

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

FERNANDA DE OLIVEIRA SÁ

AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR *IN VITRO* DOS DERIVADOS
LDT409 E LDT540A, PLANEJADOS A PARTIR DO CARDANOL, EM
MACRÓFAGOS J774 ESTIMULADOS COM *Plasmodium berghei* ANKA

Brasília

2019

FERNANDA DE OLIVEIRA SÁ

AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR *IN VITRO* DOS DERIVADOS LDT409 E LDT540A, PLANEJADOS A PARTIR DO CARDANOL, EM MACRÓFAGOS J774 ESTIMULADOS COM *Plasmodium berghei* ANKA

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

Orientador: Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro
Co-orientadora: Dra. Tatiana Karla S. Borges

BRASÍLIA

2019

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

da de Oliveira Sá, Fernanda
AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR IN VITRO DOS
DERIVADOS LDT409 E LDT540A, PLANEJADOS A PARTIR DO
CARDANOL, EM MACRÓFAGOS J774 ESTIMULADOS COM Plasmodium
berghei ANKA / Fernanda de Oliveira Sá; orientador Luiz
Antonio Soares Romeiro; co-orientador Tatiana Karla dos
Santos Borges. -- Brasília, 2019.
153 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências
Farmacêuticas) -- Universidade de Brasília, 2019.

1. Malária. 2. Imunomodulação. 3. NF-kB. 4. PPAR. 5.
Cardanol. I. Antonio Soares Romeiro, Luiz, orient. II.
Karla dos Santos Borges, Tatiana, co-orient. III. Título.

FERNANDA DE OLIVEIRA SÁ

AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR *IN VITRO* DOS DERIVADOS LDT409 E LDT540A, PLANEJADOS A PARTIR DO CARDANOL, EM MACRÓFAGOS J774 ESTIMULADOS COM *Plasmodium berghei* ANKA

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

Aprovado em 11/07/2019.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro

Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira

Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dra. Fabiana Brandão Alves Silva

Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dra. Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo

Universidade de Brasília – UnB

Brasília

2019

Essa dissertação é dedicada a Deus, por estar sempre ao meu lado, nos melhores momentos e também nos momentos difíceis, sendo o meu refúgio, minha fortaleza, e o socorro bem presente nas angústias e tribulações.

Perfeito saber pertence à Deus, ciência dos céus não negará aos seus (Johann Haydn).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus criador e a Cristo Senhor, por mais dois anos de estudo, não foram momentos fáceis, muitos desafios enfrentados, muitas vezes dolorosos, mas estiveram comigo e guiou os meus passos por caminhos certos, obrigada senhor pelas forças recebidas, pela realização de mais um sonho e por mais uma vitória.

Agradeço imensamente a minha família, não sei o que seria sem vocês. Ao meu esposo Jacsney Sérgio, amigo, e incentivador do meu futuro, obrigada por todo suporte e amor. Aos meus pais Neide e Raimundo por todo apoio. A minha irmã Raquel, minha grande amiga. Aos meus segundos pais, minha sogra Maria e sogro José por estar sempre ao meu lado, exemplos de vida, obrigada pelos conselhos e carinho. Obrigada tia Iracema por muitas vezes desabafar com você, muito obrigada pelas orações.

Ao meu orientador, professor Luiz Romeiro, que tão gentilmente me recebeu em seu laboratório, e me deu a oportunidade de ser membro do seu grupo de pesquisa. O meu muito obrigada por toda paciência que teve comigo, percepção das dificuldades, todo o suporte no desenvolvimento deste estudo e pelo compartilhamento do seu tão precioso conhecimento em Química Medicinal. Aprendi muito com o senhor durante esses anos, espero um dia ser tão dedicada quanto você.

Agradeço a todas as colegas do laboratório de Desenvolvimento de Inovações Terapêuticas, Andressa Oliveira, Luciana Camargo, Thaís Ferreira e em especial a professora Laís Flávia, que durante a graduação me acompanhou com toda paciência durante os trabalhos de iniciação científica, foi com você que me apaixonei pela Química Farmacêutica.

À professora Tatiana Karla sou muito grata por sua disposição, com muito carinho me recebeu no laboratório de Imunologia Celular, onde tive a oportunidade de trabalhar com a parte biológica, obrigada por ensinar a ciência de uma forma divertida. Agradeço imensamente aos amigos feitos no LIC, em especial ao Lucas Fraga, que também foi meu professor, me ensinou tudo que eu precisava para os meus experimentos, companheiro de todas as horas, obrigada pelos momentos de alegria, foi muito bom estar ao seu lado. Também agradeço aos grandes amigos André Cunha, Dra. Mayara Oliveira e Me. Danilo

Corazza por toda contribuição, foi muito bom a companhia de vocês. Agradeço também as técnicas do Laboratório, Me. Shirley Couto e Me. Mariângela Sousa, por todo suporte durante os experimentos, vocês também foram importantes na elaboração deste trabalho.

À Professora Djane Braz pelas discussões sobre a CEUA e os experimentos realizados.

Ao Prof. Dr. Edilberto Silveira e Herbert Magalhães do CENAUREM da Universidade Federal do Ceará pelos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

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

À CAPES pela bolsa de estudos. À banca examinadora, pela participação e preciosas contribuições.

Agradeço à Professora Fabiana Brandão, que gentilmente após a defesa da dissertação me ajudou na correção da análise estatística. O meu muito obrigada!

RESUMO

A malária, doença infecciosa transmitida por mosquitos infectados com protozoários do gênero *Plasmodium*, apresentou aumento no número de casos após anos de estagnação. Durante os estágios do ciclo evolutivo, principalmente no estágio sanguíneo, o parasito provoca hiperativação do sistema imunológico e contribui para evolução da malária grave, mesmo após tratamento adequado. Assim, entre as diferentes vias de sinalização intracelulares das células imunológicas envolvidas na resposta inflamatória, a do Fator Nuclear Kappa B (NF-κB), ativada por sinalização canônica e não canônica, envolve a expressão gênica de citocinas, quimiocinas, enzimas inflamatórias, corpúsculo lipídico, alterações dos níveis de proteínas NF-κB e estresse oxidativo como resposta. Descrevemos neste trabalho a síntese e a avaliação imunomodulatória dos agonistas parciais de PPARs o LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**), desenvolvidos no LADETER, em macrófagos J774 estimulados com *Plasmodium berghei* ANKA. Os derivados **17** e **18** foram sintetizados com respectivos rendimentos globais de 77 % e 69 % e caracterizados por RMN de ¹H e de ¹³C. Nossos resultados mostraram apenas a ativação da via não canônica pelo parasito (**p = 0,0062, Kruskal-Wallis), a qual foi modulada por **17** (*p = 0,0289, Kruskal-Wallis). A infecção com o parasito induziu o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (*p = 0,0372, Kruskal-Wallis), óxido nítrico (*p = 0,0109, Kruskal-Wallis), corpúsculo lipídico (**p = 0,0067, Kruskal-Wallis) e da enzima COX-2 (*p = 0,0199, Kruskal-Wallis), sendo observada a redução biológica destes mediadores pelos derivados-alvo **17** e **18**, exceto para COX-2. Os resultados sugerem que LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**) atuam como moduladores negativos das vias sinalização inflamatórias estudadas, como estratégia terapêutica na prevenção do desenvolvimento das formas graves da malária.

Palavras-chave: Malária; Imunomodulação; NF-κB; PPAR; LCC; Cardanol.

ABSTRACT

Malaria, an infectious disease transmitted by mosquitoes infected with *Plasmodium* protozoa, showed an increase in the number of cases after years of stagnation. During the stages of the evolutionary cycle, especially in the blood stage, the parasite causes overactivation of the immune system and contributes to the evolution of severe malaria, even after appropriate treatment. Thus, among the different intracellular signaling pathways of the immune cells related to the inflammatory response, the Kappa B Nuclear Factor (NF- κ B), activated by canonical and non-canonical signaling, involves the gene expression of cytokines, chemokines, inflammatory enzymes, corpuscle. Lipid levels, changes in NF- κ B protein levels, and oxidative stress in response. In this work, we described the synthesis, and immunomodulatory evaluation of partial PPAR agonists LDT409 (**17**) and LDT540A (**18**), developed in LADETER, in J774 macrophages stimulated with *Plasmodium berghei* ANKA. Derivatives 17 and 18 were synthesized with respective overall yields of 77% and 69% and characterized by ^1H and ^{13}C NMR. Our results only showed non-canonical pathway activation by the parasite (** $p = 0.0062$, Kruskal-Wallis), which was modulated by 17 (* $p = 0.0289$, Kruskal-Wallis). Infection with the parasite-induced increased levels of reactive oxygen species (* $p = 0.0372$, Kruskal-Wallis), nitric oxide (* $p = 0.0109$, Kruskal-Wallis), lipid corpuscle (** $p = 0.0067$, Kruskal-Wallis) and the enzyme COX-2 (* $p = 0.0199$, Kruskal-Wallis), with a biological reduction of these mediators by target derivatives **17** and **18**, except for COX-2. The results suggest that LDT409 (**17**) and LDT540A (**18**) act as negative modulators of the inflammatory signaling pathways studied, as a therapeutic strategy to prevent the development of severe forms of malaria.

Keywords: Malaria; Immunomodulation; NF- κ B; PPAR; LCC; Cardanol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Áreas com ocorrência de malária no mundo de 2000 a 2016	22
Figura 2:	Áreas Brasileiras com ocorrência de malária	23
Figura 3:	Ciclo evolutivo do <i>Plasmodium</i> spp	26
Figura 4:	Mecanismos imunológicos na infecção por malária	29
Figura 5:	Sinalização NF-KB. Via Canônica e não Canônica	34
Figura 6:	Estrutura primária e terciária dos receptores nucleares, apresentando as regiões amino (N) e carbóxi terminais (C), domínio de ligação ao DNA (DBD) e ao ligante (LBD)	38
Figura 7:	Mecanismo de ativação de PPAR por ligantes	39
Figura 8:	Classes de fármacos antimaláricos	40
Figura 9:	Derivados do cajueiro	42
Figura 10:	Principais componentes do LCC e diferentes graus de instauração da cadeia lateral	42
Figura 11:	Sítios de modificação na estrutura do cardanol monoinsaturado (12A)	43
Figura 12:	Estrutura de Markush e legendas empregadas nos assinalamentos de sinais em espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C	54
Figura 13:	Espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C do LDT10A (12S)	71
Figura 14:	Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C do derivado LDT10A (12A)	73
Figura 15:	Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C dos intermediários LDT408 (15) e LDT539A (16)	75
Figura 16:	Espectros de RMN de ^{13}C do LDT409 (17) e LDT540A (18)	76

Figura 17:	Efeito na viabilidade das células J774 após 24 horas de incubação com LDT409 (17), na presença de 10 μ L de solução MTT (5 mg/mL)	80
Figura 18:	Efeito na viabilidade das células J774 após 24 horas de incubação com LDT540A (20), na presença de 10 μ L de solução MTT (5 mg/mL)	80
Figura 19:	Média de Intensidade de Fluorescência celular de RelA	81
Figura 20:	Média de Intensidade de Fluorescência celular de RelB em células J774	83
Figura 21:	Média de Intensidade de Fluorescência celular de EROS em células J774	85
Figura 22:	Absorbância do óxido nítrico do sobrenadante de macrófagos J774	86
Figura 23:	Média de Intensidade de Fluorescência de corpos lipídicos (CL) em células J774	87/88
Figura 24:	Média de Intensidade de Fluorescência celular de COX-2 em células J774	89

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Fluxograma do delineamento experimental	49
Esquema 2:	Planejamento sintético dos derivados-alvo LDT409 e LDT540A	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Estímulos celulares e respectivos receptores	33
Tabela 2:	Composição percentual dos componentes lipídicos e insaturações no LCC natural	43
Tabela 3:	Anticorpos primários e secundários conforme antígenos	64
Tabela 4:	Anticorpos primários e secundários conforme antígenos	68
Tabela 5:	Propriedades físico-químicas dos intermediários e produtos finais	77
Tabela 6:	Principais deslocamentos químicos de RMN (ppm, CDCl ³) da série saturada	77
Tabela 7:	Principais deslocamentos químicos de RMN (ppm, CDCl ³) da série insaturada	78
Tabela 8:	Resumo dos resultados de avaliação biológica	89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Espécies de <i>Plasmodium</i> responsáveis pela infecção em humanos e as principais complicações da doença	25
------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AF-1: Função de Ativação 1
AF-1: Função de Ativação 2
ANKA: cepa de *P. berhei* isolado na região Antuérpia e Kasapa (Congo).
Arg-1: Arginase 1
BSA: Albumina Sérica Bovina
CD31: Grupamento de Diferenciação 31
CD36: Grupamento de Diferenciação 36
CD40: Grupamento de Diferenciação 40
CD81: Grupamento de Diferenciação 81
CD40R: Receptor de CD40
CED: Célula Endotelial
cIAP: Proteína Celular Inibidora da Apoptose
CL: Corpúsculo Lipídico
COX-2: Ciclooxygenase 2
CPS: Proteínas Circunsporozoítica
D: dubleto
Dd: duplo dupleto
DAT: Domínio de Ativação de Transcrição
DBD: DNA *Bindind* Domínio
DC: Célula Dendrídica
DCM: Diclorometano
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DHR: Domínio de Homologia Rel
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
E-Selectina: Selectina de Célula Endotelial
ERN: Espécie Reativa de Nitrogênio
FADD: Proteína Contendo Domínio de Morte Associado ao FAS
GPI: glucofosfatidilinositol
HAT: Histona Acetiltransferase
HDAC: Histona Desacetilase
HR: Homóloga de reticulócito

IKK: Cinase Inibidora de Cinase kB
ICAM-1: Molécula de Adesão Intercelular 1
IL: Interleucina (subtipos: IL-6, IL-12, IL-1 β , IL-8, IL-10)
IL-1R: Receptor de IL-1
IFN: Interferons (subtipos: α , β e γ)
I κ B: Inibidora dos Fatores Nucleares NF κ B
IV: Infravermelho
J: Constante de acoplamento
LBD: *Ligand Binding Domain*
LCC: Líquido da Casca da Castanha de Cajú
LDT: Laboratório de Desenvolvimento de Inovações Terapêuticas
LOX-5: Lipooxigenase 5
LPS: lipopolissacarídeo
LT: linfócito T
LTR: receptor de linfotoxina
MC: Malária Cerebral
MCP-1: Proteína Químioatraente de Monócito 1
MeCN: Acetonitrila
MHC I: Complexo de histocompatibilidade maior I
MHC II: Complexo de histocompatibilidade maior II
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio
m: Multiplete
 μ M: Micromolar
mg: Miligramas
MHz: Megahertz
 μ L: Microlitros
NEMO: Modulador Essencial de NF κ B
NF- κ B: Fator Nuclear kB
NIK: Kinase indutora do NF κ B
NKT: Natural Killer T
NO: Óxido Nítrico
OMS: Organização Mundial da Saúde
OPAS: Organização Pan-Americana da Saúde
PAMP: Padrão Molecular Associado ao Patógeno

