



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Estudo comparativo de raízes de *Jatropha mollissima* sertão/praias,
das castanhas de caju (*Anacardium occidentale* L.) de diferentes
plantios e estudo *in vitro* e *in silico* de compostos com potencial de
inibição da enzima conversora de angiotensina**

Samuel José Mendes dos Santos

FORTALEZA - CE

2014

Samuel José Mendes dos Santos

**Estudo comparativo de raízes de *Jatropha mollissima* sertão/praias,
das castanhas de caju (*Anacardium occidentale* L.) de diferentes
plantios e estudo *in vitro* e *in silico* de compostos com potencial de
inibição da enzima conversora de angiotensina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan.


FORTALEZA - CE

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- S233e Santos, Samuel José Mendes dos.
Estudo comparativo de raízes de *Jatropha mollissima* sertão/praias, das castanhas de caju (*Anacardium occidentale* L.) de diferentes plantios e estudo *in vitro* e *in silico* de compostos com potencial de inibição da enzima conversora de angiotensina. / Samuel José Mendes dos Santos. – 2014.
57 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Mestrado (Dissertação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Mestrado em Química, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Química.
Orientação: Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan.
1. Castanha. 2. Angiotensina. 3. Hipertensão arterial. 4. Inibidores da ECA. I. Título.


Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.



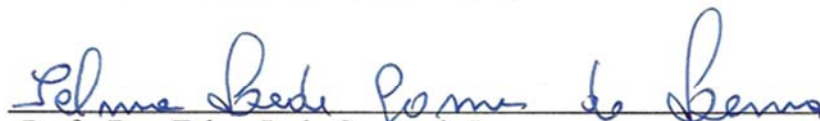
Samuel José Mendes dos Santos

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 31/01/2014.

EXAMINADORES:



Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan
Universidade Federal do Ceará – UFC



Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará – UFC



Dr. Edy Sousa de Brito
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA

AGRADECIMENTOS

- ✓ À professora Dra. Maria Teresa Salles Trevisan, pela orientação, confiança, compreensão e apoio no trabalho realizado, que fortaleceu meu espírito nos momentos difíceis, bem como, pelas palavras amigas nas horas mais necessárias.
- ✓ Aos amigos com os quais tive valiosas discussões sobre química medicinal e computacional, assim como ensinamentos na aparelhagem de HPLC e ensaio enzimático.
- ✓ À Universidade Federal do Ceará, aos professores, funcionários e alunos, pela colaboração e excelente suporte para a execução deste trabalho.
- ✓ À FUNCAP, pela bolsa de mestrado e ajuda financeira.
- ✓ Aos familiares, que estiveram sempre ao lado, incentivando na realização desse sonho.
- ✓ A Célia, secretária da pós-graduação, pela ajuda, conselhos e incentivos durante a realização do mestrado.
- ✓ E aos demais, que, de alguma forma, contribuíram na elaboração desta dissertação.

“Nossa maior fraqueza está em desistir. O
caminho mais certo de vencer é tentar
mais uma vez.”

Thomas Edison

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FLUXOGRAMAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
CAPITULO I – INTRODUÇÃO	
1.1. Hipertensão arterial	1
1.2. O Caju e seus principais componentes fenólicos: os ácidos anacárdicos	3
1.3. Análise <i>in silico</i> dos parâmetros: absorção, distribuição, metabolismo e eliminação (ADME)	6
1.4. O Gênero <i>Jatropha</i>	9
1.5. <i>Jatropha mollissima</i> (Pohl) Baill	10
CAPÍTULO II – OBJETIVOS	
2. Objetivos	12
CAPÍTULO III - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	
3.1. Reagentes	13
3.2. Casca das castanha de caju e isolamento dos antioxidantes fenólicos do LCC	13
3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE	17
3.4. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CG -EM)	17
3.5. Espectrometria de Ionização por Eletropulverização Acoplada à Espectrometria de Massa (ESI-ES)	18
3.6. Ensaio enzimático de convenção da angiotensina I	18
3.7. Ensaio <i>in silico</i>	20
3.8. <i>Jatropha mollissima</i>	21
CAPÍTULO IV- RESULTADOS E DISCUSÃO	
4.1. Identificação dos ácidos anacárdicos em LCC	22

4.2. A inibição da ECA pelos ácidos anacárdico	25
4.3. Estudo <i>in silico</i> dos componentes fenólicos do caju	31
4.4. Estudo comparativo do LCC extraído de diferentes plantios de caju	34
4.5. Estudo comparativo dos possíveis produtos da <i>Jatropha mollissima</i> sertão/praiá	36
CAPÍTULO V – CONCLUSÃO	
5. Conclusão	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Principais componentes do sistema renina-angiotensina.	1
Figura 2. A) Caju; B) Castanha; e C) LCC.	3
Figura 3. Reação de descarboxilação dos ácidos anacárdicos.	4
Figura 4. Extrator de Soxhlet.	4
Figura 5. Sistema Molinspiration.	8
Figura 6. <i>Jatropha mollissima</i> (Pohl) Baill. A. ramo florido; B. botão floral; C. flor masculina isolada; D. detalhe dos estames isolados; E. flor feminina; F. fruto tricoça; G. bráctea isolada; H. sépala isolada.	11
Figura 7. Fotografias da espécie <i>Jatropha mollissima</i> .	11
Figura 8. Caju, pedúnculo e fruto (castanha).	13
Figura 9. Derivatização dos ácidos anacárdicos com BSTFA.	17
Figura 10. Cromatogramas das frações de alquilfenóis obtidos a partir do Líquido da casca da castanha de caju. Os picos I-IX são: ácido 1-anacárdico, ácido 2-anacárdico, ácido 3-anacárdico, ácido 4-anacárdico, 1-cardanol, 2-cardanol, 3-cardanol, 1-cardol e 2-cardol, respectivamente.	22
Figura 11. Estruturas dos alquilfenóis detectados no LCC: I = ácido 1-anacárdico, II = ácido 2-anacárdico, III = ácido 3-anacárdico, IV = ácido 4-anacárdico, V = 1-cardanol, VI = 2-cardanol, VII = 3-cardanol, VIII = 1-cardol e IX = 2-cardol.	24
Figura 12. Inibição por diferentes concentrações de ácidos anacárdicos sobre a atividade da ECA.	26
Figura 13. Estrutura de outros compostos fenólicos analisados como inibidores da ECA.	27
Figura 14 – Cromatogramas de CLAE da <i>Jatropha mollissima</i> , região Praia (Beberibe), realizados em três diferentes comprimento de onda, cromatografia de fase reversa isocrática e fase móvel metanol-ácido acético 5% (5:95). A) comprimento de onda de 340,4; B) comprimento de onda de 257,4 e C) comprimento de onda de 278,4.	37
Figura 15 - Cromatogramas de CLAE da <i>Jatropha mollissima</i> , região Sertão, realizados em três diferentes comprimento de onda, cromatografia de fase reversa isocrática e fase móvel metanol-ácido acético 5% (5:95). A) comprimento de onda de 340,4; B) comprimento de onda de 257,4 e C) comprimento de onda de 278,4.	38

Figura 16 - Cromatogramas de CLAE da *Jatropha mollissima*, comprimento de onda 278,4, cromatografia de fase reversa isocrática e fase móvel metanol-ácido acético 5% (5:95). A) *Jatropha mollissima* região praia B) *Jatropha mollissima* região sertão. **39**

Figura 17 - Cromatogramas de CLAE da *Jatropha mollissima*, comprimento de onda 257,4, cromatografia de fase reversa isocrática e fase móvel metanol-ácido acético 5% (5:95). A) *Jatropha mollissima* região praia B) *Jatropha mollissima* região sertão. **40**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos e suas nomenclaturas SMILE fornecido pelo <i>site</i> Molinspiration.	20
Tabela 2. Dados ESI-ES para ácidos anacárdicos individuais, purificados por CLAE semipreparativa.	23
Tabela 3. Dados de CG-EM para ácidos anacárdicos individuais purificados do LCC por CLAE semipreparativa.	23
Tabela 4. Inibição da enzima conversora de angiotensina I (ECA) pelos alquilfenóis e ácidos anacárdicos purificados por CLAE semipreparativa, juntamente com os dados de referência selecionados e os dados publicados.	28
Tabela 5. Log P encontrado nos sistemas Marvin, Molinspiration e vcclap, respectivamente.	31
Tabela 6. Estudo <i>in silico</i> dos compostos fenólicos encontrados na casca da castanha de caju, do Captopril e de outros compostos fenólicos, resultados obtidos pelo sistema Molinspiration.	33
Tabela 7. Análise das cinco amostras de LCC extraídas das cascas de castanha dos cajueiros anões.	34
Tabela 8. Análise das cinco amostras de LCC em gramas de ácido anacárdico por quilograma de LCC.	35
Tabela 9. Análise das cinco amostras de LCC e quantidade de ácido anacárdico e cardanois.	35

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 – Extração do LCC a partir da casca da castanha de caju.	14
Fluxograma 2 – Isolamento dos antioxidantes fenólicos do LCC.	16
Fluxograma 3 – Ensaio enzimático para inibição da ECA.	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME	Administração, metabolismo e excreção
Ang	Angiotensina
BSTFA	Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CG-EM	Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ESI-ES	Espectrometria de Ionização por Eletropulverização-Espectrometria de Massa
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HHL	N-hipuril-L-histidil-L-leucina
LCC	Líquido da casca da castanha de caju
SNC	Sistema nervoso central
SRA	Sistema Renina Angiotensina
TFA	Ácido Trifluoroacético
TMS	Trimetilsilano
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano-ácido clorídrico
UV-VIS	Ultravioleta-visível

RESUMO

A hipertensão arterial é uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo e dentre seus principais fatores causadores destacam-se uma dieta pouco saudável, falta de exercícios físicos e obesidade. A inibição da enzima conversora da angiotensina (ECA) foi identificada como um alvo terapêutico para controlar a pressão arterial elevada, pois o octapeptídeo angiotensina II, que possui atividade vasoconstritora, terá sua atividade minimizada nos vasos sanguíneos. Compostos encontrados na casca da castanha de caju foram separados e identificados e seu potencial de inibição da ECA foi estudado. Observou-se que os ácidos anacárdicos possuem essa atividade, sendo o ácido 3-anacárdico o maior inibidor entre os compostos fenólicos extraídos da casca da castanha de caju. Estudos *in silico* são realizados atualmente para prever a biodisponibilidade oral e a capacidade de penetração no sistema nervoso central (SNC) de uma droga. Buscou-se realizar este estudo para verificar essas propriedades nos ácidos anacárdico, assim como também, comparar com outros inibidores da ECA. Observou-se que os ácidos anacárdicos violam somente uma das cinco regras de Lipinski, e como a regra estabelece que pelo menos três destes requisitos devam ser satisfeitos, concluiu-se que os ácidos anacárdicos apresentam uma boa biodisponibilidade oral e penetração no SNC. Desse modo, a busca por uma espécie de clone que forneça uma maior massa de LCC por extração assim como uma maior quantidade de ácidos anacárdicos por quilograma de LCC se torna importante. A partir disso, verificou-se entre cinco cultivos de cajueiros anões (CCP-76, CCP-09, Embrapa-110, Embrapa-119 e Embrapa-109) o que poderia oferecer um LCC com maior quantidade de ácidos anacárdicos. O cajueiro identificado como CCP-76 forneceu uma maior quantidade de LCC com cerca de 30 gramas para cada 50 gramas de casca de castanha utilizada para extração e se obteve uma concentração de 185 gramas de ácidos anacárdico por quilograma de LCC, sendo o melhor para extração dos alquilfenóis, entre os estudados. Em paralelo a esses estudos, procurou-se verificar a diferença de compostos existentes na raiz de *Jatropha mollissima* cultivada em regiões diferentes e verificou-se que o estresse do sertão cearense aumenta a síntese de substâncias para a sua sobrevivência, sendo a raiz a região da planta escolhida por ser rica em metabolitos secundários. Assim, essas plantas podem ser utilizadas na medicina preventiva, porém, estudos mais profundos devem ser realizados.

Palavras Chaves: *Jatropha mollissima*, *Anacardium occidentale*, castanha, enzima, angiotensina, inibição, *in silico*, *in vitro*.

ABSTRACT

Hypertension is a disease that affects millions of people around the world and among its main causative factors include an unhealthy diet, lack of physical exercise and obesity. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) has been identified as a therapeutic target for controlling high blood pressure because the octapeptide angiotensin II, which has vasoconstrictor activity, have minimized their activity in blood vessels. Compounds found in the bark of cashew nuts were separated and identified, and their potential for ACE inhibition was studied. It was observed that the anacardic acids possess this activity, being the 3-anacardic acid inhibitor best among the largest phenolic compounds extracted from the bark of cashews. In silico studies are currently performed to predict the bioavailability and the ability to penetrate the central nervous system (CNS) of a drug. We attempted to conduct this study to verify these properties in anacardic acids, as well as compare with other ACE inhibitors. It was observed that the anacardic acids infringe only one of the five rules of Lipinski, and as the rule states that at least three of these requirements must be satisfied, it is concluded that the anacardic acids exhibit good oral bioavailability and CNS penetration. Thus, the search for a cashew that provides a greater mass of LCC per extraction well as a greater amount of anacardic acid per kilogram of LCC becomes important. From this, it was found among five crops of dwarf cashew (CCP-76, CCP- 09, Embrapa-110, Embrapa-119 and Embrapa-109) which could offer a LCC with greater amount of anacardic acids. The cashew labeled CCP-76 gave a higher amount of LCC to about 30 grams per 50 grams of chestnut bark used for extraction and obtained a concentration of 185 grams per kilogram of anacardic acids LCC to be the best extraction of alkylphenols, among studied. In parallel to these studies, we sought to investigate differences existing compounds in *Jatropha mollissima* grown in different regions, and it was found that the stress of Ceará hinterlands increases the synthesis of substances for their survival. Thus, these plants can be used in preventive medicine, however, further study should be conducted.

Key words: *Jatropha mollissima*, *Anacardium occidentale*, chestnut, enzyme inhibitors, inhibition, in silico, *in vitro*.

