

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

THAIS DE ARAUJO MARQUES FERREIRA

SÍNTESE DE DERIVADOS DO CARDANOL E AVALIAÇÃO SOBRE
RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAIS

BRASÍLIA

2018

THAIS DE ARAUJO MARQUES FERREIRA

SÍNTESE DE DERIVADOS DO CARDANOL E AVALIAÇÃO SOBRE
RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAIS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro

BRASÍLIA

2018

Autorizo a reprodução e divulgação apenas do resumo deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

dF383s de Araujo Marques Ferreira, Thais
Síntese de Derivados do Cardanol e Avaliação sobre
Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomais /
Thais de Araujo Marques Ferreira; orientador Luiz Antonio
Soares Romeiro. -- Brasília, 2018.
165 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade de Brasília, 2018.

1. PPAR. 2. Diabetes. 3. Dislipidemia. 4. LCC. 5.
Cardanol. I. Soares Romeiro, Luiz Antonio, orient. II.
Título.

THAIS DE ARAUJO MARQUES FERREIRA

SÍNTESE DE DERIVADOS DO CARDANOL E AVALIAÇÃO SOBRE RECEPTORES
ATIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAI

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 26 de junho de 2018

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro

Universidade de Brasília – UnB

Prof.^a Dr.^a Maria Lucilia dos Santos

Universidade de Brasília – UnB

Prof.^a Dr.^a Ana Carolina Migliorini Figueira

Laboratório Nacional de Biociências - LNBio

Prof.^a Dr.^a Yanna Karla de Medeiros Nóbrega

Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr. Mauricio Homem de Mello

Universidade de Brasília – UnB

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o amor e incentivo, por acreditarem em mim, apoiarem meus sonhos e compreenderem minha ausência em alguns momentos. Ana Marta Ferreira, André Nunes e Ronan Ferreira, vocês são meu exemplo de força e determinação, essa conquista é por e para vocês.

Ao Prof. Dr. Luiz Romeiro, meu orientador, toda a minha admiração. Agradeço pela paciência, motivação e imenso conhecimento compartilhado, pelo suporte na realização desse projeto e pela oportunidade de fazer parte do grupo LDT ao longo desses oito anos.

Aos companheiros de laboratório, por toda a ajuda e suporte na execução da metodologia sintética. Em especial, as amigas Andressa Oliveira, Priscilla Alves, Lais Lemes e Giselle Ramos, pela inestimável colaboração e incentivo, por sempre me transmitirem palavras de conforto e me apoiarem nos momentos de desânimo.

Ao Prof. Dr. Edilberto Silveira, Dra. Patrícia Nascimento e MSc. Hebert Magalhães do Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará (UFC) pela obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

À Prof. Dra. Carolyn Cummins e as alunas Lilia Magomedova e Cigdem Sahin do *Nuclear Hormone Receptors in Human Health and Disease* da *University of Toronto* (UofT) pela realização dos ensaios biológicos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

Ao CNPq (Br, #473389/2009-6 e 490203/2012-4) pelo apoio financeiro.

À Universidade de Brasília (UnB) e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF).

À banca examinadora, Prof. Dra. Maria Lucilia dos Santos, Prof. Dra. Ana Carolina Figueira, Prof. Dra. Yanna Nóbrega e Prof. Dr. Mauricio Mello, por terem aceitado o convite, e desde já pelas críticas e contribuições no enriquecimento do trabalho.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a produção desse projeto.

RESUMO

FERREIRA, Thais de Araujo Marques. **Síntese de Derivados do Cardanol e Avaliação sobre Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomais.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

A modulação da expressão de Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomais (PPAR) está implicada em diversas patologias metabólicas e constitui importante alvo de pesquisas de interesse terapêutico. A ativação de PPAR resulta em atividades antilipídêmica, anti-insulínica, antiapoptótica, anti-inflamatória e antioxidante. Neste sentido, agonistas sintéticos PPAR foram desenvolvidos para interagir especificamente com os PPAR α , fibratos, e os PPAR γ , tiazolidinadionas, para o tratamento de dislipidemia e diabetes tipo 2, respectivamente. No entanto, efeitos adversos que incluem ganho de peso, edema, fratura óssea e toxicidade hepática, foram relatados. No âmbito de uma linha de pesquisas que visa a utilização terapêutica de lipídeos fenólicos extraídos do líquido da casca da castanha de caju, este trabalho descreve o planejamento, a síntese e a avaliação de novos ligantes PPAR. Neste contexto, a estratégia sintética levou à obtenção de 15 derivados-alvo em rendimentos de 74% a 98%, que foram caracterizados por métodos espectroscópicos de análise. Os resultados farmacológicos referentes à ativação de PPAR evidenciaram a capacidade dos ligantes de atuarem como ativadores de transcrição duais ou pan PPAR, com EC₅₀ a valores de micromolar. Em adição, os derivados aumentaram a oxidação e a captação de ácidos graxos em hepatócitos primários, e foram indutores de adipogênese em pré-adipócitos 3T3-L1. O composto mais potente da série saturada foi designado como composto modelo para avaliação farmacológica *in vivo*, devido a seu perfil transcricional com atividade balanceada e parcial PPAR α/γ , em *Danio rerio* (zebrafish) e em modelo de obesidade induzida por dieta em camundongos, resultando na regulação do metabolismo energético com redução dos efeitos adversos apresentados pelos agonistas tradicionais de PPAR.

Palavras-chave: PPAR; Diabetes; Dislipidemia; LCC; Cardanol.

ABSTRACT

FERREIRA, Thais de Araujo Marques. **Synthesis of Cardanol Derivatives and Evaluation on Peroxisome Proliferator Activated Receptor**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

The modulation of Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR) expression is involved in several metabolic pathologies and is an important target for research of therapeutical interest. PPAR activation results in antilipidemic, anti-insulin, antiapoptotic, anti-inflammatory and antioxidant activities. Thus, PPAR synthetic agonists were developed to interact specifically with PPAR α the fibrates, and PPAR γ the thiazolidinediones, for the treatment of dyslipidemia and type 2 diabetes, respectively. However, side effects including weight gain, edema, bone fracture and hepatic toxicity have been reported. In a research line aimed at the therapeutic use of phenolic lipids extracted from the cashew nut shell liquid, this study describes the design, synthesis and evaluation of new PPAR ligands. In this context, the synthetic strategy provide 15 target derivatives with yields ranging from 74% to 98%, wich were characterized by spectroscopic methods of analysis. The pharmacological results regarding PPAR activation showed the ability of the ligands to act as dual or pan transcriptional activators of PPAR, with EC₅₀ to micromolar values. In addition, the derivatives increased the oxidation and uptake of fatty acids in primary hepatocytes, and were considered inducers of adipogenesis in preadipocytes. The best active compound of the saturated series was designated as a model compound for pharmacological evaluation *in vivo* due to their transcriptional profile with balanced and partial activity PPAR α/γ , in *Danio rerio* (zebrafish) and in a mouse model of diet-induced obesity, resulting in regulation of energy metabolism with less adverse effects compared to traditional PPAR agonists.

Keywords: PPAR; Diabetes; Dyslipidemia; CNSL; Cardanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura molecular dos fibratos, agentes anti-lipidêmicos, agonistas sintéticos PPAR α	22
Figura 2:	Estrutura molecular de agonistas sintéticos PPAR β/δ , desenvolvidos e com uso descontinuado pela presença de efeitos adversos	23
Figura 3:	Estrutura molecular das tiazolidinadionas, sensibilizadores insulínicos, agonistas sintéticos PPAR γ	25
Figura 4:	Estrutural geral dos receptores nucleares representando as regiões amino (<i>N</i>) e carbóxi-terminais (<i>C</i>), domínio de ligação ao DNA (DBD), região de dobradiça (Hinge) e domínio de ligação ao ligante (LBD)	27
Figura 5:	Ilustração do mecanismo de ativação ligante-dependente de PPAR	28
Figura 6:	Ilustração da adipogênese estimulada pela ativação de PPAR γ	32
Figura 7:	Constituintes do Líquido da Casca da Castanha de Caju: ácidos anacárdicos, cardanois, cardois e metilcardois	39
Figura 8:	Numeração e legendas empregadas no assinalamento de sinais em espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C	51
Figura 9:	Estrutura do controle positivo GW7647 (31), agonista de PPAR α	83

- Figura 10:** Atividade transcricional em PPAR α dos compostos da série saturada LDT10 (**18**), LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) a 50,0 μ M em células HEK293. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo 83
- Figura 11:** Atividade luciferase dos compostos LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) comparada através de curva dose-resposta, em relação ao controle GW7647 (**31**). Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo 84
- Figura 12:** Estrutura do controle positivo WY14643 (**32**), agonista de PPAR α 85
- Figura 13:** Atividade transcricional em PPAR α dos compostos da série insaturada LDT486 (**19**), LDT487 (**25**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**) a 50,0 μ M em células HEK293. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo 85
- Figura 14:** Atividade luciferase das misturas de compostos LDT486 (**19**), LDT487 (**25**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**) comparada através de curva dose-resposta, em relação ao controle GW7647 (**31**) para PPAR α . Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo 86
- Figura 15:** Atividade transcricional em PPAR α dos compostos da 87

série monoinsaturada LDT486A (**20**), LDT487A (**27**), LDT539A (**23**) e LDT540A (**28**) em concentrações de 10,0 nM a 100,0 μ M, em células HEK293. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo

- Figura 16:** Atividade transcricional em PPAR β/δ dos compostos da série saturada LDT10 (**18**), LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) em células HEK293. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo 89
- Figura 17:** Estrutura do controle positivo CAY10592 (**33**), agonista de PPAR β/δ 89
- Figura 18:** Atividade transcricional em PPAR β/δ das misturas de compostos LDT486 (**19**), LDT487 (**25**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**) em células HEK293. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo 90
- Figura 19:** Atividade luciferase das misturas de compostos LDT486 (**19**), LDT487 (**25**) e LDT540 (**26**) comparada através de curva dose-resposta para PPAR β/δ , em relação ao controle GW0742 (**7**). Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo 90
- Figura 20:** Atividade transcricional em PPAR β/δ dos compostos da série monoinsaturada LDT486A (**20**), LDT487A (**27**) e 92

LDT540A (**28**) em células HEK293. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo

- Figura 21:** Atividade transcricional em PPAR γ dos compostos da série saturada LDT10 (**18**), LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) testados a concentração de 50,0 μ M em células HEK293. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo 93
- Figura 22:** Atividade transcricional em PPAR γ do LDT409 (**30**) testado em concentrações de 10,0 nM a 75,0 μ M, em células HEK293. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo 94
- Figura 23:** Atividade luciferase dos compostos LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) comparada através de curva dose-resposta, em relação ao controle rosiglitazona (**9**). Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo 95
- Figura 24:** Atividade transcricional em PPAR γ dos compostos da série insaturada LDT486 (**19**), LDT487 (**25**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**) testados a concentração de 50,0 μ M em células HEK293. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo 96

- Figura 25:** Atividade luciferase das misturas de compostos LDT486 (19), LDT487 (25), LDT539 (22) e LDT540 (26) comparada através de curva dose-resposta, em relação ao controle rosiglitazona (9) para PPAR γ . Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo 96
- Figura 26:** Atividade transcricional em PPAR γ dos compostos da série monoinsaturada LDT486A (20), LDT487A (27), LDT539A (23) e LDT540A (28) testados em concentrações de 10,0 nM a 100,0 μ M em células HEK293Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo 97
- Figura 27:** Efeito dos derivados LDT15 (21), LDT16 (29), LDT408 (24) e LDT409 (30) testados a 50,0 μ M sobre hepatócitos primários. Avaliação da expressão de genes envolvidos na oxidação (FGF21, CPT1, PDK4) e captação (FABP1 e CD36) de AG por qPCR. Resposta aos veículos evidenciada pela linha tracejada. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). * P <0,05, usando teste T com correção de Welch e one way ANOVA com correção Holm-Sidak 101
- Figura 28:** Efeito das misturas de compostos LDT486 (19), LDT487 (25), LDT539 (22) e LDT540 (26) testadas a 50,0 μ M sobre hepatócitos primários. Avaliação da expressão de genes envolvidos na oxidação (FGF21, CPT1, PDK4) e captação (FABP1 e CD36) de AG por qPCR. Resposta aos veículos evidenciada pela linha tracejada. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). * P <0,05, usando 103

teste T com correção de Welch e one way ANOVA com correção Holm-Sidak

- Figura 29:** Efeito dos compostos monoinsaturados LDT486A (**20**), LDT487A (**27**), LDT539A (**23**) e LDT540A (**28**) testadas a 50,0 μ M sobre hepatócitos primários. Avaliação da expressão de genes envolvidos na oxidação (FGF21, CPT1, PDK4) e captação (CD36) de AG por qPCR. Resposta aos veículos evidenciada pela linha tracejada. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). * P <0,05, usando teste T com correção de Welch e one way ANOVA com correção Holm-Sidak 105
- Figura 30:** Efeito dos derivados LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) a 25,0 μ M sobre a adipogênese de pré-adipócitos 3T3-L1. Avaliação da expressão de marcadores de adipogênese: Ap2, LPL, CD36 e adiponectina. Resposta aos veículos evidenciada pela linha tracejada. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). * P <0,05, usando teste T com correção de Welch e one way ANOVA com correção Holm-Sidak 107
- Figura 31:** Efeito das misturas de compostos LDT486 (**19**), LDT487 (**25**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**) a 25,0 μ M sobre a adipogênese de pré-adipócitos 3T3-L1. Avaliação da expressão de marcadores de adipogênese: Ap2, LPL, CD36 e adiponectina. Resposta aos veículos evidenciada pela linha tracejada. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). P <0,05, usando teste T com correção de Welch e one way ANOVA com correção Holm-Sidak 108
- Figura 32:** Efeito dos derivados saturados e das misturas de 110

compostos sobre a adipogênese de pré-adipócitos 3T3-L1 corados com vermelho neutro e observadas por microscopia

- Figura 33:** Análise da viabilidade celular por ensaio de MTT de células HEK293 tratadas com o veículo, controles positivos e derivados LDTs. Os resultados são apresentados como média +-EPM (N = 3) 112
- Figura 34:** Análise da viabilidade celular por ensaio de MTT de células HEK293 e H9c2 tratadas com o veículo, controles positivos e derivados LDTs. Os resultados são apresentados como média +- EPM (N = 3). Os derivados LDT380 e LDT407 representados na figura não configuram se importantes para este trabalho 112
- Figura 35:** Avaliação *in vivo* em zebrafish da ativação transcricional dos subtipos de PPAR induzida pelos derivados de cadeia saturada, LDT15 (**21**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**), comparados aos controles positivos WY14643 (**32**), GW0742 (**7**) e rosiglitazona (**9**), e ao veículo DMSO 114

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1:	Planejamento estrutural dos derivados-alvo em que o grupo polar visa interações com aminoácidos conservados entre PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ , e a cadeia alifática monoinsaturada mimetiza o ácido oleico, agonista endógeno de PPAR	45
Esquema 2:	Planejamento sintético dos derivados-alvo	48
Esquema 3:	Metodologia sintética para obtenção da série saturada	73
Esquema 4:	Metodologia sintética para obtenção da série mono-, di- e trieno-insaturada	75
Esquema 5:	Metodologia sintética para obtenção da série monoinsaturada	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Características físico-químicas e principais sinais em RMN de ^1H e RMN de ^{13}C obtidos para os derivados LDT15 (21), LDT16 (29), LDT408 (24) e LDT409 (30)	74
Tabela 2:	Características físico-químicas e principais sinais em RMN de ^1H e RMN de ^{13}C obtidos para as misturas de compostos LDT486 (19), LDT487 (25), LDT539 (22) e LDT540 (26)	76
Tabela 3:	Assinalamentos de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C das cadeias insaturadas para as misturas de compostos LDT10i (16), LDT486 (19), LDT487 (25), LDT539 (22) e LDT540 (26)	77
Tabela 4:	Características físico-químicas e principais sinais em RMN de ^1H e RMN de ^{13}C obtidos para os compostos monoinsaturados LDT486A (20), LDT487A (27), LDT539A (23) e LDT540A (28)	79
Tabela 5:	Assinalamentos de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C das cadeias monoinsaturadas para os derivados LDT486A (20), LDT487A (27), LDT539A (23) e LDT540A (28)	80
Tabela 6:	Valores de EC_{50} para os compostos LDT15 (21), LDT16 (29), LDT408 (24) e LDT409 (30) (série saturada) e o controle positivo GW7647 (31), no PPAR α	84
Tabela 7:	Valores de EC_{50} para as misturas de compostos LDT486 (19), LDT487 (25), LDT539 (22) e LDT540 (26) (série mono-, di- e trieno-insaturadas) e o controle GW7647 (31), no PPAR α	86

Tabela 8:	Valores de EC ₅₀ para os compostos LDT486A (20), LDT487A (27), LDT539A (23) e LDT540A (28) (série monoinsaturada) e o controle GW7647 (31), no PPAR α	88
Tabela 9:	Valores de EC ₅₀ para as misturas de compostos LDT486 (19), LDT487 (25), LDT539 (22) e LDT540 (26) (série mono-, di- e trieno-insaturadas) e o controle GW0742 (7), para PPAR β/δ	91
Tabela 10:	Valores de EC ₅₀ para os compostos LDT486A (20), LDT487A (27), LDT540A (28) (série monoinsaturada) e o controle positivo GW0742 (7), no PPAR β/δ	93
Tabela 11:	Valores de EC ₅₀ para os compostos LDT15 (21), LDT16 (29), LDT408 (24) e LDT409 (30) (série saturada) e do controle positivo rosiglitazona (9), no PPAR γ	95
Tabela 12:	Valores de EC ₅₀ para as misturas de compostos LDT486 (19), LDT487 (25), LDT539 (22) e LDT540 (26) (série mono-, di- e trieno-insaturadas) e o controle rosiglitazona (9), no PPAR γ	97
Tabela 13:	Valores de EC ₅₀ para os compostos LDT486A (20), LDT487A (27), LDT539A (23) e LDT540A (28) (série monoinsaturada) e o controle rosiglitazona (9), no PPAR γ	99
Tabela 14:	Perfil de atividade e valores de EC ₅₀ em μ M para os derivados-alvo em PPAR	99
Tabela 15:	Perfil de atividade dos derivados-alvo na expressão de genes em hepatócitos primários	106

Tabela 16:	Perfil de atividade dos derivados-alvo na diferenciação de adipócitos	111
-------------------	---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACO – Acetil Coenzima A
AF-1 – Função de ativação 1
AF-2 – Função de ativação 2
AG – Ácidos graxos
ALT – Alanina transaminase
ANGPTL4 - Proteína 4 Semelhante a Angiopietina
aP2 – Proteína de Adipócitos tipo 2
Aqp – Aquaporinas
AST – Aspartato transaminase
ATP – Adenosina trifosfato
Bnp – Peptídeo natriurético tipo B
CCD – Cromatografia em camada delgada
CD36 – Grupamento de diferenciação 36
CD68 – Grupamento de diferenciação 68
CDK5 – Quinase dependente de ciclina 5
CEBP α – Proteína estimuladora de ligação CCAAT alfa
CEBP β – Proteína estimuladora de ligação CCAAT beta
Col1a1 - Colágeno tipo 1
CPT1 – Carnitina Palmitoil Transferase 1
d – duplete
DBD – Domínio de ligação ao DNA
DCM – Diclorometano
dd – duplo duplete
DHGNA – Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DP – Desvio padrão
EC₅₀ – Concentração do composto que induz metade do efeito máximo
Eq. – Equivalente
FABP1 – Proteína de Ligação a Ácidos Graxos 1

FDA – Food and Drug Administration
FGF1 – Fator de Crescimento de Fibroblastos 1
FGF21 – Fator de Crescimento de Fibroblastos 21
GLUT1 – Transportador de Glicose Tipo 1
GLUT4 – Transportador de Glicose Tipo 4
His – Histidina
HATs – Histonas Acetiltransferases
HEPES – Ácido (4-(2-hidróxietil)-1-piperazine etanol sulfônico
Hex – Hexano
HDACs – Histonas Desacetilases
HDL – Lipoproteína de Alta Densidade
HFD – High Fat Diet
Hz – Hertz
IL-1 – Interleucina 1
IL-1 β – Interleucina 1 β
IL-6 – Interleucina 6
J – Constante de acoplamento
LADETER – Laboratório de Desenvolvimento de Estratégias Terapêuticas
LBD – Domínio de Ligação ao Ligante
LCC – Líquido da casca da Castanha do Caju
LC/MS - Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas
LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade
LDT – Laboratório de Desenvolvimento de Inovações Terapêuticas
LPL – Lipoproteína Lipase
m – Multipleteo
 μ M – Micromolar
mg – Miligramas
MHz – Megahertz
mL – Mililitros
MO – Micro-ondas
MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazóli
NF- κ B – Fator de Transcrição Nuclear kappa B
nM – Nanomolar
NR1C1 – Membro 1 do grupo C da sub-família 1 dos RN

NR1C2 – Membro 2 do grupo C da sub-família 1 dos RN
NR1C3 – Membro 3 do grupo C da sub-família 1 dos RN
PBS – Tampão fosfato-salino
Pd/C – Paládio em carvão
PDK4 – Piruvato Desidrogenase Lipoamida Quinase Isoenzima 4
p.f – Ponto de fusão
PGC1 α – Co-ativador 1 alfa do receptor ativado por proliferadores peroxissomais gama
PPAR – Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais
PPAR α – Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais Alfa
PPAR β/δ – Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais Beta/Delta
PPAR γ – Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais Gama
PPER – Elementos Responsivos ao PPAR
ppm – Partes Por Milhão
qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RLU – Unidades Relativas de Luciferase
Rf – Fator de Retenção
RMN de ^1H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1
RMN de ^{13}C – Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RN – Receptor Nuclear
RNA – Ácido ribonucleico
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
RXR - Receptor retinóide X
s – Simpleto
Ser273 – Serina 273
sl – Sinal largo
t – Tripleto
t.a – Temperatura ambiente
TAB – Tecido Adiposo Branco
TAM – Tecido Adiposo Marrom
TG – Triglicerídeos
THF – Tetrahydrofurano
TMS – Tetrametilsilano
TNF α – Fator de Necrose Tumoral α

Tyr – Tirosina

TZD – Tiazolidinadionas

UCP1 – Proteína de desacoplamento 1

UV – Ultravioleta

VLDL – Lipoproteína de Densidade Muito Baixa

Y473 – Tirosina 473

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAIS	20
1.2 PPAR α	20
1.3 PPAR β/δ	22
1.4 PPAR γ	24
1.5 ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL E MECANISMO DE ATIVAÇÃO DOS PPARs.....	26
1.6 PPAR COMO ALVO TERAPÊUTICO PARA DOENÇAS METABÓLICAS. 29	
1.6.1 Síndrome Metabólica	29
1.6.2 Dislipidemia e Obesidade.....	30
1.6.3 Diabetes tipo 2	32
1.6.4 Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica	34
1.7 NOVOS AGONISTAS SINTÉTICOS PPAR	36
1.8 LIPÍDEOS FENÓLICOS DE <i>Anacardium occidentale</i>	38
2 OBJETIVOS	41
2.1 OBJETIVO GERAL	42
2.1.1 Objetivos Específicos	42
3 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL	43
4 ESTRATÉGIA SINTÉTICA	46
5 PARTE EXPERIMENTAL	49
5.1 METODOLOGIA SINTÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS	50
5.1.1 Obtenção da Mistura de Cardanois (LDT10i, 16)	51
5.1.2 Obtenção do Cardanol Monoinsaturado (LDT10iA, 17)	52
5.1.3 Obtenção do Derivado 3-Pentadecilfenol (LDT10, 18).....	53
5.1.4 Obtenção da Mistura de Ésteres LDT486 (19) e dos derivados β -oxiésteres LDT486A (20) e LDT15 (21)	54
5.1.5 Obtenção da Mistura de Ésteres LDT539 (22) e dos Derivados α,α -Dimetiléster LDT539A (23) e LDT408 (24).....	56

5.1.6 Síntese das Misturas de Ácidos LDT487 (25) e LDT540 (26) e dos Derivados β -oxoácidos LDT487A (27), LDT540A (28), LDT16 (29) e LDT409 (30).....	59
5.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	63
5.2.1 Reagentes Químicos	63
5.2.2 Plasmídeos	64
5.2.3 Linhagens Celulares e Condições para Cultivo.....	64
5.2.4 Ensaio de Gene Reporter.....	65
5.2.5 Ensaio em Hepatócitos Primários	65
5.2.6 Ensaio de Diferenciação de Adipócitos	66
5.2.7 Extração de RNA, Síntese de DNA e Análise por qPCR.....	67
5.2.8 Ensaio de Viabilidade Celular.....	68
5.2.9 Sistema Reporter Fluorescente em <i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	68
5.2.10 Análise Estatística	69
RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
6 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO	71
6.1 OBTENÇÃO DA MISTURA DE CARDANOIS (LDT10i, 16)	72
6.2 SÉRIE SATURADA	73
6.3 SÉRIE INSATURADA	75
6.4 SÉRIE MONOINSATURADA	77
7 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	81
7.1 ENSAIO DE GENE REPORTER.....	82
7.1.1 PPAR α	82
7.1.2 PPAR β/δ	89
7.1.3 PPAR γ	93
7.2 ENSAIO EM HEPATÓCITOS PRIMÁRIOS.....	100
7.3 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO DE ADIPÓCITOS	106
7.4 EFEITOS DOS COMPOSTOS E DAS MISTURAS INSATURADAS NA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE HEK293 E H9C2.....	111
7.5 SISTEMA REPORTER FLUORESCENTE EM <i>DANIO RERIO</i>	113
7.6 DESDOBRAMENTOS DA PESQUISA.....	115
8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	116
9 REFERÊNCIAS	119
ANEXOS	128

1.INTRODUÇÃO

Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomais (PPARs) são fatores de transcrição induzidos por moléculas sinalizadoras lipofílicas que se dividem em três isoformas: PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ , sendo particularmente efetivos na manutenção da homeostase energética celular por meio da indução da sensibilização insulínica e da promoção da oxidação e armazenamento de ácidos graxos (DOMÍNGUEZ-AVILA et al. 2016; FENG et al., 2016; HASHIMOTO et al., 2018; HAZLEHURST et al., 2016; MCQUEEN, 2010).

Agonistas sintéticos de PPAR foram desenvolvidos para interagir especificamente com PPAR α , os fibratos, e PPAR γ , as tiazolidinadionas (TZDs), com o objetivo de ativar a expressão de PPAR em células periféricas visando o tratamento de dislipidemia e diabetes tipo 2, respectivamente. No entanto, a ativação farmacológica de PPAR apresenta efeitos adversos, restringindo sua utilização terapêutica (AMENT et al., 2015; CAPELLI et al., 2016; DOMÍNGUEZ-AVILA et al. 2016; LAGANÀ et al., 2016).

Apesar dos efeitos adversos associados ao agonismo do receptor, o desenvolvimento de novos ligantes com ação mediada por PPAR tem sido re-explorado como alvo para diferentes doenças. Adicionalmente, estudos na área da lipidômica, estudo qualitativo e quantitativo da composição de lipídeos em sistema biológico relacionados a doenças como câncer, diabetes, doença de Alzheimer e doenças infecto-contagiosas, têm focado interesse no papel dos ácidos graxos e seus derivados na modulação dos PPARs.

No âmbito de uma linha de pesquisas que visa a utilização de lipídeos fenólicos extraídos de *Anacardium occidentale*, este trabalho descreve o planejamento, a síntese e a avaliação de novos ligantes PPAR a partir do cardanol, derivado do líquido da casca de castanha de caju (LCC). A cadeia alquílica do cardanol, similar aos ácidos graxos de cadeias longas, possui características relevantes para o reconhecimento hidrofóbico nos sítios de reconhecimento molecular, bem como no desenvolvimento de novas funcionalidades por meio de interconversão de grupos funcionais (HAMAD; MUBOFU, 2015; NG et al., 2017; VASAPOLLO et al., 2011).

1.1 RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAIS

Os Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomais, pertencentes à família de Receptores Nucleares (RN), são fatores de transcrição ativados em resposta a moléculas sinalizadoras lipofílicas, originalmente clonados a partir de peroxissomas hepáticos de ratos, organelas responsáveis pela regulação do metabolismo de ácidos graxos (CORONA; DUCHEN, 2016; GHONEM; ASSIS; BOYER, 2015; KAHREMANY et al., 2014; SCHWARZ et al., 2016).

Os PPARs estão vinculados a diversos processos metabólicos, implicados na proliferação e diferenciação celular, angiogênese e proteção vascular. Particularmente efetivos na sensibilização insulínica do tecido adiposo, músculo e fígado, bem como na promoção da captação e armazenamento de ácidos graxos, os PPARs são considerados importantes alvos terapêuticos de doenças metabólicas (CORONA, DUCHEN, 2016; DOMÍNGUEZ-AVILA et al. 2016; FENG et al., 2016; HAZLEHURST et al., 2016; SANTOS, 2014).

Três isotipos desta família de receptores foram identificadas em mamíferos, PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ , codificadas por distintos genes, com diferentes perfis de expressão nos tecidos, especificidade de ligantes e atividades regulatórias metabólicas (DUBOIS et al., 2017; DUHART et al., 2016; HASHIMOTO et al., 2018; LAGANÀ et al., 2016).

Neste sentido, temos PPAR α ou NR1C1 – membro 1 do grupo C da subfamília 1 dos RN codificado por genes localizados no cromossomo 22q12.2-13.1 –; PPAR β/δ ou NR1C2 – membro 2 do grupo C da subfamília 1 dos RN codificado por genes localizados no cromossomo 6p21.1-21.2 – e PPAR γ ou NR1C3 – membro 3 do grupo C da subfamília 1 dos RN codificado por genes localizados no cromossomo 3p25 (DONG et al., 2015; DUBOIS et al., 2017; SAHEBKAR; CHEW; WATTS, 2014; TAIN; HSU; CHAN, 2015).

1.2 PPAR α

O suptipo α é expresso em tecidos metabolicamente ativos incluindo fígado, coração, mucosa intestinal, musculo esquelético, tecido adiposo marrom (TAM), e possui como ligantes endógenos: ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa,

ácido linoleico, ácido docosaexaenoico e ácido eicosapentaenoico, derivados do ácido araquidônico e endocanabinóides (AMENT et al., 2015; DOMÍNGUEZ-AVILA et al. 2016; LAGANÀ et al., 2016; YAMADA et al., 2016).

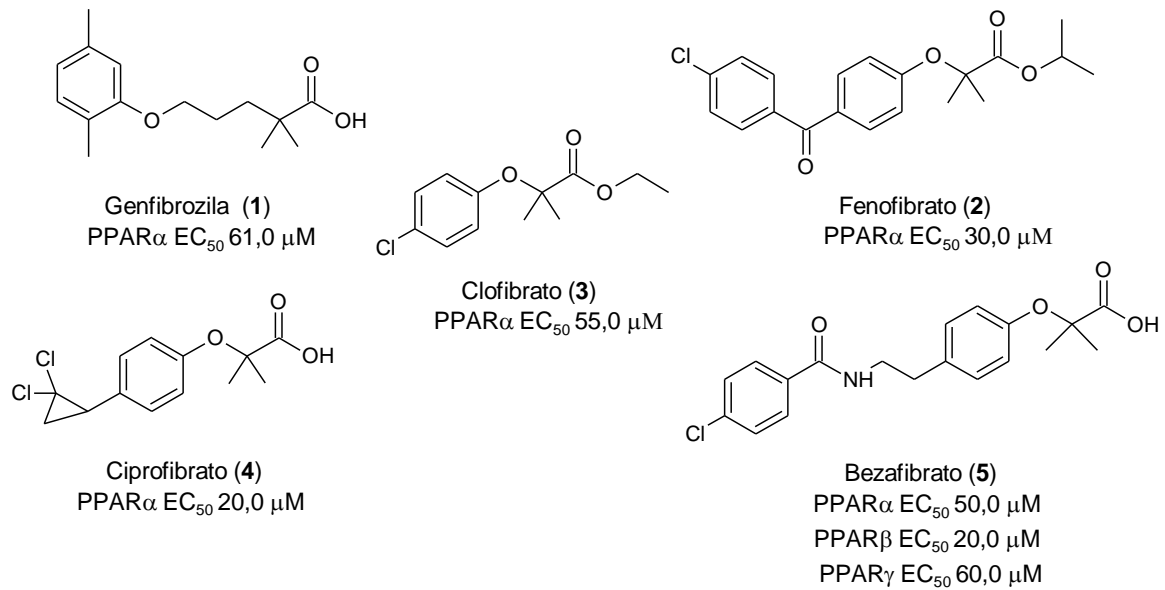
A ativação de PPAR α reduz os níveis de triglicerídeos (TG) e de colesterol LDL (c-LDL), enquanto aumenta a síntese de colesterol HDL (c-HDL) através de mecanismos que incluem β oxidação hepática, promoção do transporte de ácidos graxos, indução da expressão de lipoproteína lipase, modulação de vias hepáticas lipogênicas, e estimulação da síntese de apolipoproteínas (AMENT et al., 2015; BARB; PORTILLO-SANCHEZ; CUZI, 2016; HASHIMOTO et al., 2018; ISHIBASHI et al., 2016; YAMADA et al., 2016).

Em adição, a ativação de PPAR α também exerce atividade anti-inflamatória por meio da redução da expressão das proteínas estimuladoras de ligação CCAAT alfa (CEBP α) e beta (CEBP β) e do Fator de Transcrição Nuclear kappa B (NF- κ B), levando a baixos níveis de proteína C-reativa, Interleucina-6 (IL-6) e prostaglandinas (BOTTA et al., 2018).

Os efeitos de PPAR α são predominantes no fígado, onde o receptor desempenha papel-chave na redução da gordura hepática e previne a esteatose. No fígado, no pâncreas e o no tecido adiposo, a ativação de PPAR α induz a expressão do Fator de Crescimento de Fibroblastos 21 (FGF21), responsável pela regulação do metabolismo de lipídeos e da glicose, promoção da oxidação de ácidos graxos e cetogênese. Assim como, aumenta a expressão de Proteína 4 que é semelhante a Angiopietina (ANGPTL4) com ação no armazenamento e mobilização de lipídeos séricos, reduzindo os níveis de c-LDL (AMENT et al., 2015; LAGANÀ et al., 2016; TAIN; HSU; CHAN, 2015; ZAREI et al., 2017).

Os fibratos, derivados arilóxiálquilácidos (Figura 1), correspondem aos agonistas sintéticos de PPAR α como genfibrozila (1), fenofibrato (2), clofibrato (3) e ciprofibrato (4), sendo aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e disponíveis comercialmente para o tratamento de dislipidemia. Por sua vez, bezafibrato (5) é considerado agonista pan PPAR por ativar os três isotipos: PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ (DUBOIS et al., 2017; GHONEM; ASSIS; BOYER, 2015; LAGANÀ et al., 2016; TAIN; HSU; CHAN, 2015).

Figura 1: Estrutura molecular dos fibratos, agentes anti-lipidêmicos, agonistas sintéticos PPAR α



Fonte: BERGER; ROBERTS, 2005; GUERRE-MILLO et al., 2000

A ativação do receptor por essa classe de fármacos resulta na redução de 30-50 % de TG plasmáticos, diminuição dos níveis de VLDL e aumento de 5-20 % de c-HDL, em consequência da β oxidação, lipólise e indução da transcrição de apolipoproteínas AI/AII. Como resultado tem-se a redução de aterosclerose, melhora da sensibilidade insulínica e dos níveis plasmáticos de glicose. Os fibratos são bem tolerados pela maioria dos pacientes; porém, alguns efeitos adversos foram observados e incluem distúrbios gastrointestinais e toxicidade hepática, associados a proliferação de peroxissomas no fígado (ISHIBASHI et al., 2018; LAGANÀ et al., 2016; SANTOS, 2014; TAIN; HSU; CHAN, 2015; UGWU et al., 2018).

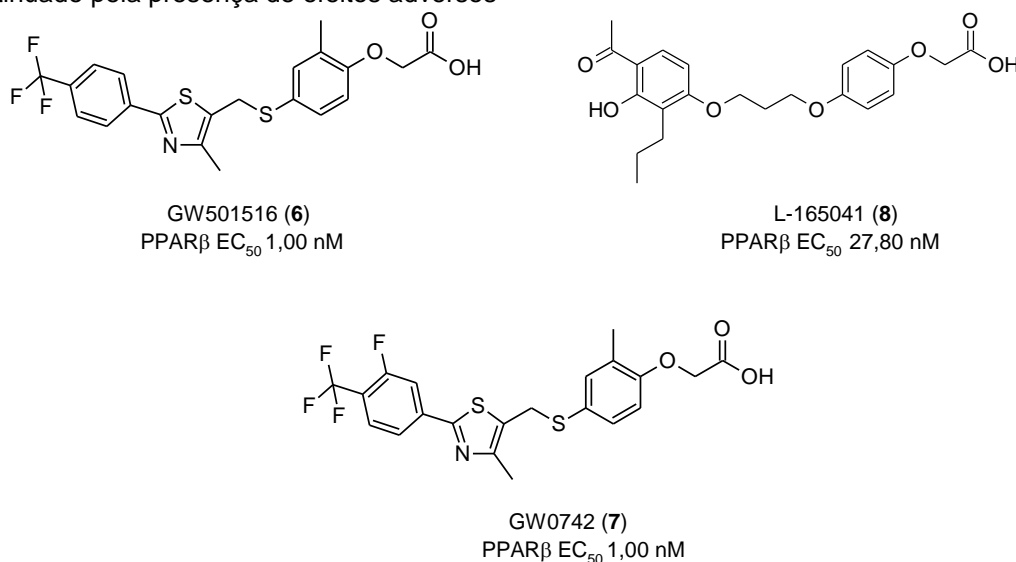
1.3 PPAR β/δ

PPAR β/δ possui alta expressão na pele, fígado, músculo esquelético, tecido adiposo e coração, sendo expresso ubiquamente em outros tecidos, e ativado endogenamente por ácidos graxos de cadeia longa, triacilgliceróis, prostaciclina e ácido retinóico (AMENT et al., 2015; DOMÍNGUEZ-AVILA et al. 2016; LAGANÀ et al., 2016; RIGANO; SIRIGNANO; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2017).

Fisiologicamente, a expressão de PPAR β/δ promove sensibilidade insulínica, redução dos níveis de glicose, β oxidação de ácidos graxos no tecido adiposo e regulação da fisiologia do músculo esquelético, melhorando os perfis lipídicos e prevenindo a obesidade. Em estudos com animais *knockout* do receptor β/δ , os camundongos apresentaram intolerância à glicose sob dieta normal e foram induzidos à obesidade quando administrada dieta rica em lipídeos (AMENT et al., 2015; DOMÍNGUEZ-AVILA et al. 2016; DONG et al., 2015; KAHREMAN Y et al., 2014; LAGANÀ et al., 2016; TAIN; HSU; CHAN, 2015; ZAREI et al., 2017).

Agonistas sintéticos PPAR β/δ como GW501516 (6), GW0742 (7) e L-1650 (8) (Figura 2) foram desenvolvidos e estão sendo avaliados para o tratamento de síndrome metabólica, obesidade, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares, resultando na regulação do metabolismo de lipídeos e da homeostase energética, na prevenção da hipertensão arterial, na redução do remodelamento cardiovascular e da inflamação, na promoção da função endotelial, inibição do estresse oxidativo e da sinalização proliferativa (AMENT et al., 2015; LAGANÀ et al., 2016; SAHEBKAR; CHEW; WATTS, 2014; TORAL et al., 2017).

Figura 2: Estrutura molecular de agonistas sintéticos PPAR β/δ , desenvolvidos e com uso descontinuado pela presença de efeitos adversos



Fonte: GILLILAN; AYERS; NOY, 2007; WOOD, 2006

Em adição, estudos recentes evidenciaram o papel de PPAR β/δ na indução da diferenciação terminal e inibição da inflamação inata, sugerindo seu efeito anticâncer. Adicionalmente, pacientes com câncer colorretal apresentaram menor

expectativa de vida quando observados níveis reduzidos desse receptor, demonstrando a necessidade de novos estudos para estabelecimento dos efeitos fisiológicos resultantes da ativação do isotipo β/δ (LAKSHMI et al., 2017; SANTOS, 2014).

1.4 PPAR γ

O isotipo γ divide-se em duas proteínas, PPAR γ 1, expresso ubiquamente na maioria dos tecidos, e PPAR γ 2, expresso restritamente no tecido adiposo branco (TAB) e marrom. Esta última difere pela presença adicional de 30 resíduos de aminoácidos no domínio amino-terminal que confere maior atividade transcricional quando comparado a PPAR γ 1 (DOMÍNGUEZ-AVILA et al. 2016; LAGANÀ et al., 2016; MINATEL et al., 2016; RIGANO; SIRIGNANO; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2017).

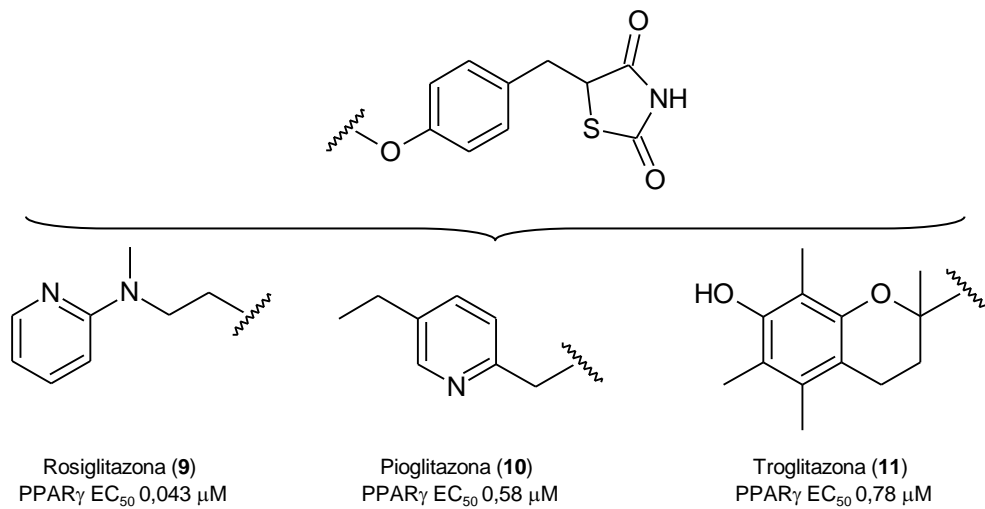
Os ligantes endógenos de PPAR γ incluem ácidos graxos poli-insaturados, prostanoídes, ácido nitrooléico, o derivado de prostaglandina J₂ 15-deóxi-delta-12,14 e endocanabinóides. A ação central do receptor dá-se na regulação do metabolismo de lipídeos e da glicose, através da promoção da adipogênese, armazenamento de lipídeos, sensibilidade insulínica e utilização de glicose. Em adição, a ativação de PPAR γ promove o efluxo de colesterol dos macrófagos, reduzindo a inflamação, e está implicada na regulação da expressão de citocinas e de células, resultando em remodelamento do equilíbrio imunológico (AMENT et al., 2015; CHOI et al., 2018; DOMÍNGUEZ-AVILA et al. 2016; DUHART et al., 2016; FENG et al., 2016; LAGANÀ et al., 2016).

Em particular, PPAR γ 2 consiste em um efetivo ativador de transcrição, modulado durante a ingestão de nutrientes e em resposta à obesidade, por prevenir lipotoxicidade, promover a excreção de lipídeos dos tecidos periféricos, estimular a resposta proliferativa de células β à sensibilidade insulínica, promover a diferenciação de adipócitos e mediar a funcionalidade termogênica de adipócitos marrons (DUHART et al., 2016; LAGANÀ et al., 2016; LASAR et al., 2018).

A ativação de PPAR γ por agonistas sintéticos dá-se por derivados tiazolidinadiônicos como a rosiglitazona (**9**), pioglitazona (**10**) e troglitazona (**11**) (Figura 3), que determinam as modificações na morfologia celular dos adipócitos,

induzindo a diferenciação de células estaminais do tecido adiposo em adipócitos maduros, a distribuição de gordura, a melhora da resistência insulínica pela expressão de fatores adipocitários e proteção de células pancreáticas, e a regulação dos metabolismos de lipídeos e da glicose (DUHART et al., 2016; JIA et al., 2014; LAGANÀ et al., 2016; PAN et al., 2017).

Figura 3: Estrutura molecular das tiazolidinadonas, sensibilizadores insulínicos, agonistas sintéticos PPAR γ



Fonte: MABILLEAU; CHAPPARD; BASLÉ, 2011; SAHIN, 2017

Em adição, evidências sugerem que os efeitos antidiabéticos mediados pelas TZDs ocorra por mecanismos que não dependam somente da ativação do receptor, e sim por bloquear um processo denominado de fosforilação. A inibição da expressão gênica da quinase dependente de ciclina 5 (CDK5), reduz a fosforilação de Ser 273 de PPAR γ , modificando a expressão de genes, promovendo o aumento dos níveis de adiponectina e a sensibilidade insulínica mediada por esta classe de compostos (BRIDI, 2016).

No entanto, as TZDs promovem efeitos adversos que incluem a síntese de triglicerídeos, expansão do tecido adiposo e ganho ponderal, retenção de líquidos nos ductos coletores renais, toxicidade hepática, falha cardíaca congestiva, quando o tratamento é iniciado em paciente com disfunção diastólica ou doença cardíaca congestiva, assim como perda de massa óssea no gênero feminino por induzir adipogênese e osteoclastogênese no osso, e inibir a diferenciação de osteoblastos, limitando sua utilização terapêutica (AN et al., 2018; BARB, PORTILLO-SANCHEZ, CUZI, 2016; DOMÍNGUEZ-AVILA et al. 2016; JIA et al., 2014; PAN et al., 2017).

Os efeitos adversos mediados pelas TZDs podem ocorrer pelo agonismo total, potente e seletivo em PPAR γ , conduzindo à sua ativação supra fisiológica em vários tecidos e órgãos, ou devido a efeitos específicos de determinado composto, como o uso da rosiglitazona associado ao risco de infarto do miocárdio (CHRIST, 2016).

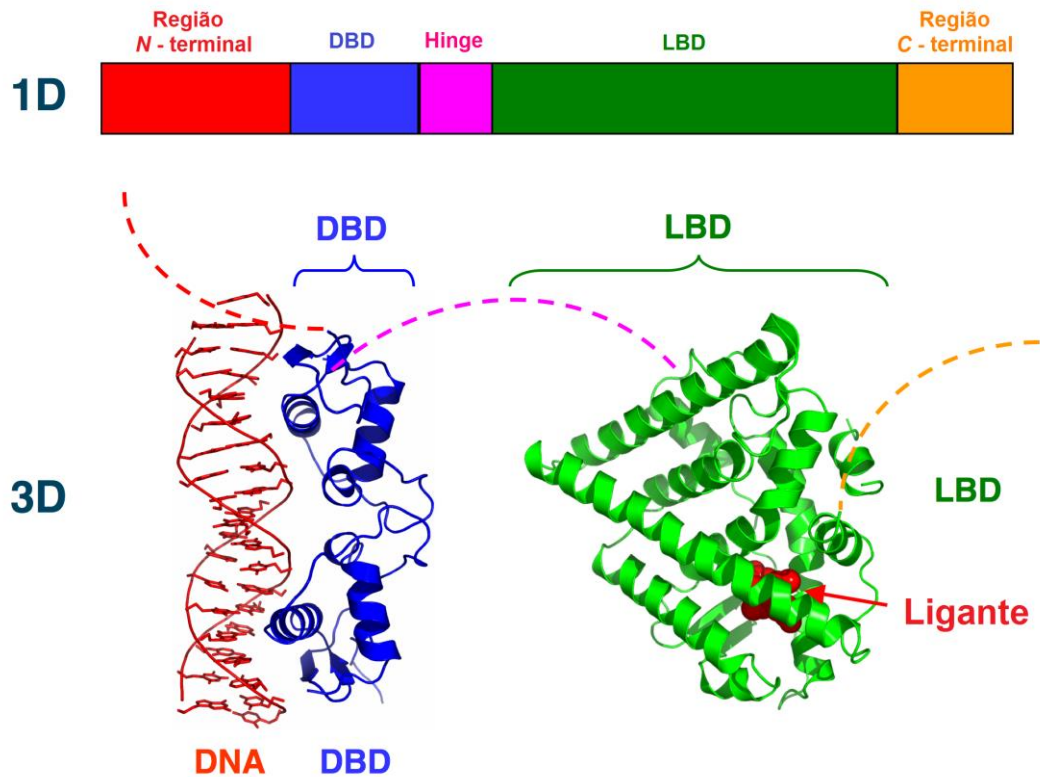
Empregada de forma comercial, mas restrita a alguns países da Europa devido ao aparecimento de casos de câncer de bexiga, a pioglitazona é a única TZD disponível para uso clínico como sensibilizadora insulínica e adicionalmente atuando na redução dos níveis de glicose e triglicérides circulantes (DUHART et al., 2016; LEE et al., 2017).

Neste sentido, novos estudos propõe a busca por ligantes seletivos, que modulem parcialmente a ativação de PPAR γ , estabilizem o receptor e induzam o bloqueio da fosforilação de Ser273, promovendo as atividades benéficas de sua ativação na redução da glicose e sensibilização insulínica, com redução dos efeitos secundários indesejados (BRIDI, 2016).

1.5 ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL E MECANISMO DE ATIVAÇÃO DOS PPARs

A organização estrutural dos PPARs, assim como de outros receptores nucleares, é composta por regiões e domínios funcionais (Figura 4). A região amino-terminal A/B, com função de transativação independente de ligante (AF-1), permite a interação do receptor com co-ativadores, co-repressores e outros fatores de transcrição. O domínio de ligação ao DNA (DBD) atua no reconhecimento de elementos responsivos ao PPAR (PPRE). Por sua vez, o hinge ou região de dobradiça serve de elo entre o DBD e o domínio de ligação ao ligante (LBD), o qual tem função de transativação dependente de ligante e apresenta 60 a 70 % de homologia entre os isotipos. Por fim, a região carbóxi-terminal (AF-2), permite modificações conformacionais do receptor na presença do ligante, conduz ao recrutamento de co-ativadores e desligamento de co-repressores (DUHART et al., 2016; KAHREMAN et al., 2014; MANSOUR, 2014; RIGANO; SIRIGNANO; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2017; SCHWARZ et al., 2016).

Figura 4: Estrutura geral dos receptores nucleares representando as regiões amino (*N*) e carbóxi-terminais (*C*), domínio de ligação ao DNA (DBD), região de dobradiça (Hinge) e domínio de ligação ao ligante (LBD)



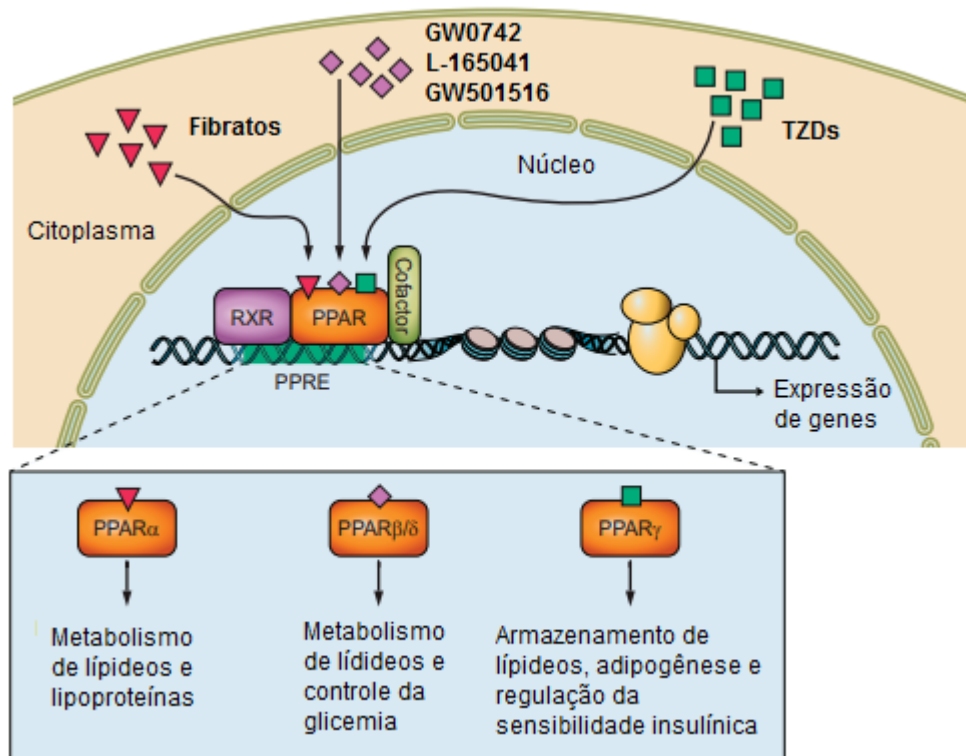
Fonte: Adaptado de Wikimedia Commons, 2007

O comprimento e a sequência de aminoácidos de cada domínio variam entre os PPARs, assim como as alterações funcionais. Todos os subtipos apresentam o LBD em formato de “Y”, constituído por um braço central predominantemente polar e bem conservado, e dois braços laterais hidrofóbicos e menos conservados. Por sua vez, o LBD de PPAR α e PPAR γ é significativamente maior que o de PPAR β/δ , que possui o domínio mais estreito na região adjacente a hélice 12. Como resultado, PPAR β/δ não acomoda substituintes volumosos, limitando a busca por ligantes (AN et al., 2018; BATISTA et al., 2012; XU et al., 2001).

Adicionalmente, a ação e os efeitos adversos de agonistas PPAR dependem da interação com algumas moléculas que atuam como co-ativadoras – histonas acetiltransferases (p300/CBP) – ou co-repressoras – histonas desacetilases (NCoR, SMRT) – resultando no remodelamento da cromatina e interação com a maquinaria basal de transcrição (CAPELLI et al., 2016; GHONEM; ASSIS; BOYER, 2015; LAGANÀ et al., 2016; SANTOS, 2014; TAIN; HSU; CHAN, 2015).