PfEMP-1: Proteína de Membrana Eritrocítica
PPAR: Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomais [Subtipos (α -alfa, β/δ - beta/delta, γ -gama)].
RelA: Fator Nuclear do NFkB p65
RelB: Fator Nuclear do NFkB p65
RF: Fator de Retenção
RIP: Proteína Indutora de Ácido Retinóico 1
RXR: Receptor Retinóide X
RMN de ^{13}C : Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ^1H : Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RNA: Ácido Ribonucleico
RNAm: Ácido Ribonucleico Mensageiro
ROS: Espécies Reativas de Oxigênio
S: Simpleto
SH: Heparan Sulfato
sl: Sinal largo
STF: Solução Salina Tamponada com Fosfato
t.a: Temperatura Ambiente
TCD4: Linfócito T CD4 (Auxiliar)
TCD8: Linfócito T CD8 (Citotóxico)
TCR: Receptor de Célula T
Th: célula T helper
Th1: célula T helper 1
TLR: Receptor do tipo Toll like
TMS: Tetrametilsilano
TNF: Fator de Necrose Tumoral (Subtipos α e γ)
TNFR: receptor de TNF
TRADD: Proteína com Domínio de Morte Associado ao Receptor TNF
TRAFs: Fatores Associados aos Receptores de TNF
TRAP: Proteína Adesiva Relacionada com Trombospondina
t: tripleto
UV: Ultravioleta
VCAM-1: Molécula Celular de Adesão Vascular 1
WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
1. Introdução	21
1.1 Apresentação da Doença	21
1.2 Dados Epidemiológicos	22
1.3 Espécies Parasitárias	24
1.4 Ciclo Biológico do Parasito	26
1.5 Manifestações Clínicas	28
1.6 Processo Imunopatológico na Malária	28
1.7 Malária Grave	31
1.8 Vias de Sinalização Intracelulares	32
1.8.1 Fator Nuclear Kappa B	32
1.8.2 Espécies Reativas de Oxigênio	35
1.8.3 Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomais	37
1.9 Tratamento	39
1.10 Líquido da Casca da Castanha de Caju (LCC)	41
OBJETIVOS	45
2. Objetivos	46
2.1 Objetivo Geral	46
2.1.1 Objetivos Específicos	46
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	47
3. Delineamento Experimental	48
ESTRATÉGIA SINTÉTICA	50
4. Estratégia Sintética	51
PARTE EXPERIMENTAL	52

5. Parte Experimental	53
5.1 Metodologia Sintética e Caracterização dos Compostos	53
5.1.1 Obtenção do Derivado 3-Pentadecil (LDT10, 12S)	54
5.1.2 Obtenção do Derivado Z-3-(Pentadec-8-enil)fenol (LDT10A, 12A)	55
5.1.3 Obtenção dos α,α -Dimetilésteres LDT408 (15) e LDT539A (16)	56
5.1.4 Obtenção dos Derivados β -oxoácidos (LDT409, 17) e (LDT540A, 18)	58
5.2 Avaliação Biológica	59
5.2.1 Inóculo	60
5.2.2 Hemácias Parasitadas com <i>Plasmodium berghei</i> e não parasitadas utilizadas como estímulo	60
5.2.3 Cultivo de Macrófagos J774	61
5.2.4 Avaliação da Citotoxicidade por ensaio de MTT	61
5.2.5 Avaliação da Concentração de Proteínas da Via Fator Nuclear Kappa B (NF-kB)	62
5.2.6 Avaliação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)	64
5.2.7 Avaliação da Produção de Óxido Nítrico	65
5.2.8 Avaliação da Produção de Corpúsculo Lipídico	66
5.2.9 Quantificação da expressão da enzima ciclooxigenase 2 (COX2)	67
5.2.10 Análise Estatística	68
RESULTADOS	69
6.1 Síntese e Caracterização dos Compostos	70
6.1.1 Obtenção do Cardanol Saturado (LDT 10, 12S)	70

6.1.2 Obtenção do Cardanol monoinsaturado (LDT 10A, 16)	72
6.1.3 Obtenção dos derivados beta-oxiésteres LDT 408 (15) e LDT539A (16)	74
6.1.4 Obtenção dos derivados beta-oxiésteres LDT 409 (17) e LDT540A (18)	76
6.2 Avaliação Biológica	79
6.2.1 Avaliação dos compostos na citotoxicidade do LDT409 e LDT540A em macrófagos J774	79
6.2.2 Quantificação da Proteína RelA (p65)	81
6.2.3 Quantificação da Proteína RelB (p68)	82
6.2.4 Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)	84
6.2.5 Quantificação de Óxido Nítrico (NO)	85
6.2.6 Quantificação dos níveis de Corpúsculos Lipídicos (CL)	87
6.2.7 Quantificação da enzima ciclooxygenase 2 (COX-2)	88
DISCUSSÃO	90
7. Discussão	91
7.1 Limitações	98
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	100
8. Conclusão e Perspectivas	101
8.1 Conclusão	101
8.2 Perspectivas	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
9. Referências Bibliográficas	105
Anexos	116

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO DA DOENÇA

A malária – considerada uma emergência vinculada principalmente a países subdesenvolvidos e de clima tropical. A malária humana, possivelmente a mais grave doença infecciosa, é transmitida pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* infectadas por protozoários unicelulares do gênero *Plasmodium* em suas glândulas salivares. No Brasil a doença está associada principalmente às espécies *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* (SHOFIELD; GRAU, 2005; FIOCRUZ, 2017).

As manifestações clínicas da doença estão diretamente relacionadas com o ciclo biológico do parasito (PAULA et al., 2016) e à capacidade de controle da parasitemia por mecanismos imunológicos do hospedeiro (GAZZINELLI, et al., 2014). Em todos os estágios do ciclo evolutivo, a presença do parasito e de seus produtos parasitários estimulam o sistema imune (BRASIL, 2010) desencadeando resposta inflamatória sistêmica (DUNST, et al., 2017), que exacerbada, quando não controlada adequadamente por processos de homeostase, pode evoluir à malária grave.

A via NF-κB pode explicar, em parte, como as células ativam processos inflamatórios induzidos pelo *Plasmodium* por meio de sistema orquestrado de fatores de transcrição (VIENNOIS et al., 2002) canônico e/ou não canônico (MITRA et al., 2015). Todavia, a ativação da via pode ser reprimida por ação dos Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomais (PPARs), quando estes são ativados por ligantes endógenos e/ou exógenos, inibindo a transcrição de genes inflamatórios e evitando a evolução para as formas graves da doença.

O nosso grupo tem desenvolvido uma série de agonistas parciais de PPARs, a partir do cardanol, um dos constituintes do líquido da casca da castanha de caju (LCC) e.g. LDT409 e LDT540A (FERREIRA, 2018). De forma complementar, Sahim (2017) identificou, entre outras características, que o LDT409 está relacionado com a inibição de genes inflamatórios *in vivo*.

Nesse sentido, este trabalho visa avaliar os efeitos imunomoduladores/anti-inflamatórios dos derivados LDT409 e LDT540A em modelos de estímulo celular induzido por *P. berghei* ANKA.

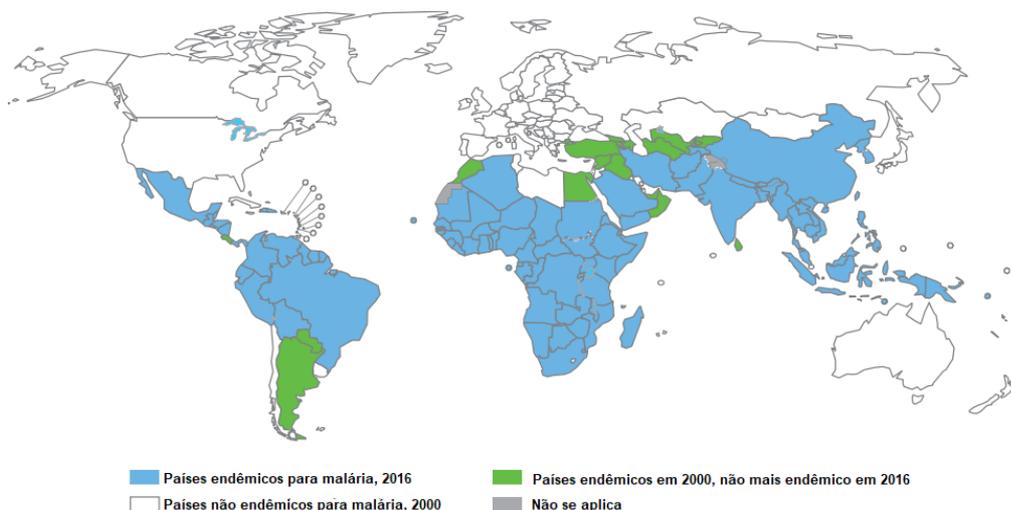
1.2 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Segundo Relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS), o período de 2000 a 2014 foi marcado pelo declínio sustentado do número de notificações mundiais de malária, resultado de altos investimentos em campanhas de saúde pública, e adoção de estratégias de erradicação da doença, tais como a distribuição de mosquiteiros tratados com inseticidas, testes de diagnóstico rápido e distribuição de terapias preventivas (WHO, 2017; RANG et al., 2016).

A partir de 2015 – com a crise financeira mundial que disponibilizou menos recursos aos programas de prevenção e tratamento – começaram a ser registrados avanços da doença relacionados (FIOCRUZ, 2018). Neste contexto, considerando 91 países, foi reportado o total de 216 milhões de casos de malária com aproximadamente 445.000 mortes (WHO, 2017). Em 2017, por sua vez, foi registrado aumento de 84 % em relação ao mesmo período do ano anterior.

A malária apresenta distribuição mundial com a maioria dos casos notificados no continente Africano (90 %), Sudoeste Asiático (7 %) e oriente (2 %) (Figura 1). No mapa, ainda podemos observar que a maior concentração dos casos está localizada entre os trópicos. Adicionalmente, na região das américas apenas o Paraguai e Argentina conseguiram controlar a doença nos últimos 16 anos.

Figura 1: Áreas com ocorrência de malária no mundo de 2000 a 2016.



Fonte: WHO (2016).

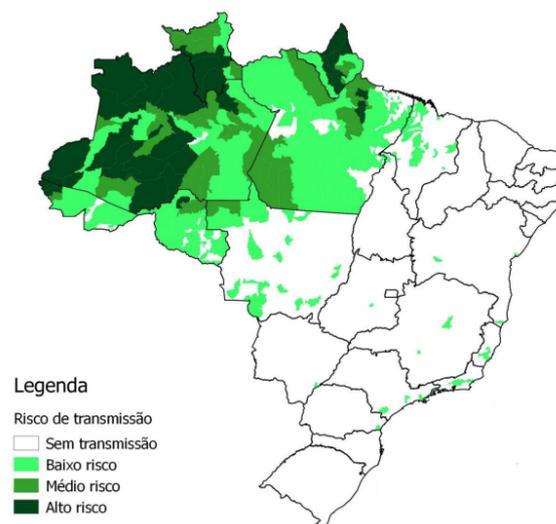
A atualização epidemiológica da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) em janeiro de 2018 alertou para crescentes números de notificações em nove países das Américas, incluindo o Brasil, que registrou aumento de 79 % entre os anos de 2016 e 2017 (OPAS, 2018).

No Brasil o aumento do número de casos notificados pode ser explicado com base nos processos migratórios ocorridos desde 2017, principalmente a partir da Venezuela onde a doença é endêmica. De acordo com dados publicados pelo Ministério da Saúde em maio de 2018, a Venezuela foi responsável por 78 % dos casos importados de malária registrados, seguida da Guiana (10 %), da Guiana Francesa (6 %), do Peru (4 %) e da Bolívia (1 %) (BRASIL, 2018b).

No território Brasileiro mais de 99 % dos casos de malária são registrados na região amazônica (Figura 2), onde as áreas de risco de transmissão ocorrem nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará e Rondônia devido as condições climáticas que propiciam o desenvolvimento do mosquito e os fatores socioeconômicas que favorecem a transmissão da doença (LAPOUPLE, et al., 2015).

Figura 2: Áreas Brasileiras com ocorrência de malária.

Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2017.



Fonte: Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS.

O Distrito Federal não é considerado área de transmissão de malária; contudo, todos os anos, principalmente após períodos de férias, são registrados casos da doença importados de outros estados e países. Em 2017 foram confirmados 34 casos de malária não autóctones: 24 % provenientes de viajantes da região Norte, 12 % da região Sul e 18 % da região Sudoeste, e 46 % de países Africanos – estes relacionados a diferentes espécies do parasito (BRASÍLIA, 2018).

1.3 ESPÉCIES PARASITÁRIAS

Os agentes etiológicos da malária são protozoários do gênero *Plasmodium* com mais de 150 mil espécies catalogadas (FIOCRUZ, 2011) relacionadas à infecção de diferentes hospedeiros. As espécies *P. yoelii*, *P. vinckei* e *P. berghei* são responsáveis pela infecção de roedores.

As espécies *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* causam doença em humanos – este último inicialmente identificado como parasito em macacos teve confirmada sua relação com a doença em humanos. A infecção por *P. ovale* ocorre principalmente no continente africano, enquanto as espécies *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* predominam nas regiões endêmicas brasileiras (BRASIL, 2014). Recentemente, a partir de estudos de casos de malária registrados na região da Mata Atlântica no Estado do Rio de Janeiro no período de 2015 e 2016, pesquisadores da Fiocruz identificaram nova forma de transmissão autóctone pela espécie *Plasmodium simium*, que infecta macacos, responsável pela infecção em humanos. Nestes casos, a análise de material genético do parasito demonstrou ser a causa de 28 infecções (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2017).

A espécies de *Plasmodium* diferem em relação a duração do ciclo eritrocítico e bem como nas complicações desencadeadas no hospedeiro (Quadro 1). Estas podem ser graves e gerar impactos na qualidade de vida de forma permanente mesmo após a recuperação da infecção.

Quadro 1: Espécies de *Plasmodium* responsáveis pela infecção em humanos e as principais complicações da doença.

<i>Plasmodium</i> spp.	DCE (h)	Maiores complicações	Refs
<i>P. falciparum</i>	48-72	Malária Cerebral	Brasil, 2005
<i>P. vivax</i>	48	Reincidência	ADAMS; MUELLER, 2017
<i>P. ovale</i>	48	Anemia grave	Groger et al., 2017
<i>P. malariae</i>	72	FQ; Anemia	Rang et al., 2016
<i>P. knowlesi</i>	24	SDRA; Malária Cerebral	SINGH; DANESHVAR, 2013

DCE: duração do ciclo eritrocítico; Ref: Referência. *P.* Plasmodium; SDRA: síndrome do desconforto respiratório agudo; FQ: febre quartã

As infecções por *P. vivax* e *P. ovale* embora causem infecção autolimitada e manifestação branda da doença; a forma evolutiva hipnozoíto no fígado contribui para reincidência da doença, causando febre aguda e anemia grave (PAULA et al., 2016). Adicionalmente, na infecção por *P. ovale* ocorre a síndrome do desconforto respiratório agudo (PAULA et al., 2016; GROGER et al., 2017).

O *P. malariae* é responsável por causar a febre quartã, que recorre a cada quatro dias, estando diretamente relacionada à duração do ciclo eritrocítico no hospedeiro de 72 horas (RANG et al., 2016). Embora a espécie seja descrita como clinicamente silenciosa, antígenos plasmodiais podem ser reconhecidos por anticorpos para a formação de imunocomplexos que se depositam nos glomérulos renais e nos capilares pulmonares, dificultando a formação de urina e as trocas gasosas, respectivamente.

