores de superóxido dismutase de *T.brucei*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar compostos sintéticos ou de origem natural que inibam superóxido dismutase de *T. brucei*
- Determinar a concentração de inibidor necessária para reduzir em 50% (IC₅₀) a atividade de *TbSOD*
- Avaliar o modo de interação dos inibidores identificados

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EXPRESSÃO DE *TbSODb2*

Os clones de *TbSODb2* utilizados neste projeto foram fornecidos pelos Dr. Richard Garrat (IFSC/USP) e Dr. José Fernando Bachega (IFSC/USP).

As bactérias contendo um plasmídeo pET28a, no qual foi inserida a sequência codificante da enzima *TbSODb2*, foram cultivadas, sob agitação (180 rpm), a 37°C em meio de cultura Luria-Bertani (LB) suplementado com canamicina (30 µg/ml) e Cloreto Férrico (100 mM). Quando a cultura atingiu D.O de 0,6 foi adicionado IPTG (*isopropil β-D-tiogalactosídeo*) em concentrações que variam de 0,0 a 1,0 mM. As células foram então cultivadas em diferentes condições de temperatura (25° C ou 37° C) por períodos de tempo que variaram de 3 a 24h. A seguir, as células foram recolhidas por centrifugação 5000 rpm (rotor SN93-10 ref. 12436-B) por 30 minutos e ressuspensas em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo NaCl 100 mM). As células foram rompidas, primeiramente, por choque térmico utilizando nitrogênio líquido (5 ciclos de congelamento/descongelamento). A seguir, a suspensão de células foi lisada por sonicação (10 ciclos de 1 minuto cada, com intervalo de 30s) em banho de gelo, utilizando o sonicador Sonics Vibra Cell, CV18, amplitude 80%. Após o rompimento das células a suspensão foi centrifugada a 5000rpm (rotor SN93-10 ref. 12436-B) por 20 minutos e a fase solúvel recolhida para purificação.

Todo o processo foi acompanhado por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (15%) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O tempo médio de corrida foi de 2 horas e 30 minutos, mantendo a voltagem constante (130V). Os géis foram corados utilizando solução corante (Comassie Blue; azul de bromofenol; metanol e ácido acético) e após 30 minutos descorados (solução descorante: ácido acético; metanol e água).

3.2 PURIFICAÇÃO DE *TbSODb2*

A enzima *TbSODb2* foi purificada através da cromatografia de afinidade utilizando resina de sefarose contendo Ni⁺². Após a coluna ter sido equilibrada com tampão A (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, CaCl₂ 2,5 mM), a fase solúvel, coletada

após lise das células, foi injetada na coluna. Na sequência, 20ml de tampão de equilíbrio foi novamente passado pela coluna. A eluição de *TbSOD* foi realizada utilizando um gradiente crescente de imidazol (0-500 mM).

Realizou-se o doseamento de *TbSODb2* através do método espectrofotométrico (ZAIA, D.; ZAIA, C.; LICHTIG, 1998), utilizando o coeficiente de extinção molar teórico da proteína em 280nm ($50545 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), calculado com o auxílio do servidor expasy (<http://www.expasy.org/>).

3.3 PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS CINÉTICOS DE *TbSODb2*

A atividade catalítica de *TbSODb2* foi avaliada através do método indireto baseado na autooxidação do pirogalol e a reação foi monitorada espectrofotometricamente (Shimadzu UV-1800) em comprimento de onda de 320 nm . A influência do pH (8,0, 8,5 e 9,0), concentração de enzima (1-15 µg) e interferência de solvente orgânico (DimetilSulfóxido (DMSO) 5% e 10%) sobre a atividade de *TbSODb2* foram avaliados para se determinar as condições que seriam empregadas nos ensaios cinéticos. O tempo de leitura dos ensaios foi de 90s e as medidas foram realizadas em triplicata. A média das leituras e seu desvio padrão foram considerados para geração dos gráficos de atividade enzimática. Para comparação da significância entre os dados utilizou-se o teste-t de Student.

3.3 TRIAGEM *in vitro* E DETERMINAÇÃO DE IC_{50} DE INIBIDORES DE *TbSODb2*

Avaliou-se extratos e frações obtidos de *Zanthoxylum tingoassuiba*, *Ocotea nonata*, *Tibouchina pereirae*, disponibilizados pelo Dr. Eudes S. Velozo (UFBA) e Dr. Alexsandro Branco (UEFS). Realizou-se também a triagem com compostos sintéticos cedidos pelo Dr. Sílvio D. Cunha (UFBA) e extratos e frações provenientes de fungos endofíticos cedidos pela Dr^a Mônica T. Pupo (USP/RP). A avaliação de potenciais inibidores foi realizada em concentração única de 100µM, ou 1 mg/ml quando se tratava de extratos/frações. Resumidamente, os potenciais inibidores foram diluídos em DMSO e adicionados numa concentração fixa ao meio reacional utilizado para avaliar a atividade catalítica de *TbSODb2*. As condições finais

utilizadas nesses experimentos foram: concentração final de pirogalol 0,4 mM; 10 μ g de *TbSODb2*; tampão tris-HCl 100mM (pH 8,0) e DMSO (10% v/v).

A caracterização cinética baseou-se na determinação do IC₅₀ (concentração que inibe em 50% a atividade da enzima), a 25°C. Cada leitura foi realizada em triplicata e o gráfico de IC₅₀ foi gerado por regressão não linear com auxílio do programa SigmaPlot 12.0.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS SÍTIOS DE INTERAÇÃO EM *TbSODb2*

A busca por potenciais sítios de interação na enzima *TbSOD* foi realizada utilizando o servidor Metapocket 2.0, usando os parâmetros padrão. Somente os resultados dos programas Surfnets (LASKOWSKI, 1995), PASS (BRADY; STOUTEN, 2000) e QsiteFinder (LAURIE; JACKSON, 2005) foram considerados para a análise consensual (HUANG, 2009).

Alternativamente, o programa de acoplamento molecular AutodockVina (TROTT; OLSON, 2010) também foi utilizado para identificar potenciais sítios de interação, conforme descrito no item 3.6 e 3.6.1

3.6 ACOPLAMENTO MOLECULAR

A fim de preparar a estrutura cristalográfica de *TbSOD* (código PDB: 3ESF) para os estudos de acoplamento molecular, moléculas de água foram removidas do arquivo original e átomos de hidrogênio foram adicionados com auxílio do módulo BIOPOLYMER da plataforma SYBYL-X 1.2. A seguir, a orientação de resíduos ASN, HIS e o estado de protonação de resíduos ASP, GLU, LYS, ARG e HIS foram ajustados manualmente a fim de satisfazer interações intermoleculares (ex. ligações de hidrogênio). Finalmente, cargas atômicas parciais Gasteiger-Huckel foram atribuídas aos resíduos da proteína enquanto ao átomo de metal (Fe) foi atribuída carga +3.

Os programas SurflexDock e AutoDockVina foram utilizados para realizar o acoplamento propriamente dito, no qual a estrutura da proteína foi mantida rígida, enquanto que a flexibilidade rotacional foi garantida aos ligantes. Detalhes sobre os parâmetros de cada programa estão descritos abaixo.

3.6.1 AutoDockVina

3.6.1.1 Identificação de sítios de interação por acoplamento molecular:

O programa AutoDockVina exige que o usuário determine apenas o centro e o tamanho da caixa onde será realizada a busca conformacional (TROTT; OLSON, 2010). Assim, a escolha de uma caixa de 50Å x 50Å x 48Å, englobando todo o monômero da proteína (PDB: 3ESF), centro das coordenadas $x=23,83$; $y=-7,13$; $z=36,34$ possibilitou que todas as cavidades e bolsões da macromolécula fossem explorados.

3.6.1.2 Acoplamento no sítio potencial:

Numa segunda etapa, somente a cavidade identificada como potencial sítio de interação foi considerada na etapa de busca conformacional (dimensões da caixa 16Å x 20Å x 18Å, centro das coordenadas $x=30,23$; $y=-14,98$; $z=37,90$).

3.6.2 SurflexDock

Duas etapas de acoplamento foram feitas no SurflexDock, sendo que na primeira etapa utilizou-se os resíduos do sítio ativo (His²⁸, His⁷⁶, Asp¹⁶¹, His¹⁶⁵) para delimitação do espaço de busca conformacional. Nessa etapa foi utilizada uma representação indireta do sítio que considera seu volume e as interações possíveis entre um ligante e os resíduos presentes no sítio de interação (protomol) (JAIN, 2007). Na segunda etapa os resíduos utilizados para criação dessa representação (Glu⁵⁶; Glu⁵⁷; Leu¹⁴⁹; Gln¹⁹⁴; Lys¹⁵⁵) foram aqueles que circundam a cavidade identificada com o auxílio do programa Metapocket 2.0. Os parâmetros “bloat”, que representa a extensão do protomol, e “threshold”, que descreve a profundidade do protomol (YANG et al., 2008), foram alterados para 1 e 0,56, respectivamente. Os demais parâmetros do programa não foram alterados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

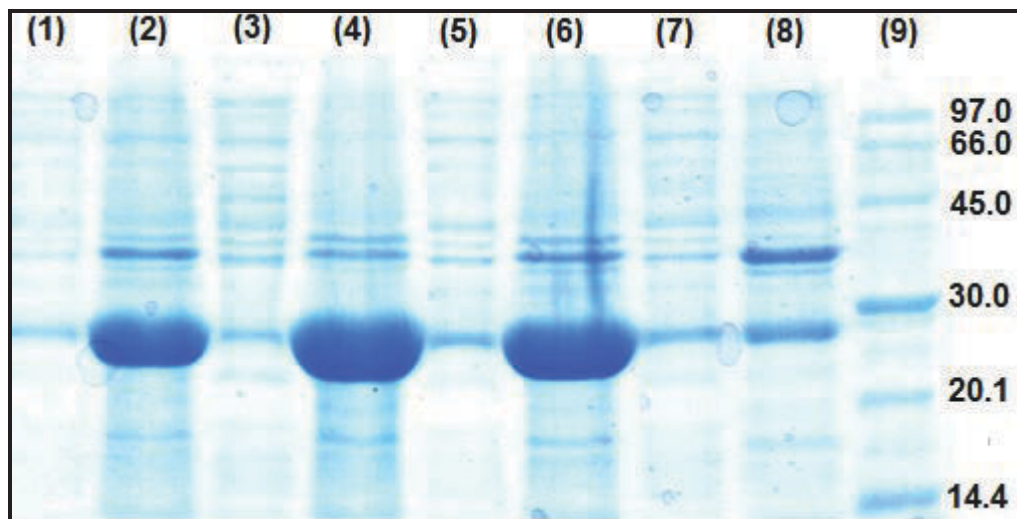
4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE *TbSODb2*

O paradigma atual aplicado a identificação e otimização de moléculas candidatas a fármacos se baseia na utilização de testes *in vitro* que permitam avaliar de forma rápida e com baixo custo moléculas potencialmente bioativas (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011). Muitas vezes os ensaios são realizados com o alvo macromolecular isoladamente, pois isso permite não só aumentar a potência das moléculas através do aumento de sua complementaridade estérea e eletrônica com o seu sítio de interação, mas também garante que a ação biológica observada se dá pela ação sobre uma biomacromolécula que tem papel crucial para o mecanismo fisiopatológico de interesse. Nesse contexto, a enzima superóxido dismutase de *T. brucei* foi selecionada como alvo terapêutico de interesse. As razões que fundamentam tal escolha são: 1) A enzima SOD desempenha papel chave na proteção dos tripanosomatídeos contra o estresse oxidativo; 2) Fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas têm sua ação farmacológica baseada na exposição dos parasitas a espécies reativas de oxigênio; 3) A enzima SOD de *T. brucei* (*TbSODb2*), que apresenta alta similaridade sequencial e estrutural com a enzima de *T. cruzi* (vide figura 7 e 8, página 21) pode ser expressa na forma solúvel e ativa em sistemas heterólogos (BACHEGA et al., 2009), o que facilita a padronização de testes de triagem de inibidores *in vitro*.

Dessa forma, a partir de um clone de *E. coli* (BL21-DE3) contendo o plasmídeo que codifica a enzima *TbSODb2*, deu-se início a padronização das condições ótimas de expressão e purificação de *TbSODb2*. Embora condições iniciais tenham sido estabelecidas pelo Dr. Bacheга durante seu doutorado, não houve necessidade naquela época de se otimizar as condições experimentais pois o objetivo do trabalho de doutorado era outro: caracterização estrutural de *TbSODb2* através de difração de raios X. Adicionalmente, deve-se considerar que diferenças interlaboratoriais, de reagentes e até mesmo da cepa utilizada para produção de *TbSODb2* podem exigir pequenos ajustes no protocolo de expressão e purificação da enzima. Considerando as razões expostas acima, foram realizados testes para avaliar as melhores condições de obtenção da enzima alvo através da expressão heteróloga visando sua obtenção em quantidades elevadas e na forma solúvel.

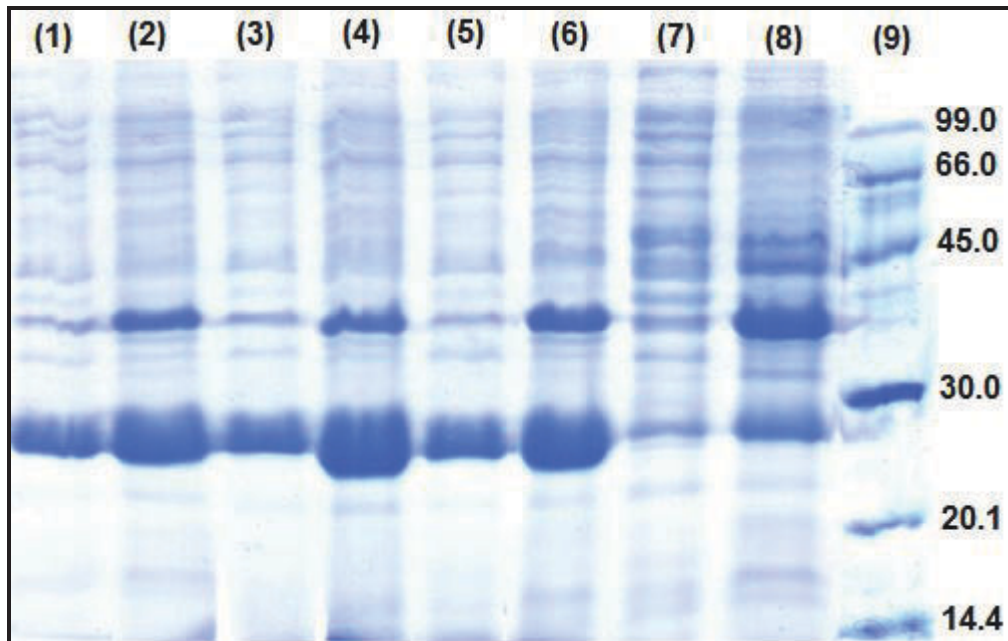
A primeira variável investigada foi a influência de diferentes concentrações de IPTG (0,1-1mM) sobre os níveis de expressão e solubilidade da enzima, quando a indução da expressão é feita a 37° C (Figura 15). Observou-se que nesta temperatura tem-se um bom nível de expressão, no entanto a maior parte da proteína se encontra na fração insolúvel. Esse resultado pode ser decorrente do enovelamento incorreto das proteínas, e conseqüente agregação, que é favorecida em temperaturas mais altas (SORENSEN; MORTENSEN, 2005).