Uma vez ativado por ligantes endógenos ou sintéticos (Figura 5) que interagem com seu domínio LBD, PPAR se heterodimeriza com o Receptor X Retinóide (RXR) promovendo a dissociação de proteínas co-repressoras e o ancoramento de proteínas co-ativadoras. A expressão do gene alvo é regulada pela ligação do DBD do heterodímero PPAR-RXR à extremidade 3' e 5' dos elementos responsivos ao PPAR no núcleo celular. Os PPRE correspondem a repetições de sequências consenso AGGTCA separadas por um nucleotídeo, responsáveis pelo início da transcrição de genes alvo e indução da sinalização de cascatas que medeiam os efeitos fisiológicos do receptor na regulação de processos metabólicos (DOMÍNGUEZ-AVILA et al. 2016; DUBOIS et al., 2017; DUHART et al., 2016; LAGANÀ et al., 2016; SCHWARZ et al., 2016; YAMADA et al., 2016).

Figura 5: Ilustração do mecanismo de ativação ligante-dependente de PPAR



Fonte: Adaptado de TORAL et al., 2017

Na ausência de ligante, o heterodímero PPAR-RXR encontra-se em sua forma inativa ligado a proteínas co-repressoras, as quais recrutam desacetilases de histonas, responsáveis por condensar a estrutura da cromatina no local da interação entre o receptor e seus elementos responsivos, impedindo a ativação da maquinaria

transcricional de genes (CAPELLI et al., 2016; RIGANO; SIRIGNANO; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2017; TAIN; HSU; CHAN, 2015).

1.6 PPAR COMO ALVO TERAPÊUTICO PARA DOENÇAS METABÓLICAS

1.6.1 Síndrome Metabólica

A síndrome metabólica acomete cerca de 25 % da população mundial e sua prevalência crescente está relacionada à alimentação rica em lipídeos e falta de atividade física, em associação ao aumento da idade. Por definição, a síndrome metabólica é uma condição fisiopatológica representada pela junção de desordens relacionadas ao desequilíbrio na utilização e armazenamento de energia, incluindo diabetes tipo 2, aterosclerose, esteatose hepática e doença cardiovascular (BLACKFORD et al., 2016; DONG et al., 2015; DUBOIS et al., 2017; HWANG; LEE, 2016; PAN et al., 2017; RIGANO; SIRIGNANO; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2017).

Pacientes com síndrome metabólica apresentam cinco vezes maior risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2, devido à resistência insulínica e a obesidade abdominal, o que resulta em maior incidência de infarto do miocárdio, em torno de três a quatro vezes. Em adição, os danos degenerativos ocasionados à estrutura vascular pelo acúmulo de lipídeos conduzem à aterosclerose, a maior causa de doença cardiovascular. Desta maneira, indivíduos com diagnóstico de síndrome metabólica apresentam como principal comorbidade o risco cardiovascular, responsável por 31 % dos óbitos mundiais (BLACKFORD et al., 2016; HWANG; LEE, 2016; ISHIBASHI et al., 2016; SZKUP et al., 2018).

Dois abordagens são utilizadas para o tratamento da síndrome metabólica. Inicialmente, modificações nos hábitos de vida através da redução da captação de calorias e aumento do gasto energético pela atividade física. Em segundo lugar, estão as intervenções farmacêuticas voltadas ao tratamento individual dos componentes da síndrome (BLACKFORD et al., 2016; DUBOIS et al., 2017; WANG et al., 2014).

Evidências recentes suportam a importância terapêutica dos PPARs como alvo para o tratamento farmacológico das doenças metabólicas, uma vez que são

responsáveis por promover sensibilidade insulínica, reduzir a inflamação e regular o metabolismo de lipídeos e da glicose, mecanismos patológicos comuns às desordens metabólicas (DONG et al., 2015; DUBOIS et al., 2017; RIGANO; SIRIGNANO; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2017; TAIN; HSU; CHAN, 2015).

Além disso, PPARs são expressos no sistema cardiovascular, onde a ativação do isotipo α pode inibir a produção de endotelina 1 e reduzir a fibrose cardíaca, enquanto a ativação de PPAR γ regula a hipertrofia de cardiomiócitos e reduz a pressão arterial, melhorando a estrutura do miocárdio e resultando em efeitos protetores cardíacos (SUN et al., 2018; SZKUP et al., 2018). Estudos recentes demonstraram efetiva ação dos fibratos na prevenção de doença cardiovascular (FUJIOKA, 2018; ISHIBASHI et al., 2018).

1.6.2 Dislipidemia e Obesidade

A dislipidemia consiste em uma desordem lipídica caracterizada por excesso de TG, redução dos níveis de c-HDL e elevação de c-LDL. Quando associada à obesidade, a dislipidemia é considerada fator de risco ao desenvolvimento de comorbidades incluindo aterosclerose, problemas cardiovasculares e diabetes tipo 2 (DEROSA; SAHEBKAR; MAFFIOLI, 2017; PADMANABHAN; ARUMUGAM, 2014; SAHEBKAR; CHEW; WATTS, 2014).

Por sua vez, a obesidade é definida como o acúmulo de gordura anormal e está correlacionada a fatores genéticos, sociais, ambientais, mudanças no fenótipo adipocitário bem como das funções endócrinas e metabólicas, que alteram o equilíbrio entre a ingestão e o gasto energético. O tamanho dos adipócitos e a resistência insulínica são aumentados, resultando em falha na adipogênese e modificação da fisiologia do tecido adiposo (COELHO et al., 2016; CHRIST, 2016; LAGANÀ et al., 2016; LASAR et al., 2018; YAMADA et al., 2016).

Dentre as adipocinas produzidas nos adipócitos, a adiponectina tem papel crucial na homeostase da glicose e na regulação do metabolismo lipídico no fígado e no músculo esquelético, sendo capaz de alterar substancialmente a anatomia do tecido adiposo e atuar como indutora de sensibilidade insulínica e anti-aterogênese (DUHART et al., 2016; ELISSA; ELSHERBINY; MAGMOMAH, 2015; HASHIMOTO et al., 2018; LAGANÀ et al., 2016; MINATEL et al., 2016).

A leptina é um hormônio expresso por adipócitos, correlacionado ao conteúdo lipídico das células e responsável pelo controle homeostático da massa de tecido adiposo. O ganho de peso corporal conduz a hipertrofia de adipócitos e aumento dos níveis de expressão de leptina, que por sua vez, inibe a ingestão de alimentos e reduz a massa do tecido. Do mesmo modo, com a redução do peso e perda de gordura, os níveis de leptina são diminuídos, levando ao aumento da ingestão de alimentos e ganho de peso. Os sinais são enviados ao hipotálamo para a regulação da relação fome/saciedade e potencialmente perturbam seu feedback, ocasionando resistência a esse hormônio e contribuindo ao ganho de peso (FATMAWATI et al., 2018; ZHANG et al., 2018).

Pacientes obesos apresentam resistência à leptina e baixos níveis de adiponectina, ocasionado o acúmulo de lipídeos e resistência insulínica, redução de c-HDL e aumento de TG plasmáticos. Adicionalmente, a resistência insulínica também é ocasionada pelo aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias derivadas do acúmulo de macrófagos no tecido adiposo visceral, NF- κ B, IL-6 e interleucina 1- β (IL-1 β), que inibem a sinalização local e sistêmica da insulina (DUHART et al., 2016; ELISSA; ELSHERBINY; MAGMOMAH, 2015; LAGANÀ et al., 2016; MINATEL et al., 2016; SANTOS, 2014; ZHANG et al., 2018).

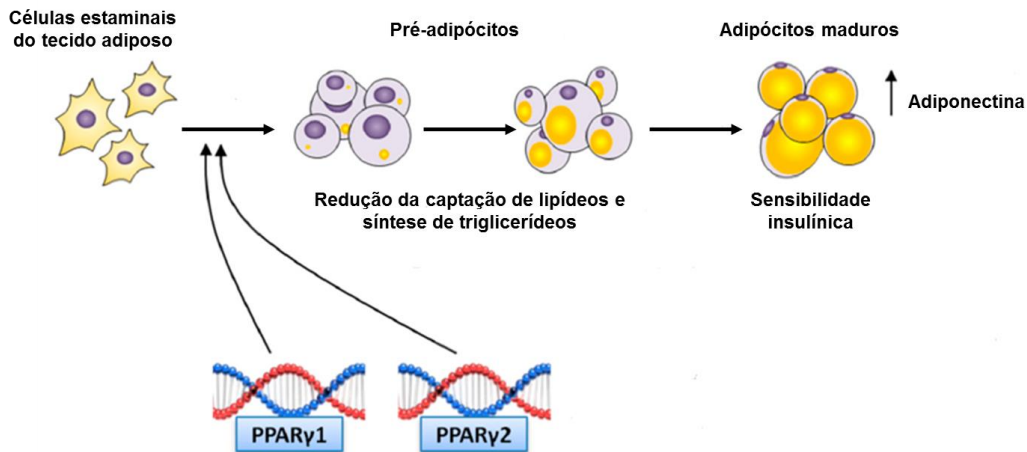
Neste sentido, o tecido adiposo desempenha importante papel na regulação da homeostase energética, constituindo alvo de tratamento para obesidade e hiperlipidemia. Dentre os receptores ativados por proliferadores peroxissomais, PPAR α é considerado o maior regulador do metabolismo lipídico hepático e corresponde ao alvo molecular farmacológico de agentes antilipidêmicos, os fibratos (DEFOUR et al., 2018; GHONEM; ASSIS; BOYER, 2015; LAGANÀ et al., 2016).

PPAR γ , o maior regulador da diferenciação de adipócitos no corpo humano, desempenha um papel essencial no metabolismo de lipídeos, mediando a obtenção de características termogênicas pelo tecido adiposo branco. Desta maneira, estimula a divisão de adipócitos em pequenas gotículas lipídicas e a transcrição de genes responsáveis pelo catabolismo lipídico e associados à termogênese, incluindo a proteína desacopladora 1 (UCP1) (DEFOUR et al., 2018; LASAR et al., 2018).

PPAR γ no tecido adiposo (Figura 6) pode induzir a apoptose de células de gordura; promover a conversão de adipócitos para tamanho menor com maior potencial de armazenamento lipídico; ocasionar a diferenciação de pré-adipócitos

em células maduras; reduzir os depósitos de gordura e aumentar a expressão de genes associados ao armazenamento de triglicerídeos e lipogênese.

Figura 6: Ilustração da adipogênese estimulada pela ativação de PPAR γ



Fonte: Adaptado de MINATEL et al., 2016

Em adição, a ativação deste receptor é responsável pela regulação da expressão de dois marcadores terminais da adipogênese: proteína de adipócitos tipo 2 (aP2) e fosfoenolpiruvato carbóxiquinase, assim como, também é responsável pelo aumento dos níveis de adiponectina ao final da diferenciação, resultando em melhora da resistência insulínica e redução de gordura hepática (DUHART et al., 2016; LAGANÀ et al., 2016; MINATEL et al., 2016).

A adipogênese estimulada em resposta à utilização clínica das TZDs tem sido associada à expressão dos fatores de crescimento de fibroblastos 1 (FGF1) e FGF21 que atuam no tecido adiposo visceral, na promoção na sensibilidade insulínica e remodelamento adiposo; entretanto, quando expressos em maior quantidade no cérebro têm importante papel no ganho de peso induzido por estes fármacos (DUHART et al., 2016; FILIPOVA et al., 2017; LIU et al., 2016).

1.6.3 Diabetes tipo 2

Diabetes constitui uma desordem metabólica crônica na qual há deficiência absoluta ou relativa de insulina devido à baixa secreção desse hormônio pelas

células β pancreáticas, por resistência dos tecidos periféricos a ação da insulina e/ou por excesso de triglicerídeos e ácidos graxos acumulados no músculo esquelético, resultando em hiperglicemia (DUHART et al., 2016; ELISSA; ELSHERBINY; MAGMOMAH, 2015; LEE et al., 2016). Dados epidemiológicos da *International Diabetes Federation* revelaram que 425 milhões de adultos entre 20 e 79 anos apresentaram diagnóstico para esta patologia em 2017, e estimativas para o ano de 2045 apontam mais de 629 milhões de portadores de diabetes

O diabetes tipo 2, que acomete mais de 90 % dos diabéticos, é caracterizado por disfunção das células β pancreáticas e redução da utilização da insulina pelo fígado e tecidos periféricos, devido à tolerância dos receptores celulares a ação desse hormônio (ZHANG et al., 2018). Defeitos na via de sinalização da insulina ocasionam intolerância à glicose, implicando em compensação metabólica pelas células β que aumentam a síntese de insulina, levando à hiperinsulinemia permanente. Além do acúmulo de glicose, a elevação de triglicerídeos e ácidos graxos na circulação sanguínea, inflamação crônica e fatores genéticos também resultam em resistência (DUHART et al., 2016; ELISSA; ELSHERBINY; MAGMOMAH, 2015; HWANG; LEE, 2016; LEE et al., 2017; SKLIROS; VLACHOPOULOS; TOUSOULIS, 2016).

Adicionalmente, a resistência insulínica apresentada por aproximadamente 92 % dos pacientes, conduz a estresse celular com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), dano nas estruturas celulares, expressão de citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral α (TNF α) e IL-6, disfunções mitocondrial e de células progenitoras endoteliais, que altera a expressão de hormônios, como a adiponectina, constituindo fator de risco para o desenvolvimento de problemas cardiovasculares, cânceres, doenças hepáticas crônicas e artrites (DUHART et al., 2016; FILIPOVA et al., 2017; LEE et al., 2016; MINATEL et al., 2016).

Diversas terapias que resultem no aumento da secreção de insulina pelo pâncreas, na sensibilidade dos órgãos a esse hormônio, na diminuição da produção de glicose hepática e em sua utilização nos tecidos periféricos podem ser utilizadas no tratamento farmacológico do diabetes tipo 2. Dentre estas, as TZDs são agonistas totais de PPAR γ (LEE et al., 2017).

A ativação de PPAR γ apresenta função essencial na regulação da homeostase da glicose, uma vez que aumenta a expressão do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) enquanto reduz a lipólise, ao mesmo tempo que aumenta a

lipogênese e diminui a expressão de TNF α . Em adição, PPAR γ é considerado o principal regulador da adipogênese e da expressão de adipocinas, incluindo leptina e adiponectina, promovendo sensibilização insulínica e constituindo importante alvo de tratamento para o diabetes tipo 2 (DUHART et al., 2016; ELISSA; ELSHERBINY; MAGMOMAH, 2015; FRENDO-CUMBO; MACPHERSON; WRIGHT, 2016).

1.6.4 Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

O fígado constitui o maior órgão responsável pela regulação do metabolismo de lipídeos e da glicose em resposta a sinais hormonais (QIU et al., 2017). A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é caracterizada pelo acúmulo de lipídeos intrahepáticos e abrange esteatose hepática simples, necrose hepática, inflamação lobular, fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular, bem como está relacionada ao surgimento de complicações extra-hepáticas incluindo doenças cardiovasculares (BARB; PORTILLO-SANCHEZ; CUZI, 2016; HAZLEHURST et al., 2016; LIU et al., 2016; QIU et al., 2017; ZAREI et al., 2017).

A DHGNA corresponde a desordem hepática crônica mais comum, com prevalência de 6-35 % na população geral e incidência média de 20 %, segunda maior causa de transplantes de fígado nos Estados Unidos e sua crescente prevalência vêm obtendo proporções mundiais de epidemia (BORRELLI et al., 2018; ZAREI et al., 2017).

De acordo com Zhang e colaboradores (2018) mais de 74 % dos pacientes com diabetes tipo 2 apresentam DHGNA. Adicionalmente, a DHGNA caracteriza-se como fator de risco individual aumentando aproximadamente em cinco vezes a probabilidade de desenvolvimento do diabetes. A DHGNA está presente em 80-90 % dos obesos e em aproximadamente 90 % dos pacientes com dislipidemia, desta forma, portanto, relacionada à síndrome metabólica (BORRELLI et al., 2018; HAZLEHURST et al., 2016).

A resistência insulínica periférica dos tecidos e do fígado contribui para a DHGNA através do aumento de glicose circulante e da disponibilidade de substratos de lipídeos para o acúmulo hepático (HAZLEHURST et al., 2016). A nível lipídico, pacientes com DHGNA apresentam aumento dos níveis de triglicerídeos e baixa concentração de c-HDL, bem como aumento da apolipoproteína B e de partículas de

c-LDL, resultando em falha no metabolismo de lipoproteínas e na oxidação de ácidos graxos (BARB; PORTILLO-SANCHEZ; CUZI, 2016; DECARA et al., 2015; QIU et al., 2017).

Uma vez que não existem terapias farmacológicas para prevenir ou reverter a progressão de DHGNA, agonistas PPAR constituem importantes alvos na promoção da melhora da esteatose hepática através da expressão do receptor no fígado, estimulando a captação de ácidos graxos, a oxidação de lipídeos e a redução da resistência insulínica. PPAR α constitui o maior regulador transcricional da oxidação de ácidos graxos hepáticos (BORRELLI et al., 2018; QIU et al., 2017). Estudos demonstraram que a terapia com fibratos em pacientes com DHGNA resulta em melhora do perfil lipídico, mas não apresenta benefício histológico ou clínico discernível no fígado de humanos, evidenciando a baixa potência dos agonistas PPAR α disponíveis para uso terapêutico (BARB; PORTILLO-SANCHEZ; CUZI, 2016; DECARA et al., 2015; LIU et al., 2016; ZAREI et al., 2017).

Em contrapartida, ativação de PPAR β/δ resulta em melhora da esteatose hepática pela regulação de FGF21, promoção da oxidação de ácidos graxos e redução da síntese lipídica em camundongos, assim como, reduz o teor de gordura hepática em estudos clínicos em humanos. Em adição, a ativação de PPAR β/δ em camundongos aumentou a expressão e os efeitos mediados por PPAR α no fígado, sugerindo a importância de ligantes duais PPAR α/β para tratamento da DHGNA (ZAREI et al., 2017).

Por sua vez, as TZDs (agonistas PPAR γ) promovem o aumento da expressão de adiponectina no plasma a qual reduz a resistência insulínica, a gliconeogênese e o influxo de ácidos graxos no fígado, promovendo a melhora histológica e funcional do órgão e da esteatose hepática (BARB; PORTILLO-SANCHEZ; CUZI, 2016; HAZLEHURST et al., 2016; LIU et al., 2016).

Barb e colaboradores (2016) demonstraram promissora atividade do uso crônico, efetivo e seguro, da pioglitazona para tratamento de esteatohepatite em pacientes sem diabetes. Em adição, a utilização de pioglitazona reduz os níveis séricos de enzimas hepáticas e a inflamação lobular (BORRELLI et al., 2018; YANG et al., 2017).

1.7 NOVOS AGONISTAS SINTÉTICOS PPAR

Agonistas sintéticos PPAR, como fibratos e TZDs, foram desenvolvidos para interagir de maneira potente e específica com os respectivos PPAR α e PPAR γ , objetivando ativar a expressão dos receptores para o tratamento de dislipidemia e diabetes tipo 2. Entretanto, demonstraram efeitos adversos que incluem irritação gastrointestinal, ganho de peso, edema e perda de massa óssea. Por outro lado, a síntese de agonistas PPAR β/δ permanece sobre estudo (AMENT et al., 2015; CAPELLI et al., 2016; DOMÍNGUEZ-AVILA et al. 2016; LAGANÀ et al., 2016).

Neste sentido, o desenvolvimento de novos ligantes com equilíbrio na ativação dos diferentes isotipos, agonismo parcial, menor potência, bem como eficácia e segurança é essencial para maior conhecimento das funções fisiológicas e fisiopatológicas moduladas pelos isotipos de PPAR, seus mecanismos e características farmacodinâmicas (CHEN; YANG, 2014; SAHEBKAR; CHEW; WATTS, 2014; RIGANO; SIRIGNANO; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2017).

Em adição, uma das estratégias propostas para o desenvolvimento de agonistas PPAR consiste no desenvolvimento de agonistas duais (α/γ , α/δ , δ/γ) ou na ativação simultânea dos três isotipos do receptor, agonismo Pan ($\alpha/\delta/\gamma$), objetivando o tratamento de doenças metabólicas através da oxidação de ácidos graxos no fígado e redução dos níveis plasmáticos de lipídeos estimulados por PPAR α e PPAR δ , bem como promoção da sensibilidade insulínica mediada por PPAR γ . A expressão dos PPARs poderia acarretar na manutenção dos efeitos benéficos com balanceado perfil de ativação e redução dos efeitos adversos ocasionados pelo agonismo pleno e individual de cada receptor (AMENT et al, 2015; CAPELLI et al., 2016; SAHEBKAR; CHEW; WATTS, 2014).

Agonistas parciais são caracterizados como ativadores fracos que apresentam curvas dose-resposta com menor potencial de ativação. Estes podem induzir conformações alternativas do PPAR, pela interação com diferentes aminoácidos contidos nos receptores, recrutamento de diferentes proteínas co-reguladoras, estabilizando diferentes regiões do sítio de ligação que resultam em efeitos de transcrição distintos de agonistas totais com expressão diferencial de genes alvo; entretanto, com similar atividade biológica na melhora do perfil metabólico (CAPELLI et al., 2016; CHRIST, 2016).

Diversos agonistas PPAR duais α/γ , muraglitazar, tesaglitazar, ragaglitazar, foram submetidos a estudos clínicos para o tratamento de diabetes tipo 2 e dislipidemia; contudo, por aumentarem o risco de eventos cardiovasculares, disfunção renal e promoverem ganho de peso não ultrapassaram a fase clínica III. Considerado o glitazar mais promissor, face à sua potente ação na redução dos níveis de glicose, prevenção de aterosclerose e atividade anti-inflamatória, aleglitazar teve ensaio clínico de fase III interrompido devido ao aumento da taxa de hemorragia gastrointestinal, perda de massa óssea, disfunção renal, edema e falta de eficácia na redução de eventos cardiovasculares (BARB; PORTILLO-SANCHEZ; CUZI, 2016; LAGANÀ et al., 2016; SAHEBKAR; CHEW; WATTS, 2014).

Por sua vez, estudos com elafibranor ou GFT505, agonista dual PPAR α (EC_{50} = 6,0 nM) e PPAR δ (EC_{50} = 47,0 nM), promoveram efeitos combinados da ativação do isotipo α , regulação do metabolismo lipídico, e do isotipo δ , melhora da homeostase da glicose, por meio do aumento da sensibilidade insulínica e inibição da produção de glicose no fígado, sendo importante opção terapêutica para o tratamento de dislipidemia aterogênica, diabetes tipo 2 e DHGNA (BARB; PORTILLO-SANCHEZ; CUZI, 2016; LAGANÀ et al., 2016; SAHEBKAR; CHEW; WATTS, 2014).

Em adição, elafibranor demonstrou atividade hepatoprotetora através da redução dos níveis de enzimas hepáticas ALT e AST, com diminuição do acúmulo de lipídeos e inibição de genes pró-inflamatórios, interleucina 1 (IL-1) e TNF- α , bem como genes pró-fibróticos. Recente estudo randomizado e controlado por placebo demonstrou a eficácia do composto na resolução da esteatohepatite com melhora do perfil de risco cardiometabólico e da sensibilidade hepática e periférica à insulina, junto a favorável perfil de segurança (DEROSA; SAHEBKAR; MAFFIOLI, 2017; LAGANÀ et al., 2016; SAHEBKAR; CHEW; WATTS, 2014; ZAREI et al., 2017).

O potente agonista Pan PPAR, MHYZ2013 apresentou promissora resposta ao tratamento de dislipidemia, doença hepática gordurosa e resistência insulínica, prevenindo a obesidade e suprimindo a inflamação em estudo realizado por An et al. (2018). Efeitos mediados pelo aumento da expressão de FGF21 e de adiponectina, por oxidação de ácidos graxos no fígado e no músculo esquelético, assim como pela expressão de marcadores de termogênese no tecido adiposo branco, melhorando a funcionalidade do tecido (AN et al., 2018).

Atualmente, novos membros da família dos fibratos, moduladores seletivos de PPAR α , foram desenvolvidos e estão sendo avaliados em estudos clínicos de fase III, entre eles o protótipo pema-fibrato ou K-877, o qual demonstrou maior eficácia e significativos resultados na redução de TG plasmáticos e no aumento de c-HDL, junto a menor risco de efeitos adversos e atividade cardioprotetora quando comparado ao fenofibrato (BARB, PORTILLO-SANCHEZ e CUZI, 2016; FUJIOKA, 2018; ISHIBASHI et al., 2016; ISHIBASHI et al., 2018).

Lobeglitazona, aprovada em 2013 pelo *Ministry of Food and Drug Safety* na Coreia, foi desenvolvida como potente derivado tiazolidinediônico mais efetivo e seguro para o tratamento do diabetes tipo 2, apresentando maior potência quando comparada a rosiglitazona e pioglitazona, com EC₅₀ de 0,018 μ M em modelo animal de diabetes. Assim como, perfil semelhante no controle da glicemia e da modulação lipídica, com dose 30 vezes menor em estudos clínicos e ausência de efeitos adversos relacionados a doenças cardiovasculares e câncer de bexiga (LEE et al., 2017).

Desta maneira, a ascensão da prevalência de doenças metabólicas, junto ao crescente número de estudos sobre os efeitos biológicos da ativação de PPAR em diferentes órgãos e tecidos, justifica o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas eficazes e mais seguras através do uso de agonistas parciais ou moduladores seletivos com balanceada atividade e que mimetizem ligantes endógenos de PPAR (CHRIST, 2016).

1.8 LIPÍDEOS FENÓLICOS DE *Anacardium occidentale*

Segundo Grygiel-Górniak (2014), a presença de grupo polar, região de ligação e cadeia hidrofóbica são três dos elementos essenciais para ativação de PPAR. Em adição, ácidos graxos de cadeia longa interagem com os três tipos de PPAR, exibindo elevada afinidade para PPAR α (SRITHARAN, 2017; YAMADA et al., 2016).

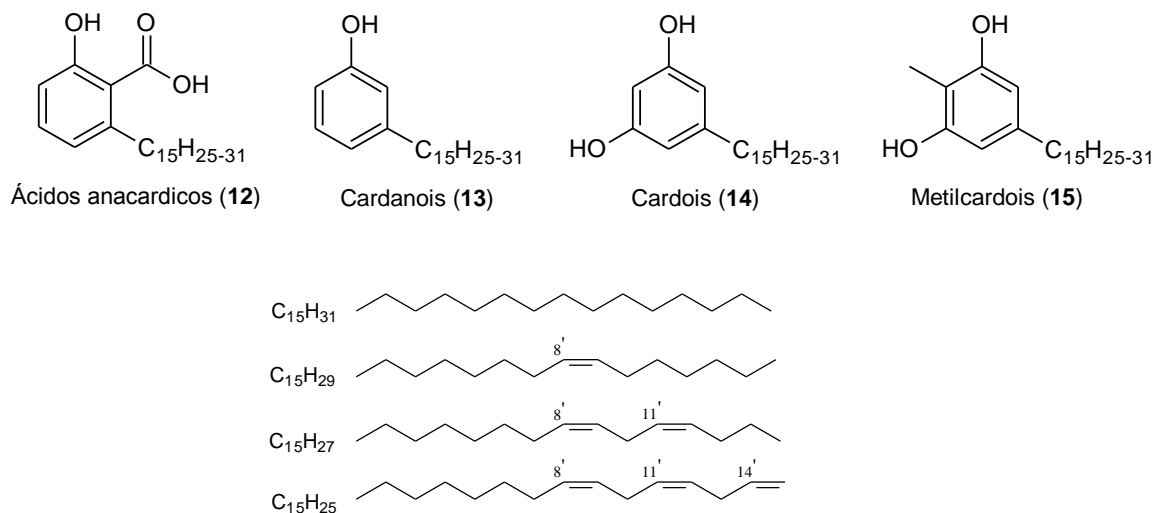
Tais elementos estruturais são identificados nos lipídeos fenólicos isolados do líquido da casca da castanha de caju (LCC), que apresentam grupo fenólico e cadeia alifática de 15 carbonos com diferentes graus de insaturação, mimetizando

ácidos graxos endógenos e permitindo modificações moleculares para o desenvolvimento de novos compostos biologicamente ativos.

O LCC é considerado um dos principais materiais renováveis da biomassa da cajucultura, encontrado nos alvéolos da casca da castanha que é o fruto do cajueiro (*Anacardium occidentale*) e representa 30-35 % do peso da castanha. Aproximadamente 2,1 milhões de toneladas de castanha de caju são produzidas por ano no Brasil, caracterizando o LCC como uma matéria prima abundante, utilizado para fins medicinais e industriais. Vários estudos com seus componentes, purificados ou como misturas, têm revelado seus efeitos biológicos antioxidantes, antígenotóxicos, antifúngicos e antimicrobianos (BANDE et al., 2018; SOUZA FILHO, 2013; HAMAD; MUBOFU et al., 2015; NG et al., 2017).

Rico em compostos fenólicos (Figura 7), o LCC pode ser obtido por diferentes processos de extração com manutenção dos seus constituintes principais; ou durante o processamento da amêndoa a altas temperaturas, sendo respectivamente classificados como natural ou técnico (BALACHANDRAN et al., 2013; HAMAD; MUBOFU et al., 2015; LEITE et al., 2015).

Figura 7: Constituintes do Líquido da Casca da Castanha de Caju: ácidos anacárdicos, cardanois, cardois e metilcardois



Em um dos processos de extração por solvente, as castanhas são fragmentadas em pedaços e extraídas continuamente em aparelho Soxlet. O óleo obtido contém misturas de ácidos anacárdicos (**12**, 62,90 %), cardanois (**13**, 6,99 %), cardois (**14**, 23,98 %) e traços de metilcardois (**15**) (HAMAD; MUBOFU et al., 2015; LEITE et al., 2015).

Por outro lado, o LCC técnico é composto principalmente por cardanois (60-65 %), gerado pela descarboxilação dos ácidos anacárdicos quando submetidos a altas temperaturas. O LCC técnico ainda é composto de cardois (15-20 %), material polimérico (10 %), e traços de metilcardois (BALACHANDRAN et al., 2013; HAMAD; MUBOFU et al., 2015; LEITE et al., 2015).

A natureza da cadeia alquílica C15 do cardanol varia de acordo com o grau de insaturação, podendo ser saturada (5-8 %), monoinsaturada (48-49 %), di-insaturada (16-17 %), e tri-insaturada (29-30 %). As duplas ligações apresentam estereoquímica Z, como as encontradas nos ácidos graxos insaturados, característica relevante para o reconhecimento hidrofóbico por resíduos complementares nos sítios de reconhecimento molecular bem como no desenvolvimento de novas funcionalidades por meio de interconversão de grupos funcionais. Adicionalmente, o grupo fenol pode ser explorado em diferentes metodologias sintéticas, enquanto a presença do anel aromático permite interações π - π não encontradas nos ácidos graxos, sendo o diferencial no reconhecimento molecular pelos receptores-alvo (BALACHANDRAN et al., 2013; HAMAD; MUBOFU et al., 2015; NG et al., 2017; VASAPOLLO et al., 2011).

Neste sentido, o desenvolvimento de novos agonistas PPAR planejados a partir do cardanol constitui a finalidade deste trabalho, sob a hipótese de que possam atuar de forma similar aos ácidos graxos moduladores de PPAR, promovendo a regulação do metabolismo de lipídios e da glicose, sensibilização à insulina, oxidação de ácidos graxos e redução da inflamação, com expectativa de que sejam terapeuticamente desejáveis ao tratamento de doenças metabólicas e apresentem redução dos efeitos adversos.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo a obtenção de derivados do cardanol que atuem sobre a ativação de PPAR para o tratamento de doenças metabólicas.

2.1.1 Objetivos Específicos

Compreendem os objetivos específicos:

- Sintetizar e caracterizar novos compostos candidatos a ligantes PPAR planejados a partir do cardanol;
- Ensaios biológicos *in vitro* das moléculas-alvo frente à ativação de PPARs por ensaio de gene reporter luciferase;
- Ensaios biológicos *in vitro* quanto à expressão de genes envolvidos na captação e oxidação de ácidos graxos em hepatócitos primários, e na diferenciação de adipócitos;
- Ensaio biológico *in vivo* em sistema reporter utilizando *Danio rerio* (zebrafish);
- Estabelecer relações estrutura-atividade.

3. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

Os ligantes endógenos e sintéticos de PPAR sugerem um modelo farmacofórico padrão para a ativação do receptor, em que a presença de subunidade hidrofílica permite a interação com a região central predominantemente polar no domínio de ligação ao ligante, e a cauda hidrofóbica interage com a região menos conservada do LBD composta por aminoácidos hidrofóbicos (AN et al., 2018; BATISTA et al., 2012; XU et al., 2001).

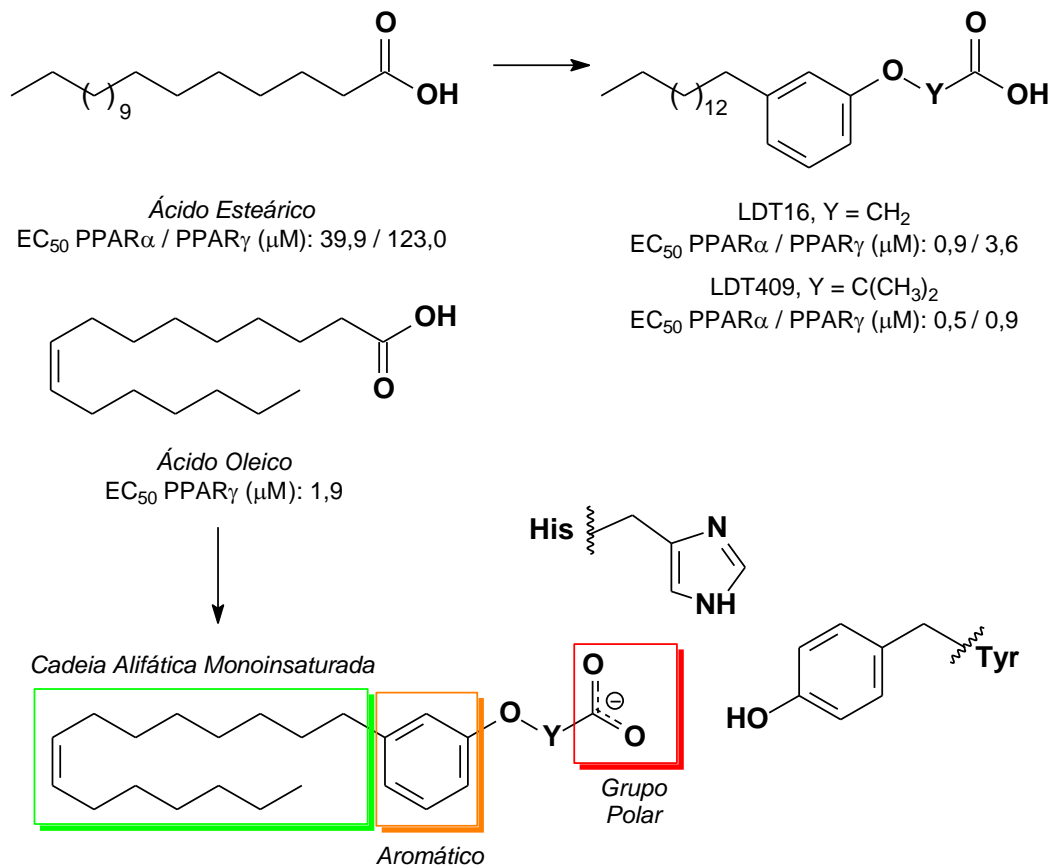
Quando ativado por ácidos graxos com cadeia insaturada PPARs são responsáveis pela inibição da lipogênese, redução dos níveis de triglicerídeos plasmáticos, promoção da β oxidação de ácidos graxos e prevenção da lipotoxicidade. O ácido oleico, ácido (9Z)-octadecenóico, exibe atividade agonista para os três isotipos de PPAR em ensaios de gene reporter, apresentando maior potência para PPAR α/δ e demonstrando a importância da cadeia monoinsaturada na ativação dos receptores. Enquanto ácidos graxos poli-insaturados exibem elevada afinidade para PPAR α (SRITHARAN, 2017; YAMADA et al., 2016; YOKOI et al. 2010).

No âmbito de uma linha de pesquisa que visa a utilização de lipídeos fenólicos do LCC para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas, estudos prévios com derivados do cardanol saturado, sintetizados por mim durante o mestrado, apresentaram perfil agonista parcial frente aos PPARs superior aos ácidos graxos saturados: cáprico (C10), mirístico (C14) e esteárico (C18). Adicionalmente, os derivados do cardanol modularam a expressão de importantes genes em hepatócitos primários e na diferenciação de pré-adipócitos com efeito reduzido comparado aos agonistas plenos.

Desta maneira, novos análogos derivados do cardanol foram planejados com arcabouço estrutural complementar aos resíduos de aminoácidos contidos nos PPARs, contendo grupo polar e da cadeia hidrofóbica, junto ao grupo aromático que fornece interações adicionais. Dois padrões moleculares foram planejados (Esquema 1): i. no qual a presença da subunidade alfa-ariloxicarboxilica visa a interação com resíduos de histidina e tirosina, contidos no domínio de ligação ao ligante de PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ , responsáveis pelo recrutamento de co-ativadores e estabilização do receptor, bem como a modulação da subunidade

pentadecenila; ii. onde a cadeia lateral dos derivados planejados contém cadeia de 15 carbonos monoinsaturada no carbono 8, capaz de mimetizar o ácido oleico.

Esquema 1: Planejamento estrutural dos derivados-alvo em que o grupo polar visa interações com aminoácidos conservados entre PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ , e a cadeia alifática monoinsaturada mimetiza o ácido oleico, agonista endógeno de PPAR



4. ESTRATÉGIA SINTÉTICA

A rota sintética para a obtenção dos derivados-alvo compreendeu a exploração de procedimentos sintéticos clássicos de interconversão de grupos funcionais: hidrogenação catalítica, *O*-alquilação e hidrólise alcalina, sob condições experimentais convencionais e sob refluxo.

Neste sentido, o planejamento sintético (Esquema 2) se baseou em rota iniciada com a hidrogenação da mistura de cardanois utilizando catalisador paládio/carvão (Pd/C) 10 % em etanol, visando o derivado 3-pentadecilfenol (LDT10, **18**). Em seguida, LDT10 (**18**) foi submetido à reação de *O*-alquilação com o derivado 2-haloéster correspondente, na presença de carbonato de potássio em acetona ou acetonitrila, para fornecer os derivados betaoxiésteres LDT15 (**21**) e LDT408 (**24**). Os ésteres-derivados foram submetidos à hidrólise com hidróxido de lítio em mistura tetrahidrofurano/água, na presença de catalisador de transferência de fase aliquat336®, visando os respectivos ácidos carboxílicos LDT16 (**29**) e LDT409 (**30**), finalizando a série com a cadeia alquílica saturada.

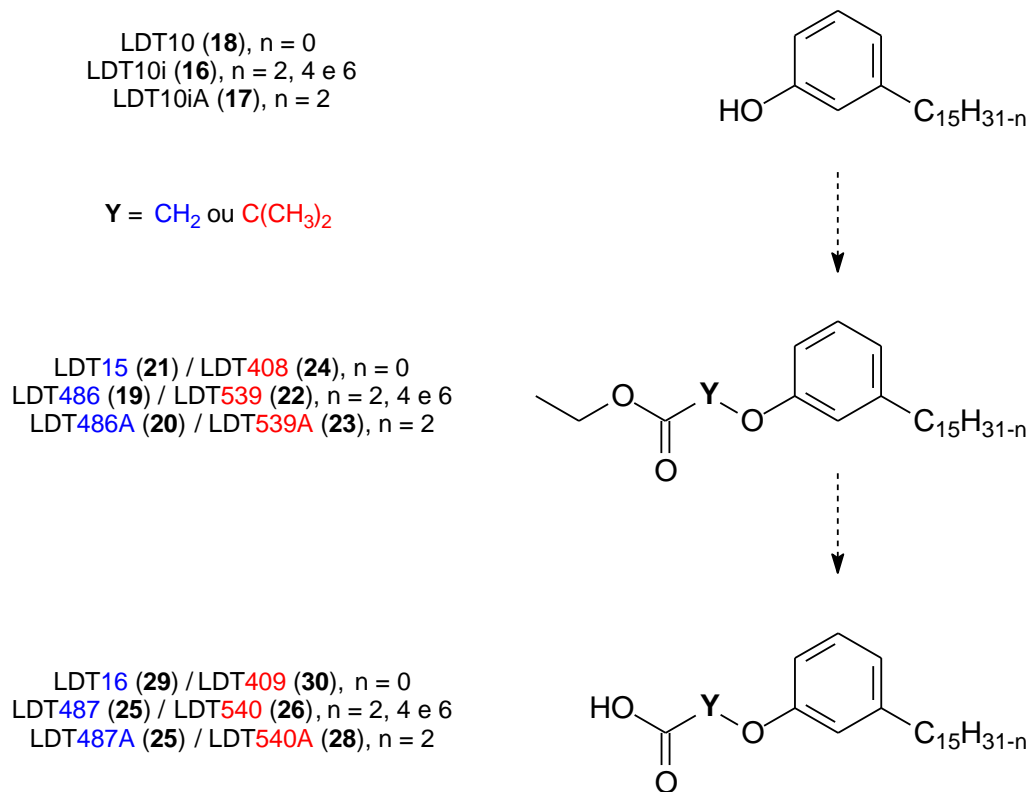
Para as séries com as cadeias contendo insaturações foi realizado o mesmo procedimento reacional utilizando a mistura de cardanois (LDT10i, **16**) e o cardanol monoinsaturado (LDT10iA, **17**) como materiais de partida. Estes foram submetidos à reação de *O*-alquilação com o derivado 2-haloéster correspondente na presença de carbonato de potássio em acetona ou acetonitrila, visando às misturas de compostos betaoxiésteres LDT486 (**19**) e LDT539 (**22**); e os derivados LDT486A (**20**) e LDT539A (**23**). Os ésteres-derivados foram submetidos à hidrólise com hidróxido de lítio para fornecer as misturas de ácidos LDT487 (**25**) e LDT540 (**26**), bem como os ácidos LDT487A (**27**) e LDT540A (**28**).

A caracterização das estruturas dos intermediários e produtos finais deu-se a partir da análise de espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono-13, obtidos no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Por sua vez, os estudos biológicos foram realizados na Faculdade de Farmácia Leslie Dan da Universidade de Toronto, Canadá. A avaliação do perfil de atividade *in vitro* foi realizada a partir de ensaio de gene reporter frente à ativação de PPAR; expressão de transcritos de DNA complementar de genes em hepatócitos

primários relacionados à oxidação e captação de ácidos graxos; e adipócitos 3T3-L1 associados à diferenciação de adipócitos. Enquanto a avaliação *in vivo* englobou ensaio sobre a transcrição de PPAR em zebrafish.

Esquema 2: Planejamento sintético dos derivados-alvo



Parte Experimental

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 METODOLOGIA SINTÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

Os procedimentos experimentais em síntese orgânica foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Estratégias Terapêuticas (LADETER) da Universidade Católica de Brasília (UCB) e no Laboratório de Desenvolvimento de Inovações Terapêuticas (LDT) da Universidade de Brasília (UnB) no período entre agosto de 2014 e junho de 2018.

Os reagentes e solventes químicos utilizados na síntese dos compostos foram adquiridos das indústrias Sigma-Aldrich® (EUA), Tedia® (EUA) e PanReac® (Espanha). O solvente acetonitrila foi previamente tratado com hidreto de cálcio e destilado antes do uso. A mistura de cardanois destilada foi obtida a partir de doação da empresa RESIBRAS®.

As reações foram realizadas sob agitação magnética, à temperatura ambiente ou aquecimento convencional. Para as reações sob refluxo com reagentes e solventes com ponto de ebulição menor que a temperatura de aquecimento foi utilizado banho termostático, sistema de refrigeração dos condensadores a temperaturas que variaram de $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

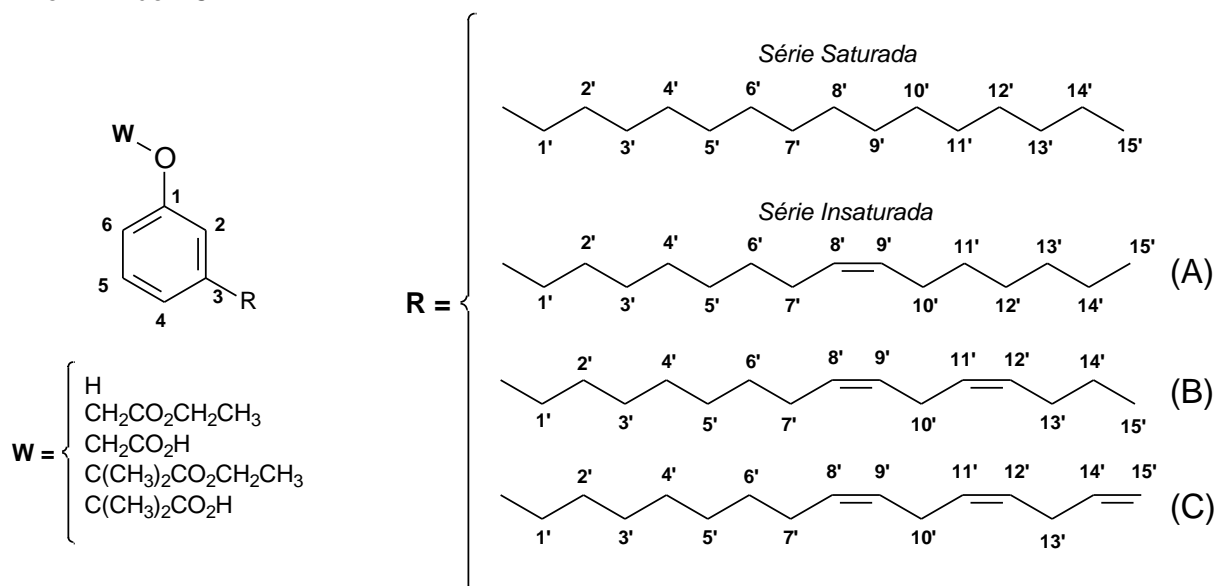
As reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) por meio de cromatofolhas (5,0 x 1,5 cm) de alumínio de Kieselgel 60 F254 com espessura de 0,25 mm (SILICYCLE®) e reveladas em lâmpada UV (254 nm), o que permitiu o cálculo do fator de retenção (Rf). Para a purificação dos compostos, utilizou-se cromatografia em coluna de sílica gel G60 (70-230 mesh) SILICYCLE® e o sistema de cromatografia flash em equipamento Isolera Spektra Systems with ACI™ (Biotage®) em cartucho de sílica SNAP 10 g. Os pontos de fusão, não corrigidos, foram determinados em aparelho MQAPF-302.

A evaporação dos solventes foi realizada em evaporador rotatório Tecnal® TE-211, à pressão reduzida, variando entre 10 e 0,1 mmHg, e em temperaturas entre 40 e 60 °C.

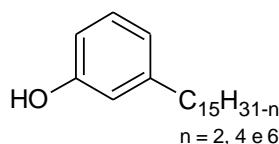
Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H – 300 MHz ou 500 MHz) e de carbono 13 (RMN de ^{13}C – 75 MHz ou 125 MHz) foram

adquiridos em aparelho Bruker Avance DRX300 e DRX500 do Centro Nordestino de Aplicação da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará (UFC), utilizando tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os valores de deslocamento químico (δ) são referenciados em parte por milhão (ppm) em relação ao TMS e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As áreas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas como: simpleto (s); simpleto largo (sl); duplete (d); duplo duplete (dd); tripleto (t) e multiplete (m).

Figura 8: Numeração e legendas empregadas no assinalamento de sinais em espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C



5.1.1 Obtenção da Mistura de Cardanois (LDT10i, 16)

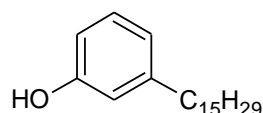


A mistura de cardanois, fornecida pela RESIBRAS, foi purificada por meio de coluna cromatográfica contendo gel de sílica como fase sólida e eluída com mistura de hexanos, levando à mistura LDT10i (**16**) em rendimento de 90 % em relação à massa total aplicada.

RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) δ : 0,89-0,95 (m, 3H, H15'a-b); 1,33-1,43 (m, 13H, H3'-6'a-c', H11'a e H14'a-b); 1,61 (sl, 2H, H2'a-c); 2,04-2,08 (m, 4H, 7'a-c, 10'a, 13'b); 2,56 (t, $J = 7,6$ Hz; 2H, H1'a-c); 2,80-2,85 (m, 2H, 10'b-c e 13'c); 4,99-5,09 (m, 2H, H15'c); 5,37-5,46 (sl, 3H, H8'-9'a-c e H11'-12'b-c); 6,65-6,67 (m, 2H, H6 e H2); 6,76 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, H4); 7,15 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, H5).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) δ : 14,0-14,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$, 15'a-b); 22,8-23,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 14'a-b); 25,8-25,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 10'b-c, 13'c); 27,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 7'a-c, 10'a, 13'b); 29,2-29,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 3'-6'a-c, 11'-12'a); 31,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 2'a-c); 31,7-32,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 13'a); 36,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 1'a-c); 112,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 6); 114,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 15'c); 115,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 2); 121,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 4); 129,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 5); 127,0-129,5 e 130,0-130,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 8'-9'a-c e 11'-12'b-c); 137,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 14'c); 145,1 ($\underline{\text{C}}$, 3); 155,7 ($\underline{\text{C}}$, 1).

5.1.2 Obtenção do Cardanol Monoinsaturado (LDT10iA, 17)

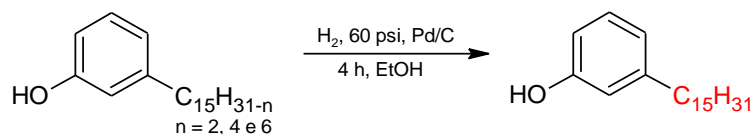


A mistura de cardanois, fornecida pela RESIBRAS, foi purificada por meio de coluna cromatográfica, protegida da luz para evitar a degradação dos compostos, contendo gel de sílica dopada com 12 % de nitrato de prata como fase sólida e eluída com mistura de hexanos, fornecendo o derivado LDT10iA (**17**) em rendimento de 56 % em relação à massa total aplicada (ANDREÃO et al., 2010).

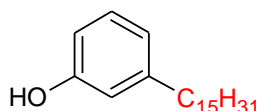
RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz) δ : 0,89-0,92 (t, $J = 6,5$ Hz, 3H, H15'a); 1,24-1,32 (m, 16H, H3'-6'a', H11'-14'a); 1,60-1,61 (m, 2H, H2'a); 2,03-2,08 (m, 4H, 7'a, 10'a); 2,56 (t, $J = 7,7$ Hz; 2H, H1'a); 5,34-5,40 (sl, 2H, H8'-9'a); 6,65-6,67 (m, 2H, H6 e H2); 6,76 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, H4); 7,15 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, H5).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz) δ : 14,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$, 15'a); 22,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 14'a); 27,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 7'a, 10'a); 29,2-29,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 3'-6'a, 11'-12'a); 31,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 2'a); 32,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 13'a); 36,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 1'a); 112,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 6); 115,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 2); 121,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 4); 129,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 5); 130,0-130,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 8'-9'a); 145,1 ($\underline{\text{C}}$, 3); 155,7 ($\underline{\text{C}}$, 1).

5.1.3 Obtenção do Derivado 3-Pentadecilfenol (LDT10, 18)



Em um frasco de hidrogenação (250,0 mL) foram adicionados 10,00 g da mistura de cardanois (33,06 mmol) e etanol (30,0 mL). À solução foram adicionados 0,22 g de catalisador paládio (Pd/C) 10 % e a mistura submetida à hidrogenação catalítica sob pressão de hidrogênio a 60 psi em reator Paar, à temperatura ambiente durante 4 horas. A mistura foi filtrada em funil sinterizado, para retirada do catalisador, e o solvente evaporado à pressão reduzida. Após purificação em coluna cromatográfica em gel de sílica eluída com mistura hexano/diclorometano (1:1), o derivado saturado **18** foi obtido.

3-Pentadecilfenol (LDT10, **18**)

Sólido branco

Rendimento (95 %)

R_f: 0,35 (1:1 Hex:DCM)

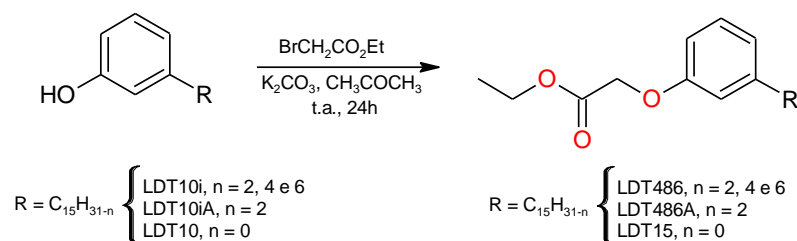
Ponto de fusão: 44-45 °C

Fórmula molecular: C₂₁H₃₆O

RMN de ¹H (CDCl₃; 500 MHz): δ: 0,92 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H, H15'); 1,29-1,33 (m, 24H, H3'-14'); 1,60-1,62 (m, 2H, H2'); 2,58 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H, H1'); 6,67-6,69 (m, 2H, H6 e H2); 6,78 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, H4); 7,16 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H, H5).

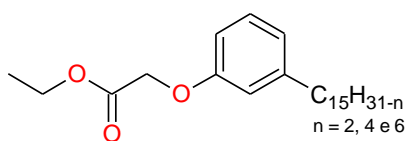
RMN de ¹³C (CDCl₃; 125 MHz): δ: 14,3 (CH₃, 15'); 22,9 (CH₂, 14'); 29,6-29,9 (CH₂, 3'-12'); 31,5 (CH₂, 2'); 32,2 (CH₂, 13'); 36,0 (CH₂, 1'); 112,7 (CH, 6); 115,6 (CH, 2); 121,2 (CH, 4); 129,6 (CH, 5); 145,2 (C, 3); 155,6 (C, 1).