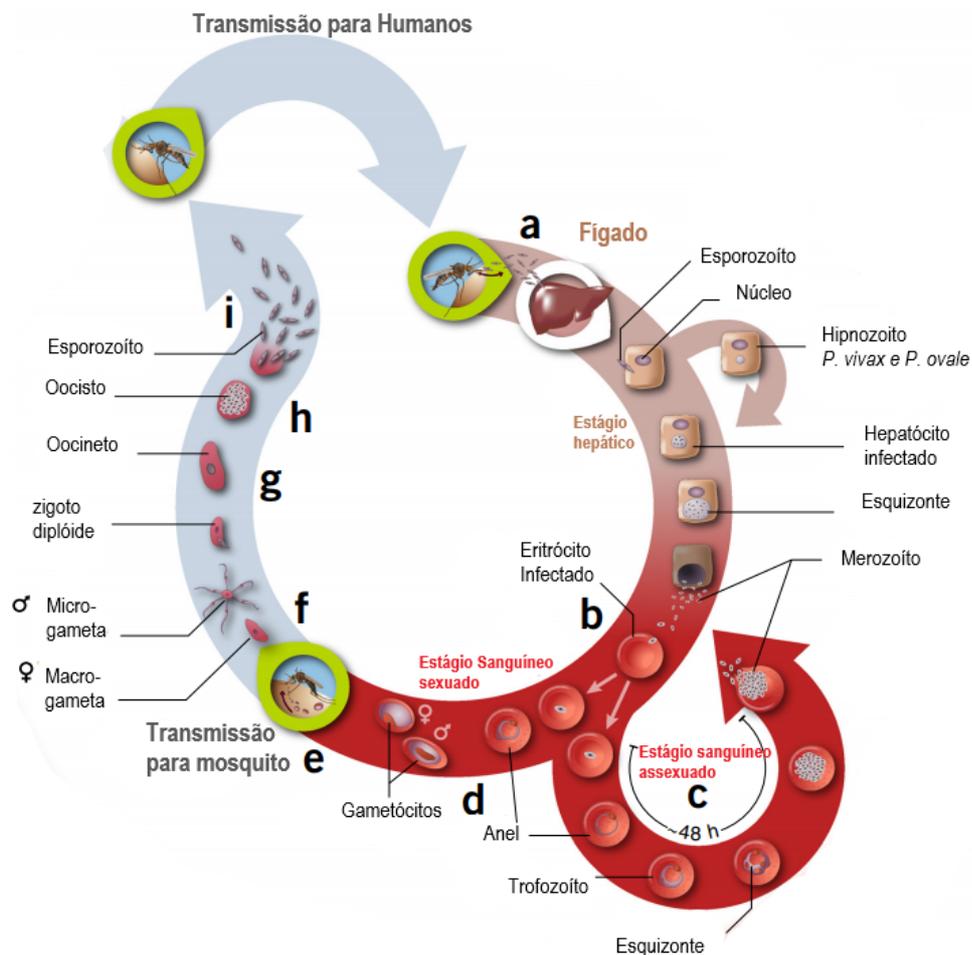
As espécies *P. falciparum* e *P. knowlesi* são consideradas mortais (COBAN et al., 2018). Neste sentido, a complicação da infecção por *P. falciparum* pode levar ao desenvolvimento da malária cerebral – patologia de etiologia complexa que evolui para óbito em poucos dias de infecção.

A malária é uma infecção que pode ocorrer de forma sistêmica, em virtude do ciclo biológico do parasito em circulação sanguínea, que favorece o acometimento de diversos órgãos e tecidos.

1.4 CICLO BIOLÓGICO DO PARASITO

Independente da espécie de *Plasmodium*, o ciclo de vida em humanos é essencialmente o mesmo e está dividido nos estágios hepático e sanguíneos sexuado e assexuado. A Figura 3 apresenta o ciclo evolutivo do parasito, no mosquito e em humanos.

Figura 3: Ciclo evolutivo do Plasmodium.



Fonte: Adaptado de Blasco et al., (2017).

A infecção humana se inicia pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*, que apresenta nas suas glândulas salivares os esporozoítos, a forma infectante do hospedeiro (SHOFIELD; GRAU 2005). Durante o repasto sanguíneo (a) aproximadamente 100 esporozoítos são liberados na derme. Estes rapidamente alcançam a corrente sanguínea e invadem os hepatócitos por

meio das proteínas circunsporozoítica (CPS) – relacionadas com trombospondina (TRAP) que se ligam a proteoglicana sulfato heparan (SH) e ou tetrasparina denominada CD81, localizados na superfície do hepatócito. No fígado, e particularmente nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esperozoitos originam os hipnozoítos – forma evolutiva do parasito – que podem permanecer latente por meses ou anos. Por sua vez, outra população replica-se por divisão múltipla em ciclo assexuado de reprodução (esquizogonia) originando os esquizontes (SHOFIELD; GRAU 2005). Após período de 5 a 16 dias, a depender da espécie, os esquizontes diferenciam-se em cerca de 30.000 merozoítos (BLASCO et al., 2017).

(b) Os merozoítos rompem os hepatócitos e invadem os capilares intra-hepáticos para conseguir acesso a circulação sanguínea (ANTINORI, et al., 2012; WIRTH; PRADEL, 2012). Os parasitos expressam ligantes para receptores dos eritrócitos, para invadir e desenvolverem-se no estágio sanguíneo assexuado ou sexuado (MILLER, et al., 2013). (c) No ciclo de crescimento assexuado, os merozoítos apresentam-se sob forma de anel e diferenciam-se em trofozoítos no período de 24 horas a 72 horas. Esta nova forma cresce e sofre divisão nuclear passando a esquizontes sanguíneos que se desenvolvem dentro de vacúolos parasitóforos, e após processo de esquizogonia originam novos merozoítos. Os esquizontes rompem os eritrócitos e liberam os merozoítos na circulação reiniciando o ciclo sanguíneo assexuado, fase na qual são observadas as manifestações clínicas da doença. (d) No ciclo de vida sexuado, os merozoítos diferenciam-se em macrogametas e microgametas, (e, f) os quais quando ingeridos pelo mosquito em novo repasto sanguíneo, iniciam a reprodução sexuada no intestino gerando os oocinetos (g), que por sua vez geram os oocistos (h) na parede intestinal. Por fim, os oocistos diferenciam-se por esporogonia em esporozoítos (i) que chegam à glândula salivar do mosquito (BLASCO et al., 2017; SHOFIELD; GRAU 2005, HIRAKO, 2016).

1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Os sintomas da doença estão diretamente relacionados com o ciclo eritrocítico da espécie de *Plasmodium*, os quais inespecíficos compreendem febre, cefaleia, mal-estar geral e dores musculares (PAULA et al., 2016). A medida que a infecção evolui surgem outros sintomas que caracterizam a doença como febre alta, cefaleia, sudorese, calafrios e tremores que ocorrem de acordo com o rompimento das hemácias e apresentam duração de aproximadamente 10 horas, podendo ser acompanhados de episódios de prostração, alterações de consciência, convulsão e choque (BRASIL, 2018a).

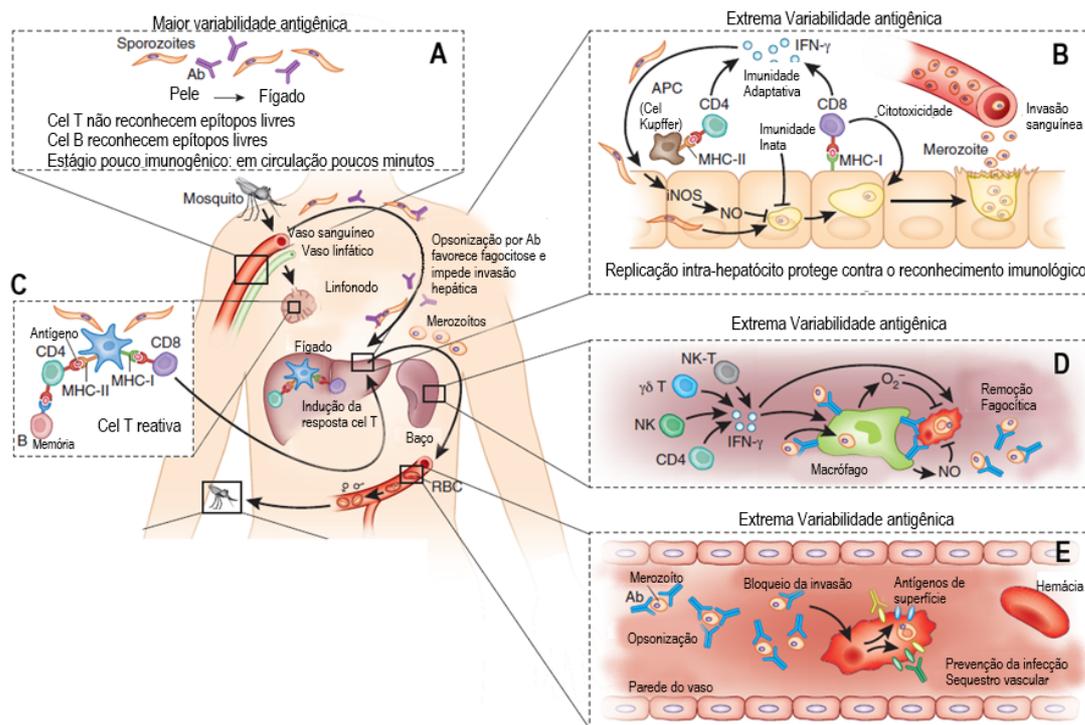
A malária pode cursar de forma clinicamente silenciosa em indivíduos que residem em áreas endêmicas e adquirem várias vezes a infecção. Nesses casos o parasitemia é baixa, refletindo a capacidade de controle por mecanismos imunológicos (GAZZINELLI, et al., 2014). Em indivíduos como primoinfectados, gestantes, crianças e imunossuprimidos, a doença apresenta-se de forma clinicamente evidente (SHOFIELD; GRAU 2005; BRASIL, 2010).

1.6 PROCESSO IMUNOPATOLÓGICO NA MALÁRIA

Em todos os estágios, a presença do parasito é responsável por ativação do sistema imunológico. O estágio sanguíneo é considerado o mais imunogênico, em que a liberação de material celular oriundo de destruição e ruptura de eritrócitos e os produtos parasitários são responsáveis pela exposição do sistema imune, ativando de forma maciça as células leucocitárias (BRASIL, 2010; GOMES, et al., 2011).

A infecção pelo *Plasmodium* spp inicialmente envolve a participação de resposta imune inata seguida de resposta adaptativa. A Figura 4 apresenta como as principais respostas imunológicas controlam a infecção em cada estágio do ciclo evolutivo no hospedeiro bem como os principais mecanismos de evasão do parasito.

Figura 4: Mecanismos imunológicos na infecção por malária.



Fonte: Adaptado de Riley e Stewart (2013).

A resposta imune inata desempenha papel na vigilância contra o patógeno por meio de respostas protetoras parciais (ABBAS & LICHTMAN, 2009) que inicia-se a partir do momento em que os esporozoítos são inoculados na derme do hospedeiro (A). Estes são reconhecidos por células dendríticas e macrófagos teciduais; porém o parasito apresenta mecanismos de evasão (ABBAS & LICHTMAN, 2009) e consegue alcançar a circulação sanguínea. Esse estágio embora muito rápido, é muito imunogênico – pois os parasitos migram para os gânglios linfáticos e ativam os linfócitos T. Além disso tem os epítopos do parasito são reconhecidos por linfócitos B, que aumentam a produção e secreção de anticorpos anti-esporozoítas (GAZZINELLI, et al., 2014), e quando opsonizados são impedidos de invadir o fígado (RILEY & STERWART, 2013). (B) Os esporozoítas não opsonizados invadem os hepatócitos e se replicam no tecido hepático dentro de vacúolos parasitóforos e estimulam a expressão de genes para síntese de interferons alfa e beta (IFN- α e IFN- β) (LIEHL, et al., 2013) que apresentam ação autócrina sobre os hepatócitos e induzem a expressão de quimiocinas que atraem células da resposta imune inata.

Desta forma, as células natural Killer (NK) são direcionadas para o fígado e liberam maiores concentrações de IFNs sobre as células hepáticas para conter o parasito em processo de aproximadamente 24 horas; porém não é suficiente para conter o crescimento parasitário (DUNST, et al., 2017). Após esse período as células de Kupffer (apresentadoras de antígeno) atuam como ponte entre a imunidade inata e adaptativa; processam os parasitos e deslocam-se para os linfonodos para apresentar o antígeno aos linfócitos T, **(C)** estimulando a ativação, proliferação e migração dos linfócitos TCD4 e TCD8 para o fígado, iniciando a resposta imune adaptativa (RILEY & STERWART, 2013). Adicionalmente, as cepas virulentas de *Plasmodium* podem interferir na produção da interleucina 12 (IL-12) nas células apresentadoras de antígeno prejudicando sua interação e ativação do subtipo de linfócito T helper (Th1), deletando as respostas efetoras e de memória, caracterizando mecanismo de resistência (WYKES et al., 2007).

Por sua vez, **(B)** os linfócitos TCD4 que migraram para o fígado – reconhecem os antígenos apresentados pelo Complexo de histocompatibilidade principal (MHC de classe II) das células de Kupffer – liberam interferon gama (IFN- γ) para intensificar a capacidade microbicida destas células. Paralelamente, os linfócitos TCD8 recrutados ligam-se ao MHC de classe I na superfície dos hepatócitos infectados e induzem essas células ao processo apoptótico (RILEY; STERWART, 2013). O parasito consegue escapar destes mecanismos adaptativos, de forma que um único merozoíto sobrevivente origina aproximadamente 40.000 novos merozoítos ao longo de seis dias (MILLER, et al., 2013), proliferando até o rompimento das células hospedeiras e liberação na circulação (RILEY; STERWART, 2013).

(D) A passagem de merozoítos livres e/ou eritrócitos infectados pelo baço induzem a ativação de resposta antigênica extrema. Estes são captados por receptores na membrana dos macrófagos, processados e apresentados como antígenos aos linfócitos T que ativados liberam INF- γ para estimular os macrófagos à produção produtos antiparasitários (ABBAS & LICHTMAN, 2009; RILEY & STEWART; 2013; DUNST et al., 2017). A população de linfócitos Th1 ativada secreta as citocinas interleucina 2 (IL-2), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IFN γ . Estes ativam linfócitos B para produção de anticorpos, processo

de opsonização de merozoítos e hemácias e liberação de interleucinas (IL-6, IL-12, IL-1 β , IL-8, IL-10 e TNF- α), bem como produção de óxido nítrico (NO) e radicais de oxigênio para destruição dos parasitos (GAZZINELLI, et al., 2014).

(E) os eritrócitos infectados apresentam na membrana uma série de proteínas de superfície induzidas pelo parasito. Neste estágio os linfócitos B produzem anticorpos complementares aos antígenos de superfície, processo que impede a citoaderência endotelial das hemácias parasitadas, e favorece o reconhecimento e depuração por monócitos (ABBAS & LICHTMAN, 2009; RILEY & STEWART; 2013).

A diversidade de citocinas e quimiocinas produzidas durante a infecção promove resposta pró-inflamatória (DUNST, et al., 2017), que na maioria dos casos é corrigida por processos de homeostase. Caso contrário poderá contribuir para a evolução de malária grave com consequências fatais. Portanto, a regulação adequada do sistema imunológico é a chave para resposta oportuna (SCHOFIELD; GRAU, 2005).

1.7 MALÁRIA GRAVE

A malária grave nos seres humanos ocorre principalmente na infecção por *Plasmodium falciparum* e menos frequente pelas espécies *P. vivax*, *P. knowlesi* (COBAN, et al., 2018). A doença é desencadeada pelo efeito sinérgico de fatores como aderência de hemácias parasitadas em microvasculatura sistêmica, produção e liberação de produtos parasitários, e aumento da concentração plasmática de citocinas inflamatórias produzidas durante o ciclo hepático e sanguíneo (GAZZINELLI, et al., 2014; DUNST, et al., 2017).