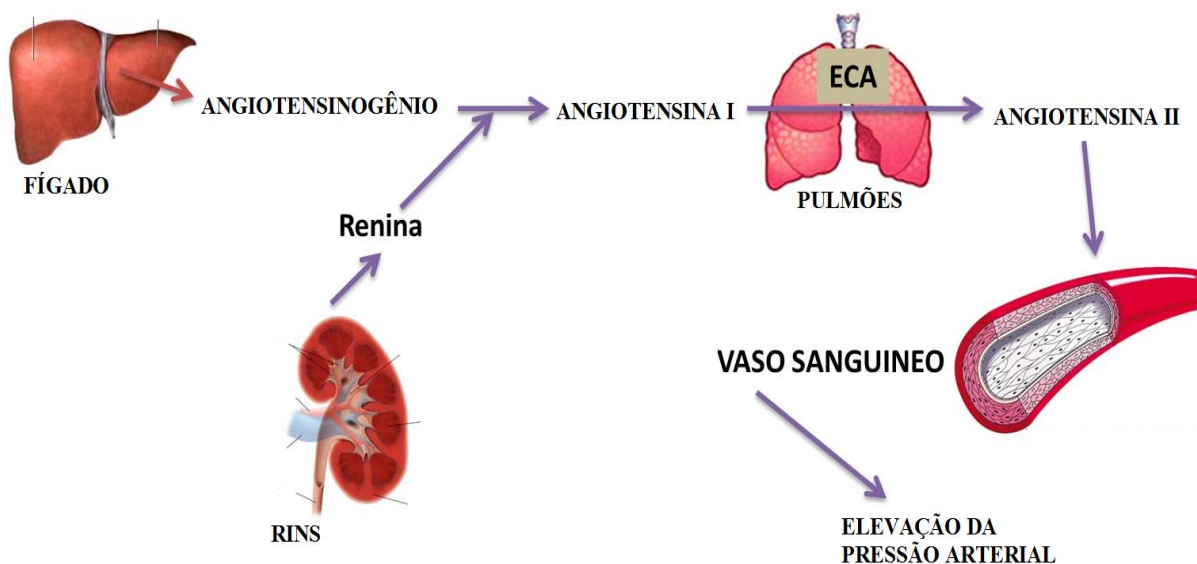
1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial sistêmica (HAS), também conhecida como pressão alta, é uma síndrome ocasionada por inúmeros fatores como uma dieta pouco saudável, falta de exercícios físicos, sedentarismo, fumo, etilismo e obesidade.¹

O sistema renina-angiotensina (SRA) circulante é um sistema endócrino que promove a produção de angiotensina (Ang) II, um octapeptídeo com atividade vasoconstritora, que fisiologicamente aumenta a pressão arterial. A angiotensina I é gerada pela ação da renina, uma enzima produzida pelos rins, sobre o angiotensinogênio plasmático, produzido pelo fígado, formando o decapeptídeo Angiotensina I, que é clivado pela enzima conversora de Angiotensina (ECA), presente em abundância no endotélio pulmonar, liberando a Angiotensina II um octapeptídeo. A figura 1 mostra o sistema renina-angiotensina com os componentes descritos acima.¹

Figura 1. Principais componentes do sistema renina-angiotensina.



A inibição da enzima conversora de angiotensina foi identificada como um alvo terapêutico para controlar a pressão arterial elevada. A angiotensina II é um composto biologicamente ativo do sistema renina-angiotensina, constituindo-se em um importante regulador da pressão arterial e da homeostase cardiovascular.¹

A angiotensina II está relacionada com doenças cardiovasculares e com o aumento da inflamação vascular. A administração de inibidores da ECA resulta num aumento das enzimas antioxidantes e diminuição dos níveis de peroxidação lipídica, enquanto que a angiotensina II eleva o estresse oxidativo com aumento dos níveis de peroxidação lipídica e uma diminuição das enzimas antioxidantes.² Desse modo, inibidores da ECA têm sido utilizados como anti-hipertensivos durante os últimos 20 anos.³

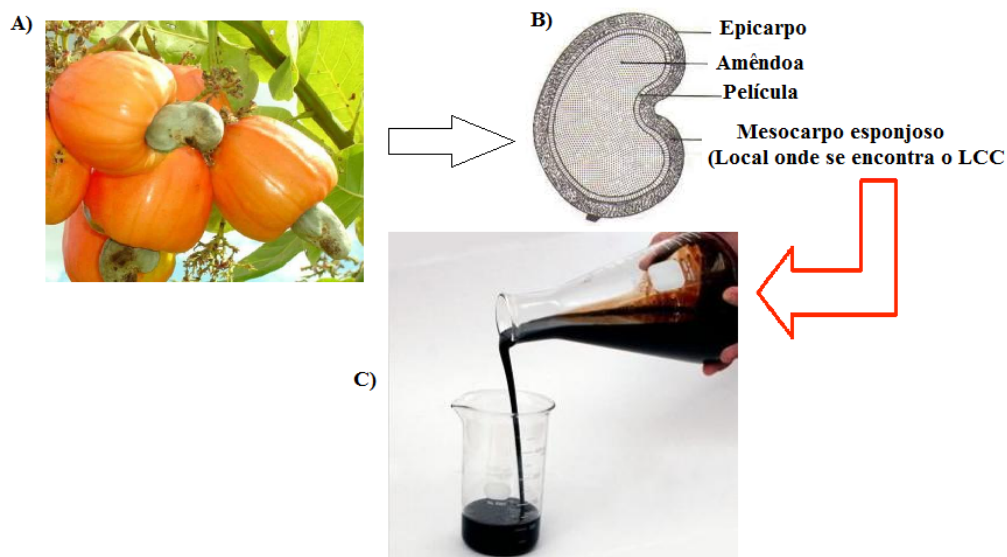
Este trabalho buscou verificar o potencial de inibição da ECA pelos ácidos anacárdicos, pois os mesmos são encontrados nos alimentos consumidos pela população mundial diariamente, e o incentivo a pesquisas que busquem demonstrar a atividade de compostos como os ácidos anacárdicos produz impactos sociais e econômicos, pois os custos com medicamentos inibidores da ECA são altíssimos e novos produtos que possam baratear o mercado de medicamentos são de extrema importância.

1.2. O Caju e seus principais componentes fenólicos: os ácidos anacárdicos

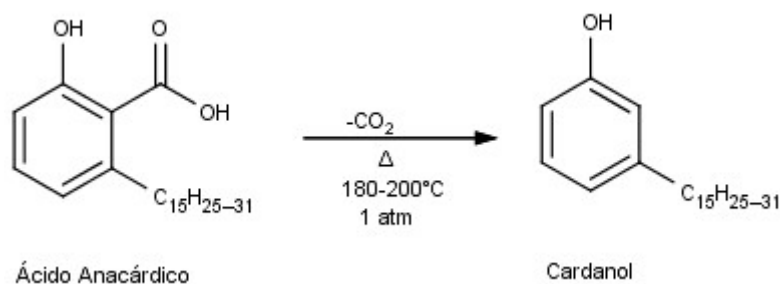
Anacardium occidentale Linn., um membro da família *Anacardiaceae*, é uma árvore tropical nativa do Brasil que é amplamente cultivada na Índia e leste da África. A Índia é o maior produtor de castanha de caju, sendo responsável por quase 50% das exportações mundiais. O Líquido da casca da castanha de caju (LCC) é um importante subproduto agrícola extraído da casca da castanha.⁴ O potencial de disponibilidade anual deste material é enorme e responde por cerca de 32% da casca. As atividades biológicas dos componentes do LCC, especialmente os ácidos anacárdicos, têm atraído uma atenção considerável em diversas áreas.^{4, 5, 6, 7}

O líquido da casca da castanha do caju (LCC) está localizado no mesocarpo esponjoso da castanha que é obtido como um subproduto na indústria do caju, durante o processo de fritura da castanha para a extração da amêndoa. Ele possui diversas utilidades na indústria, podendo ser usado na produção de tintas, combustíveis, resinas, inseticidas etc. É caracterizado como um líquido viscoso, castanho escuro e, à medida que ocorre a exposição ao ar, sua cor intensifica-se devido à formação de produtos de oxidação. (Figura 2)

Figura 2. A) Caju; B) Castanha; e C) LCC.



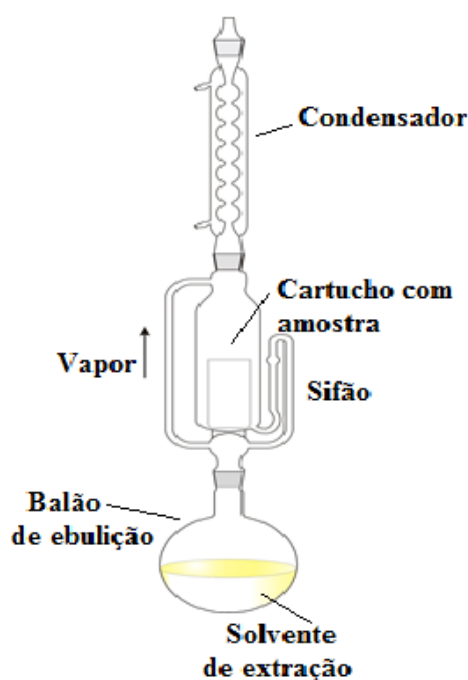
Muitos processos de extração do LCC envolvem altas temperaturas, isso promove a ausência dos ácidos anacárdicos nesse óleo, pois o aquecimento ocasiona a descarboxilação do ácido, formando o cardanol. (Figura 3)

Figura 3. Reação de descarboxilação dos ácidos anacárdicos.

Sendo assim, é necessária uma extração a baixa temperatura para que essa descarboxilação não ocorra. Isso é obtido utilizando o Soxhlet.

O Soxhlet é um extrator de laboratório inventado em 1879 por Franz Von Soxhlet. Ele foi primeiramente projetado para a extração de lipídio em material sólido. No entanto, a referida vidraria não se limita à extração de lipídios. Geralmente, uma extração com Soxhlet é feita quando o composto desejado tem uma limitada solubilidade em um solvente e as impurezas são insolúveis.

Normalmente, o material sólido contendo o composto é colocado dentro de um cartucho feito de papel de filtro, que é carregado para a câmara principal do extrator de Soxhlet. O solvente a ser utilizado fica num balão de destilação e o extrator é acoplado ao balão e a um condensador (figura 4).

Figura 4. Extrator de Soxhlet.

O solvente é aquecido e o vapor passa pelo braço do Soxhlet, em seguida, sofre condensação e o líquido passa pela amostra, promovendo a extração de compostos químicos. Com o passar do tempo, a câmara que contém o material sólido é lentamente cheia com solvente e alguns dos compostos desejados serão dissolvidos no solvente aquecido. Quando a câmara do Soxhlet está cheia, é esvaziada automaticamente por um sifão lateral, permitindo a volta do solvente para o balão. Esse ciclo é realizado repetidas vezes, ao longo de horas ou dias.

Durante cada ciclo, uma parte dos compostos dissolve-se no solvente. Depois de vários ciclos o composto desejado é concentrado no balão de destilação. A vantagem desse sistema é que apenas um tipo de solvente é utilizado e reciclado durante todo o processo de extração a baixas temperaturas.

Após a extração, o solvente é removido, tipicamente por meio de um evaporador rotativo, obtendo-se o composto extraído. A porção insolúvel do sólido extraído permanece no cartucho e pode ser descartado ou reutilizado para uma nova extração com Soxhlet, utilizando o mesmo ou outro solvente.

Por ser um método simples, barato e realizado a baixas temperaturas a extração com Soxhlet foi a escolhida para extrair o LCC das castanhas de caju, diminuída a descarboxilação dos ácidos anacárdicos, assim como, para a extração de compostos da *Jatropha mollissima*, também estudada.

1.3. Análise *in silico* dos parâmetros: absorção, distribuição, metabolismo e eliminação (ADME)

Atualmente, estudos *in silico* são realizados em etapas preliminares no processo de desenvolvimento de fármacos, a fim de economizar tempo e delinear melhor o estudo de novos compostos. Os processos farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação (ADME) são de grande importância na escolha de um fármaco, pois definem a biodisponibilidade da substância no organismo. Assim, para um candidato a fármaco atingir eficácia terapêutica, deve possuir uma potência elevada e seletividade para interagir com o alvo biológico, assim como uma boa biodisponibilidade.⁸

Uma boa biodisponibilidade oral é um dos atributos mais desejáveis de um novo fármaco. A predição desse fato envolve fatores biológicos e físico-químicos como dissolução no trato gastrointestinal, permeabilidade pelas membranas intestinais e metabolismo de primeira passagem intestinal e hepática.⁹ Lipinski foi um dos primeiros a definir um conjunto de parâmetros capazes de identificar compostos com problemas de absorção e permeabilidade sendo predita essas propriedades como “regra dos cinco de Lipinski”.¹⁰

Lipinski concluiu, através de estudos¹⁰ com um banco de dados de aproximadamente 2500 fármacos comerciais oralmente ativos, que uma boa absorção e permeação são mais comuns quando o Log P calculado for menor ou igual a 5; o peso molecular, menor ou igual a 500 Da; o número de grupos doadores de ligação de hidrogênio, menor ou igual a 5; e o número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio, menor ou igual a 10.¹⁰ Essa regra recebeu a denominação de “Regra dos cinco”, pois todos os valores se limitam a números iguais ou múltiplos de 5.

A lipofilia é uma das propriedades físico-químicas que mais influenciam a capacidade de uma molécula se movimentar através de compartimentos biológicos.¹¹ O Log P está relacionado com a lipofilia da molécula. Assim, o coeficiente de partição octano/água (Log P) permite obter uma estimativa da absorção dos fármacos no organismo. Um fármaco que atravesse eficazmente a membrana celular deve ter uma boa relação lipofílica e hidrofílica, pois moléculas altamente lipofílicas têm tendência a ficar retidas nos tecidos gordos, ligam-se mais fortemente às proteínas plasmáticas, o que diminui sua eficácia na distribuição no organismo; as mais hidrofílicas podem não ter a capacidade de atravessar membranas, sendo mais suscetíveis a serem rapidamente excretadas sem que ocorra a ação farmacológica pretendida.¹¹ Além do Log P, compostos com grande massa molar (MW) e muitas ligações

doadoras e receptoras de hidrogênio tendem a ter dificuldade em atravessar as membranas biológica, diminuindo a biodisponibilidade da droga no organismo.¹⁰

Como pretende-se que o composto seja administrado via oral, ele deve ser capaz de atravessar o trato gastrointestinal e atravessar a barreira hematoencefálica para atuar no SNC. Assim, os compostos analisados foram avaliados de acordo com a “Regra dos Cinco” de Lipinski modificada para penetração no SNC, que estabelece: peso molecular menor ou igual a 400 daltons (Da), coeficiente de partição octano/água calculado (cLog P) menor ou igual a 5, número de aceptores de ligação de hidrogênio (nON) menor ou igual a 7 e número de grupos doadores de ligação de hidrogênio (nOHNH) menor ou igual a 3.¹² A regra estabelece que pelo menos três destes requisitos devem ser satisfeitos para que o composto apresente uma boa biodisponibilidade oral e penetração no SNC.


Além dos quatro fatores analisado por Lipinski, existem outros como o número de ligações rotativas (nrotb) e área de superfície polar (PSA). A contagem de ligações rotativas é amplamente utilizada para prever a biodisponibilidade, pois um número maior de dez ligações rotativas em um composto químico é correlacionado com a diminuição da disponibilidade oral em ratos, isso está relacionado à afinidade do ligante, pois para cada duas ligações rotativas há uma diminuição de 0,5 kcal. Um valor de PSA menor que 60 tende a identificar compostos com ação no SNC, isto está relacionado a esses compostos conseguirem ultrapassar a barreira hematoencefálica.¹³

Assim, além dos 4 fatores da “Regra dos cinco” de Lipinski, foram calculados a área superficial polar e o número de ligações rotativas, parâmetros também relacionados à capacidade do fármaco de permear as membranas biológicas, que devem ser menores que 90Å e 10, respectivamente.¹²

Atualmente, existem diversos programas, *sites* e sistemas para se calcular os parâmetros citados anteriormente, e um dos sistemas de informática, gratuito e muito utilizado, é o Molinspiration que oferece uma ampla gama de ferramentas e realiza manipulação e processamento de molécula, incluindo nomenclatura SMILES e conversão SDfile, gerando também fragmentação de moléculas, cálculo de várias propriedades moleculares, modelagem molecular e desenho de drogas. É utilizado como banco de dados, fornecendo subestrutura e similaridade com outras moléculas em pesquisas. Este *software* fornece uma triagem virtual baseado em fragmento, previsão da bioatividade e visualização de dados. As Ferramentas Molinspiration são escritas em Java, portanto, pode ser usado praticamente em qualquer plataforma de computador e oferece serviços gratuitos *on-line* para o cálculo de propriedades

moleculares importantes como o Log P, área de superfície polar, o número de doadores de ligação de hidrogênio e de receptores, como também, a previsão da bioatividade para os alvos ligantes de GPCR, inibidores da quinase, moduladores de canais iônicos e receptores nucleares. Atualmente, esse *software* Molinspiration é usado por centenas de especialistas para produzir resultados científicos de alta qualidade. (Figura 5)

Figura 5. Sistema Molinspiration.