5.1.4 Obtenção da Mistura de Ésteres LDT486 (19) e dos derivados β -oxiésteres LDT486A (20) e LDT15 (21)



Em experimentos independentes, a um balão (50,0 mL) foram adicionados **16** (0,50 g; 1,67 mmol), **17** (0,70 g; 2,31 mmol) ou **18** (0,50 g; 1,64 mmol), carbonato de potássio (2,00 eq) e acetona (15,0 mL). A mistura permaneceu sob agitação magnética durante 30 minutos, e então, foi adicionado 2-bromoacetato de etila (1,25 eq). A reação prosseguiu sob agitação magnética, à temperatura ambiente por 24 horas. Após redução do volume de solvente à pressão reduzida, a mistura foi diluída com água destilada (20,0 mL) e extraída com acetato de etila (2 x 10,0 mL). As frações orgânicas reunidas foram lavadas com solução de ácido clorídrico 10 % (15,0 mL), solução salina saturada (15,0 mL) e seca sob sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado à pressão reduzida e o resíduo purificado em coluna de gel de sílica eluída com hexano levando aos ésteres-alvo.

Mistura de (*Z*)-2-(3-pentadec-8-en-, 8,11-dien-, 8,11,14-trien-1-il)fenóxi)acetato de etila (LDT486, **19**)



Óleo incolor

Rendimento (98 %)

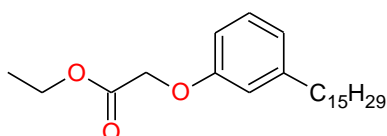
R_f: 0,75 (4:1 Hex:AcOEt)

Fórmula molecular: C₂₅H₃₆O₃

RMN de ¹H (CDCl₃; 500 MHz): δ: 0,88-0,90 (m, 3H, H₁₅'a-b); 1,27-1,32 (m, 18H, H₃'-6' a-c, H₁₁'a, H₁₄'a-b, ArOCH₂CO₂CH₂CH₃); 1,60 (sl, 2H, H₂'a-c); 2,00-2,04 (m, 3H, H₇'a-c, H₁₀'a, H₁₃'b); 2,57 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, H₁'a-c); 4,28 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H, ArOCH₂CO₂CH₂CH₃); 4,61 (s, 2H, ArOCH₂CO₂CH₂CH₃); 5,34-5,36 (m, 4H, H₈'-9'a-c, H₁₁'-12'b-c) 6,70 (dd, *J* = 8,0 Hz, *J* = 2,0 Hz, 1H, H₆); 6,76 (sl, 1H, H₂); 6,81 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, H₄); 7,19 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, H₅).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz): δ : 14,3-14,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$, 15'a-b, $\text{ArOCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 22,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 14'a-b); 27,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 7'a-c, 10'a, 13'b); 29,2-29,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 3'-6'a-c, 11'-12'a); 31,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 2'a-c); 32,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 13'a); 36,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 1'a-c); 61,5 ($\text{ArOCH}_2\text{CO}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$); 65,7 ($\text{ArO}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 111,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 6); 115,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 2); 122,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 4); 129,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 5); 130,0-130,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 8'-9'a-c, 11'-12'b-c); 145,0 ($\underline{\text{C}}$, 3); 158,0 ($\underline{\text{C}}$, 1); 169,3 ($\text{ArOCH}_2\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

2-(3-((8Z)-pentadec-8-en-1-il)fenóxi)acetato de etila (LDT486A, **20**)



Óleo incolor

Rendimento (90 %)

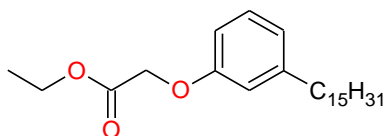
R_f: 0,51 (9:1 Hex:AcOEt)

Fórmula molecular: $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{O}_3$

RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz): δ : 0,87-0,91 (m, 3H, H15'a); 1,27-1,33 (m, 19H, H3'-6'a, H11'-14'a, $\text{ArOCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 1,58-1,63 (m, 2H, H2'a); 2,01-2,03 (m, 4H, H7'a, H10'a); 2,58 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H, H1'a); 4,27 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, $\text{ArOCH}_2\text{CO}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$); 4,61 (s, 2H, $\text{ArO}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 5,34-5,37 (m, 2H, H8'-9'a); 6,72 (dd, $J = 8,1$ Hz, $J = 2,2$ Hz, 1H, H6); 6,77 (sl, 1H, H2); 6,82 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H4); 7,19 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H, H5).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 75 MHz): δ : 14,3-14,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$, 15'a, $\text{ArOCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 22,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 14'a); 27,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 7'a, 10'a); 29,2-29,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 3'-6'a, 11'-12'a); 31,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 2'a); 32,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 13'a); 36,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 1'a); 61,5 ($\text{ArOCH}_2\text{CO}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$); 65,7 ($\text{ArO}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 111,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 6); 115,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 2); 122,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 4); 129,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 5); 130,0-130,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 8'-9'a); 145,0 ($\underline{\text{C}}$, 3); 158,1 ($\underline{\text{C}}$, 1); 169,3 ($\text{ArOCH}_2\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

2-(3-Pentadecilfenóxi)acetato de etila (LDT15, **21**)



Sólido branco

Rendimento (90 %)

R_f: 0,50 (9:1 Hex:AcOEt)

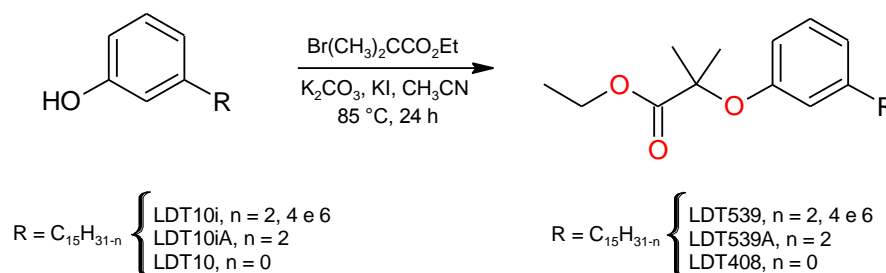
Ponto de fusão: 30-31 °C

Fórmula molecular: $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_3$

RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz): δ : 0,89 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H, H15'); 1,30-1,33 (m, 27H, H3'-14', $\text{ArOCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,57-1,62 (m, 2H, H2'); 2,58 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H, H1'); 4,28 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, $\text{ArOCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 4,62 (s, 2H, $\text{ArOCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 6,71 (dd, $J = 8,2$ Hz, $J = 2,2$ Hz, 1H, H6); 6,77 (sl, 1H, H2); 6,81 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H4); 7,19 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H, H5).

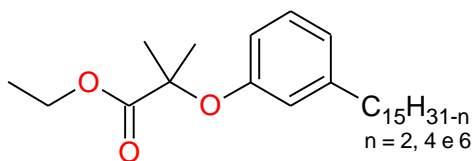
RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz): δ : 14,3 ($\text{ArOCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 14,4 (CH_3 , 15'); 22,9 (CH_2 , 14'); 29,5-29,9 (CH_2 , 3'-12'); 31,5 (CH_2 , 2'); 32,1 (CH_2 , 13'); 36,2 (CH_2 , 1'); 61,5 ($\text{ArOCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 65,6 ($\text{ArOCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 111,6 (CH , 6); 115,3 (CH , 2); 122,1 (CH , 4); 129,4 (CH , 5); 145,0 (C , 3); 158,0 (C , 1); 169,3 ($\text{ArOCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

5.1.5 Obtenção da Mistura de Ésteres LDT539 (22) e dos Derivados α,α -Dimetiléster LDT539A (23) e LDT408 (24)



Em experimentos independentes, a um balão (50,0 mL) foram adicionados os fenóis **16** (0,90 g; 3,01 mmol), **17** (1,00 g; 3,30 mmol) ou **18** (1,20 g; 3,94 mmol), carbonato de potássio (2,00 eq), iodeto de potássio (1,00 eq) e acetonitrila (10,0 mL). A mistura permaneceu sob agitação magnética durante 30 minutos, e então, foi adicionado α -bromoisobutirato de etila (3,00 eq). A reação prosseguiu sob agitação magnética em sistema com condensador acoplado a banho termostático à 10 °C, sob refluxo com temperatura interna de 85 °C por 24 horas. Após redução do volume de solvente à pressão reduzida, a mistura foi diluída com água destilada (20,0 mL) e extraída com acetato de etila (2 x 10,0 mL). As frações orgânicas foram lavadas com solução de ácido clorídrico 10 % (15,0 mL), solução salina saturada (15,0 mL) e seca sob sulfato de sódio. O solvente foi evaporado à pressão reduzida e os resíduos purificados em coluna de gel de sílica eluída com hexano, fornecendo a mistura e os derivados.

Mistura de (Z)-2-metil-2-(3-(pentadec-8-en-, 8,11-dien-, 8,11,14-trien-1-il)fenóxi)propanoato de etila (LDT539, **22**)



Óleo incolor

Rendimento (90 %)

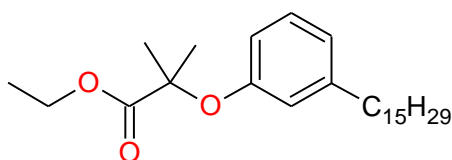
Rf: 0,84 (4:2 Hex:AcOEt)

Fórmula molecular: C₂₇H₄₀O₃

RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz): δ: 0,87-0,94 (m, 3H, H15'a-b); 1,23-1,40 (m, 22H, H3'-6'a-c, H11'a, H14'a-b, ArOC(CH₃)₂CO₂CH₂CH₃); 1,60 (s, 11H, H2'a-c, ArOC(CH₃)₂CO₂CH₂CH₃); 2,00-2,04 (m, 4H, H7'a-c, H10'a, 13'b); 2,54 (t, J = 7,6 Hz, 2H, H1'a-c); 2,79-2,84 (m, 1H, H10'b-c, H13'c); 4,24 (q, J = 7,1 Hz, 2H, ArOC(CH₃)₂CO₂CH₂CH₃); 5,34-5,44 (m, 2H, H8'-9'a-c, H11-12'b-c); 6,65 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H6); 6,70 (s, 1H, H2); 6,80 (d, J = 7,4 Hz, 1H, H4); 7,12 (t, J = 7,7 Hz, 1H, H5).

RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz): δ: 14,3 (CH₃, 15'a-b, ArOC(CH₃)₂CO₂CH₂CH₃); 22,8 (CH₂, 14'a-b); 25,6-25,8 (CH₂, 10'b-c, 13'c, ArOC(CH₃)₂CO₂CH₂CH₃); 27,4 (CH₂, 7'a-c, 10'a, 13'a); 29,2-29,9 (CH₂, 3'-6'a-c; 11'-12'a); 31,4 (CH₂, 2'a-c); 32,0 (CH₂, 13'a); 36,1 (CH₂, 1'a-c); 61,5 (ArOC(CH₃)₂CO₂CH₂CH₃); 79,1 (ArOC(CH₃)₂CO₂CH₂CH₃); 114,9 (ArCH, 15'c); 116,3 (ArCH, 6); 119,6 (ArCH, 2); 122,5 (ArCH, 4); 129,5 (ArCH, 5); 127,8-128,9 e 130,0-130,1 (CH, 8'-9'a-c, 11'-12'b-c); 144,4 (ArC, 3); 155,6 (ArCO, 1); 174,6 (ArOC(CH₃)₂CO₂CH₂CH₃).

2-Metil-2-(3-((8Z)-pentadec-8-en-1-il)fenóxi)propanoato de etila (LDT539A, **23**)



Óleo incolor

Rendimento (86 %)

Rf: 0,53 (9:1 Hex:AcOEt)

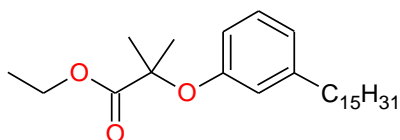
Fórmula molecular: C₂₇H₄₄O₃

RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz): δ: 0,91-0,95 (m, 3H, H15'a); 1,27-1,38 (m, 19H, H3'-6'a, H11'-14'a, ArOC(CH₃)₂CO₂CH₂CH₃); 1,61-1,64 (m, 8H, H2'a, ArOC(CH₃)₂CO₂CH₂CH₃); 1,98-2,07 (m, 4H, H7'a, H10'a); 2,58 (t, J = 7,7 Hz, 2H, H1'a); 4,28 (q, J = 7,1 Hz, 2H, ArOC(CH₃)₂CO₂CH₂CH₃); 5,37-5,41 (m, 2H, H8'-9'a);

6,69 (dd, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,9$ Hz, 1H, H6); 6,73 (sl, 1H, H2); 6,84 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H4); 7,17 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H, H5).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 75 MHz): δ : 14,0-14,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$, 15'a, $\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 22,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 14'a); 25,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, $\text{ArOC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 27,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 7'a, 10'a); 29,2-29,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 3'-6'a; 11'-12'a); 30,1-31,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 2'a); 32,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 13'a); 36,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 1'a); 61,5 ($\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$); 79,1 ($\text{ArOC}\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 116,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 6); 119,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 2); 122,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 4); 128,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 5); 130,0-130,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 8'-9'a); 144,4 ($\underline{\text{C}}$, 3); 155,6 ($\underline{\text{C}}$, 1); 174,6 ($\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

2-Metil-2-(3-Pentadecilfenóxi)propanoato de etila (LDT408, **24**)



Óleo amarelo

Rendimento (92 %)

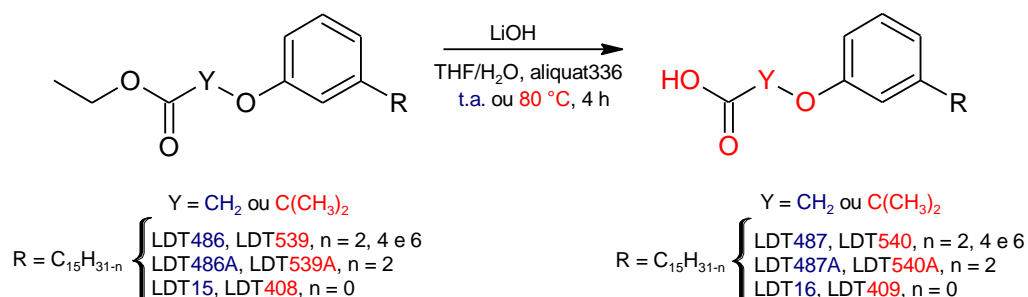
R_f: 0,75 (9:1 Hex:AcOEt)

Fórmula molecular: $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_3$

RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz): δ : 0,89 (t, $J = 6,7$ Hz 3H, H15'); 1,24-1,28 (m, 27H, $\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$, H3'-14'); 1,57-1,61 (m, 8H, $\text{ArOC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ e H2'); 2,55 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H, H1'); 4,24 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, $\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$); 6,65 (dd, $J = 8,1$ Hz, $J = 1,7$ Hz, 1H, H6); 6,70 (sl, 1H, H2); 6,81 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H4); 7,13 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H, H5).

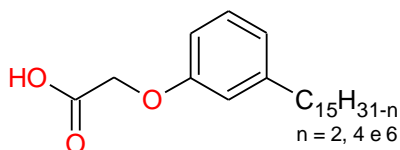
RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 75 MHz): δ : 14,3 ($\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 14,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$, 15'); 22,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 14'); 25,6 ($\text{ArOC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 29,5-29,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 3'-12'); 31,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 2'); 32,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 13'); 36,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 1'); 61,5 ($\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$); 79,1 ($\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 116,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 6); 119,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 2); 122,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 4); 128,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 5); 144,5 ($\underline{\text{C}}$, 3); 155,6 ($\underline{\text{C}}$, 1); 174,6 ($\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

5.1.6 Síntese das Misturas de Ácidos LDT487 (25) e LDT540 (26) e dos Derivados β -oxoácidos LDT487A (27), LDT540A (28), LDT16 (29) e LDT409 (30)



Em experimentos independentes, a um balão (25,0 mL) foram adicionados as misturas e os derivados: **19** (0,54 g; 1,40 mmol), **20** (0,50 g; 1,28 mmol), **21** (0,25 g; 0,64 mmol), **22** (0,40 g; 0,97 mmol), **23** (0,50 g; 1,20 mmol) ou **24** (0,50 g; 1,19 mmol), hidróxido de lítio (4,00 eq), solubilizado em água destilada (1,0-2,0 mL), catalisador de transferência de fase Aliquat336[®] (2-3 gotas) e tetraidrofurano (5,0-10,0 mL). O sistema reacional foi colocado sob agitação magnética por 4 horas. Para os derivados dimetilados, o sistema reacional foi colocado sob agitação magnética com condensador acoplado a banho termostático à 10 °C, sob refluxo com temperatura interna a 80 °C por 4 horas. Na sequência, a mistura foi acidificada com ácido clorídrico concentrado até pH 1,0 e extraída com acetato de etila (3 x 5,0 mL). As frações orgânicas reunidas foram lavadas com solução salina saturada (10,0 mL) e seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado à pressão reduzida e os produtos obtidos foram purificados em coluna de gel de sílica, eluída com hexano/acetato de etila (80 %: 20 %), fornecendo os derivados e as misturas de ácidos.

Mistura de Ácidos (*Z*)-2-(3-(pentadec-8-en-, 8,11-dien-, 8,11,14-trien-1-il)fenóxi)acético (LDT487, **25**)



Óleo incolor

Rendimento (74 %)

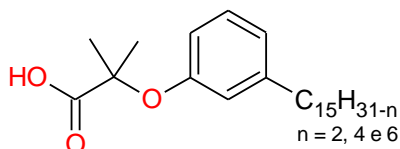
R_f: 0,42 (4:1 Hex:AcOEt)

Fórmula molecular: C₂₃H₃₂O₃

RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz): δ : 0,88-0,95 (m, 3H, H15'a-b); 1,28-1,41 (m, 14H, H3'-6' a-c, H11'a, H14'a-b); 1,59-1,64 (m, 2H, H2'a-c); 2,02-2,04 (m, 3H, H7'a-c, H10'a, H13'b); 2,59 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H, H1'a-c); 2,80-2,84 (m, 2H, H10'b-c, H13'c); 4,69 (s, 2H, $\text{ArOCH}_2\text{CO}_2\text{H}$); 5,35-5,41 (m, 2H, H8'-H9'a-c, H11'-12'b-c); 6,74 (dd, $J = 8,2$ Hz, $J = 2,1$ Hz, 1H, H6); 6,79 (sl, 1H, H2); 6,86 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H4); 7,22 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H, H5).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 75 MHz): δ : 14,0-14,3 (CH_3 , 15'a-b); 22,9-23,0 (CH_2 , 14'a-b); 25,8-25,9 (CH_2 , 10'b-c, 13'c); 27,4 (CH_2 , 7'a-c, 10'a, 13'b); 29,2-29,9 (CH_2 , 3'-6'a-c, 11'-12'a); 31,5 (CH_2 , 2'a-c); 31,7-32,0 (CH_2 , 13'a); 36,1 (CH_2 , 1'a-c); 65,1 ($\text{ArOCH}_2\text{CO}_2\text{H}$); 111,6 (ArCH , 6); 114,9 (CH , 15'c); 115,3 (ArCH , 2); 122,6 (ArCH , 4); 129,5 (CH , 5); 127,1-129,5 e 130,0-130,6 (CH , 8'-9'a-c, 11'-12'b-c); 137,0 (CH , 14'c); 145,2 (C , 3); 157,6 (C , 1); 174,3 ($\text{ArOCH}_2\text{CO}_2\text{H}$).

Mistura de Ácidos (*Z*)-2-Metil-2-(3-(pentadec-8-en-, 8,11-dien-, 8,11,14-trien-1-il)fenóxi)propanóico (LDT540, **26**)



Óleo incolor

Rendimento (82 %)

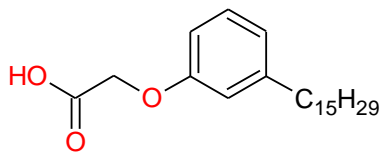
Rf: 0,66 (4:1 Hex:AcOEt)

Fórmula molecular: $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_3$

RMN de ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz): δ : 0,87-0,94 (m, 3H, H15'a-b); 1,31-1,40 (m, 18H, H3'-6' a-c, H11'a, H14'a-b); 1,60 (s, 12H, H2'a-c, $\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{H}$); 2,01-2,03 (m, 3H, H7'a-c, H10'a, H13'b); 2,57 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H, H1'a-c); 2,79-2,84 (m, 1H, H10'b-c, H13'c); 5,34-5,38 (m, 2H, H8'-H9'a-c, H11'-12'b-c); 6,75 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H6); 6,78 (sl, 1H, H4); 6,89 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H4); 7,17 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H, H5).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 75 MHz): δ : 14,3 (CH_3 , 15'a-b); 22,8-23,0 (CH_2 , 14'a-b); 25,3-25,8 (CH_2 , 10'b-c, 13'c, $\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{H}$); 27,4 (CH_2 , 7'a-c, 10'a, 13'b); 29,2-29,9 (CH_2 , 3'-6'a-c, 11'-12'a); 31,5 (CH_2 , 2'a-c); 31,7-32,0 (CH_2 , 13'a); 36,0 (CH_2 , 1'a-c); 79,8 ($\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{H}$); 114,9 (CH , 15'c); 117,7 (CH , 6); 121,1 (CH , 2); 123,7 (CH , 4); 129,5 (CH , 5); 127,0-129,1 e 130,0-130,3 (CH , 8'-9'a-c, 11'-12'b-c); 137,0 (CH , 14'c); 144,8 (C , 3); 154,5 (C , 1); 178,1 ($\text{ArOCH}_2\text{CO}_2\text{H}$).

Ácido 2-(3-((8Z)-pentadec-8-en-1-il)fenóxi)acético (LDT487A, **27**)



Sólido branco

Rendimento (88 %)

Rf: 0,60 (3:1 Hex:AcOEt)

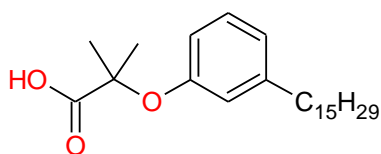
Ponto de fusão: 52-54 °C

Fórmula molecular: C₂₃H₃₆O₃

RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz): δ: 0,87-0,92 (m, 3H, H15'a); 1,28-1,32 (m, 15H, H3'-6'a, H11'-14'a); 1,61 (sl, 2H, H2'a); 2,00-2,03 (m, 4H, H7'a, H10'a); 2,59 (t, J = 7,7 Hz, 2H, H1'a); 4,68 (s, 2H, ArOCH₂CO₂H); 5,34-5,38 (m, 2H, H8'-H9'a); 6,73 (dd, J = 8,2 Hz, J = 2,2 Hz, 1H, H6); 6,78 (sl, 1H, H2); 6,85 (d, J = 7,5 Hz, 1H, H4); 7,21 (t, J = 7,8 Hz, 1H, H5).

RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz): δ: 14,3 (CH₃, 15'a); 22,8 (CH₂, 14'a); 27,4 (CH₂, 7'a, 10'a); 29,2-29,9 (CH₂, 3'-6'a, 11'-12'a); 31,5 (CH₂, 2'a); 32,0 (CH₂, 13'a); 36,1 (CH₂, 1'a); 65,1 (ArOCH₂CO₂H); 111,6 (CH, 6); 115,3 (CH, 2); 122,5 (CH, 4); 129,5 (CH, 5); 130,0-130,1 (CH, 8'-9'a); 145,2 (C, 3); 157,7 (C, 1); 174,1 (ArOCH₂CO₂H).

Ácido 2-metil-2-(3-((8Z)-pentadec-8-en-1-il)fenóxi)propanóico (LDT540A, **28**)



Óleo incolor

Rendimento (80 %)

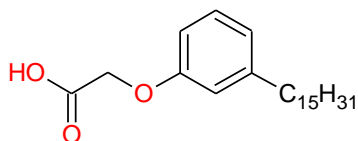
Rf: 0,77 (4:1 Hex:AcOEt)

Fórmula molecular: C₂₅H₄₀O₃

RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz): δ: 0,86-0,89 (m, 3H, H15'a); 1,26-1,30 (m, 16H, H3'-6'a, H11'-14'a); 1,60 (s, 8H, H2'a, ArOC(CH₃)₂CO₂H); 2,00-2,03 (m, 3H, H7'a, H10'a); 2,57 (t, J = 7,7 Hz, 2H, H1'a); 5,33-5,37 (m, 2H, H8'-H9'a); 6,74-6,77 (m, 2H, H6, H2); 6,91 (d, J = 7,5 Hz, 1H, H4); 7,18 (t, J = 7,8 Hz, 1H, H5).

RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz): δ: 14,3 (CH₃, 15'a); 22,9 (CH₂, 14'a); 25,2 (CH₂, ArOC(CH₃)₃CO₂H); 27,4 (CH₂, 7'a, 10'a); 29,2-30,0 (CH₂, 3'-6'a, 11'-12'a); 31,5 (CH₂, 2'a); 32,0 (CH₂, 13'a); 36,0 (CH₂, 1'a); 80,0 (ArOC(CH₃)₂CO₂H); 118,0 (CH, 6); 121,4 (CH, 2); 122,4 (CH, 4); 124,0 (CH, 5); 128,3-129,2 e 130,0-130,3 (CH, 8'-9'a); 144,8 (C, 3); 154,2 (C, 1); 177,2 (ArOCH₂CO₂H).

Ácido 2-(3-Pentadecilfenóxi)acético (LDT16, **29**)



Sólido branco

Rendimento (90 %)

Rf: 0,58 (3:1 Hex:AcOEt)

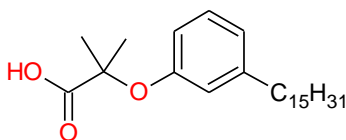
Ponto de fusão: 77-79 °C

Fórmula molecular: C₂₃H₃₈O₃

RMN de ¹H (CDCl₃; 500 MHz): δ: 0,89 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H, H_{15'}); 1,27-1,31 (m, 24H, 3'-14'); 1,60-1,62 (m, 2H, H_{2'}); 2,57 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H, H_{1'}); 4,66 (s, 2H, ArOCH₂CO₂H); 6,72 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, H₆); 6,77 (sl, 1H, H₂); 6,84 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H, H₄); 7,20 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, H₅).

RMN de ¹³C (CDCl₃; 125 MHz): δ: 14,3 (CH₃, 15'); 22,9 (CH₂, 14'); 29,2-29,8 (CH₂, 2'-12'); 31,8 (CH₂, 2'); 32,1 (CH₂, 13'); 36,2 (CH₂, 1'); 65,1 (ArOCH₂CO₂H); 111,6 (CH, 6); 115,3 (CH, 2); 122,4 (CH, 4); 129,5 (CH, 5); 145,2 (C, 3); 157,7 (C, 1); 173,2 (ArOCH₂CO₂H).

Ácido 2-Metil-2-(3-pentadecilfenóxi)propanóico (LDT409, **30**)



Sólido Branco

Rendimento (90 %)

Rf: 0,66 (3:1 Hex:AcOEt)

Ponto de fusão: 46-48 °C

Fórmula molecular: C₂₅H₄₂O₃

RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz): δ: 0,90 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H, H_{15'}); 1,28 (s, 24H, CH₂, H_{3'}-14'); 1,62 (m, 8H, ArOC(CH₃)₂CO₂H e H_{2'}); 2,57 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H, H_{1'}); 6,76 (dd, *J* = 8,1 Hz, *J* = 1,7 Hz, 1H, H₆); 6,79 (sl, 1H, H₂); 6,90 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, H₄); 7,18 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H, H₅).

RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz): δ: 14,3 (CH₃, 15'); 22,9 (CH₂, 14'); 25,3 (ArOC(CH₃)₃CO₂H); 29,5-29,9 (CH₂, 3'-12'); 31,5 (CH₂, 2'); 32,1 (CH₂, 13'); 36,0 (CH₂, 1'); 79,6 (ArOC(CH₃)₂CO₂H); 117,6 (CH, 6); 121,0 (CH, 2); 123,6 (CH, 4); 129,1 (CH, 5); 144,8 (C, 3); 154,7 (C, 1); 179,2 (ArOC(CH₃)₂CO₂H).

5.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

Uma vez sintetizados e caracterizados por métodos espectroscópicos, todos os derivados-alvo foram submetidos a ensaios *in vitro* para avaliação da ativação transcricional frente a PPARs, através de ensaio de gene reporter em células de rim embrionário humano (HEK293), e seus efeitos regulatórios na expressão de genes alvo de PPAR associados a oxidação e captação de ácidos graxos, por meio de ensaio com hepatócitos primários extraídos de camundongos, e diferenciação de células 3T3-L1. Em adição, foi determinada a viabilidade de cardiomiócitos H9c2 e células HEK293 após tratamento com os LDTs. Por fim, os compostos da série saturada LDT15 (**21**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) foram submetidos a estudos *in vivo* para caracterização da ativação transcricional de PPAR em *Danio rerio* (zebrafish) e determinação do composto mais ativo para a série.

Os ensaios biológicos foram realizados em colaboração com a Prof. Dra. Carolyn Cummins, pelas alunas Lilia Magomedova e Cigdem Sahin, do *Nuclear Hormone Receptors in Human Health and Disease* da *Leslie Dan Faculty of Pharmacy, University of Toronto* (UofT). Todos os procedimentos foram aprovados pelo *Faculties of Medicine and Pharmacy Animal Care Committee* (FMPACC) da UofT.

5.2.1 Reagentes Químicos

Os controles WY14643, GW7647, GW0742, rosiglitazona e pioglitazona foram adquiridos da Cayman Chemicals® (EUA). Comprimidos de inibidores de protease foram obtidos da Roche® (Canadá). Dexametasona, insulina, isobutilmetilxantina, meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com alto teor de glicose, DMEM com baixo teor de glicose, DMEM sem glicose, lactato de sódio, penicilina e estreptomicina, solução 0,25 % de tripsina-EDTA, tampão fosfato-salino (PBS), dimetilsulfóxido (DMSO), corante óleo vermelho O em pó e 10% de formalina tamponada neutra foram obtidos a partir da Sigma-Aldrich® (EUA). Soro fetal bovino, soro fetal bovino tratado com carvão ativado, soro neonatal bovino e meio de cultura M199 foram adquiridos da Invitrogen® (EUA). As placas tratadas com cultura

de tecidos e as placas revestidas com colagênio tipo I de camundongos foram obtidas da BD Bioscience® (EUA). O sistema de ensaio de luciferase foi adquirido da Promega® (EUA). Por fim, o RNA STAT-60 foi comprado da Tel-Test Inc®.

5.2.2 Plasmídeos

Os plasmídeos GAL4-hPPAR α , GAL4-hPPAR β/δ , GAL4-hPPAR γ , GAL4-mPPAR α , GAL4-mPPAR β/δ , GAL4-mPPAR γ , o promotor de luciferase, o controle β -galactosidase, e o vetor de plasmídeo pGEM foram cedidos pelo Prof. Dr. David Mangelsdorf da *University of Texas*. Os plasmídeos foram convertidos em DH5-alfa de *Escherichia coli*, e cultivados por 12 horas a 37 °C, em placas de agar Miller contendo 0,1 mg/mL de ampicilina. Uma única colônia foi isolada e cultivada em meio de caldo LB contendo 0,1 mg/mL de ampicilina, sobre agitação a 37 °C durante 12 horas. O DNA de plasmídeo foi purificado utilizando o kit de midiprep de plasmídeo GenElute-HP da Invitrogen® (EUA).

5.2.3 Linhagens Celulares e Condições para Cultivo

Células de rim embrionário humano HEK293 foram cultivadas em DMEM com alto teor de glicose suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de penicilina/estreptomicina em placas de cultura de 100 mm, e incubadas a 37 °C em atmosfera úmida mantida com 5 % de dióxido de carbono (CO₂). Quando em uso, as células HEK293 foram rotineiramente divididas em nova placa ao atingir aproximadamente 80 % de confluência, duas vezes por semana na proporção de 1:5. Células 3T3-L1 murino foram mantidas em DMEM contendo 10 % de soro neonatal bovino e 1 % de penicilina/estreptomicina, incubadas a 37 °C em atmosfera úmida mantida com 5 % de CO₂ até atingirem a confluência. As células 3T3-L1 foram divididas em proporção 1:4 ou 1:8, uma vez por semana. A linhagem celular de cardiomiócitos de camundongos H9c2 foi cultivada em DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 mM de piruvato de sódio, dividida em proporção de 1:3 ao atingirem aproximadamente 70 % de confluência.

5.2.4 Ensaio de Gene Reporter

Células HEK293 foram transfectadas, aproximadamente 40 mil células por poço, usando fosfato de cálcio, em DMEM contendo 10 % de soro fetal bovino tratado com carvão ativado, em placa de 96 poços e incubadas por 12 horas a 37 °C em atmosfera úmida mantida com 5 % de CO₂. No dia seguinte, as células foram transfectadas com os plasmídeos de expressão GAL4-hPPAR α , GAL4-hPPAR β/δ e GAL4-hPPAR γ . A quantidade total de DNA de plasmídeo (150 ng/poço) incluiu 50 ng de reporter de luciferase, 20 ng pCMX- β -galactosidase, 15 ng de GAL4-LBD da proteína de fusão do receptor, e pGEM para preenchimento do plasmídeo. Os compostos para teste foram adicionados no mesmo meio de 6 a 8 horas pós-transfecção em concentrações de 10 nM a 100 μ M. Para PPAR α , foram utilizados como controles positivos, GW7647 e WY14643, em PPAR β/δ os controles utilizados foram CAY10592 e GW0742, por fim, em PPAR γ utilizou-se rosiglitazona e pioglitazona. Etanol e dimetilsulfóxido foram usados em concentrações finais de 0,1 % como veículos e controles negativos. As células foram colhidas 14 a 16 horas mais tarde e ensaiadas para a atividade de luciferase, sendo os valores da luciferase normalizados para a eficiência da transfecção utilizando β -galactosidase, e multiplicados pelo tempo de incubação para a atividade de β -galactosidase. Os valores foram expressos como unidades relativas de luciferase (RLU). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos em três ensaios independentes. Ao final, curva dose resposta foi confeccionada por meio do programa GraphPad Prism 6[®] através dos valores de EC₅₀ obtidos para cada composto.

$$RLU = \frac{\text{Atividade Luciferase}}{\text{Atividade } \beta\text{-galactosidase}} \times \text{Tempo (min)}$$

5.2.5 Ensaio em Hepatócitos Primários

Hepatócitos primários do fígado de camundongos tipo selvagem, com 7 a 10 semanas de idade, foram isolados por perfusão de colagenase conforme descrito por Patel e colaboradores (2011).

Em resumo, os camundongos foram anestesiados na presença de isoflurano e os órgãos externos deslocados de maneira a se expor a veia porta. Uma canula (24GA, 0,75 IN; BD Angiocath) foi inserida na veia porta e o fígado foi perfundido com 40 mL de tampão de digestão de colagenase, utilizando uma bomba peristáltica operada a 4 mL/min por 10 minutos. O fígado digerido foi excisado e transferido para placa estéril de 100 mm para lavagem com DMEM contendo baixa concentração de glicose e 5 % de soro fetal bovino tratado com carvão ativado, 1 x de penicilina/estreptomicina e 0,01 M de HEPES. As células foram retiradas do fígado com auxílio de uma pinça de ponta fina, filtradas através de filtro de células de 100 µm (BD Bioscience®, EUA), e centrifugadas com força centrífuga relativa de 50 xg durante 3 minutos à temperatura ambiente. Os hepatócitos foram lavados três vezes com tampão de lavagem composto por DMEM com baixa concentração de glicose suplementado com 5 % soro fetal bovino tratado com carvão ativado e 1 M HEPES, pH 7,4 e 1 % penicilina/estreptomicina.

As células foram contadas usando corante azul de triptofano, para determinação da viabilidade, e semeadas em placas revestidas com colágeno de tipo I e IV, em concentração de $0,5 \times 10^5$ células por poço, durante 2 horas em meio contendo 10 % de soro fetal bovino tratado com carvão ativado, 1 x de penicilina/estreptomicina e 10 nM de insulina. Em seguida, foi adicionado meio de cultura M199, contendo 5 % de soro fetal bovino tratado com carvão, 1 % de penicilina/estreptomicina e 1 nM de insulina. Tratamentos com os ligantes a 50 µM, o controle positivo WY14643 ou com os veículos em concentrações finais de 0,1 %, etanol e dimetilsulfóxido, foram realizados no dia seguinte, em meio M199 sem soro fetal bovino e incubado por 12 horas a 37 °C em 5 % de CO₂. As células foram colhidas 16 horas mais tarde, para a extração de RNA e realização de qPCR para análise da expressão de genes: CD36, FABP1, PDK4, CPT1 e FGF21.

5.2.6 Ensaio de Diferenciação de Adipócitos

Células 3T3-L1 foram cultivadas em placas de 12 poços para cultura de células, mantidas em DMEM suplementado com 10 % de soro neonatal bovino, até sua confluência de 100 %. Dois dias depois, a diferenciação de adipócitos foi induzida pelo tratamento das células com meio de diferenciação celular contendo

100 µg/mL de isobutilmetilxantina, 1 µM de dexametasona e 5 µg/mL de insulina. Com o início da diferenciação, as células foram tratadas com o ligante a 25 µM, o controle positivo, rosiglitazona e pioglitazona, ou os veículos a 0,1 %, etanol e dimetilsulfóxido. Em todo o período de cultivo, totalizando 11 dias, as células foram submetidas a tratamento com ligantes ou com os veículos. A adipogênese foi avaliada pela expressão de proteínas adipocitárias, aP2, LPL, CD36 e adiponectina, por meio de qPCR (STUDENT; HSU; LANE, 1980).

Ao final do ensaio de diferenciação de adipócitos, o acúmulo de lipídeos foi avaliado pela coloração com o corante de lipídeos vermelho neutro. Após 11 dias de diferenciação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas em 10 % de formalina tamponada neutra por 1 hora a temperatura ambiente. O vermelho neutro foi diluído em água destilada (3:2) e esta mistura, filtrada com membrana de 0,45 µm. Na sequência, as células fixadas foram lavadas duas vezes com água destilada e isopropanol 60% e coradas com solução 0,6 % de vermelho neutro, 60 % de isopropanol e 40 % de água, durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguida de 4 lavagens com água destilada para remoção do corante não ligado as células. As imagens foram visualizadas usando o sistema de imagens celular EVOS® XL CORE (Life Technologies, Canadá).

5.2.7 Extração de RNA, Síntese de DNA e Análise por qPCR

O RNA total das células foi isolado usando RNA STAT-60, tratado com DNase I e transcrito reversamente em DNA complementar (cDNA) com hexâmeros aleatórios, utilizando o *High Capacity Reverse Transcription System* da ABI®. qPCR foi realizada usando 2X SYBR Green Master Mix em equipamento 7900 da ABI®, com placas de 384 poços. O método Ct comparativo foi utilizado para calcular os níveis relativos de RNA mensageiro (mRNA), normalizados para a ciclofilina ou ao mRNA 36B4 (BOOKOUT et al., 2005).

5.2.8 Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi medida utilizando kit de ensaio colorimétrico MTT a 595 nm (Roche®). Células H9c2 foram semeadas em placas de 96 poços, 5 mil células por poço, e mantidas com 100 µL de meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de penicilina/estreptomicina. As células HEK293 foram cultivadas à 40 mil células por poço, em placa de 96 poços contendo DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino. Ambas as linhagens celulares foram incubadas à 37 °C, em 5 % de CO₂ por 24 horas. No dia seguinte, as células foram tratadas com o veículo dimetilsulfóxido em concentração de 0,1 %, controles positivos (100 µM e 150 µM de ácido palmítico, 100 µM de ácido esteárico, 10 µM de rosiglitazona, 10 µM de WY14643, 10 µM de GW7642 e 1 µM de muraglitazar) ou 25 µM dos compostos LDTs, e incubadas durante 24 horas. Após o período de tratamento, foram adicionados 10 µM de reagente de marcação MTT, para obter uma concentração final de 0,5 mg/mL em cada poço, e as células foram incubadas por 4 horas, à 37 °C em 5 % de CO₂. O corante foi inativado por meio da adição de 100 µL de tampão de solubilidade Roche® a cada poço e incubação da placa por 12 horas em atmosfera umidificada, antes de medir a absorbância em 595 nm.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Absorbância do composto} - \text{Absorbância do branco}}{\text{Absorbância do DMSO} - \text{Absorbância do branco}} \times 100$$

5.2.9 Sistema Reporter Fluorescente em *Danio rerio* (Zebrafish)

Plasmídeos e linhagens transgênicas de zebrafish foram criadas contendo os vetores de expressão GAL4-DBD para o LDB de PPAR α (aminoácidos 179-468), PPAR β/δ (aminoácidos 142-441) e PPAR γ (aminoácidos 189-477), junto ao gene da proteína fluorescente verde (GFP), conforme descrito por Tiefenbach e colaboradores (2010).

O Zebrafish foi mantido em temperatura de 28,5 °C em ciclo claro/escuro por 10 a 14 horas e analisado de acordo com horas ou dias pós-fertilização. Os embriões transgênicos de PPAR foram coletados a partir de cruzamento de peixes homozigotos com o tipo selvagem, e desenvolvidos em água de embrião (0,0750 g/L

de bicarbonato de sódio, 0,0180 g/L de sal marinho e 0,0084 g/L de sulfato de cálcio hidratado). Todos os embriões com desenvolvimento atrasado, mortos ou não fertilizados, foram descartados. Enquanto os córios de embriões, um dia após a fertilização, foram removidos enzimaticamente com Pronase (1,0 mg/mL). Espécimes de dez embriões foram dispensadas por poço em placa de 24 poços. Os derivados LDT15 (**21**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**), controles positivos WY14643, GW0742 e rosiglitazona, ou veículo DMSO, nas concentrações de EC₅₀ previamente obtidas no ensaio de gene reporter, foram solubilizados em 500 µL de água de embrião e adicionados a cada poço embrionário. Para PPAR α : 3,4 µM de LDT15 (**21**), 8,9 µM de LDT408 (**24**), 0,5 µM de LDT409 (**30**) e 5,0 µM de WY14643. Para PPAR β/δ : 26,0 µM de LDT15 (**21**), 30,0 µM de LDT408 (**24**), 30,0 µM de LDT409 (**30**) e 1,0 µM de GW0742. Para PPAR γ : 43,0 µM de LDT15 (**21**), 3,5 µM de LDT408 (**24**), 0,9 µM de LDT409 (**30**) e 100,0 nM de rosiglitazona. Após 1 hora de pré-incubação, os embriões foram submetidos a calor (28 a 37°C) por 30 minutos e imagens foram tiradas 24 horas mais tarde. A interação da proteína de fusão GAL4-PPAR na presença de ligantes ativos, resultou na expressão fluorescente do gene reporter de GFP.

5.2.10 Análise Estatística

Os dados foram analisados no programa estatístico GraphPad PRISM®. Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para comparação da média entre dois grupos, a significância estatística foi determinada por teste t de Student com correção de Welch. Para comparação da média entre múltiplos grupos, a análise de variância de um fator (one way ANOVA), seguida por pós-teste e correção de Holm-Sidak foi utilizada. Os valores atípicos foram removidos pelo método ROUT. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Síntese e Caracterização

6. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO

O planejamento sintético visando a obtenção dos derivados-alvo a partir do LCC técnico compreendeu a exploração de procedimentos sintéticos clássicos de interconversão de grupos funcionais, por exemplo, O-alkilação, e hidrólise alcalina, em condições experimentais à temperatura ambiente ou aquecimento convencional.

Os compostos sintetizados para o trabalho apresentam suas propriedades intelectuais protegidas por patente intitulada “*Novel ligands of PPAR α /d/g derived from cashew nut shell liquid (CNSL) with application to metabolic and Alzheimer’s disease*”, número 10002758, depositada em 26 de maio de 2014 no *Canadian Intellectual Property Office* (RO, CA).

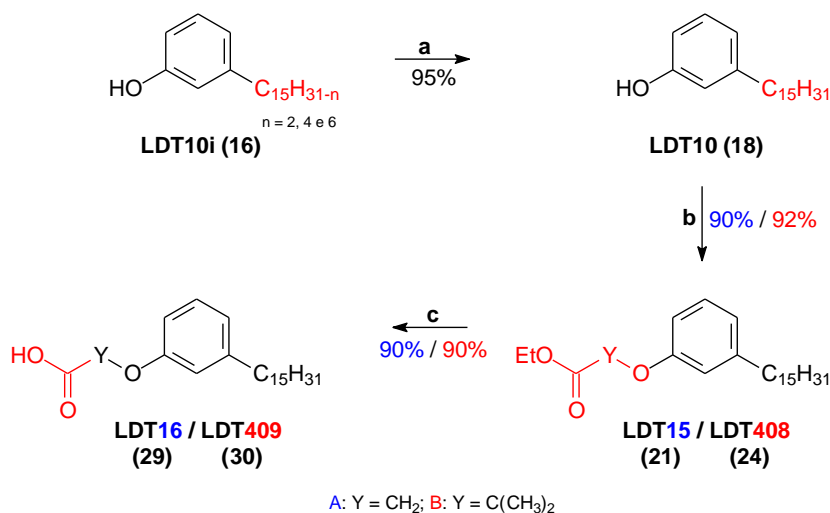
6.1 OBTENÇÃO DA MISTURA DE CARDANOIS (LDT10i, 16)

A mistura de cardanois fornecido pela RESIBRAS foi purificada em coluna de gel de sílica eluída com mistura de hexanos em rendimento de 90 %. LDT10i (**16**) foi caracterizada por análise espectroscópica por RMN evidenciando a presença dos derivados monoeno (a, C8'-C9'), dieno (b, C8'-C9' e C11'-C12') e trieno (c, C8'-C9', C11'-C12' e C14'-C15'). Os grupos vinilídeos 8'-9'a-c e 11'-12'b-c foram assinalados como multipeto na faixa de 5,37 a 5,46 ppm no espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 ; 500 MHz; Anexo 1), e confirmados por RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 125 MHz; Anexo 2) pela presença de sinais entre 127,0 a 129,5 ppm e 130,0 a 130,6 ppm. O grupo metilídeo 14'c foi identificado por deslocamento químico em 137,0 ppm (RMN de ^{13}C). Por sua vez, o metileno 15'c foi evidenciado como multipeto entre 4,99 e 5,09 ppm em RMN de ^1H , corroborado por sinal em 114,9 ppm em RMN de ^{13}C . Os hidrogênios alílicos (7'a-c, 10'a e 13'b) foram evidenciados como multipeto entre 2,04 e 2,08 ppm em RMN de ^1H , bem como pelo sinal em 27,4 ppm em RMN de ^{13}C . Por fim, os hidrogênios bis-alílicos (10'b-c e 13'c) foram assinalados pela presença de multipeto na faixa de 2,80 a 2,85 ppm (RMN de ^1H) e sinais na faixa de 25,8 a 25,9 (RMN de ^{13}C).

6.2 SÉRIE SATURADA

A síntese dos derivados planejados a partir do cardanol saturado (Esquema 3) foi iniciada a partir da hidrogenação catalítica da mistura de cardanois LDT10i (16), conduzindo à obtenção do LDT10 (18), como um sólido branco em rendimento de 95 % e caracterizado em CCD como uma única mancha (Rf 0,35 1:1 Hex:DCM).

Esquema 3: Metodologia sintética para obtenção da série saturada



a. H₂, Pd/C 10%, EtOH, t.a., 4h, 60 psi; b. i. BrCH₂CO₂Et, K₂CO₃, CH₃COCH₃, t.a., 24h; ii. Br(CH₃)₂CCO₂Et, K₂CO₃, KI, CH₃CN, 85°C/ 10°C, 24h; c. LiOH, THF-H₂O, Aliquat336, t.a. ou 80°C/10°C, 4h.

Na análise espectroscópica do derivado LDT10 (18), os deslocamentos químicos entre 0,91 ppm e 2,59 ppm (RMN de ¹H) e 14,3 ppm a 36,0 ppm (RMN de ¹³C) estão relacionados à cadeia alquílica saturada. Por sua vez, a ausência de sinais referentes aos derivados monoeno, dieno e trieno, corroboraram a caracterização do cardanol saturado.

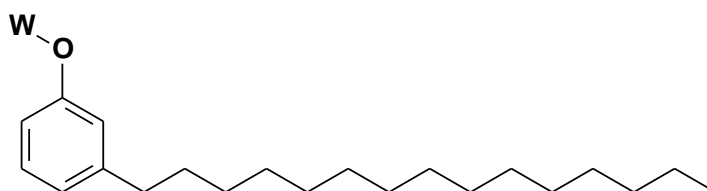
De posse do derivado LDT10 (18) este foi submetido à reação de O-alquilação com 2-haloésteres, bromacetato de etila levando ao derivado beta-oxiéster LDT15 (21), como um sólido branco caracterizado em CCD por única mancha (Rf 0,50 9: 1 Hex:AcOEt) em rendimento de 90 %, ou bromoisobutirato de etila conduzindo ao derivado LDT408 (24), óleo amarelo caracterizado em CCD como única mancha (Rf 0,75 9:1 Hex:AcOEt) em rendimento de 92 %. A subunidade etila do grupo carbetóxi dos derivados foi caracterizada em RMN de ¹H (Anexos 11 e 17) pela presença de quartetos em 4,28 ppm (7,1 Hz) e 4,24 ppm (7,1 Hz), corroborados pelos respectivos deslocamentos químicos em 61,5 ppm em RMN de

^{13}C (Anexos 12 e 18). Adicionalmente, o grupo carbonila foi identificado por sinal em 169,3 ppm e 174,6 ppm, corroborando para caracterização dos derivados **21** e **24**, respectivamente.

A próxima etapa da rota sintética planejada consistiu na hidrólise do grupo éster dos derivados LDT15 (**21**) e LDT408 (**24**), levando aos ácidos carboxílicos correspondentes LDT16 (**29**), obtido como sólido branco em rendimento de 90 % e caracterizado como única mancha em CCD (R_f 0,58 3:1 Hex:AcOEt), e LDT409 (**30**) obtido em rendimento de 90 % como sólido branco e caracterizado com única mancha em CCD (R_f 0,66 3:1 Hex:AcOEt). A conversão foi confirmada pela presença de sinal em 173,2 ppm e 179,2 ppm, relativos aos carbonos carboxílicos no espectro de RMN de ^{13}C para os derivados **29** (CDCl_3 ; 125 MHz; Anexo 24) e **30** (CDCl_3 ; 75 MHz; Anexo 30), bem como pela ausência dos sinais referentes ao grupo etoxila.

Um resumo dos rendimentos, ponto de fusão e principais sinais em RMN dos derivados saturados, LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**), estão ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1: Características físico-químicas e principais sinais em RMN de ^1H e RMN de ^{13}C obtidos para os derivados LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**)



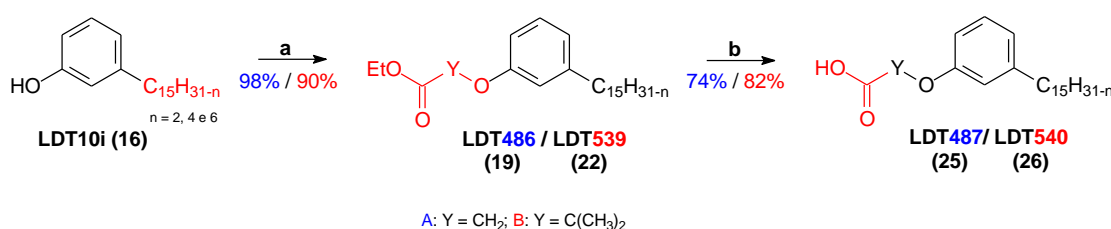
Compostos	Rend. (%)	p.f. (°C)	W	RMN de ^1H (δ ppm)	RMN de ^{13}C (δ ppm)
LDT15 (21)	90	30-31	$\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	1,30 – 1,33	14,3
			$\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	4,28	61,5
			$\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	--	169,3
LDT16 (29)	90	77-79	CH_2COOH	--	173,2
LDT408 (24)	92	--*	$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	1,24 – 1,28	14,3
			$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	4,24	61,5
			$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	1,57 – 1,61	25,6
			$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	--	174,6
LDT409 (30)	90	46-48	$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	1,62	25,3
			$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{COOH}$	--	179,2

--* Obtido como óleo

6.3 SÉRIE INSATURADA

A princípio foi realizada a avaliação da atividade dos compostos da série C15 saturada por meio de ensaio de gene reporter luciferase, LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) apresentaram perfis sobre a ativação parcial dos três isotipos de PPAR e superiores aos ácidos graxos saturados: decanóico, tetradecanóico e octadecanóico. Em adição, os derivados saturados foram indutores da expressão de transcritos de DNA para genes importantes à regulação do metabolismo da glicose e de lipídeos. Neste contexto, a série insaturada foi planejada (Esquema 4), pela semelhança aos ácidos graxos endógenos e eicosanóides, visando avaliar a relevância das duplas ligações na interação e ativação de PPAR, e sobre seus efeitos regulatórios.

Esquema 4: Metodologia sintética para obtenção da série mono-, di- e trieno-insaturada



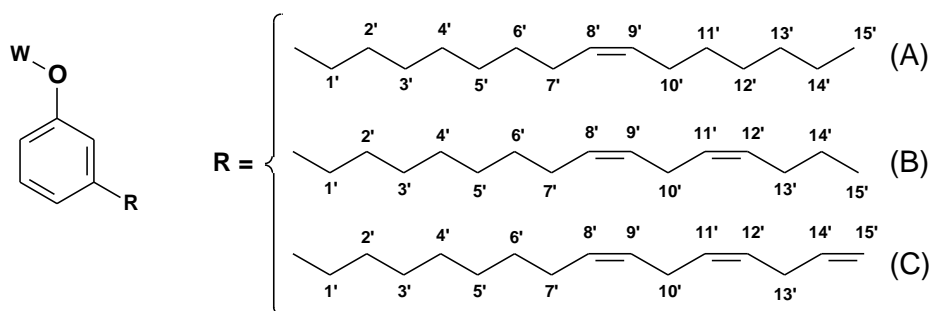
a. i. BrCH₂CO₂Et, K₂CO₃, CH₃COCH₃, t.a., 24h; ii. Br(CH₃)₂CCO₂Et, K₂CO₃, KI, CH₃CN, 85°C/ 10°C, 24h; b. LiOH, THF-H₂O, Aliquat336, t.a. ou 80°C/10°C, 4h.