Figura 15 - Gel (SDS-PAGE) 15% com diferentes condições de expressão de *TbSODb2* a 37°C por 3 horas: (1) sobrenadante 1.0 mM IPTG; (2) precipitado – 1.0 mM IPTG ; (3) sobrenadante 0.5mM IPTG; (4) precipitado – 0.5mM IPTG; (5) sobrenadante - 0.1mM IPTG; (6) precipitado 0.1 mM IPTG; (7) sobrenadante – 0.0 mM IPTG; (8) precipitado - 0mM IPTG (9) Padrão de peso molecular



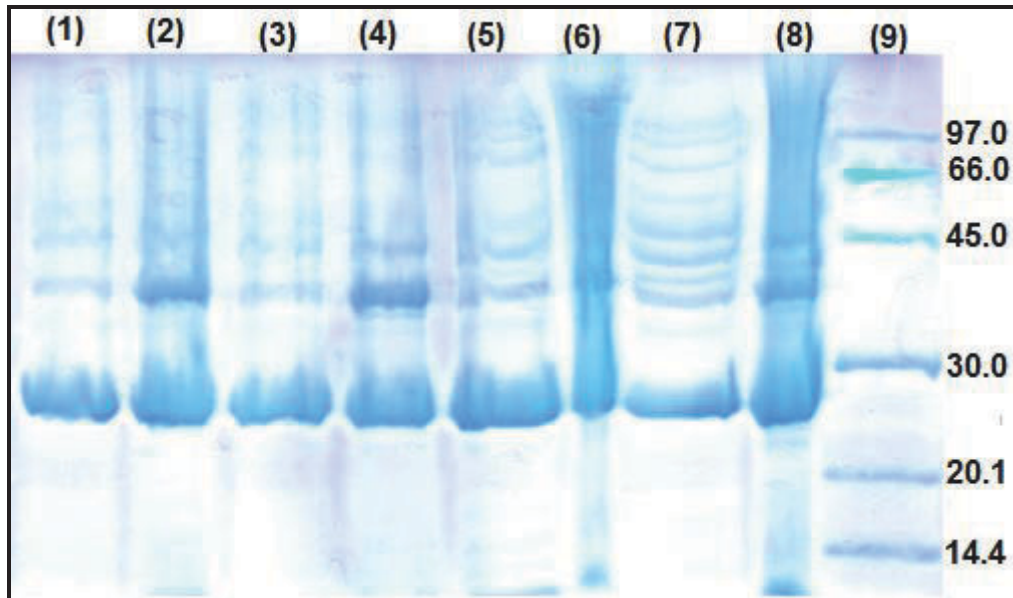
Por outro lado, a redução da temperatura inibe a expressão de proteases do choque térmico e aumenta a expressão de chaperonas de *E.coli*, responsáveis pelo enovelamento correto de proteínas (SORENSEN; MORTENSEN, 2005). Assim, novos testes de expressão foram realizados na temperatura de 25°C, considerando 2 tempos diferentes de indução: 6 horas (Figura 16) e 24 horas (Figura 17).

Figura 16 - Gel (SDS-PAGE) 15% com diferentes condições de expressão de *TbSODb2* a 25°C por 6 horas: 1) sobrenadante 1.0 mM IPTG; (2) precipitado – 1.0 mM IPTG ; (3) sobrenadante 0.5mM IPTG; (4) precipitado – 0.5mM IPTG; (5) sobrenadante - 0.1mM IPTG; (6) precipitado 0.1 mM IPTG; (7) sobrenadante – 0.0 mM IPTG; (8) precipitado – 0.0mM IPTG (9) Padrão de peso molecular



A redução da temperatura leva a um decréscimo na produção da enzima de interesse, o que pode ser contrabalanceado pelo aumento do tempo de indução. Como esperado, os níveis de expressão de *TbSODb2*, na forma solúvel, tornam-se superiores com tempos maiores de indução, assim foi padronizado o tempo de 16 horas para expressão de *TbSODb2*, entretanto a constatação de que os níveis de expressão variam pouco quando se passa de 0,1 mM para 1 mM de IPTG nos levaram a utilizar uma concentração intermediária (0,5 mM) nos experimentos subsequentes.

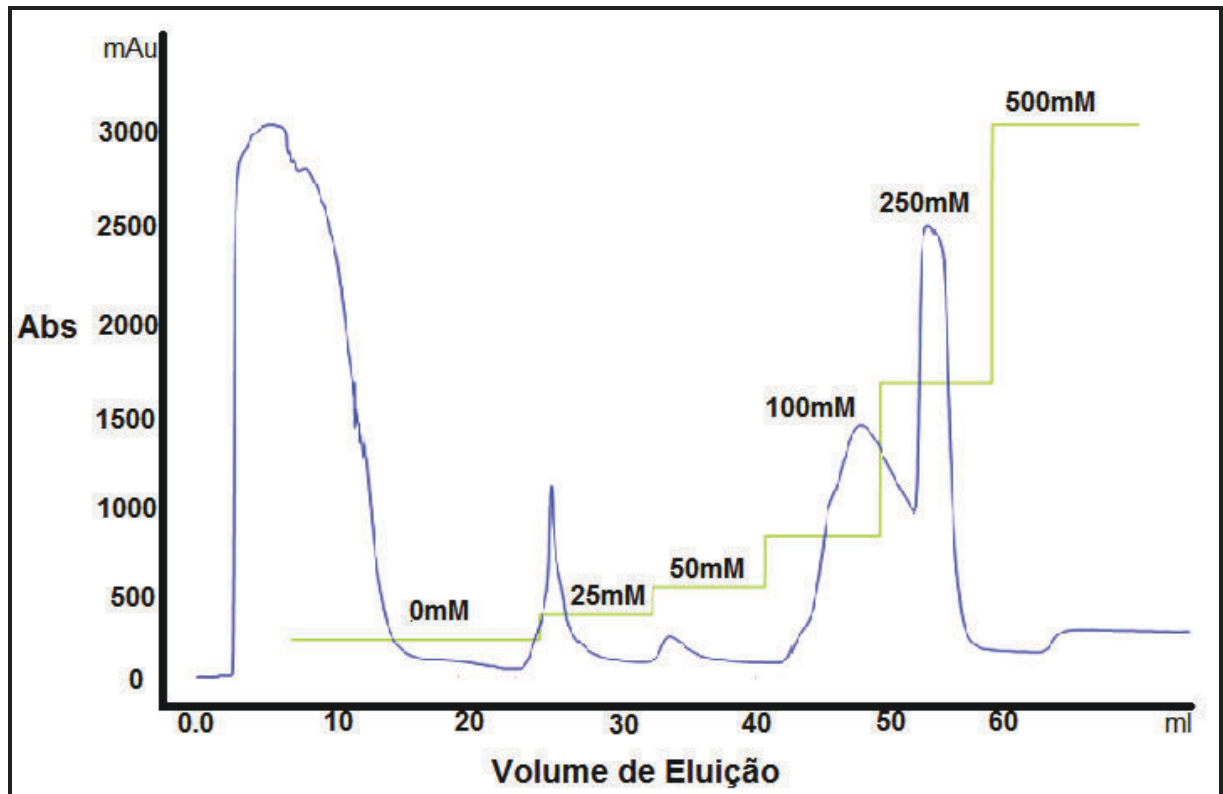
Figura 17 - Gel (SDS-PAGE) 15% com diferentes condições de expressão de *TbSODb2* a 25°C por 24 horas: 1) sobrenadante 1.0 mM IPTG; (2) precipitado – 1.0 mM IPTG ; (3) sobrenadante 0.5mM IPTG; (4) precipitado– 0.5mM IPTG; (5) sobrenadante - 0.1mM IPTG; (6) precipitado 0.1 mM IPTG; (7) sobrenadante – 0.0 mM IPTG; (8) precipitado – 0.0 mM IPTG (9) Padrão de peso molecular



Uma vez otimizadas as condições de expressão, iniciou-se a purificação da proteína recombinante *TbSODb2*, utilizando cromatografia de afinidade. Essa estratégia é semelhante ao procedimento utilizado por Bachega e colaboradores (2008), uma vez que na etapa de subclonagem do gene que codifica *TbSODb2*, no vetor de expressão pET28a, foram inseridos 6 resíduos de histidina na porção N-terminal da proteína. Portanto, essa estratégia possibilita que *TbSODb2* seja purificada por cromatografia de afinidade com colunas que tenham íons de Ni imobilizados: Ao se passar a fração solúvel de proteínas, obtida após sonicação e centrifugação, pela coluna cromatográfica, a enzima de interesse é retida, enquanto as demais são eluídas juntamente com o tampão de lavagem (BRESOLI; MIRANDA; BUENO, 2009). Devido a sua interação forte com a coluna é necessário adicionar um agente que tenha afinidade pelo Ni e desloque *TbSODb2*. Bachega e colaboradores (2008) utilizaram para isso um tampão contendo 100 mM de imidazol que foi injetado de forma abrupta na coluna (step único). A fim de assegurar maior pureza de *TbSODb2*, utilizou-se um gradiente crescente de imidazol (0 – 500 mM), que promoveu a eluição de *TbSODb2* na concentração de 250 mM de imidazol (Figura 18). Nota-se que essa estratégia permite a separação de frações de proteína que se

ligam fracamente a coluna de Ni, em função de apresentarem resíduos de histidina na sua superfície.

Figura 18 - Cromatograma da purificação de *TbSODb2*. Em azul: picos referentes as frações coletadas; Em verde: gradiente de imidazol.

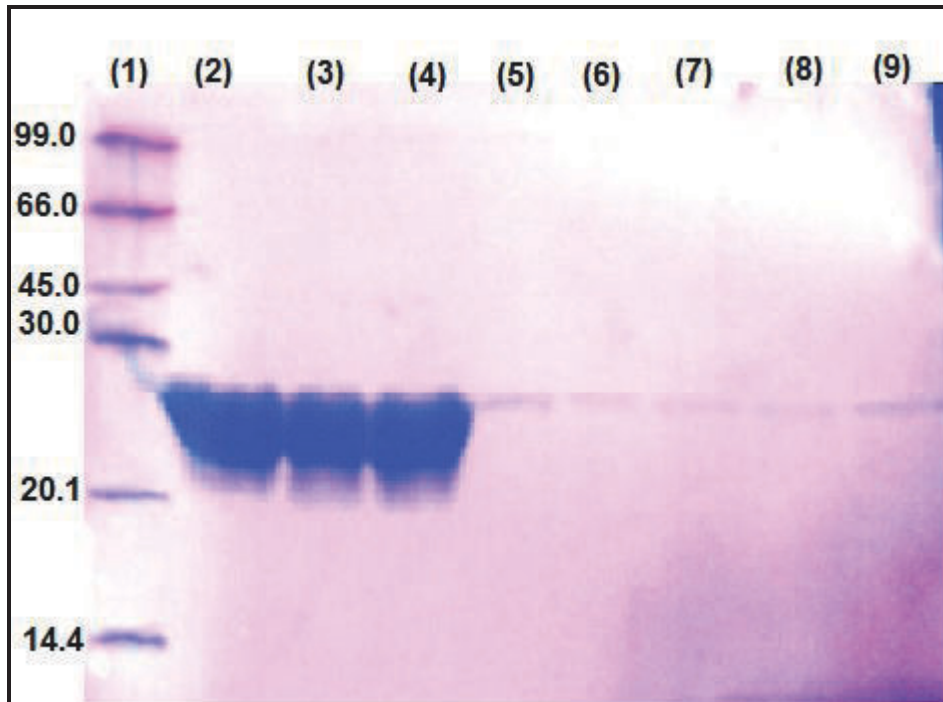


O rendimento médio desse processo é de 40mg de proteína por litro de meio de cultura utilizado para expressão, enquanto o rendimento obtido por Bachega e colaboradores (2008) foi de 70mg/L. O rendimento inferior pode ser decorrente das alterações implementadas no protocolo de purificação, bem como de fatores inerentes a cepa utilizada nos nossos experimentos. No entanto, cabe destacar que *TbSODb2* obtida através da metodologia descrita acima apresenta grau de pureza adequado (Figura 19) para realizar os teste de inibição cinética.

Outro ponto relevante a ser mencionado é que embora Bachega e colaboradores (2008) tenham alcançado rendimentos superiores, eles não investigaram as condições ideais de concentração de enzima, pH, concentração de pirogalol e estabilidade de SOD frente a solventes orgânicos para realizar a triagem de inibidores de *TbSODb2*. Dessa forma, foi necessário padronizar esses parâmetros a

fim de obter condições reacionais que permitissem a identificação de inibidores estruturalmente diversos e que modulem *TbSODb2* por diferentes mecanismos de ação (inibição competitiva, não competitiva ou incompetitiva). Maiores detalhes sobre esse tópicos são apresentados a seguir.

Figura 19 - Gel (SDS-PAGE) 10% mostrando a pureza obtida após eluição com imidazol: (1) padrão de peso molecular; (2-4) eluição com 250mM imidazol; (5-9) eluição com 500mM imidazol.



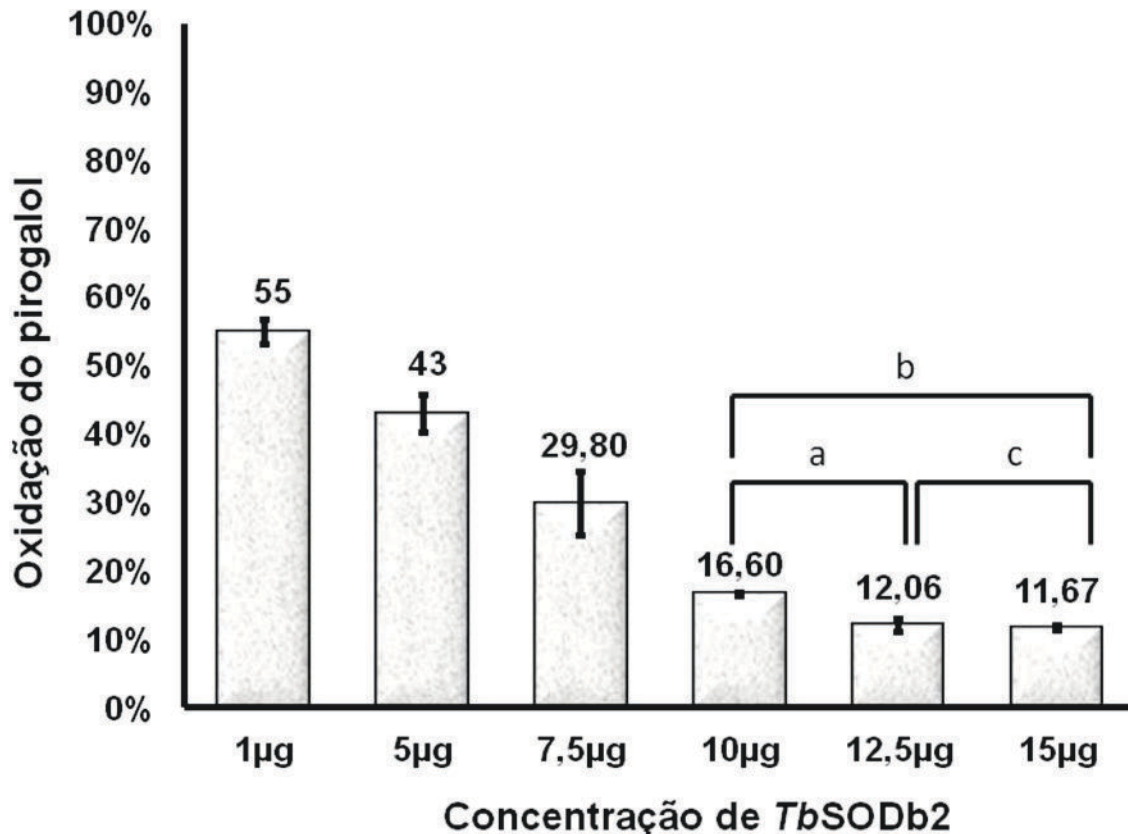
4.2 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO CINÉTICO DE *TbSODb2*

A fim de caracterizar os parâmetros cinéticos de uma enzima, pode-se utilizar concentrações de enzima e substrato que promovam a reação enzimática em “estado estacionário”. Nessas condições a concentração do complexo ES ($E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$) é constante, ocorrendo um equilíbrio entre a formação e desaparecimento de ES. Para que isso ocorra a razão entre a concentração do substrato e da enzima deve ser elevada (COPELAND, 2005). Todavia, não se pode utilizar concentrações muito pequenas de enzima pois isso dificultaria o acompanhamento da reação, uma vez que a intensidade do sinal medido seria muito pequena e se aproximaria do limite de detecção do ensaio. Outra limitação da utilização de pequenas concentrações de enzima é que essa pode se adsorver às paredes da cubeta e, conseqüentemente, causar desvios na cinética esperada.