Molinspiration Product and Services

- Calculation of Molecular Properties and Prediction of Bioactivity
- Galaxy 3D Structure Generator
- Molecular Database - Substructure and Similarity Search
- Molinspiration Publications
- Molinspiration FAQ
- WebME Ajax Molecule Editor
- JME Molecular Editor
- About Molinspiration

Cheminformatics on the Web

Molinspiration now also on Touch Devices!




Molinspiration interactive web services are available from now not only on desktop computers, but also on touch devices including iPhone, iPad and Android phones and tablets. Molecule structure input to our [property calculation and bioactivity prediction services](#) is powered by the [JSME molecule editor](#), written in JavaScript. Also our [Galaxy 3D molecule visualizer](#) that allows interactive display of molecules in various modes and visualization of surface molecule lipophilicity potential and polar surface area is written in JavaScript.

Molinspiration Cheminformatics Software

Molinspiration offers **broad range of cheminformatics software tools** supporting molecule manipulation and processing, including SMILES and SDfile conversion, normalization of molecules, generation of tautomers, molecule fragmentation, calculation of various molecular properties needed in QSAR, molecular modelling and drug design, high quality molecule depiction, molecular database tools supporting substructure and similarity searches. Our products support also fragment-based virtual screening, bioactivity prediction and data visualization. Molinspiration tools are written in Java, therefore can be used practically on any computer platform.

Free Web Tools for Cheminformatics Community



Molinspiration supports internet chemistry community by offering **free on-line services** for calculation of important molecular properties (logP, polar surface area, number of hydrogen bond donors and acceptors and others), as well as prediction of bioactivity score for the most important drug targets (GPCR ligands, kinase inhibitors, ion channel modulators, nuclear receptors). **Number of molecules processed every month is exceeding 80,000 in 2011!**

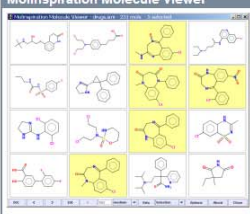
More than 600 Citations in Scientific Papers!

Molinspiration software is used by hundreds of cheminformatics experts in industry and academia to produce high-quality scientific results. Check the [list of publications](#) produced with help of our software.

JME Molecular Editor

Molinspiration is proud to offer a web home for [JME Editor](#), probably the most used structure inout tool on the Internet.

Molinspiration Molecule Viewer



[Molinspiration Molecule Viewer](#) allows visualization of collection of molecules encoded as SMILES or SDfile. SMILES is automatically transformed into molecule 2D representation by our [depiction engine](#). Display of associated data, selection of molecules, built-in substructure search and export of selected molecules is supported. Viewer is written in Java, therefore is platform independent and may be used on any computer where the Java runtime is installed. **Ask for free evaluation now!**

Latest News

[Galaxy 3D Molecule Viewer](#) in JavaScript replaced the old applet viewer. Feb 2013

[WebME 3.8.1](#) released, with several small improvements June 2012

Updated version of [Molinspiration depiction](#) providing among other improvements better layout

1.4. O Gênero *Jatropha*

O gênero *Jatropha* L. (*Euphorbiaceae*), pertence à subfamília *Crotonoideae* e é representada por 165 a 175 espécies, sendo encontrada em regiões tropicais da África e das Américas. A classificação do gênero se baseou em dados morfológicos, citológicos e na morfologia da epiderme. Esse grupo é de grande importância econômica, pois além de apresentarem várias espécies, as mesmas são referidas por usos medicinais e/ou ornamentais. Sua semente é de fácil propagação facilitando sua proliferação em vários locais.¹⁴ A *Jathopha* se caracteriza por apresentar diversas substâncias pertencente a vários grupos químicos, tais como flavonóides, ligninas, glicosídeos e cianógenos.¹⁵ Independentemente da espécie, os extratos de diferentes partes, tais como folhas, troncos, cascas e raízes da planta, têm sido usados na medicina popular por um longo tempo.

1.5. *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill

Jatropha mollissima é encontrada como arbusto e é conhecida popularmente como Pinhão-bravo e Pinhão-de-purga.¹⁵ O látex “in natura” é empregado na medicina popular como antiofídico e as sementes são comercializadas em feiras para extração do óleo fixo, que é utilizado como purgativo, para uso veterinário.¹⁶

A descrição morfológica da *Jatropha mollissima* foi realizada por Leal C.K.A. & Agram. de F. (2005) como: Arbusto com látex avermelhado, 2,0-3,0 m de comprimento; ramos cilíndricos, glabros, suculentos, estriados; estípulas caulinares, 2,0-4,0 mm, espinhosas, lignificadas, persistentes; estípulas nectaríferas foliares, filiformes, dissectas, glandular-estipitadas. Folhas peltadas; pecíolo 4,0-10,0 cm, cilíndrico, puberulento, tricomas simples unisseriados; lâmina 3,0-15,0 x 4,0-10,0 cm, orbicular, 5-palmatilobada, subcrassas; lobos elípticos, puberulentos, tricomas simples, unisseriados, denteados, glandular-estipitados, base aguda, ápice glandular-acuminado, broquidródroma. Brácteas, 4,0-3,0 x 2,0-1,5 mm, elípticas, nectaríferas, glandular-estipitadas. Pedúnculo cilíndrico, 4,0-2,0 cm, puberulento. Inflorescências em corimbos, terminais, bracteados; 2 flores pistiladas circundadas por 4 flores estaminadas; pedicelos 0,4-1,5 cm, cilíndricos, glabrescentes. Brácteas florais 0,2-1,0 cm, aciculares, puberulentas, glandular-estipitadas. Flores estaminadas e pistiladas pentâmeras, cálice 0,5-1,5 cm, sépalas soldadas no 1/4 basal, lobos ovalelípticos, estipitados, glabros; corola até 2,0 cm, pétalas livres, 0,5-1,0 cm, oblongas, face externa avermelhada e a interna amarela, glabra. Flores estaminadas marginais, estames-8, isodínamos, filetes 6,0 mm, concrecidos na base, cilíndricos, glabros; antera 0,3-0,5 mm, sagitada, rimosa. Flores pistiladas centrais, estiletes-3, conatos na base, colunares, ca. 2,0cm; estigmas-2, bífidos, ovário trilocular, uniovular; disco hipógino, glabro. Fruto capsular, 1,5-3,0 cm, trilocular, glauco, com deiscência explosiva; sementes-3, oblongas, 0,8-1,0 cm, glabras, carúncula evidente, ca. de 1/5 do tamanho da semente; testa lisa, brilhante, marrom-ferrugínea. (Figura 6)

Figura 6. *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. A. ramo florido; B. botão floral; C. flor masculina isolada; D. detalhe dos estames isolados; E. flor feminina; F. fruto tricoca; G. bráctea isolada; H. sépala isolada.¹⁶

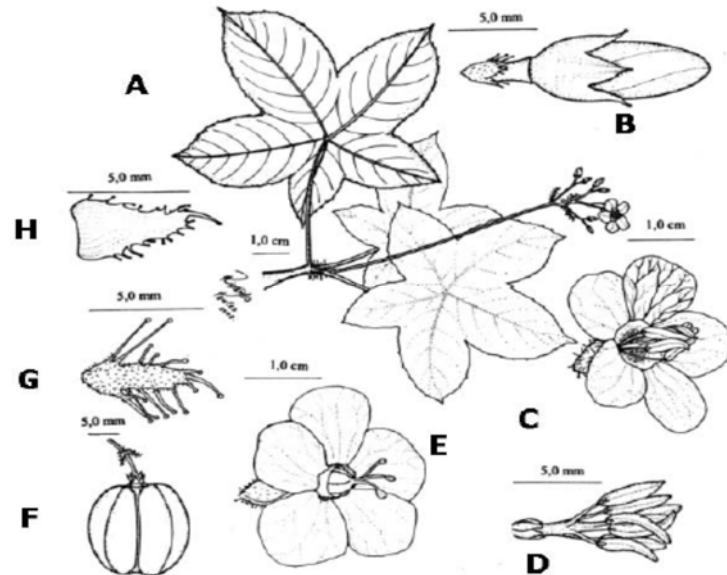
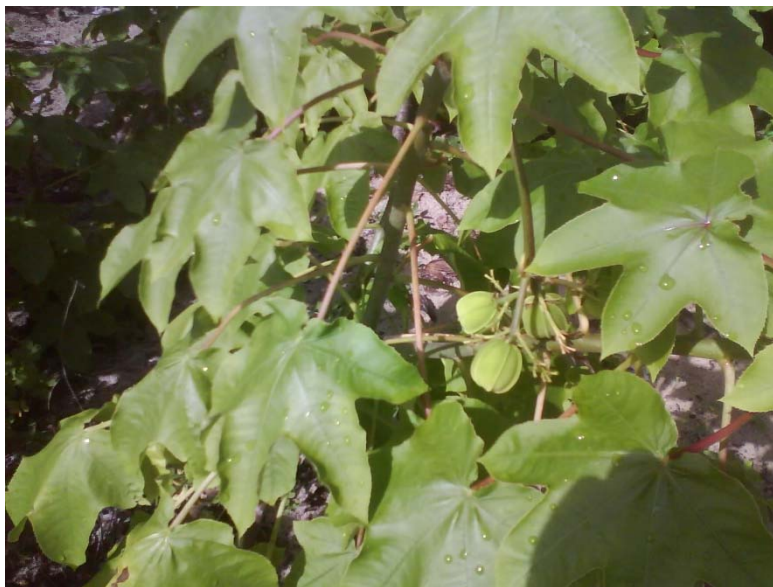


Figura 7. Fotografias da espécie *Jatropha mollissima*.



Fonte: wikipedia.org, fotografo Rapper Ouriço.

O presente trabalho consiste de análise dos alquilfenóis extraídos do LCC e avaliação do potencial de inibição da enzima conversora de angiotensina. Verificou-se também, entre cinco cajueiros anões, o que apresentava maior concentração de ácidos anacárdicos por quilograma de LCC extraído da casca da castanha. Realizou-se, também, uma análise da *Jatropha mollissima* das regiões da praia e do sertão cearense.

2. OBJETIVOS

- Avaliar entre cinco amostras de castanha de caju a que fornece a maior quantidade de LCC e de ácidos anacárdicos;
- Verificar o potencial de inibição da ECA pelos ácidos anacárdicos, cardanols e cardols e comparar com dados de outros compostos fenólicos;
- Realizar um estudo *in silico* e prever a biodisponibilidade dos ácidos anacárdicos; e
- Prever os fatores que influenciam a *Jatropha mollissima* de diferentes regiões a terem diferenças, qualitativas e quantitativas.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Nesta seção, serão apresentados os materiais, reagentes, soluções e técnicas experimentais usadas na elaboração deste trabalho.

3.1. Reagentes

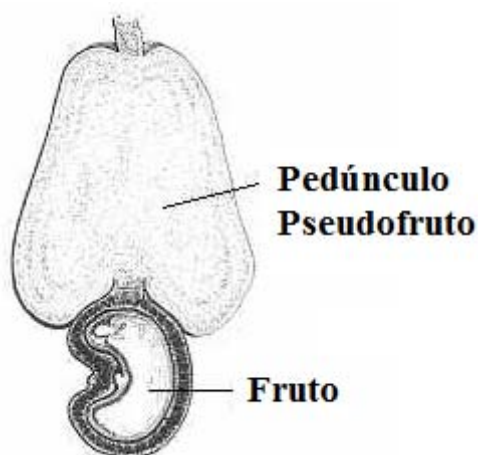
A Enzima conversora de angiotensina I (ECA), captopril, ácido trifluoroacético (TFA), HCl, N-hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL) foram obtidos da Sigma Aldrich; acetonitrila, ácido acético, DMSO e ácido salicílico, da Merck; enquanto o ácido elágico, maclurina, mangiferina, luteolina e taxifolina, da Extrasynthese.

Todas as soluções foram feitas em água bidestilada, DMSO ou metanol.

3.2. Casca da castanha de caju e isolamento dos antioxidantes fenólicos do LCC

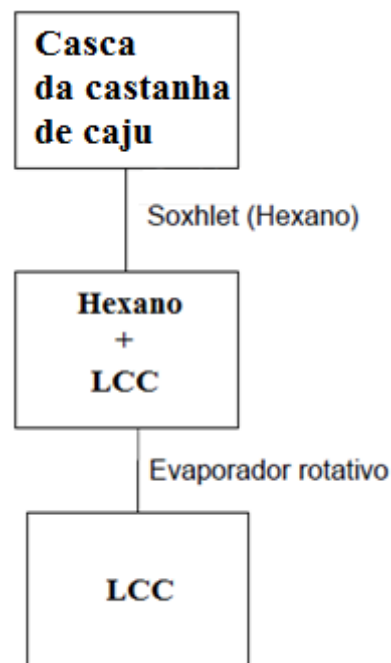
As cascas de castanhas de caju empregadas para a extração do LCC foram coletadas na Estação Experimental da Embrapa Agroindústria Tropical, localizada em Paraipaba, Ceará, Brasil. Os frutos pertenciam aos cultivos CCP-76, CCP-09, Embrapa-110, Embrapa-119 e Embrapa-109, cujos materiais genéticos são mantidos pelo banco de germoplasma da Embrapa. A sigla CCP é um código de especificação dos plantios utilizados para localização dos cajueiros na Estação experimental da Embrapa. Os pedúnculos foram separados manualmente das castanhas. (Figura 8)

Figura 8. Caju, pedúnculo e fruto (castanha).



O LCC foi extraído da casca da castanha de caju por Soxhlet. Cerca de 50 gramas da casca da castanha triturada ou inteira foram colocados em um cartucho para o extrator de Soxhlet, em seguida foram realizadas três extrações com hexano, cada extração teve duração de três horas. A mistura LCC e hexano foi concentrada em um evaporador rotativo a temperatura de 35°C. (Fluxograma 1)

Fluxograma 1 – Extração do LCC a partir da casca da castanha de caju.