O tecido sanguíneo desempenha papel central na patogênese da malária grave (COBAN et al., 2018), uma vez que durante o estágio intraeritrocítico as espécies de *Plasmodium* induzem a expressão de proteínas de superfície na membrana da hemácia (MILLER, et al., 2016). Esses antígenos aderem aos receptores ICAM-1 (molécula de adesão intercelular), E-selectina (selectina de célula endotelial), V-CAM (molécula de adesão vascular), bem como CD36 e CD31 no endotélio vascular, constituindo a estratégia parasitária para evasão da depuração esplênica (SCHOFIELD; GRAU 2005).

A interação antígeno-receptor promove amplo sequestro de hemácias parasitadas na microvasculatura de órgãos como o cérebro, pulmão, coração, rim, placenta, retina e outros (GILLRIE, et al., 2016), provocando aglomeração de eritrócitos infectados ou não, plaquetas, fibrina e leucócitos. Esses agregados celulares denominados de rosetas se acumulam em determinado local da vasculatura e causam obstrução, isquemia tecidual, desregulação da coagulação, e lesões locais (GOMES et al., 2011; GALEGO-DELGADO; RODRIGUEZ, 2015). Além disso, o sequestro de hemácias parasitadas para os respectivos órgãos resulta na liberação de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) e.g. nucleosídeos estimuladores, RNAm (RNA mensageiro) GPI (glicosilfosfatidilinositol) e haemozoína, que interagem com receptores de reconhecimento padrão (PRRs) nas células e/ou tecido alvo (COBAN, et al., 2018; GAZZINELLI, et al., 2018).

O entendimento do mecanismo pelo qual o parasito bem como seus produtos parasitários deflagram respostas em nível celular são cruciais para a compreensão do processo fisiopatológico da infecção pelo *Plasmodium*, bem como o desenvolvimento de estratégias de tratamento. Diferentes vias de sinalização intracelulares estão envolvidas na modulação das respostas imunológicas, tendo sido a via NF-kB amplamente explorada.

1.8 VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULARES

1.8.1 Fator Nuclear Kappa B

Encontrado praticamente em todos os tipos celulares o estudo do complexo proteico da via de sinalização intracelular Fator Nuclear Kappa B (NF-kB) é de grande interesse para diversas patologias. As proteínas NF-KB são fatores de transcrição que regulam grande número de genes para diferentes funções biológicas, incluindo respostas fisiológicas como a proliferação celular e apoptose, e respostas inflamatórias em resultado a estímulos infecciosos (WONG; TERGAONKAR, 2009; VIENNOIS, et al., 2012).

A sinalização NF- κ B explica, em parte, como as células imunitárias detectam patógenos e processam informações por meio de sistema orquestrado de fatores de transcrição, promovendo respostas inatas e adaptativas, desencadeando processos patológicos de base inflamatórias (HAYDEN; GHOSH, 2008; KARIN et al., 2006).

Como apresentado na Tabela 1, uma série de estímulos tais como proteínas de adesão celular, PAMPs do *Plasmodium* e citocinas inflamatórias, interagem com receptores específicos na superfície das células imunes e nos tecidos acometidos, modulando vias de sinalização intracitoplasmáticas.

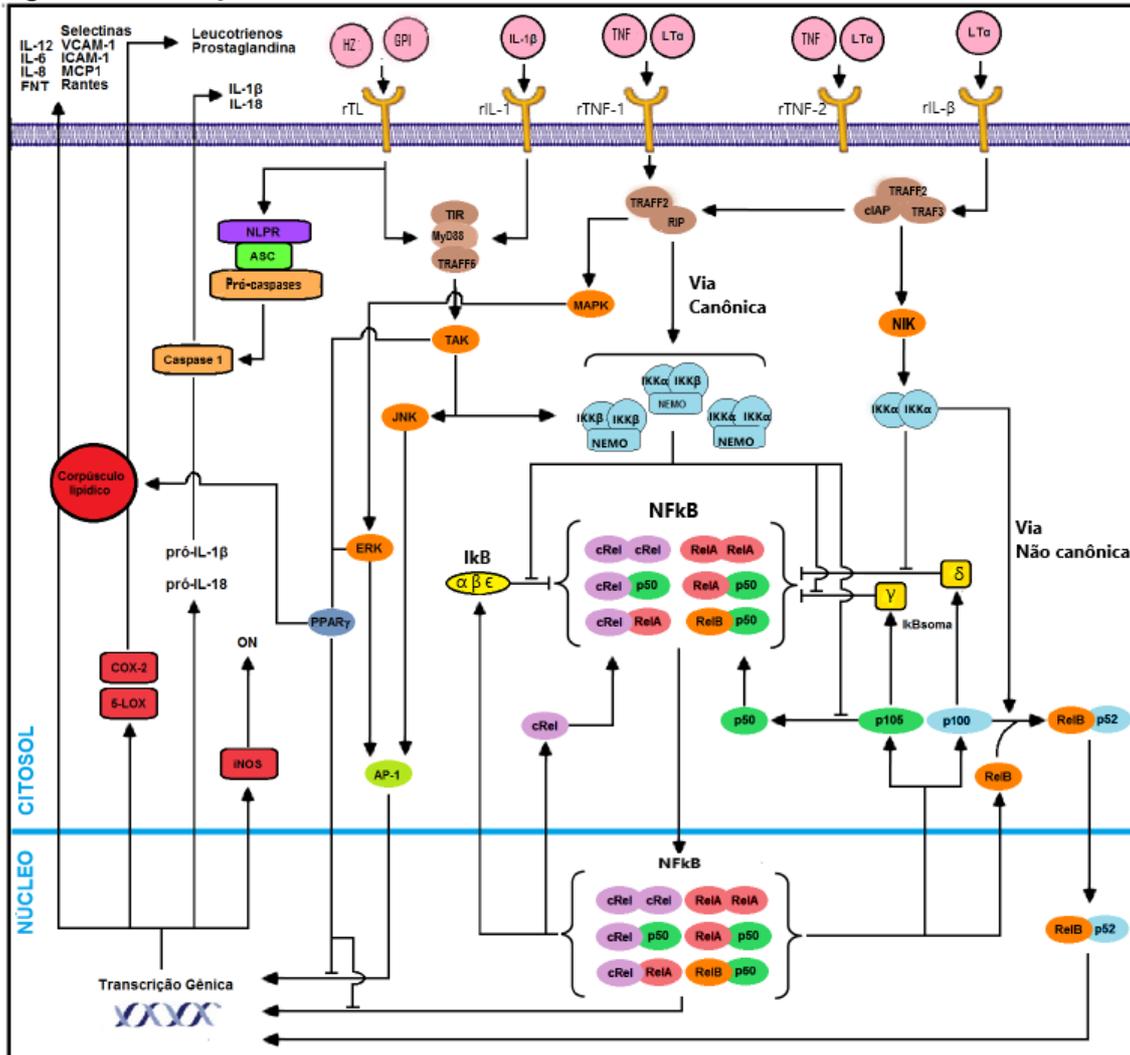
Tabela 1: Estímulos celulares e respectivos receptores.

Estímulo	Receptor	Célula	Ref.
EMP-1	ICAM-1, V-CAM, CD31, CD36	CED, DC, MC	SCHOFIELD; GRAU, 2005
IL-1	IL-1R	MC	Kida et al., 2005.
TNFα	TNFR-1;TNFR-2	MC, LB	SCHOFIELD; GRAU, 2005.
Linfotoxina	LTR; TNFR1-2	DC, MC,	ABBAS; LICHTMAN, 2009.
CD40	CD40R	LTh	ABBAS; LICHTMAN, 2009.
Haemozoína	TLR-9	DC, MC	SCHOFIELD; GRAU, 2005
GPI	TLR-2, TLR-4, CD4 ⁺ , CD8 ⁺	CED NKT, MC	SCHOFIELD; GRAU, 2005.
LPS, RNA	TLR	DC, MC	ABBAS; LICHTMAN, 2009.

EMP-1: Proteína de membrana eritrocítica; CED: célula endotelial; ICAM-1: molécula de adesão intercelular; RNA: ácido ribonucleico; VCAM-1: Molécula celular de adesão vascular; CD31: Marcador de células endoteliais 31; CD36: Marcador de células endoteliais 36; GPI: glucosulfosfatidylinositol; NKT; natural killer T; TCR: receptor de célula T; LTh: célula T helper; LB: linfócito B; TLR: receptor Toll-like; TNF α : fator de necrose tumoral alfa; LPS: lipopolissacarídeo; DC: célula dendrídica; MC: macrófago; CD40R: receptor de CD40; LTR: receptor de linfotoxina; TNFR: receptor de TNF; IL-1: interleucina 1; IL-1R: receptor de IL-1. CD40: grupamento de diferenciação 40; CD4+/8+: grupamento de diferenciação 4+ e 8+.

Os fatores associados aos receptores de TNF (TRAFFs) são importantes mediadores e representam uma família de proteínas intracelulares. Neste sentido, TRAFF1 e TRAFF2 estão envolvidos na transdução de sinais provenientes dos estímulos aos receptores de TNF e linfotoxina, enquanto TRAF 6 está relacionado à sinalização via receptor de IL-1 e TLRs (OECKINGHAUS et al., 2011). O esquema de sinalização (Figura 5) apresenta o envolvimento de uma série de elementos reguladores.

Figura 5: Sinalização NF-KB. Via Canônica e não Canônica.



Fonte: Modificado de BORGES, 2013.

Por sua vez, os TRAFs são responsáveis pela ativação das proteínas adaptadoras *e.g.* FADD, TRADD, a NIK, RIP e cIAP, também envolvidas na sinalização (SHIH et al., 2011; BORGES et al., 2013), apresentando em comum a função de ativação do complexo IKKs. O complexo IKK é representado pelo conjunto de proteínas quinases constituído pelas homólogas IKKα, IKKβ e IKKδ, estando ou não complexadas à subunidade da proteína NEMO (Modulador Essencial de NF-κB) no citoplasma celular (PERKINS, 2007; SHIH et al., 2011).

As proteínas IKKs atuam sobre outro conjunto de proteínas conhecidas como IκBs *i.e.* IκBα, IκBβ e IκBε (WONG & TERGAONKAR, 2009), responsáveis pelo bloqueio das regiões promotoras dos complexos proteicos NF-κB. A fosforilação de IκB por IKKs é sinal para sua degradação proteossômica, tornando os fatores de transcrição NF-κB livres para translocação nuclear (OECKINGHAUS, et al., 2011; WONG; TERGAONKAR, 2009).

A família de fatores de transcrição NF- κ B consistem em cinco membros de proteínas: p50, p52, p65 (RelA), p68 (RelB) e cRel. Todos apresentam em comum a região *N*-terminal apresentando Domínio de Homologia Rel (DHR) responsáveis pela ligação ao DNA (MITRA, et al., 2015).

A translocação nuclear dos fatores ocorre após dimerização com outros membros das proteínas NF- κ B, podendo ocorrer combinações (VIENNOIS, et al., 2002). Os dímeros ligam-se na região κ B dos promotores no núcleo celular para regular a transcrição. Apenas RelA, RelB e c-Rel apresentam região gênica de Domínio de Ativação de Transcrição (DAT) – responsável por ativar diretamente a transcrição gênica –; enquanto p50 e p52 podem reprimir a transcrição, tendo como exceção a formação de dímeros com fatores de transcrição que apresentam domínio DAT (MITRA, et al., 2015; GHOSH & HAYDEN, 2008).

A via de sinalização do NF- κ B pode ser ativada por meio de vias específicas de sinalização: Clássica (canônica), representada pela proteína RelA, ou Alternativa (não canônica), representada pela proteína RelB (WANG et al., 2011; MITRA, et al., 2015). As duas vias podem utilizar componentes de ativação e inibição compartilhados como as proteínas RIP e TRAF que desempenham papéis semelhantes em ambas as vias (GHOSH & HAYDEN, 2008).

A sinalização não canônica tem início com a ativação dos receptores de LTR e CD40L mediados pelas proteínas TRAF2 e TRAF3. Estas ativam a proteína quinase NIK que fosforila e ativa as proteínas IKKs (IKK α /IKK α), cuja fosforilação da subunidade p100 do dímero NF- κ B p100/RelB é sinal para sua degradação proteossômica. Desta forma, há geração dos dímeros NF- κ B p52/RelB (VIENNOIS et al., 2012; WONG; TERGAONKAR, 2009; VARFOLOMEEV; VUCIC, 2008) que translocam-se para o núcleo e induzem a expressão de genes relacionados à maturação de linfócitos B .

A ativação da via clássica ocorre quando um ou mais receptores são ativados e.g receptor de TNF- α , TLR ou TCR, deflagrando respostas intracelulares que culminam em ativação de proteínas quinases IKKs. Estas fosforilam os inibidores citossólicos I κ -B que, após degradados, tornam livre o dímero do fator RelA no citoplasma (GHOSH & HAYDEN, 2008) para

translocação nuclear e interação com os sítios de DNA genômico, regulando, desta forma, a transcrição de genes relacionados com respostas imunológicas e inflamatórias (WONG; TERGAONKAR, 2009; DOHI, et al., 2014).

O resultado da ativação da via clássica do NF- κ B envolve a transcrição de genes para imunoreceptores, moléculas de adesão celular (ICAM-1, VCAM-1 e CD36) e enzimas inflamatórias (COX-2 e LOX-5) (WONG; TERGAONKAR, 2009). Além disso, a ativação da via NF- κ B por produtos parasitários derivados do *Plasmodium* – como a molécula de haemozoína e GPI – é responsável pela indução da expressão da Proteína Quimioatraente de Monócito 1 (MCP-1), citocinas (TGF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-12, IL-8, IL-6, TNF- α , linfotóxina α e β) (SON et al., 2008) e corpúsculo lipídico (BORGES, 2013).

Os corpúsculos lipídicos (CLs) são organelas localizadas no citoplasma em situações fisiológicas e encontram-se aumentados em processos inflamatórios. Os CL são esferas ricas em lipídios como triacilgliceróis, diacilgliceróis, ésteres de retinila, colesterol livre, triglicerídios, ácido araquidônico e colesterol. Neste contexto, o conteúdo lipídico é substrato das enzimas COX-2 e LOX-5 para a produção dos eicosanoides que intensificam o processo inflamatório (BOZZA et al., 2009; MELO & BANDEIRA-MELO, 2007; SILVA, 2012).

Adicionalmente, a ativação da via NF- κ B por produtos parasitários também resulta na expressão de genes envolvidos com estresse oxidativo (CHOPRA et al., 1992; KALTSCHMIDT et al., 2002).

1.8.2 Espécies Reativas de Oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (EROS) intracelulares ocorrem fisiologicamente em virtude do metabolismo mitocondrial de oxigênio (O₂) (DINIZ, 2015; FINKEL et al., 1998). Na infecção por *Plasmodium*, os macrófagos são induzidos ao aumento da concentração de EROs que entra em desequilíbrio com a formação de espécies antioxidantes (BRINKMANN et al., 1984), provocando morte direta do parasito por estresse oxidativo (RODRIGUES, 2014; PRECÁRIO et al., 2012; JONES, 2006; DINIZ, 2015).