Na série de análogos com cadeias laterais insaturadas, a mistura LDT10i (**16**) foi submetida à reação de O-alkilação com 2-bromacetato de etila levando à mistura LDT486 (**19**), óleo incolor caracterizado em CCD como única mancha (Rf 0,75 4:1 Hex:AcOEt) em rendimento de 98 %, ou bromoisobutirato de etila levando à mistura de derivados beta-oxiésteres LDT539 (**22**), obtida como óleo incolor e caracterizada em CCD como única mancha (Rf 0,84 4:1 Hex:AcOEt) em rendimento de 90 %. As misturas de ésteres apresentaram sinais característicos para a subunidade etila do grupo carbetóxi em RMN de ¹H (Anexos 7 e 13) pela presença de quarteto em 4,28 ppm (7,1 Hz) e 4,24 ppm (7,1 Hz), referentes ao metileno, corroborados pelos respectivos deslocamentos químicos em 61,5 ppm em RMN de ¹³C (Anexos 8 e 14). Enquanto que o sinal relativo ao carbono carbonílico foi evidenciado em 169,3 ppm e 174,6 ppm.

As misturas de compostos LDT486 (**19**) e LDT539 (**22**) foram submetidas à hidrólise conduzindo as misturas de ácidos carboxílicos LDT487 (**25**), óleo incolor caracterizado como única mancha em CCD (Rf 0,42 4:1 Hex:AcOEt) em rendimento de 74 %, e LDT540 (**26**) obtido em rendimento de 82 % como óleo incolor caracterizado com única mancha em CCD (Rf 0,66 4:1 Hex:AcOEt). A conversão foi confirmada pela presença de sinal em 174,3 ppm e 178,1 ppm, relativo ao carbono carbonílico (RMN de ^{13}C , Anexos 8 e 26), bem como pela ausência dos sinais em 4,24 ppm e 4,28 ppm em RMN de ^1H e 61,5 ppm em RMN de ^{13}C referentes ao grupo metileno da etoxila.

Um resumo dos rendimentos, ponto de fusão e principais sinais em RMN das misturas de compostos, LDT486 (**19**), LDT487 (**25**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**), estão ilustrados na Tabela 2.

Tabela 2: Características físico-químicas e principais sinais em RMN de ^1H e RMN de ^{13}C obtidos para as misturas de compostos LDT486 (**19**), LDT487 (**25**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**)



Compostos	Rend. (%)	p.f. (°C)	W	RMN de ^1H (δ ppm)	RMN de ^{13}C (δ ppm)
LDT486 (19)	98	--*	$\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	1,27 – 1,32	14,3 – 14,4
			$\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	4,28	61,5
			$\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	--	169,3
LDT487 (25)	74	--*	CH_2COOH	--	174,3
LDT539 (22)	90	--*	$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	1,23 – 1,40	14,3
			$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	4,24	61,5
			$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	1,60	25,6 – 25,8
			$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	--	174,6
LDT540 (26)	82	--*	$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	1,60	25,8
			$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{COOH}$	--	178,1

--* Obtido como óleo

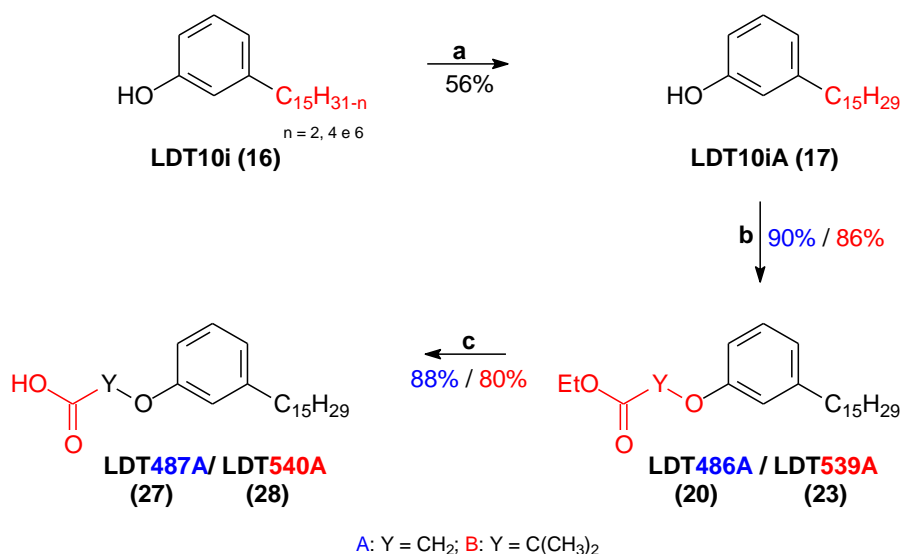
Em adição, as cadeias laterais insaturadas monoeno (a, C8'-C9'), dieno (b, C8'-C9' e C11'-C12') e trieno (c, C8'-C9', C11'-C12' e C14'-C'15') também foram caracterizadas por assinalamentos em RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (Tabela 3).

Tabela 3: Assinalamentos de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C das cadeias insaturadas para as misturas de compostos LDT10i (16), LDT486 (19), LDT487 (25), LDT539 (22) e LDT540 (26)

RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (δ ppm)					
Deslocamento	LDT10i	LDT486	LDT487	LDT539	LDT540
15'A-B	0,89 – 0,95 14,0 – 14,3	0,88 – 0,90 14,3 – 14,4	0,88 – 0,95 14,0 – 14,3	0,87 – 0,94 14,3	0,87 – 0,94 14,3
3'-6'A-C e 11'-12'A	1,33 – 1,43 29,2 – 29,9	1,27 – 1,32 29,2 – 29,9	1,28 – 1,41 29,2 – 29,9	1,23 – 1,40 29,2 – 29,9	1,31 – 1,40 29,2 – 29,9
13'A	1,33 – 1,43 31,7 – 32,0	1,27 – 1,32 32,0	1,28 – 1,41 31,7 – 32,0	1,23 – 1,40 32,0	1,31 – 1,40 31,7 – 32,0
14'A-B	1,33 – 1,43 22,8 – 23,0	1,27 – 1,32 22,8	1,28 – 1,41 22,9 – 23,0	1,23 – 1,40 22,8	1,31 – 1,40 22,8 – 23,0
2'A-C	1,61 31,5	1,60 31,5	1,59 – 1,64 31,5	1,60 31,4	1,60 31,5
7'A-C, 10'A e 13B	2,04 – 2,08 27,4	2,00 – 2,04 27,4	2,02 – 2,04 27,4	2,00 – 2,04 27,4	2,01 – 2,03 27,4
1'A-C	2,56 36,0	2,57 36,1	2,59 36,1	2,54 36,1	2,57 36,0
10'B-C e 13'C	2,80 – 2,85 25,8 – 25,9	--	2,80 – 2,84 25,8 – 25,9	2,79 – 2,84 25,6 – 25,8	2,79 – 2,84 25,3 – 25,8
15'C	4,99 – 5,09 114,9	--	114,9	114,9	114,9
8'-9'A-C e 11'-12'B-C	5,37 – 5,46 127,0 – 129,5 130,0 – 130,6	5,34 – 5,36 130,0 – 130,1	5,35 – 5,41 127,1 – 129,5 130,0 – 130,6	5,34 – 5,44 127,8 – 128,9 130,0 – 130,1	5,34 – 5,38 127,0 – 129,1 130,0 – 130,3
14'C	137,0	--	137,0	--	137,0

6.4 SÉRIE MONOINSATURADA

Por sua vez, os derivados monoinsaturados foram sintetizados (Esquema 5) visando mimetizar o ácido oleico, agonista endógeno PPAR, e avaliar a importância da cadeia monoinsaturada na ativação dos receptores.

Esquema 5: Metodologia sintética para obtenção da série monoinsaturada

a. SiO₂/AgNO₃ 12%; b. i. BrCH₂CO₂Et, K₂CO₃, CH₃COCH₃, t.a., 24h; ii. Br(CH₃)₂CCO₂Et, K₂CO₃, KI, CH₃CN, 85°C/ 10°C, 24h; c. LiOH, THF-H₂O, Aliquat336, t.a. ou 80°C/10°C, 4h.

O cardanol monoinsaturado foi obtido após fracionamento cromatográfico do LCC técnico, fornecido pela RESIBRAS, em coluna de gel de sílica dopada com 12 % de nitrato de prata eluída com mistura de hexanos em rendimento de 56 %. LDT10iA (**17**) foi caracterizado por análise espectroscópica, evidenciando a presença do derivado monoeno. Neste sentido, o vinilideno 8'-9' apresentou assinalamento como multiplete na faixa de 5,34 a 5,40 ppm em RMN de ¹H (CDCl₃; 500 MHz; Anexo 3), confirmados por RMN de ¹³C (CDCl₃; 125 MHz; Anexo 4), pela presença de sinais entre 130,0 e 130,1 ppm. Por sua vez, os hidrogênios alílicos (7' e 10') foram evidenciados por multiplete entre 2,03 e 2,08 ppm em RMN de ¹H, bem como pela presença de sinal em 27,4 ppm em RMN de ¹³C.

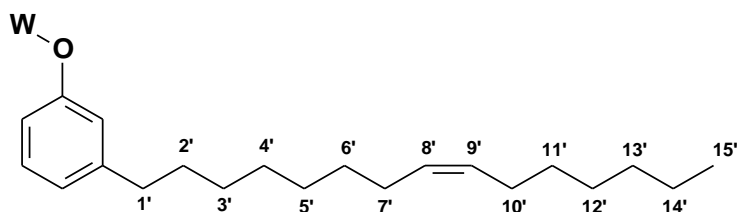
Na obtenção dos derivados monoinsaturados, inicialmente LDT10iA (**17**) foi submetido à reação de O-alkilação com 2-bromacetato de etila conduzindo ao LDT486A (**20**), obtido como óleo incolor em rendimento de 90 % e caracterizado em CCD como única mancha (Rf 0,51 9:1 Hex:AcOEt), ou com bromoisobutirato de etila que forneceu o derivado beta-oxiéster LDT539A (**23**) como óleo incolor em rendimento de 86 % e caracterizado em CCD como única mancha (Rf 0,53 9:1 Hex:AcOEt). Os grupos metila da subunidade alfa-carbonila do LDT539A (**23**) foram caracterizados por deslocamento em 25,6 ppm bem como pela presença do carbono terciário em 79,1 ppm em RMN de ¹³C (CDCl₃; 75 MHz; Anexo 16) e multiplete entre 1,60-1,64 ppm em RMN de ¹H (CDCl₃; 300 MHz; Anexo 15). Sinais referente aos

metilenos característicos à subunidade etila foram evidenciados pela presença de quadrupletos em 4,27 ppm (7,1 Hz) e 4,28 ppm (7,1 Hz) em RMN de ^1H (Anexos 9 e 15), corroborados pelos respectivos deslocamentos químicos em 61,5 ppm em RMN de ^{13}C (Anexos 10 e 16); enquanto o grupo carbonila foi identificado por sinais em 169,3 ppm e 174,6 ppm.

Por fim, os ácidos LDT487A (**27**) e LDT540A (**28**) foram obtidos após hidrólise, em rendimentos de 88 % e 80 %, como sólido branco e óleo incolor, caracterizados com única mancha em CCD (Rf 0,60 3:1 Hex:AcOEt e Rf 0,77 4:1 Hex:AcOEt), respectivamente. Os derivados foram caracterizados pela ausência dos sinais em 4,27 ppm e 4,28 ppm (RMN de ^1H , Anexos 21 e 27) e 61,5 ppm (RMN de ^{13}C , Anexos 22 e 28), referentes aos grupos metilenos da etoxila, e pela presença de deslocamentos químicos em 174,1 ppm e 177,2 ppm relativos ao carbono carbonílico no espectro de RMN de ^{13}C .

Um resumo dos rendimentos, ponto de fusão e principais sinais em RMN dos derivados monoinsaturados LDT486A (**20**), LDT487A (**27**), LDT539A (**23**) e LDT540A (**28**), estão ilustrados na Tabela 4.

Tabela 4: Características físico-químicas e principais sinais em RMN de ^1H e RMN de ^{13}C obtidos para os compostos monoinsaturados LDT486A (**20**), LDT487A (**27**), LDT539A (**23**) e LDT540A (**28**)



Compostos	Rend. (%)	p.f. (°C)	W	RMN de ^1H (δ ppm)	RMN de ^{13}C (δ ppm)
LDT486A (20)	90	--*	$\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	1,27 – 1,33	14,3 – 14,4
			$\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	4,27	61,5
			$\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	--	169,3
LDT487A (27)	74	52-54	CH_2COOH	--	174,1
LDT539A (23)	90	--*	$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	1,27 – 1,38	14,0 – 14,3
			$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	4,28	61,5
			$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	1,61 – 1,64	25,6
			$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	--	174,6
LDT540A (28)	82	--*	$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	1,60	25,2
			$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{COOH}$	--	177,2

--* Obtido como óleo

Por fim, as cadeias monoinsaturadas foram caracterizadas por assinalamentos em RMN de ^1H e RMN de ^{13}C obtidos em ppm (Tabela 5).

Tabela 5: Assinalamentos de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C das cadeias monoinsaturadas para os derivados LDT486A (**20**), LDT487A (**27**), LDT539A (**23**) e LDT540A (**28**)

RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (δ ppm)					
Deslocamento	LDT10iA	LDT486A	LDT487A	LDT539A	LDT540A
15'	0,89 – 0,92 14,3	0,87 – 0,91 14,3 – 14,4	0,87 – 0,92 14,3	0,91 – 0,95 14,0 – 14,3	0,86 – 0,89 14,3
3'-6' e 11'-12'	1,24 – 1,32 29,2 – 29,9	1,27 – 1,33 29,2 – 29,9	1,28 – 1,32 29,2 – 29,9	1,27 – 1,38 29,2 – 29,9	1,26 – 1,30 29,2 – 30,0
13'	1,24 – 1,32 32,0	1,27 – 1,33 32,0	1,28 – 1,32 32,0	1,27 – 1,38 32,0	1,26 – 1,30 32,0
14'	1,24 – 1,32 22,8	1,27 – 1,33 22,8	1,28 – 1,32 22,8	1,27 – 1,38 22,8	1,26 – 1,30 22,9
2'	1,60 – 1,61 31,4	1,58 – 1,63 31,5	1,61 31,5	1,61 – 1,64 30,1 – 31,4	1,60 31,5
7' e 10'	2,03 – 2,08 27,4	2,01 – 2,03 27,4	2,00 – 2,03 27,4	1,98 – 2,07 27,4	2,00 – 2,03 27,4
1'	2,56 36,0	2,58 36,2	2,59 36,1	2,58 36,1	2,57 36,0
8'-9'	5,34 – 5,40 130,0 – 130,1	5,34 – 5,37 130,0 – 130,1	5,34 – 5,38 130,0 – 130,1	5,37 – 5,41 130,0 – 130,1	5,33 – 5,37 128,2 – 129,2 e 130,0 – 130,3

7. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

Os ensaios biológicos foram realizados em colaboração com a Prof. Dra. Carolyn Cummins, pelas alunas Lilia Magomedova e Cigdem Sahin, do *Nuclear Hormone Receptors in Human Health and Disease* da *Leslie Dan Faculty of Pharmacy, University of Toronto* (UofT). Todos os procedimentos foram aprovados pelo *Faculties of Medicine and Pharmacy Animal Care Committee* (FMPACC) da UofT.

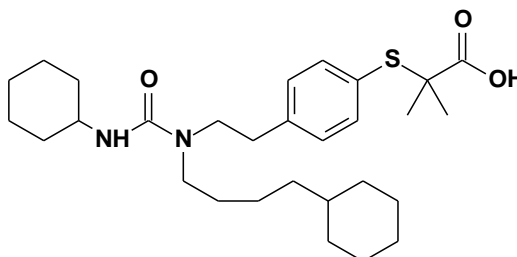
7.1 ENSAIO DE GENE REPORTER

Os derivados das séries saturada e monoinsaturada, bem como as misturas de compostos insaturados foram submetidos a ensaio biológico de gene reporter em células de rim embrionário humano HEK293 e avaliados quanto à atividade luciferase, em concentrações de 10,0 nM a 100,0 μ M, visando analisar a ativação da transcrição de PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ . As células foram transfectadas com os plasmídeos de expressão contendo a sequência de codificação para o gene reporter luciferase e as proteínas de fusão GAL4-hPPAR. A luciferase constitui uma das enzimas mais utilizadas como reporter, resultando em um sinal bioluminescente por meio da oxidação do substrato luciferina, quando em contato com um ligante ativo, detectado por um luminômetro e indicativo da indução da ativação de PPAR (CAMPOS-MELO et al., 2014).

7.1.1 PPAR α

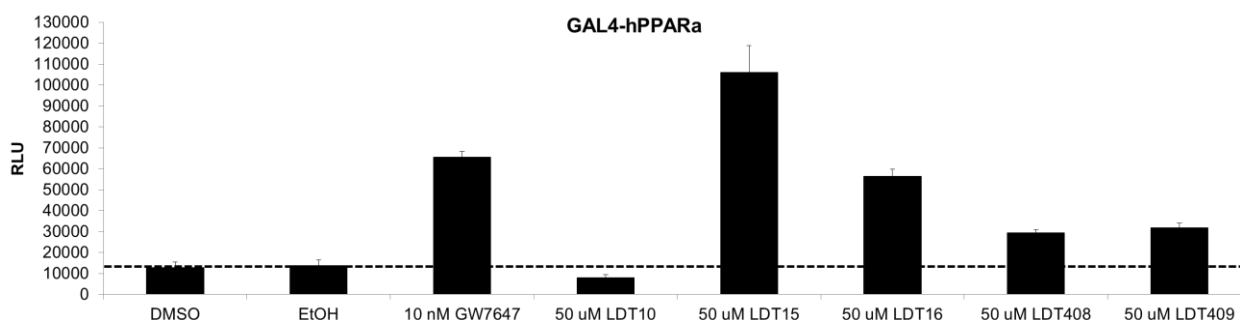
Inicialmente os compostos da série saturada LDT10 (**18**), LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) foram avaliados quanto à atividade em PPAR α a 50,0 μ M por meio de ensaio com GAL4-hPPAR α , utilizando como controle GW7647 (**31**, Figura **9**) (10,0 nM) e tendo como veículos dimetilsulfóxido (DMSO 0,1 %) e etanol (EtOH 0,1 %).

Figura 9: Estrutura do controle positivo GW7647 (**31**), agonista de PPAR α



Os resultados demonstraram que os derivados LDT15 (**21**) e LDT16 (**29**) apresentaram os melhores perfis de indução da ativação do receptor α , quando comparados aos veículos e ao controle GW7647 (**31**) (Figura 10). Por sua vez, LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) foram considerados ativadores fracos com atividade de transcrição em PPAR α duas vezes acima dos veículos, evidenciados pela linha tracejada. Por fim, LDT10 (**18**) não foi considerado indutor de transcrição do subtipo α , com perfil de ativação inferior ao controle e aos veículos.

Figura 10: Atividade transcricional em PPAR α dos compostos da série saturada LDT10 (**18**), LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) a 50,0 μ M em células HEK293. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo



Uma vez que demonstraram atividade transcricional em PPAR α , os derivados LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) foram submetidos a nova avaliação em diferentes concentrações, de 10,0 nM a 100,0 μ M, para determinação de sua potência individual na ativação do isotipo humano de PPAR α e confecção da curva dose-resposta (Figura 11). Os valores de EC₅₀ variaram de 0,20 μ M a 8,91 μ M (Tabela 6) e todos os derivados demonstraram atividade parcial quando comparados ao agonista total GW7647 (**31**, EC₅₀ 6,50 nM). Por sua vez, o derivado LDT409 (**30**) ativou PPAR α com EC₅₀ 0,20 μ M, sendo considerado o composto mais potente neste ensaio.

Figura 11: Atividade luciferase dos compostos LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) comparada através de curva dose-resposta, em relação ao controle GW7647 (**31**). Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo

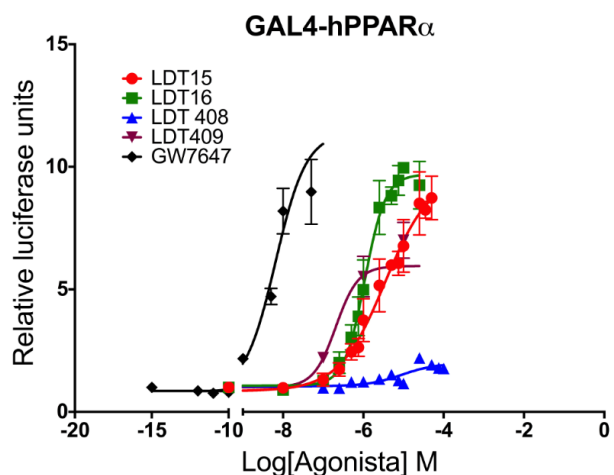
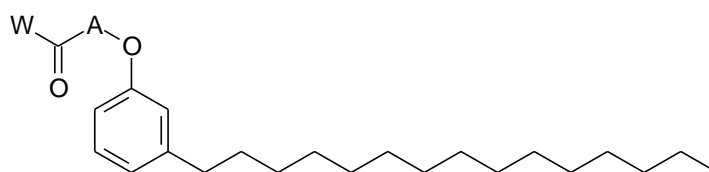


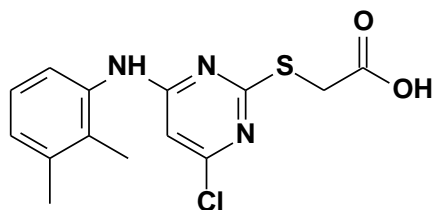
Tabela 6: Valores de EC_{50} para os compostos LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) (série saturada) e o controle positivo GW7647 (**31**), no PPAR α



Composto	A	W	EC_{50}
LDT15 (21)	CH ₂	OEt	3,45 μ M
LDT16 (29)	CH ₂	OH	0,93 μ M
LDT408 (24)	C(CH ₃) ₂	OEt	8,91 μ M
LDT409 (30)	C(CH ₃) ₂	OH	0,53 μ M
GW7647 (31)	--	--	6,50 nM
Ácido Cáprico	--	--	31,00 μ M
Ácido Mirístico	--	--	12,80 μ M
Ácido Esteárico	--	--	39,90 μ M

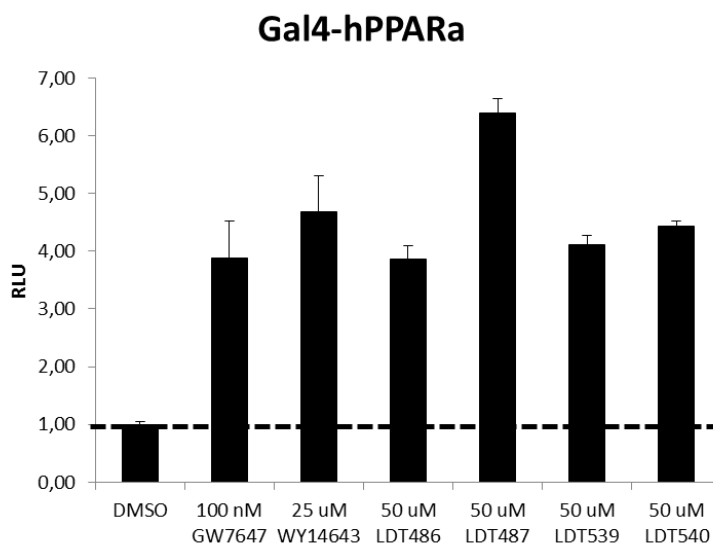
As misturas de compostos LDT486 (**19**), LDT487 (**25**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**) foram avaliadas quanto à atividade agonista em PPAR α a 50,0 μ M por meio de ensaio com GAL4-hPPAR α , utilizando como controles GW7647 (**31**, 100,0 nM) e WY14643 (**32**, 25,0 μ M, Figura 12), tendo DMSO 0,1 % como veículo.

Figura 12: Estrutura do controle positivo WY14643 (**32**), agonista de PPAR α



Os resultados demonstraram que as misturas de compostos LDT486 (**19**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**) apresentaram perfis de ativação de transcrição de PPAR α (Figura 13). Enquanto a mistura de ácidos LDT487 (**25**) apresentou o melhor perfil de ativação transcricional do receptor.

Figura 13: Atividade transcricional em PPAR α dos compostos da série insaturada LDT486 (**19**), LDT487 (**25**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**) a 50,0 μ M em células HEK293. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo



Desta maneira, as misturas insaturadas foram submetidas a nova avaliação sob diferentes concentrações, de 10,0 nM a 100,0 μ M, para determinação das potências individuais e confecção da curva dose-resposta. Quando comparados ao agonista total GW7647 (**31**), as misturas de compostos LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**) apresentaram perfis de agonistas parciais, enquanto as misturas LDT486 (**19**) e LDT487 (**25**) de agonistas totais (Figura 14). Por sua vez, a mistura LDT540 (**26**) foi considerada a mais ativa para o ensaio com EC₅₀ de 1,0 μ M (Tabela 7).

Figura 14: Atividade luciferase das misturas de compostos LDT486 (**19**), LDT487 (**25**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**) comparada através de curva dose-resposta, em relação ao controle GW7647 (**31**) para PPAR α . Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo

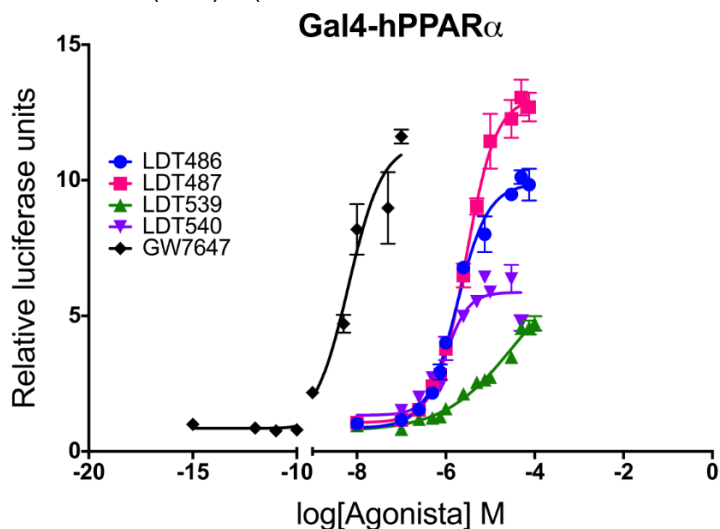
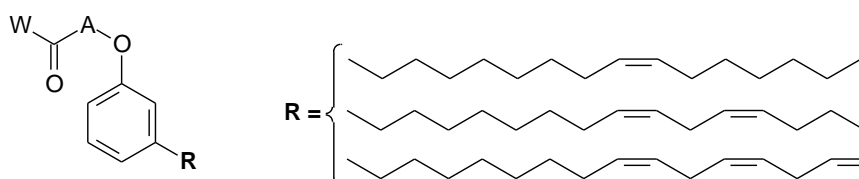


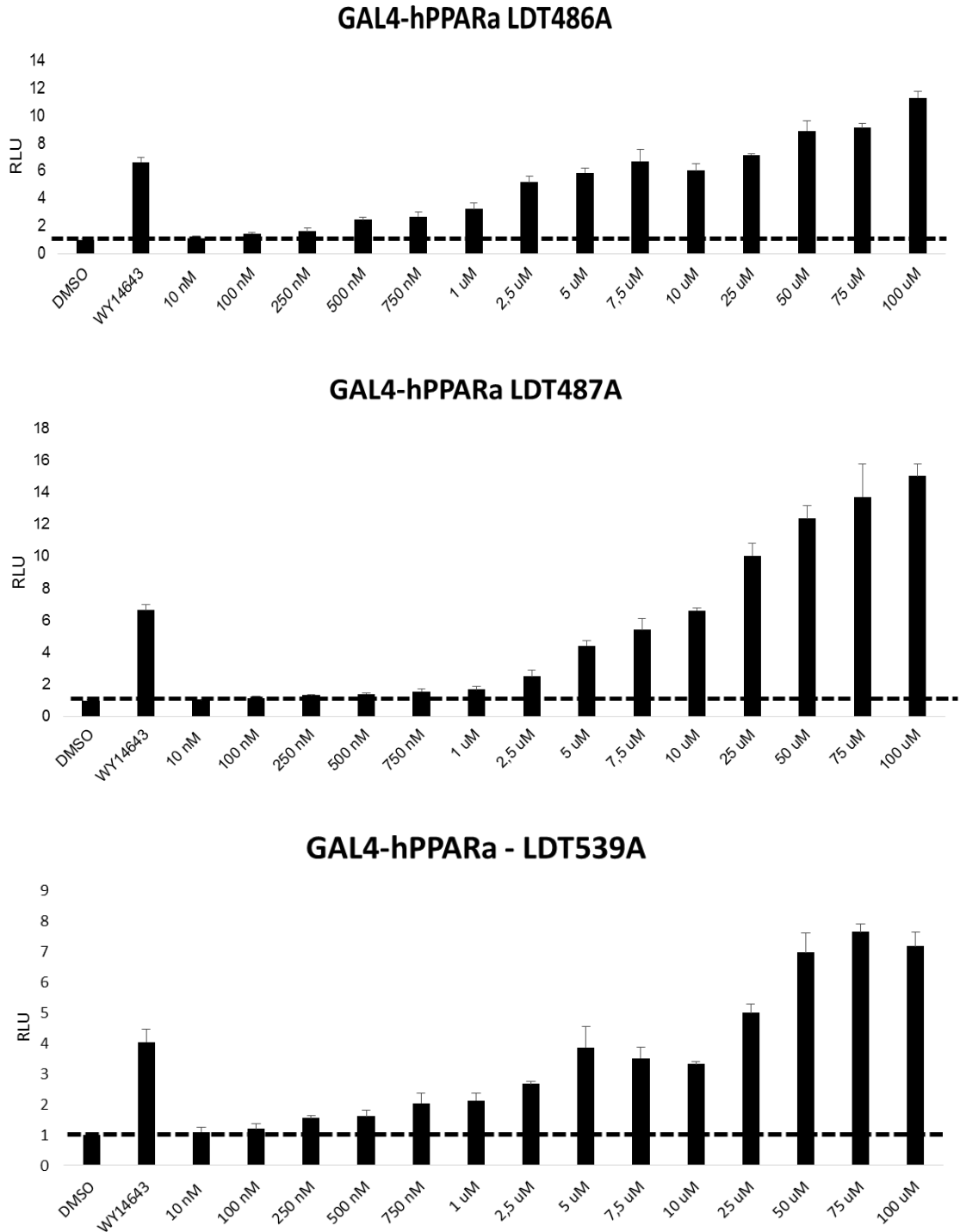
Tabela 7: Valores de EC₅₀ para as misturas de compostos LDT486 (**19**), LDT487 (**25**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**) (série mono-, di- e trieno-insaturadas) e o controle GW7647 (**31**), no PPAR α

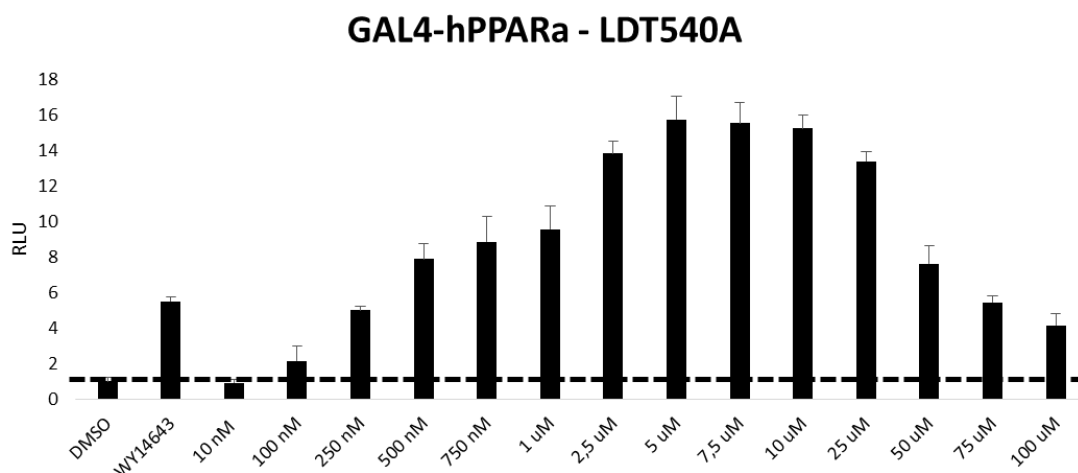


Misturas	A	W	EC ₅₀
LDT486 (19)	CH ₂	OEt	1,60 μ M
LDT487 (25)	CH ₂	OH	2,80 μ M
LDT539 (22)	C(CH ₃) ₂	OEt	32,00 μ M
LDT540 (26)	C(CH ₃) ₂	OH	1,00 μ M
GW7647 (31)	--	--	6,50 nM

Os derivados monoinsaturados foram submetidos a análise em diferentes concentrações, de 10,0 nM a 100,0 μ M, para avaliação da atividade transcricional em PPAR α , determinação de suas potências individuais e confecção da curva dose-resposta, utilizando DMSO (0,1 %) como veículo e WY14643 (**32**, 25,0 μ M) como controle positivo. Os resultados evidenciaram a ativação da transcrição do subtipo α mediada por todos os derivados em diferentes concentrações, quando comparados ao veículo e ao controle (Figura 15).

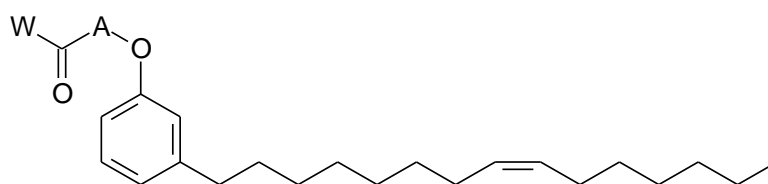
Figura 15: Atividade transcricional em PPAR α dos compostos da série monoinsaturada LDT486A (**20**), LDT487A (**27**), LDT539A (**23**) e LDT540A (**28**) em concentrações de 10,0 nM a 100,0 μ M, em células HEK293. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo





O derivado LDT486A (**20**) induziu a transcrição de PPAR α em concentrações a partir de 500,0 nM, enquanto LDT487A (**27**) foi ativo em concentrações a partir de 2,5 μ M, com níveis de expressão duas vezes maior que o veículo. Por sua vez, LDT539A (**23**) e LDT540A (**28**) ativaram a transcrição de PPAR α em concentrações a partir de 750,0 nM e 100,0 nM, respectivamente. Adicionalmente, o derivado LDT540A (**28**) ativou PPAR α com EC₅₀ 0,73 μ M, sendo considerado o composto mais potente para o ensaio (Tabela 8).

Tabela 8: Valores de EC₅₀ para os compostos LDT486A (**20**), LDT487A (**27**), LDT539A (**23**) e LDT540A (**28**) (série monoinsaturada) e o controle GW7647 (**31**), no PPAR α

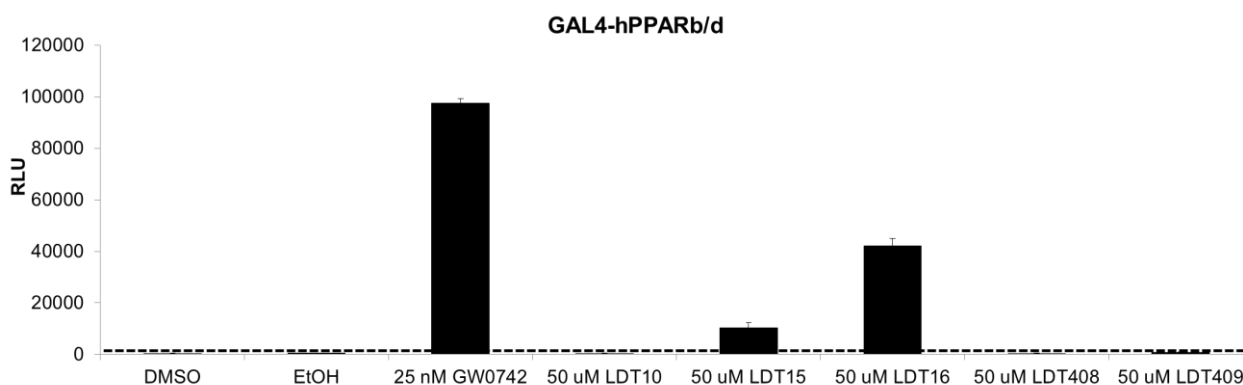


Composto	A	W	EC ₅₀
LDT486A (20)	CH ₂	OEt	4,40 μ M
LDT487A (27)	CH ₂	OH	21,00 μ M
LDT539A (23)	C(CH ₃) ₂	OEt	67,00 μ M
LDT540A (28)	C(CH ₃) ₂	OH	0,73 μ M
GW7647 (31)	--	--	6,50 nM

7.1.2 PPAR β/δ

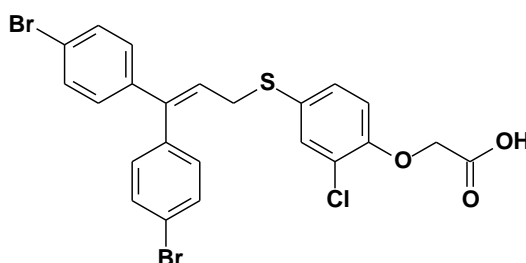
Para o receptor β/δ (Figura 16), os compostos saturados LDT10 (**18**), LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) foram testados a 50,0 μM , utilizando como controle GW0742 (**7**, 25,0 nM) e como veículos DMSO e EtOH em concentração de 0,1 %. O derivado LDT15 (**21**) foi considerado fraco ativador do receptor β , enquanto o derivado LDT16 (**29**) foi o melhor composto para o ensaio com EC_{50} de 10,0 μM .

Figura 16: Atividade transcricional em PPAR β/δ dos compostos da série saturada LDT10 (**18**), LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) em células HEK293. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo



As misturas insaturadas foram testadas a 50,0 μM , tendo como controles CAY10592 (**33**, 10,0 μM , figura 17) e GW0742 (**7**, 10,0 nM), e veículo DMSO 0,1 %.

Figura 17: Estrutura do controle positivo CAY10592 (**33**), agonista de PPAR β/δ



A mistura de compostos LDT539 (**22**) apresentou perfil de ativação similar ao veículo, evidenciado pela linha tracejada, não sendo caracterizada como indutora de transcrição do subtipo β/δ . Por sua vez, as misturas LDT486 (**19**) e LDT540 (**26**)

foram consideradas ativadoras fracas de PPAR β/δ e a mistura de ácidos LDT487 (25) demonstrou melhor perfil transcricional em relação aos controles (Figura 18).

Figura 18: Atividade transcricional em PPAR β/δ das misturas de compostos LDT486 (19), LDT487 (25), LDT539 (22) e LDT540 (26) em células HEK293. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo

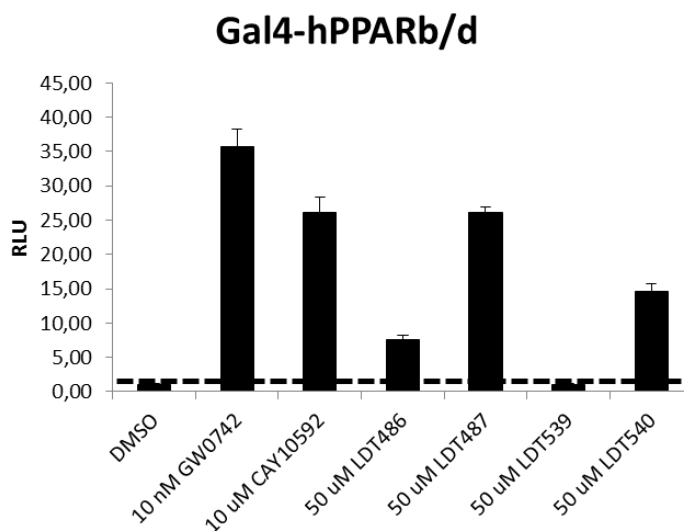
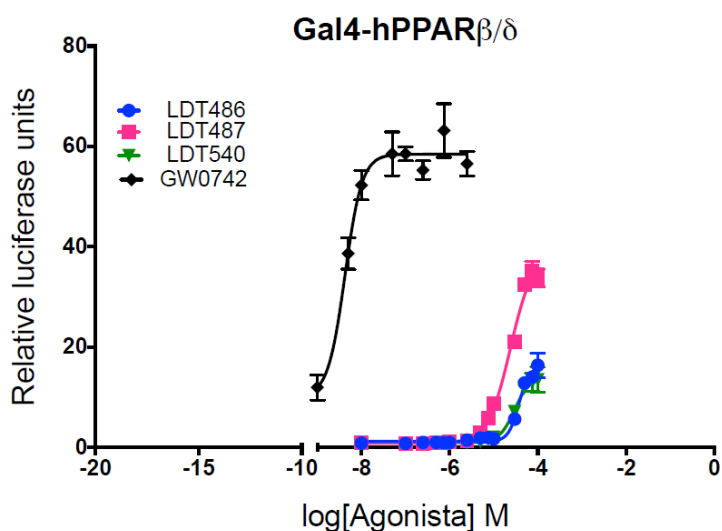


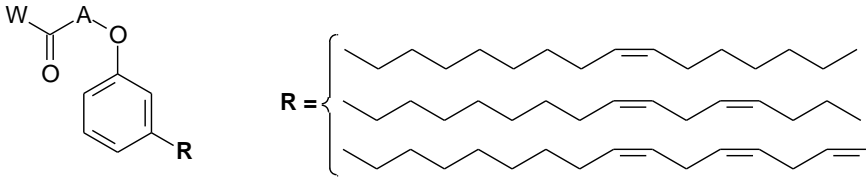
Figura 19: Atividade luciferase das misturas de compostos LDT486 (19), LDT487 (25) e LDT540 (26) comparada através de curva dose-resposta para PPAR β/δ , em relação ao controle GW0742 (7). Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo



Adicionalmente, as misturas de compostos foram submetidas a nova avaliação em diferentes concentrações (de 10,0 nM a 100,0 μ M) para determinação das potências individuais e confecção da curva dose-resposta (Figura 19). Os

resultados evidenciaram o perfil de fracos agonistas parciais das misturas de compostos LDT486 (**19**), LDT487 (**25**) e LDT540 (**26**), quando comparadas ao controle GW0742 (**7**, EC₅₀ 3,50 nM), na ativação de PPARβ/δ humano. Em adição, todos os valores de EC₅₀ obtidos estavam acima de 24,00 μM (Tabela 9).

Tabela 9: Valores de EC₅₀ para as misturas de compostos LDT486 (**19**), LDT487 (**25**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**) (série mono-, di- e trieno-insaturadas) e o controle GW0742 (**7**), para PPARβ/δ

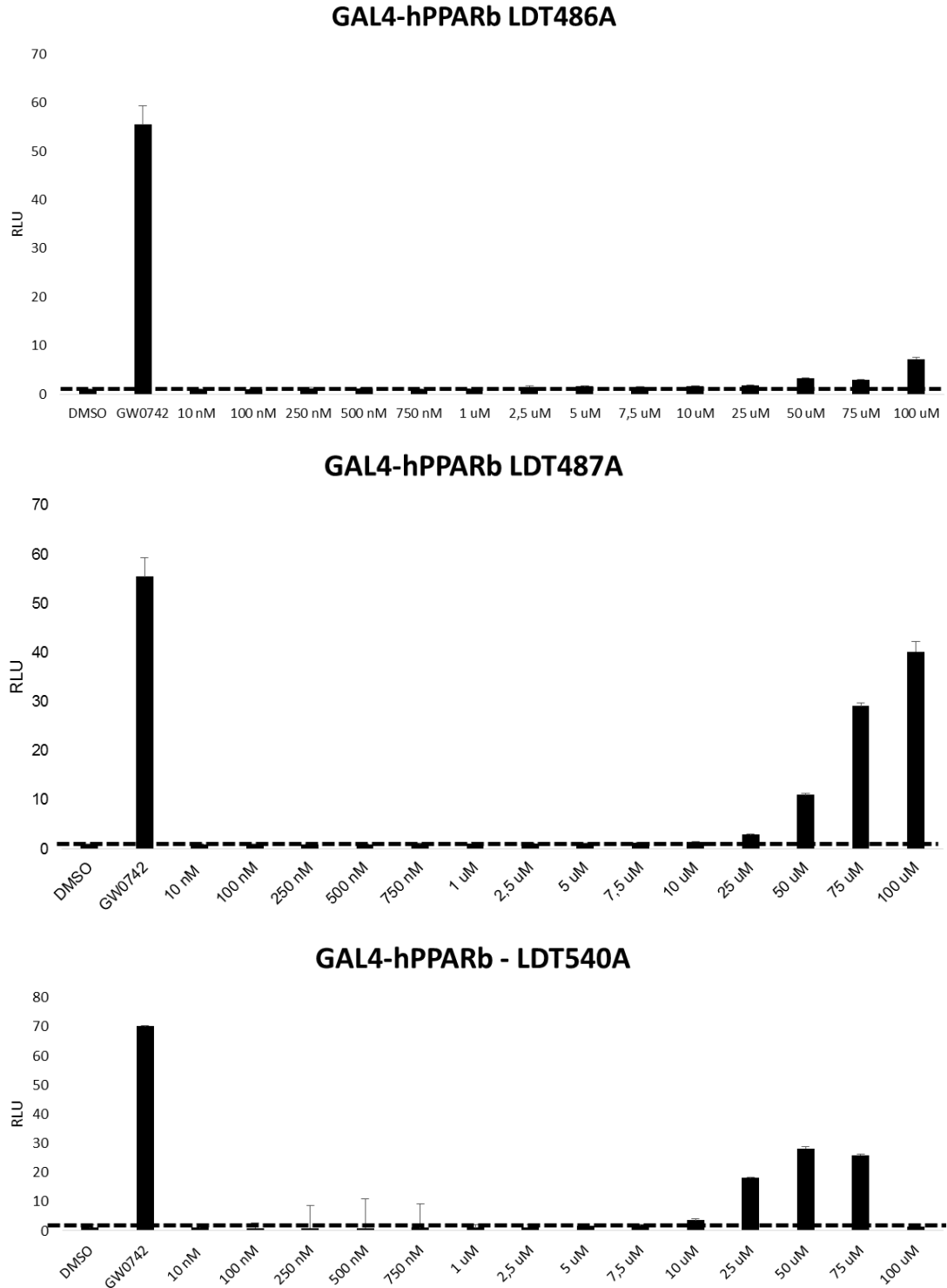


Misturas	A	W	EC ₅₀
LDT486 (19)	CH ₂	OEt	37,00 μM
LDT487 (25)	CH ₂	OH	24,00 μM
LDT539 (22)	C(CH ₃) ₂	OEt	45,00 μM
LDT540 (26)	C(CH ₃) ₂	OH	30,00 μM
GW0742 (7)	--	--	3,50 nM

Os derivados monoinsaturados foram submetidos a análise em diferentes concentrações, de 10,0 nM a 100,0 μM, para avaliação da atividade transcricional no receptor β/δ, em relação ao veículo DMSO 0,1 % e ao controle positivo GW0742 (**7**, 10,0 nM), visando a determinação de suas potências individuais e confecção da curva dose-resposta.

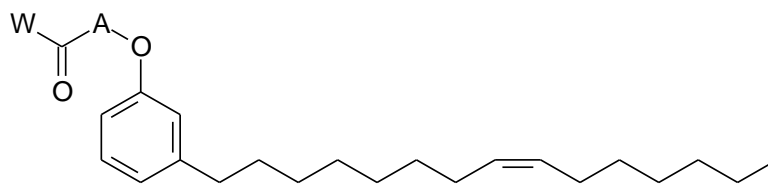
Neste sentido, os derivados ácidos LDT487A (**27**) e LDT540A (**28**) apresentaram perfis de indução transcricional nas células tratadas com concentrações a partir de 25,0 μM, obtendo níveis de expressão duas vezes acima do veículo DMSO, evidenciado pela linha tracejada. Enquanto o derivado éster LDT486A (**20**) induziu a transcrição do subtipo β/δ em concentrações a partir de 50,0 μM (Figura 20).

Figura 20: Atividade transcricional em PPAR β/δ dos compostos da série monoinsaturada LDT486A (**20**), LDT487A (**27**) e LDT540A (**28**) em células HEK293. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo



Quando comparados ao agonista total GW0742 (**7**, EC₅₀ 3,50 nM), os compostos apresentaram perfis de agonistas parciais, destacando-se o LDT486A (**20**) com EC₅₀ 7,10 μ M (Tabela 10).

Tabela 10: Valores de EC₅₀ para os compostos LDT486A (**20**), LDT487A (**27**), LDT540A (**28**) (série monoinsaturada) e o controle positivo GW0742 (**7**), no PPAR β/δ

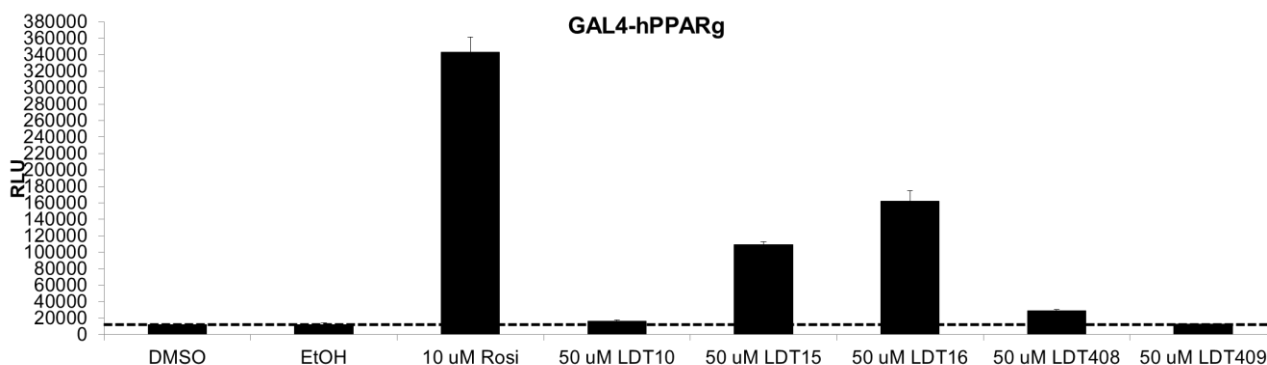


Composto	A	W	EC ₅₀
LDT486A (20)	CH ₂	OEt	7,10 μ M
LDT487A (27)	CH ₂	OH	70,00 μ M
LDT540A (28)	C(CH ₃) ₂	OH	21,00 μ M
GW0742 (7)	--	--	3,50 nM

7.1.3 PPAR γ

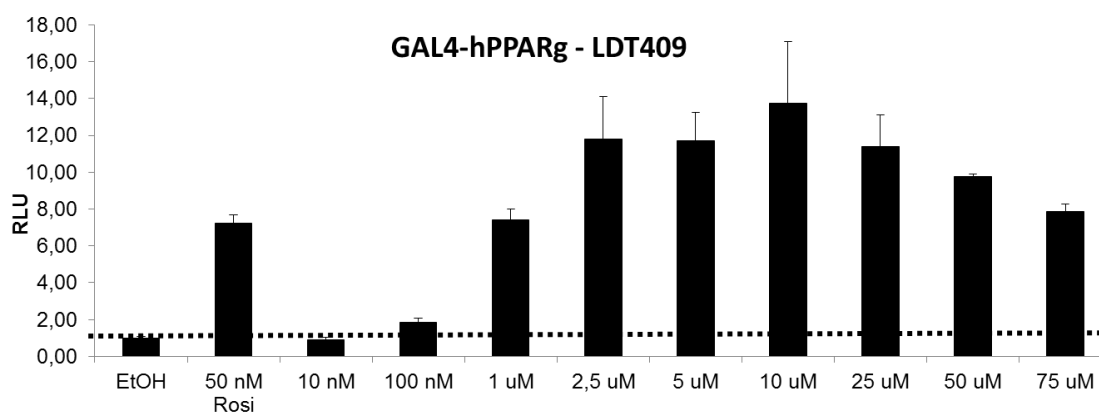
Inicialmente, os compostos de cadeia saturada foram avaliados quanto à atividade agonista em PPAR γ a 50,0 μ M por meio de ensaio com GAL4-PPAR γ , utilizando como controle o agonista tiazolidinadiônico rosiglitazona (**9**, 10,0 μ M) sendo os veículos DMSO e EtOH em concentrações finais de 0,1 %. Os derivados LDT15 (**21**) e LDT16 (**29**) foram ativadores de transcrição no receptor γ em relação aos veículos e ao controle. Por sua vez, LDT408 (**24**) foi considerado fraco ativador com perfil de ativação duas vezes acima dos veículos, evidenciados pela linha tracejada (Figura 21).

Figura 21: Atividade transcricional em PPAR γ dos compostos da série saturada LDT10 (**18**), LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) testados a concentração de 50,0 μ M em células HEK293. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo



Posteriormente, foi detectada troca de compostos em que o LDT407 foi avaliado para a série saturada no lugar do derivado LDT409 (**30**). Desta maneira, nova avaliação do LDT409 (**30**) foi realizada frente a atividade transcricional de PPAR γ em diferentes concentrações (de 10,0 nM a 75,0 μ M, Figura **22**), tendo como veículo EtOH 0,1 % e controle positivo rosiglitazona (**9**, 50,0 nM). O derivado induziu a ativação da transcrição de PPAR γ em concentrações a partir de 100,0 nM, com níveis de expressão duas vezes acima do veículo.