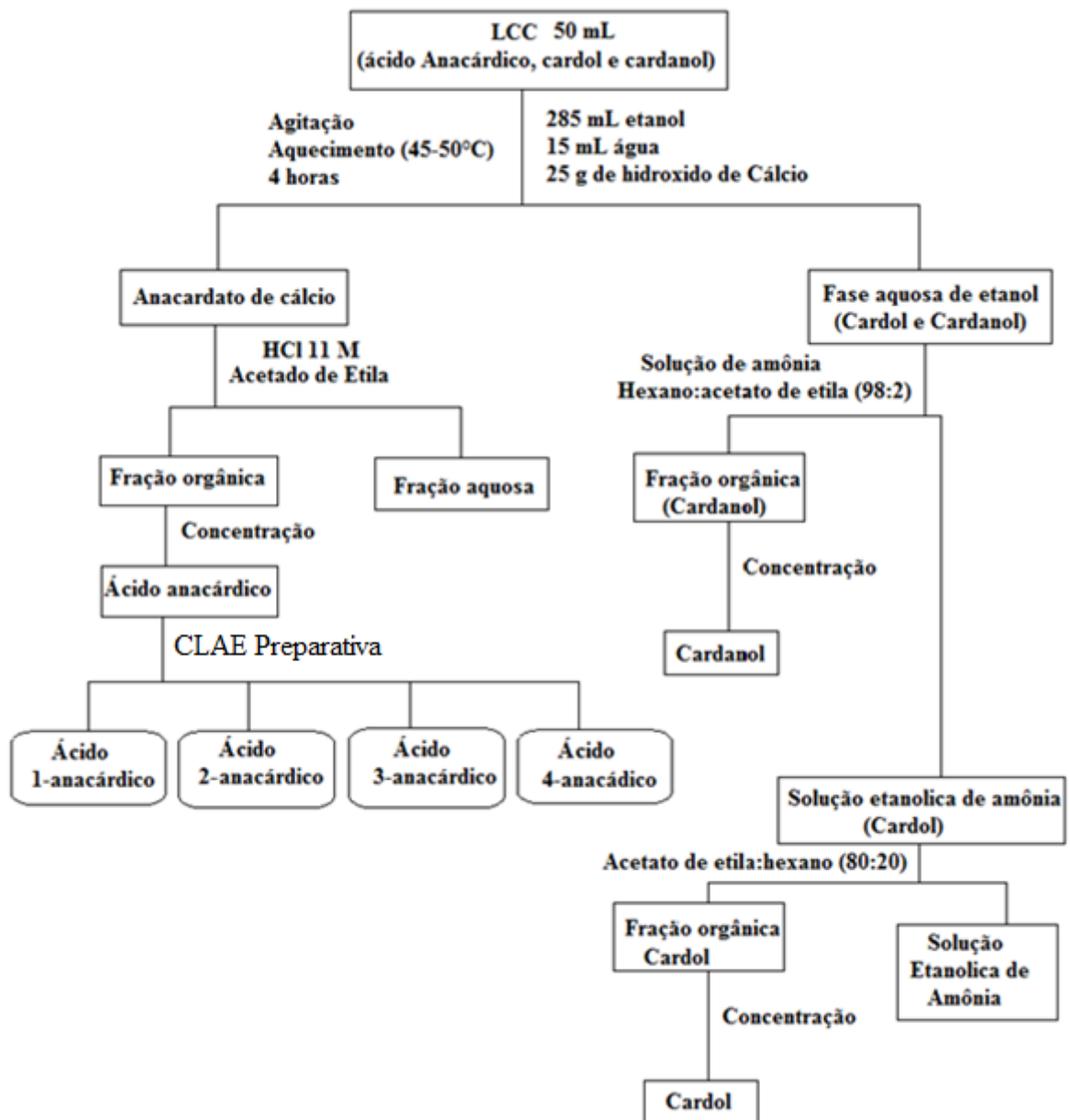
A purificação dos ácidos anacárdicos, cardanols e cardols do LCC foi realizada como descrito por Paramashivappa et al.¹⁷

Em um erlenmeyer de 1 litro, com agitação e aquecimento, foram colocados primeiramente 110 mL de óleo da casca da castanha de caju (LCC), 570 mL de etanol e 30 mL de água destilada. Em seguida adicionou-se lentamente 50 gramas de hidróxido de cálcio para precipitar os ácidos anacárdicos na forma de anacardato de cálcio. O sistema permaneceu sobre agitação e aquecimento (45 – 50°C) por 4 horas. Após esse tempo o ácido anacárdico precipitará na forma de anacardato de cálcio e o sobrenadante é constituído de cardanois e cardois. Logo após as 4 horas a solução foi filtrada com papel de filtro e o precipitado posto para secar em uma travessa. Após seco o precipitado é macerado de modo a ficar com os menores grãos possíveis.

Após a secagem do precipitado deve-se colocar em um erlenmeyer de 1 litro e adicionar 440 mL de água destilada e 60 mL de ácido clorídrico concentrado (11 M). Deixa agitando por 1 hora. Em seguida adicionar 150 mL de acetato de etila e continuar agitando por mais 15 minutos. Com ajuda de um funil de separação separar a água da solução. Após retirada a água, adicione 100 mL de água a solução e agite por mais 3 minutos, retirar novamente a água com ajuda de um funil de separação, repetir esse procedimento por mais 2 vezes para retirar possíveis impurezas. Ao final deve-se adicionar sulfato de sódio anidro, filtrar e rotoevaporar a solução para garantir que toda a água tenha saído. A separação dos ácidos anacárdicos se realizou através de CLAE preparativa com fase móvel constituída por acetonitrila-água-ácido acético (80-20-1) executado no modo isocrático a uma taxa de fluxo de 3,0 mL/minuto.

O sobrenadante foi tratado com solução de amônia e solução de hexano/acetato de etila (98:2) para se separar os componentes cardanols. Em seguida, utilizou-se uma solução de acetato de etila/hexano (80:20) para a extração de cardols. (Fluxograma 2)

Fluxograma 2 – Isolamento dos antioxidantes fenólicos do LCC.



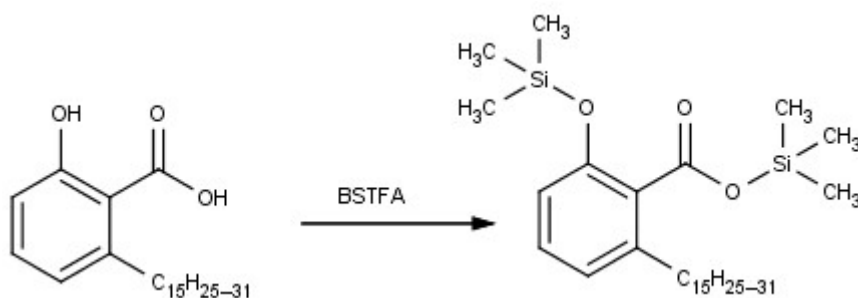
3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os experimentos analíticos de CLAE de fase reversa foram realizados num HPLC Agilent 1100 (HP 1101, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha). A separação cromatográfica de ácidos anacárdicos, cardanols e cardols foi feita utilizando uma coluna C18 de fase reversa (5 μm), coluna (250 x 4 mm I.D., Latek, Heidelberg, Alemanha). A fase móvel consistiu de acetonitrila – água – ácido acético (80:20:1) executado no modo isocrático a uma taxa de fluxo de 3,0 mL/minuto¹⁸. O controle e manipulação de dados foram realizados com o *software* HP Chemstation em um PC.

3.4. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM)

As análises foram realizadas exatamente conforme descrito por Owen et al.¹⁹ Antes da CG-MS, os extratos metanólicos secos (40 $\mu\text{g/ml}$) foram derivatizados, pois a amostra não era volátil, por adição de 100 μl de BSTFA (bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida) a 30°C durante 30 minutos. (Figura 9)

Figura 9. Derivatização dos ácidos anacárdicos com BSTFA.



3.5. Espectrometria de Ionização por Eletropulverização Acoplada à Espectrometria de Massa (ESI-ES)

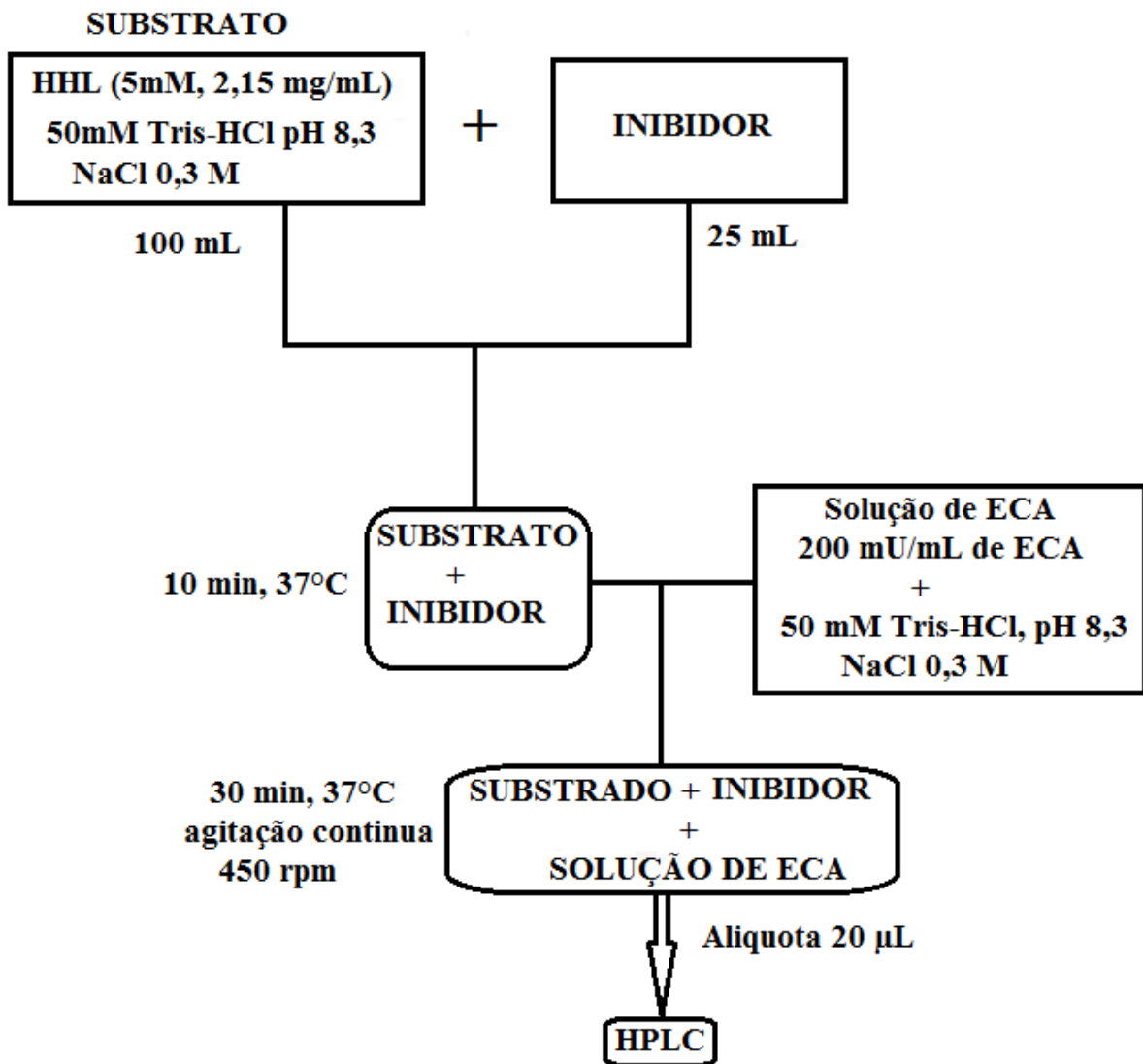
As amostras purificadas por CLAE semipreparativa foram dissolvidos em metanol, e os espectros foram registrados num Finnigan MAT TSQ 7000 espectrômetro de massa (Finnigan, San Jose, Califórnia, EUA), equipado com uma fonte de nanoeletrospray (EMBL, Heidelberg, Alemanha). Argônio foi utilizado como gás de colisão a uma pressão nominal de 2,5 mTorr (1 Torr = 133,3 Pa). Capilares de vidro banhado a ouro para a amostra de pulverização foram preparados usando um extrator microcapilar (Type -87- B, Sutter Instruments). A tensão aplicada foi de 400-700 V, e o intervalo de digitalização em massa foi 20-2600 D.

3.6. Ensaio enzimático de convenção da angiotensina I

Dissolveu-se 5 mM de N-hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL) (2,15 mg/mL) em 50 mM de Tris-HCl (pH 8,3) contendo NaCl 0,3 M. Misturou-se 100 mL de solução de substrato com 25 mL de solução de inibidor (ou de metanol/hexano/tampão Tris como controle). As soluções inibidoras foram captopril (como controle positivo) e os alquilfenóis purificados.

Após incubação durante 10 min a 37°C, adicionou-se 50 mL de uma solução de ECA (200 miliunidades/mL de enzima conversora de angiotensina (ECA) em 50 mM Tris- HCl, pH 8,3 contendo 0,3 M de NaCl (250 mL) a -20°C até a utilização) e se incubou durante mais 30 minutos a 37°C com agitação contínua a 450 rpm. A reação foi cessada pela adição de HCl 1 M (100 mL). Uma alíquota dessa mistura (20 µL) foi analisada por CLAE. (Fluxograma 3)

Fluxograma 3 – Ensaio enzimático para inibição da ECA.



3.7. Ensaio *in silico*

Os programas utilizados para prever o Log P foram o Molinspiration (<http://www.molinspiration.com/>), o Marvin (<http://www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php>) e o vclap (<http://www.vclab.org/lab/alogps/start.html>). Todos os sistemas foram utilizados de forma gratuita e com suporte de um computador da marca Dell munido de 16 gigabytes de memória Ram, 650 gigabytes de HD interno e microprocessador Core i7 da Intel, com o sistema operacional Windows 8 e o Google Chrome para abrir os *sites* e executar os ensaios. Para se realizar os experimentos, utilizou-se a própria estrutura da molécula ou a nomenclatura SMILE (Tabela 1).

Tabela 1. Compostos e suas nomenclaturas SMILE fornecido pelo *site* Molinspiration.

Compostos	Nomenclatura SMILE
Ácido 1-anacárdico	<chem>OC(=O)c1c(O)cccc1CCCCCCC=CCC=CCC=C</chem>
Ácido 2-anacárdico	<chem>CCCC=CCC=CCCCCCCCc1cccc(O)c1C(O)=O</chem>
Ácido 3-anacárdico	<chem>CCCCCCC=CCCCCCCCc1cccc(O)c1C(O)=O</chem>
Ácido 4-anacárdico	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCc1cccc(O)c1C(O)=O</chem>
1-Cardanol	<chem>Oc1cccc(CCCCCCCC=CCC=CCC=C)c1</chem>
2-Cardanol	<chem>CCCC=CCC=CCCCCCCCc1cccc(O)c1</chem>
3-Cardanol	<chem>CCCCCCC=CCCCCCCCc1cccc(O)c1</chem>
1-Cardol	<chem>Oc1cc(O)cc(CCCCCCCC=CCC=CCC=C)c1</chem>
2-Cardol	<chem>Oc1cc(O)cc(CCCCCCCC=CCC=CCCC)c1</chem>
Captopril	<chem>CC(CS)C(=O)N1CCCC1C(O)=O</chem>
Ácido Elágico	<chem>Oc1cc2c(=O)oc4c(O)c(O)cc3c(=O)oc(c1O)c2c34</chem>
Mangiferina	<chem>OC[C@H]4OC(c3c(O)cc2oc1cc(O)c(O)cc1c(=O)c2c3O)C(O)[C@@H](O)C4O</chem>
Maclurina	<chem>Oc2cc(O)c(C(=O)c1ccc(O)c(O)c1)c(O)c2</chem>
Luteolina	<chem>Oc3cc(O)c2c(=O)cc(c1ccc(O)c(O)c1)oc2c3</chem>
Taxifolina	<chem>OC3C(c1ccc(O)c(O)c1)Oc2cc(O)cc(O)c2C3=O</chem>
Ácido Salicílico	<chem>OC(=O)c1ccccc1O</chem>

Para análise dos parâmetros massa molar, área de superfície polar (PSA), número de doadores e receptores de hidrogênio e número de ligações rotativas, utilizou-se somente o sistema Molinspiration (<http://www.molinspiration.com/>).