A ativação de TLRs pelo patógeno desencadeia deslocamento de TRAFF6 para membrana mitocondrial externa gerando EROS. Estas impulsionam a fosforilação de IκBs levando à estimulação NF-κB que resulta na expressão de NADPH oxidase (NOX2) e óxido nítrico sintase (NOS), enzimas produtoras das espécies reativas como radical hidroxila (HO·), superóxido (O₂·), peroxila (ROO·), alcoxila (RO·), oxigênio (O₂), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), nitritos (NO₂⁻), nitratos (NO₃⁻), peroxinitritos (ONOO⁻) e óxido nítrico (NO) (RODRIGUES, 2014; TAN et al., 2016).

Há uma discussão sobre o envolvimento de EROS na malária (PRECÁRIO et al., 2000; JONES, 2006), fato que torna controverso o seu papel protetor, em decorrência ao controle da parasitemia, e fisiopatológico, em virtude dos danos às estruturas celulares do hospedeiro (POTTER et al., 2005).

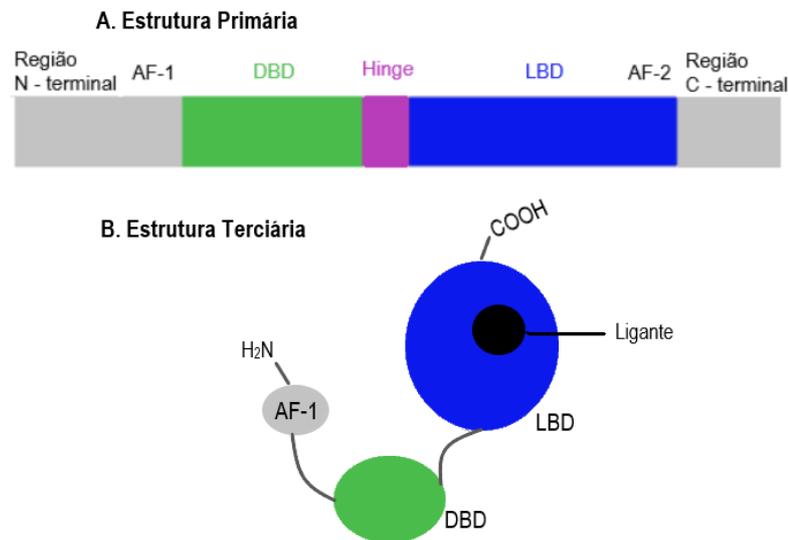
A ativação da via NF-κB em isolado não é suficiente para induzir a expressão gênica em resposta aos estímulos; esse processo é influenciado por uma série de proteínas com distintas funções conhecidas como fatores transcripcionais. Além disso, a transcrição de genes inflamatórios pode ser inibida por receptores ativados por proliferadores peroxissomais.

1.8.3 Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomais

Os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs) fazem parte da superfamília de receptores nucleares (RNs) que desempenham funções de fatores de transcrição e promovem a ativação ou repressão da expressão gênica quando em contato ou não com ligantes (HONG et al., 2018; GRYGIEL-GORNIK, 2014).

Do ponto de vista estrutural os PPARs possuem organização comum representada por regiões e domínios funcionais (Figura 6). A região N-terminal apresenta função de ativação independente de ligante (AF-1), sendo a parte responsável pela interação com co-ativadores, co-repressores e outros fatores de transcrição; o domínio de ligação ao DNA (domínio DBD, do inglês, *DNA Binding Domain*) reconhece elementos responsivos ao PPAR; a região de dobradiça (*hinge*) atua como ponte entre os domínios DBD e LBD; o domínio interação com ligantes (LBD, do inglês, *Ligand Binding Domain*) apresenta sítio para interação de agonistas endógenos e exógenos; e uma região subjacente à função de ativação 2 (AF-2) seguido da posição C-terminal (LAGANA et al., 2016; AMATO, 2008).

Figura 6: Estrutura primária e terciária dos receptores nucleares, apresentando as regiões amino (N) e carbóxi terminais (C), domínio de ligação ao DNA (DBD) e ao ligante (LBD)



Fonte: Modificado de Glass e Ogawa (2005)

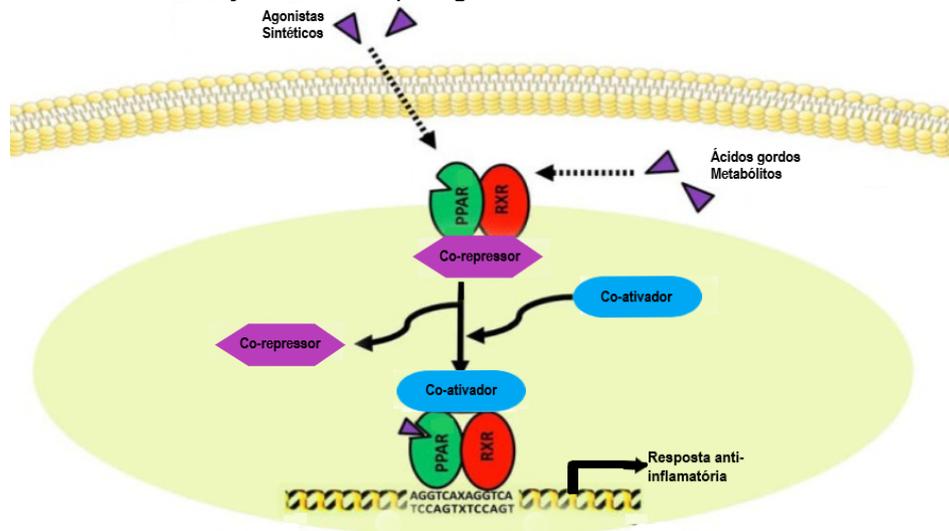
Os PPARs modulam a expressão gênica de três formas clássicas: transativação, repressão basal e transrepressão da transcrição (AMATO, 2008) que envolve a participação direta de Histonas acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs), e está diretamente relacionada com a atividade nuclear dos dímeros de NF-KB.

A transativação ocorre após interação de agonistas no domínio de ligação LBD do PPAR no núcleo celular favorecendo a formação de heterodímero com o receptor retinóide (RXR). Este sofre modificações conformacionais e permite o desligamento de correpressores bem como o ancoramento de complexos coativadores. Desta forma, permite a descompactação da cromatina e recrutamento da maquinaria transcricional (AMATO, 2008; GRYGIEL-GORNIK, 2014; AMBER-VITOS, 2016) (Figura 7).

A repressão basal ocorre na ausência de ligantes PPARs que mantém a transcrição gênica em estágio inativo. O heterodímero PPAR-RXR encontra-se no citoplasma ou no núcleo celular associado a correpressores que mantêm a cromatina enovelada, impedindo o recrutamento da maquinaria envolvida na transcrição genica (AMATO, 2008).

O processo de transrepressão da transcrição ocorre após interação de ligantes naturais ou agonistas com a região LBD de PPAR, favorecendo a complexação com RXR e ligação do complexo ao DNA. Desta forma ocorre o antagonismo dos dímeros de NF- κ B sobre os promotores; impedimento da remoção de correpressores; e competição com coativadores transcripcionais – mecanismos que impossibilitam a ativação de genes inflamatórios (MICHALIK; WAHLI, 2008; KOSTADINOVA et al., 2005).

Figura 7: Mecanismo de ativação de PPAR por ligantes



Modificado de Wei et al., 2012

A família de PPARs compreendem três isoformas: PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ , que diferem em termos de suas distribuições teciduais, especificidade de ligantes e funções biológicas (GINDERACHTER et al., 2008).

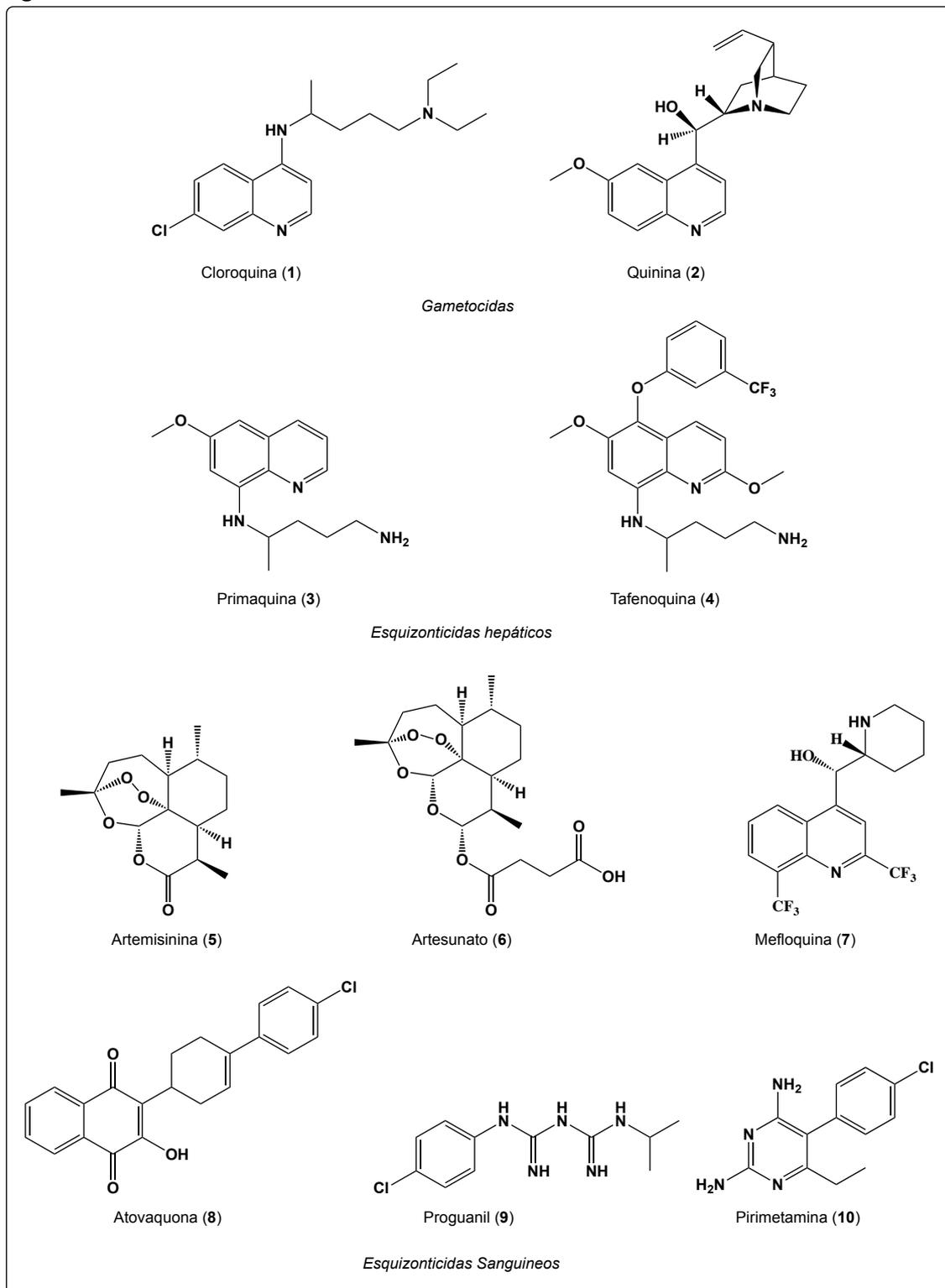
1.9 TRATAMENTO

Apesar de muitas décadas de intenso esforço em pesquisa e desenvolvimento, atualmente não existe vacina contra a malária, portanto, o tratamento é exclusivamente quimioterápico.

O tratamento antimalárico depende da espécie de plasmódio, idade do paciente, e da gravidade (BRASIL, 2010; WHO, 2015). Os agentes antimaláricos são classificados de acordo com o mecanismo de ação nos diferentes estágios do ciclo de vida do parasito e as indicações clínicas do uso, sendo: gametocidas,

esquizonticidas hepáticos e esquizonticidas sanguíneos (Figura 8), alguns deles apresentam mais de um mecanismo de ação.

Figura 8: Classes de fármacos antimaláricos



Os agentes gametocidas cloroquina (1) e quinina (2) agem contra as formas sexuadas do plasmódio prevenindo a transmissão para o vetor. Apresentam atividade contra gametócitos de *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*, porém, raramente utilizados para esta finalidade (GOLAN, 2014; RANG et al., 2016). Por sua vez, os compostos esquizontocidas hepáticos primaquina (3) e tafenoquina (4), atuam sobre as formas latentes de *P. vivax* e *P. ovale* no fígado (RANG et al., 2016). Considerando os fármacos esquizontocidas sanguíneos utilizados para cura clínica e.g artemisinina (5), artesunato (6), mefloquina (7), atovaquona (8), proguanil (9) e pirimetamina (10), estes agem nos estágios intraeritrocíticos assexuados, eliminando os parasitos da circulação (GOLAN, 2014; GOODMAN et al., 2015). Segundo o *Guidelines for the treatment of malaria* (do inglês, Diretrizes para o Tratamento da Malária), o tratamento eficaz é realizado com artemisinina combinada a outro antimalárico de diferente mecanismo (WHO, 2015; RANG et al., 2016).

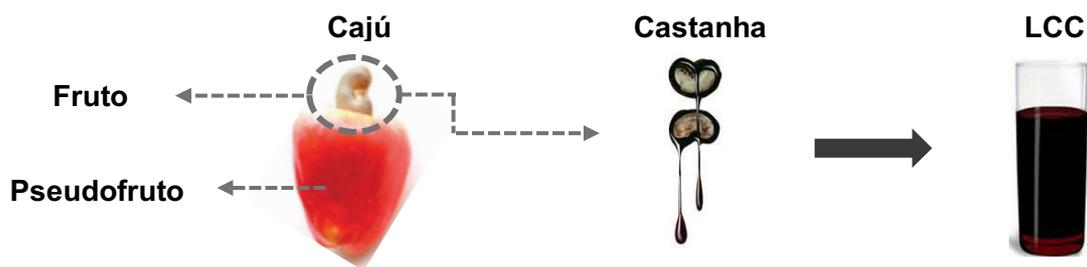
A malária pode cursar com gravidade independente do suporte clínico e tratamento adequado, desencadeando processos de hiperativação inflamatória. Nesse sentido, a descoberta de compostos que atuem como terapia coadjuvante aos antimaláricos, que modulem a exacerbação do sistema imunológico, poderá evitar o desenvolvimento das formas graves.

As plantas medicinais, importantes fontes de compostos com propriedades biológicas e físico-químicas, têm sido utilizadas no tratamento bem como no planejamento de novos agentes terapêuticos.

1.10 LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DE CAJU (LCC)

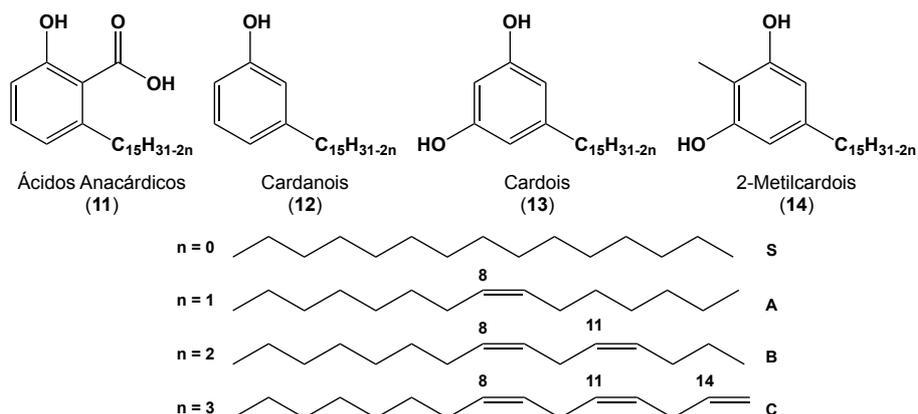
O *Anacardium occidentale L* é o nome científico da árvore popularmente conhecida como cajueiro, abundante na região nordeste do Brasil. Tanto seu fruto (castanha) quanto seu pseudofruto (pedúnculo) são apreciados mundo afora. A castanha apresenta comprimento variável, casca coriácea lisa, mesocarpo alveolado e é repleta de óleo escuro, cáustico e inflamável, denominado de líquido da casca da castanha de caju (LCC) (MAZZETTO; LOMONACO, 2009). (Figura 9)

Figura 9: Derivados do cajueiro



O LCC representa aproximadamente 25 % do peso da castanha e considerado como importante fonte de lipídios fenólicos não isoprenóides constituído por misturas de ácidos anacárdicos (**11**), cardanois (**12**), cardois (**13**) e traços de metilcardois (**12**) (Figura 10) (MAZZETTO; LOMONACO, 2009; GONZAGA, 2008; PATEL; BANDYOPADHYAY, 2006).