Figura 22: Atividade transcricional em PPAR γ do LDT409 (**30**) testado em concentrações de 10,0 nM a 75,0 μ M, em células HEK293. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo



Para determinação das potências individuais, os derivados LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) foram submetidos a avaliação em concentrações de 10,0 nM a 100,0 μ M e curva dose-resposta foi confeccionada. O composto LDT15 (**21**) ativou PPAR γ de forma concentração dependente (EC_{50} 42,70 μ M, Tabela **11**), caracterizando-o como agonista parcial (Figura **23**) em contraste à ativação do receptor pelo controle rosiglitazona (EC_{50} 48,70 nM). O derivado LDT408 (**24**) não foi considerado ativador de transcrição do subtipo γ , enquanto o LDT16 (**29**) apresentou perfil de agonista total (EC_{50} 3,65 μ M). Por sua vez, LDT409 revelou atividade de agonista parcial e EC_{50} de 0,94 μ M (Tabela **11**), o qual o caracterizou como o melhor derivado da série de cadeia alquílica saturada.

Figura 23: Atividade luciferase dos compostos LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) comparada através de curva dose-resposta, em relação ao controle rosigitazona (**9**). Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo

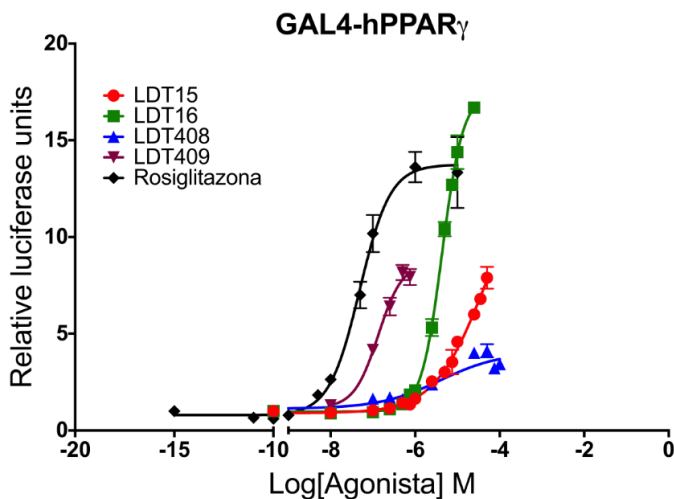
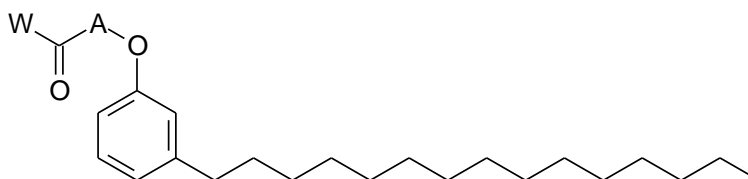


Tabela 11: Valores de EC_{50} para os compostos LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) (série saturada) e do controle positivo rosigitazona (**9**), no PPAR γ

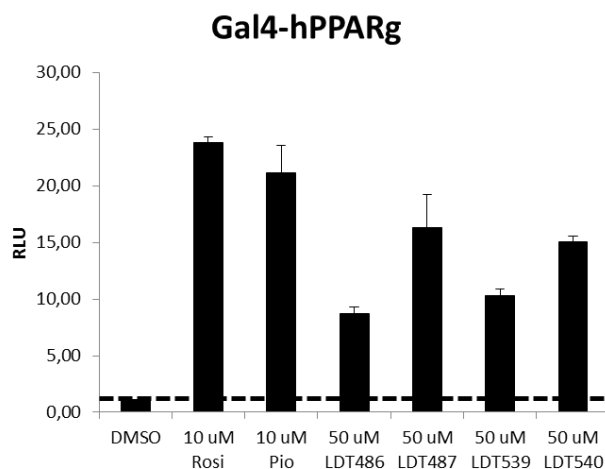


Composto	A	W	EC_{50}
LDT15 (21)	CH ₂	OEt	42,70 μ M
LDT16 (29)	CH ₂	OH	3,65 μ M
LDT408 (24)	C(CH ₃) ₂	OEt	**
LDT409 (30)	C(CH ₃) ₂	OH	0,94 μ M
Rosigitazona (9)	--	--	48,70 nM
Ácido Cáprico	--	--	53,0 μ M
Ácido Mirístico	--	--	**
Ácido Estearico	--	--	123,0 μ M

** Sem atividade farmacológica em PPAR.

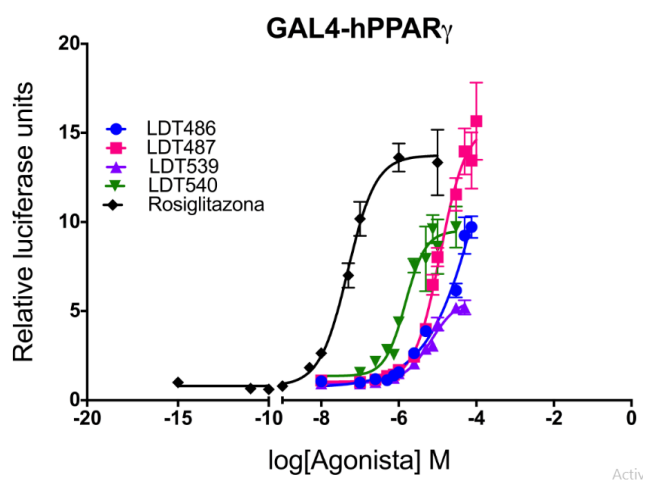
As misturas de compostos foram avaliadas quanto à atividade agonista em PPAR γ a 50,0 μ M por meio de ensaio com GAL4-PPAR γ , utilizando como controles rosigitazona (**9**) e pioglitazona (**10**, 10,0 μ M) e o veículo DMSO 0,1 %, evidenciando a capacidade dos compostos insaturados como ativadores de transcrição do receptor γ , em que as misturas de ácidos LDT487 (**25**) e LDT540 (**26**) apresentaram os melhores perfis transcricionais (Figura **24**).

Figura 24: Atividade transcricional em PPAR γ dos compostos da série insaturada LDT486 (**19**), LDT487 (**25**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**) testados a concentração de 50,0 μ M em células HEK293. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo



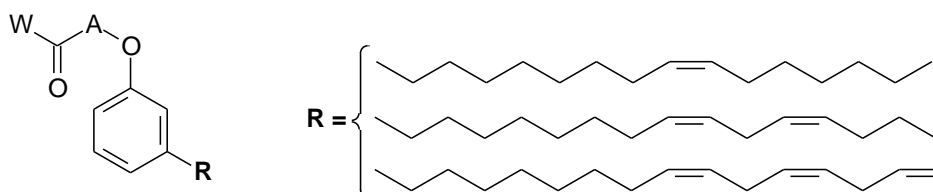
Para determinação das potências individuais das misturas de compostos, estas foram submetidas a nova avaliação em diferentes concentrações (de 10,0 nM a 100,0 μ M) e curva dose-resposta foi determinada (Figura **25**). O mesmo perfil foi observado para os três subtipos de PPAR, em que a mistura de ácidos LDT487 (**25**) destacou-se por sua atividade agonista total. Enquanto, as misturas LDT486 (**19**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**) apresentaram perfis de agonistas parciais em relação à rosiglitazona (**9**) na indução da transcrição de PPAR γ .

Figura 25: Atividade luciferase das misturas de compostos LDT486 (**19**), LDT487 (**25**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**) comparada através de curva dose-resposta, em relação ao controle rosiglitazona (**9**) para PPAR γ . Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo



Por sua vez, os valores de EC_{50} obtidos variaram de 1,00 a 13,00 μM , caracterizando a mistura de ácidos LDT540 (**26**) (EC_{50} 1,00 μM) como a melhor indutora de transcrição para o ensaio (Tabela 12).

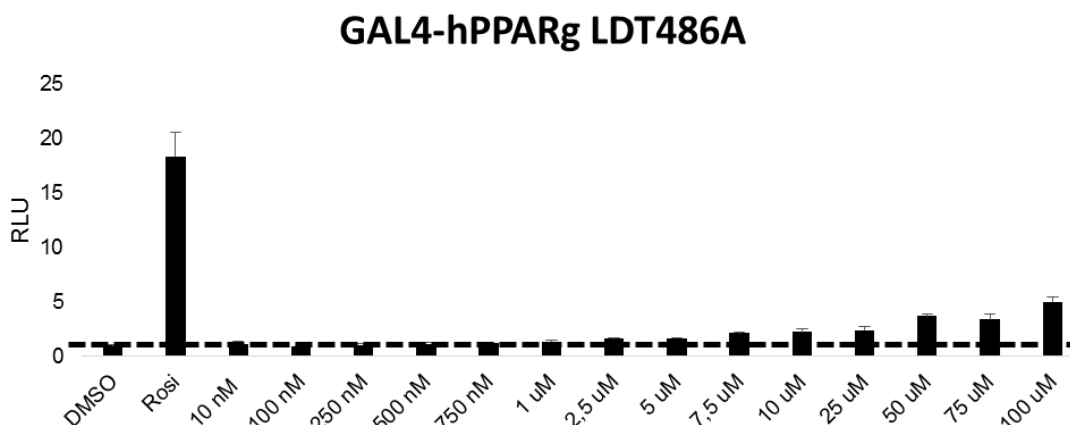
Tabela 12: Valores de EC_{50} para as misturas de compostos LDT486 (**19**), LDT487 (**25**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**) (série mono-, di- e trieno-insaturadas) e o controle rosiglitazona (**9**), no PPAR γ



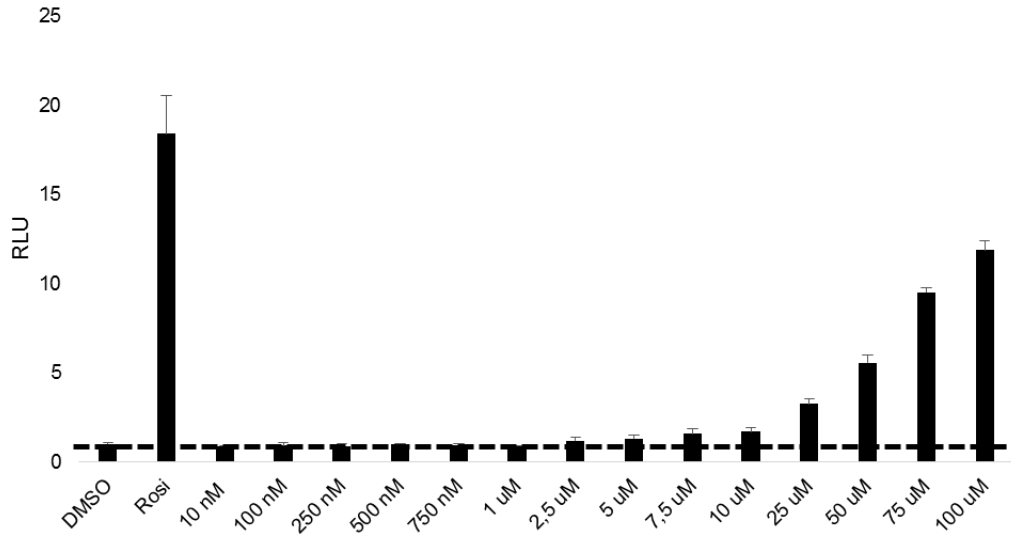
Misturas	A	W	EC_{50}
LDT486 (19)	CH ₂	OEt	13,00 μM
LDT487 (25)	CH ₂	OH	6,00 μM
LDT539 (22)	C(CH ₃) ₂	OEt	12,00 μM
LDT540 (26)	C(CH ₃) ₂	OH	1,00 μM
Rosiglitazona (9)	--	--	48,70 nM

Por fim, os derivados monoinsaturados foram submetidos a análise em diferentes concentrações, de 10,0 nM a 100,0 μM , para avaliação da atividade transcricional no receptor γ , determinação de suas potências individuais e confecção da curva dose-resposta, utilizando DMSO 0,1 % como veículo e rosiglitazona (**9**) 10,0 μM como controle positivo (Figura 26).

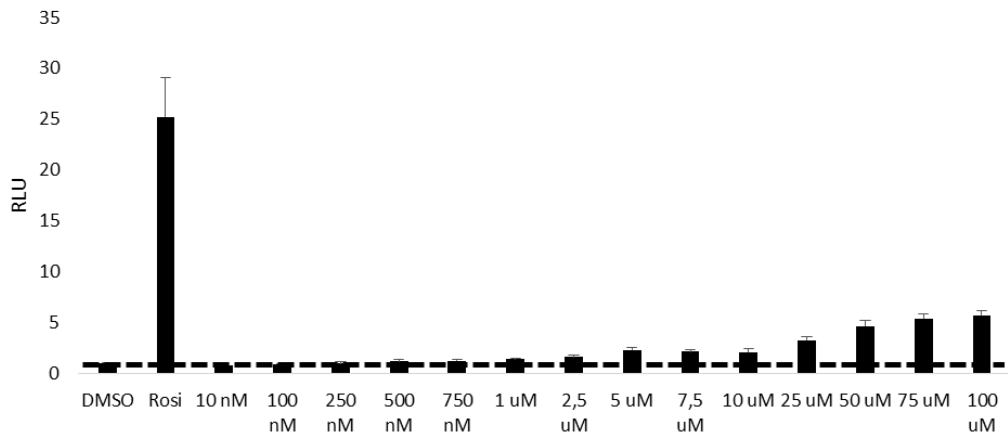
Figura 26: Atividade transcricional em PPAR γ dos compostos da série monoinsaturada LDT486A (**20**), LDT487A (**27**), LDT539A (**23**) e LDT540A (**28**) testados em concentrações de 10,0 nM a 100,0 μM em células HEK293Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). Unidades Relativas de Luciferase (RLU) = (Unidades de luz de luciferase / Galactosidase) x tempo



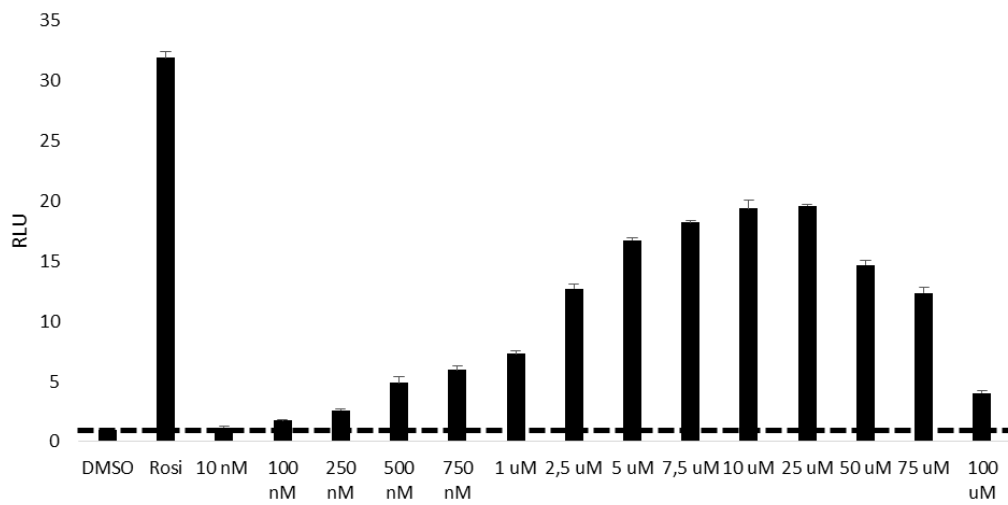
GAL4-hPPAR γ LDT487A



GAL4-hPPAR γ - LDT539A

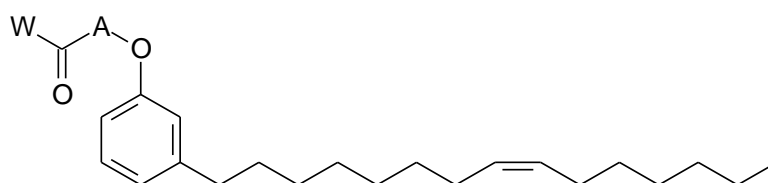


GAL4-hPPAR γ - LDT540A



Todos os derivados foram indutores de transcrição de PPAR γ nas células HEK293 tratadas com concentrações a partir de 7,5 μ M, com níveis de expressão duas vezes acima do veículo. Destacando-se o ácido LDT540A (**28**), responsável pela ativação da transcrição do receptor em concentrações a partir de 100,0 nM com valor de EC₅₀ de 1,80 μ M (Tabela 13).

Tabela 13: Valores de EC₅₀ para os compostos LDT486A (**20**), LDT487A (**27**), LDT539A (**23**) e LDT540A (**28**) (série monoinsaturada) e o controle rosiglitazona (**9**), no PPAR γ



Composto	A	W	EC ₅₀
LDT486A (20)	CH ₂	OEt	50,00 μ M
LDT487A (27)	CH ₂	OH	40,00 μ M
LDT539A (23)	C(CH ₃) ₂	OEt	**
LDT540A (28)	C(CH ₃) ₂	OH	1,80 μ M
Rosiglitazona (9)	--	--	48,70 nM

** Sem atividade farmacológica em PPAR.

De modo geral, os derivados e as misturas de compostos caracterizaram-se como agonistas duais ou pan PPAR, uma vez que foram capazes de induzir a ativação da transcrição de dois ou ambos os subtipos de PPAR em concentrações à micromolar, com exceção dos precursores das séries LDT10i (**16**), LDT10iA (**17**) e LDT10 (**18**) (Tabela 14).

Tabela 14: Perfil de atividade e valores de EC₅₀ em μ M para os derivados-alvo em PPAR

Compostos	EC ₅₀ (μ M)			Compostos	EC ₅₀ (μ M)		
	PPAR α	PPAR β	PPAR γ		PPAR α	PPAR β	PPAR γ
LDT15 (21)	3,45	26,00	42,70	LDT539 (22)	32,00	45,00	12,00
LDT16 (29)	0,93	10,00	3,65	LDT540 (26)	1,00	30,00	1,00
LDT408 (24)	8,91	**	**	LDT486A (20)	4,40	7,10	50,00
LDT409 (30)	0,53	30,00	0,94	LDT487A (27)	21,00	70,00	40,00
LDT486 (19)	1,60	37,00	13,00	LDT539A (23)	67,00	**	**
LDT487 (25)	2,80	24,00	6,00	LDT540A (28)	0,73	21,00	1,80

** Sem atividade farmacológica em PPAR.

No planejamento estrutural acreditava-se que a introdução do grupo ácido carboxílico poderia levar ao aumento da potência dos compostos por meio de

interações polares com aminoácidos conservados entre os subtipos de PPAR, histidina e tirosina, promovendo o recrutamento de proteínas coreguladoras e a estabilização para ativação da transcrição de PPAR. A introdução do grupo ácido nos derivados LDT16 (**29**), LDT409 (**30**) e LDT540A (**28**) e nas misturas de compostos LDT487 (**25**) e LDT540 (**26**), acarretou em aumento da transcrição de todos os receptores, corroborando ao planejamento.

Por sua vez, a longa cadeia alquílica contendo diferentes graus de insaturação, mimetizando ácidos graxos endógenos agonistas de PPAR, pode estar relacionada à atividade de moduladores seletivos com balanceada afinidade por PPAR α e PPAR γ exibida pelos compostos, caracterizando-os como agonistas parciais. Estas características os diferenciam das TZDs, que apresentam alta afinidade e agonismo total de PPAR γ , resultando em efeitos adversos de insuficiência cardíaca, ganho de peso, perda de massa óssea e edema.

Por fim, derivados ácidos na presença do grupo dimetila na subunidade alfa-carbonila, mimetizando os fibratos agonistas sintéticos PPAR α , apresentaram melhores perfis de ativação transcricional dos três subtipos do receptor, caracterizando-os como compostos líderes no ensaio de gene reporter: derivado LDT409 (**30**) para a série saturada, a mistura de ácidos LDT540 (**26**) para a série insaturada e o composto LDT540A (**28**) para a série monoinsaturada.

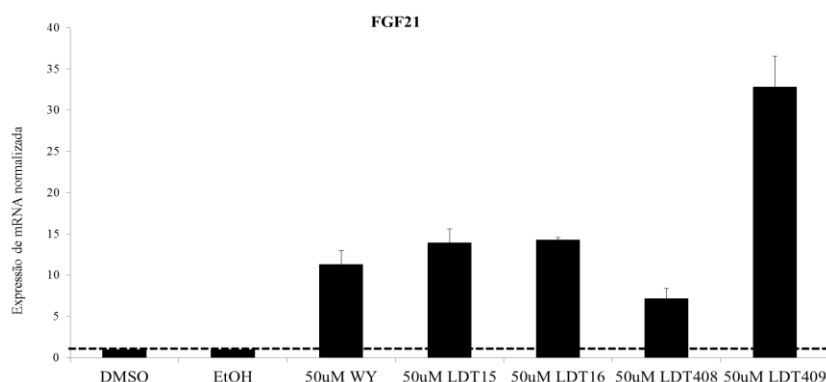
7.2 ENSAIO EM HEPATÓCITOS PRIMÁRIOS

A ativação do PPAR α conduz a uma cascata de expressão de genes envolvidos no aumento da captação intracelular e oxidação de ácidos graxos no fígado. Neste sentido, aumenta a expressão do grupamento de diferenciação 36 (CD36), uma proteína transportadora de ácidos graxos, e da proteína de ligação a ácidos graxos-1 (FABP1), contribuindo para a captação de ácidos graxos; a ativação resulta ainda no aumento da piruvato desidrogenase quinase-4 (PDK4) e da proteína carnitina palmitoiltransferase (CPT1), responsáveis pela oxidação de AG, e FGF21, hormônio relacionado à redução da resistência periférica à insulina e do ganho de peso. Desta maneira, para análise dos efeitos regulatórios dos derivados LDTs sobre genes envolvidos na regulação de AG, ensaios em hepatócitos primários de camundongos foram realizados (PATEL et al., 2011).

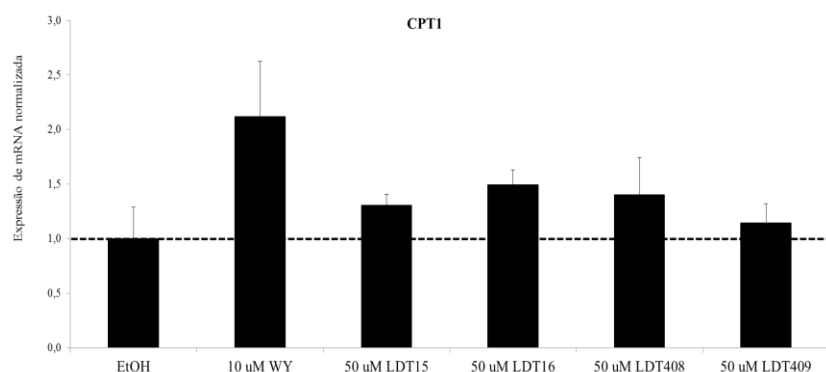
O tratamento de hepatócitos primários com os compostos LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (50,0 μM) resultou no aumento da expressão de transcritos de DNA complementar (cDNA) em análise por qPCR para FGF21 (Figura **27 A**), hormônio com potentes propriedades antidiabéticas por promover a sensibilização à insulina e oxidação de ácidos graxos, quando comparado ao controle WY14643 (**32**) a 50,0 μM e aos veículos DMSO e EtOH em concentração de 0,1 %. A expressão de transcritos de cDNA de CPT-1 (Figura **27 B**), enzima limitadora de velocidade na β -oxidação, foi aumentada após o tratamento com todos os ligantes quando comparado ao veículo etanol. Por sua vez, a expressão de transcritos para PDK4 (Figura **27 C**), enzima que permite a utilização preferencial de ácidos graxos como fonte de energia ao invés da glicose, foi super regulada por todos os derivados saturados. Por fim, o tratamento com o derivado LDT15 (**21**) aumentou significativamente a expressão de transcritos de cDNA para genes importantes a captação de AG, FABP1 e CD36 (Figura **27 D e 27 E**).

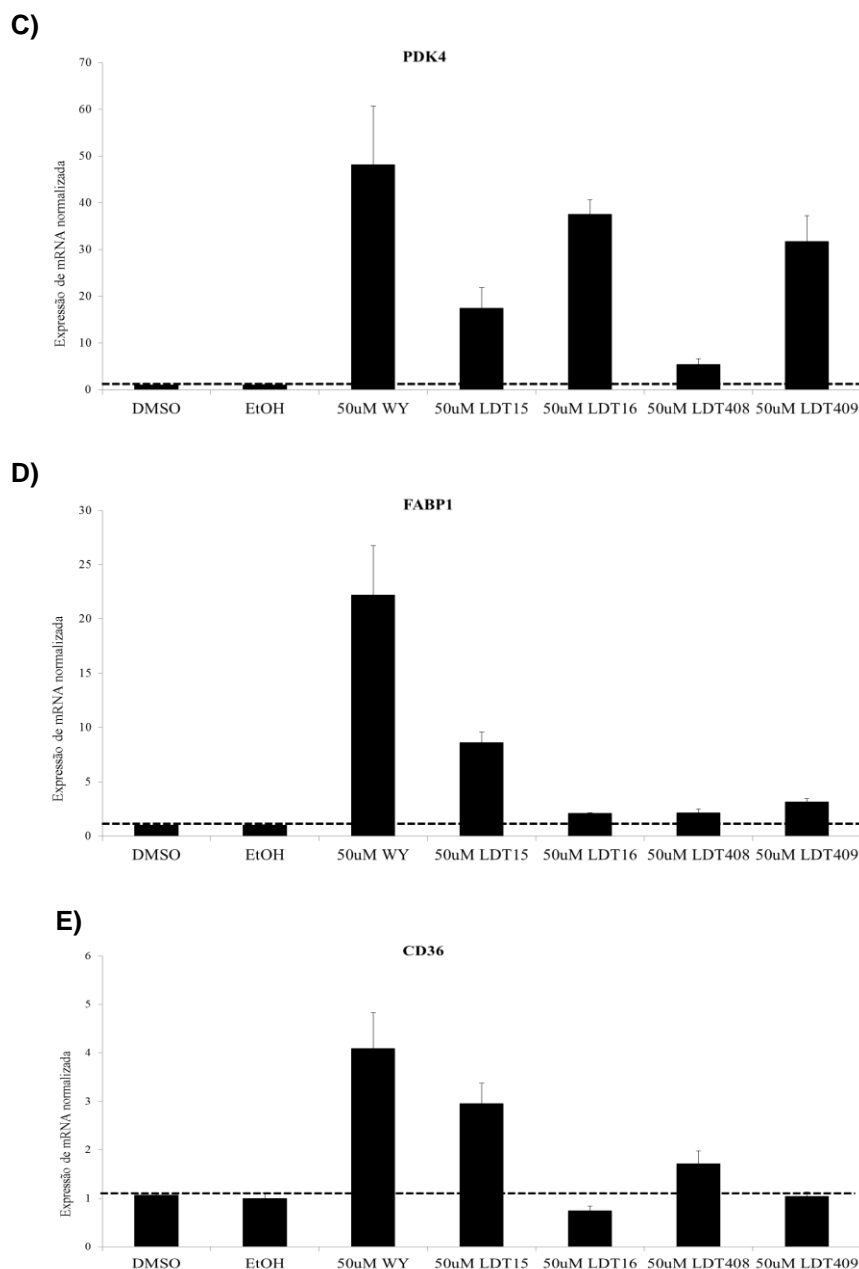
Figura 27: Efeito dos derivados LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) testados a 50,0 μM sobre hepatócitos primários. Avaliação da expressão de genes envolvidos na oxidação (FGF21, CPT1, PDK4) e captação (FABP1 e CD36) de AG por qPCR. Resposta aos veículos evidenciada pela linha tracejada. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). * P < 0,05, usando teste T com correção de Welch e one way ANOVA com correção Holm-Sidak

A)



B)

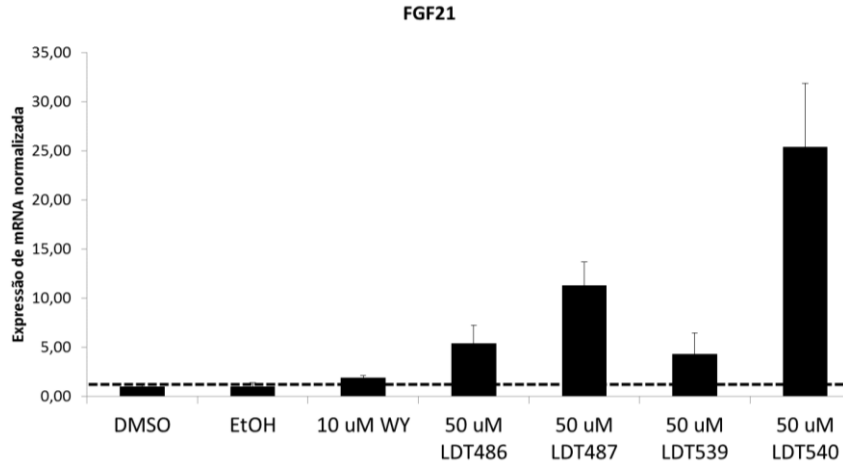




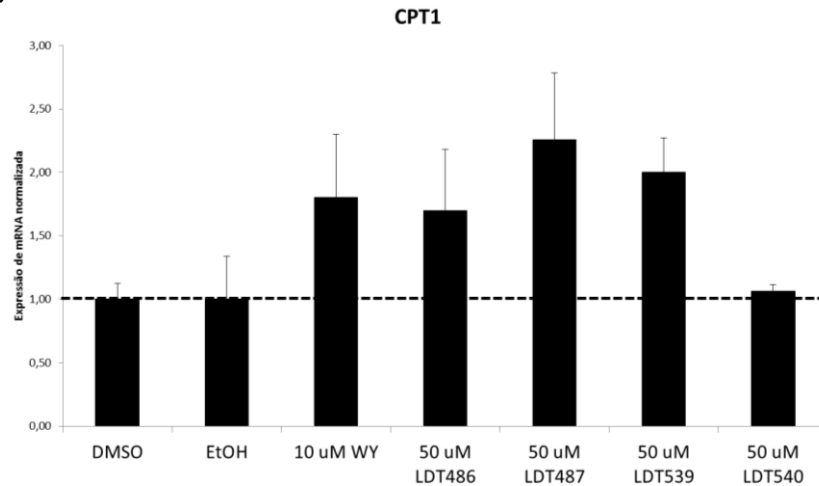
Na avaliação da série insaturada, a expressão de transcritos de cDNA de genes associados à oxidação (FGF21 e PDK4, Figura **28 A** e **28 C**) e à captação (FABP1 e CD36, Figura **28 D** e **28 E**) de ácidos graxos, foi aumentada em análise por qPCR após tratamento com todas as misturas, LDT486 (**19**), LDT487 (**25**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**), a 50,0 μ M, quando comparadas aos veículos, DMSO e EtOH a 0,1 %, e ao controle positivo WY14643 (**32**) 10,0 μ M; enquanto a expressão de transcritos de cDNA para CPT1 (Figura **28 B**) foi aumentada após tratamento com as misturas de compostos LDT486 (**19**), LDT487 (**25**) e LDT539 (**22**).

Figura 28: Efeito das misturas de compostos LDT486 (**19**), LDT487 (**25**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**) testadas a 50,0 μM sobre hepatócitos primários. Avaliação da expressão de genes envolvidos na oxidação (FGF21, CPT1, PDK4) e captação (FABP1 e CD36) de AG por qPCR. Resposta aos veículos evidenciada pela linha tracejada. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). * P <0,05, usando teste T com correção de Welch e one way ANOVA com correção Holm-Sidak

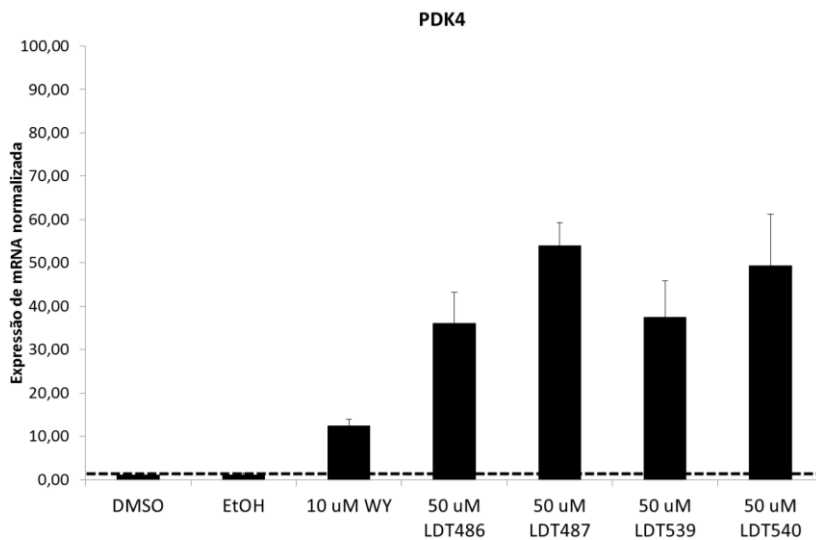
A)



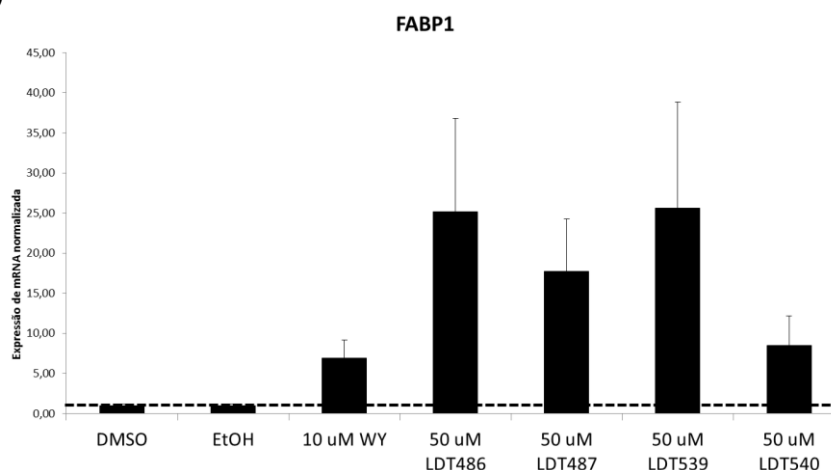
B)



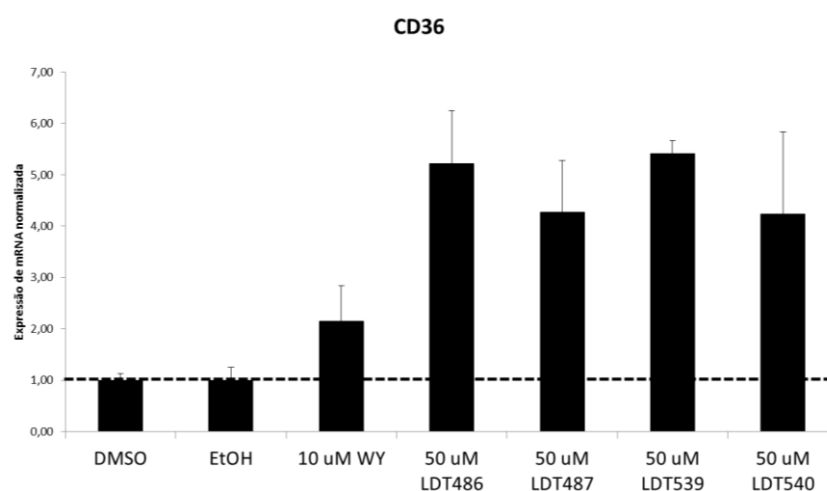
C)



D)

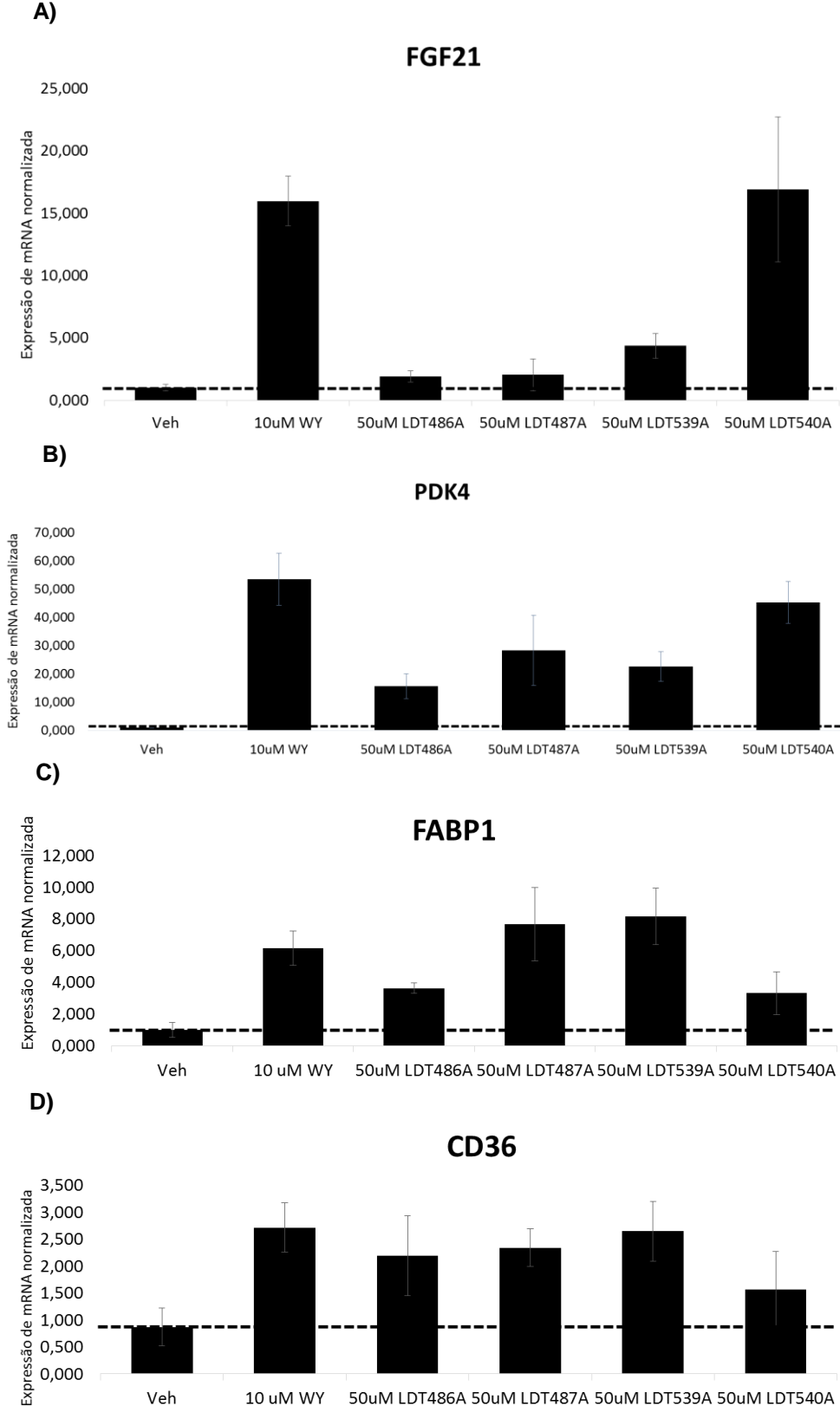


E)



Por sua vez, os compostos monoinsaturados foram avaliados a 50,0 μM em relação ao veículo DMSO em concentração final de 0,1 % e ao controle positivo WY14643 (**32**) a 10,0 μM . Os resultados demonstraram que todos os derivados, LDT486A (**20**), LDT487A (**25**), LDT539A (**23**) e LDT540A (**28**), induziram a expressão de transcritos de cDNA para genes importantes à oxidação e captação de ácidos graxos em hepatócitos primários, FGF21 (Figura **29 A**), PDK4 (Figura **29 B**), FABP1 (Figura **29 C**) e CD36 (Figura **29 D**), com níveis de expressão duas vezes acima do veículo DMSO, evidenciado pela linha tracejada.

Figura 29: Efeito dos compostos monoinsaturados LDT486A (**20**), LDT487A (**27**), LDT539A (**23**) e LDT540A (**28**) testadas a 50,0 μ M sobre hepatócitos primários. Avaliação da expressão de genes envolvidos na oxidação (FGF21, CPT1, PDK4) e captação (CD36) de AG por qPCR. Resposta aos veículos evidenciada pela linha tracejada. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). * P <0,05, usando teste T com correção de Welch e one way ANOVA com correção Holm-Sidak



Os resultados em hepatócitos primários sugerem a capacidade dos derivados saturados, monoinsaturados e das misturas de compostos insaturados em promover a expressão de transcritos de cDNA em análise por qPCR para genes responsáveis pela oxidação (FGF21, CPT1 e PDK4) e captação (FABP1 e CD36) de ácidos graxos no fígado, responsáveis pela redução das taxas de lipídeos circulantes e melhora do metabolismo lipídico. Estes são efeitos benéficos de agonistas PPAR α , usados no tratamento de distúrbios metabólicos (Tabela 15).

Tabela 15: Perfil de atividade dos derivados-alvo na expressão de genes em hepatócitos primários

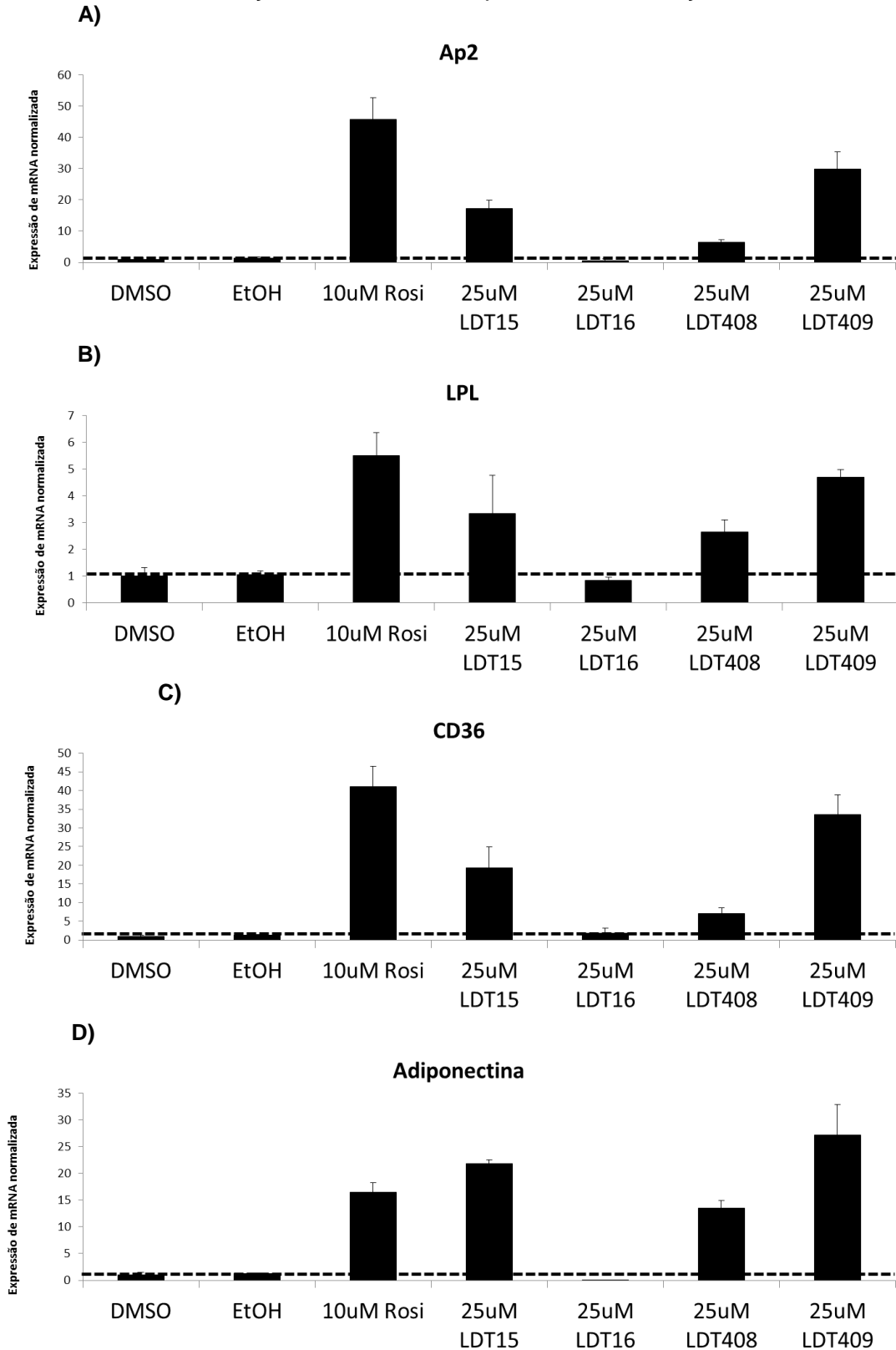
Composto	Atividade	Misturas	Atividade	Composto	Atividade
LDT15 (21)	Ativo	LDT486 (19)	Ativo	LDT486A (20)	Ativo
LDT16 (29)	Ativo	LDT487 (25)	Ativo	LDT487A (27)	Ativo
LDT408 (24)	Ativo	LDT539 (22)	Ativo	LDT539A (23)	Ativo
LDT409 (30)	Ativo	LDT540 (26)	Ativo	LDT540A (28)	Ativo

7.3 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO DE ADIPÓCITOS

Na sequência, visando acessar a capacidade dos derivados-alvo sob a ativação do PPAR γ , foi realizado o ensaio de diferenciação de adipócitos utilizando pré-adipócitos provenientes do camundongo *Swiss*, 3T3 linhagem 1. Dentre os PPAR, PPAR γ é o maior regulador de adipogênese por ser amplamente expresso no tecido adiposo e por regular a expressão de genes e marcadores da diferenciação de adipócitos. Estes incluem a proteína de ligação de ácidos graxos (aP2); lipoproteína lipase (LPL), que hidrolisa triglicerídeos circulantes; CD36, transportador de ácidos graxos; e adiponectina, hormônio secretado pelos adipócitos maduros responsável por reduzir a resistência periférica à insulina, estimular a captação de glicose pelo músculo e minimizar a gliconeogênese no fígado.

Células 3T3-L1 foram cultivadas e com o início da diferenciação tratadas com os ligantes a 25,0 μ M, os controles positivos rosiglitazona (9) e/ou pioglitazona (10) a 10,0 μ M, ou com os veículos, DMSO e EtOH a 0,1 %. As células 3T3-L1 foram lisadas para a avaliação da expressão de transcritos de DNA complementar para marcadores de adipogênese (Ap2, LPL e CD36) e expressão de adiponectina, mensurada por qPCR (STUDENT; HSU; LANE, 1980).

Figura 30: Efeito dos derivados LDT15 (**21**), LDT16 (**29**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) a 25,0 μ M sobre a adipogênese de pré-adipócitos 3T3-L1. Avaliação da expressão de marcadores de adipogênese: Ap2, LPL, CD36 e adiponectina. Resposta aos veículos evidenciada pela linha tracejada. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). * P <0,05, usando teste T com correção de Welch e one way ANOVA com correção Holm-Sidak

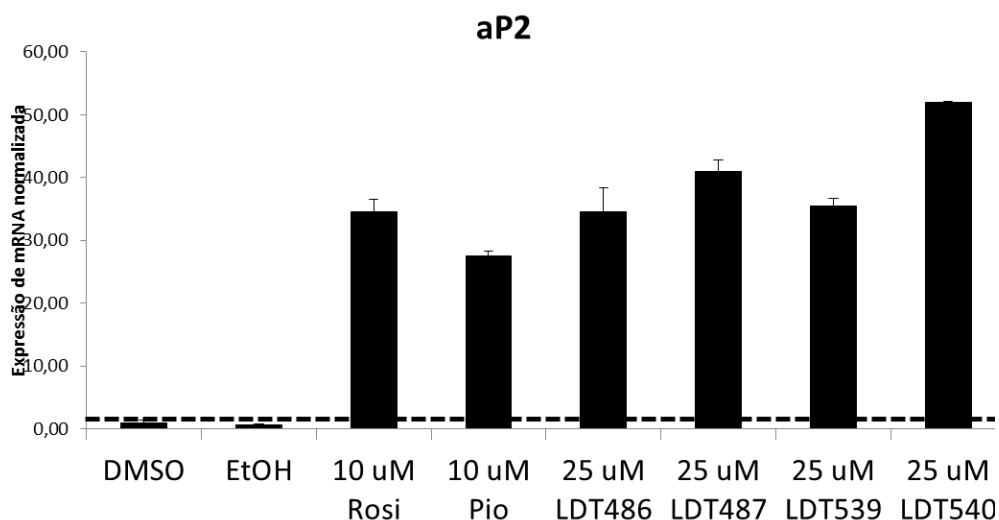


Tratamento dos pré-adipócitos 3T3-L1 com os derivados LDT15 (**21**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**) resultou no aumento da expressão de transcritos de cDNA para os marcadores de diferenciação de adipócitos, Ap2, LPL e CD36 (Figura **30 A**, **30 B** e **30 C**), quando comparado aos veículos e ao controle, indicando a indução da adipogênese. A expressão de transcritos para adiponectina (Figura **30 D**) foi induzida em potente grau em relação à rosiglitazona (**9**) pelos derivados LDT15 (**21**) e LDT409 (**30**). Por sua vez, o LDT408 (**24**) também aumentou significativamente a expressão deste hormônio quando comparado aos veículos.

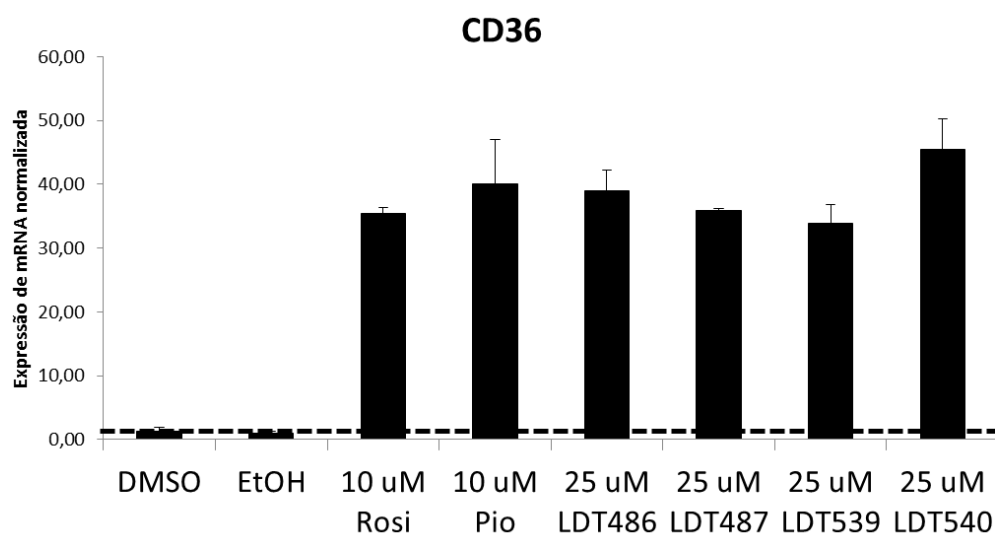
Considerando a série das misturas insaturadas, o tratamento com LDT486 (**19**), LDT487 (**25**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**) (25,0 μ M) induziu a expressão de transcritos de cDNA em qPCR para os marcadores de diferenciação de adipócitos, aP2 e CD36 (Figura **31 A** e **31 B**), quando comparadas aos controles rosiglitazona (**9**) e pioglitazona (**10**) a 10,0 μ M e aos veículos, DMSO e EtOH em concentração de 0,1 %. Por sua vez, a expressão de transcritos para LPL (Figura **31 D**) e do hormônio adiponectina (Figura **31 E**) também foi aumentada após tratamento com todos as misturas, em níveis similares aos controles utilizados a 10,0 μ M, indicando a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos.