3.8. *Jatropha mollissima*

As raízes de *J. mollissima*, para estudo comparativo, foram coletadas nas cidades de Beberibe/Ceará, em setembro de 2009 pelo professor Luquesio Petrola de Melo Jorge, esta raiz foi denominada de *Jatropha* praia. A outra raiz foi coletada em Tauá/Ceará, em junho de 2013, pelo professor Paulo Jorge Neto, esta raiz foi denominada *Jathopha* sertão.

A extração foi realizada em um extrator de Soxhlet, sendo utilizados 10 gramas de raiz de *Jatropha mollissima*. Foram feitas três extrações com hexano com duração de três horas cada processo e ao final os três extratos foram combinados. Após as três extrações com hexano, foram realizadas mais três com metanol. O produto das três extrações com metanol foram combinados e analisado por CLAE analítica de fase reversa isocrático, e a fase móvel consistia em metanol-ácido acético 5% (5:95).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação dos ácidos anacárdicos em LCC

O Líquido da casca da castanha de caju (LCC) foi fracionado em três classes nomeadamente por ácidos anacárdicos, cardanols e cardols. Os cromatogramas são mostrados na Figura 10. Os ácidos anacárdicos foram extraídos do LCC e separados em quatro compostos individuais através de CLAE semipreparativa. Os espectros de UV dos compostos purificados foram típicos de ácidos anacárdicos, isso foi confirmado por ESI-ES (Tabela 2) e GC-EM (Tabela 3). As estruturas seguem conforme Figura 11.

Figura 10. Cromatogramas das frações de alquilfenóis obtidos a partir do Líquido da casca da castanha de caju. Os picos I-IX são: ácido 1-anacárdico, ácido 2-anacárdico, ácido 3-anacárdico, ácido 4-anacárdico, 1-cardanol, 2-cardanol, 3-cardanol, 1-cardol e 2-cardol, respectivamente.

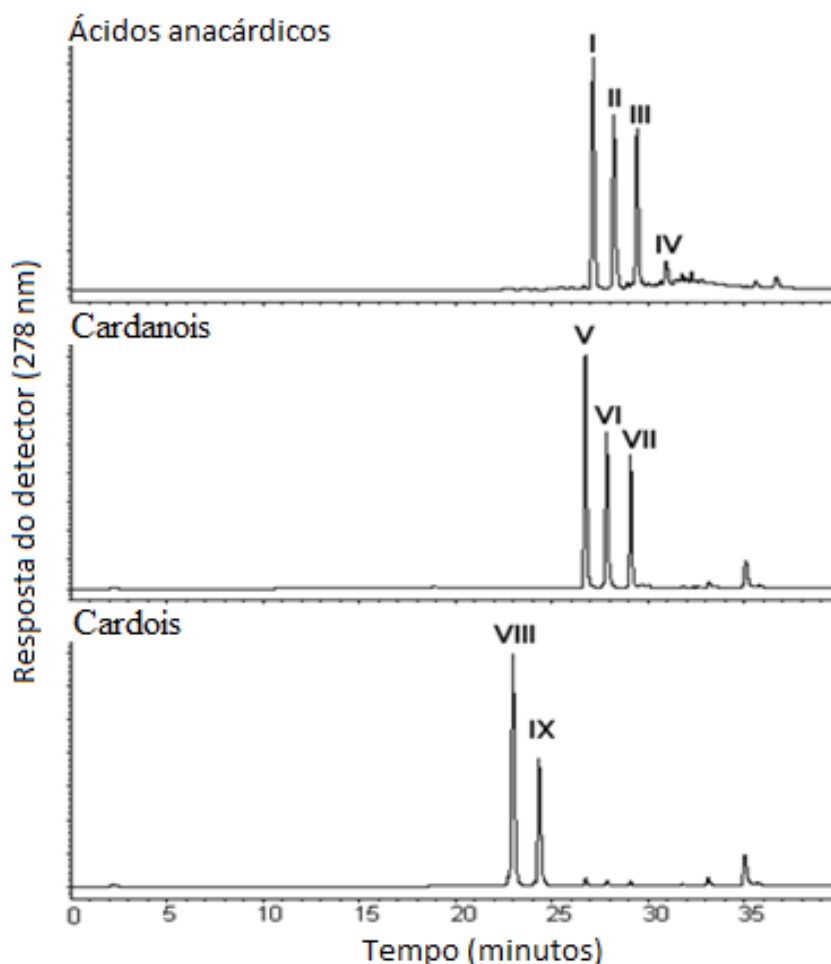


Tabela 2. Dados ESI-ES para ácidos anacárdicos individuais, purificados por CLAE semipreparativa.

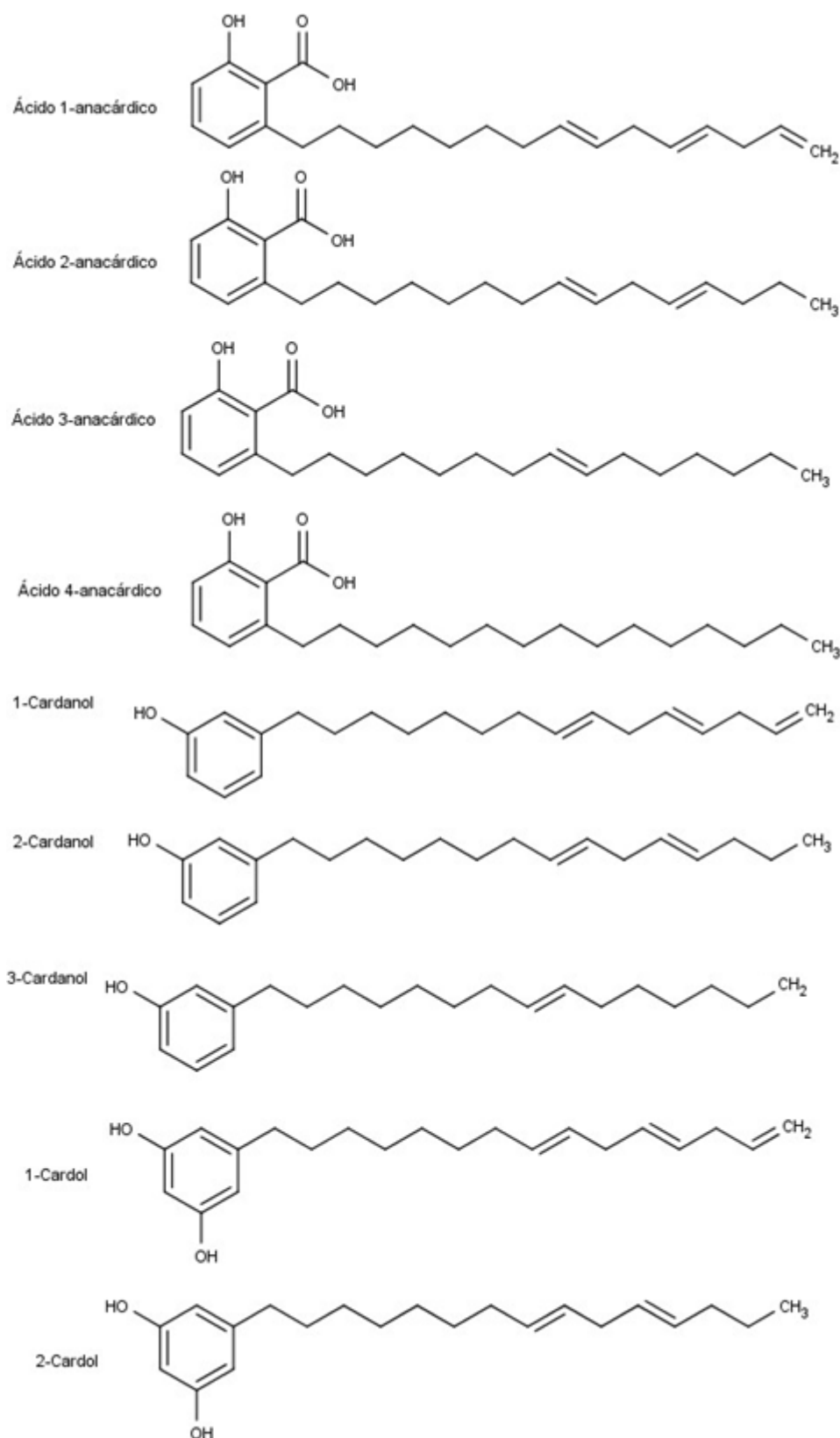
Alquilfenóis	<i>m/z</i>				
	Massa do ions [M]	[M-H] ⁻	[2M-H] ⁻	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺
Ácido 1-anacárdico	342.219	341.1	683.4	343.0	365.0
Ácido 2-anacárdico	344.235	343.1	687.4	345.0	367.0
Ácido 3-anacárdico	346.251	345.1	691.5	347.1	369.0
Ácido 4-anacárdico	348.266	347.1	695.5	349.1	371.0

Tabela 3. Dados de CG-EM para ácidos anacárdicos individuais purificados do LCC por CLAE semipreparativa.

	Alquilfenóis	Grupos TMS	M ⁺ (calc.)	<i>m/z</i> (intensidade relativa, %)	
				M ⁺	Fragmentos
I	Ácido 1-anacárdico	2	486	486 (3)	471 (100), 396 (46), 219 (68), 147 (44)
II	Ácido 2-anacárdico	2	488	488 (8)	473 (100), 398 (52), 219 (58), 147 (39)
III	Ácido 3-anacárdico	2	490	490 (7)	475 (100), 400 (9), 219 (35), 147 (16)
IV	Ácido 4-anacárdico	2	492	492 (1)	477 (100), 402 (1), 219 (19), 147 (6)

Cada grupo Trimetilsilano (TMS) substitui um próton hidroxila e adiciona 72 da massa molecular inicial.

Figura 11. Estruturas dos alquilfenóis detectados no LCC: I = ácido 1-anacárdico, II = ácido 2-anacárdico, III = ácido 3-anacárdico, IV = ácido 4-anacárdico, V = 1-cardanol, VI = 2-cardanol, VII = 3-cardanol, VIII = 1-cardol e IX = 2-cardol.



4.2. A inibição da ECA pelos ácidos anacárdicos

Executou-se um ensaio de inibição da ECA, utilizando como inibidor o LCC e seus componentes fenólicos. A mistura dos quatro ácidos anacárdicos juntos mostrou a maior inibição da ECA ($IC_{50} = 18 \mu M$) em comparação com cardanols e cardols juntos ($> 500 \mu M$). Outra comparação dos compostos purificados mostrou a seguinte relação: ácido 3-Anacárdico ($IC_{50} = 12 \mu M$) $>$ ácido 4-anacárdico ($IC_{50} = 20 \mu M$) $>$ ácido 2-anacárdico ($IC_{50} = 33 \mu M$) $>$ ácido 1-anacárdico ($IC_{50} = 39 \mu M$) (Figura 12). O captopril utilizado como controle positivo mostrou um $IC_{50} = 6,85 \text{ nM}$. Outros compostos fenólicos com o ácido elágico, maclurina, mangiferina e luteolina (Figura 13) foram fracamente positivos, com valores de $IC_{50} > 500 \mu M$, enquanto a taxifolina e o ácido salicílico tiveram valores negativos (Tabela 4).

Figura 12. Inibição por diferentes concentrações de ácidos anacárdicos sobre a atividade da ECA.

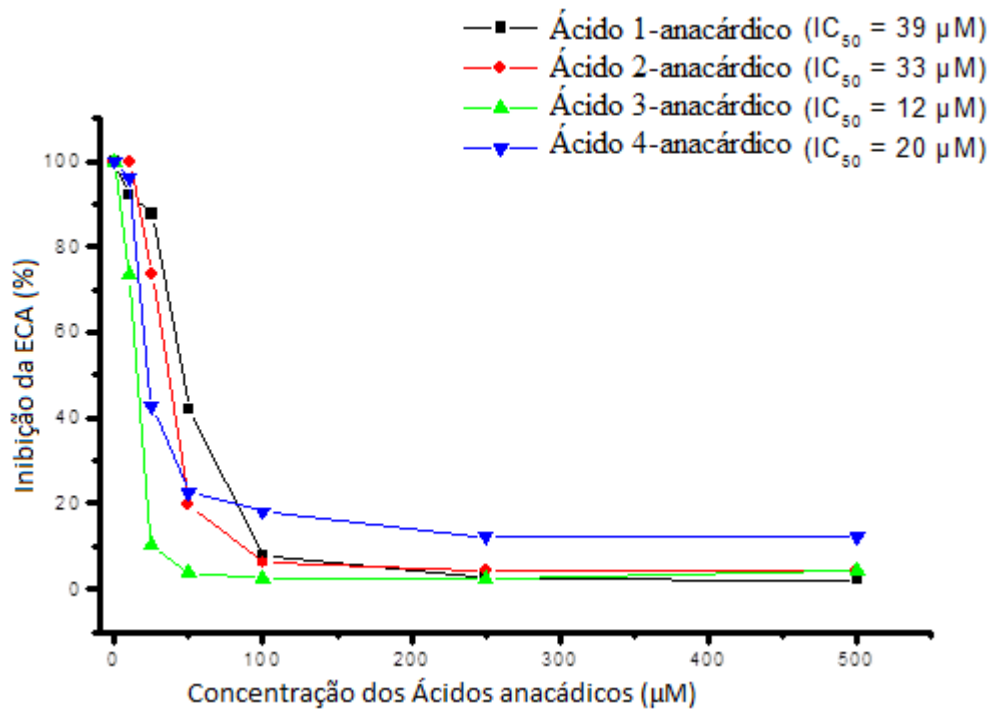


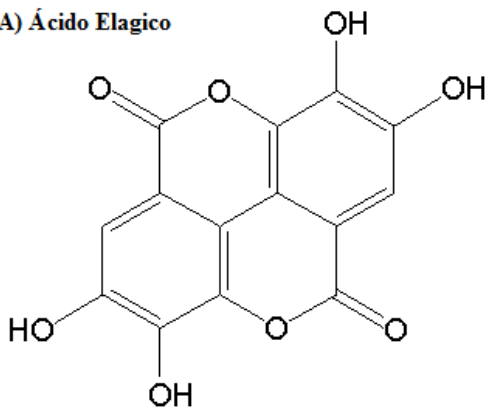
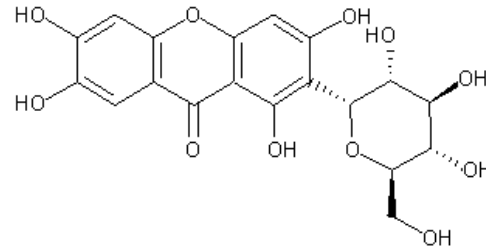
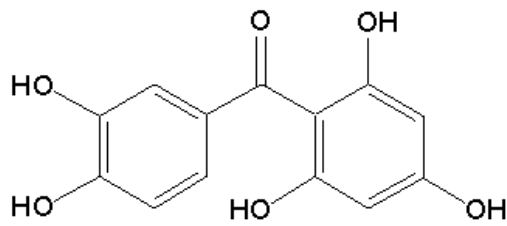
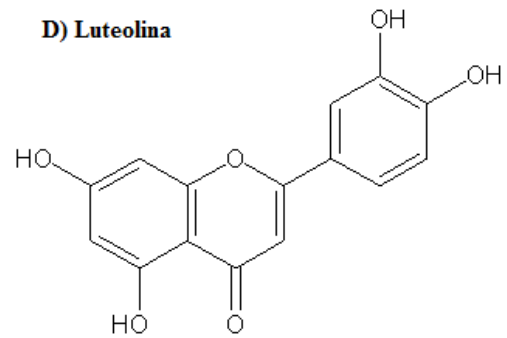
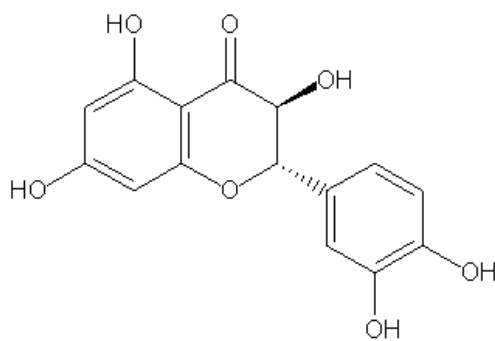
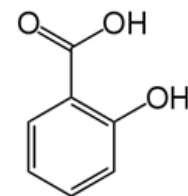
Figura 13. Estrutura de outros compostos fenólicos analisados como inibidores da ECA.**A) Ácido Elágico****B) Mangiferina****C) Maclurina****D) Luteolina****E) Taxifolina****F) Ácido Salicílico**

Tabela 4. Inibição da enzima conversora de angiotensina I (ECA) pelos alquilfenóis e ácidos anacárdicos purificados por CLAE semipreparativa, juntamente com os dados de referência selecionados e os dados publicados.