Visando equilibrar esses fatores e garantir que a reação tivesse cinética de primeira ordem (dependente apenas da concentração da enzima), investigou-se a concentração ótima da enzima para inibir a auto-oxidação do pirogalol (Figura 20). Esse método indireto foi selecionado em função de seu baixo custo e por ser amplamente utilizado para identificar inibidores de SOD (ROTH; GILBERT, 1984; KABIRI; STEVERDING, 2001; SOULERE et al., 2002). Sabendo-se que o pirogalol gera o substrato da superóxido dismutase (íon superóxido), para que as condições estacionárias sejam respeitadas, deve-se utilizar uma concentração de pirogalol bem maior que a concentração da enzima. De fato, estudos anteriores (MARKLUND,S.; MARKLUND,G., 1974; LI, 2012) sugerem concentrações na faixa de 0,2mM – 0,4mM de pirogalol. Logo, adotou-se a concentração final de 0,4mM de pirogalol e iniciou-se o estudo da concentração ideal de enzima a ser utilizada.

Ao se comparar a porcentagem de auto-oxidação que ocorre na presença de 5 µg e 10 µg de *TbSODb2* (Figura 20), percebe-se uma redução de mais de 100% na taxa auto-oxidação ($43 \pm 0,0181$ x $16,60 \pm 0,0014$), o que sugere que a inibição da reação está sendo influenciada majoritariamente pela concentração da enzima. Por outro lado, ao se comparar a taxa de inibição da auto-oxidação na presença de 1 µg e 5 µg de *TbSODb2* ($55 \pm 0,0026$ vs $43 \pm 0,0181$) nota-se uma falta de linearidade na resposta. Nesse caso, a explicação mais plausível é que a enzima esteja se adsorvendo às paredes da cubeta. Ao se utilizar concentrações superiores de *TbSODb2* verifica-se que há variação significativa na porcentagem de oxidação (10 µg vs 12,5 µg, $P=0,0001$; 10 vs 15 µg $P< 0,0001$; 12,5 µg vs 15 µg, $P=0,045$), o que indica que nessas condições a velocidade de reação ainda é dependente da concentração de *TbSODb2*, ou seja, a reação ocorre em condições estacionárias. Considerando os fatores acima, pode-se concluir que a cinética de primeira ordem (estado estacionário) é respeitada nas concentrações testadas. A fim de garantir que o sinal observado seja significativamente diferente daquele observado na ausência de *TbSODb2* e que o estado estacionário seja mantido pelo maior tempo possível, adotou-se a concentração de 10 µg para realização dos testes de inibição enzimática.

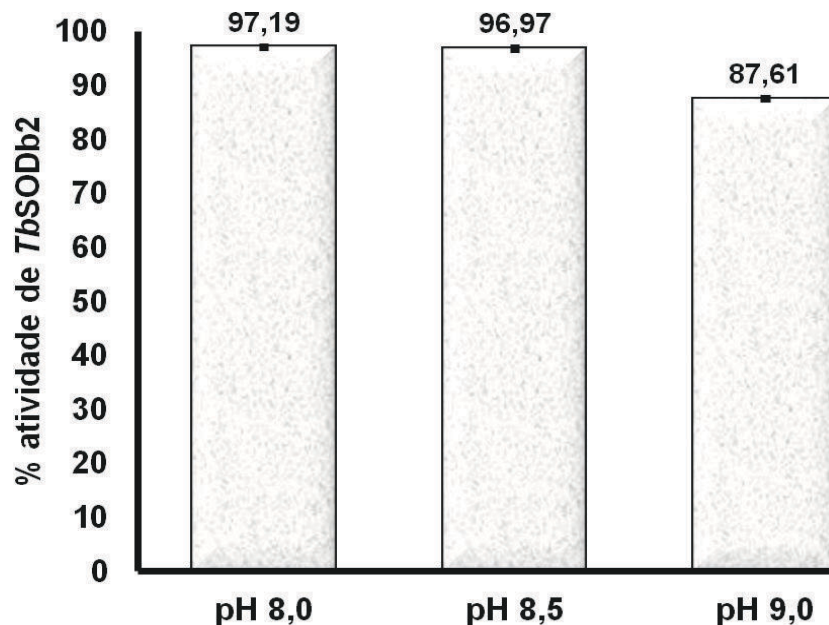
Figura 20 - Inibição da autooxidação do pirogalol (0,4mM) na presença de concentrações diferentes da enzima *TbSODb2*. a) $P= 0,0001$ entre 10 μg e 12,5 μg ; b) $P< 0,0001$ entre 10 μg e 15 μg ; c) $P=0,045$ entre 12,5 μg e 15 μg .



Outro fator que pode influenciar a velocidade inicial da reação enzimática e a interação de *TbSODb2* com seu substrato e demais ligantes é o pH do meio reacional (COPELAND, 2005). A fim de se determinar a concentração hidrogeniônica que garanta estabilidade e eficiência catalítica adequadas aos estudos de cinética enzimática dever-se-ia avaliar a atividade catalítica de *TbSODb2* numa ampla faixa de pH. Entretanto, as condições ótimas de atividade cinética, na maioria das vezes, são próximas daquelas encontradas em condições fisiológicas da enzima, ou seja, no parasita. Infelizmente, geralmente, não é possível se determinar de forma acurada qual o pH do compartimento onde a enzima se encontra (glicosomo para *TbSODb2* e *TbSODb1*). Por essa razão, costuma-se realizar os testes cinéticos em condições próximas ao do pH fisiológico do hospedeiro (pH 7,4). Todavia, a taxa de oxidação reduzida do pirogalol neste pH limita a utilização desse pH, pois o sinal observado na presença e na ausência de *TbSODb2* são semelhantes (dados não mostrados). Por outro lado, o aumento de pH provoca uma

aceleração no processo de oxidação do pirogalol (MARKLUND,S.;MARKLUND, G., 1974), o que deve favorecer o aumento do sinal e, conseqüentemente, melhorar a sensibilidade do teste. Por essa razão, investigou-se a atividade enzimática nos seguintes pHs: 8,0; 8,5; 9,0 (Figura 21). Embora a atividade catalítica permaneça praticamente inalterada em pH 8,0 ou 8,5, observa-se que meios reacionais ainda mais básicos causam redução da atividade catalítica. Sendo assim, padronizou-se os testes com a utilização de pH 8,0 (condição mais próxima do pH fisiológico).

Figura 21 - Atividade de SOD em diferentes faixas de pH. Condições reacionais: Pirogalol (0.4mM), Tampão Tris (100 mM) e *TbSODb2* 10 μ g

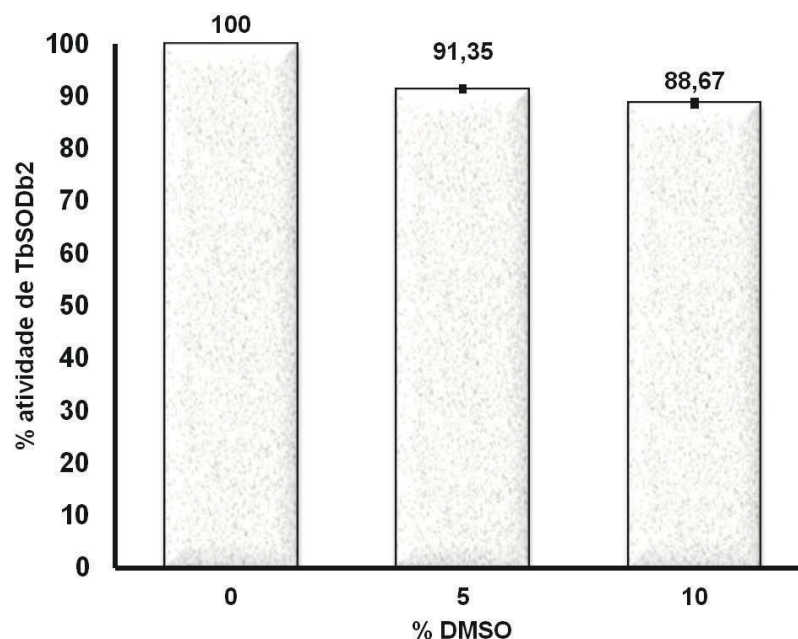


Após estabelecer as condições ideais para avaliação da atividade catalítica de *TbSODb2* avançamos para a padronização dos testes de triagem de potenciais inibidores, mas como a grande maioria das moléculas a serem testadas não é solúvel em água, foi necessário investigar a estabilidade da enzima frente a solventes orgânicos.

Ao se adicionar solventes orgânicos ao meio reacional, altera-se o padrão de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas que estabilizam a estrutura tridimensional da proteína (ARAGÃO et al., 2009). Conseqüentemente, pode ocorrer redução de sua atividade catalítica (BEVILAQUA, 2005) e, até, desnovelamento da proteína (LIMA; ANGNES, 1999). Considerando que a maioria das moléculas a ser

testada é solúvel em DMSO, o efeito desse solvente sobre a atividade de *TbSODb2* foi investigado (Figura 22) a fim de se determinar a menor quantidade de solvente orgânico que permitisse solubilizar os potenciais inibidores e que não levasse a redução significativa na atividade catalítica. Os resultados mostraram que não existe diferença significativa na atividade da enzima na presença de 5% ($P=0,88$) ou 10% ($P= 0,38$) de DMSO. A partir desse resultado, padronizou-se a concentração de 10% de DMSO para solubilização das moléculas a serem testadas, pois a maioria dos produtos a serem testados precipita em soluções aquosas contendo apenas 5% de DMSO.

Figura 22 - Teste de estabilidade da enzima em 5% e 10% de DMSO usando tampão 100mM Tris-HCl pH8,0; 0,4mM pirogalol, *TbSODb2* 10 μ g. $P=0,88$ entre 0 e 5%DMSO; $P= 0,38$ entre 0 e 10% DMSO.



4.3 TRIAGEM DE INIBIDORES DE *TbSOD*

Como destacado anteriormente, produtos naturais possuem um amplo espectro de complexidade estrutural e diversidade funcional distintos dos compostos sintéticos (YUE et al., 2012). Nesse sentido, pequenas moléculas, provenientes de fontes naturais, são reconhecidas como estruturas privilegiadas com probabilidade maior do que muitos compostos sintéticos de exibir atividade biológica (CRAWFORD et al., 2011). Por essa razão, extratos e frações obtidos de *Zanthoxylum tingoassuiba*,

Ocotea nonata, *Tibouchina pereirae*, foram avaliados quanto ao seu potencial inibitório de *TbSODb2* através de ensaio de dose única (1mg/mL). Essa abordagem teve por objetivo guiar o fracionamento biomonitorado de extratos que apresentassem a atividade biológica desejada. Embora um número expressivo de frações e extratos tenha sido avaliado, somente o extrato de *Ocotea nonata* (butanólico) e o extrato de *Tibouchina pereirae* (hexano) apresentaram inibição maior que 50% nos testes de triagem realizados.

A triagem realizada com os extratos e frações de produtos naturais permitiu também identificar a catequina, um derivado fenólico que pode ser encontrado no chá verde (*Camellia sinensis*) (SANELLA et al., 2007) como uma molécula que interfere na oxidação do pirogalol (Figura 23). Esse efeito está associado à presença do grupamento catecol na catequina, o qual compete com o pirogalol na reação de oxidação (vide figura 12 página 26). Entretanto, SOULERE e colaboradores (2002) demonstraram que derivados catecólicos, após sofrerem oxidação para forma quinona apresentam atividade inibitória frente a enzima FeSOD. Visando investigar se o mesmo comportamento seria observado em nosso estudo os grupos catecólicos da catequina foram oxidados (oxidação em temperatura ambiente e acompanhamento por espectroscopia de ultravioleta visível até não haver mais alteração no espectro de absorbância), dando origem a forma quinona da catequina (catequina oxidada) (Figura 24). Essa estratégia eliminou a interferência com o ensaio e permitiu constatar que a catequina na sua forma quinona, de fato, apresenta atividade inibitória sobre *TbSODb2* (Figura 25).