Figura 31: Efeito das misturas de compostos LDT486 (**19**), LDT487 (**25**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**) a 25,0 μ M sobre a adipogênese de pré-adipócitos 3T3-L1. Avaliação da expressão de marcadores de adipogênese: Ap2, LPL, CD36 e adiponectina. Resposta aos veículos evidenciada pela linha tracejada. Os dados representam a média \pm EPM (N = 3). P <0,05, usando teste T com correção de Welch e one way ANOVA com correção Holm-Sidak

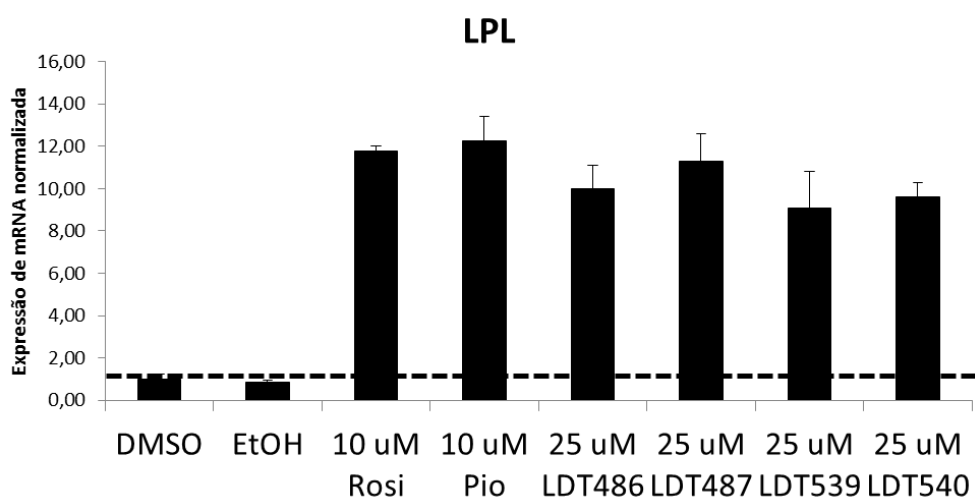
A)



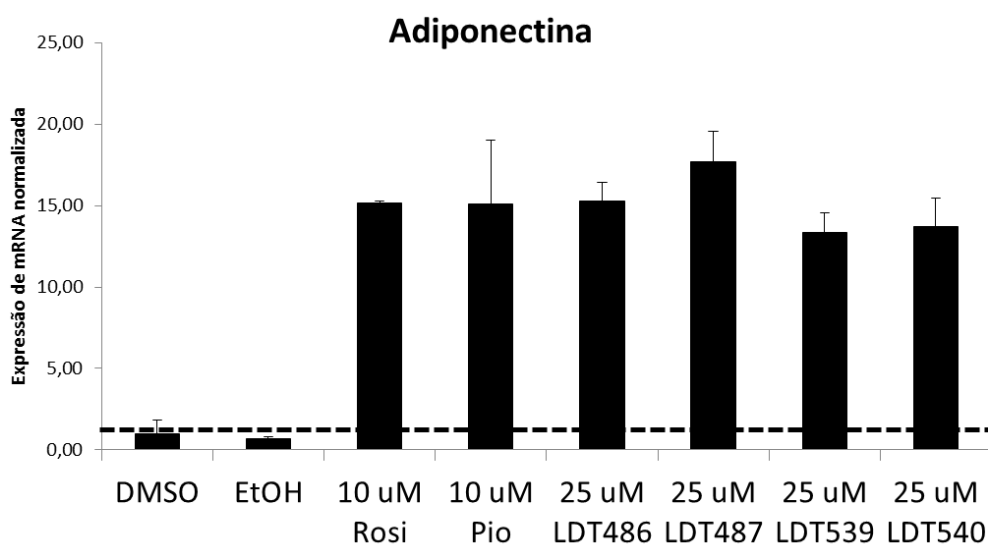
B)



D)



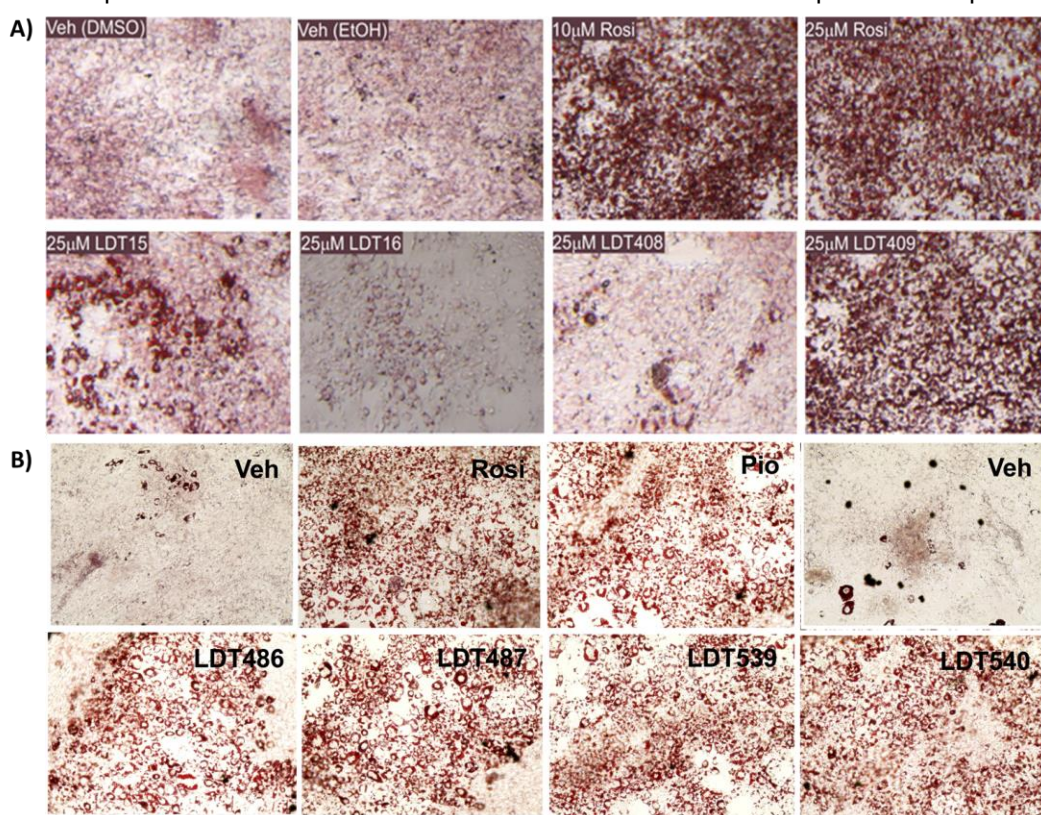
E)



A avaliação da diferenciação de adipócitos com o corante vermelho neutro demonstrou que o derivado LDT409 (**30**, Figura **32 A**) e as misturas LDT539 (**22**) e

LDT540 (**26**, Figura **32 B**) induzem o acúmulo intracelular de lipídeos de forma comparável à rosiglitazona (**9**) e a pioglitazona (**10**). O derivado LDT15 (**21**, Figura **31 A**) e as misturas LDT486 (**19**) e LDT487 (**25**, Figura **32 B**) são capazes de induzir a adipogênese em menor grau quando comparados aos controles, com células adipócitas maiores. Por sua vez, os compostos LDT 16 (**29**) e LDT408 (**24**, Figura **32 A**) induziram menor acúmulo intracelular de lipídeos, em relação as células 3T3-L1 tratadas com rosiglitazona (**9**).

Figura 32: Efeito dos derivados saturados e das misturas de compostos sobre a adipogênese de pré-adipócitos 3T3-L1 corados com vermelho neutro e observadas por microscopia



De maneira geral, a diferenciação de adipócitos mediada pela ativação de PPAR γ foi observada, mostrando aumento nos níveis de expressão de transcritos de cDNA em análise por qPCR para marcadores adipocitários (Ap2, LPL e CD36) e adiponectina, após tratamento com os derivados LDT15 (**21**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**), e com as misturas de compostos LDT486 (**19**), LDT487 (**25**), LDT539 (**22**) e LDT540 (**26**) quando comparados aos veículos e controles positivos (Tabela **16**). Por sua vez, a avaliação dos derivados monoinsaturados, ésteres LDT486A (**20**) e LDT539A (**23**) e ácidos LDT487A (**27**) e LDT540A (**28**), sobre a adipogênese está em andamento.

Tabela 16: Perfil de atividade dos derivados-alvo na diferenciação de adipócitos

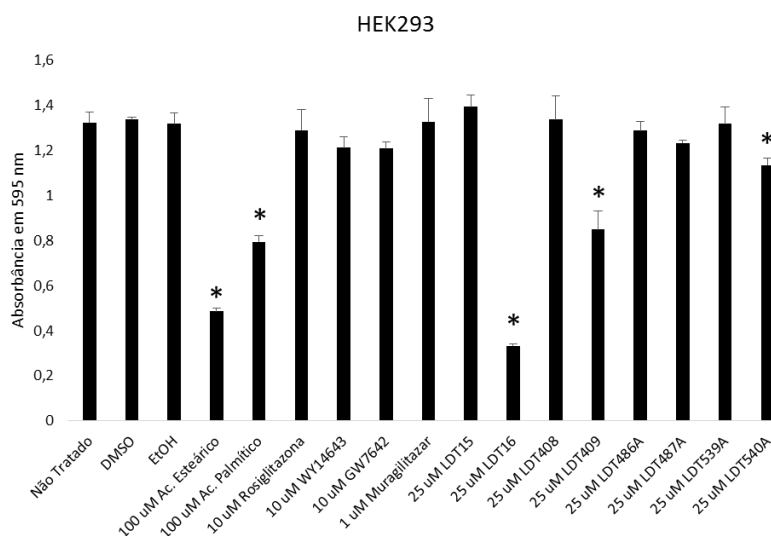
Composto	Atividade	Misturas	Atividade	Composto	Atividade
LDT15 (21)	Ativo	LDT486 (19)	Ativo	LDT486A (20)	Em avaliação
LDT16 (29)	Inativo	LDT487 (25)	Ativo	LDT487A (27)	Em avaliação
LDT408 (24)	Ativo	LDT539 (22)	Ativo	LDT539A (23)	Em avaliação
LDT409 (30)	Ativo	LDT540 (26)	Ativo	LDT540A (28)	Em avaliação

7.4 EFEITOS DOS COMPOSTOS E DAS MISTURAS INSATURADAS NA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE HEK293 E H9C2

Células de rim embrionário HEK293 foram submetidos a tratamento com 25,0 μM dos compostos saturados e monoinsaturados; com os controles positivos, 10,0 μM de rosiglitazona (**9**), 10,0 μM de GW7647 (**31**), 10,0 μM de WY14643 (**32**), 100,0 μM de ácido hexadecanóico (palmítico, **33**), 100,0 μM de ácido octadecanóico (esteárico, **34**) e 1,0 μM de muraglitazar (**35**); e com os veículos DMSO e EtOH em concentração final de 0,1 %, por 24 horas visando determinar os efeitos dos compostos na viabilidade celular utilizando kit de ensaio colorimétrico MTT. O ácido palmítico e o ácido esteárico foram utilizados como controles positivos devido a seus conhecidos efeitos tóxicos na viabilidade celular, quando em altas concentrações (RABKIN; LODHA, 2009).

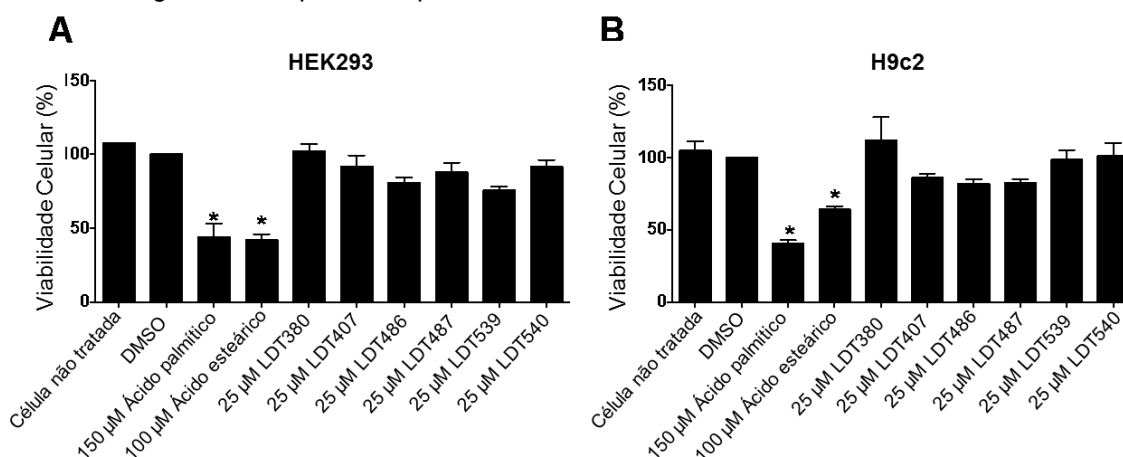
Tratamento com o ácido hexadecanóico (palmítico, **33**), o ácido octadecanóico (esteárico, **34**) e os derivados ácidos LDT16 (**29**), LDT409 (**30**) e LDT540A (**26**) resultou em redução significativa da viabilidade de células HEK293. Por sua vez, os compostos LDT15 (**21**), LDT408 (**24**), LDT486A (**20**), LDT487A (**27**) e LDT539A (**23**) não induziram qualquer toxicidade celular *in vitro*, quando avaliados a 25,0 μM em relação aos controles e aos veículos (Figura **33**).

Figura 33: Análise da viabilidade celular por ensaio de MTT de células HEK293 tratadas com o veículo, controles positivos e derivados LDTs. Os resultados são apresentados como média +-EPM (N = 3)



Para as misturas de compostos, células HEK293 e cardiomiócitos H9c2 foram submetidos a tratamento com 25,0 µM das misturas; com os controles positivos 150,0 µM de ácido palmítico (**33**) e 100,0 µM de ácido esteárico (**34**); e com o veículo DMSO a 0,1 %, por 24 horas para a leitura do ensaio de MTT.

Figura 34: Análise da viabilidade celular por ensaio de MTT de células HEK293 e H9c2 tratadas com o veículo, controles positivos e derivados LDTs. Os resultados são apresentados como média +- EPM (N = 3). Os derivados LDT380 e LDT407 representados na figura não configuram se importantes para este trabalho



Os resultados demonstraram (Figura 34 A e 34 B) que o ácido palmítico (**33**) e o ácido esteárico (**34**) produziram redução significativa da viabilidade de células HEK293 e H9c2. Por sua vez, as misturas de compostos LDT486 (**19**) e LDT539 (**22**) demonstraram redução da viabilidade de células HEK293, e as misturas **19** e

LDT487 (**25**) em células H9c2, quando comparados ao veículo DMSO, não sendo estas significativas estatisticamente. De maneira geral, as misturas de compostos não induziram qualquer toxicidade celular *in vitro*, quando avaliadas a 25,0 µM.

7.5 SISTEMA REPORTER FLUORESCENTE EM *DANIO RERIO*

Danio rerio, também conhecido como zebrafish, constitui promissor modelo experimental para ensaios *in vivo*, por possuir sequência genômica estabelecida auxiliando na identificação de moléculas com ações biológicas em receptores nucleares. Adicionalmente, apresenta mecanismos relacionados ao metabolismo lipídico e a adipogênese conservados com os mamíferos, sugerindo efeitos regulatórios similares e fornecendo fundamentações para o estudo de obesidade e outras doenças metabólicas (BROEDER et al., 2015; SRITHARAN, 2017).

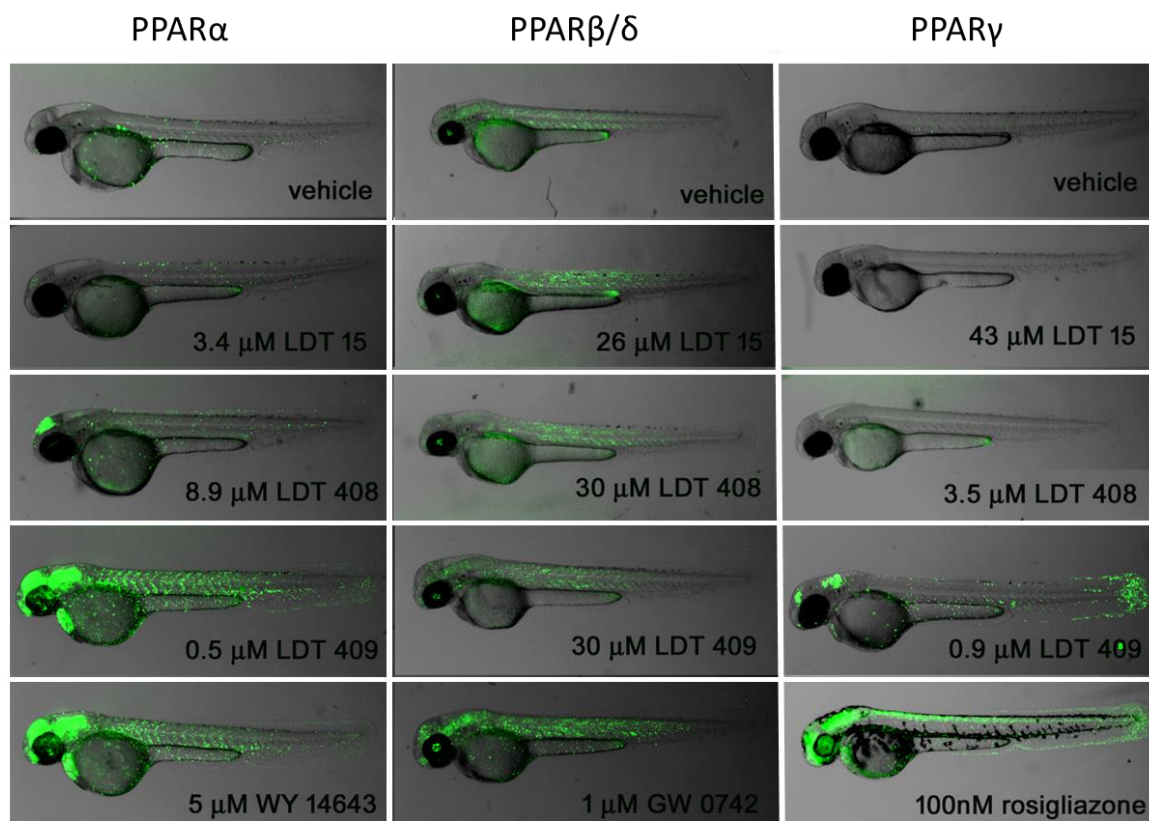
Em adição, a presença de cinco genes de PPAR foi identificada no genoma do zebrafish, dois genes para PPAR α , ppar αa e ppar αb com 67 % e 74 % de similaridade ao receptor em humanos, respectivamente; dois genes para PPAR β/δ , ppar δa e ppar δb com 71 % e 73 % de homologia; e um gene para PPAR γ , ppar γ apresentando 67 % de similaridade ao subtipo γ humano (BROEDER et al., 2015; SRITHARAN, 2017).

Neste sentido, ensaio reporter com embriões transgênicos de zebrafish foi realizado para avaliação *in vivo* da expressão dos subtipos de PPAR (α , β/δ e γ) frente aos derivados da série saturada, visando a determinação do composto líder (Figura **35**). Os embriões foram tratados com os compostos LDT15 (**21**), LDT408 (**24**) e LDT409 (**30**), com os controles WY14643 (**32**), GW0742 (**7**) e rosiglitazona (**9**) e o veículo (DMSO), após dois dias de fertilização, nas concentrações de EC₅₀ previamente obtidas no ensaio de gene reporter luciferase. Os embriões vivos contendo os vetores de fusão para expressão gênica de PPAR produziram proteína fluorescente verde (GFP) em resposta aos ligantes ativos, sendo esta indicativa dos níveis de expressão nuclear do receptor em tecidos específicos.

Na presença de 5,0 µM de WY14643 (**32**), houve forte expressão de GFP nos embriões contendo a proteína de fusão de PPAR α no sistema nervoso central (SNC), epiderme, coração, sangue, retina e músculo. Por sua vez nos embriões contendo GAL4-PPAR β/δ , a expressão de GFP foi aumentada no músculo

esquelético e no cérebro na presença de 1,0 μM do agonista GW0742 (7). Enquanto 100,0 nM de rosiglitazona (9) induziu forte expressão de GFP no SNC e coração de embriões contendo GAL4-PPAR γ .

Figura 35: Avaliação *in vivo* em zebrafish da ativação transcricional dos subtipos de PPAR induzida pelos derivados de cadeia saturada, LDT15 (21), LDT408 (24) e LDT409 (30), comparados aos controles positivos WY14643 (32), GW0742 (7) e rosiglitazona (9), e ao veículo DMSO



Os resultados demonstraram que o LDT15 (21) não apresentou expressão de GFP significativa nos três subtipos de PPAR, com níveis similares ao veículo DMSO. O derivado éster LDT408 (24), em concentração de 8,9 μM , induziu resposta de agonista parcial via expressão de GFP em embriões contendo PPAR α , seletivamente no cérebro. Enquanto o ácido LDT409 (30) demonstrou perfil transcricional de agonista dual PPAR α e PPAR γ , nas concentrações que induzem 50 % do efeito máximo 0,5 μM e 0,9 μM , respectivamente, em diferentes tecidos, quando comparado ao veículo e aos controles positivos agonistas de cada subtipo.

7.6 DESDOBRAMENTOS DA PESQUISA

LDT409 (**30**) foi escolhido como composto líder para avaliação biológica *in vivo* da resposta farmacológica em modelo de obesidade induzida por dieta devido à sua atividade agonista parcial com afinidade balanceada para PPAR α (EC₅₀ 0,53 μ M) e PPAR γ (EC₅₀ 0,94 μ M). Nos ensaios *in vitro*, o derivado aumentou a expressão de transcritos de DNA complementar de genes chave de PPAR α , associados a captação e oxidação de ácidos graxos no fígado, e de PPAR γ , relacionados a adipogênese, em análise por qPCR. Em adição, ensaio *in vivo* utilizando *Danio rerio* resultou na expressão de genes de PPAR após tratamento com o composto, confirmando a transcrição do receptor em diferentes tecidos.

Neste sentido, foram sintetizados 10 g do derivado LDT409 (**30**) para estudos no *Hormone Receptors in Human Health and Disease* da *University of Toronto* que culminaram no trabalho de Mestrado de Cigdem Sahin, em que todos os procedimentos foram aprovados pelo *Faculties of Medicine and Pharmacy Animal Care Committee* (FMPACC).

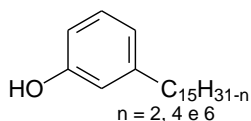
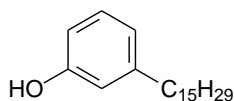
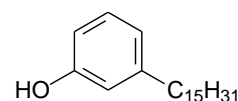
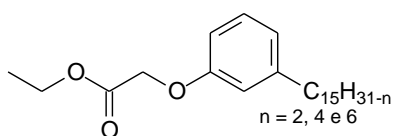
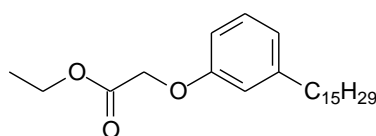
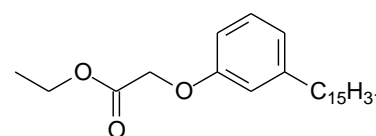
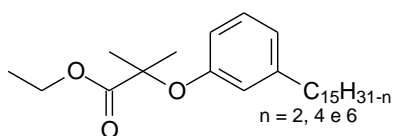
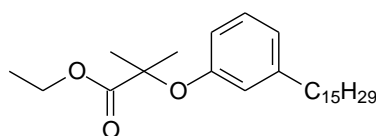
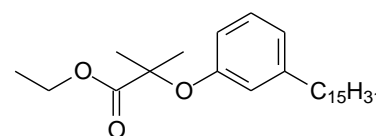
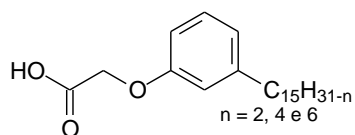
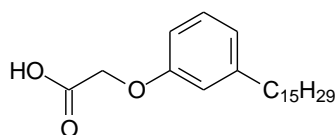
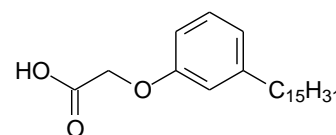
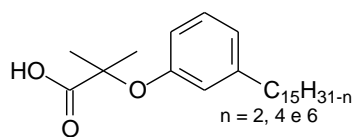
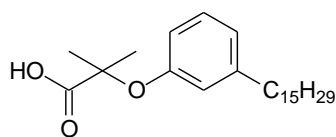
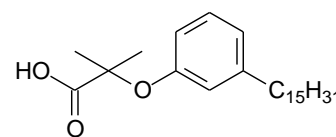
Em conjunto, administração do LDT409 (**30**, 40 mg/kg/dia), por injeção intraperitoneal uma vez ao dia durante 18 dias, demonstrou efeitos benéficos na regulação dos perfis lipídicos, supressão de genes pró-inflamatórios e na promoção da sensibilidade insulínica no plasma, fígado e tecido adiposo de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, em comparação ao veículo (5 % de DMSO, 5 % de polisorbato 80 em solução salina) e ao controle positivo rosiglitazona (**9**, 10 mg/kg/dia). Além disso, o derivado LDT409 (**30**) induziu o fenótipo termogênico no TAB e reduziu o tamanho das gotículas lipídicas, melhorando a funcionalidade do tecido adiposo. Apresentando ainda, possível redução dos efeitos adversos *in vivo* de ganho de peso, retenção hídrica e edema, toxicidade hepática e renal, fratura óssea e insuficiência cardíaca, associados ao uso da rosiglitazona (**9**).

Os resultados sugerem o envolvimento de mecanismos adicionais na regulação da atividade agonista parcial mediada pelo composto, incluindo diferentes fatores transcricionais, corretores e modificações pós-traducionais, que conduzem à expressão de genes específicos e modulação da atividade de PPAR, variáveis que serão analisadas nas perspectivas do trabalho.

Conclusões e Perspectivas

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As metodologias sintéticas mostraram-se eficazes para a obtenção dos derivados-alvo, tendo a mistura de cardanois como material de partida (LDT10i, **16**). Neste contexto, foram sintetizados quinze derivados e misturas de compostos em rendimentos globais que variaram de 74 % a 98 %. As metodologias empregadas para obtenção dos compostos-alvo, desenvolvidas no laboratório, como O-alkilação e hidrólise alcalina, e adaptadas da literatura, incluindo a purificação com nitrato de prata, compreenderam reações clássicas de interconversão de grupos funcionais, sob condições experimentais à temperatura ambiente e refluxo, estando de acordo com os paradigmas e conceitos em Química Medicinal. A caracterização estrutural dos intermediários e compostos-alvo deu-se por meio de métodos espectroscópicos de análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono 13.

LDT10i (**16**)LDT10iA (**17**)LDT10 (**18**)LDT486 (**19**)LDT486A (**20**)LDT15 (**21**)LDT539 (**22**)LDT539A (**23**)LDT408 (**24**)LDT487 (**25**)LDT487A (**27**)LDT16 (**29**)LDT540 (**26**)LDT540A (**28**)LDT409 (**30**)

A avaliação *in vitro* de ensaio de gene reporter luciferase foi capaz de evidenciar a atividade dos compostos sintetizados como agonistas PPAR pela ativação da transcrição dos receptores com valores de EC₅₀ em concentrações micromolar. Neste contexto destacaram-se os derivados ácidos LDT409 (**30**, EC₅₀: PPAR α 0,53 μ M/ PPAR γ 0,94 μ M), LDT540A (**28**, EC₅₀: PPAR α 0,73 μ M/ PPAR γ 1,80 μ M) e a mistura de ácidos LDT540 (**26**, EC₅₀: PPAR α 1,00 μ M/ PPAR γ 1,00 μ M).

Estruturalmente, a introdução do grupo ácido carboxílico conduziu ao aumento da potência dos compostos por meio de interações polares do grupo aniônico (carboxilato) com resíduos de histidina e tirosina contidos no domínio de ligação ao ligante dos PPARs, promovendo o recrutamento de proteínas coreguladoras e a estabilização para ativação da transcrição do receptor. Por sua vez, a presença do grupo dimetila na subunidade alfa-carbonila, mimetizando os fibratos, resultou em melhores perfis de ativação transcricional dos PPARs, sugerindo a importância da rigidez conformacional, assim como de interações hidrofóbicas adicionais no aumento da potência mediada pelos compostos LDT409 (**30**), LDT540 (**26**) e LDT540A (**28**).

Ensaio em hepatócitos primários demonstraram a capacidade dos derivados-alvo e das misturas de compostos em regular a expressão de transcritos de DNA complementar de genes responsáveis pela oxidação (FGF21, CPT1 e PDK4) e captação (FABP1 e CD36) de ácidos graxos no fígado, os quais são efeitos mediados pela ativação de PPAR α e importantes para a regulação do metabolismo lipídico. Por sua vez, ensaios em pré-adipócitos resultaram na expressão de transcritos de cDNA de marcadores da diferenciação de adipócitos (aP2, LDP, CD36 e adiponectina), evidenciando papel na adipogênese via ativação de PPAR γ no tecido adiposo. Enquanto, ensaio *in vivo* em zebrafish demonstrou a expressão de genes de PPAR α e PPAR γ após tratamento com o derivado LDT409 (**30**).

Novos estudos *in vitro* sobre a análise de coreguladores, fatores transcricionais e modificações pós-traducionais, visando a determinação do mecanismo de ativação mediado pelo derivado LDT409 (**30**), assim como avaliação farmacológica *in vivo* dos melhores ligantes da série insaturada LDT540 (**26**) e monoinsaturada LDT540A (**28**), constituem as perspectivas do trabalho na validação do planejamento estrutural, bem como no estabelecimento da relação estrutura-atividade química de possíveis agonistas duais PPAR α/γ .

Referências

10. REFERÊNCIAS

- AMENT, Zsuzsanna et al. PPAR-pan activation induces hepatic oxidative stress and lipidomic remodelling. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 95, p. 357-368, 2015.
- AN, Hye Jin et al. A PPAR Pan Agonist, MHY2013 Alleviates Age-Related Hepatic Lipid Accumulation by Promoting Fatty Acid Oxidation and Suppressing Inflammation. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, vol. 41, n. 1, 2018.
- ANDREÃO, Patrícia S. S. et al. Utilização e recuperação de sílica gel impregnada com nitrato de prata. **Química Nova**, vol. 33, n. 1, p. 212-215, 2010.
- BALACHANDRAN, Vijai Shankar et al. Recent advances in cardanol chemistry in a nutshell: from a nut to nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, vol. 42, n. 2, 2013.
- BANDE, L. O. S et al. Botanical pesticides effect from shells of bean's cashew nut on biological agents of trichoderma sp. and gliocladium sp. **IOP Publishing**, vol. 122, 2018.
- BARB, Diana; PORTILLO-SANCHEZ, Paola; CUSI, kenneth. Pharmacological management of nonalcoholic fatty liver disease. **Metabolism clinical and experimental**, vol. 65, p. 1183-1195, 2016.
- BATISTA, Fernanda A. H. et al. Structural Insights into Human Peroxisome Proliferator Activated Receptor Delta (PPAR-Delta) Selective Ligand Binding. **Plos One**, vol. 7, n. 5, 2012.
- BERGER, Alvin; ROBERTS, Matthew A. **Understanding Lipid Metabolism with Microarrays and Other "Omic" Approaches**. New York: Crc Press, 2005. 472 p.
- BLACKFORD, Krysten et al. Home-based lifestyle intervention for rural adults improves metabolic syndrome parameters and cardiovascular risk factors: A randomised controlled trial. **Preventive Medicine**, vol. 89, p. 15-22, 2016.
- BOOKOUT, A.L. et al. Current protocols in molecular biology. **John Wiley & Sons**, vol. 2, p. 15.18.11-15.18.21, 2005.
- BORRELLI, Antonella et al. Role of gut microbiota and oxidative stress in the progression of nonalcoholic fatty liver disease to hepatocarcinoma: Current and innovative therapeutic approaches. **Redox Biology**, vol. 15, p. 467-479, 2018.
- BOTTA, Margherita et al. PPAR Agonists and Metabolic Syndrome: An Established Role? **International Journal Of Molecular Sciences**, vol. 19, n. 4, 2018.
- BRIDI, Aline Vilanova. **Busca de novos ligantes para o ppar γ utilizando uma abordagem biofísica e celular**. 2016. 114 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

BROEDER, Marjo J. Den et al. Zebrafish as a Model to Study the Role of Peroxisome Proliferating-Activated Receptors in Adipogenesis and Obesity. **PPAR Research**, vol. 2015, p.1-11, 2015.

CAMPOS-MELO, Danae et al. Comprehensive Luciferase-Based Reporter Gene Assay Reveals Previously Masked Up-Regulatory Effects of miRNAs. **International Journal Of Molecular Sciences**, vol. 15, n. 9, p. 15592-15602, 2014.

CAPELLI, Davide et al. Structural basis for PPAR partial or full activation revealed by a novel ligand binding mode. **Nature: Scientific Reports**, vol. 6, n. 34792, p. 1, 2016.

CHEN, Lihong; YANG, Guangrui. PPARs Integrate the Mammalian Clock and Energy Metabolism. **Hindawi Publishing Corporation: PPAR Research**, vol. 2014, 2014.

CHEN, Mei-hsing; LIN, Cheng-hsiu; SHIH, Chun-ching. Antidiabetic and Antihyperlipidemic Effects of Clitocybe nuda on Glucose Transporter 4 and AMP-Activated Protein Kinase Phosphorylation in High-Fat-Fed Mice. **Hindawi Publishing Corporation: Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2014, 2014.

CHEN, Wei et al. A metabolomic study of the PPAR δ agonist GW501516 for enhancing running endurance in Kunming mice. **Nature: Scientific Reports**, vol. 5, n. 9884, 2015.

CHOI, Jah Yeon et al. Therapeutic Effects of Targeted PPAR γ Activation on Inflamed High-Risk Plaques Assessed by Serial Optical Imaging In Vivo. **Theranostics**, vol. 8, n. 1, 2018.

CHRIST, Camila Greice. **Efeito do gq-02, derivado de tiazolidinadionas, sobre a aquisição de fenótipo termogênico pelo adipócito in vivo e em cultura de células**. 2016. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

COELHO, Michella S. et al. GQ-16, a TZD-Derived Partial PPAR γ Agonist, Induces the Expression of Thermogenesis- Related Genes in Brown Fat and Visceral White Fat and Decreases Visceral Adiposity in Obese and Hyperglycemic Mice. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, 2016.

CORONA, Juan Carlos; DUCHEN, Michael R. PPAR γ as a therapeutic target to rescue mitochondrial function in neurological disease. **Free Radical Biology and Medicine**, 2016.

DECARA, Juan M. et al. Treatment with a novel oleic-acid–dihydroxyamphetamine conjugation ameliorates non-alcoholic fatty liver disease in obese Zucker rats. **The Company of Biologists: Disease Models & Mechanisms**, vol. 2015, n. 8, p. 1213-1225, 2015.

DEFOUR, Merel et al. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α is dispensable for cold-induced adipose tissue browning in mice. **Molecular Metabolism**, vol. 2018, p. 1-16, 2018.

DEROSA, Giuseppe; SAHEBKAR, Amirhossein; MAFFIOLI, Pamela. The role of various peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands in clinical practice. **Journal of Cellular Physiology**, vol. 233, p. 153-161, 2017.

DOMÍNGUEZ-AVILA et al. Modulation of PPAR Expression and Activity in Response to Polyphenolic Compounds in High Fat Diets. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 17, 2016.

DONG, Chen et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptors gene polymorphisms in type 2 diabetes and metabolic syndrome. **World Journal of Diabetes**, vol. 6, n. 4, 2015.

DUBOIS, Vanessa et al. Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis. **The Journal of Clinical Investigation**, vol. 127, n. 4, 2017.

DUHART, D. Alemán González et al. Current Advances in the Biochemical and Physiological Aspects of the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus with Thiazolidinediones. **Hindawi Publishing Corporation**, vol. 2016, 2016.

ELISSA, Laila Ahmed; ELSHERBINY, Nehal Mohsen; MAGMOMAH, Abdalkareem Omar. Propolis restored adiponectin level in type 2 diabetes through PPAR γ activation. **Egyptian journal of basic and applied sciences**, vol. 2, p. 318-326, 2015.

FATMAWATI et al. The Efficacy of Seluang Fish Oil (*Rasbora agrottynea*) Related Body Weight, Lipid Profile, Adiponectin and Leptin in High Fat Diet -Induced Wistar Rats. **Bioscientia Medicina**, vol. 2, n. 2, 2018.

FENG, Xiuqing et al. Activation of PPAR γ by a Natural Flavonoid Modulator, Apigenin Ameliorates Obesity-Related Inflammation Via Regulation of Macrophage Polarization. **EBioMedicine**, vol. 9, p. 61-76, 2016.

FILIPOVA, Elena et al. Effects of pioglitazone therapy on blood parameters, weight and BMI: a meta-analysis. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, vol. 9, n. 90, 2017.

FREITAS, Thiago Viana de. **Síntese de Derivados 2-benzil-quinona e 4-fenil-1,3-dioxolano Planejados a Partir dos Lipídeos Fenólicos Não-Isoprenoides do LCC**. 2014. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

FRENDO-CUMBO, Scott; MACPHERSON, Rebecca E. K.; WRIGHT, David C. Beneficial effects of combined resveratrol and metformin therapy in treating diet-induced insulin resistance. **Physiological Reports**, vol. 4, n. 5, 2016.

FUJIOKA, Yoshio. Effects of a Novel Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Modulator K-877 (Pemafibrate) on Postprandial hyperlipidemia. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, vol. 25, n. 2, 2018.

GILLILAN, Richard E.; AYERS, Stephen D.; NOY, Noa. Structural Basis for Activation of Fatty Acid Binding Protein 4. **Journal of Molecular Biology**, vol. 5, n. 372, p. 1246-1260, 2007.

GUERRE-MILLO, Michèle et al. Peroxisome Proliferator-activated Receptor a Activators Improve Insulin Sensitivity and Reduce Adiposity*. **The Journal Of Biological Chemistry**, vol. 275, n. 22, p.16638-16642, 2000.

GHONEM, Nisanne S; ASSIS, David N.; BOYER, James L. Fibrates and Cholestasis. **Hepatology**, vol. 62, n. 2, p. 635-643, 2015.

GRYGIEL-GÓRNIAK, Bogna. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. **Nutrition Journal**, vol. 17, n. 13, 2014.

HAMAD, Fatma B; MUBOFU, Egid B. Potential Biological Applications of Bio-Based Anacardic Acids and Their Derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 16, 2015.

HASHIMOTO, Haruo et al. Adiponectin deficiency-induced diabetes increases 5 TNF α and FFA via downregulation of PPAR α . **The Journal of Veterinary Medical Science**, 2018.

HAZLEHURST, Jonathan M. et al. Non-Alcoholic fatty liver disease and diabetes. **Metabolism clinical and experimental**, vol. 65, p. 1096-1108, 2016.

HWANG, Moon-Hyon; LEE, Sewon. Insulin resistance: vascular function and exercise. **Integrative Medicine Research**, vol. 2016, 2016.

ISHIBASHI, Shun et al. Effects of K-877, a novel selective PPAR α modulator (SPPARMa), in dyslipidaemic patients: A randomized, double blind, active- and placebo-controlled, phase 2 trial. **Atherosclerosis**, vol. 249, p. 36-43, 2016.

ISHIBASHI, Shun et al. Efficacy and safety of pemafibrate (K-877), a selective peroxisome proliferator-activated receptor a modulator, in patients with dyslipidemia: Results from a 24-week, randomized, double blind, active-controlled, phase 3 trial. **Journal of Clinical Lipidology**, vol. 12, p. 173-184, 2018.

JIA, Zhanjun et al. New Insights into the PPAR γ Agonists for the Treatment of Diabetic Nephropathy. **Hindawi Publishing Corporation**, vol. 2014, 2014.

KAHREMANY, Shirin et al. Activation of PPAR δ : from computer modelling to biological effects. **British Journal of Pharmacology**, vol. 172, n. 3, 2014.

LAGANÀ, Antonio Simone et al. Pleiotropic Actions of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) in Dysregulated Metabolic Homeostasis, Inflammation

and Cancer: Current Evidence and Future Perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 17, 2016.

LAKSHMI, Sowmya P. et al. PPAR agonists for the prevention and treatment of lung cancer. **Hindawi Publishing Corporation**, vol. 2017, 2017.

LASAR, David. Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Controls Mature Brown Adipocyte Inducibility through Glycerol Kinase. **Cell Reports**, vol. 22, p. 760-773, 2018.

LEE, Min A. et al. Structures of PPAR γ complexed with lobeglitazone and pioglitazone reveal key determinants for the recognition of antidiabetic drugs. **Scientific Reports**, vol. 7, 2017.

LEE, Ting-I et al. HDAC Inhibition Modulates Cardiac PPARs and Fatty Acid Metabolism in Diabetic Cardiomyopathy. **Hindawi Publishing Corporation**, vol. 2016, 2016.

LEITE, Aracelli de Sousa et al. Evaluation of Toxic, Cytotoxic, Mutagenic, and Antimutagenic Activities of Natural and Technical Cashew Nut Shell Liquids Using the *Allium cepa* and *Artemia salina* Bioassays. **Hindawi Publishing Corporation**, vol. 2015, 2015.

LIU, Weilin et al. Effective treatment of steatosis and steatohepatitis by fibroblast growth factor 1 in mouse models of nonalcoholic fatty liver disease. **Proceedings of the National Academy Sciences of United States of America**, vol. 113, n. 8, 2016.

MABILLEAU, Guillaume; CHAPPARD, Daniel; BASLÉ, Michel F.. Cellular and molecular effects of thiazolidinediones on bone cells: a review. **International Journal Of Biochemistry And Molecular Biology**, v. 2011, n. 3, p.240-246, 2011.

MANSOUR, Mahmoud. Chapter Seven – The Roles of Peroxisome Proliferator Activated Receptors in the Metabolic Syndrome. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, vol. 121, 2014.

MCQUEEN, Charlene A. **Comprehensive Toxicology**. 2. ed. United Kingdom: Elsevier, 2010.

MINATEL, Igor Otavio et al. Antioxidant Activity of -Oryzanol: A Complex Network of Interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 2016, n. 17, 2016.

NASCENTE, L. C. de. **Síntese de Novo Derivado Beta-Fenoxietilamínico, Candidato a Antagonista Alfa-Adrenérgico**. Congresso de Iniciação Científica da Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2004

NG, Feifei et al. Bio-Based Aromatic Epoxy Monomers for Thermoset Materials. **Molecules**, vol. 22, n. 149, 2017.

PADMANABHAN, Monika & ARUMUGAM, Geetha. Effect of *Persea americana* (avocado) fruit extract on the level of expression of adiponectin and PPAR- γ in rats subjected to experimental hyperlipidemia and obesity. **De Gruyter**, vol. 2014, 2014.

PAN, De-si et al. Chiglitazar Preferentially Regulates Gene Expression via Configuration-Restricted Binding and Phosphorylation Inhibition of PPAR γ . **Hindawi: PPAR Research**, vol. 2017, p.1-16, 2017.

PATEL, R. et al. LXR beta is required for glucocorticoid-induced hyperglycemia and hepatosteatosis in mice. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 121, p. 431-441, 2011.

QIU, Xinchun et al. HDAC5 Integrates ER Stress and Fasting Signals to Regulate Hepatic Fatty Acid Oxidation. **The Journal of Lipid Research**, 2017.

RABKIN, S.W., LODHA, P. Stearic acid-induced cardiac lipotoxicity is independent of cellular lipid and is mitigated by the fatty acids oleic and capric acid but not by the PPAR agonist troglitazone. **Experimental Physiology**, vol. 94, p. 877-887, 2009.

RIGANO, Daniela; SIRIGNANO, Carmina; TAGLIALATELA-SCAFATI, Orazio. The potential of natural products for targeting PPAR α . **Acta Pharmaceutica Sinica B**, vol. 7, n. 4, p. 427-438, 2017.

SAHEBKAR, Amirhossein; CHEW, Gerard T; WATTS, Gerald F. New peroxisome proliferator-activated receptor agonists: potential treatments for atherogenic dyslipidemia and non-alcoholic fatty liver disease. **Informa Healthcare: Expert Opinion on Pharmacotherapy**, vol. 4, n. 15, 2014.

SAHIN, Cigdem. **Characterizing Novel PPAR Agonists Derived from Cashew Nut Shell Liquid for Treatment of Metabolic Disease**. 2017. Dissertação (Mestrado) – Pharmaceutical Sciences, University of Toronto, Toronto, 2017.

SANTOS, Jademilson Celestino. **Caracterização estrutural dos complexos entre os receptores ativadores de proliferação de peroxissomos (PPARs) dos tipos alfa e gama e seus agonistas**. 2014. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SCHWARZ, Rico et al. Monitoring Solution Structures of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β/δ upon Ligand Binding. **PLoS ONE**, vol. 11, 2016.

SKLIROS, Nikitas P.; VLACHOPOULOS, Charalambos; TOUSOULIS, Dimitrios. Treatment of Diabetes: Crossing to the other side. **Hellenic Journal of Cardiology**, vol. 2016, 2016.

SOUZA FILHO, Roberto Yoshio de. **Estudos visando à síntese de heterociclos de 5- membros a partir dos lipídeos fenólicos do lcc: isobenzofuranonas e indolinonas em foco**. 2013. Dissertação (Mestrado) - Pós-graduação em Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SRITHARAN, Abiran. **Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), phthalates and reproduction in the female zebrafish (Danio rerio)**. 2017. Dissertação (Mestrado) - Integrative Biology, University Of Guelph, Ontario, 2017.

STUDENT, Adina Kaiden; HSU, Robert Y.; LANE, M. Daniel. Induction of Fatty Acid Synthetase Synthesis in Differentiating 3T3-L1 Preadipocytes*. **The journal of biological chemistry**, vol. 255, n. 10, p. 4745-4750, 1980.

SUN, Yanru et al. Anti-hypertensive and cardioprotective effects of a novel apitherapy formulation via upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor- α and - γ in spontaneous hypertensive rats. **Saudi Journal of Biological Sciences**, vol. 25, n. 2, p. 213-219, 2018.

SZABLEWSKI, L. Glucose transporters in healthy heart and in cardiac disease. **International Journal of Cardiology**, vol. 230, p. 70-75, 2017.

SZKUP, Matgorzata et al. Associations between the components of metabolic syndrome and the polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ), the fat mass and obesity-associated (FTO), and the melanocortin-4 receptor (MC4R) genes. **Aging**, vol. 10, n. 1, 2018.

TAIN, You-Lin; HSU, Chien-Ning; CHAN, Julie Y. H. PPARs Link Early Life Nutritional Insults to Later Programmed Hypertension and Metabolic Syndrome. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 17, n. 20, 2015.

TIEFENBACH, Jens et al. A Live Zebrafish-Based Screening System for Human Nuclear Receptor Ligand and Cofactor Discovery. **Plos One**, vol. 5, n. 3, 2010.

TORAL, Marta et al. Antihypertensive effects of peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ activation. **American Journal Of Physiology-heart And Circulatory Physiology**, vol. 312, n. 2, p.189-200, 2017.

UGWU, David I. et al. Novel Phenoxazinones as potent agonist of PPAR- α : design, synthesis, molecular docking and in vivo studies. **Lipids In Health And Disease**, vol. 17, n. 1, 2018.

VASAPOLLO, Giuseppe; MELE, Giuseppe & SOLE, Roberta Del. Cardanol- Based Materials as Natural Precursors for Olefin Metathesis. **Journal Molecules**, vol. 16, n. 8, 2011.

WANG, Limei et al. Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): a review. **Biochemical Pharmacology**, 2014.

Wikimedia Commons. **Nuclear Receptor Structure**. 2007. Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nuclear_Receptor_Structure.png

WOOD, Anthony. **Annual Reports in Medicinal Chemistry, Volume 41**. Reino Unido: Academic Press, 2006.

XU, H. Eric et al. Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator activated receptors. . **Proceedings of the National Academy Sciences of United States of America**, vol. 98, n. 24, p. 13919-13924, 2001.

YAMADA, Hidetoshi et al. 8-Hydroxyeicosapentaenoic Acid Decreases Plasma and Hepatic Triglycerides via Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. **Hindawi Publishing Corporation**, vol. 2016, 2016.

YANG, Lili et al. Lingguizhugan Decoction Protects against High-Fat-Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Alleviating Oxidative Stress and Activating Cholesterol Secretion. **Hindawi Publishing Corporation**, vol. 2017, 2017.

YOKOI, Hiroshi et al. Hydroxy Monounsaturated Fatty Acids as Agonists for Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, vol. 33, n. 5, p. 854-861, 2010.

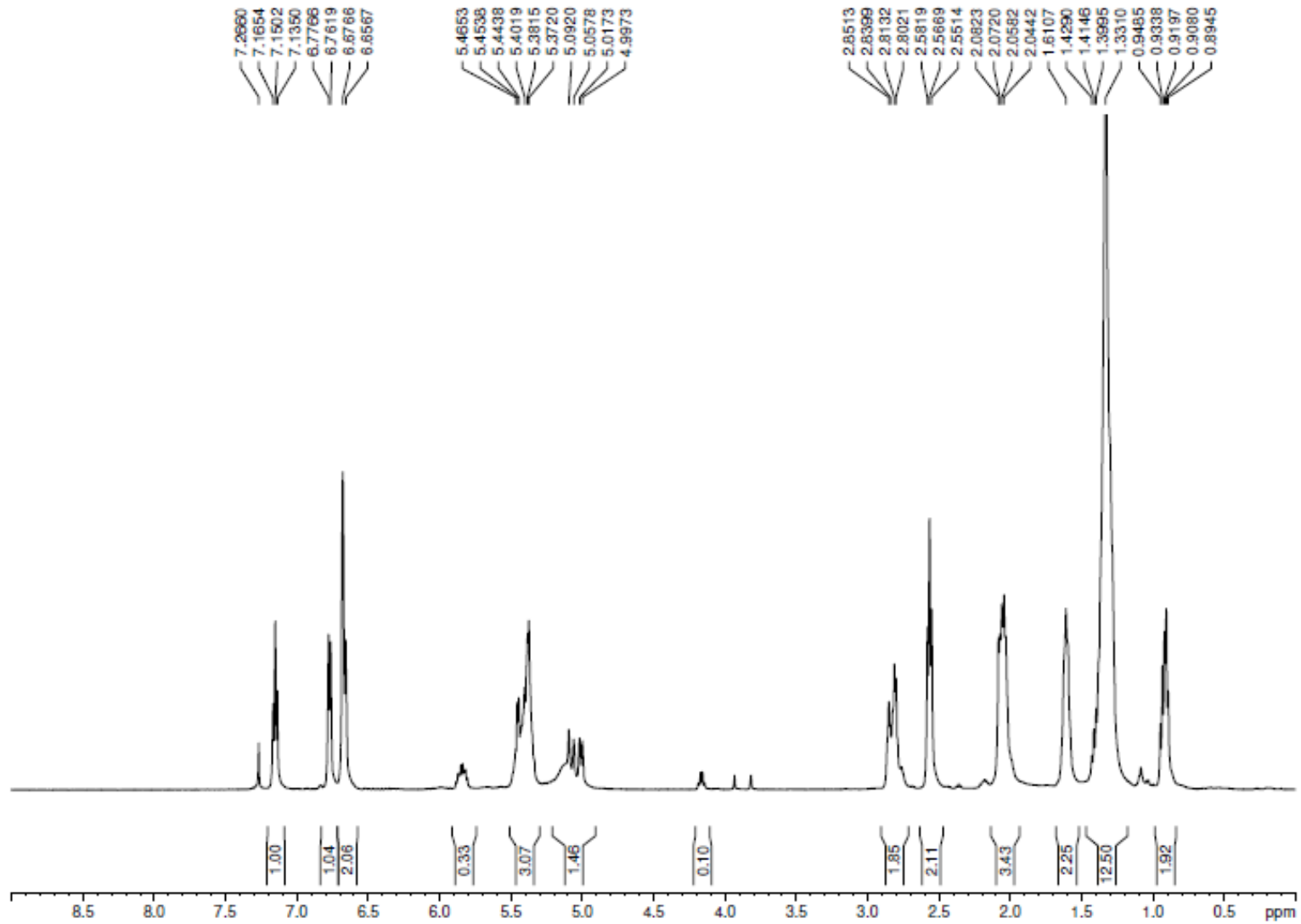
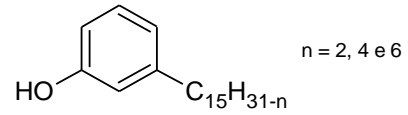
ZAREI, Mohammad et al. Hepatic regulation of VLDL receptor by PPARb/d and FGF21 modulates non-alcoholic fatty liver disease. **Elsevier: Molecular Metabolism**, vol. 2017, p. 1-15, 2017.

ZHANG, Xiaoyan et al. FAM3 gene family: A promising therapeutical target for NAFLD and type 2 diabetes. **Metabolism Clinical and Experimental**, vol. 81, p. 71-82, 2018.

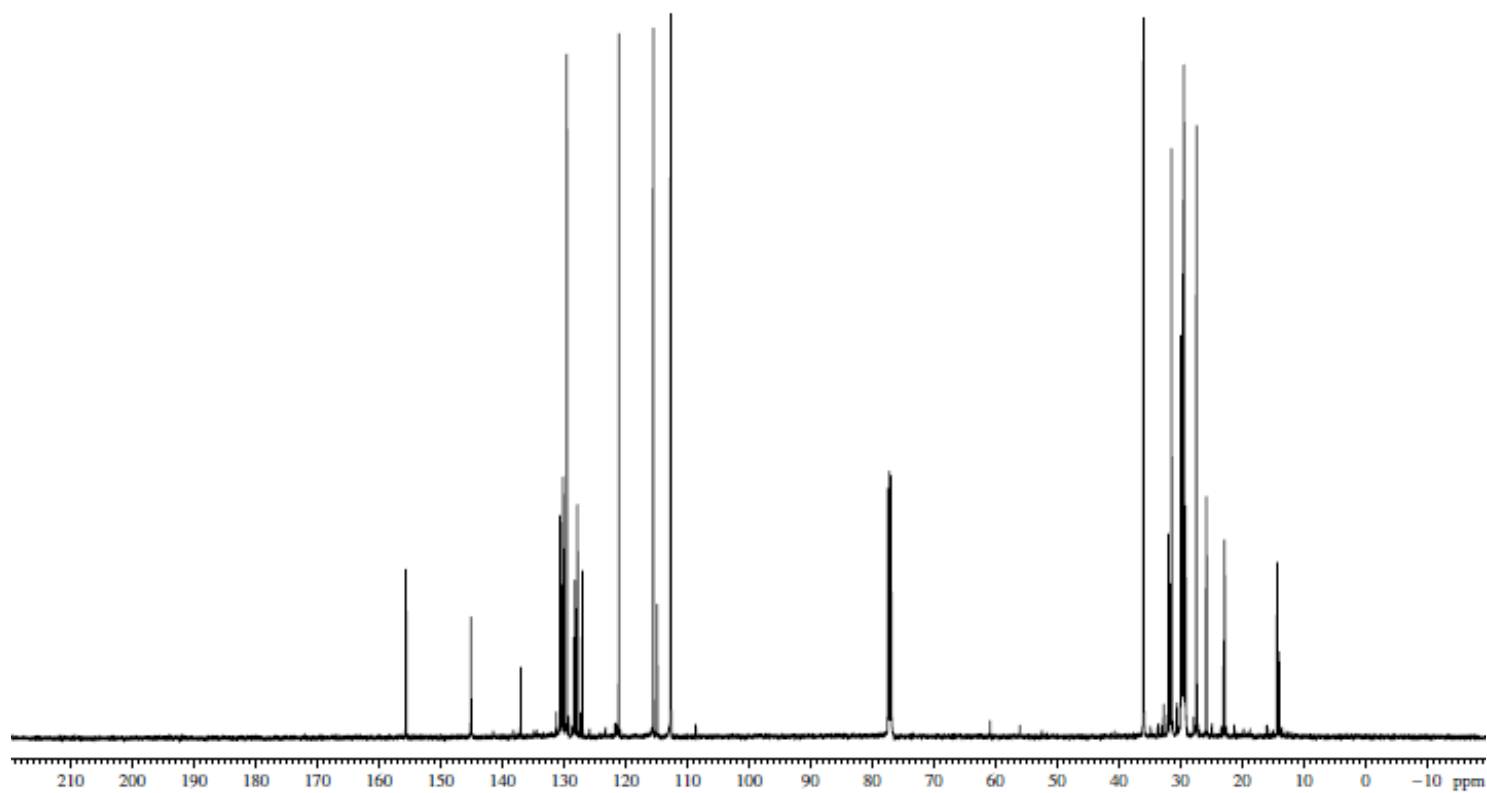
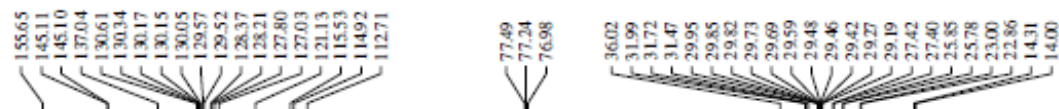
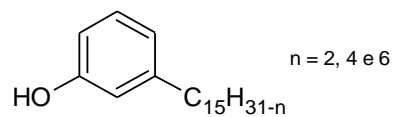
ZHANG, Yinxin et al. A noncanonical PPAR γ /RXR α -binding sequence regulates leptin expression in response to changes in adipose tissue mass. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, vol. 115, n. 26, p. 6039-6047, 2018.