Alquilfenóis	IC₅₀ (μM)
LCC	50
Mistura dos quatro ácidos anacárdicos	18
Cardanols	> 500
Cardols	> 500
Ácido 1-Anacárdico	39
Ácido 2-Anacárdico	33
Ácido 3-Anacárdico	12
Ácido 4-Anacárdico	20
Captopril (Controle positivo)	6.85 nM
Outros compostos fenólicos	
Ácido Elágico	> 500
Mangiferina	> 500
Maclurina	> 500
Luteolina	> 500
Taxifolina	Negativo
Ácido Salicílico	Negativo
Valores publicados	
(-)-Epicatequina	1783
(+)-Catequinas	1593
Procianidina dimérica	267
Procianidina trimérica	126
Procianidina tetramérica	12
Procianidina pentamérica	25
Procianidina hexamérica	10
Cianidina sambubiosida	118
Delfinidina sambubiosida	142
Quercetina cafeoil glucorhamnosida	159
Quercetina galoil galactosida	160
Quercetina glucuronida	200
Kaempferol galactopiranosida	260
Luteolina glucopiranosideo	280
Luteolina	290

Os resultados mostraram que o LCC extraído da castanha de caju por Soxhlet contém uma série de alquilfenóis. Estes consistem em sua maior parte de ácidos anacárdicos, cardanois e cardois. Dentre os alquilfenóis estudados do LCC, observa-se que os mais potentes em atividades biológicas são os ácidos anacárdicos e em menor extensão cardanois e cardois. É importante salientar que o LCC, bruto, já foi descrito como um potente captador de espécies reativas de oxigênio e inibidor das xantinas oxidases.⁴

Neste estudo, o LCC se mostrou ser um inibidor da ECA, com um IC_{50} de 50 μM . A mistura dos quatro ácidos anacárdicos mostrou IC_{50} de 18 μM , o que demonstrou ser mais potente do que a mistura de cardanois e cardois ($IC_{50} > 500 \mu M$). Observa-se também que o ácido 3-anacárdico com uma ligação dupla na cadeia lateral foi o mais ativo ($IC_{50} = 12 \mu M$) em comparação com o ácido 4-anacárdico que não possui insaturação na cadeia lateral ($IC_{50} = 20 \mu M$). Em contraste, os ácidos anacárdicos 2 e 1 (duas e três ligações duplas na cadeia lateral, respectivamente), obtiveram valores de IC_{50} de 33 e 39 μM , respectivamente, sendo menos potentes que os ácidos anacárdicos 3 e 4.⁴

Os dados obtidos nessa pesquisa em comparação com dados na literatura^{20,21}, demonstram que os ácidos anacárdicos são bons inibidores da ECA e se verifica também que os produtos secundários de plantas reportam valores de IC_{50} de moléculas individuais maiores que os obtidos pelos ácidos anacárdicos e LCC. Os únicos dados comparáveis²¹ que relataram valores semelhantes aos obtidos com os ácidos anacárdicos são: procianidina hexamérica ($IC_{50} = 10 \mu M$), procianidina tetramérica ($IC_{50} = 12 \mu M$) e procianidina pentamérica ($IC_{50} = 25 \mu M$), enquanto que procianidina dimérica ($IC_{50} = 267 \mu M$), procianidina trimérica ($IC_{50} = 126 \mu M$) e especialmente monômeros de (-)-epicatequina ($IC_{50} = 1781 \mu M$) e (+)-catequina ($IC_{50} = 1593 \mu M$) foram relativamente inativos. É importante citar que oligômeros de procianidina presentes na dieta são degradados pelo suco gástrico para dímeros e monômeros. Ácidos anacárdicos são mais estáveis e são, portanto, menos suscetíveis a sofrer o mesmo destino no corpo humano.

O ácido salicílico, que possui estrutura muito semelhante à dos ácidos anacárdicos, teve resultado negativo no teste da inibição da ECA, indicando a importância da cadeia lateral fitilo para bloquear a atividade da enzima. Isto tem semelhanças com o mecanismo descrito para a inibição da xantina oxidase⁴.

Também tem sido relatado que os peptídeos de baixo peso molecular apresentam valores baixos de IC_{50} em μM , entretanto, são suscetíveis a serem degradados no corpo humano.²²⁻²⁶ Produtos naturais com modificações sintéticas²⁷⁻²⁹ também são descritos como potenciais inibidores da ECA, porém, é improvável competir com drogas, como captopril ($IC_{50} = 6,85$

nM), lisinopril e enalapril no uso clínico. Os ácidos anacárdicos (presentes em produtos de caju) tomados na dieta são suscetíveis a terem efeitos benéficos à saúde, diminuindo o risco de hipertensão e, talvez, particularmente úteis como um substituto de anti-hipertensivos em mulheres grávidas, pois os inibidores da ECA utilizados atualmente no mercado farmacêutico são contraindicados.^{4, 30}

Portanto, verifica-se que os estudos sobre a biodisponibilidade e metabólitos dos ácidos anacárdicos são necessários.

4.3. Estudo *in silico* dos componentes fenólicos do caju

Inicialmente, procurou-se fazer uma correlação entre os Log P encontrados nos três sistemas (Molinspiration, Marvin e vcclap). Os resultados encontrados (Tabela 5) mostram que as moléculas de ácidos anacárdicos são mais lipofílicas que hidrofílicas. Isso significa que essas moléculas se ligam com maior facilidade as proteínas plasmáticas, facilitando a distribuição do composto pelo organismo biológico. A diferença dos valores encontrados está diretamente relacionada ao método de cálculo do sistema utilizado, cada sistema realiza os cálculos com fragmentação das moléculas e usando plataformas computacionais que geram esses resultados. Visto isso, observa-se que o desvio padrão dos três programas utilizados para análise dos ácidos anacárdicos, cardanois e cardois não ultrapassou 0,50. Já para o captopril, ácido elágico, maclurina e taxifolina o desvio padrão superou 0,50. Visto que o desvio padrão mede a variabilidade dos valores à volta da média, seu valor mínimo seria zero e indicaria que não há variabilidade entre os programas, ou seja, que todos os valores são iguais à média. Assim nas amostras com Desvio padrão superior a 0,50 temos uma maior variabilidade entre os valores encontrados com os programas utilizados, sendo comum em análises computacionais visto que cada programa calcula essa constante utilizando diversos parâmetros de análise.

Tabela 5. Log P encontrados nos sistemas Marvin, Molinspiration e vcclap, respectivamente.

Compostos	Log P	miLogP	ALogP	Desvio padrão
Ácido 1-anacárdico	7,69	6,852	6,76	0,50
Ácido 2-anacárdico	7,99	7,612	7,15	0,42
Ácido 3-anacárdico	8,35	8,291	7,59	0,42
Ácido 4-anacárdico	8,71	8,601	8,04	0,36
1-Cardanol	7,38	6,884	7,16	0,25
2- Cardanol	7,68	7,644	7,55	0,07
3- Cardanol	8,05	8,315	7,99	0,17
1- Cardol	7,08	6,357	6,89	0,37
2- Cardol	7,38	7,117	7,28	0,13
Captopril	0,73	-1,09	0,75	1,06
Outros compostos fenólicos				
Ácido Elágico	2,32	0,943	1,48	0,69
Mangiferina	-0,36	-0,162	-0,50	0,17
Maclurina	3,21	1,778	1,90	0,79
Luteolina	2,40	1,974	2,07	0,22
Taxifolina	1,82	0,712	1,49	0,57
Ácido Salicílico	1,98	1,87	1,17	0,44

A Tabela 6 mostra todos os valores obtidos no sistema Molinspiration para as moléculas estudadas. Os ácidos anacárdicos possuem somente uma violação a regra de Lipinski (nviol.) que é o Log P, já discutido anteriormente. Em relação à área superficial polar, os valores são inferiores a 60 Å, o que demonstra que podem passar a barreira hematoencefálica e apresentarem atividade no sistema nervoso central. A soma do número de doadores de hidrogênio (nOHNH) e do número de receptores de hidrogênio (nON) é menor que 12, e uma massa molar (MW) menor que 400 daltons demonstra que os ácidos anacárdicos têm uma boa biodisponibilidade oral. Esses resultados são *in silico*, estudos *in vivo* são muito importantes para se comprovar tais resultados antes de o composto ir para as farmácias como medicamento.

Ácido elágico, maclurina, luteolina, taxifolina e ácido salicílico não violaram nenhum parâmetro da regra de Lipinski. Apesar de não apresentarem bons resultado como inibidores da ECA *in vitro*, possuem uma boa biodisponibilidade oral, porem estudos *in vivo* devem reforça os resultados e as aplicações dessas drogas devem ser encontradas.

O Captopril, medicamento muito usado no Brasil para diminuição e manutenção da pressão arterial para níveis normais, não teve violação a “Regra dos cinco” de Lipinski, e só foi reforçada a sua boa biodisponibilidade oral muito utilizada nas emergências clínicas. O mesmo também consegue passagem pela membrana hematoencefálica de acordo com os resultados *in silico*.

A mangiferina é a única, entre as substâncias estudadas, que violou duas das cinco regras de Lipinski, o número de doadores e receptores de hidrogênio que foram maiores que 5 e 7, respectivamente. A área superficial polar de 201,269, bem superior a 60, demonstra que o composto não apresentará ação no sistema nervoso central, pois o mesmo não irá passar a barreira hematoencefálica.

Os cardanois e os cardois, assim como os ácidos anacárdicos, também tiveram uma violação à regra de Lipinski, o Log P, ou seja, sua permeabilidade pelas membranas biológicas poderá ser afetada por eles serem mais lipossolúveis do que hidrossolúveis, porém, como os outros requisitos à “Regra dos cinco” foram satisfeitos, podemos dizer que apresentaram uma boa biodisponibilidade oral e atravessaram a barreira hematoencefálica.

Drogas com ação pulmonar têm que possuir uma maior permeabilidade pulmonar, ou seja, maior área superficial polar (PSA), pois são menos sensíveis a ligações de hidrogênio,¹¹. Visto isso, os ácidos anacárdicos apresentaram uma ação também pulmonar melhor que os cardanois e cardois.

Tabela 6. Estudo *in silico* dos compostos fenólicos encontrados na casca castanha de caju, do captopril e de outros compostos fenólicos, resultados obtidos pelo sistema Molinspiration.

Compostos	Log P	TPSA (Å)	MW (Da)	nON	nOHNH	nviol.	Nrotb
Ácido 1-anacárdico	6,852	57,527	342,479	3	2	1	13
Ácido 2-anacárdico	7,612	57,527	344,495	3	2	1	13
Ácido 3-anacárdico	8,291	57,527	346,511	3	2	1	14
Ácido 4-anacárdico	8,601	57,527	348,527	3	2	1	15
1-Cardanol	6,884	20,228	298,47	1	1	1	12
2- Cardanol	7,644	20,228	300,486	1	1	1	12
3- Cardanol	8,315	20,228	302,502	1	1	1	13
1- Cardol	6,357	40,456	314,469	2	2	1	12
2- Cardol	7,117	40,456	316,485	2	2	1	12
Captopril	-1,09	57,608	217,29	4	1	0	3
Ácido Elágico	0,943	141,334	302,194	8	4	0	0
Mangiferina	-0,162	201,269	422,342	11	8	2	2
Maclurina	1,778	118,211	262,217	6	5	0	2
Luteolina	1,974	111,123	286,239	6	4	0	1
Taxifolina	0,712	127,445	304,254	7	5	0	1
Ácido Salicílico	1,87	57,527	138,122	3	2	0	1

4.4. Estudo Comparativo do LCC extraído de diferentes plantios de caju

Nesta parte do trabalho, avaliaram-se as quantidades de ácidos anacárdicos presentes na casca da castanha de caju industrializada, utilizaram-se cinco clones de cajueiros anões precoces desenvolvidos pela Embrapa Agroindústria Tropical. Foram analisados cinco clones e verificada a melhor forma de extração. As amostras que foram trituradas para extração de LCC tiveram os melhores rendimentos, extraíndo mais LCC e, por consequência, mais ácidos anacárdicos. Das cinco amostras, a CCP-76 processada triturada extraiu a maior quantidade de LCC, cerca de 29 gramas e a amostra CCP-76 processada inteira teve rendimento bem abaixo, assim se verifica que triturar o material é extremamente importante para o rendimento na extração. (Tabela 7)

Tabela 7. Análise das cinco amostras de LCC extraídas das cascas de castanha dos cajueiros anões.

Rendimento ácido anacárdico					
Amostra	Estado da Amostra	LCC obtido (gramas)	Massa de castanha pesada (gramas)	Rendimento (%)	
1	CCP-76	Triturada	29,1552 g	50,4751 g	57,76%
2	CCP-09	Triturada	15,2842 g	50,5047 g	30,26%
3	110	Triturada	15,1521 g	53,0934 g	28,53%
4	119	Triturada	18,5985 g	54,7276 g	33,98%
5	109	Triturada	16,1748 g	50,0509 g	32,31%
6	CCP-76	Inteira	3,9667 g	48,8234 g	8,12%
7	CCP-09	Inteira	6,0131 g	50,7953 g	11,83%
8	109	Inteira	3,8354 g	51,0215 g	7,51%

Avaliaram-se também as quantidades de ácidos anacárdicos nas cascas de castanha. O clone de certificação CCP-76 processado de forma triturado teve a maior fonte de ácidos anacárdicos bioativos e o Embrapa-109, casca processada inteira, teve o teor mais baixo entre os clones estudados (Tabela 8). Em virtude do rendimento da amostra CCP-76 ser superior as demais fez-se novamente o experimento e a partir de 50,0632 gramas da casca de castanha triturada obteve-se cerca de 28,2775 gramas de LCC, o que corresponde a 56,48% de rendimento, sendo essa a maior fonte de LCC entre as cascas de castanhas de caju analisadas.

Tabela 8. Análise das cinco amostras de LCC em gramas de ácido anacárdico por quilograma de LCC.