Figura 23 - Interferência da forma oxidada e não oxidada da catequina na oxidação do pirogalol

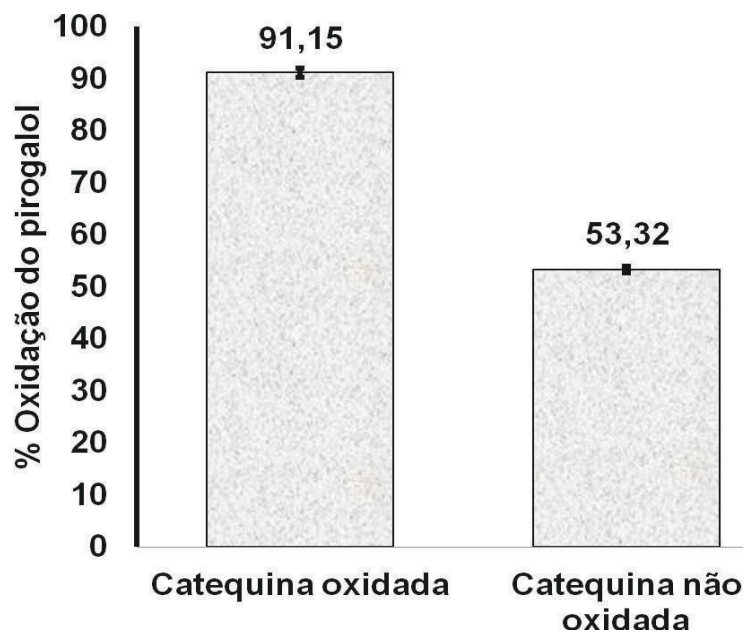
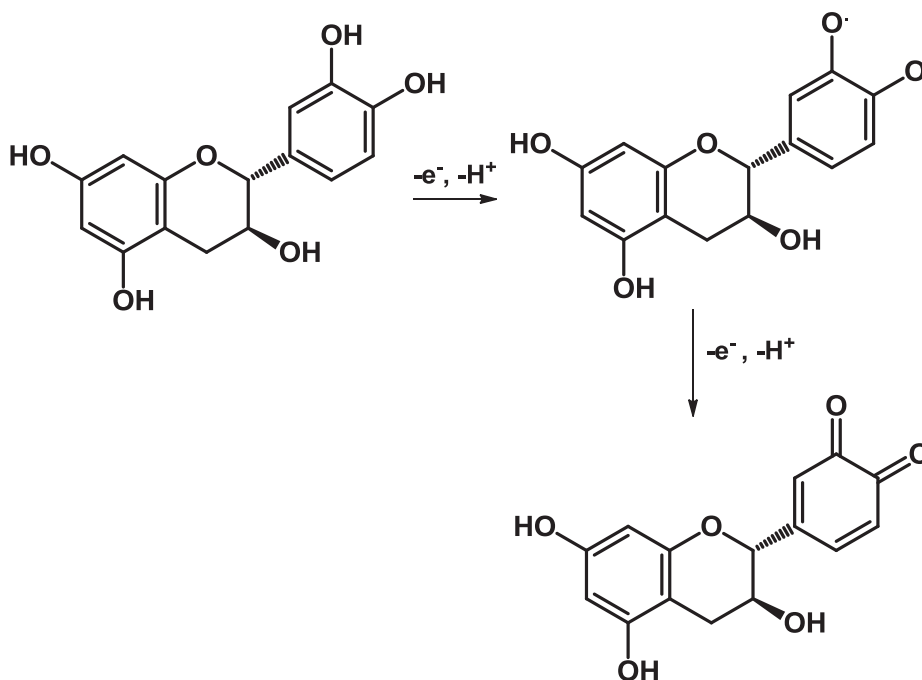
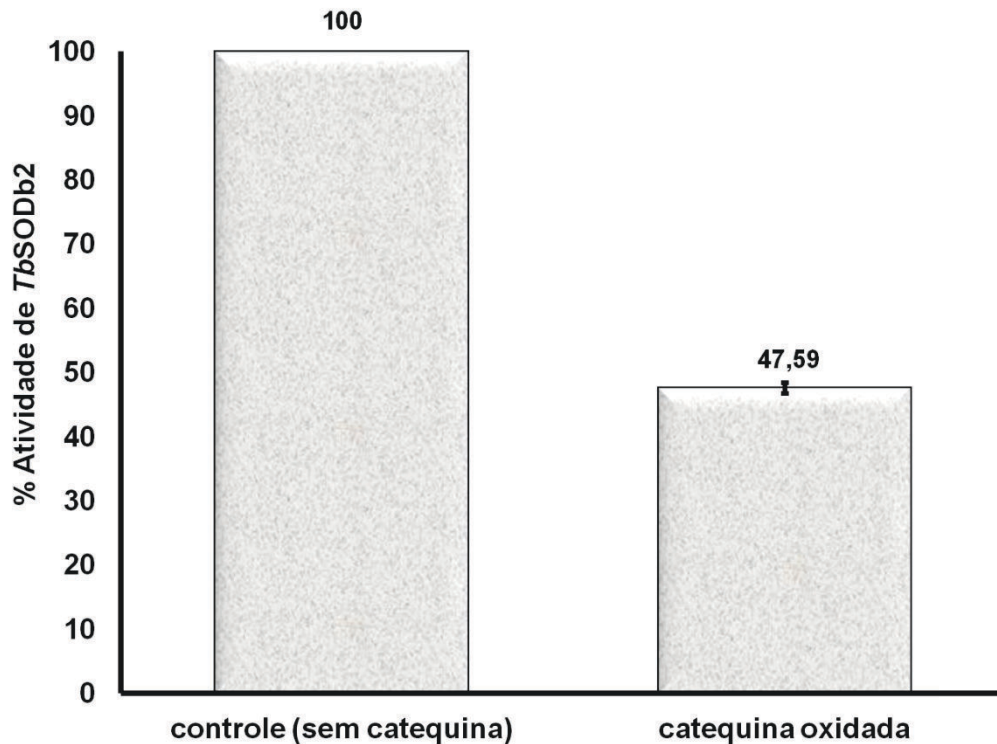


Figura 24 - Reação de oxidação da catequina



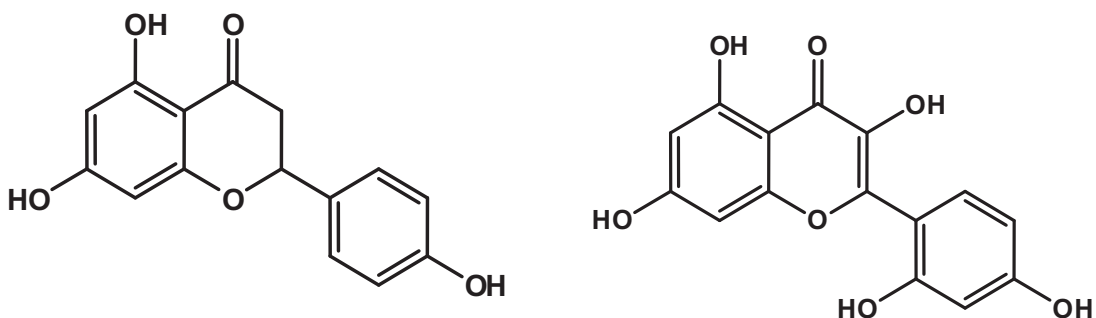
Fonte: JANEIRO; BRETT, 2004.

Figura 25 - Atividade inibitória das formas oxidada e não oxidada da catequina frente a *TbSODb2*.



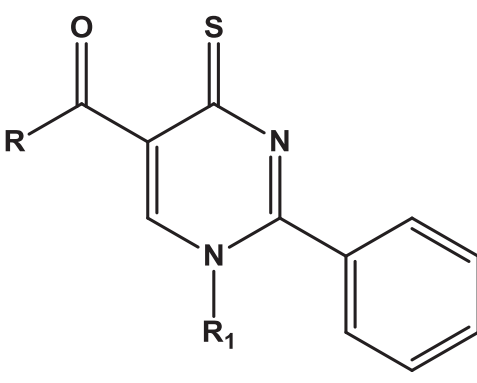
Apesar desse resultado promissor, dados da literatura mostram que é difícil quantificar a concentração de quinonas geradas *in situ* por oxidação espontânea dos grupamentos catecólicos, pois eles se decompõem rapidamente em soluções aquosas (SOULERE et al., 2002; JANEIRO; BRETT, 2004). Portanto, a caracterização cinética do perfil de inibição de *TbSODb2* por catequina oxidada não é trivial. A fim de contornar esse problema, adquiriu-se um conjunto de 2 análogos de catequina (Figura 26), disponíveis comercialmente, que não devem sofrer o mesmo processo de autooxidação (formação de quinona) e serão avaliados frente a *TbSODb2*.

Figura 26 - Análogos da catequina disponíveis comercialmente

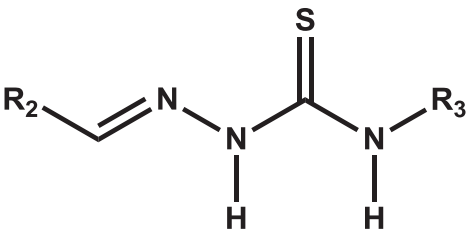


Paralelamente, foram avaliados também metabólitos obtidos de fungos endofíticos. A diversidade química observada nessas moléculas é bastante diferente daquela presente nas plantas estudadas e portanto representam uma porção do espaço químico ainda não explorada pelos produtos naturais previamente avaliados. Entre os extratos e frações testados (vide anexo A), sete apresentaram redução da oxidação do pirogalol (22FHS-63; 22FHS-84; 22FAS 63; 31FHS-21; 31FHS42; 31FHS-63; 31FHS-84; SA-A7A-COX4.1) e os demais não apresentaram atividade. Por fim, avaliou-se também uma biblioteca de 33 derivados de tiossemicarbazona e tioxipirimidina (Quadro 2 e 3). O interesse nessa classe química se deve ao fato de moléculas similares já terem sua atividade antimicrobiana e antiparasitária descritas na literatura (BACCHI et al., 1998; SILVA, 2004; KONG et al., 2011). Adicionalmente, a facilidade de obtenção dessas moléculas através de reações multicomponentes, usando micro-ondas (CUNHA; SILVA, 2009), ou de derivados das mesmas contribuiria para a fase de otimização da potência de eventuais inibidores identificados nos testes de triagem.

Quadro 2 – Derivados de tioxipirimidinas testados contra *TbSODb2*

	
R	R ₁
OEt	<i>n</i> -Butil
CH ₃	<i>n</i> -Butil
CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅
OEt	CH ₂ C ₆ H ₅

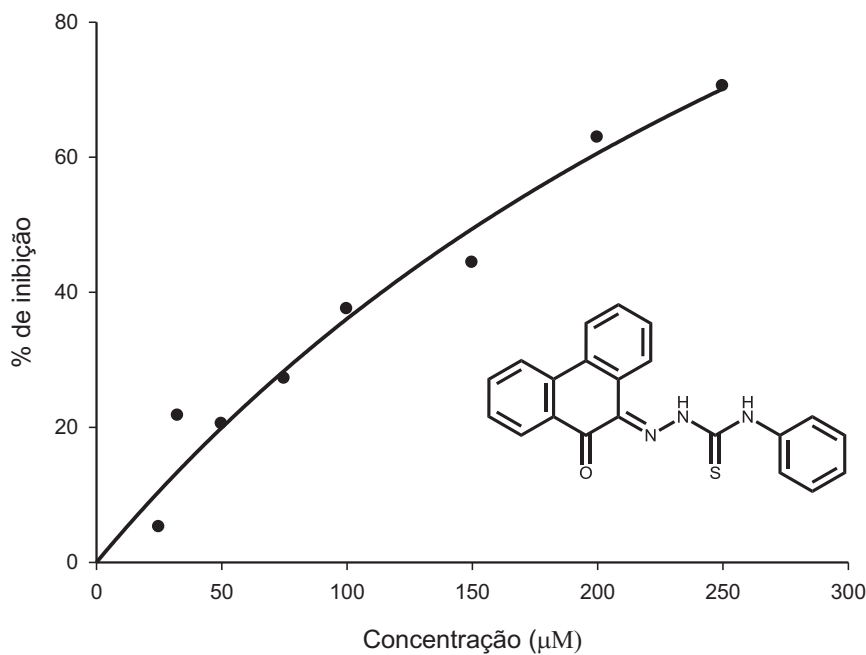
Quadro 3 – Derivados de tiossemicarbazonas testados contra *TbSODb2*

			
R ₂	R ₃	R ₂	R ₃
C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	C ₉ H ₉	C ₆ H ₅
C ₆ H ₅ -2-OH	C ₆ H ₅	C ₈ H ₇	C ₆ H ₅
C ₆ H ₅ -4-H ₃ CO	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅ -4-Cl	C ₆ H ₅
C ₆ H ₅ -4-Cl	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅ -2-OH-3-H ₃ CO	C ₆ H ₅
C ₆ H ₅ -4-N(CH ₃) ₂	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅ -2-OH	C ₆ H ₅
C ₆ H ₅ -2-Cl	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅ -2-NO ₂	C ₆ H ₅
C ₆ H ₅ -2-H ₃ CO	C ₆ H ₅	C ₁₀ H ₈ O	C ₆ H ₅
C ₆ H ₅ -4-NO ₂	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅ -3,4-OH	C ₆ H ₅
C ₆ H ₅ -2-H ₃ CO-3-OH	C ₆ H ₅	C ₂₄ H ₁₈ O	C ₆ H ₅
C ₆ H ₅ -4-H ₃ CO	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅ -3-H ₃ CO-4-OH	C ₆ H ₅
C ₇ H ₄ O ₂	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅ -3-OH	C ₆ H ₅
C ₈ H ₈	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	n-Butil
C ₆ H ₅ -4-H ₃ CO	C ₆ H ₅ -4-Cl	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅ -4-Cl
C ₇ H ₄ O ₂	C ₆ H ₅ -4-Cl	C ₆ H ₅ -4-NO ₂	C ₆ H ₅ -4-Cl
C ₈ H ₆ NO	C ₆ H ₅ -4-Cl	-	-

Embora os derivados de tioxipirimidina não tenham apresentado atividade frente a *TbSODb2*, foi identificado que a Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona tem atividade inibitória no ensaio de dose única (40%).

Na sequência, procurou-se determinar a concentração do inibidor na qual a velocidade de formação do produto é igual a metade da velocidade sem a presença do inibidor, pois esse valor, conhecido como IC_{50} , é usado para ranquear novas entidades químicas em termos da potência inibitória (KRIPPENDORFF et al., 2009). A curva dose-resposta obtida sugere que o valor de IC_{50} seja próximo de 200 μM (Figura 27). Valores exatos não puderam ser calculados devido a limitações com a solubilidade da molécula em concentrações acima de 250 μM .

Figura 27 - Curva dose-resposta de Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona frente a *TbSODb2*.



4.4 IDENTIFICAÇÃO DE SÍTIO E ACOPLAMENTO MOLECULAR

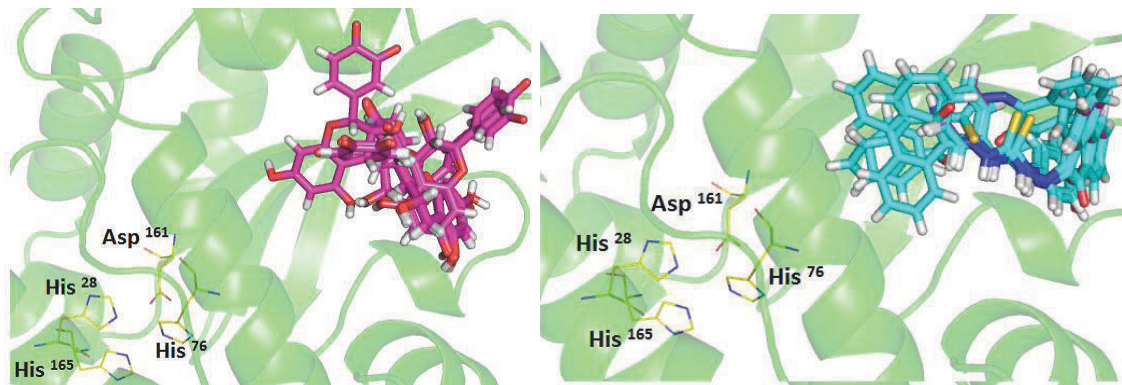
Em função das dificuldades experimentais discutidas anteriormente, não foi possível, até o momento, definir o mecanismo de inibição de catequina oxidada e de Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona utilizando métodos clássicos de cinética enzimática. Alternativamente, procurou-se investigar esse tópico com o auxílio de ferramentas *in silico*. Essa abordagem computacional pode ser dividida

nas seguintes etapas: 1) identificação de potenciais sítios de interação em *TbSODb2*; 2) Simulação do acoplamento molecular de catequina oxidada e de Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona nos sítios previamente identificados; 3) Planejamento de modificações moleculares que possam aumentar a complementariedade estérea e eletrônica com o sítio de interação; 4) síntese e avaliação biológica dos derivados.