Anexos

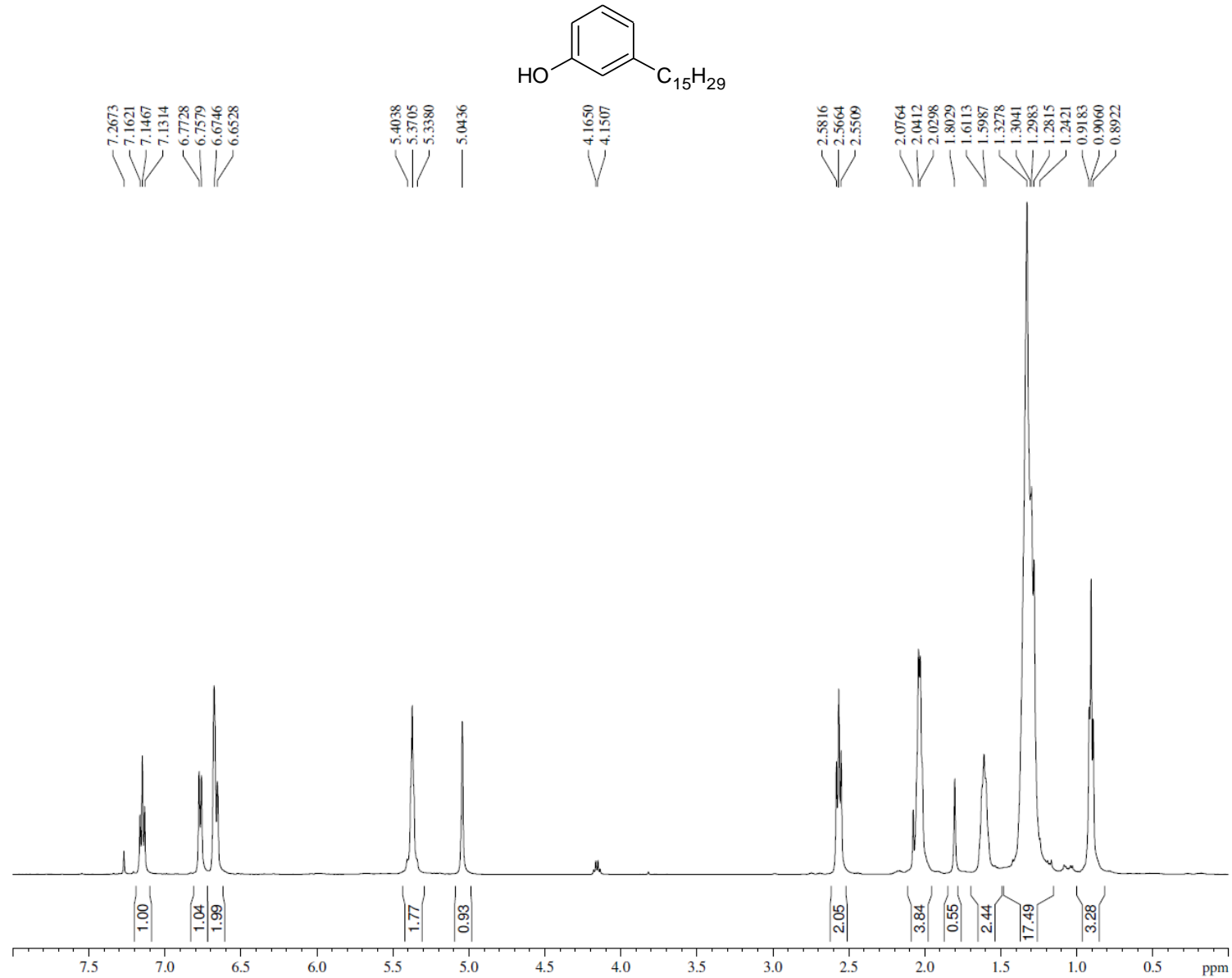
**ANEXO 1 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):
Mistura de Cardanois (LDT10i, **16**)**



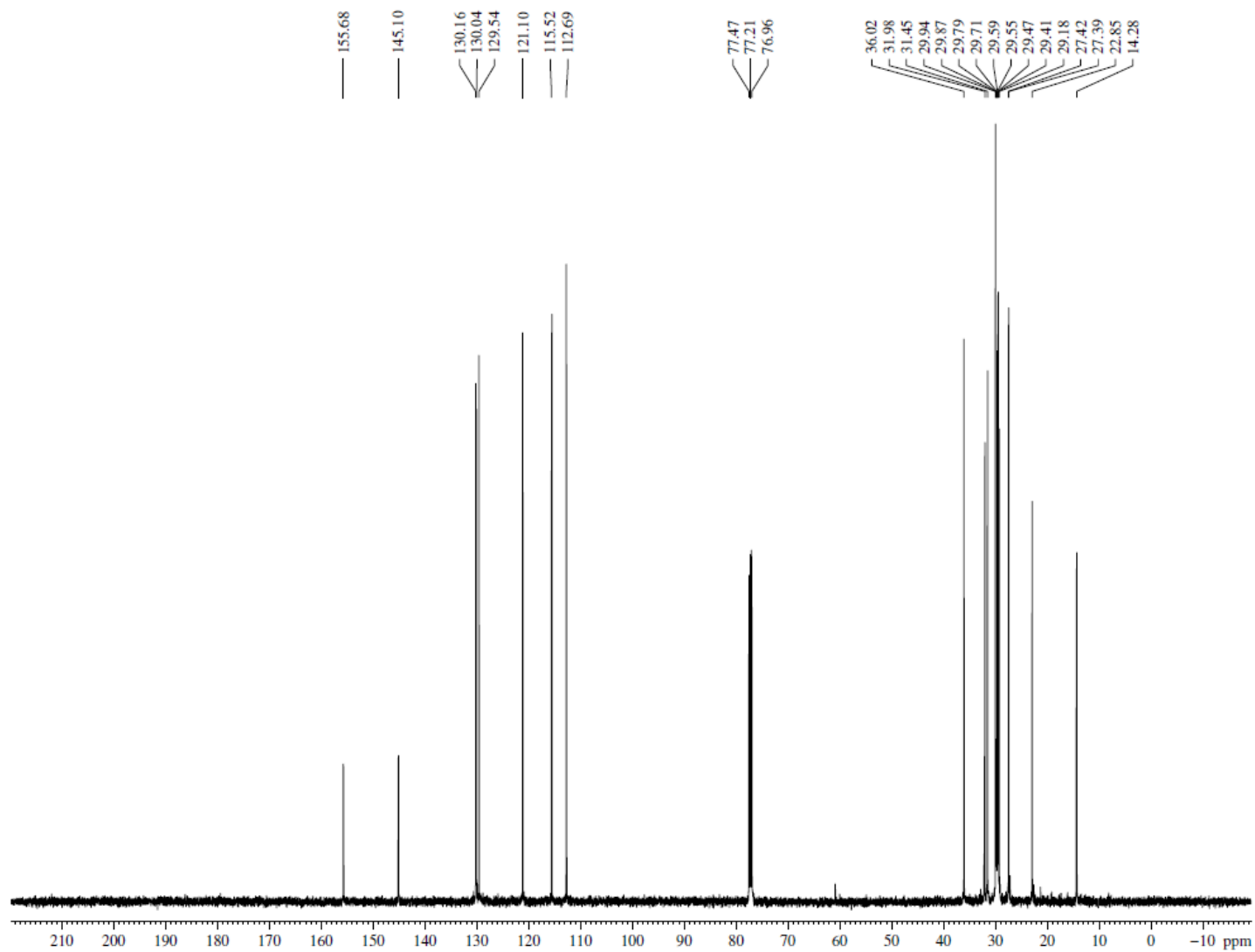
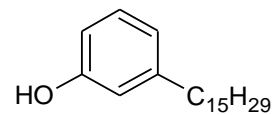
**ANEXO 2 – Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):
Mistura de Cardanóis (LDT10i, **16**)**



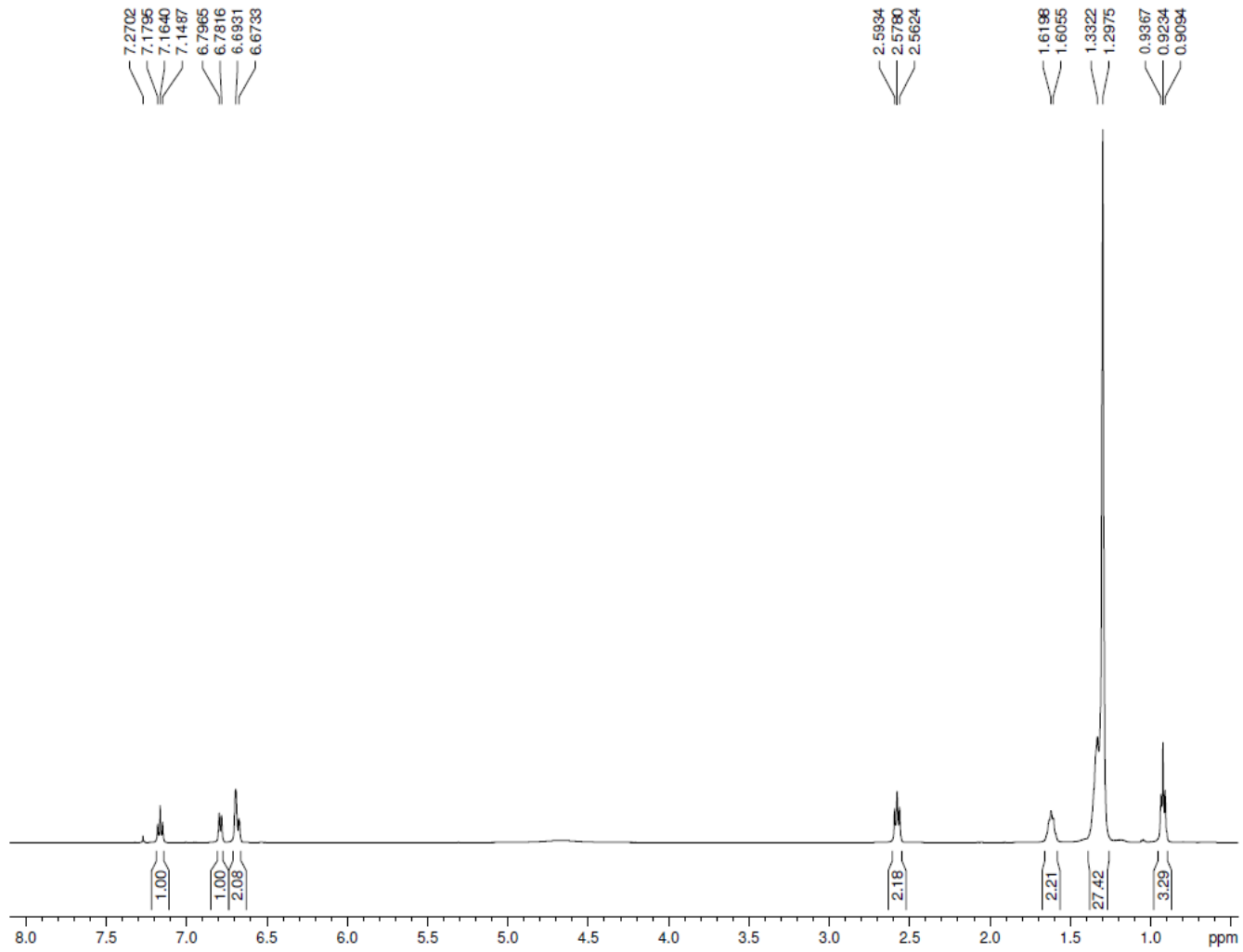
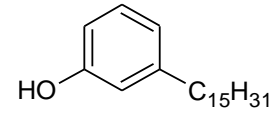
**ANEXO 3 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):
Cardanol Monoinsaturado (LDT10iA, **17**)**



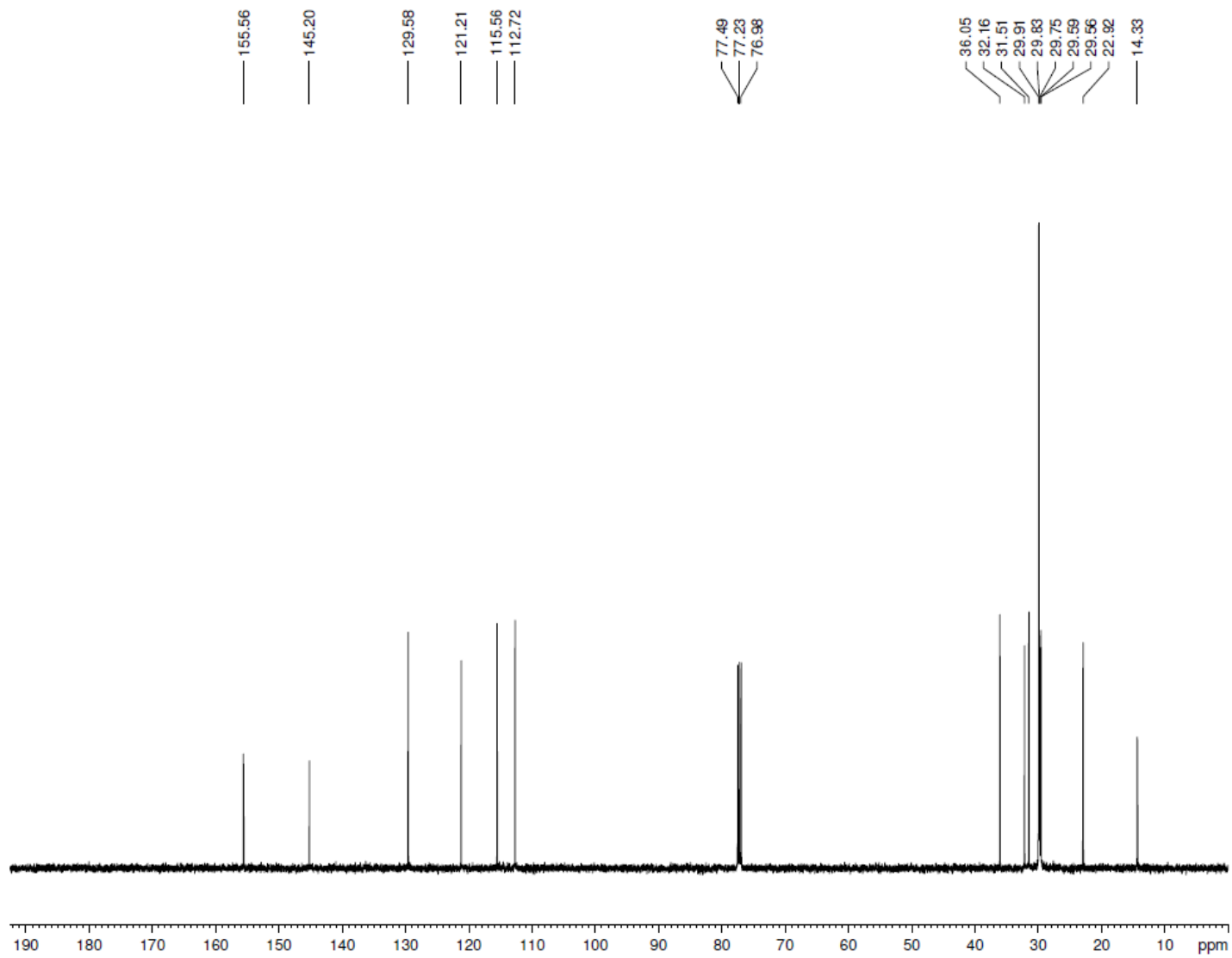
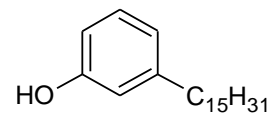
**ANEXO 4 – Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):
Cardanol Monoinsaturado (LDT10iA, 17)**



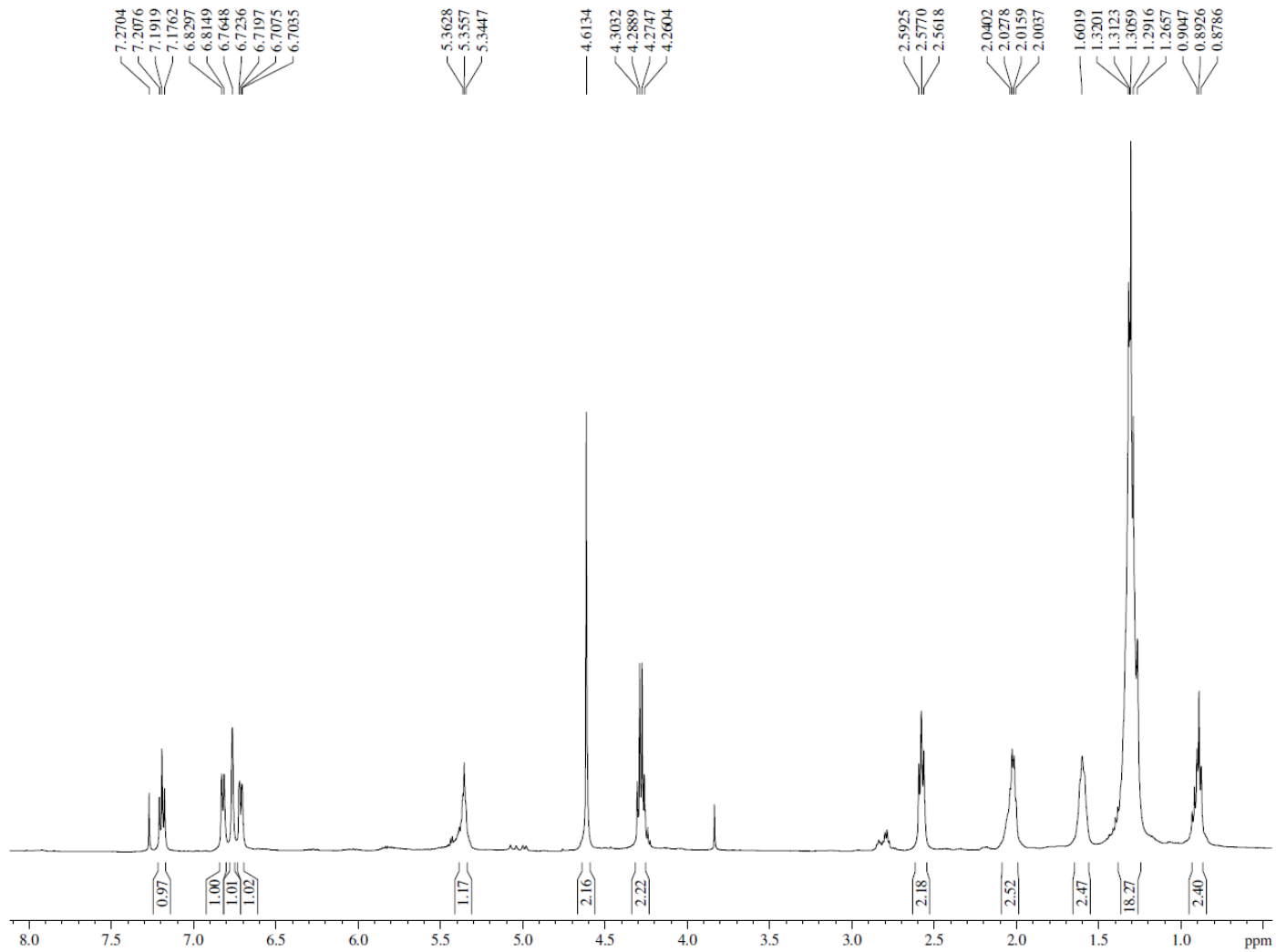
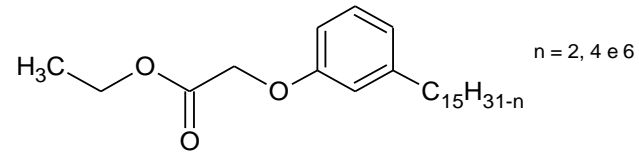
ANEXO 5 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):
3-Pentadecilfenol (LDT10, **18**)



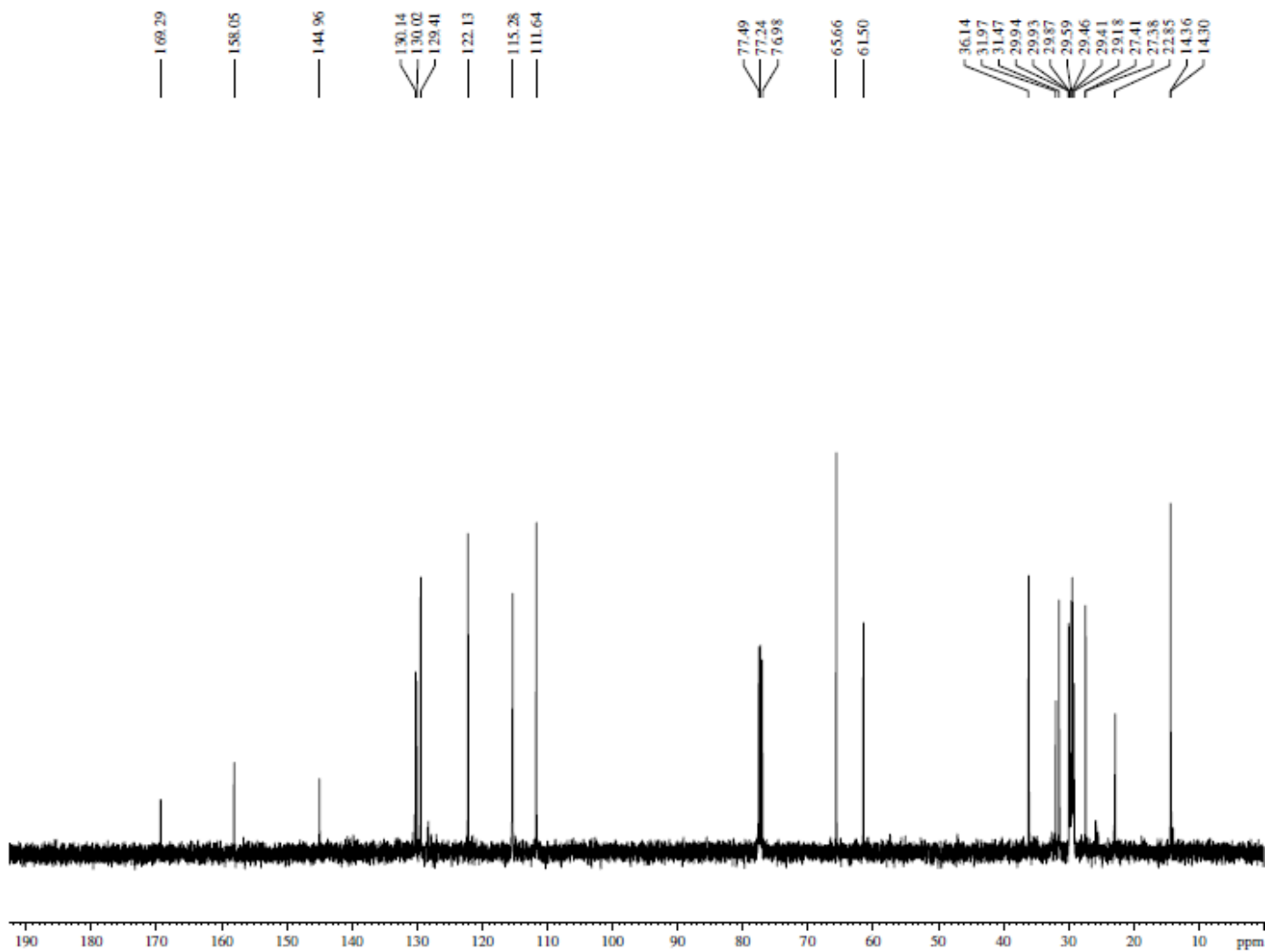
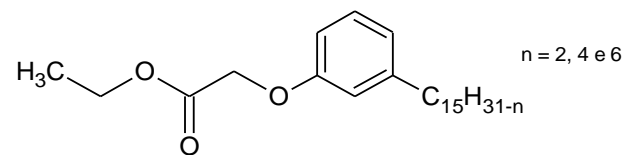
ANEXO 6 – Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):
3-Pentadecilfenol (LDT10, **18**)



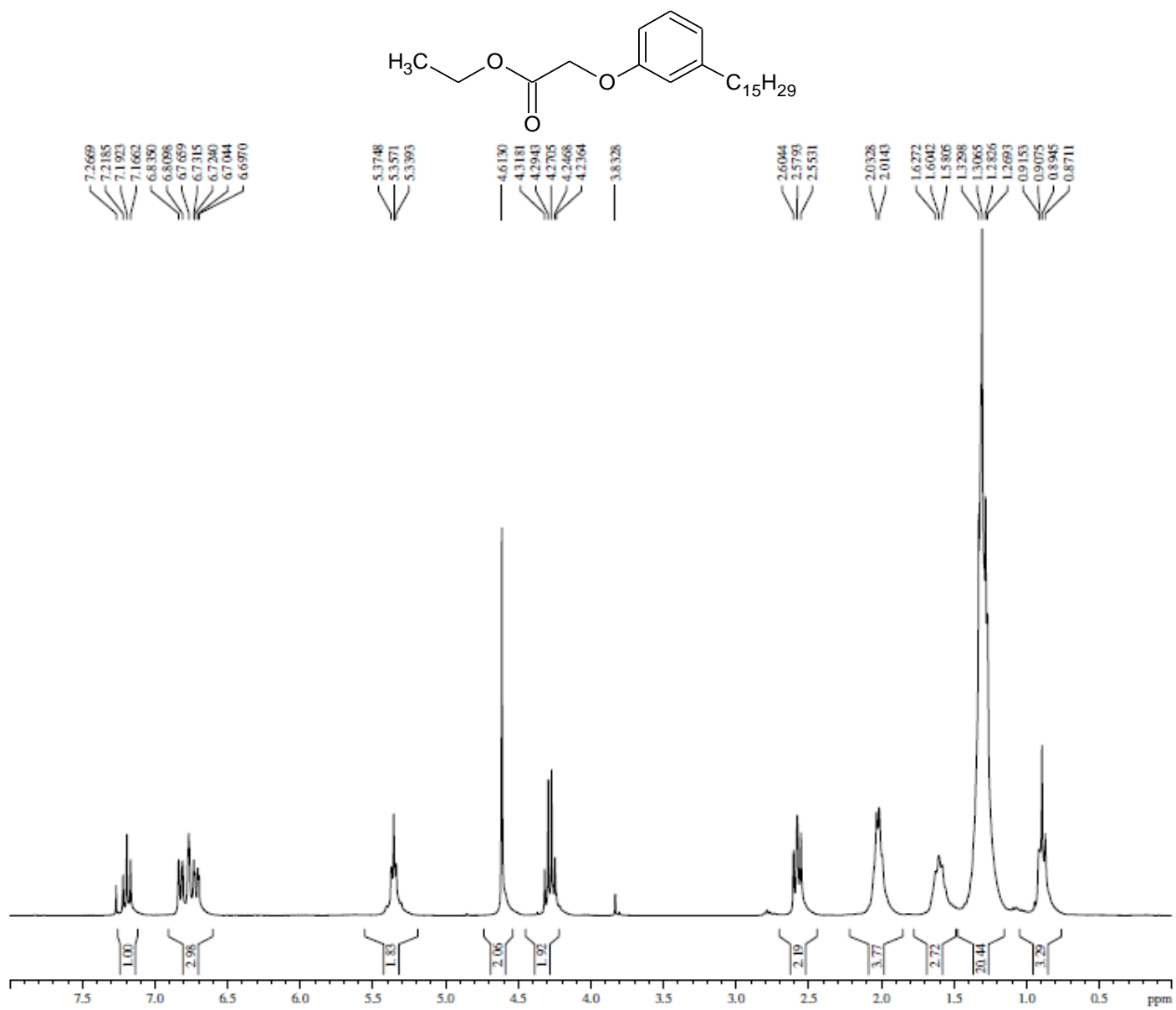
ANEXO 7 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):
Mistura 2-{3-[(8E)-pentadec-8-en/8,11-dien/8,11,14-trien-1-il]fenóxi}acetato de etila (LDT486, **19**)



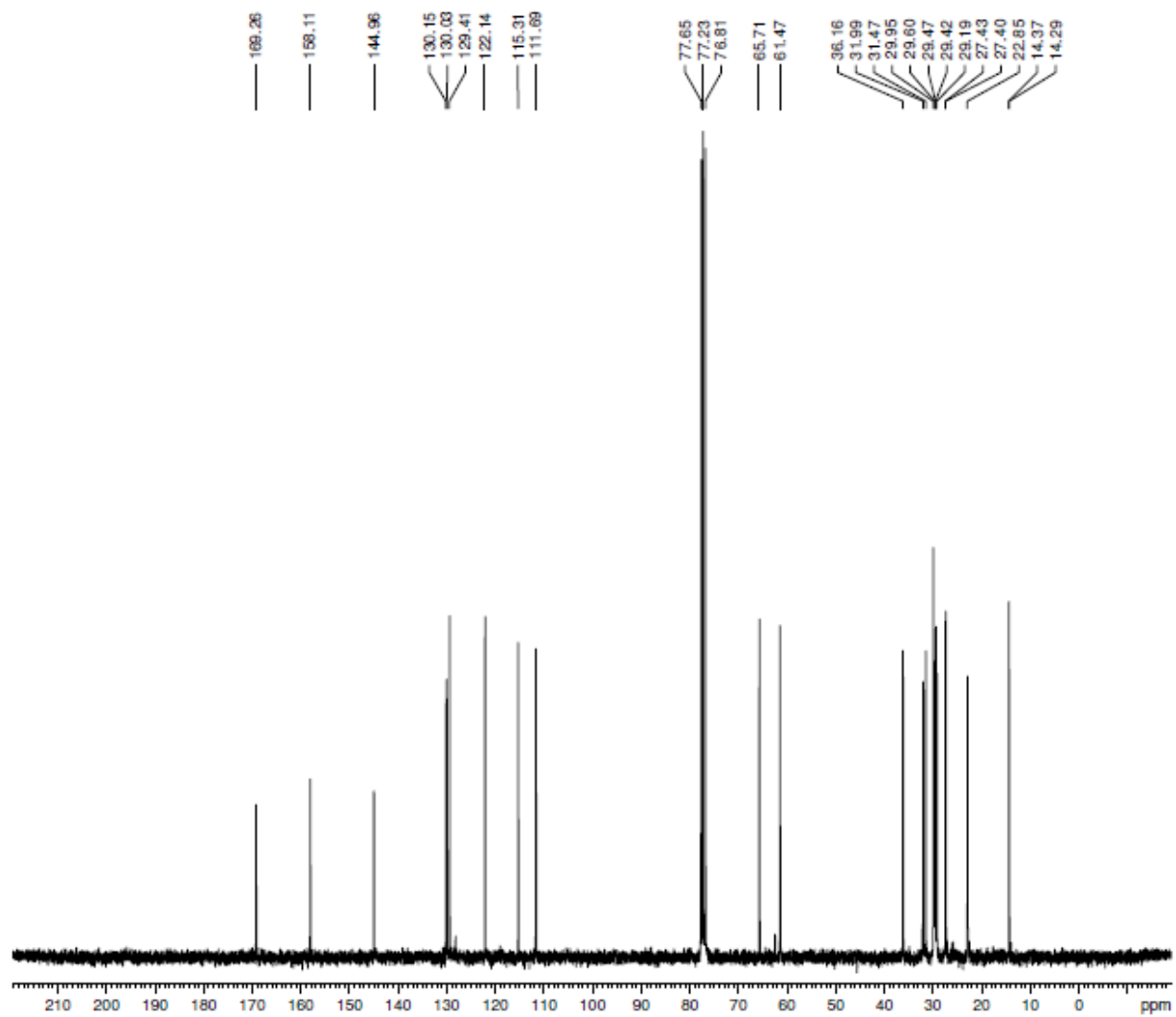
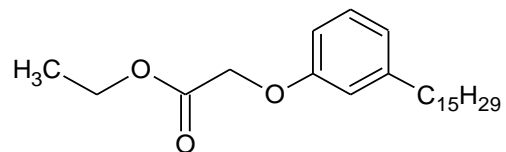
ANEXO 8 – Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):
Mistura 2-{3-[(8E)-pentadec-8-en/8,11-dien/8,11,14-trien-1-il]fenóxi}acetato de etila (LDT486, 19)



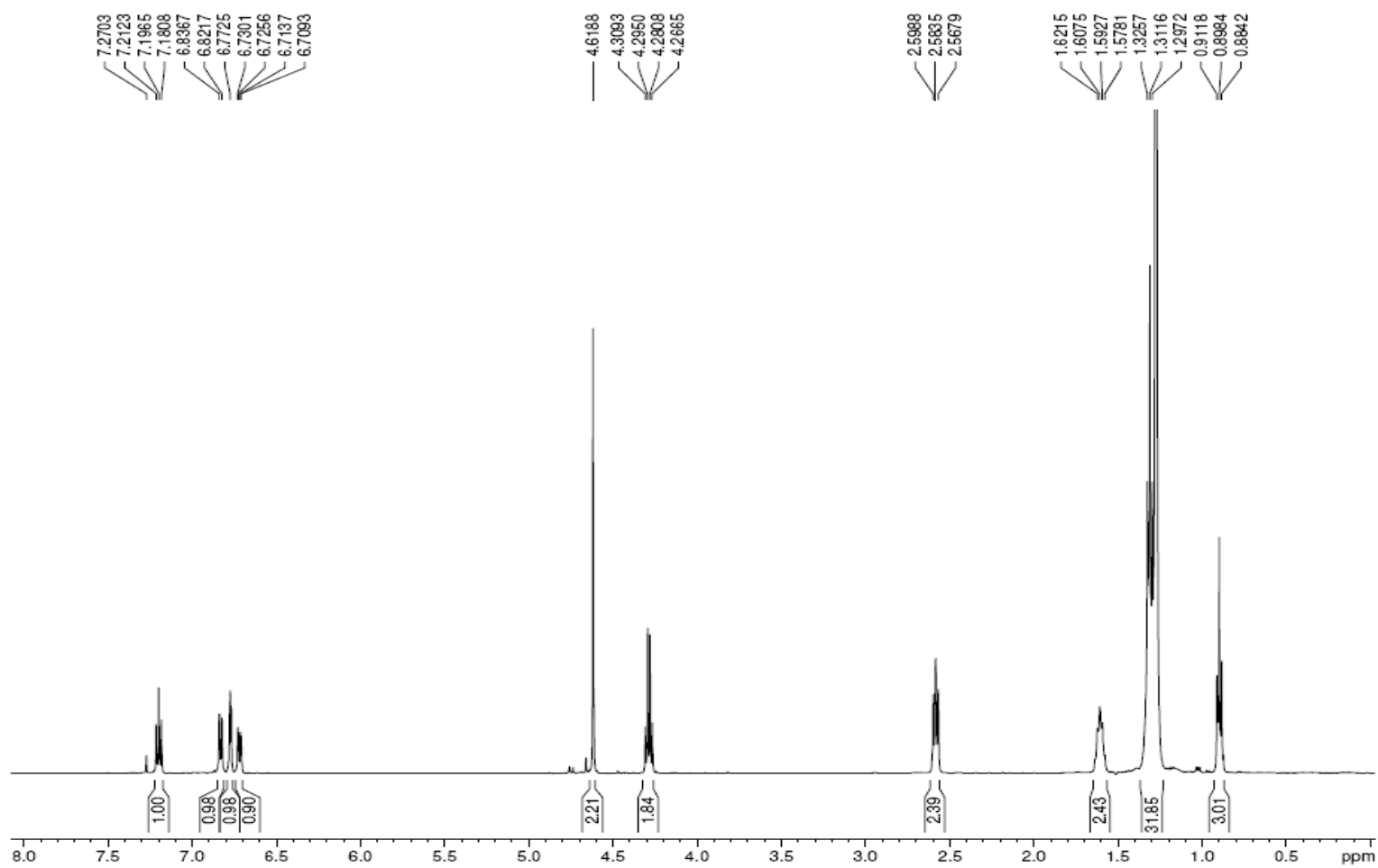
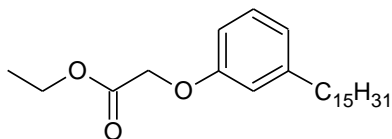
ANEXO 9 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3):
2-{3-[(8E)-pentadec-8-en-1-il]fenóxi}acetato de etila (LDT486A, **20**)



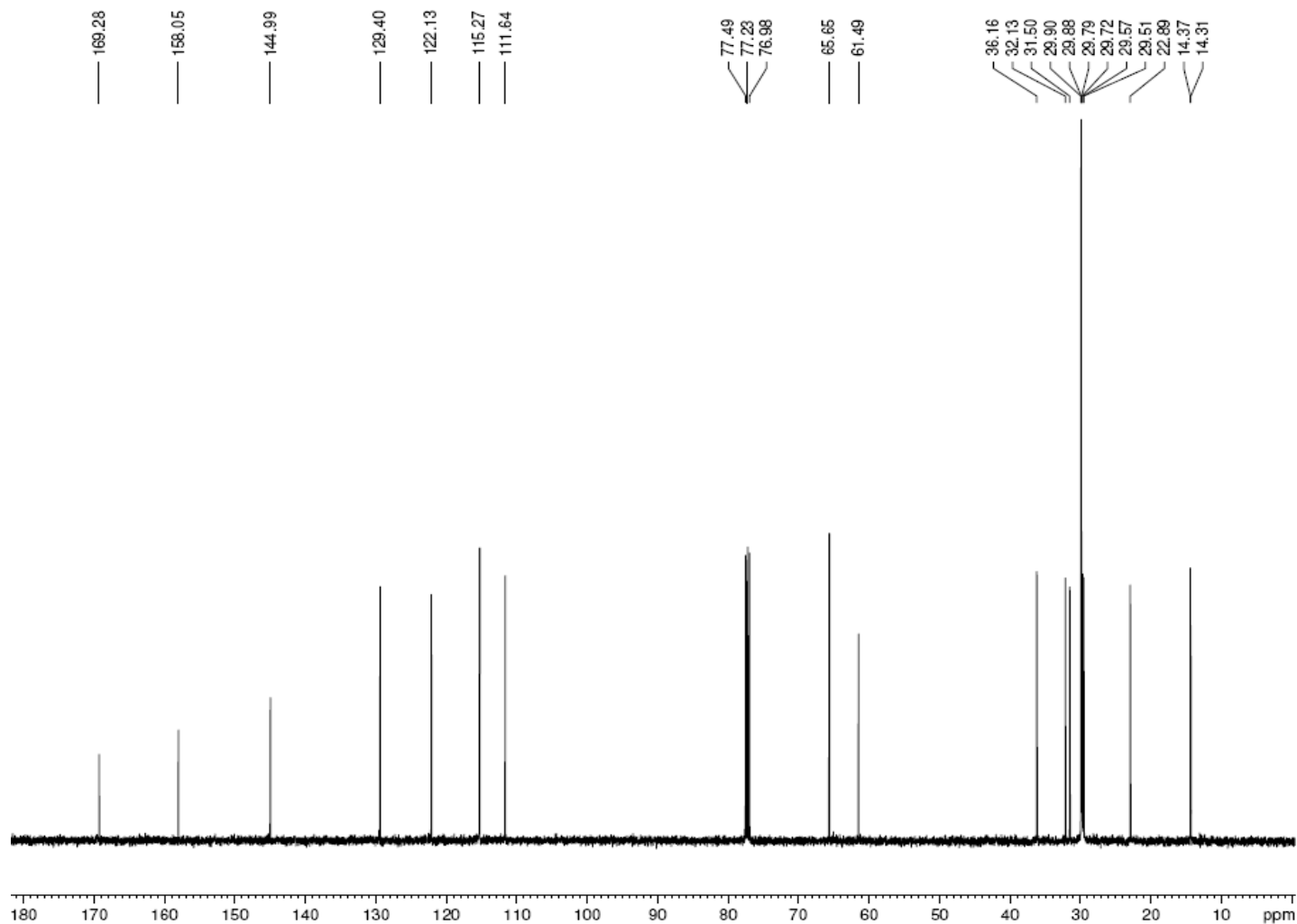
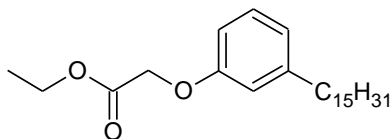
ANEXO 10 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):
2-{3-[(8E)-pentadec-8-en-1-il]fenóxi}acetato de etila (LDT486A, **20**)



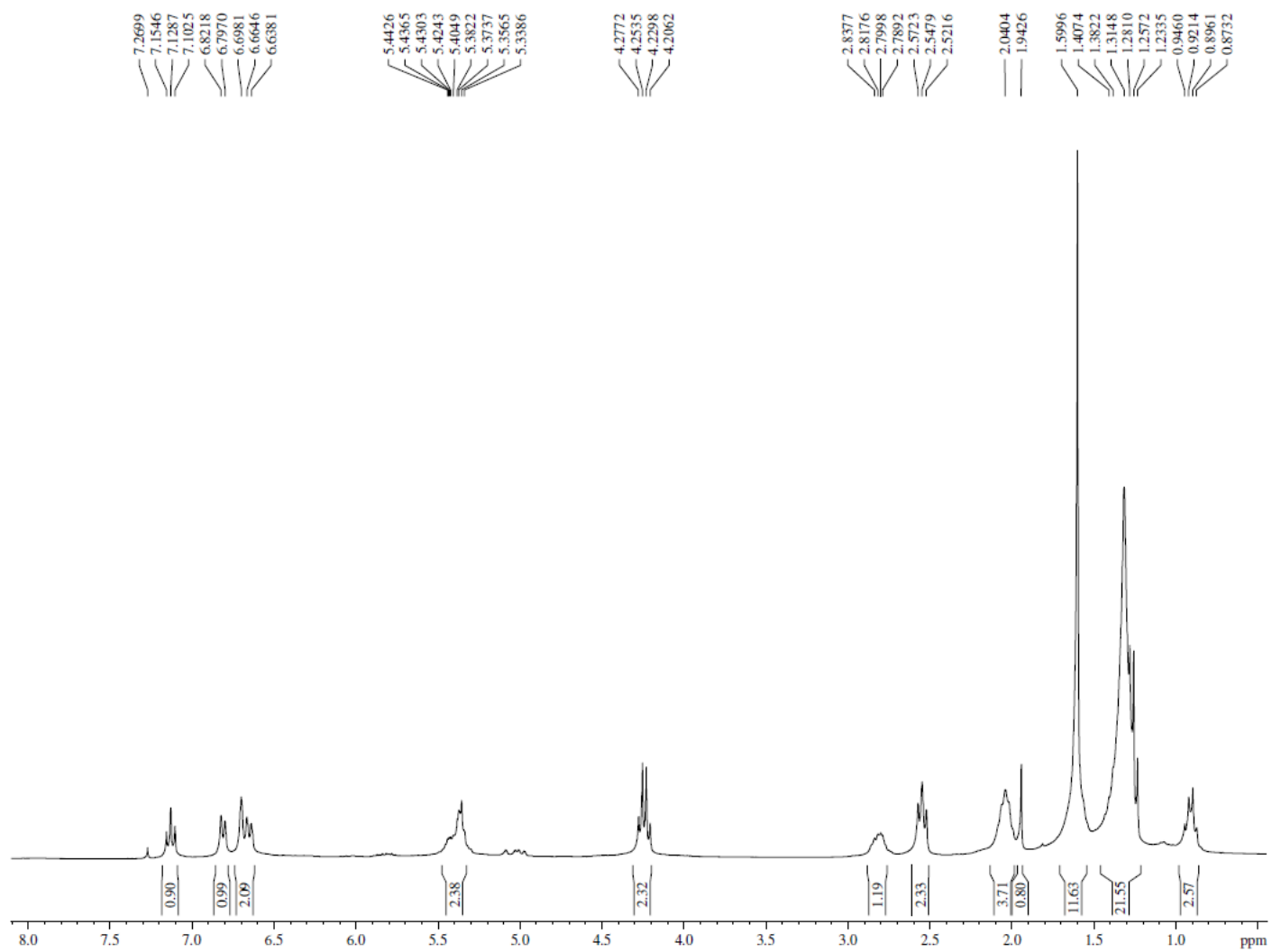
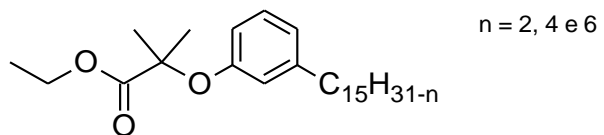
**ANEXO 11 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):
2-(3-Pentadecilfenóxi)acetato de etila (LDT15, **21**)**



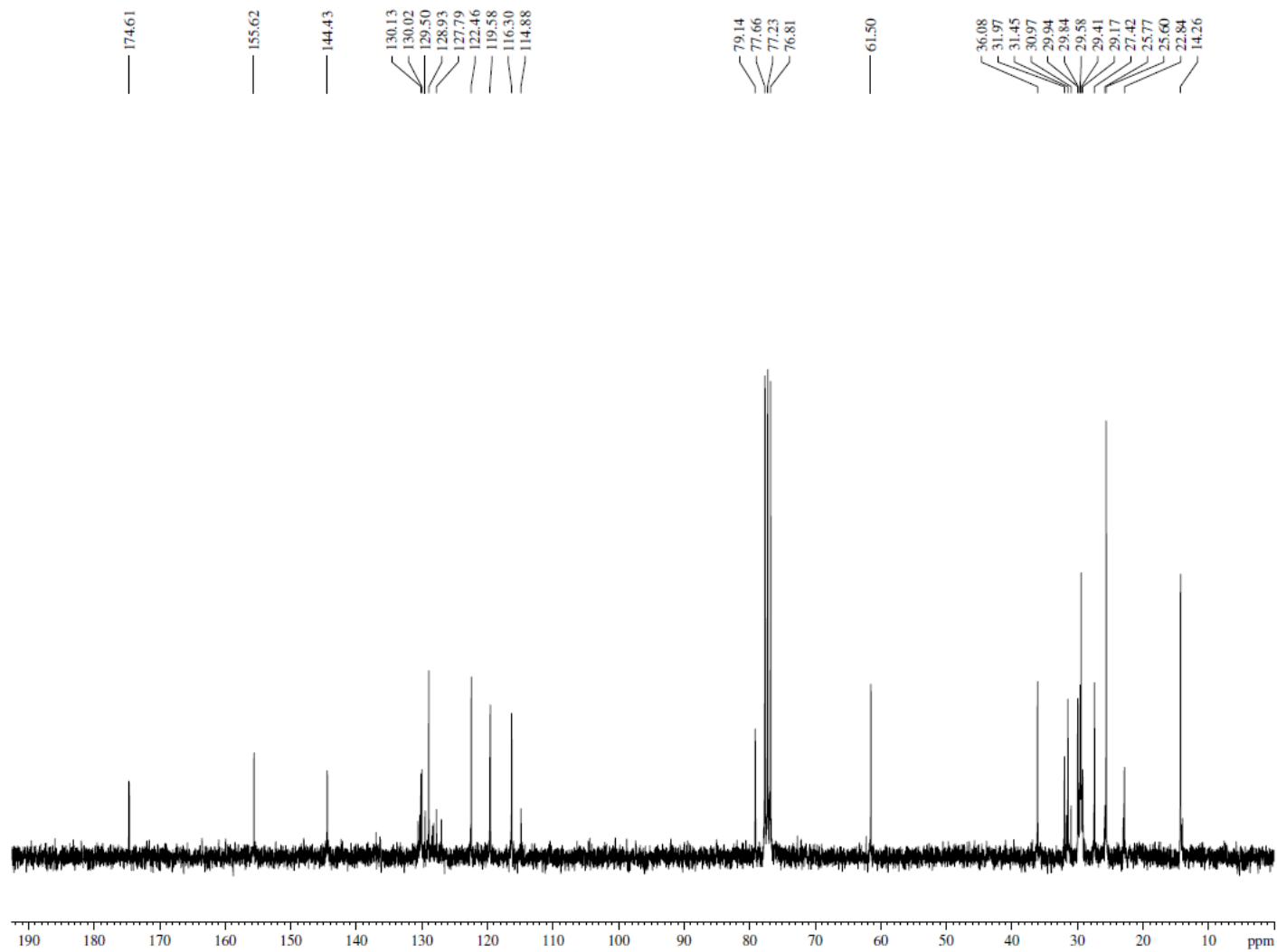
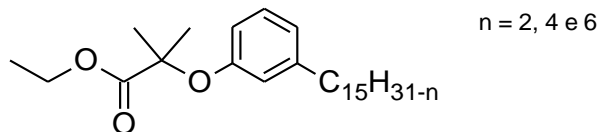
**ANEXO 12 – Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):
2-(3-Pentadecilfenóxi)acetato de etila (LDT15, **21**)**



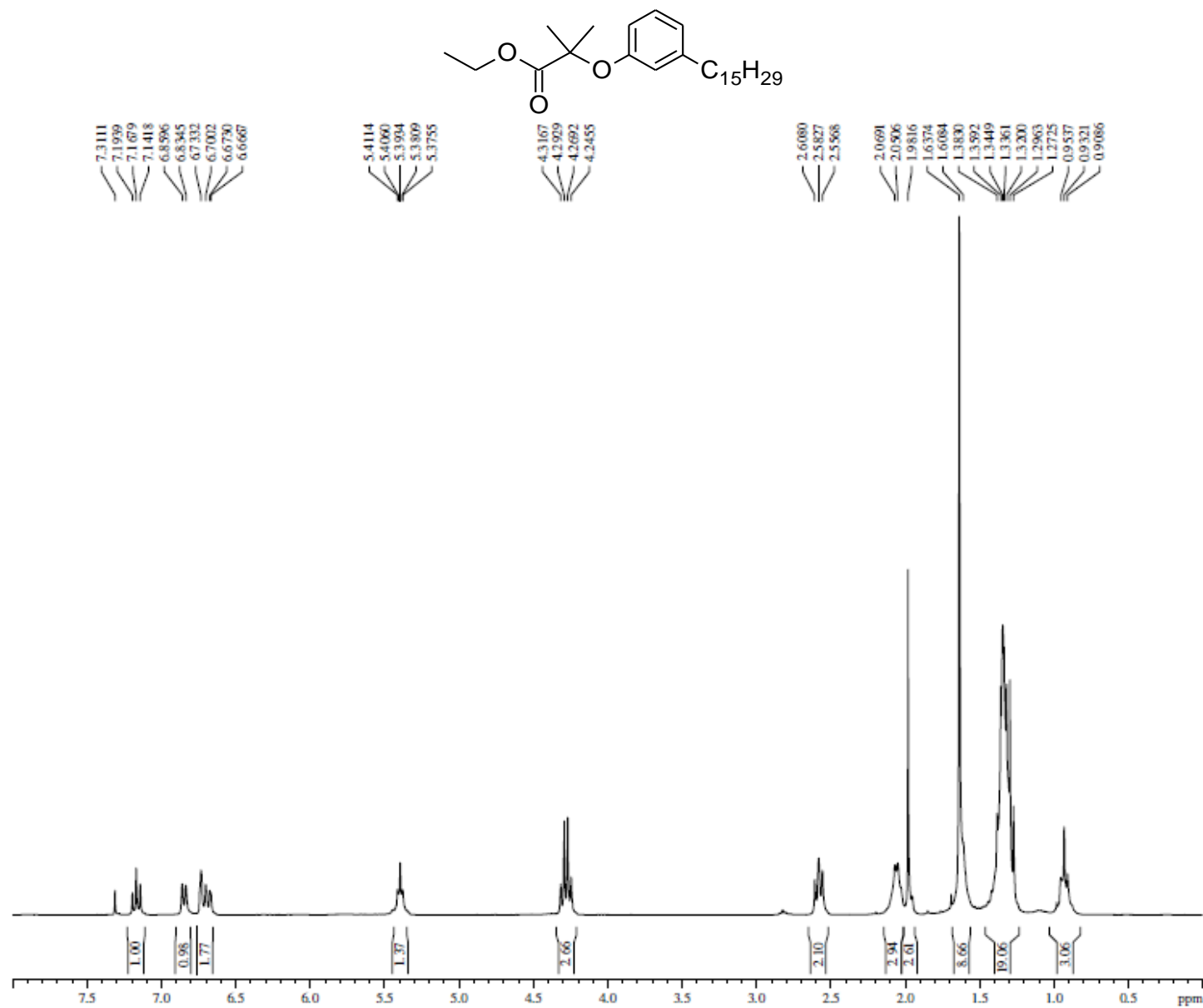
ANEXO 13 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3):
Mistura de 2-metil-2-{3-[(8E)-pentadec-8-en/8,11-dien/8,11,14-trien-1-il]fenóxi}propanoato de etila (LDT539, **22**)