Figura 10: Principais componentes do LCC e diferentes graus de instauração da cadeia lateral



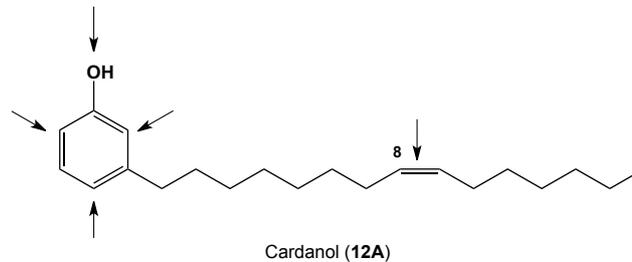
O método empregado para obtenção do LCC reflete diretamente na composição de seus constituintes (BALACHANDRAN et al., 2013). O LCC natural é obtido por método de extração com solventes orgânicos ou prensagem a frio, enquanto o LCC técnico é obtido por meio do beneficiamento da castanha de caju, no qual a primeira etapa consiste na hidratação seguida de aquecimento da castanha à 190 °C. A esta temperatura há descarboxilação da mistura de ácidos anacárdicos (**11**) levando à mistura de cardanois (**12**) (BALACHANDRAN et al., 2013; HAMAD; MUBOFU, 2015). A Tabela 2 apresenta os constituinte dos LCC natural e técnico e percentuais das misturas e insaturações.

Tabela 2: Composição percentual dos componentes lipídicos e de insaturações no LCC natural

Constituintes	Mistura	Percentual de Insaturações			
	%	Saturado (% S)	Monoeno (% A)	Dieno (% B)	Trieno (% C)
Ácidos Anacárdicos (11)	71,7-82,0	2,2-3,0	25,0-33,3	17,8-32,1	36,6-50,4
Cardanois (12)	1,6-9,2	3,9-4,4	21,6-32,2	15,4-18,2	45,2-59,0
Cardois (13)	13,8-20,1	0,2-2,7	8,4-15,2	24,2-28,9	36,5-67,2
2-Metilcardois (14)	1,7-3,9	0,9-1,3	16,3-25,3	20,6-24,4	49,8-62,2

Fonte: MAZZETTO & LOMONACO (2009)

O cardanol monoinsaturado (**12A**) é uma matéria prima promissora para a indústria química e farmacêutica, especialmente quanto ao caráter aromático e alicíclico bem como pelo grupo fenol, tornando-o arcabouço molecular para modificações moleculares e obtenção de diferentes candidatos a fármacos (Figura 11) (RESCK et al., 2005; LOGRADO et al., 2005).

Figura 11: Sítios de modificação na estrutura do cardanol monoinsaturado (**12A**)

Como estratégia para obtenção de candidatos a fármacos de baixo custo e sustentável, as pesquisas no Laboratório de Desenvolvimento de Inovações Terapêuticas (LADETER) tem utilizado os componentes do LCC para desenvolvimento de candidatos a agentes terapêuticos para diferentes alvos farmacológicos (ALVES, 2015; QUEIROZ, 2015; CARDOSO, 2017; RAMOS, 2018).

Neste sentido, Ferreira (2018), em seus trabalhos de Mestrado e Doutorado, utilizou a mistura de cardanóis (**12**) – principal componente do LCC técnico – como matéria prima para planejamento racional, síntese e avaliação de candidatos a agonistas PPARs humanos. Neste sentido, destacaram-se os derivados LDT409 e LTD540A com respectivas atividades agonistas parciais sobre PPAR α (EC₅₀ 0,53 μ M e EC₅₀ 0,73 μ M) e PPAR γ (EC₅₀ 0,94 μ M e EC₅₀ 1,80 μ M), cujas respostas biológicas em modelos de doenças metabólicas estavam diretamente relacionados aos seus arcaouços moleculares.

Em continuidade ao trabalho *in vitro* desenvolvido por Ferreira (2018), Sahin (2018) conduziu estudos *in vivo* para LDT409 utilizando modelo de diabetes induzida por dieta rica em gordura. Nestes estudos, determinou a atividade em PPARs de camundongos com EC₅₀ 0,10 μ M para PPAR α e PPAR γ , e EC₅₀ 1,0 μ M para PPAR β/δ , mantendo a atividade agonista parcial em relação aos controles positivos. Adicionalmente, os estudos mostraram a influência do LDT409 frente à resposta inflamatória em camundongos obesos, em que suprimiu a expressão de genes inflamatórios TNF- α , IL-1 β e CD36.

A ativação de receptores PPAR tem sido considerada estratégia terapêutica para modulação da inflamação em diversos modelos de doenças (KOSTADINOVA et al., 2005); porém o seu papel em macrófagos, cujo processo inflamatório seja induzido por *Plasmodium berghei*, é pouco compreendido. É possível que compostos agonistas PPAR α e/ou PPAR γ modulem vias de sinalização intracitoplasmáticas induzidas pelo parasito e previnam o desenvolvimento das formas graves de malária.

Portanto, o presente trabalho representa uma contribuição no âmbito dessa linha de pesquisa quanto à avaliação dos agonistas PPARs parciais LDT409 e LTD540A, originalmente desenvolvidos por Ferreira (2018), no modelo de infecção celular *in vitro* induzido por *Plasmodium berghei* ANKA visando identificar possíveis efeitos imunomodulador/anti-inflamatório.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito imunomodulador dos derivados LDT409 e LDT540A em macrófagos J774 estimulados com *Plasmodium berghei* ANKA.

2.1.1 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos compreenderam

- Sintetizar e caracterizar os derivados LDT409 e LDT540A por meio de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C
- Determinar a citototoxicidade por MTT do LDT409 e LDT540A sobre macrófagos J774.
- Avaliar o efeito *in vitro* do LDT409 e LDT540A em macrófagos J774 estimulados com *Plasmodium berghei* ANKA, sobre a expressão das moléculas RelA e RelB.
- Avaliar o efeito *in vitro* do LDT409 e LDT540A em macrófagos J774 estimulados com *Plasmodium berghei* ANKA, sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico.
- Avaliar o efeito *in vitro* do LDT409 e LDT540A em macrófagos J774 estimulados com *Plasmodium berghei* ANKA, sobre a expressão de corpúsculo lipídico e da enzima inflamatória ciclooxigenase 2 (COX-2).

Delineamento Experimental

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

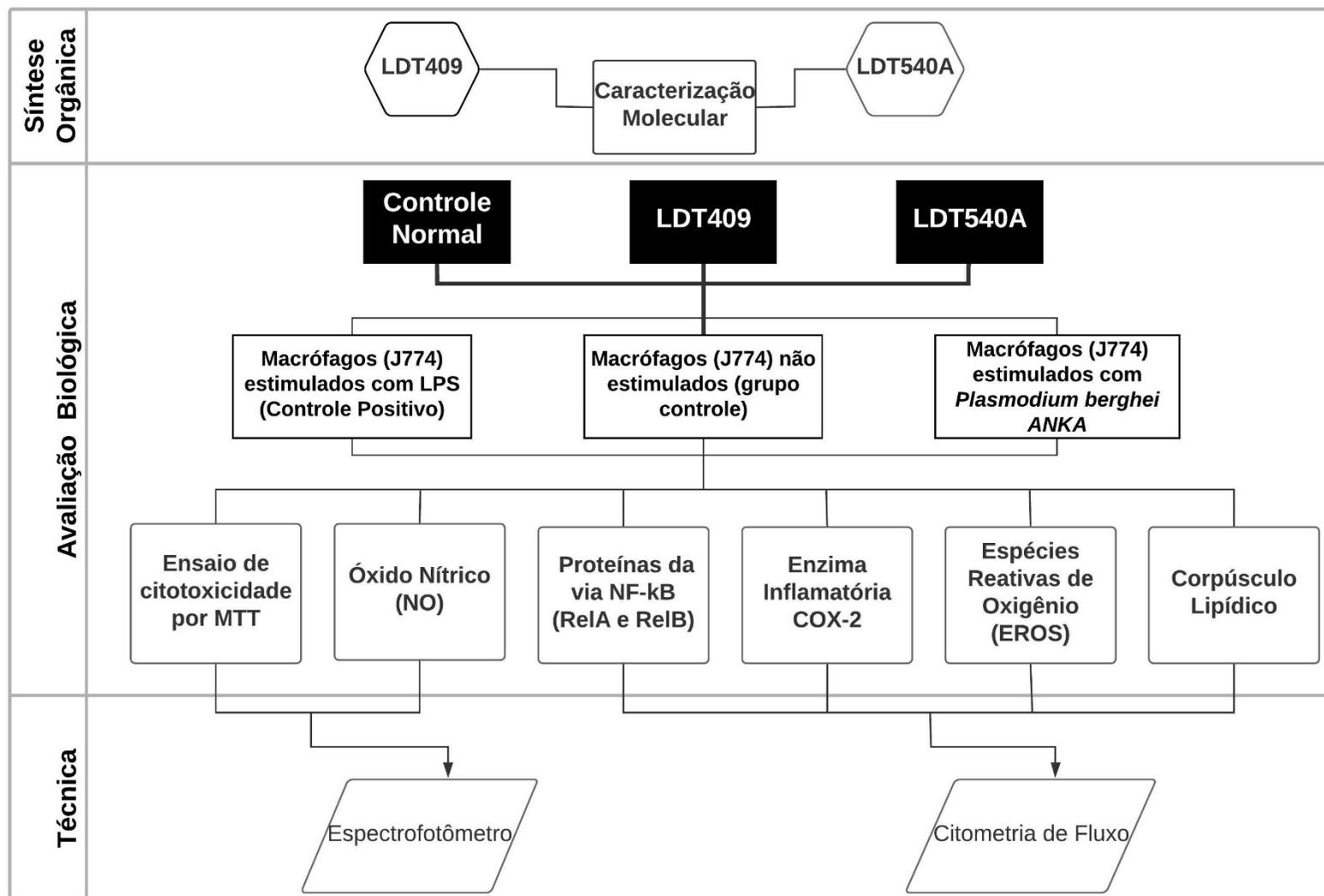
Este estudo é do tipo experimental e foi desenvolvido em três diferentes etapas (Esquema 1): síntese e caracterização dos derivados-alvos; avaliação biológica *in vitro* por determinação do efeito imunomodulador do LDT409 e o LDT540A em macrófagos J774; e tratamento dos dados obtidos por espectrofotometria e citometria de fluxo.

O procedimento experimental de síntese orgânica foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento de Inovações Terapêuticas (LDT), localizado no Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da Universidade de Brasília (UnB), desenvolvido no período de agosto de 2017 a abril de 2018, e a caracterização molecular foi determinada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono-13 realizado na Universidade Federal do Ceará (UFC).

Após confirmação estrutural, iniciou-se avaliação biológica *in vitro* no Laboratório de Imunologia Celular (LIC) da Faculdade de Saúde/Medicina da UnB, no período de dezembro de 2017 a abril de 2019.

A avaliação biológica foi conduzida utilizando três grupos estudo: Um grupo controle normal (sem tratamento), um grupo tratado com LDT409 ou com LDT540A. Que por sua vez foi dividido em três subgrupos: i. Macrófagos J774 estimulados com controle positivo LPS; ii. Macrófagos J774 não estimulados, utilizados como controle negativo; e iii. Macrófagos J774 estimulados com *Plasmodium berghei*. Os ensaios biológicos foram iniciados com a avaliação de citotoxicidade dos compostos LDT409 e LDT540A (item 5.2.4), com intuito de definir a concentração de cada composto a ser utilizados nos demais experimentos. Na sequência, foram conduzidos os ensaios de avaliação da expressão das proteínas RelA e RelB (item 5.2.5); produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (item 5.2.6); produção de óxido nítrico (NO) (item 5.2.7); e expressão de corpúsculo lipídico (item 5.2.8); e expressão da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) (item 5.2.9).

Os dados dos experimentos, obtidos por meio das técnicas de espectrofotometria e citometria de fluxo, e analisados em software Graphpad Prism 5 para análise estatística e obtenção dos gráficos.



Esquema 1. Fluxograma do delineamento experimental

Estratégia Sintética

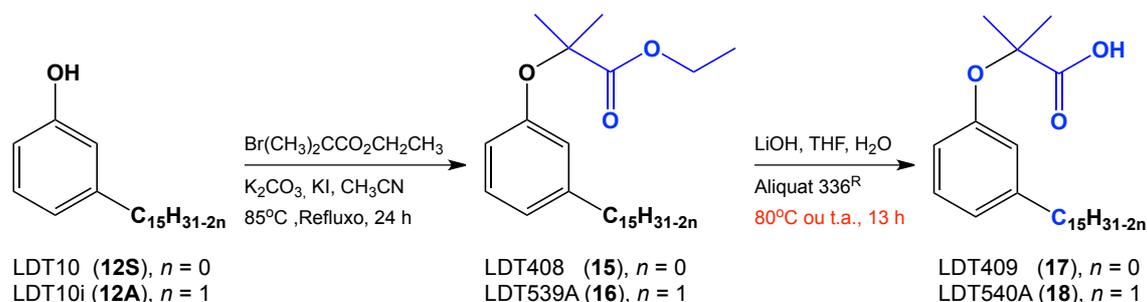
4. ESTRATÉGIA SINTÉTICA

A rota sintética para a obtenção dos compostos foi baseada em procedimentos desenvolvidos por Ferreira (2018), sendo adotadas metodologias sintéticas clássicas como a interconversão de grupos funcionais como O-alquilação e hidrólise alcalina sob condições experimentais de refluxo e/ou à temperatura ambiente.

Assim, o planejamento sintético (Esquema 2) teve início com a purificação do cardanol saturado LDT10 (**12S**) a partir do produto comercial obtido da Sigma-Aldrich®, e do cardanol monoinsaturado LDT10iA (**12A**) a partir da mistura de cardanois fornecidos pela RESIBRAS® (indústria de beneficiamento do caju). Por sua vez, cada um dos compostos de partida foi submetido a reações de O-alquilação com α -bromoisobutirato de etila, na presença de carbonato de potássio e iodeto de potássio em acetonitrila seca, para fornecer os derivados dimetilésteres LDT408 (**15**) e LDT539A (**16**). Os derivados ésteres foram submetidos a reação de hidrólise alcalina com hidróxido de lítio em mistura tetrahidrofurano/água, na presença de calalisador de transferência de fase aliquat336®, para a obtenção dos ácidos carboxílicos LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**).

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

Esquema 2: Planejamento sintético dos derivados-alvo LDT409 e LDT540A



Parte Experimental

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 METODOLOGIA SINTÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

Para a etapa de síntese dos compostos-alvo foram adquiridos reagentes e solventes das indústrias Sigma-Aldrich® (EUA) e Tedia® (EUA). O solvente acetonitrila (MeCN), utilizado para a reação de *O*-alquilação, foi previamente seco com hidreto de cálcio e destilado antes do uso.