De uma forma geral, o sítio ativo de uma enzima constitui o principal sítio de interação presente na sua superfície e moléculas que tenham afinidade por ele comportam-se como inibidores competitivos. Todavia, o substrato de *TbSOD* é um íon superóxido, conseqüentemente, o volume desse sítio de interação é bastante inferior aquele necessário para interação de uma molécula com características de protótipo (lead-like) ou de fármacos (drug-like) (LAURIE; JACKSON, 2006). Além disso, dados da literatura mostram que inibidores de FeSOD podem interagir com aminoácidos fora do sítio de ligação (SOULERE,2002; MESHNICK,1985).

De fato ao simular o acoplamento molecular da catequina oxidada e de Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona no sítio ativo verifica-se que todas as soluções encontradas pelo programa SurflexDock estão fora do sítio ativo (Figura 28).

Figura 28 - Acoplamento de Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona e catequina oxidada no sítio ativo de *TbSODb2*, de acordo com o programa SurflexDock. Os resíduos do sitio ativo estão destacados em amarelo. Esquerda: em rosa estão representadas as poses de maior pontuação para catequina oxidada; Direita: Em azul estão representadas as poses de maior pontuação para 4-fenil-fenantrenoquinona tiossemicarbazona



Diante desse resultado preliminar, decidiu-se utilizar os programas Surfnnet, QsiteFinder e PASS para identificar outros sítios de interação presentes na

superfície de *TbSODb2*, que possam acomodar os inibidores identificados no decorrer desse projeto. Os programas PASS e Surfnet consideram apenas características geométricas para prever os bolsões e cavidades que possam ser considerados como sítios de interação, enquanto o programa Q-siteFinder calcula as interações de Van der Waals com uma metila para criar mapas de interação potencial ao redor da superfície da proteína (CAPRA et al., 2009). Dessa forma, a combinação dos resultados obtidos com cada um desses programas pode levar a predições mais corretas sobre os sítios de interação presentes em *TbSODb2*. Levando em consideração essa hipótese, o sítio de interação formado pelos resíduos Gln¹⁹⁴; Lys¹⁵⁵; Leu¹⁴⁹; Phe⁷⁴; Glu⁵⁶ e Glu⁵⁷ foi identificado (Figura 29). Assim como observado para sítio ativo de *TbSOD* e *TcSOD* (Figura 8, página 21), existe alta conservação sequencial para os resíduos presentes nesse bolsão (Figura 30).

Figura 29 - Identificação de sítios de interação através dos programas Surfnet ■, PASS ■, QsiteFinder ■, no monômero A de *TbSOD* (código PDB: 3ESF). Os resíduos em destaque representam o novo sítio encontrado.

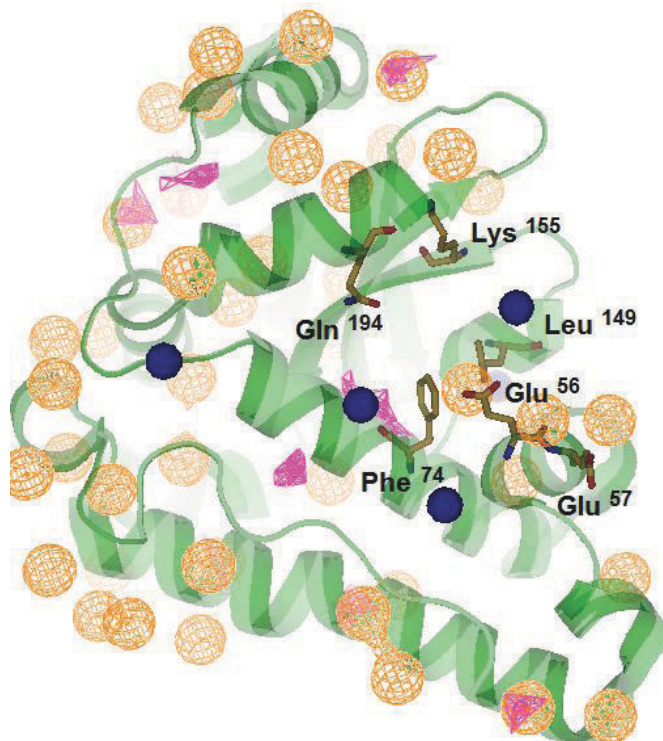
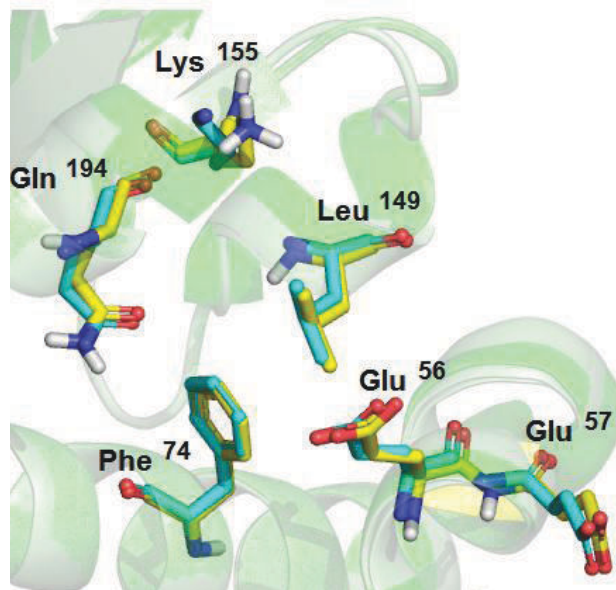
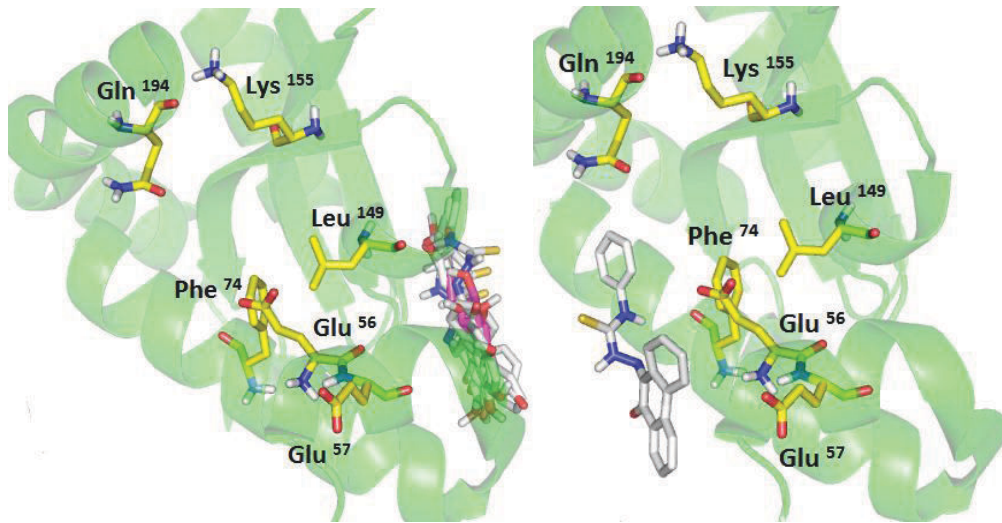


Figura 30 - Sobreposição de *TbSOD* e *TcSOD* evidenciando a conservação dos resíduos no potencial sítio identificado.



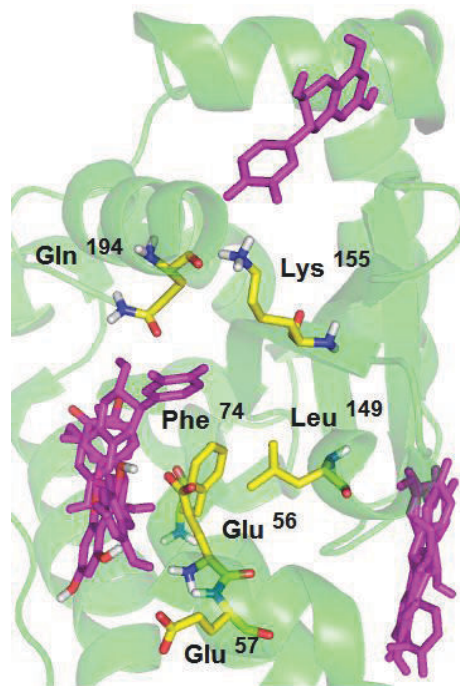
Outra estratégia para identificação de potenciais sítios alternativos de interação se baseia em simular o acoplamento molecular em todos os bolsões e cavidades presentes na proteína e, posteriormente, utilizar a função de pontuação do programa para definir em quais regiões a interação molecular é mais favorável. Essa metodologia não pode ser implementada no programa SurflexDock, pois o espaço de busca é definido a partir do protomol (vide seção 3.6.2), razão pela qual essa estratégia de acoplamento molecular foi realizada somente com o programa AutoDockVina. Inicialmente, o espaço de busca foi definido como um cubo de 50Å x 50Å x 48Å, no qual o monômero A de *TbSOD* (código PDB: 3ESF) está inserido. As poses obtidas a partir desse acoplamento às cegas (*blind docking*) foram ranqueadas de acordo com os valores de energia livre de interação inibidor-enzima e aquelas com maior pontuação foram agrupadas segundo o desvio quadrático médio (RMSD, do inglês *root mean square deviation*) das posições atômicas. Os resultados desse experimento mostram que as poses de Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona se agrupam em duas regiões da proteína (Figura 31): 1ª região- 7 poses; 2ª região- 2 poses. A variação de energia livre entre as moléculas do grupo mais populoso foi de -0,7 Kcal/mol, o que indica a convergência do programa nas soluções encontradas. As moléculas desse cluster interagem com resíduos próximos daqueles identificados, de forma consensual, pelos programas PASS, QsiteFinder e Surfnnet.

Figura 31 - Soluções encontradas com auxílio do programa AutoDockVina para o acoplamento cego de Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona em *TbSODb2*. Esquerda: sítio de interação encontrado com 7 poses; Direita: sítio de interação encontrado com 2 poses.



Ao se aplicar a mesma estratégia (*blind docking*) para o acoplamento da catequina oxidada na estrutura de *TbSODb2*, verifica-se que as poses se agrupam em 3 regiões (1° região: 5 poses; 2° região: 3 poses e 3° região: 1 pose (Figura 32) apresentando uma variação de $-0,3\text{Kcal/mol}$ na energia de interação entre as poses de 1° região.

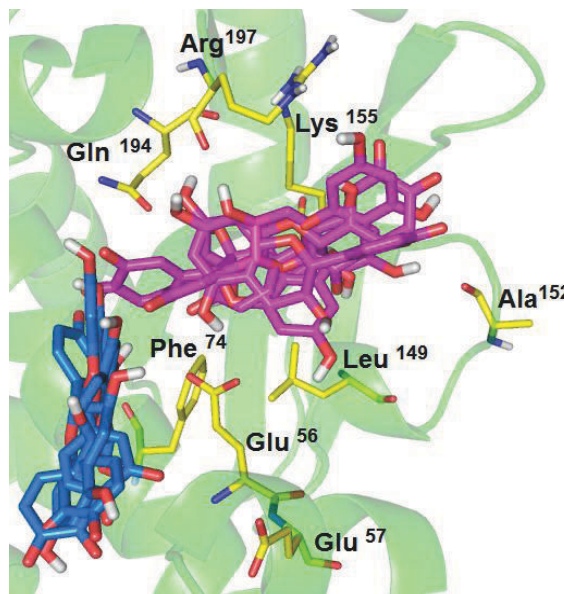
Figura 32 - Soluções encontradas com auxílio do programa AutoDockVina para o acoplamento cego de catequina oxidada em *TbSODb2*. Em amarelo: resíduos do sítio de interação encontrado. Em lilás: poses geradas para catequina oxidada. Em verde: monômero de *TbSODb2*.



Novamente, a região que concentra o maior número de soluções está próxima daquela identificada com auxílio dos programas PASS, Surfnet e QsiteFinder. Visando melhorar a qualidade das soluções encontradas, o espaço de busca foi reduzido para um cubo com dimensões de 16Å x 20Å x 18Å, englobando os resíduos do provável sítio de interação (Gln¹⁹⁴; Lys¹⁵⁵; Leu¹⁴⁹; Phe⁷⁴; Glu⁵⁶ e Glu⁵⁷), com uma margem extra de 1,0 Å. Essa estratégia permite que a busca conformacional seja realizada de forma mais eficiente e, portanto, as poses sejam mais próximas daquela que seria observada experimentalmente.

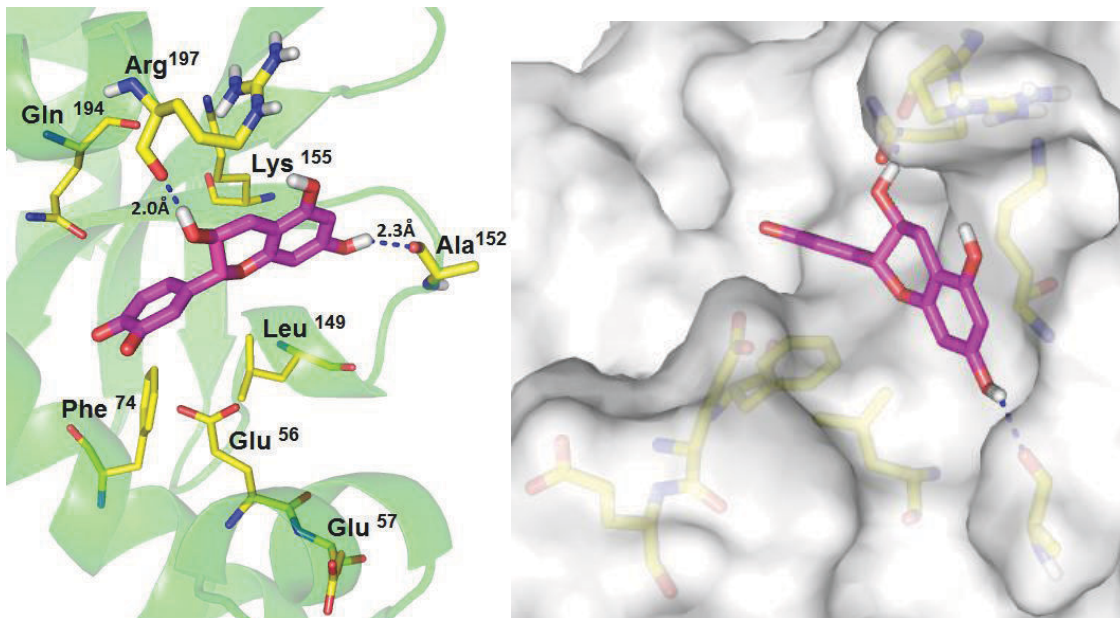
Os modos de interação encontrados com o auxílio do programa AutoDockVina se agrupam em duas regiões, sendo que a energia de interação entre elas difere em apenas 0,6Kcal/mol (Figura 33). Em função disso, o número de soluções em cada região é semelhante (5 poses na 1ª região versus 4 poses na 2ª região). Outro fator a ser considerado é que a energia de interação da melhor solução (-6,2Kcal/mol) é próxima daquela obtida no acoplamento cego (-6,4Kcal/mol). Entretanto, uma análise visual detalhada do modo de interação da 2ª e 3ª pose (2ª região) mostra que os anéis cromano estão orientados perpendicularmente a Glu⁵⁶, impossibilitando que o mesmo faça interações polares com o ligante ou com moléculas do solvente.