Análise quantitativa dos Ácidos anacárdicos						
Dados em gramas de Ácido anacárdico / quilograma de LCC						
Amostra			Ácido 1-anacárdicos	Ácido 2-anacárdicos	Ácido 3-anacárdicos	TOTAL
1	CCP 76	Triturada	91,53	53,30	40,54	185,37
2	CCP 09	Triturada	55,91	17,04	24,16	97,11
3	110	Triturada	53,36	16,47	21,95	91,78
4	119	Triturada	72,43	23,42	24,99	120,84
5	109	Triturada	50,29	27,56	21,77	99,62
6	CCP 76	Inteira	13,13	8,23	6,23	27,59
7	CCP 09	Inteira	22,06	6,69	9,65	38,40
8	109	Inteira	11,80	6,30	5,28	23,38

Neste experimento, utilizaram-se resíduos das cascas de castanhas industrializadas, as quais teriam como destino resíduo industrial. Esses resíduos mostraram-se uma boa fonte de LCC com ácidos anacárdicos presentes. Observa-se que as amostras CCP-76, CCP-09 e Embrapa-109, processadas de forma inteira, não tiveram um bom rendimento e seus LCC possuem poucos ácidos anacárdicos. Visto isso, o processo de trituração antes da extração melhora o rendimento e o fornecimento de um LCC mais rico em ácidos anacárdicos.

Verifica-se na tabela 9 que pouco ácido anacárdico sofreu descarboxilação para forma cardanois, isso foi possível devido ao controle da temperatura durante a extração do LCC por soxhlet.

Tabela 9. Análise das cinco amostras de LCC e quantidade de ácido anacárdico (AA) e cardanois.

Amostra			% AA	% Cardanois
1	CCP 76	TRITURADA	92,36	1,34
2	CCP 09	TRITURADA	92,28	1,32
3	110	TRITURADA	92,33	1,53
4	119	TRITURADA	92,42	1,47
5	109	TRITURADA	92,11	1,81
6	CCP 76	INTEIRA	94,84	1,99
7	CCP 09	INTEIRA	92,65	1,51
8	109	INTEIRA	92,59	1,76

4.5. Estudo comparativo dos possíveis produtos da *Jatropha mollissima* da região do sertão e da praia

Após a extração por Soxhlet, das raízes da planta *Jatropha mollissima*, o extrato metanoico foi passado na CLAE a uma concentração de 10 mg/mL e injetado 10 microlitro. Em seguida, realizou-se uma consulta na biblioteca do aparelho para encontrar possíveis substâncias presente nas plantas. Em geral, ambas as raízes, do sertão e da praia, apresentaram substâncias com características voltadas ao grupo das neoligninas no tempo de retenção por volta dos 20 minutos, sendo que a *Jatropha mollissima* da região da praia apresenta maior concentração. As outras possíveis substâncias são o ácido p-hidroxibenzoico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico e o ácido elágico. Para uma melhor elucidação, seria necessário purificar estas substâncias e analisar por ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa.

Com as análises dos cromatogramas, Figuras 14 e 15, podemos observa que apesar das plantas serem da mesma espécie possuem características diferentes. Isso se dá devido aos diferentes climas do local onde elas cresceram. Apesar do semiárido ser uma área seca onde reinam a morte e a fome, essa região tem uma biodiversidade riquíssima, onde as espécies de plantas conseguem sobreviver às mais duras intempéries, e é exatamente essa capacidade de resistir que torna a *Jatropha mollissima* do sertão tão especial. Muitas espécies típicas do sertão nordestino não existem em mais nenhum lugar do planeta e as que já são comuns em outras localidades sofrem modificações naturais para fazer frente à aspereza do clima. Por isso, é essencial sua pesquisa e comparação. Em boa parte do ano, não cai uma única gota de água do céu. As plantas ficam tão ressequidas que algumas delas até parecem mortas. Mas, a estação das chuvas muda esse cenário radicalmente e a vegetação volta a brotar. Para que uma planta consiga viver com pouca água no sertão, quase morrer e depois renascer, as plantas têm que fabricar compostos químicos potentes e são eles que apresentam alto valor terapêutico e isso foi observado nos cromatogramas da espécie do sertão. Os estudos com essas plantas do semiárido tanto servem para o desenvolvimento de novos medicamentos, como também, na conservação ambiental. A *Jatropha mollissima* que cresceu na praia se desenvolveu em um meio com menos estresse, visto que os solos predominantes são os Argissolos, variando de profundos a moderadamente profundos, com textura variando de média (arenosa) a argilosa. Geralmente, são bem drenados e porosos com práticas corretivas, possuem de médio a alto potencial agrícola, influenciando nas substâncias presente.

Figura 14 - Cromatogramas de CLAE da *Jatropha mollissima*, região Praia (Beberibe), realizados em três diferentes comprimento de onda, cromatografia de fase reversa isocrática e fase móvel metanol-ácido acético 5% (5:95). A) comprimento de onda de 340,4; B) comprimento de onda de 257,4 e C) comprimento de onda de 278,4.

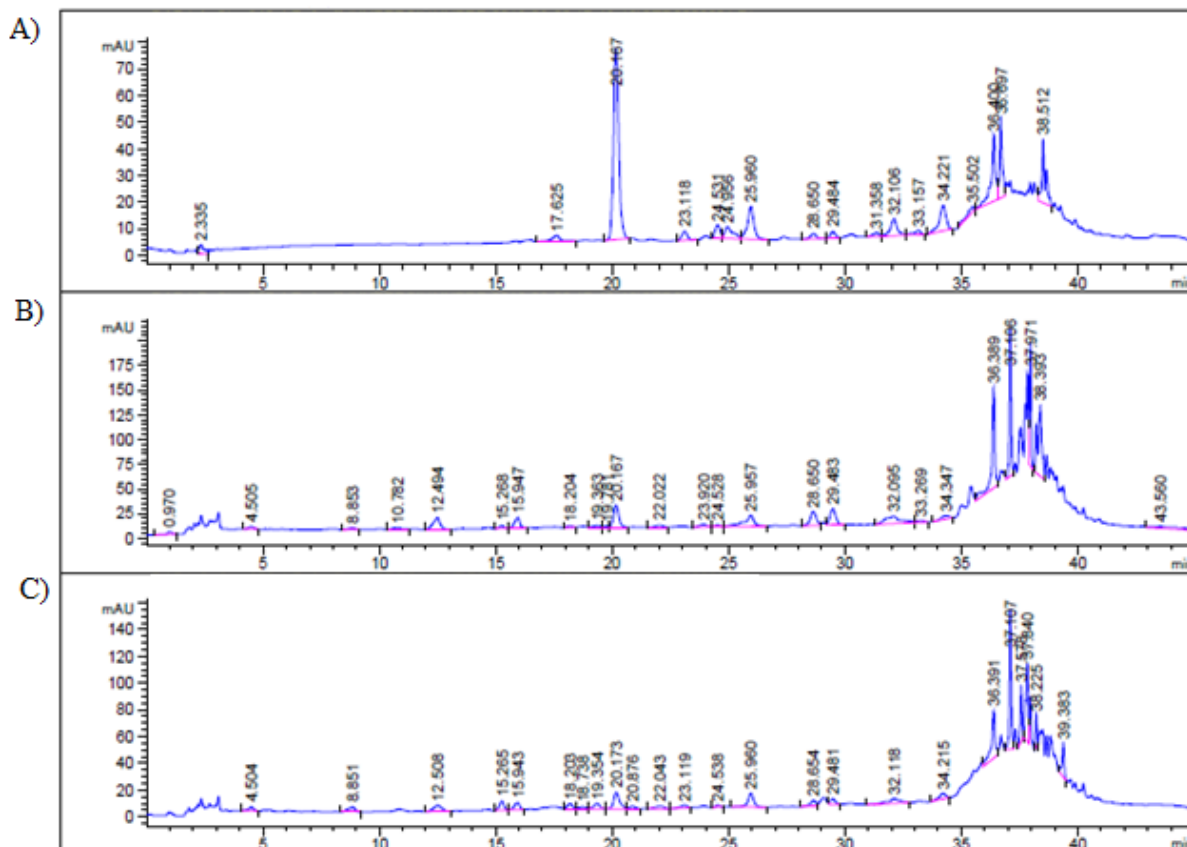


Figura 15 - Cromatogramas de CLAE da *Jatropha mollissima*, região Sertão, realizados em três diferentes comprimento de onda, cromatografia de fase reversa isocrática e fase móvel metanol-ácido acético 5% (5:95). A) comprimento de onda de 340,4; B) comprimento de onda de 257,4 e C) comprimento de onda de 278,4.

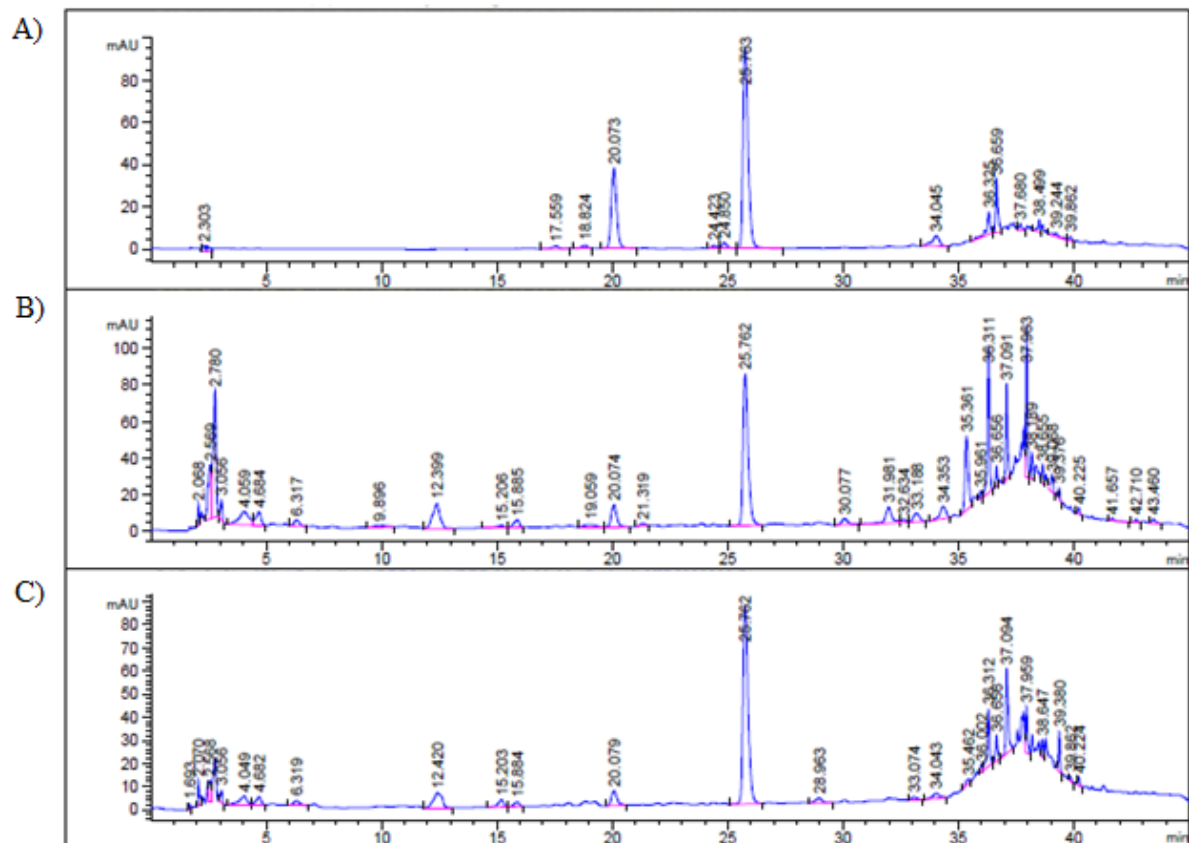
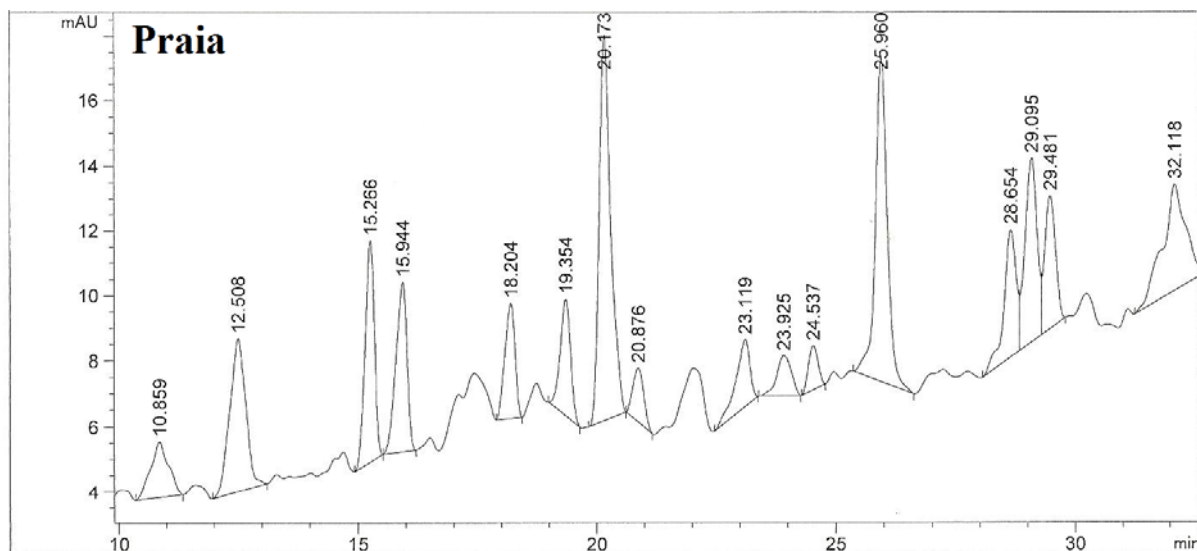
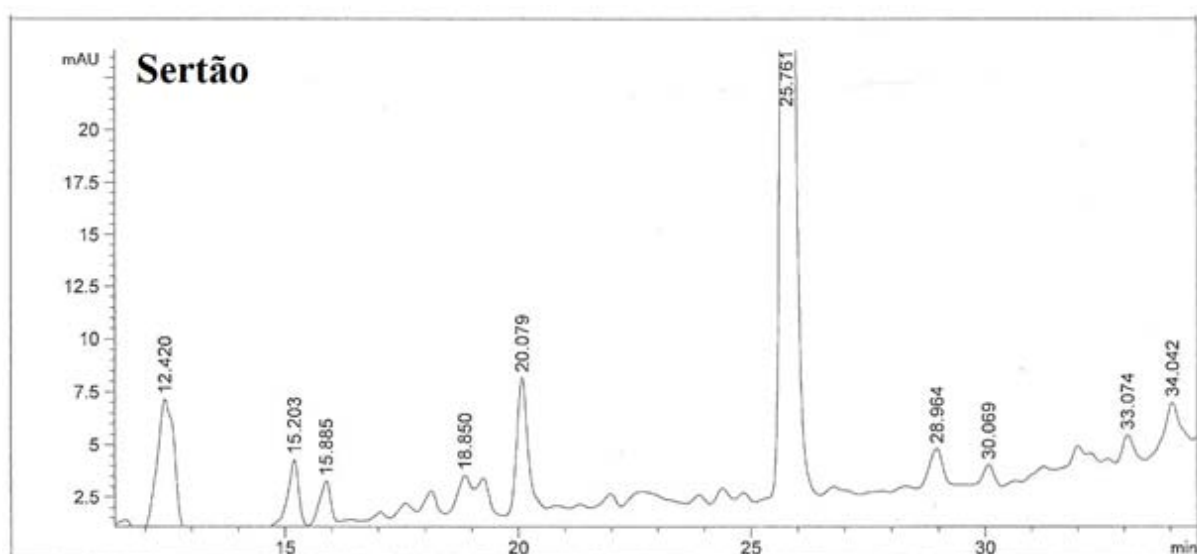


Figura 16 - Cromatogramas de CLAE da *Jatropha mollissima*, comprimento de onda 278,4, cromatografia de fase reversa isocrática e fase móvel metanol-ácido acético 5% (5:95). A) *Jatropha mollissima* região praia B) *Jatropha mollissima* região sertão.