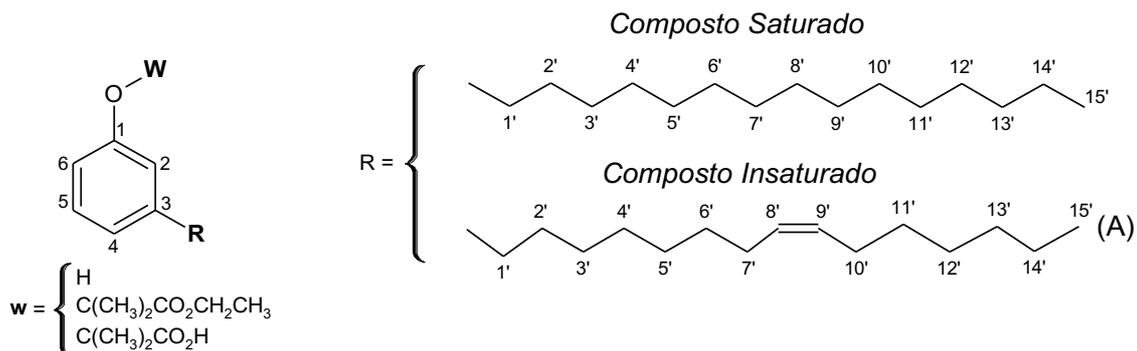
As reações de substituição nucleofílica (*O*-alquilação) e hidrólise foram realizadas em sistema de refluxo, sob agitação magnética, com aquecimento em banho de óleo, e com sistema de resfriamento de condensador com banho ultratermostático microprocessado com circulador - QUIMIS® modelo Q214M2 220V e potência de 2100 W.

As reações e purificações foram monitoradas por meio de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando cromatofolhas (5,0 x 1,5 cm) de sílica Kieselgel 60 F254 em alumínio com espessura de 0,25 mm (SILICYCLE®) e visualizadas através de lâmpada de UV (254 nm), que permitiu o cálculo do fator de retenção (RF). Para a purificação dos compostos foi utilizada cromatografia em coluna com gel de sílica G60 (70-230 mesh) SILICYCLE®.

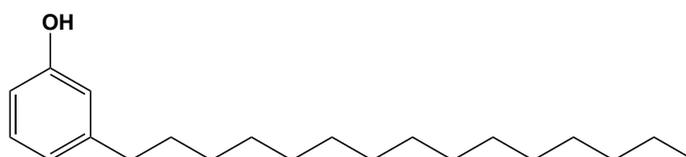
Os solventes foram evaporados à pressão reduzida utilizando evaporador rotatório Tecnal® TE-211, conectado ao sistema de alto-vácuo com pressão variando entre 10 e 0,1 mmHg.

As análises por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H) e de carbono-13 (RMN de ¹³C) foram realizadas no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará, e os espectros obtidos a 300 MHz e 75 MHz ou a 500 MHz e 125 MHz respectivamente, verificados em aparelho Bruker Avance DRX300 e DRX500. Para a realização dos testes, as amostras foram solubilizadas em CDCl₃, tendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os valores de deslocamento químico (δ) são referidos 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 12: Estrutura Markush e legendas empregadas nos assinalamentos de sinais em espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C .

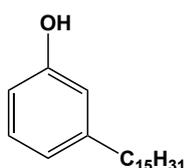


5.1.1 Obtenção do Derivado 3-Pentadecilfenol (LDT10, 12S)



O composto comercial 3-Pentadecilfenol (LDT10) foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica, eluída com mistura de hexano:acetato de etila, em rendimento de 99 % em relação à massa total aplicada.

3-Pentadecilfenol (LDT10, 12S)

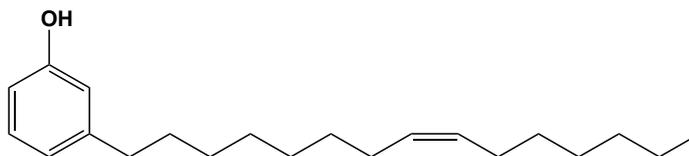


Sólido marrom claro
 Rendimento (99 %)
 R_f: 0,48 (Hex_{80%}: AcOEt_{20%})
 Fórmula molecular: C₂₁H₃₆O
 Massa Molar: 304,518 g mol⁻¹

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl₃) δ : 0,88 (t, $J = 6,5$ Hz 3H, 15'); 1,26-1,29 (m, 24H, 3'-14'); 1,57-1,62 (m, 2H, 2'); 2,56 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H, 1'); 4,77 (s, 1H, OH); 6,63-6,66 (m, 2H, 6 e 2); 6,76 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, 4); 7,14 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, 5).

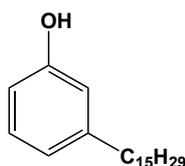
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl₃) δ : 14,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$, 15'); 22,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 14'); 29,5-29,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 3'-12'); 31,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 2'); 32,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 13'); 36,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, 1'); 112,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 6); 115,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 2); 121,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 4); 129,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, 5); 145,2 ($\underline{\text{C}}$, 3); 155,6 ($\underline{\text{C}}$, 1).

5.1.2 Obtenção do Cardanol Monoinsaturado (LDT10iA, 12A)



A mistura de cardanois (**12**) 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 11 % de nitrato de prata como fase sólida e eluída com mistura de hexano:acetato de etila, fornecendo o derivado LDT10A (**12A**) em rendimento de 37 % em relação a massa total aplicada.

Z-3-(Pentadec-8-enil)fenol (LDT10A, **12A**)



Óleo claro

Rendimento (37 %)

R_f: 0,28 (Hex80%: AcOEt 20%)

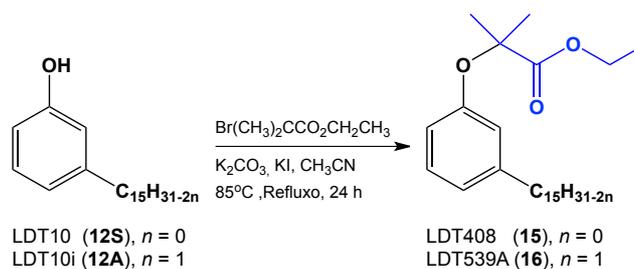
Fórmula molecular: C₂₁H₃₄O

Massa Molar: 302,502 g mol⁻¹

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 0,89-0,94 (m, 3H, 15'); 1,29-1,40 (m, 16H, 3-6, 11'-14'); 1,59-1,64 (m, 2H, 2'); 2,01-2,10 (m, 4H, 7', 10'); 2,57 (t, J = 7,7 Hz; 2H, 1'); 5,36-5,40 (m, 2H, 8' e 9'); 6,65-6,68 (m, 2H, 6 e 2); 6,77 (d, J = 7,7 Hz, 1H, 6); 7,16 (dd, J = 7,8 Hz, J = 0,8 Hz, 1H, 5).

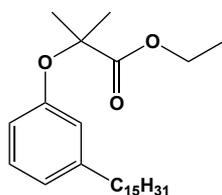
RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ: 14,3 (CH₃, 15'); 22,9 (CH₂, 14'); 27,4 (CH₂, 7', 10'); 29,2-29,9 (CH₂, 3'-6' e 11'-12'); 31,5 (CH₂, 2'); 32,0 (CH₂, 13'); 36,0 (CH₂, 1'); 112,7 (CH, 6); 115,5 (CH, 2); 121,2 (CH, 4); 129,6 (C H, 5); 130,2-130,3 (CH, 8'-9'); 145,1 (C, 3); 155,6 (C, 1).

5.1.3 Obtenção dos α,α -Dimetilésteres LDT408 (15) e LDT539A (16)



Em diferentes experimentos, a um balão (50,0 mL) foram adicionados os fenóis LDT10 (2,959 g; 9,7169 mmol), ou o LDT10iA (1,7926 g; 5,9259 mmol), carbonato de potássio (2,00 eq), iodeto de potássio (1,00 eq) e acetonitrila (15 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 à temperatura de 85°C por 24 horas. Após este período, o volume do solvente foi evaporado à pressão reduzida e à mistura foi adicionada água destilada (30,0 mL). A mistura foi extraída com acetato de etila (2 x 30,0 mL) e as frações orgânicas reunidas foram lavadas com soluções de ácido clorídrico a 10 % (30,0 mL) e salina saturada (20,0 mL). Após secagem com sulfato de sódio, o solvente foi evaporado à pressão reduzida e o resíduo purificado em coluna de gel de sílica eluída com mistura hexano-acetato de etila, fornecendo os derivados-alvo.

2-Metil-2-(3-Pentadecilfenóxi)propanoato de etila (LDT408, 15)



Óleo amarelo

Rendimento (86 %)

R_f: 0,54 (Hex_{80%}: AcOEt_{20%})

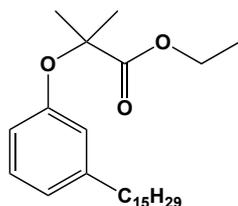
Fórmula molecular: C₂₇H₄₆O₃

Massa Molar: 418,652 g mol⁻¹

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (t, $J = 6,4$ Hz 3H, 15'); 1,23-1,26 (m, 27H, ArOC(CH₃)₂CO₂CH₂CH₃, 3'-14'); 1,59-1,64 (m, 8H, ArOC(CH₃)₂CO₂CH₂CH₃ e 2'); 2,54 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, 1'); 4,24 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H, ArOC(CH₃)₂CO₂CH₂CH₃); 6,64 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, 6); 6,69 (s, 1H, 2); 6,81 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, 4) 7,13 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H, 5).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 14,2⁸ ($\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 14,3² (CH_3 , 15'); 22,9 (CH_2 , 14'); 25,6 ($\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 29,5-29,9 (CH_2 , 3'-12'); 31,5 (CH_2 , 2'); 32,1 (CH_2 , 13'); 36,1 (CH_2 , 1'); 61,5 ($\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 79,1 ($\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 116,2 (CH , 4); 119,5 (CH , 2); 122,5 (CH , 6); 128,9 (CH , 5); 144,5 (C , 1); 155,6 (CO , 3); 174,7 ($\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

2-Metil-2-(3-((8Z)-pentadec-8-en-1-il)fenóxi)propanoato de etila (LDT539A, **16**)



Óleo incolor

Rendimento (98 %)

R_f: 0,44 ($\text{Hex}_{80\%}:\text{AcOEt}_{20\%}$)

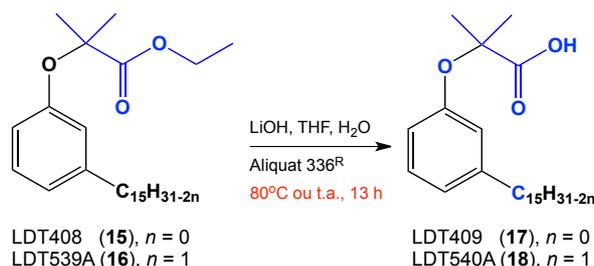
Fórmula molecular: $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_3$

Massa Molar: 416,636 g mol⁻¹

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 0,88 (t, 3H, 15'); 1,25-1,31 (m, 19H, 3'-6', 11'-14', $\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,59 (s, 8H, 2', $\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,95-2,01 (m, 4H, 7', 10'); 2,54 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H, 1'); 4,25 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, $\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 5,33-5,37 (m, 2H, 8'-9'); 6,64 (dd, $J = 8,1$ Hz, $J = 2,0$ Hz, 1H, 6); 6,69 (sl, 1H, 2); 6,80 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, 4); 7,12 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H, 5).

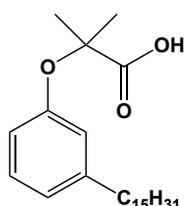
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 14,2 $\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$; 14,3 (CH_3 , 15); 22,9 (CH_2 , 14'); 25,6 (CH_2 , $\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 27,4 (CH_2 , 7' e 10'); 29,2-29,9 (CH_2 , 3'-6'; 11'-12'); 31,5 (CH_2 , 2'); 32,0 (CH_2 , 13'); 36,1 (CH_2 , 1'); 61,5 ($\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 79,1 ($\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 116,3 (CH , 6); 119,6 (CH , 2); 122,5 (CH , 4); 128,9 (CH , 5); 130,0-130,1 (CH , 8'-9'); 144,5 (C , 3); 155,6 (C , 1); 174,6 ($\text{ArOC}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

5.1.4 Obtenção dos Derivado β -oxoácidos (LDT409, 19) e (LDT540A, 20)



Em diferentes experimentos, a um balão (50,0 mL) foram individualmente adicionados o derivado LDT408 (2,529 g; 6,0408 mmol) ou o derivado LDT539A (2,40 g; 5,7695 mmol), hidróxido de lítio (4,00 eq), solubilizados em água destilada (2,0 a 4,0 mL), catalisador de transferência de fase Aliquat336® (4 gotas) e tetraidrofurano (15,0 mL). O sistema reacional foi colocado sob agitação magnética por 7 horas, com condensador acoplado a banho termostático à 10 °C, sob refluxo com temperatura interna a 80 °C ou à temperatura ambiente por 13 horas. Na sequência, a mistura foi acidificada com ácido clorídrico concentrado até pH 1,0 e extraída com acetato de etila (3 x 10,0 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 o produto obtido foi purificados em coluna de gel de sílica, eluída com hexano: acetato de etila, fornecendo os derivados-alvo.

Ácido 2-Metil-2-(3-pentadecilfenóxi)propanóico (LDT409, 17)

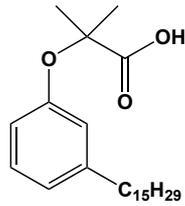


Sólido Branco
 Rendimento (89 %)
 R_f : 0,52 (Hex_{50%}:AcOEt_{50%})
 Fórmula molecular: C₂₅H₄₂O₃
 Massa Molar: 390,599 g mol⁻¹

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 0,89 (t, $J = 6,5$ Hz, 3H, 15'); 1,27 (m, 24H, CH₂, 3'-14'); 1,61 (m, 8H, ArOC(CH₃)₂CO₂H e 2'); 2,57 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H, 1'); 6,75 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, 6); 6,78 (s, 1H, 2); 6,89 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, 4); 7,18 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H, 5).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 14,3 (CH₃, 15'); 22,9 (CH₂, 14'); 25,3 (ArOC(CH₃)₂CO₂H); 29,5-29,9 (CH₂, 3'-12'); 31,5 (CH₂, 2'); 32,1 (CH₂, 13'); 36,0 (CH₂, 1'); 79,7 (ArOC(CH₃)₂CO₂H); 117,7 (CH, 6); 121,1 (CH, 2); 123,7 (CH, 4); 129,1 (CH, 5); 144,8 (C, 3); 154,5 (C, 1); 178,8 (ArOC(CH₃)₂CO₂H).

Ácido 2-metil-2-(3-((8Z)-pentadec-8-en-1-il)fenóxi)propanóico (LDT540A, **18**)



Óleo incolor

Rendimento (70 %)

R_f: 0,44 (Hex_{50%}: AcOEt_{50%})

Fórmula molecular: C₂₅H₄₀O₃

Massa Molar: 388,583 g mol⁻¹

RMN de ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ: 0,87-0,89 (m, 3H, 15'); 1,27-1,31 (m, 16H, 3'-6', 11'-14'); 1,61 (sl, 8H, 2H, ArOC(CH₃)₂CO₂H e 2'); 2,01-2,06 (m, 4H, 7' e 10'); 2,57 (t, J = 7,5 Hz, 2H, 1'); 5,36 (sl, 2H, 8'-9'); 6,75 (d, J = 7,7 Hz, 1H, 6); 6,78 (s, 1H, 2); 6,89(d, J = 7,4 Hz, 1H, 4); 7,18 (t, J = 7,7 Hz, 1H, 5).