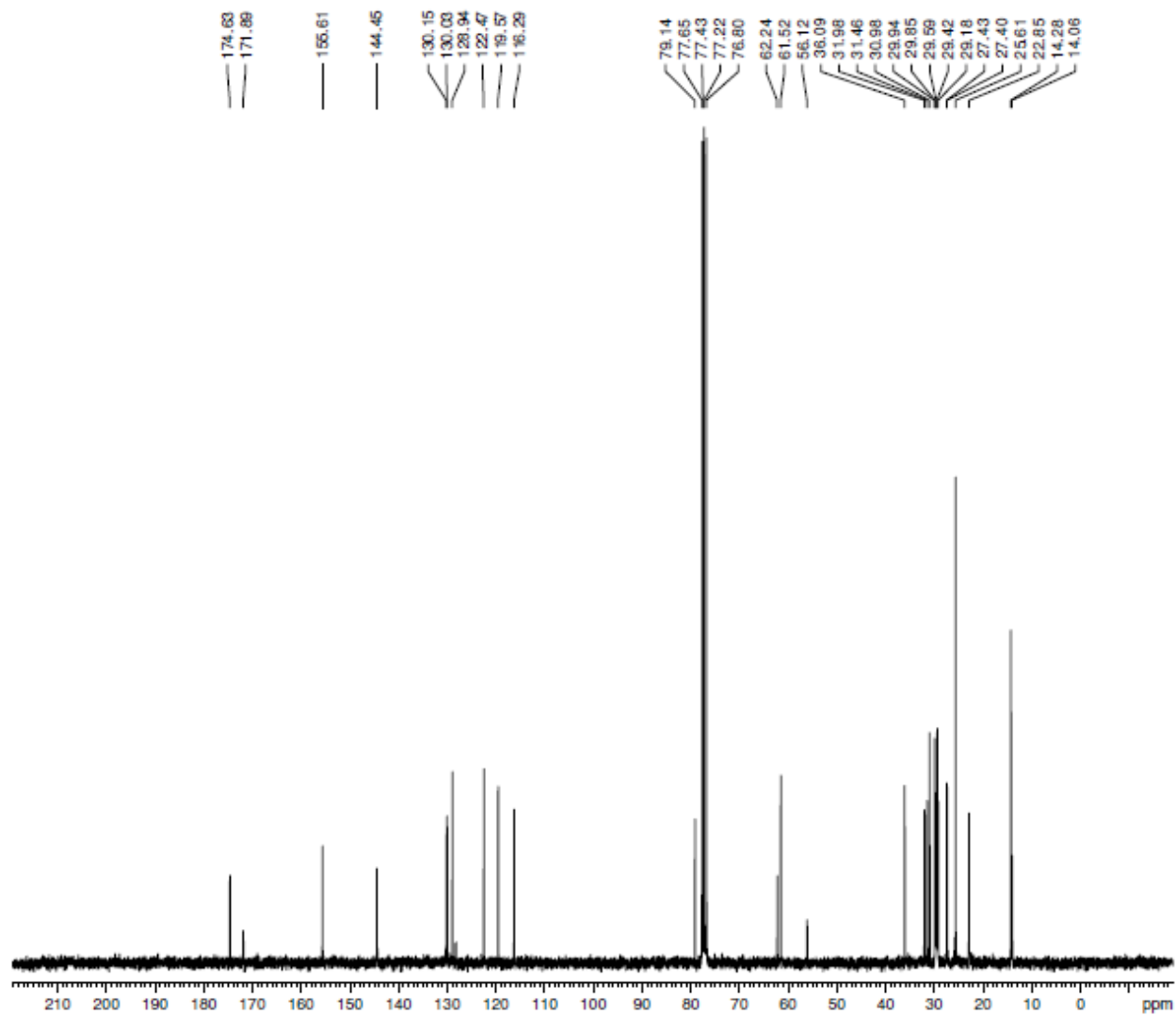
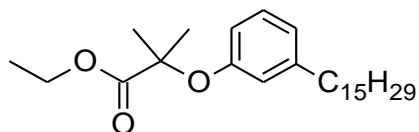
ANEXO 14 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):
Mistura de 2-metil-2-{3-[(8E)-pentadec-8-en/8,11-dien/8,11,14-trien-1-il]fenóxi}propanoato de etila (LDT539, **22**)



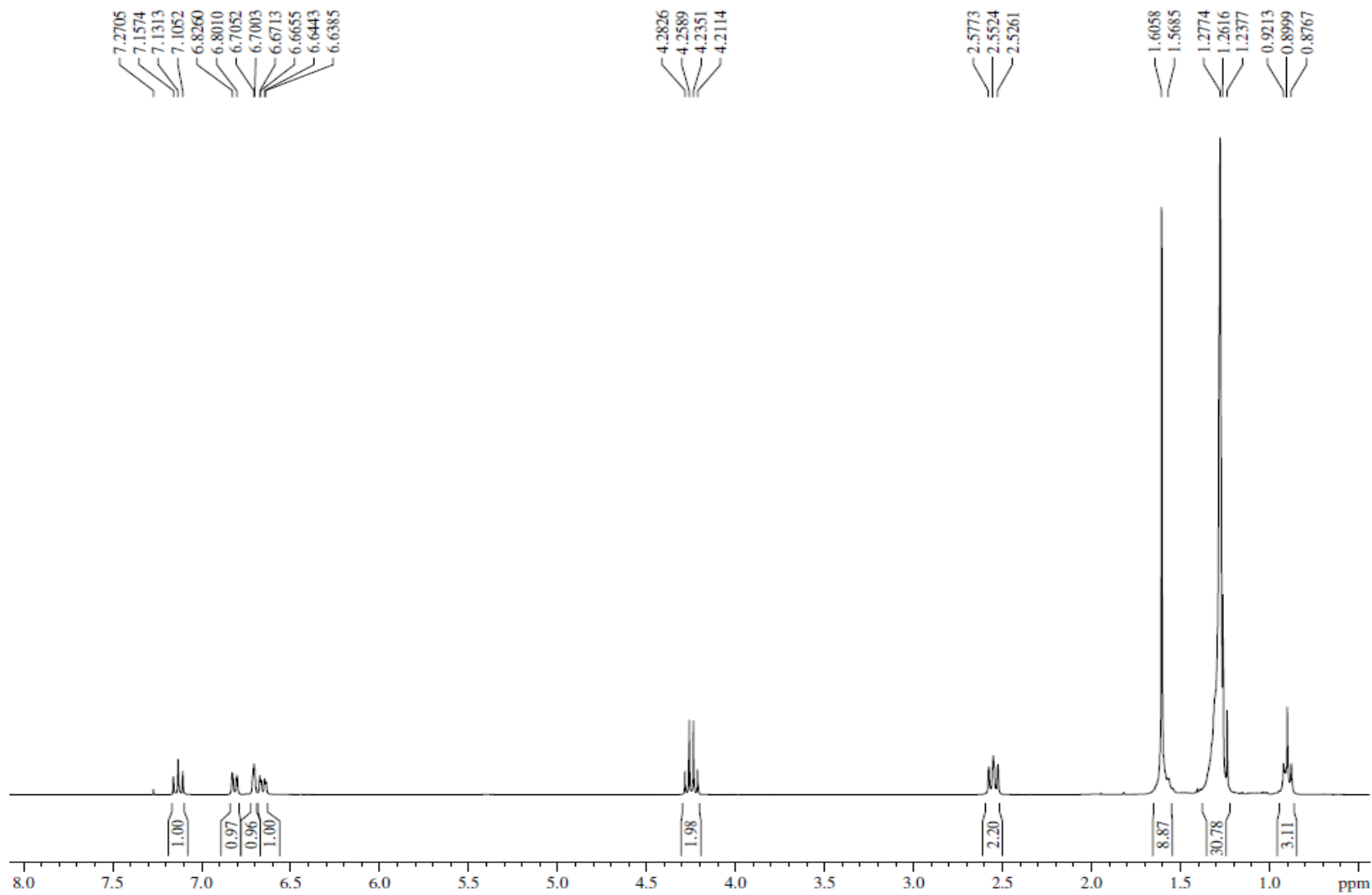
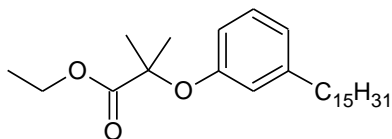
ANEXO 15 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3):
2-metil-2-(3-[(8E)-pentadec-8-en-1-il]fenóxi)propanoato de etila (LDT539A, **23**)



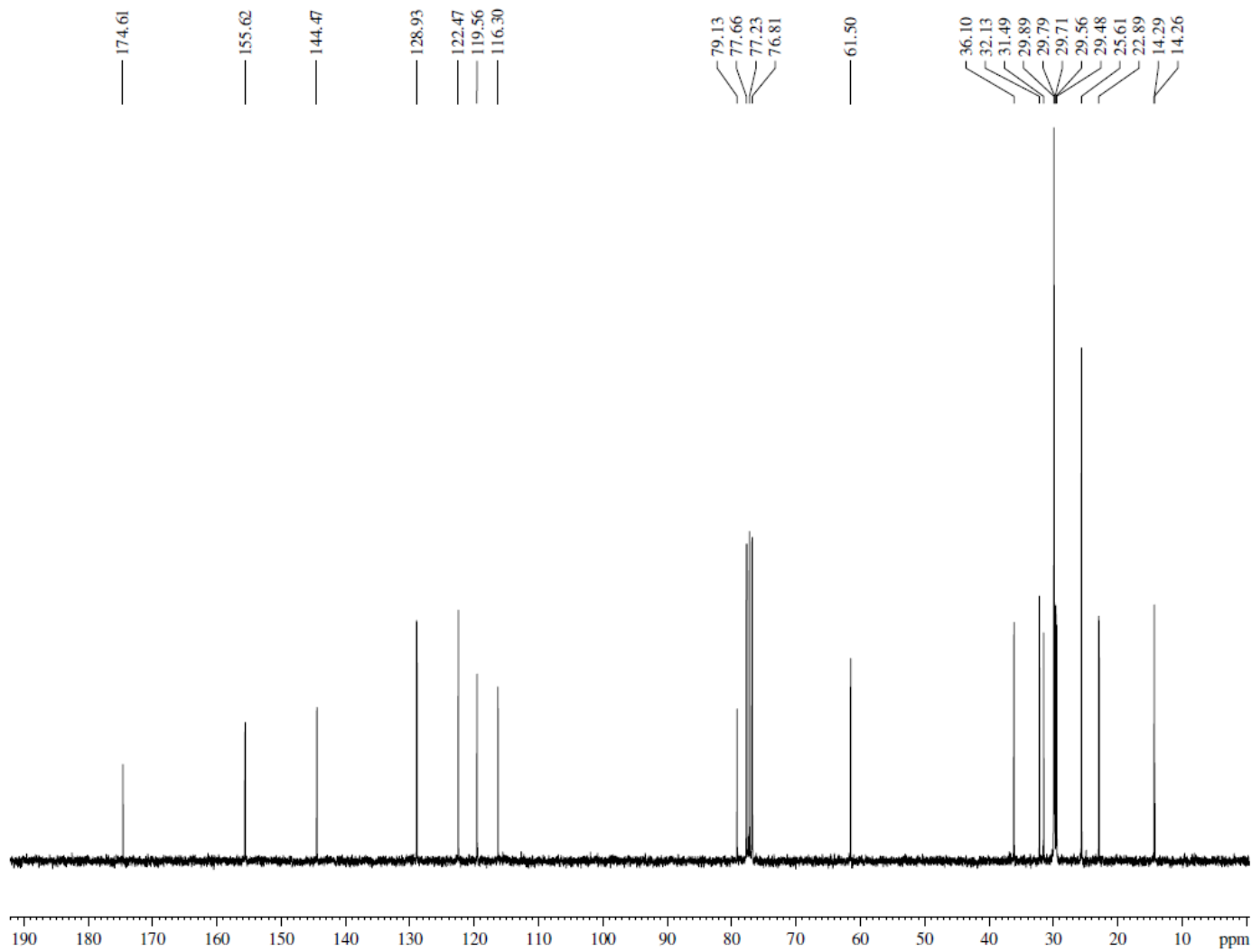
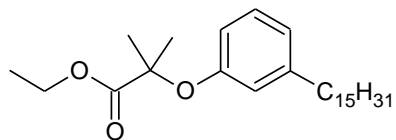
ANEXO 16 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):
2-metil-2-{3-[(8E)-pentadec-8-en-1-il]fenóxi}propanoato de etila (**LDT539A**, **23**)



**ANEXO 17 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3):
2-Metil-2-(3-Pentadecilfenóxi)Propanoato de etila (LDT408, **24**)**



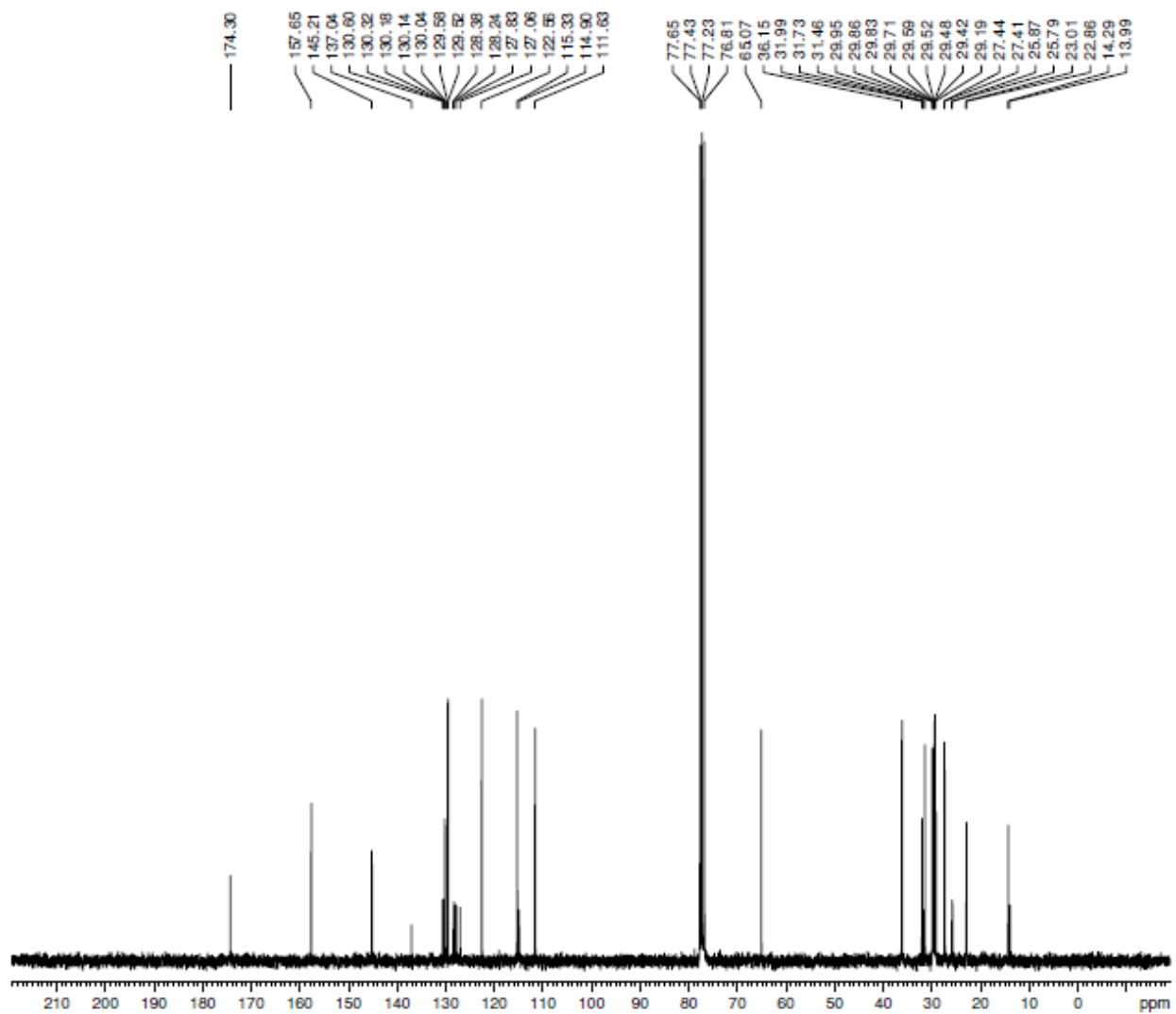
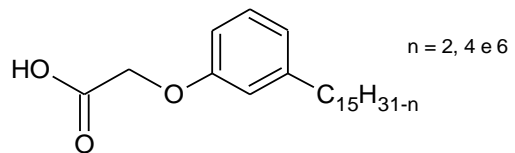
ANEXO 18 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):
2-Metil-2-(3-Pentadecilfenóxi)Propanoato de etila (LDT408, **24**)



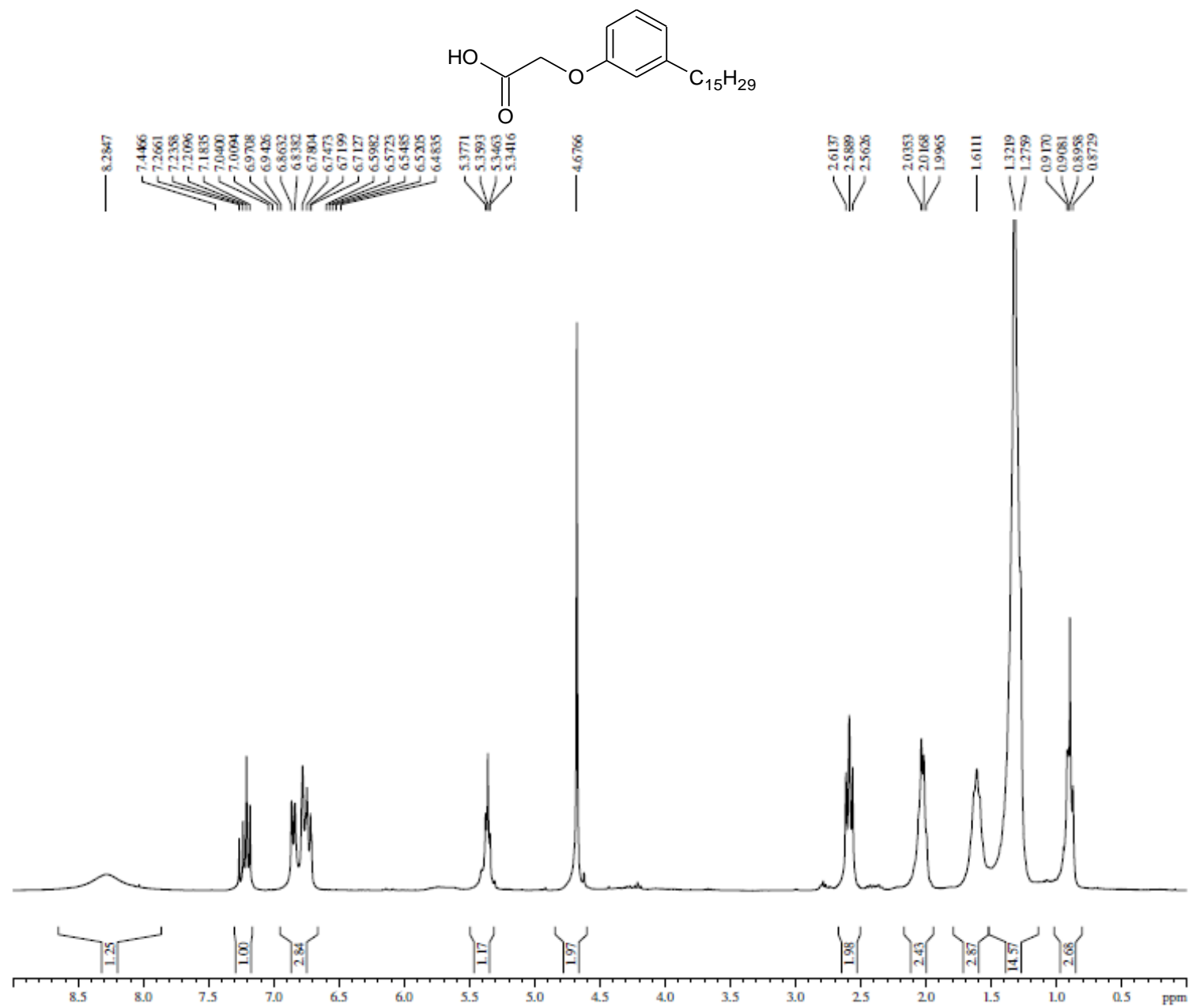
ANEXO 19 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3):
Mistura de Ácidos 2-{3-[(8E)-pentadec-8-en/8,11-dien/8,11,14-trien-1-il]fenóxi}acético (LDT487, **25**)



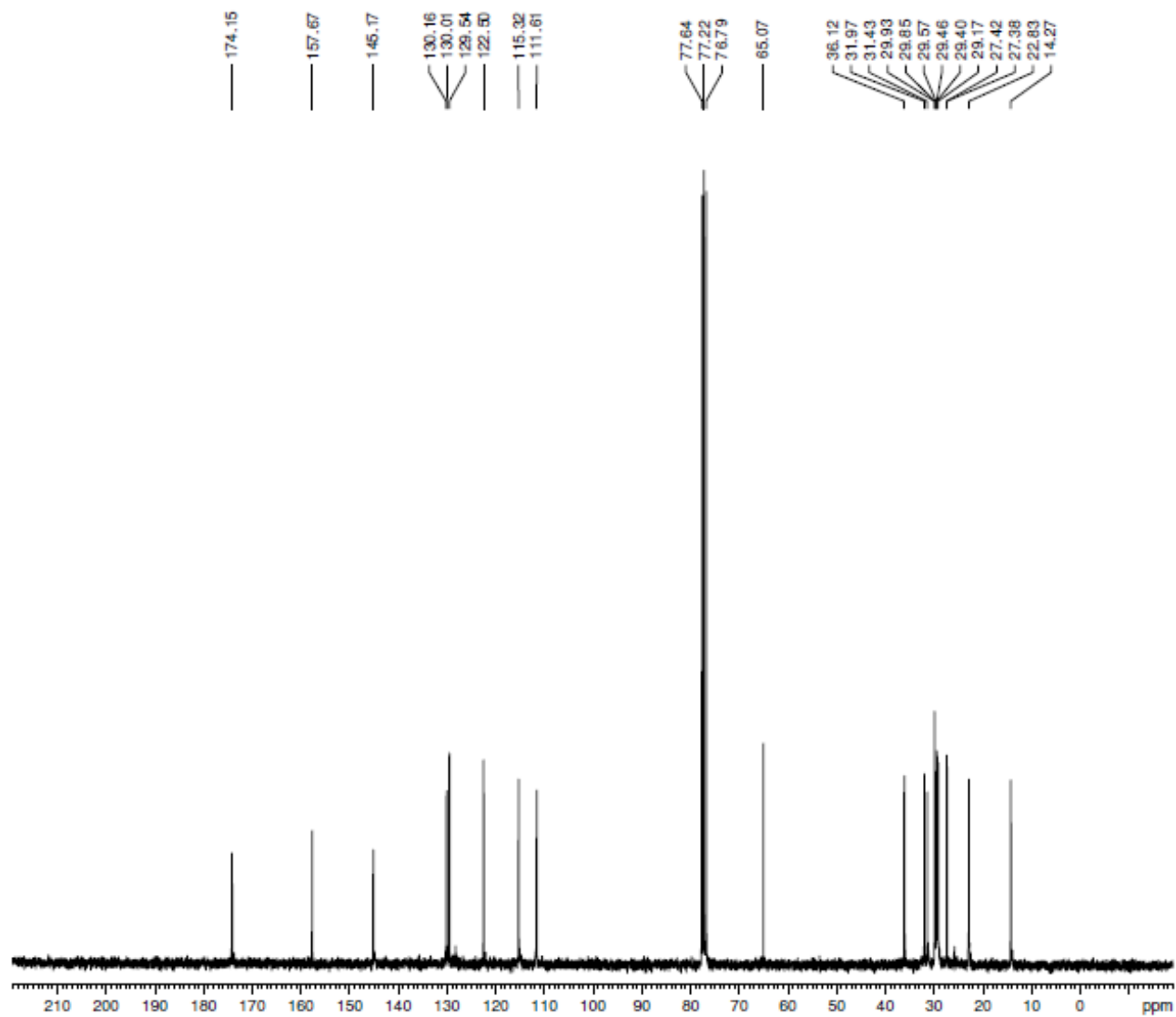
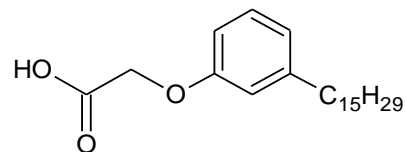
ANEXO 20 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):
Mistura de Ácidos 2-{3-[(8E)-pentadec-8-en/8,11-dien/8,11,14-trien-1-il]fenóxi}acético (LDT487, **25**)



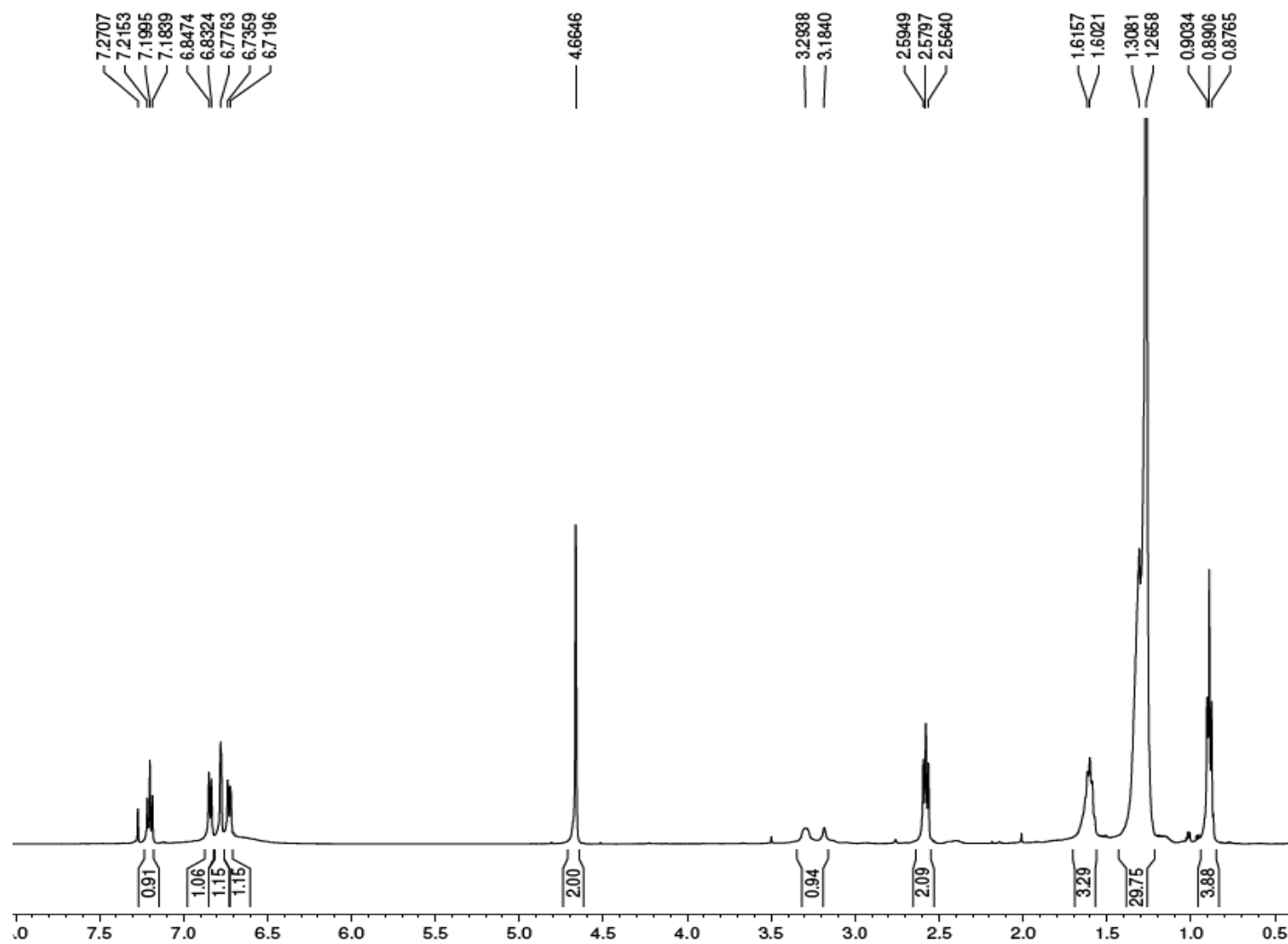
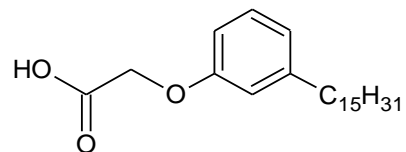
ANEXO 21 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3):
Ácido 2-{3-[(8E)-pentadec-8-en-1-il]fenóxi}acético (LDT487A, 27)



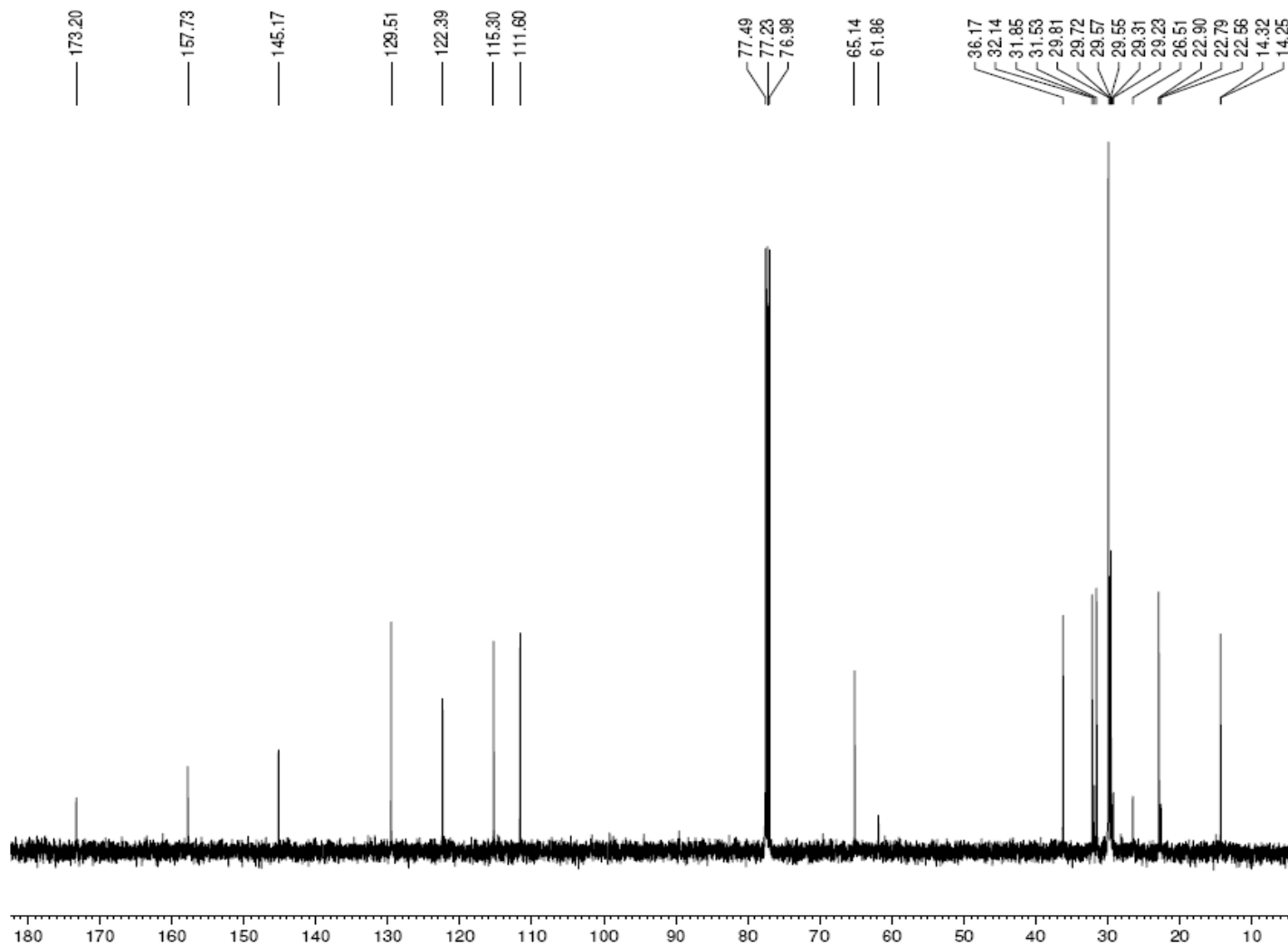
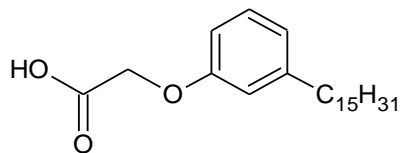
ANEXO 22 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):
Ácido 2-{3-[(8E)-pentadec-8-en-1-il]fenóxi}acético (LDT487A, **27**)



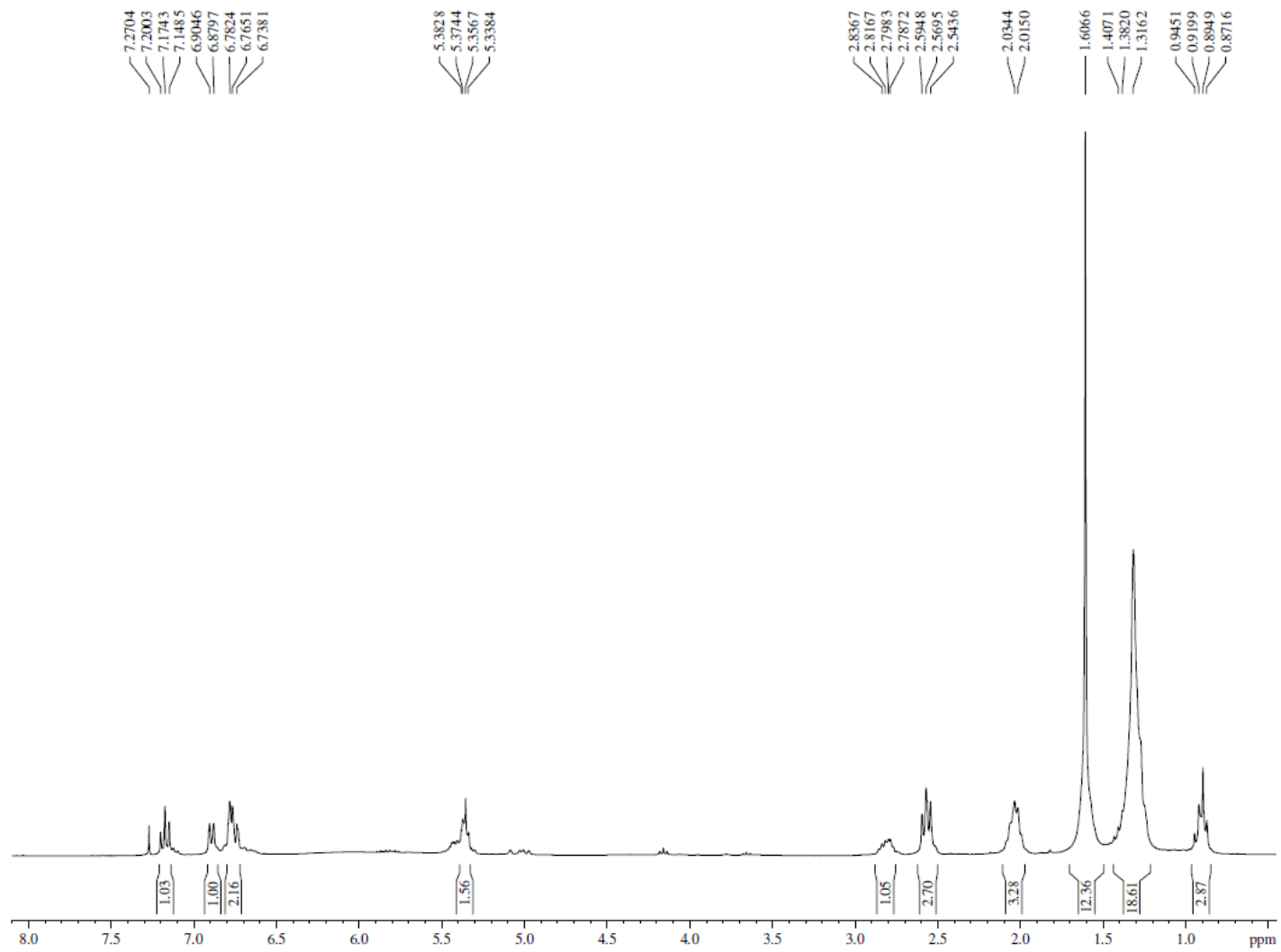
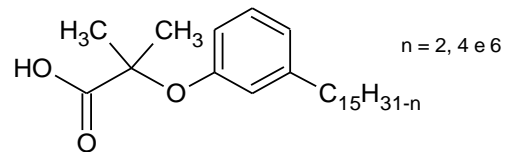
ANEXO 23 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):
Ácido 2-(3-Pentadecilfenóxi)acético (LDT16, **29**)



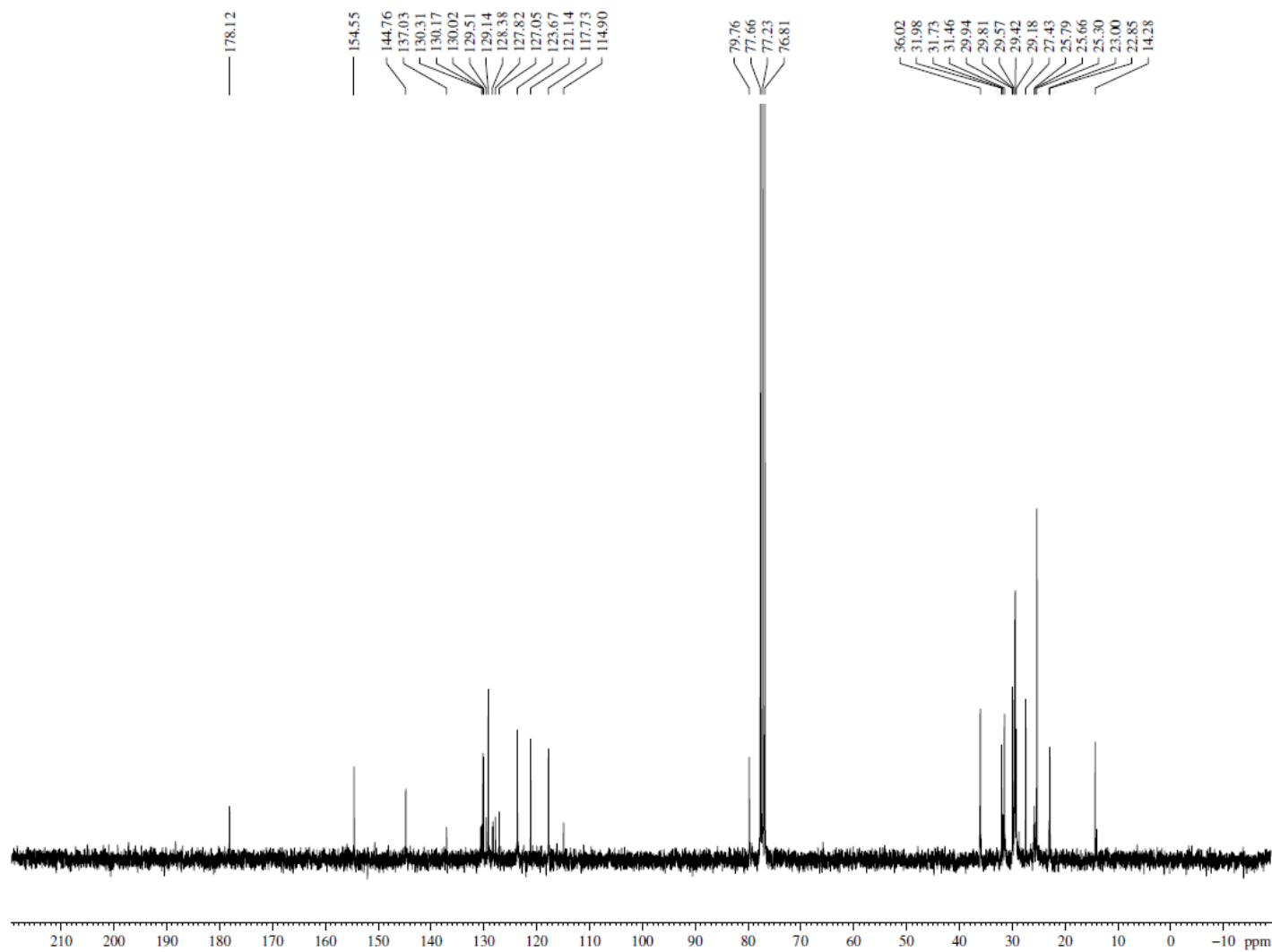
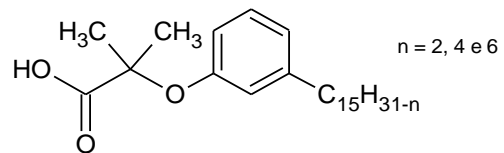
ANEXO 24 – Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):
Ácido 2-(3-Pentadecilfenóxi)acético (LDT16, **29**)



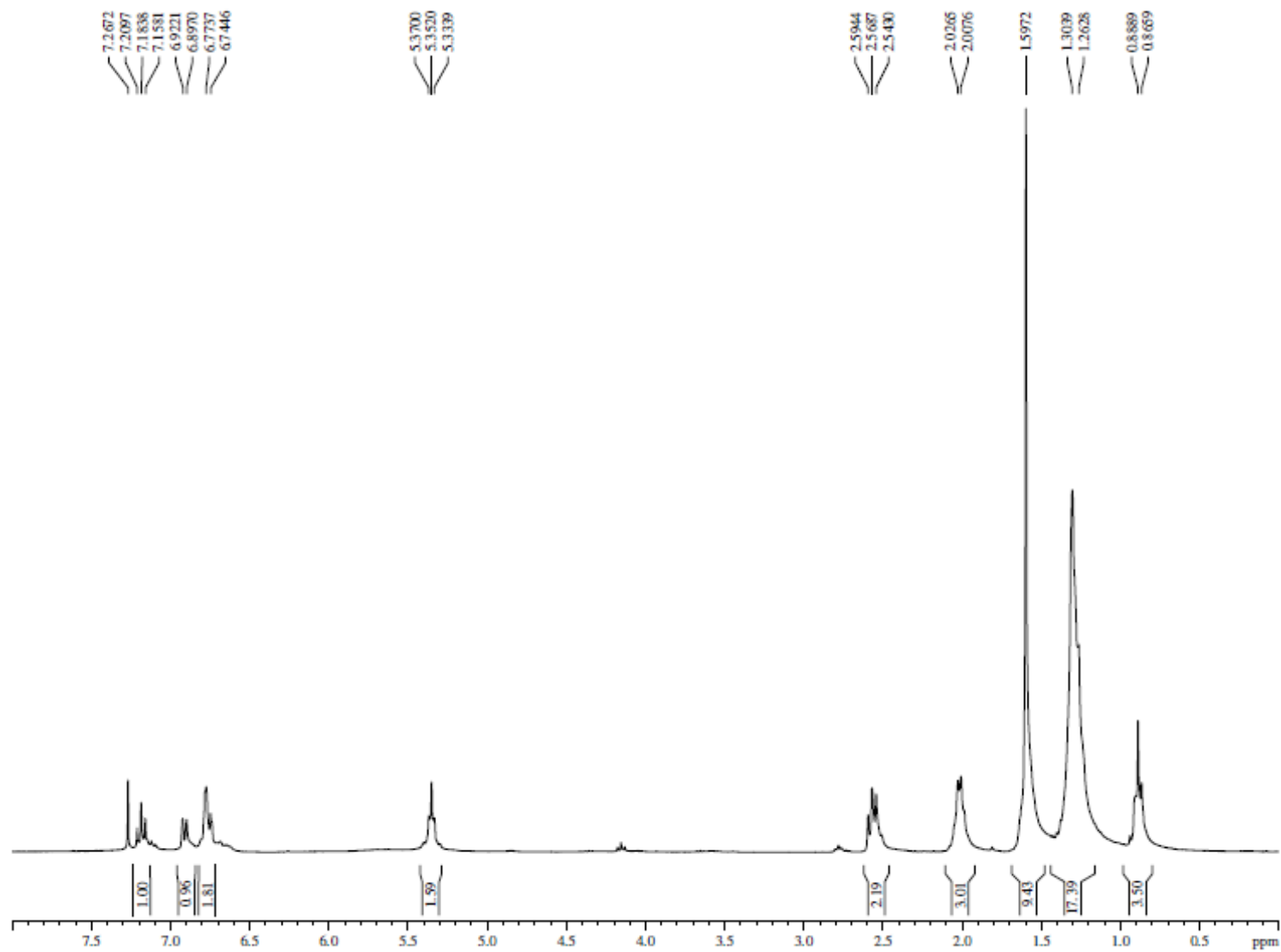
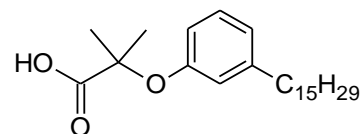
ANEXO 25 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3):
Mistura de Ácidos 2-metil-2-{3-[(8E)-pentadec-8-em/8,11-dien/8,11,14-trien-1-il]fenóxi}propanóico (LDT540, **26**)



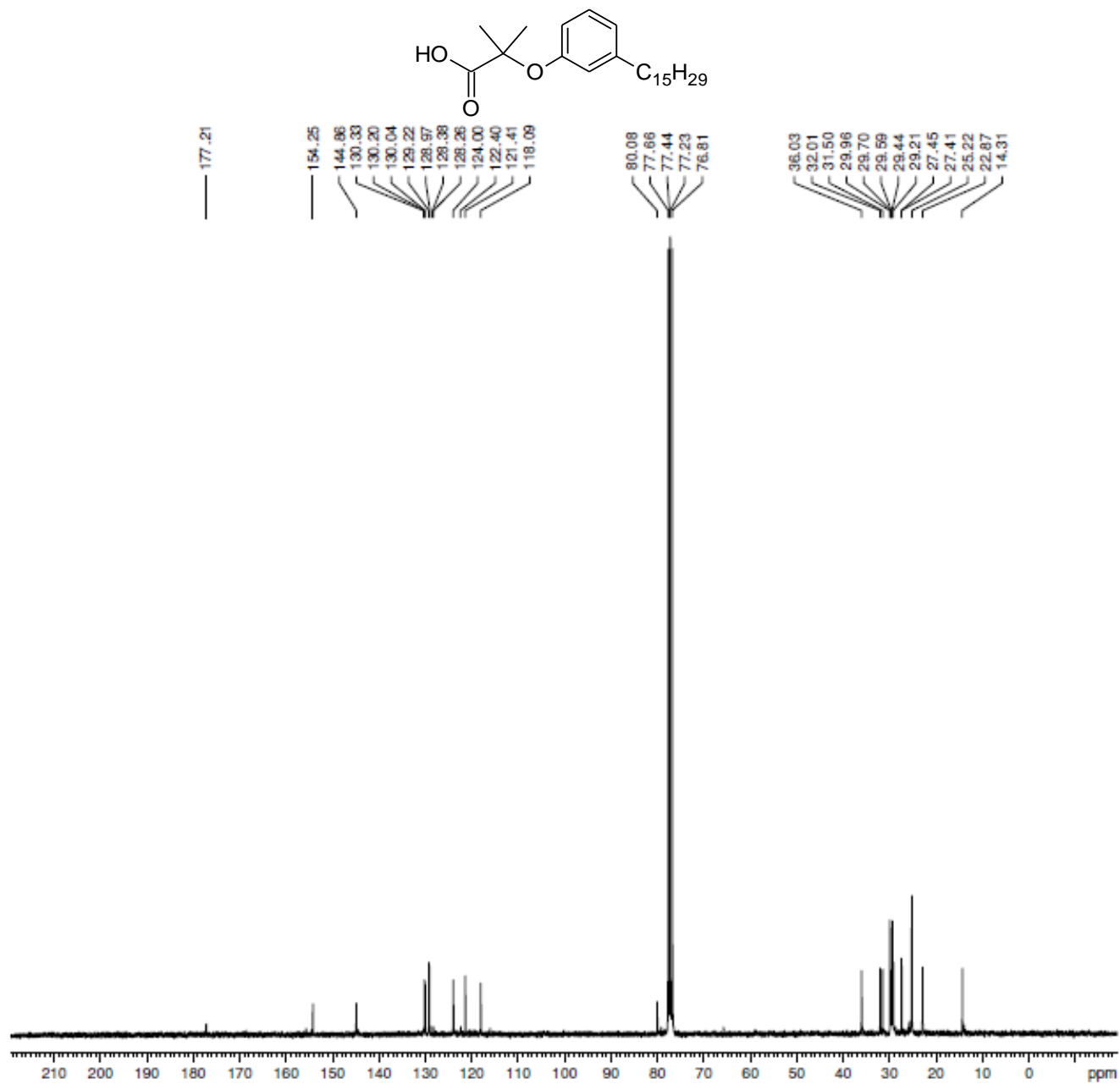
ANEXO 26 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):
Mistura de Ácidos 2-metil-2-{3-[(8E)-pentadec-8-em/8,11-dien/8,11,14-trien-1-il]fenóxi}propanóico (LDT540, **26**)



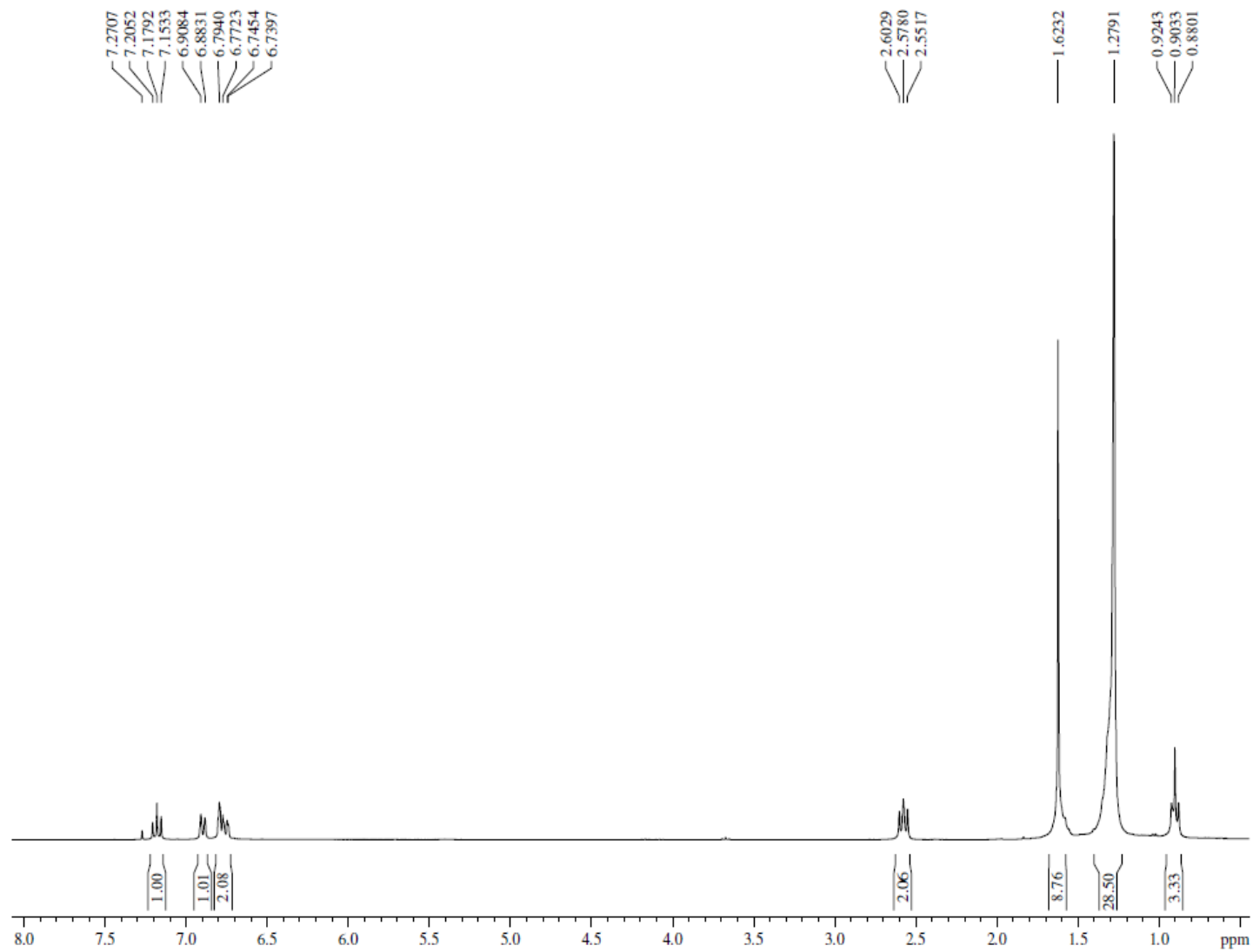
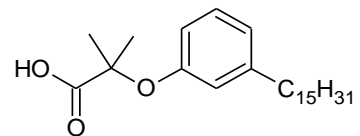
ANEXO 27 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3):
Ácido 2-metil-2-{3-[(8E)-pentadec-8-en-1-il]fenóxi}propanoico (**LDT540A**, **28**)



ANEXO 28 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):
Ácido 2-metil-2-{3-[(8E)-pentadec-8-en-1-il]fenóxi}propanóico (LDT540A, **28**)



ANEXO 29 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3):
Ácido 2-Metil-2-(3-Pentadecilfenóxi)propanóico (**LDT409**, **30**)



ANEXO 30 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):
Ácido 2-Metil-2-(3-Pentadecilfenóxi)propanóico (LDT409, **30**)