A)



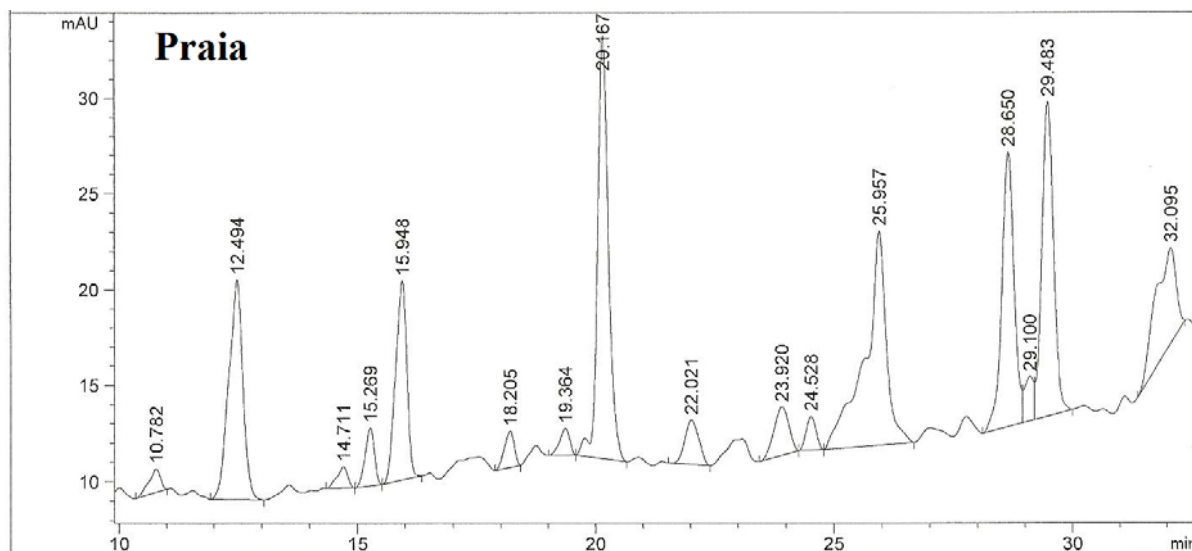
B)



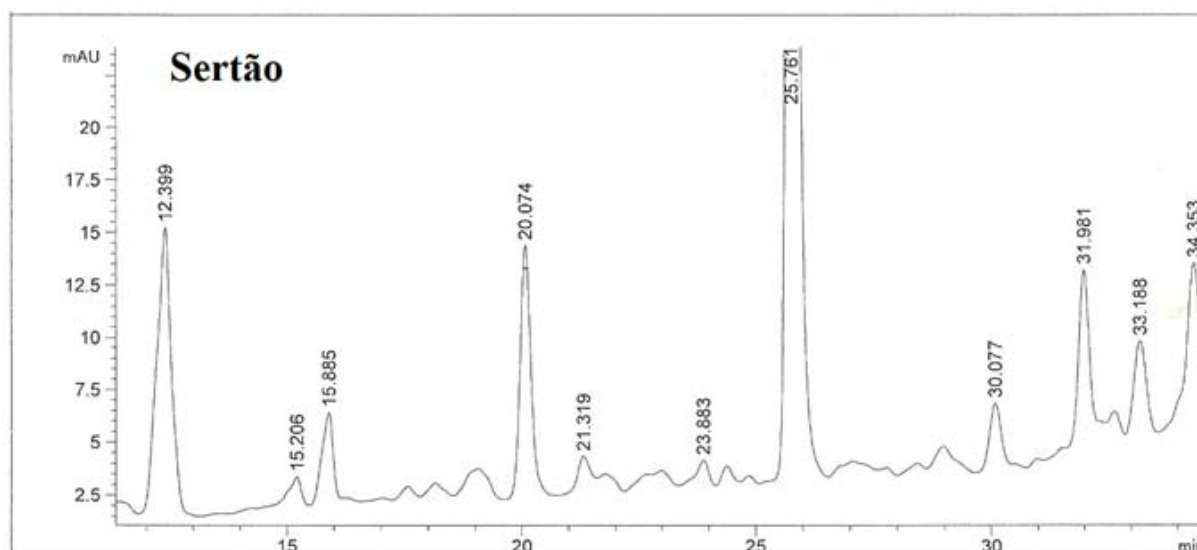
Observa-se na figura 16A que existem substâncias mais concentradas na *Jatropha* da Praia, sendo os picos em 20.173, 25.960 e 29.095 os mais notáveis. Na *Jatropha* da região do Sertão observa-se o pico em torno de 25.761 mais intenso comparando com a *J.* da Praia. Assim, esses picos justificam uma diferença quantitativa entre as amostras.

Figura 17 - Cromatogramas de CLAE da *Jatropha mollissima*, comprimento de onda 257,4, cromatografia de fase reversa isocrática e fase móvel metanol-ácido acético 5% (5:95). A) *Jatropha mollissima* região praia B) *Jatropha mollissima* região sertão.

A)



B)



Na figura 17A observa-se picos em torno de 28.650 e 29.483 que estão presente na *Jatropha* da praia, porém ausentes no sertão (Figura 17B). Justificando assim uma diferença quantitativa entre as plantas de regiões diferentes.

5. CONCLUSÕES

Os ácidos anacárdicos purificados e misturados possuem capacidade de inibir a enzima conversora de angiotensina, portanto, representam as melhores substâncias químicas extraídas de vegetais disponíveis até agora descritos, como meio de redução da hipertensão. Em particular, podem ter um papel útil no controle da hipertensão durante a gravidez.

A análise *in silico* demonstrou que, apesar dos ácidos anacárdicos violarem uma regra de Lipinski, eles podem dar bons medicamentos com boa biodisponibilidade oral e nasal, visto que possuem uma soma de doadores e receptores de hidrogênio bem inferior a 12, boa lipofilicidade que melhora a distribuição do composto no organismo devido a uma melhor ligação com as proteínas plasmáticas e atuar no sistema nervoso central, pois conseguem atravessar a barreira hematoencefálica. Os estudos *in silico* são feitos em computadores, assim é de suma importância que, antes de qualquer fármaco chegar ao mercado farmacêutico, passe por experimentos *in vivo* para avaliar melhor a sua toxicidade e ação.

O estudo dos LCC extraídos da casca da castanha de caju de diferentes clones comerciais de cajueiro anão precoce, desenvolvido pela Embrapa Agroindústria Tropical, indica que o teor de ácidos anacárdicos é muito importante, pois podem ser agentes quimiopreventivos do câncer e inibidores da ECA. Experiências com galinhas também demonstram efeitos benéficos.³¹ Os ácidos anacárdicos também fornecem proteção contra lesão gástrica induzida pelo etanol,³² e, principalmente, por meio de um mecanismo antioxidante, os efeitos dos ácidos anacárdicos mostram que o tratamento pode proteger contra a inflamação pulmonar induzida por diesel, sendo uma dose de 50mg/kg de ácidos anacárdicos a mais eficaz na redução da inflamação pulmonar.³³ O cultivo CCP-76 apresenta maior concentração de ácidos anacárdicos em comparação com as outras amostras analisadas, e, também, maior extração de LCC. Assim, esse cultivo pode ser utilizado para extração dos ácidos anacárdicos para eventuais estudos *in vivo*, utilizando a casca da castanha de caju processada industrialmente.

Os resultados do estudo da *Jatropha mollissima* de diferentes regiões sugere que as plantas analisadas podem representar novas opções no arsenal de plantas com potencial fitoterápico, sendo necessário desenvolvimento de mais pesquisas para a comprovação das substâncias analisadas por HPLC e posterior análise por RMN. A *Jatropha mollissima* pode dar remédios extremamente seguros e precisos. Verifica-se também que as espécies que se desenvolve em diferentes regiões precisam ser melhor estudadas, pois cada uma pode trazer benefícios diferentes para a humanidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Xu S, Zhi H, Hou X, Jiang B. **Angiotensin II modulates interleukin-1 β -induced inflammatory gene expression in vascular smooth muscle cells via interfering with ERK-NF- κ B crosstalk.** *Biochem Biophys Res Comm.* 2011; 410: 543 - 548.
- 2) Bild W, Hritcu L, Stefanescu C, Ciobica A. **Inhibition of central angiotensin II enhances memory function and reduces oxidative stress status in rat hippocampus** *Prog NeuroPsychopharmacol Biol Psych.* 2013; 43: 79 - 88.
- 3) Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, McCallum IR, McInnes GT, MacKinnon PL, Meredith PA, Murray LS, Reid JL, Robertson JWK. **Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer?** *Lancet.* 1998; 352: 179 - 184.
- 4) Trevisan MTS, Pfundstein B, Haubner R, Würtele G, Spiegelhalder B, Bartsch, H, Owen RW. **Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity.** *Food Chem Toxicol.* 2006; 44: 188 - 197.
- 5) Toyomizu M, Sugiyama S, Jin RL, Nakatsu T. **α -Glucosidase and aldose reductase inhibitors: constituents of Cashew, *Anacardium occidentale*, nut shell liquid.** *Phytotherapy Res.* 1993; 7: 252 - 254.
- 6) Kubo I, Kinst-Hori I, Yokokawa Y. **Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits.** *J Nat Prod.* 1994; 57: 545 - 551.
- 7) Toyomizu M, Okamoto K, Ishibashi T, Chen Z, Nakatsu T. **Uncoupling effect of anacardic acids from cashew nut shell oil on oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria.** *Life Sciences.* 2000; 66: 229 -234.
- 8) Katzung, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica.** Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro. 6ª ed.1998.

- 9) Hou, T; Wang, J.; Zahng, W.; Zhang, W.; Xiaojie, X. **ADME Evaluation in Drug Discovery. 7. Prediction of Oral Absorption by Correlation and Classification.** *J. Chem. Inf. Model.* 2007; 47(1): 208 - 218
- 10) Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. **Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug Discovery and development settings.** *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 46(1-3) : 3 - 26.
- 11) Clemente, G. **Estudo comparativo de procedimentos experimentais e computacionais para o calculo da lipofilia molecular.** *Saúde & tecnologia.* 2011; 5: 29 - 34.
- 12) Pajouhesh, H; Lenz, G.R. **Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs.** *NeuroRx.* 2005; 2(4): 541 - 553.
- 13) LIPINSKI, C.A. - **Lead and drug-like compounds: the rule-of-five revolution.** *Drug Discovery Today: Technologies,* 2004; 1: 337 - 341.
- 14) LEAL, C. K. A. & AGRA, M. F. **Estudo farmacobotânico Comparativo das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. E *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae).** *Acta Farm. Bonaerense,* 2005; 24 (1): 5 -13.
- 15) WEBSTER, G. L., **Classification of the Euphorbiaceae.** *Ann. Missouri Bot. Gard.* 1994; No 81, 3 - 143.
- 16) AGRA, M. F.; LOCATELLI, E.; ROCHA, E. A.; BARACHO,, G. S. & FORMIGA S. C. **Medicinal plants of Cariris Velhos, Paraiba, Part II: Subclasse magnoliidae, Caryophyllidae, Dilleniidae and Rosidae.** *Rev. Bras. Farm.,* 1996; No 77, 97 - 102.
- 17) Paramashivappa R, Phani Kumar P, Vithayathil PJ, Srinivasa Rao A. **Novel method for isolation of major phenolic constituents from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid.** *J Agric Food Chem.* 2001; 49: 2548 - 2551.

- 18) Shobha SV, Ravindranath B. **Supercritical carbon dioxide and solvent extraction of the phenolic lipids of Cashew nut (*Anacardium occidentale*) shells.** *J Agric Food Chem.* 1991; 39: 2214 - 2217.
- 19) Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B, Bartsch H. **Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil.** *Clin Chem.* 2000; 46: 976 - 988.
- 20) Ojeda D, Jiménez-Ferrer E, Zamilpa A, Herrera-Arellano A, Tortoriello J, Alvarez L. **Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*.** *J Ethnopharmacol.* 2010; 127: 7 - 10.
- 21) Actis-Goretta L, Ottaviani JI, Keen CL, Fraga CG. **Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins.** *Febs Lett.* 2003; 555: 597 - 600.
- 22) Ahn CB, Jeon YJ, Kim YT, Je JY. **Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from salmon byproduct protein hydrolysate by Alcalase hydrolysis.** *Process Biochem.* 2012; 47: 2240 - 2245.
- 23) Asoodeh A, Yazdi MM, Chamani JK. **Purification and characterisation of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from lysozyme hydrolysates.** *Food Chemistry.* 2012; 131: 291 - 295.
- 24) Ko SC, Lee JK, Byun HG, Lee SC, Jeon YJ. **Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from enzymatic hydrolysates of *Styela clava* flesh tissue.** *Process Biochem.* 2012; 47: 34 - 40
- 25) .Graham TH, Shen HC, Liu W, Xiong Y, Verras A, Bleasby K, Bhatt UR, Chabin RM, Chen D, Chen Q, Calvo MG, Geissler WM, He H, Lassman ME, Shen Z, Tong X, Tung EC, Xie D, Xu S, Colletti SL, Tata JR, Hale JJ, Pinto S, Shen DM. **The discovery of non-benzimidazole and brain-penetrant prolylcarboxypeptidase inhibitors.** *Bioorg Med Chem Lett.* 2012; 22: 658 - 665.

- 26) Jimsheena VK, Gowda LR. **Arachin derived peptides as selective angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitors: structure-activity relationship.** *Peptides*. 2010; 31: 1165 - 1176.
- 27) Kantevari S, Addla D, Bagul PK, Sridhar B, Banerjee SK. **Synthesis and evaluation of novel 2-butyl-4-chloro-1-methylimidazole embedded chalcones and pyrazoles as angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors.** *Bioorg Med Chem*. 2010; 19: 4772 - 4781.
- 28) Bonesi M, Loizzo MR, Statti GA, Michel S, Tillequin F, Menichini F. **The synthesis and Angiotensin Converting Enzyme (ACE) inhibitory activity of chalcones and their pyrazole derivatives.** *Bioorg Med Chem Lett*. 2010; 20: 1990 - 1993.
- 29) Corminboeuf O, Bezençon O, Grisostomi C, Remeň L, Richard-Bildstein S, Bur D, Prade L, Hess P, Strickner P, Fischli W, Steiner B, Treiber A. **Design and optimization of new piperidines as renin inhibitors.** *Bioorg Med Chem Lett*. 2010; 20: 6286 - 6290.
- 30) Solomon CG, Seely EW, **Hypertension in pregnancy.** *Endocrinol Metab Clin N Am*. 2001; 40: 847 - 863.
- 31) Sucupira, FS. **48ª Reunião Annual da Sociedade de Zootecnia**, Belem-Brazil, 2011.
- 32) Morais, T.C. *Chemico-Biological Interactions (Print)*, v. 183, 264 - 269, 2010.
- 33) Carvalho ALN. Heidelberg, **4 th General Meeting of alumni DKFZ**, 2010. V.1. p.58.