Figura 33 - Soluções obtidas com o acoplamento da catequina oxidada utilizando o programa AutoDockVina. Em amarelo: resíduos identificados pelo consenso entre o PASS, Surfnet, Qsitefinder. Em lilás: poses geradas incluindo a de maior pontuação para catequina oxidada. Em azul: segundo grupo de poses geradas para catequina oxidada apresentando pontuações menores. Em verde: Monômero de *TbSODb2*



Por outro lado, na pose de maior pontuação (1° região), o anel pirano posiciona as hidroxilas das posições 3 e 7 para interagir com as carbonilas dos resíduos Arg¹⁹⁷ e Ala¹⁵², enquanto o anel fenila realiza interações do tipo T-stacking com o resíduo Phe⁷⁴ (Figura 34). Outro fator que merece ser mencionado é a boa complementariedade que essa pose apresenta com a superfície molecular de *TbSODb2* (Figura 34).

Figura 34 - Acomplamento da catequina oxidada utilizando o programa AutodockVina. Esquerda: Pose de maior pontuação evidenciando as interações com a proteína. Direita: Representação da superfície da proteína e encaixe da catequina oxidada. Em amarelo: os resíduos Gln¹⁹⁴; Lys¹⁵⁵; Leu¹⁴⁹; Phe⁷⁴; Glu⁵⁶ e Glu⁵⁷ do sítio identificado e Ala¹⁵² e Arg¹⁹⁷ resíduos próximo ao sítio que fazem interação com o inibidor. Em lilás: Pose de melhor pontuação gerada para catequina oxidada. Em verde: Monômero de *TbSODb2*. Em cinza: representação da superfície de *TbSODb2*

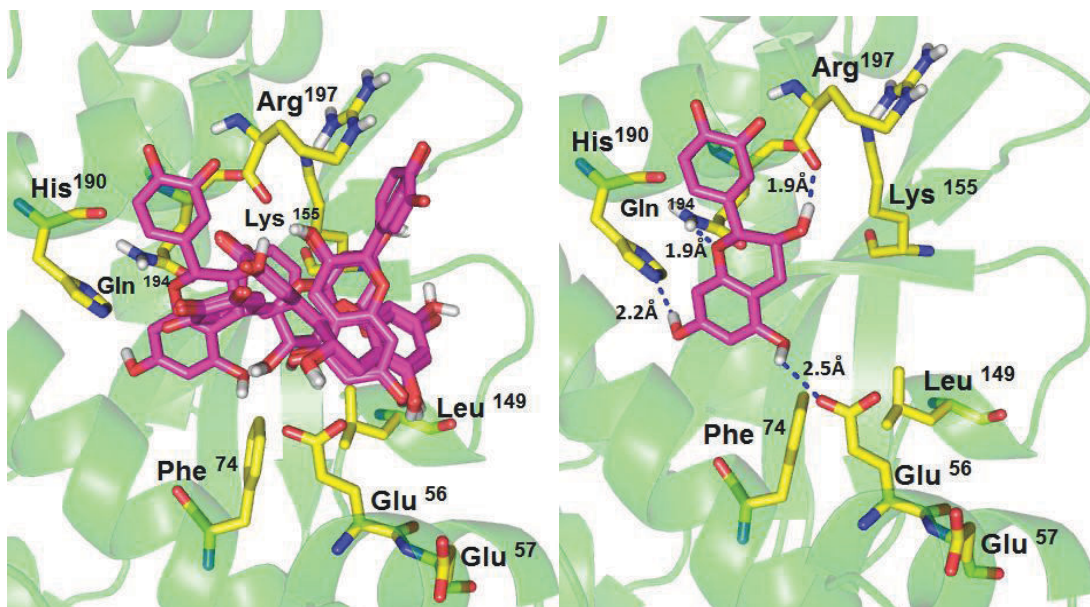


Embora métodos de busca conformacional baseados em algoritmos genéticos apresentem grande eficiência para identificar poses próximas aquelas encontradas experimentalmente para moléculas com até 5 ligações rotacionáveis (TROT; OLSON, 2010), a função de pontuação disponível no programa AutoDockVina descreve de forma simplificada a componente entrópica da energia livre de ligação. Como consequência disso, a conformação bioativa pode não apresentar a melhor pontuação entre as poses sugeridas pelo programa. Como alternativa para contornar essa limitação, decidiu-se simular o acoplamento molecular de Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona e de catequina oxidada com um segundo programa de acoplamento molecular (SurflexDock), o qual emprega tanto um método de busca

quanto uma função de pontuação diferentes (JAIN, 2003) daqueles do programa AutoDockVina. Espera-se que entre as poses de melhor pontuação, segundo o programa SurflexDock, algumas sejam semelhantes às aquelas identificadas com auxílio do programa AutodockVina. Essas soluções consensuais apresentam maior chance de se aproximarem das conformações bioativas (CLARK et al., 2002; FEHER, 2006).

De acordo com o programa SurflexDock, a catequina oxidada se liga na região localizada entre os resíduos Arg¹⁹⁷ e Ala¹⁵² (Figura 35). Entretanto, o padrão de ligações de Hidrogênio é diferente daquele mostrado anteriormente, uma vez que agora é a hidroxila da posição 3 que interage com Arg¹⁹⁷ enquanto a hidroxila da posição 5 faz uma ligação de hidrogênio com a cadeia lateral de Glu⁵⁶ e a hidroxila da posição 7 interage com o anel imidazol do resíduo His¹⁹⁰ (Figura 35). Dessa forma, a solução de maior pontuação (4.40 kcal/mol¹) interage com *TbSODb2* numa posição perpendicular em relação aquela proposta pelo programa AutodockVina (Figura 36).

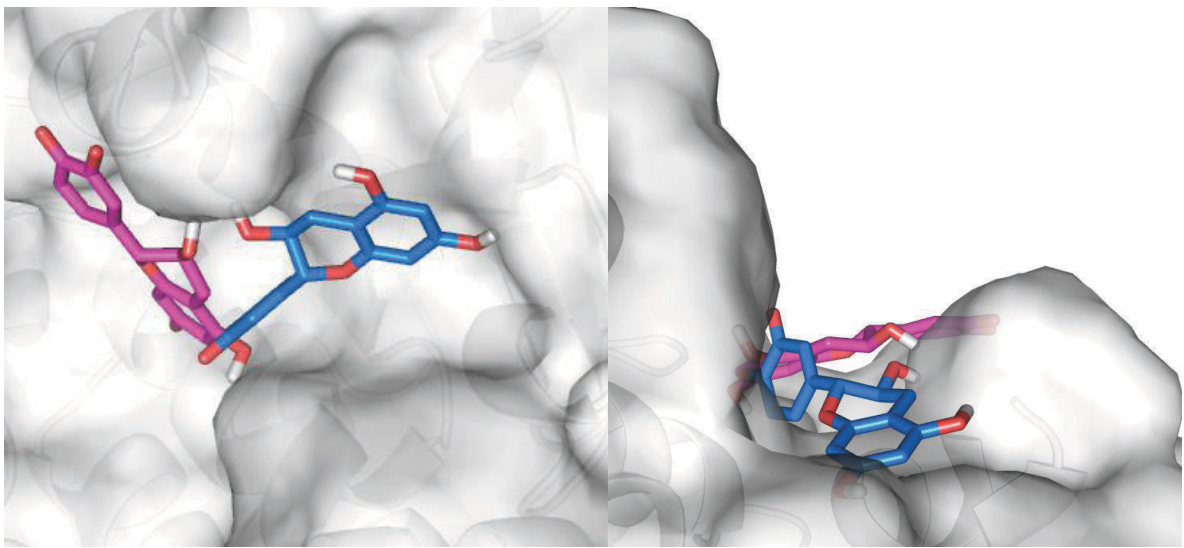
Figura 35 - Soluções obtidas com o acomplamento da catequina oxidada utilizando o programa SurflexDock. Em amarelo resíduos identificados pelos algoritmos PASS, QsiteFinder, Surfnets. Em lilás: poses geradas para catequina oxidada. Em verde: Monômero de *TbSODb2*



¹ Calculado a partir do "score total" do surflex-dock e considerando RT= 0,59Kcal/mol (temperatura de 25° C)

No entanto a complementariedade estérea da pose sugerida pelo programa SurflexDock é inferior aquela encontrada pelo programa AutodockVina, sugerindo que esse último parece ser mais adequado para prever o modo de interação de catequina oxidada em *TbSODb2* (Figura 36).

Figura 36 – Soluções do acoplamento molecular para catequina oxidada segundo os programas SurflexDock e AutodockVina na superfície da proteína *TbSODb2*. Em azul: acoplamento da catequina oxidada segundo o programa SurflexDock. Em lilás: acoplamento da catequina oxidada segundo o programa AutodockVina. Figura em duas orientações para realçar a maior complementariedade do AutoDockVina.

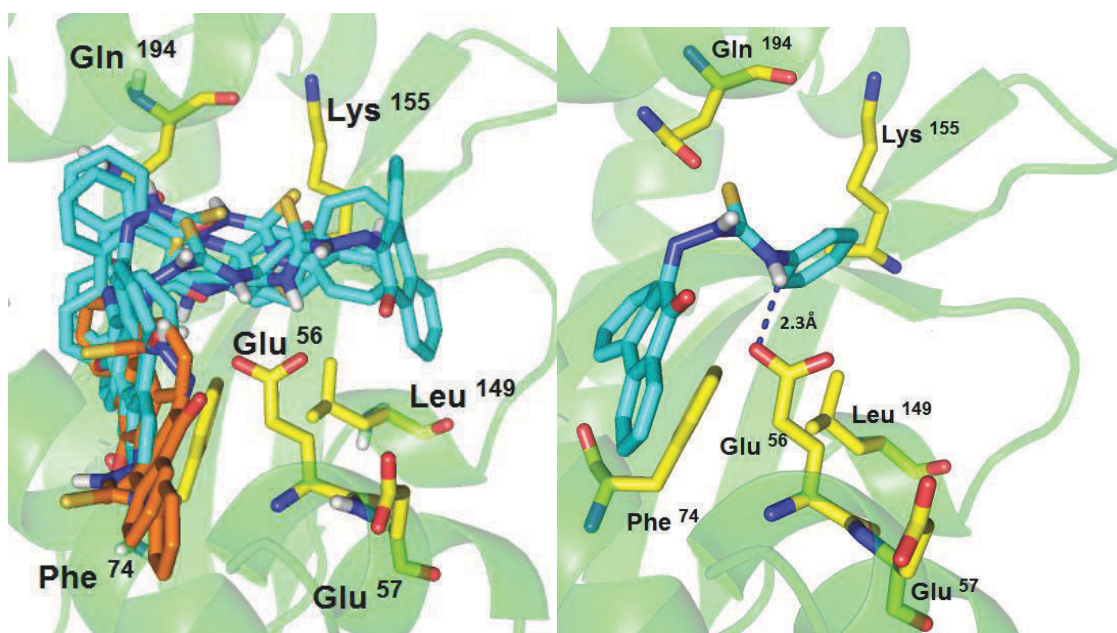


Levando em consideração os resultados obtidos com o programa AutodockVina para catequina oxidada, decidiu-se utilizar prioritariamente esse programa para simular o acoplamento da fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona em *TbSODb2*.

As soluções encontradas para Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona com auxílio do programa AutodockVina apresentaram 2 agrupamentos de poses (Figura 37). A solução de maior pontuação (-6,8Kcal/mol) encontra-se no agrupamento que concentra o maior número de poses (aproximadamente 70%). Contudo, ela apresenta pontuação inferior aquela identificada no acoplamento cego (-7,7Kcal/mol). Esse resultado sugere que Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona interage de forma mais eficiente fora da região delimitada para a busca conformacional, ou seja, o modo de interação proposto pode ser um artefato da metodologia utilizada. Essa hipótese é corroborada pela análise do modo de interação proposto para a pose de maior pontuação (Figura 39): O grupo tiossemicarbazona encontra-se distorcido e o número de interações polares entre

ligante e macromolécula é extremamente reduzido. Em conjunto, essas características mostram que o programa AutodockVina não foi capaz de encontrar soluções corretas para o problema de acoplamento molecular.

Figura 37 - Soluções obtidas com o acoplamento da Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona utilizando o programa AutodockVina. Esquerda: Todas as poses para a Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona. Direita: Interações realizadas pela pose de maior pontuação. Resíduos em amarelo correspondem aos resíduos identificados pelo consenso entre os programas PASS, Surfnet, Qsitefinder. Em azul: poses de maior pontuação. Em laranja: poses de menor pontuação. Em verde: monômero de *TbSODb2*. Linha tracejada representa uma ligação de Hidrogênio.

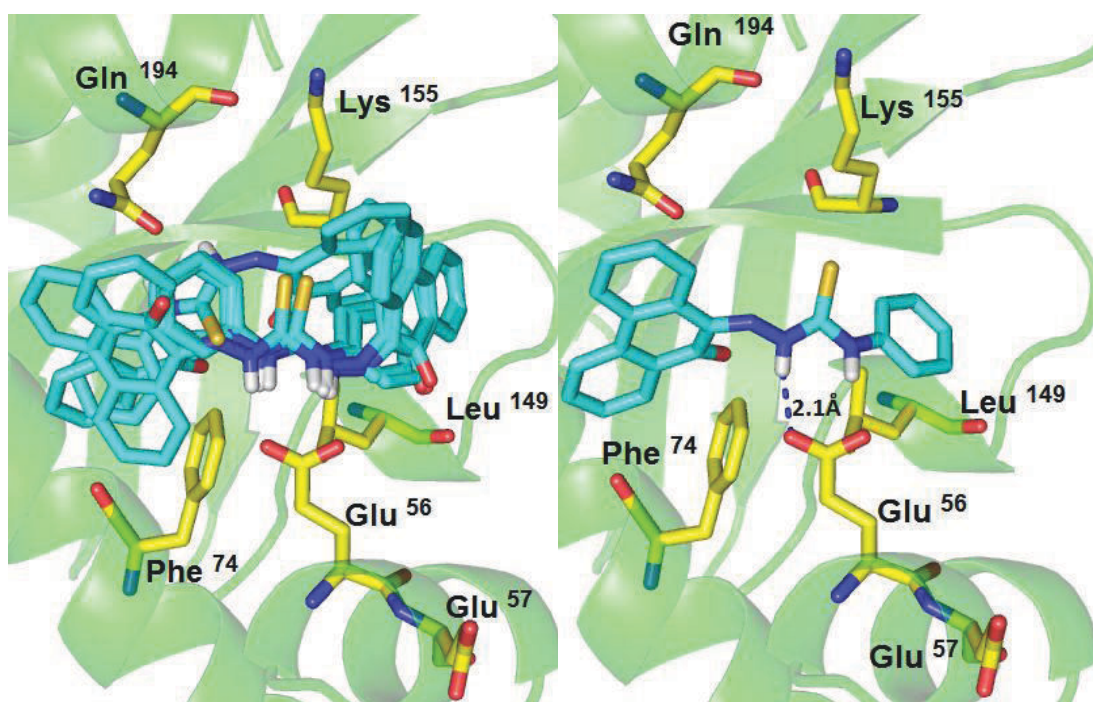


Por essa razão, decidiu-se empregar o programa SurflexDock como uma alternativa para investigar o modo de interação de Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona.

As poses geradas pelo SurflexDock mostram que o grupo tiossemicarbazona, na maioria das soluções propostas, interagem com o resíduo Glu⁵⁶, enquanto o grupo fenantrenoquinona ora se acomoda perto da Phe⁷⁴, ora próximo à Lys¹⁵⁵ (Figura 38). Esse modo de interação é similar aquele encontrado pelo programa AutodockVina. Adicionalmente, se observa que os ângulos de ligação do grupo tiossemicarbazona encontram-se também distorcidos (embora em menor grau). Portanto, em função de limitações na parametrização desse grupo funcional, nenhum dos programas utilizados para simular o acoplamento de Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona foi capaz de encontrar poses compatíveis como o modo de

interação plausível de Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona com a proteína *TbSODb2*.

Figura 38 - Acoplamento da Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona utilizando o programa SurflexDock. Esquerda: poses geradas para Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona; Direita: Pose de maior pontuação para Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona; Em amarelo: resíduos identificados pelo consenso entre os programas PASS, Surfnets, Qsitefinder. Em azul: poses geradas pelo SurflexDock. Em verde: Monômero de *TbSODb2*. Linha tracejada representa uma ligação de Hidrogênio.



5. CONCLUSÃO

A união das informações provenientes de ensaios experimentais e de métodos *in silico* mostrou-se essencial para identificar um sítio de interação alternativo em *TbSODb2* no qual os inibidores identificados na primeira etapa do trabalho pudessem interagir. Entretanto, ficou evidente que as limitações impostas pelo método de triagem de inibidores de *TbSODb2*, baseado na autooxidação não pode ser contornado plenamente pelo uso da técnica de acoplamento molecular, exigindo que ensaios cinéticos mais refinados sejam empregados para determinar univocamente o modo de interação da catequina oxidada e de Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona. Apesar disso, a identificação dessas moléculas como inibidores de *TbSODb2* constitui uma etapa determinante para o desenvolvimento de moléculas protótipo no processo de desenvolvimento de fármacos tripanocidas.

As limitações impostas pela baixa solubilidade de Fenantrenoquinona 4-fenil tiossemicarbazona impediram que o valor exato do seu IC_{50} fosse determinado. Contudo, o valor aproximado de $200\mu M$ indica que modificações moleculares serão necessárias para aumentar sua afinidade por *TbSODb2*. Infelizmente, o planejamento de derivados dessa molécula não poderá ser guiado por informações relacionadas com o alvo macromolecular, pois não foi possível identificar o provável modo de interação desse inibidor em *TbSODb2*. Por outro lado, os modos de interação proposto para catequina oxidada (Figura 34 e 35) parecem ser aceitáveis e ressaltam a importância das hidroxilas ligadas ao anel cromano para a atividade biológica, enquanto as hidroxilas catecólicas não parecem interferir significativamente na afinidade por *TbSODb2*. Diante disso, dois derivados de catequina foram selecionados (Figura 26) para investigar a influência do grupo catecol sobre a inibição de *TbSODb2*. Novamente se percebe como a integração de informações computacionais pode acelerar o desenvolvimento de compostos protótipos com atividade inibitória sobre o alvo macromolecular estudado.

REFERÊNCIAS

- ABREU, I.A.; CABELLI, D.E. Superóxide dismutase – a review of the metal-associated mechanistic variations. **Biochimica et biophysica acta**, v.1804, n.2, p.263-274, 2010;
- ARAGÃO, V.C. et al. Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. **Química Nova**, v.32, n.9, p.2268-2272, 2009;
- ARIYANAYAGAM, M.R.; FAIRLAMB, A.H. Ovothiols and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.115, n.2, p.189-198, 2001;
- AYABE, T. et al. The steady-state kinetics of the enzyme reaction tested by site-directed mutagenesis of hydrophobic residues (val, leu, and cys) in the c-terminal α -helix of human adenylate kinase. **The Journal of Biochemistry**, v.128, n.2, p.181-187, 2000;
- BACCHI, C.J. et al. Antitrypanosomal activity of a new triazine derivative, SIP11029, *in vitro* and model infections. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v.42, n.10, p. 2718-2721, 1998;
- BACHEGA, J.F.R. et al. Systematic structural studies of iron superoxide dismutases from human parasite and a statistical coupling analysis of metal binding specificity. **Proteins**, v.77, n.1, p.26-37, 2009;
- BACHEGA, J.F.R. Estrutura cristalográfica da enzima superóxido dismutase de *Trypanosoma brucei* e análise da especificidade do metal incorporado por acoplamento estatístico. 2008. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- BAFANA, A. et al. The basic and applied aspects of superoxide dismutase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.68, n.2, p.129-138, 2011;
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: Relação entre a geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2009;
- BEVILAQUA, J.V. Estudo da catálise enzimática em meio orgânico para a produção de protótipo de fármaco antiasmático. 2005. 156f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005;
- BINDOLI, A., et al. The role of adrenochrome in stimulating the oxidation of catecholamines. **Neurotoxicity Research**, v.1, n.2, p.71-80, 1999;
- BOIANI, M. et al. Mode of action of nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved? **Biochemical Pharmacology**, v.79, n.12, p.1736-1745, 2010;

BOLZANI, V.S. et al. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v.84, n.9, p.1837-1846, 2012;

BORS,W. The involvement of oxygen radicals during the autoxidation of adrenalin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.540, n.1, p.162-172, 1978;

BRADY, G.P.; STOUTEN, P.F. Fast prediction and visualization of protein binding pockets with PASS. **Journal of Computer-aided Molecular Design**, v.14, n.4, p.383-401, 2000;

BRESOLIN, I.T.L.; MIRANDA, E.A.; BUENO, S.M.A. Cromatografia de afinidade por ions metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: Aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**, v.32, n.5, p.1288-1296, 2009;

BRUN, R. BLUM,J. Human Afrian trypanosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n.2, p.261–273, 2012;

BUSE,K.; WALT,G. Global public-private partnerships: part II – what are the health issues for global governance? **Bulletin of the world health organization**, v.78, n.5, p.699-709, 2000;

CAPRA, J.A. et al. Predicting protein ligand binding sites by combining evolutionary sequence conservation and 3D structure. **PloS Computational Biology**, v.5, n.12, p.e1000585, 2009;

CAPRILES, P.V. et al. Structural modeling and comparative analysis of homologous, analogous and specific proteins from *Trypanosoma cruzi* versus *Homo sapiens*: putative drug target for chagas' disease treatment. **BMC Genomic**, v.11, n.610, p.1-10, 2010;

CHENG, T. et al. Structure-based virtual screening for drug discovery: a problem-centric review. **The AAPS Journal**, v.14, n.1, p.133-141, 2012;

CLARK, R.D. et al. Consensus scoring for ligand/protein interactions. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, v.20, n.4, p.281-295, 2002;

COOPELAND, R.A. Enzyme Reaction Mechanisms. **Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery**. EUA, Wiley-Interscience, p.21-47, 2005;

COOPELAND, R.A. Assay Considerations for Compound Library Screening. **Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery**. EUA, Wiley-Interscience, p.82-110, 2005;

CORTEZ,J. et al. Emerging and under-recognized Chagas cardiomyopathy in non-endemic countries. **World Journal Cardiology**, v.4, n.7, p.234-239, 2012;

CUNHA, S.; SILVA, T. L. One-pot and catalyst-free synthesis of thiosemicarbazones via multicomponent coupling reactions. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n.18, p. 2090-2093, 2009;

CRAWFORD, A.D. et al. Zebrafish bioassay-guided natural product discovery: isolation of angiogenesis inhibitors from east african medicinal plants. **PLOS one**, v.6, n.2, p.e14694, 2011;

DIAS, R.; AZEVEDO, W. F. Molecular docking algorithms. **Current Drug Targets**, v.9, n.12, p.1040-1047, 2008;

DIAS,L.C.; DESSOY,M.A. Quimioterapia da doença de Chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v.32, n.9, p.2444-2457, 2009;

DOLASKA,P. et al. Sctructural analysis and molecular modelling of the Cu/Zn-SOD from fungal strain *Humicola lútea* 103. **Spectrochimica Acta Part A**, v.83, n.1, p.67-73, 2011;

DUFERNEZ, F. et al. The presence of four iron containing superoxide dismutase isozymes in Trypanosomatidae: Characterization, subcellular localization and phylogenetic origin in *Trypanosoma brucei*. **Free Radical Biology & Medicine**, v.40, n.2, p.210-225, 2006;

ELDRIDGE,M.D. et al. Empirical scoring functions: I. The development of fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. **Journal Computed-aided Molecular Design**, v.11, n.5, p.425-445, 1997;

ENDO, K. et al. Development of a superoxide sensor by immobilization of superoxide dismutase. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.83, n.1, p.30-34, 2002;

FAUMAN,E.B.; RAI, B.K.; HUANG,E.S. Structure – based druggability assessment – identifying suitable targets for small molecule therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.15, n.4, p.463-468, 2011;

FERREIRA, R.S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova**, v.34, n.10, p.1770-1778, 2011;

FIDALGO,L.M.; GILLE,L. Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. **Pharmaceutical Research**, v.28, n.11, p.2758–2770, 2011;

FEHER, M. Consensus scoring for protein-ligand interactions. **Drug Discovery Today**, v.11, n.9, p.421-428, 2006;

FLOHE,L.; HECHT,H.J.; STEINERT,P. Glutathione and Trypanothione in Parasitic Hydroperoxide Metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, v.27, n.9, p.966-984, 1999;

FRANSEN, M. et al. Role of peroxisomes in ROS/RNS – metabolism: Implications for human disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1822, n.9, p.1363-1373, 2012;

GALPERIN, M.Y.; WALKER, D.R.; KOONIN, E.V. Analogous enzymes: Independent inventions in enzyme evolution. **Genome Research**, v.8, n.8, p.779-790, 1998;

GOLDSTEIN, S. et al. A critical reevaluation of some assay methods for superoxide dismutase activity. **Free Radical Biology & Medicine**, v.4, n.5, p.295-303, 1988;

GREENBAUM, D.C. et al. Synthesis and structure-activity relationships of parasiticidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.47, n.12, p.3212-3219, 2004;

GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A.D. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v.24, n.70, 2010;

GUIDO, R.V.C.; OLIVA, G. Structure-based drug discovery for tropical diseases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.9, n.9, p.824-843, 2009;

HANDY, D.E.; LOSCALZO, J. Redox Regulation of Mitochondrial Function. **Comprehensive Invited Review**, v.16, n.11, p.1323-1367, 2012;

HARAGUCHI, S. K. et al. Antitrypanosomal activity of novel benzaldehyde-thiosemicarbazone derivatives from kaurenoic acid. **Molecules**, v.16, n.2, p. 1166–1180, 2011;

HENRICH, S. et al. Computational approaches to identifying and characterizing protein binding sites for ligand design. **Journal of Molecular Recognition**, v.23, n.2, p.209-219, 2009;

HUANG, B. MetaPocket: a meta approach to improve protein ligand binding site prediction. **Omics: a Journal of Integrative Biology**, v.13, n.4, p.325-330, 2009;

HUANG, S.Y.; ZOU, X. Advances and challenges in protein-ligand docking. **International Journal Molecular Science**, v.11, n.8, p.3016-3034, 2010;

JAIN, A. N. Surflex-Dock 2.1: robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility, and knowledge-based search. **Journal of Computer-aided Molecular Design**, v.21, n.5, p.281–306, 2007;

JAIN, A. N. Effects of protein conformation in docking: improved pose prediction through protein pocket adaptation. **Journal of Computer-aided Molecular Design**, v.23, n.6, p.355-74, 2009;

JANEIRO, P.; BRETT, A.M.O. Catechin electrochemical oxidation mechanisms. **Analytica Chimica Acta**, v.518, n.1, p.109–115, 2004;

KABIRI, M.; STEVERDING, D. Identification of a developmentally regulated iron superoxide dismutase of *Trypanosoma brucei*. **The Biochemical Journal**, v.360, n.1, p.173-177, 2001;

KALYAANAMOORTHY,S.; CHEN, Y.P. Structure-based drug design to augment hit discovery. **Drug Discovery Today**, v.16, n.17, p.831-839, 2011;

KENNEDY,P.G.E. Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). **Lancet Neurology**, v.12, n.2, p.186–94. 2013;

KITCHEN, D.B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery; methods and applications. **Nature Review Drug Discovery**, v.3, n.11, p.935-949, 2004;

KOEHN, F. E. Biosynthetic medicinal chemistry of natural product drugs. **MedChemComm**, v.3, n.8, p.854-865, 2012;

KLUG,D. RABANI,J. A Direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.247, n.15, p.4839-4842, 1972;

KRIPPENDORFF, B. et al. Mechanism-based inhibition: deriving KI and Kinat directly from time-dependent IC₅₀ values. **Journal of Biomedical Screening**, v.14, n.8, p.913-923, 2009;

LASKOWSKI, R.A. Surfnet: A program for visualizing molecular surfaces, cavities, and intermolecular interactions. **Journal of Molecular Graphics**, v.13, n.5, p.323-330, 1995.

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

LAURIE, A.T.R.; JACKSON,R.M. Methods for the prediction of protein-ligand binding sites for sctructure-based drug design and virtual ligand screening. **Current Protein and Peptide Science**, v.7, n.5, p.395-406, 2006;

LEIS, S.; SCHNEIDER, S.; ZACHARIAS, M. In silico prediction of binding sites on proteins. **Current Medicinal Chemistry**, v.17, n.15, p.1550-1562, 2010;

LI, X. Improved pyrogallol autoxidation method: a reliable and cheap superoxide-scavenging assay suitable for all antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.25, p.6418-6424, 2012;

LIMA, A.W.O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. **Química Nova**, v.22, n.2, p.229-245, 1998;

LOZANO, N.B.H. et al. Molecular features for antitrypanosomal activity of thiosemicarbazones revealed by OPS-PLS QSAR studies. **Medicinal Chemistry**, v. 8, n.6, p.1045-1056, 2012.

MALLARI, J. P. et al. Discovery of trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and *TbcatB*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.18, n.9, p.2883–2885, 2008;

MALVY, D. CHAPPUIS, F. Sleeping sickness. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, n.7, p.986-995, 2011;

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v.47, n.3, p.469-474, 1974;

MATTHEWS, S.B.; HENDERSON, A.H.; CAMPBELL, A.K. The adrenochrome pathway: The major route for adrenalin catabolism by polymorphonuclear leucocytes. **Journal Molecular and Cellular Cardiology**, v.17, n.4, p.339-348, 1985;

McCLEVERTY, J.A.; MEIYER, T.J. Superoxide Processing. **Comprehensive Coordination Chemistry II**, ELSIEVER, 2.ed, v.8, p.479-506, 2005;

MCLNNES, C. Virtual screening strategies in drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.11, n.5, p.494-502, 2007;

MESHNICK, S.R.; KITCHENER, K.R.; TRANG, N.L. rypanosomatid iron-superoxide dismutase inhibitors. Selectivity and mechanism of N1,N6-bis(2,3-dihydroxybenzoyl)-1,6-diaminohexane. **Biochemical Pharmacology**, v.34, n.17, p.3147-3152, 1985;

MOREL, C.M. A pesquisa em saúde e os objetivos do milênio: desafios e oportunidades globais, soluções e políticas nacionais. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.9, n.2, p.261-270, 2004;

MULLER, S. et al. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. **Trends in Parasitology**, v.19, n.7, p.320-328, 2003;

MURTA, S.M.F. et al. Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. **Acta Tropica**, v.107, n.1, p.59-65, 2008;

OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. Assay of Superoxide Dismutase: Cautions Relevant to the Use of Cytochrome c, a Sulfonated Tetrazolium, and Cyanide. **Analytical Biochemistry**, v.298, n.2, p.337- 342, 2001;

PAL, C.; UDAY, B.; Redox-Active Antiparasitic Drugs. **Antioxidant & Redox Signaling**, v.17, n.4, p.555-582, 2012;

PEREZ-MOLINA, J.A.P. et al. Use of benznidazole to treat chronic chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.64, n.6, p.1139-1147, 2009;

PÉROT, S. et al. Druggable pockets and binding site centric chemical space: a paradigm shift in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.15, n.15, p.656-667, 2010;

RASSI, A. JR; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **The Lancet**, v.375, n.9723, p.1388-1402, 2010;

ROTH, E. F.; GILBERT, H. S. The pyrogallol assay for superoxide dismutase: absence of a glutathione artifact. **Analytical Biochemistry**, v.137, n.1, p.50-53, 1984;

SALOMON, C.J. First Century of Chagas' disease: An overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.101, n.3, p.888-894, 2012;

SANCHEZ-MORENO, M. et al. In vitro leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* species. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.6, p.387-397, 2012;

SANELLA, R. A. et al. Antimalarial properties of green tea. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.353, n.1, p.177-181, 2007;

SARAN, M.; BORS, W. Direct and indirect measurements of oxygen radicals. **Klinische Wochenschrift**, v.69, n.21, p.957-964, 1991;

SCHMIDT, T.J. et al. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part I. **Current Medical Chemistry**, v.19, n.14, p.2128-2175, 2012;

SCHULZ-GASCH, T.; STAHL, M. Binding site characteristics in structure-based virtual screening: evaluation of current docking tools. **Journal of Molecular Modeling**, v.9, n.1, p.47-57, 2003;

SILVA, C.H.T.P.; SANCHES, S.M.; TAFT, C.A. A molecular modeling and QSAR study of suppressors of the growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Journal of Molecular Graphics Modelling**, v. 23, p.89-97, 2004;

SIROTA, T.V. A novel approach to study the reaction of adrenaline autooxidation: a possibility for polarographic determination of superoxide dismutase activity and antioxidant properties of various preparations. **Biomedical Chemistry**, v.5, n.3, p.253-259, 2011;

SKOLNICK J. et al. Are predicted protein structures of any value for binding site prediction and virtual ligand screening? **Current Opinion in Structural Biology**, v.23, n.2, p.191-197, 2013;

SORENSEN, H.P.; MORTENSEN, K.K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v.4, n.1, p.1-8, 2005;

SOULÉRE, L. et al. Screening of Plasmodium falciparum iron superoxide dismutase inhibitors and accuracy of the SOD-assays. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.11, n.23, p.4941-4944, 2003;

TOMAS, A.M.; CASTRO, H. Redox Metabolism in Mitochondria of Trypanosomatids. *Antioxidants e Redox Signaling*, v.00, n.00, p.1-12, 2012;

TROTT, O.; OLSON, A. J. Software news and update AutoDockVina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v.31, n.2, p.455-461, 2010;

TURRENS, S.J.F; McCORD, J.M. The iron containing superoxide dismutases of Trypanosomatidae. **Free radical biology & medicine**, v.40, n.2, p.193-195, 2006;

VALLI, M. et al. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **Journal of natural products**, v.76, n.3, p.439-44, 2013;

VINATIER, V. et al. Superoxide-induced bleaching of streptocyanine dyes: Application to assay the enzymatic activity of superoxide dismutases. **Analytical Biochemistry**, v.405, n.2, p.255-259, 2010;

VIOTTI, R. et al. Side effects of benznidazole as treatment in chronic disease: fears and realities. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v.7, n.2, p.157-163, 2009;

WELBURN, S.C.; MAUDLIN, I.; SIMARRO, P.P. Controlling sleeping sickness – a review. **Parasitology**, v.136, n.14, p.1943-1949, 2009;

WESER, U.; SCHUBOTZ, L. M. Conformational aspects of superoxide dismutase-active copper chelates and catechols. *Bioinorganic Chemistry*, v.9, n.6, p.505-519, 1978;

WILKINSON, S.R.; MEYER, D.J.; KELLY, J.M. Biochemical characterization of a trypanosome enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity. **The Biochemical Journal**, v.352, n.3, p.755-761, 2000;

WILKINSON, S.R. et al. Functional characterization of the iron superoxide dismutase gene repertoire in *Trypanosoma brucei*. **Free Radical Biology & Medicine**, v.40, n.2, p.198-209, 2006;

WILKINSON, S.R.; KELLY, J.M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.11, p.e31, 2009;

YANG, M. et al. Structure-based virtual screening for glycosyltransferase₅₁. **Molecular Simulation**, v.34, n.9, p.849-856, 2008;

YU, J. et al. Roll a new algorithm for the detection of protein pocket and cavities with a rolling probe sphere. **Bioinformatic**, v.26, n.1, p.46-52, 2010;

YUE, R. et al. Approaches to target profiling of natural products. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, n.22, p.3841-3855, 2012;

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v.21, n.6, P.787-793, 1998;

ZHANG,Z. et al. Identification of cavities on protein surface using multiple computacional approaches for drugs binding site prediction. **Bioinformatics**, v.27, n.15, p.2083-2088, 2011;

ZHOU, J.Y.; PROGNON, P. Raw material enzymatic activity determination: a specific case for validation and comparison of analytical methods - the example of superoxide dismutase (SOD). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, n.5, p.1143-1148;

ANEXO A – Extratos e frações provenientes de fungos testados frente a enzima superóxido dismutase de *Trypanosoma brucei*

CÓDIGO	ORIGEM
22 FHS-21, 22 FHS-42, 22 FHS-63, 22FHS-84	Fração Hexânica oriunda do cultivo em meio Sólido de arroz da actinobactéria <i>Streptomyces platensis</i> RTd 22 por 21, 42 ,63 e 84 dias respectivamente
22 FAS-21, 22FAS-42, 22FAS-63, 22FAS-84	Fração Acetato de Etila oriunda do cultivo em meio Sólido de arroz da actinobactéria <i>Streptomyces platensis</i> RTd 22 por 21, 42 ,63 e 84 dias respectivamente
22 FBS-21, 22FBS-42, 22FBS-63, 22FBS-84	Fração Butanólica oriunda do cultivo em meio Sólido de arroz da actinobactéria <i>Streptomyces platensis</i> RTd 22 por 21, 42 ,63 e 84 dias respectivamente
22FBL	Fração Butanólica oriunda do cultivo da actinobactéria <i>Streptomyces platensis</i> RTd 22 em meio Líquido ISP-2 por 21 dias
22FAL-5	Sub-fração obtida da purificação cromatográfica da fração 22FAL (Fração Acetato de etila do cultivo da actinobactéria <i>Streptomyces platensis</i> RTd 22 em meio Líquido ISP-2 por 21 dias)
22FAS-3	Sub-fração obtida da purificação cromatográfica da fração 22FAS (Fração Acetato de etila do cultivo da actinobactéria <i>Streptomyces platensis</i> RTd 22 em meio Sólido de arroz por 21 dias)

<p>31 FHS-21, 31 FHS-42, 31 FHS-63, 31 FHS-84</p>	<p>Fração Hexânica oriunda do cultivo em meio Sólido de arroz da actinobactéria <i>Streptomyces sp.</i> RTd31 por 21, 42 ,63 e 84 dias respectivamente.</p>
<p>31FAS-21, 31FAS-42, 31FAS-63, 31FAS-84</p>	<p>Fração Acetato de Etila oriunda do cultivo em meio Sólido de arroz da actinobactéria <i>Streptomyces sp.</i> RTd31 por 21, 42 ,63 e 84 dias respectivamente</p>
<p>31FBS-21, 31FBS-42, 31FBS-63, 31FBS-84</p>	<p>Fração Butanólica oriunda do cultivo em meio Sólido de arroz da actinobactéria <i>Streptomyces sp.</i> RTd31 por 21, 42 ,63 e 84 dias respectivamente</p>
<p>31FBL</p>	<p>Fração Butanólica oriunda do cultivo da actinobactéria <i>Streptomyces sp.</i> RTd31 em meio Líquido ISP-2 por 21 dias.</p>
<p>SA-A7-AcOX5.3</p>	<p>Fração obtida após procedimentos cromatográficos do extrato de acetato de etila (AcOEt) da cultura em meio arroz parbolizado da actinobactéria RLe 7.</p>
<p>SA-A7-AcOX5.4</p>	<p>Fração obtida após procedimentos cromatográficos do extrato de acetato de etila (AcOEt) da cultura em meio arroz parbolizado da actinobactéria RLe 7</p>

SA-A7-AcOX5.5	Fração obtida após procedimentos cromatográficos do extrato de acetato de etila (AcOEt) da cultura em meio arroz parbolizado da actinobactéria RLe 7.
L-A7F8.1BU5.1	Fração obtida após procedimentos cromatográficos do extrato de butanol (BuOH) da cultura mista em meio PDB (Potato Dextrose Broth) da actinobactéria RLe7 e o fungo FLe 8.1.
L-A7F8.1BU5.9	Fração obtida após procedimentos cromatográficos do extrato de butanol (BuOH) da cultura mista em meio PDB (Potato Dextrose Broth) da actinobactéria RLe7 e o fungo FLe 8.1.
L-A7F8.1BU5.2.A3	Fração obtida após procedimentos cromatográficos do extrato de butanol (BuOH) da cultura mista em meio PDB (Potato Dextrose Broth) da actinobactéria RLe7 e o fungo FLe 8.1.
L-A7F8.1BU5.2.A.2	Fração obtida após procedimentos cromatográficos do extrato de butanol (BuOH) da cultura mista em meio PDB (Potato Dextrose Broth) da actinobactéria RLe7 e o fungo FLe 8.1
L-A7F8.1BU4.10	Fração obtida após procedimentos cromatográficos do extrato de butanol (BuOH) da cultura mista em meio PDB (Potato Dextrose Broth) da actinobactéria RLe7 e o fungo FLe 8.1.
L-A7F8.1BU4.2	Fração obtida após procedimentos cromatográficos do extrato de butanol (BuOH) da cultura mista em meio PDB (Potato Dextrose Broth) da actinobactéria RLe7 e o fungo FLe 8.1

L-A7F8.1BU3.3.1	Fração obtida após procedimentos cromatográficos do extrato de butanol (BuOH) da cultura mista em meio PDB (Potato Dextrose Broth) da actinobactéria RLe7 e o fungo FLe 8.1
SA-A7-AcOX4.1	Fração obtida após procedimentos cromatográficos do extrato de acetato de etila (AcOEt) da cultura em meio arroz parbolizado da actinobactéria RLe 7.
SA-A7-AcOX5.8	Fração obtida após procedimentos cromatográficos do extrato de acetato de etila (AcOEt) da cultura em meio arroz parbolizado da actinobactéria RLe 7
SA-A7-AcOX5.2	Fração obtida após procedimentos cromatográficos do extrato de acetato de etila (AcOEt) da cultura em meio arroz parbolizado da actinobactéria RLe 7.
SA-A7-AcOX5.7	Fração obtida após procedimentos cromatográficos do extrato de acetato de etila (AcOEt) da cultura em meio arroz parbolizado da actinobactéria RLe 7
SA-A7BU	Extrato de butanol (BuOH) da cultura em meio arroz parbolizado da actinobactéria RLe 7.
SA-A7-AcO	Extrato de acetato de etila (AcOEt) da cultura em meio arroz parbolizado da actinobactéria RLe 7.

L-A7F8.1BU5.8	Fração obtida após procedimentos cromatográficos do extrato de butanol (BuOH) da cultura mista em meio PDB da actinobactéria RLe7 e o fungo FLe 8.1.
L2-A7F8.1AcO	Extrato de acetato de etila (AcOEt) da cultura mista em meio PDB (Potato Dextrose Broth) da actinobactéria RLe 7 e o fungo FLe 8.1.
SA-F25BUA	Extrato de acetato de etila (AcOEt) do fungo FLe 8.1 de 25 dias de cultura em meio arroz parbolizado.
L-A7F8.1AcO3.6	Fração obtida após procedimentos cromatográficos do extrato de butanol (BuOH) da cultura mista em meio PDB da actinobactéria RLe7 e o fungo FLe 8.1

ANEXO B: Extratos e frações provenientes de plantas, testados frente a enzima superóxido dismutase de *Trypanosoma brucei*

CÓDIGO	LABORATÓRIO
26 – <i>Zanthoxylum stelligerum</i> (extrato metanólico à quente-raiz)	LAPEMM-UFBA
27 - <i>Zanthoxylum stelligerum</i> (extrato metanólico-raiz)	LAPEMM - UFBA
28 - <i>Spiranthera odorotíssima</i> (extrato metanólico-raiz)	LAPEMM - UFBA
29 A - <i>Zanthoxylum tingoassuiba</i> (extrato metanólico–folhas)	LAPEMM - UFBA
31- <i>Metrodorea mollis</i> (extrato hexânico-caule)	LAPEMM - UFBA
32- <i>Metrodorea mollis</i> (extrato metanólico- casca caule)	LAPEMM - UFBA
33- <i>Metrodorea mollis</i> (extrato metanólico extraído com ácido clorídrico 2%- raiz)	LAPEMM - UFBA
34- <i>Metrodorea mollis</i> (extrato metanólico – Caule – fração 8 da coluna de filtração - total de 10 frações)	LAPEMM - UFBA
35- <i>Metrodorea mollis</i> (extrato metanólico – Caule)	LAPEMM - UFBA
36- <i>Metrodorea mollis</i> (extrato metanólico – Raiz)	LAPEMM - UFBA
37- Código AFM (extrato metanólico – Folha)	LAPEMM - UFBA
38- Código AFM (extrato metanólico – Folha)	LAPEMM - UFBA
39- Código AFH (extrato hexânico – Folha)	LAPEMM - UFBA

40- Código ACH (extrato hexânico – Caule)	LAPEMM - UFBA
41- Código ARM (extrato metanólico – Raiz)	LAPEMM - UFBA
42- Código ACM (extrato metanólico – Caule)	LAPEMM - UFBA
43- Código ARH (extrato hexânico – Raiz)	LAPEMM - UFBA
TPEA FL - <i>Tibouchina pereirae</i> (extrato aquoso folhas)	Laboratório de Fitoquímica - UEFS
ON UEFS A - <i>Ocotea nonata</i> (extrato acetato)	Laboratório de Fitoquímica - UEFS
ON UEFS AQ	Laboratório de Fitoquímica - UEFS
ON UEFS B – <i>Ocotea nonata</i> (extrato butanólico)	Laboratório de Fitoquímica - UEFS
ON UEFS H - <i>Ocotea nonata</i> (extrato hexanico)	Laboratório de Fitoquímica - UEFS
ONF UEFS 1214	Laboratório de Fitoquímica - UEFS
FUEFS 1	Laboratório de Fitoquímica - UEFS
FUEFS 2	Laboratório de Fitoquímica - UEFS
FUEFS 4	Laboratório de Fitoquímica - UEFS
FUEFS 5	Laboratório de Fitoquímica - UEFS
FUEFS 6	Laboratório de Fitoquímica - UEFS
ER2 DCM	Laboratório de Fitoquímica - UEFS
CE H	Laboratório de Fitoquímica - UEFS
CEA (FL)	Laboratório de Fitoquímica - UEFS