RMN de ¹³C (75 MHz; CDCl₃) δ: 14,3 (CH₃, 15'); 22,9 (CH₂, 14'); 25,3 (CH₂, ArOC(CH₃)₃CO₂H); 27,4 (CH₂, 7' e 10'); 29,2-29,9 (CH₂, 3'-6', 11'-12'); 31,5 (CH₂, 2'); 32,0 (CH₂, 13'); 36,0 (CH₂, 1'); 79,7 (ArOC(CH₃)₂CO₂H); 117,7 (CH, 6); 121,1 (CH, 2); 123,7 (CH, 4); 129,1 (CH, 5); 130,0-130,1 (CH, 8'-9'); 144,8 (C, 3); 154,5 (C, 1); 178,6 (ArOC(CH₃)₃CO₂H).

5.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

Uma vez sintetizados e caracterizados por métodos espectroscópicos, os derivados foram utilizados para os ensaios biológicos *in vitro*. Nesta fase do experimento foram utilizadas a linhagem celular macrófagos J774A.1.

Para o desenvolvimento das avaliações *in vitro* foi necessário a utilização de camundongos da espécie *Mus musculus* para a manutenção da virulência da cepa de *Plasmodium berghei* ANKA e a obtenção de hemácias parasitadas e não parasitadas, utilizadas como estímulo aos macrófagos. Neste sentido, este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília – UnB (Protocolo nº 84/2018).

5.2.1 Inóculo

A linhagem de *Plasmodium berghei* ANKA foi fornecida pelo Biorepositório do Laboratório de Malária do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade de Brasília. A cepa mantida em nitrogênio líquido foi descongelada à temperatura ambiente e inoculada (100 µL) por via intraperitoneal em camundongos Swiss. A parasitemia foi monitorada por meio de distendido sanguíneo fixado em lâmina de vidro, utilizando coloração panótica. Quando a parasitemia estava acima de 10 % os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e o sangue coletado por punção cardíaca utilizando seringa de 1 mL heparinizada. Em seguida 100 µL do sangue era injetado em outro camundongo Swiss. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes para garantir a virulência da cepa em animal a partir da terceira passagem.

5.2.2 Hemácias Parasitadas com *Plasmodium berghei* e não parasitadas utilizadas como estímulo

Quando a parasitemia do camundongo de terceira passagem estava superior a 10 %, o animal foi eutanasiado para a coleta de aproximadamente 600 µL de sangue por punção cardíaca. O sangue foi centrifugado a 1200 G, a nuvem leucocitária removida e as hemácias ressuspensas em solução salina tamponada com fosfato (STF). O teor de hemácias totais na suspensão foi quantificada em câmara de Neubauer. Paralelamente, a parasitemia no sangue dos animais infectados foi avaliada por distendido sanguíneo fixado em lâmina de vidro corada com coloração panótica por meio de contagens de 500 hemácias na lâmina e o número de hemácias parasitadas. Em seguida a quantidade total de hemácias foi diluída em STF pH 7,2 (estéril) para obtenção de suspensão de concentração de 1×10^6 hemácias parasitadas para cada 100 µL. O mesmo procedimento foi repetido para a obtenção de hemácias livres de parasitos, obtido de camundongos saudáveis. A suspensão de hemácias não parasitadas foi utilizada para ajustar a parasitemia para 10 % na suspensão de hemácias parasitadas e como controle. A suspensão de hemácias não parasitadas e hemácias parasitadas (10 % parasitemia) foram utilizadas como estímulos aos macrófagos.

5.2.3 Cultivos de Macrófagos J774

A linhagem de células J774A.1 (ATCD® TIB-67™) utilizadas nesses experimentos foram cedidas pelo Laboratório de Parasitologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. As células foram descongeladas em 10 mL de meio de descongelamento em banho Maria, transferidas para tubo de centrifuga (15 mL) e centrifugadas a 1700 G por 10 minutos (procedimento repetido por duas vezes). O sobrenadante foi removido e o precipitado ressuspensionado em 10 mL de meio de cultura DEMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - GIBCO®) suplementado com soro fetal bovino (SFB) e combinação de antibióticos penicilina/estreptomicina. Este foi adicionado a garrafas de cultivo celular KASVI (K11- 2050 com filtro) para incubação por 24 horas, a 37 °C em câmara úmida com 5 % de CO₂. Para o procedimento de manutenção das culturas, a cada dois dias eram removidos 5 mL do sobrenadante e acrescentado o mesmo volume de meio de cultura, permanecendo sob as mesmas condições de incubação. Após a realização de três manutenções as células foram trocadas para placas não aderentes e colocadas para crescer sob as mesmas condições.

5.2.4 Avaliação da Citotoxicidade por ensaio de MTT

A avaliação da atividade citotóxica dos compostos sobre os macrófagos J774 foi realizada por meio de ensaio colorimétrico do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium] (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). O método baseia-se na clivagem de anéis tetrazólio presentes na estrutura do MTT por desidrogenases mitocondriais, resultando na formação de cristais de formazan (coloração violeta), o qual insolúvel em água é extraído com dimetilsulfóxido (DMSO). Apenas as células viáveis apresentam capacidade de redução do MTT, uma vez que as células inviáveis não apresentam atividade mitocondrial, impossibilitando a clivagem do reagente (FERREIRA et al., 2013).

O número de células sobreviventes é proporcional a concentração de formazan mensurada pela cor da solução e quantificada em espectrofotômetro ou leitor de microplacas (FERREIRA et al., 2013).

Em placas de 96 escavações de fundo chato e estéreis (KASVI®) foram plaqueados 1×10^4 macrófagos por poço, e incubados com os derivados LDT409 ou LDT540A pré-diluídos com 1 % de DMSO (Sigma-Aldrich) e DEMEM. O esquema de diluição seriada obedeceu às concentrações 150 μM , 125 μM , 100 μM , 75 μM , 50 μM e 25 μM por 24 horas a 37 °C em câmara úmida com 5 % de CO_2 . O grupo controle (células sem tratamento) e o grupo tratado com DMSO também foram avaliados. Após o período de incubação foi adicionado 10 μL de MTT na concentração de 5 mg/mL em cada poço, seguido de microagitação e incubação por 4 horas a 37 °C em câmara úmida com 5 % de CO_2 . Em seguida foram adicionados 50 μL de DMSO para interromper a reação e a leitura da absorbância realizada em espectrofotômetro (Spectramax plus 384, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) à 570 nm. O experimento foi realizado por uma vez em sextuplicata, e duas vezes em triplicata, e a viabilidade celular de cada poço calculada de acordo com a fórmula:

$$Viabilidade = \frac{\text{Absorbância do grupo tratado}}{\text{Média da absorbância do controle}} \times 100 \%$$

Os dados de viabilidade celular foram transferidos para o software Graphpad Prism 5 para Windows (GraphPad Software – San Diego, EUA), para a análise estatística.

Tendo como base os resultados de viabilidade para os macrófagos J774, e os estudos de viabilidade celular dos derivados LDT409 (17) e LDT540A (18) em cardiomiócitos (H9c2) e células de rim embrionário humano (HEK293) desenvolvido Sahin (2017), a concentração de 25 μM foi padronizada, para ambos os compostos, para utilização nos ensaios subsequentes.

5.2.5 Avaliação da Concentração de Proteínas da Via Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B)

A quantificação das proteínas da via NF- κ B RelA (P65) e RelB (p68) em macrófagos J774 foram determinadas por reação antígeno-anticorpo com detecção por citometria de fluxo. Em placas de 96 escavações de fundo chato e estéreis (KASVI®) foram plaqueadas $1,5 \times 10^5$ macrófagos J774 por poço, e mantidas em câmara úmida a 37 °C por 2 horas para permitir a aderência celular. Em seguida, as células foram incubadas com 25 μM dos compostos LDT409 ou

LDT540 pré-diluídos com 1 % de DMSO (Sigma-Aldrich) e DEMEM completo. As células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo, enquanto que o controle positivo foi tratado com LPS 1 µg/mL. Como estímulos celulares foram utilizadas hemácias não parasitadas ou parasitadas com *Plasmodium berghei* ANKA em densidade de $7,5 \times 10^5$ em meio de cultura DEMEM completo, mantidas em incubação a 37 °C em câmara úmida com 5 % de CO₂ por 24 horas.

Após período de incubação, a placa foi centrifugada a 1800 G por 10 minutos, o sobrenadante removido, e as células lavadas por duas vezes com STF pH 7,2. Após nova centrifugação a 1700 G por 10 minutos, o sobrenadante removido e adicionado 200 µL de paraformaldeído a 2 %, permanecendo por 20 minutos. Após fixação, as células foram lavadas por duas vezes com STF, pH 7,2, centrifugadas a 1700 G por 10 minutos, e acrescida solução de BSA a 1 % em STF pH 7,2 (STF/BSA) por 20 minutos, seguida lavagem com STF e centrifugação a 1700 G por 10 minutos. Após esse período, as células foram tratadas com solução de permeabilização STF/BSA® acrescido de 1 µM de EDTA e 0,2 % de triton X-100 (STF/BSA/EDTA/Titon) por 20 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, as células foram lavadas com STF e centrifugadas a 1700 G por 10 minutos, o sobrenadante removido e adicionados aos poços 200 µL da solução STF/BSA®, permanecendo por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, em cada poço foram adicionados 0,25 µL do anticorpo policlonal IgG anti-RelA ou anti-RelB de camundongo, produzido em cabra, diluídos em 150 µL da solução STF/BSA®, conforme instrução do fabricante. Depois esse período as células foram lavadas com STF, por duas vezes para remover o excesso de anticorpo primário, seguida de incubação com STF/BSA® acrescido de 0,2 % de Triton X-100. Após permeabilização e lavagem foram adicionados aos poços 200 µL de solução STF/BSA®, e conforme instrução do fabricante, adicionado 0,3 µL do anticorpo secundário policlonal IgG produzido em rato e marcado com o fluorocromo Alexa Fluóor 488. As células foram mantidas ao abrigo da luz, em câmara úmida a 37 °C por 90 minutos. Em seguida mais duas lavagens foram realizadas e adicionados 200 µL de solução STF/BSA® seguida de homogeneização para desaderência celular. O experimento foi realizado em triplicata, por três vezes. Foram utilizadas amostras de células J774 não marcadas com anticorpo, e amostras de células marcadas com fluorocromo (controle isotópico) para a calibração do citômetro. Todas as

amostras foram analisadas em citômetro de fluxo BD LRS FORTESSA, e o refinamento dos dados obtido por software FlowJo® e a análise estatística realizada em software Graphpad Prism 5 para Windows (GraphPad Software – San Diego, EUA).

Tabela 3: Anticorpos primários e secundários conforme antígenos

Antígeno Intracelular		
Proteína	Anticorpo Primário	Anticorpo secundário
RelA	Rato anti-p65-AF488® - Santa Cruz Biotechnology®, (F-6) - SC8008	_____
RelB	Rato anti-p68 - Santa Cruz Biotechnology®, (C-4) - 48379	Anti-rato-AF®350 – Molecular Probes®, A11045

5.2.6 Avaliação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)

A produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos foi avaliada utilizando a sonda dicetato de 2',7'-diclorofluoresceína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), produto incolor de alta permeabilidade celular que após oxidação por EROS é convertido em produto fluorescente. Este apresenta cargas negativas que impedem a saída da célula, sendo detectado por citometria de fluxo, permitindo determinar o grau de estresse oxidativo celular.

Em placas de 96 escavações de fundo chato e estéreis (KASVI®) foram plaqueadas $1,5 \times 10^5$ macrófagos por poço e incubadas por 2 horas a 37 °C em câmara úmida com 5 % de CO₂ para permitir a aderência celular. Em seguida, as células foram tratadas ou não com 25 µM de LDT409 ou LDT540 pré-diluído com 1 % de DMSO (Sigma-Aldrich) e DEMEM completo. Células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo, e células tratadas com LPS 1µg/mL diluído em DEMEM completo como controle positivo. Foram utilizados como estímulos macrófagos hemácias livres de parasitos ou hemácias parasitadas com *Plasmodium berghei* ANKA em densidade de $7,5 \times 10^5$ diluídos em meio de cultura DEMEM completo. As células foram mantidas em câmara úmida a 37 °C com 5 % de CO₂ por 24 horas. Após o período de incubação, a placa foi centrifugada a 1400 G por 10 minutos, o sobrenadante removido e as células

lavadas com 200 μ L de solução salina tamponada com fosfato (STF) pH 7,2. Após nova centrifugação sob as mesmas condições, o sobrenadante foi removido e adicionada a solução de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína 1 μ M diluído em DEMEM completo, mantida em incubação por 30 minutos a 37 °C em câmara úmida com 5 % de CO₂. Os experimentos foram realizados por uma vez em quadruplicata e duas vezes em triplicada. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo BD LRS FORTESSA programado a 485 nm de excitação e 530 nm de emissão. Os dados de citometria foram analisadas pelo software FlowJo®, a análise estatística realizada em software Graphpad Prism 5 para Windows (GraphPad Software – San Diego, EUA).

5.2.7 Avaliação da Produção de Óxido Nítrico

O óxido nítrico (ON), regulador produzido na ativação de macrófagos, é um radical livre reativo de meia-vida curta, de difícil determinação. Conseqüentemente, a mensuração de seu metabólito nitrito/nitrato é frequentemente utilizado para avaliar a produção de NO.

Neste sentido, a produção de NO foi mensurada por espectrofotometria baseada na reação de Griess – que consiste em combinar dois reagentes, a sulfanilamida (2 % em H₃PO₄ a 5 %) e solução NEED (N-1-naftilenodiamina 0,2 % em água destilada) em proporção 1:1 (TATSCH, 2011). A concentração de nitrito/nitrato presente na amostra reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar o diazocomposto que, por sua vez, reage com o NEED gerando composto de coloração vermelha (RAMOS et al., 2006). Para o experimento em placas de 96 escavações de fundo chato e estéreis (KASVI®) foram plaqueadas 1,5x10⁵ macrófagos J774 por poço, mantidas em câmara úmida a 37 °C por 2 horas para permitir a aderência celular. Em seguida, as células foram incubadas com 25 μ M dos compostos LDT409 ou LDT540 pré-diluídos com 1 % de DMSO (Sigma-Aldrich) e DEMEM completo. As células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo, e controle positivo tratadas com LPS 1 μ g/mL. Foram utilizados como estímulos celulares hemácias não parasitadas ou hemácias parasitadas com *Plasmodium berghei* ANKA em densidade de 7,5x10⁵

células/poço em meio de cultura DEMEM completo, mantidas em incubação a 37°C em câmara úmida com 5 % de CO₂ por 24 horas. Após período de incubação, ao sobrenadante foi adicionado 100 µL do reagente de Griess e a leitura realizada em espectrofotômetro em 450 nm. A curva padrão de óxido nítrico realizada por diluição seriada de nitrito de sódio de 0 a 200 µM a partir de solução estoque a 1 M. O experimento foi realizado por três vezes em triplicata e os dados espectrofotometria analisadas pelo software FlowJo®, seguido de análise estatística realizada em software Graphpad Prism 5 para Windows (GraphPad Software – San Diego, EUA).

5.2.8 Avaliação da Produção de Corpúsculo Lipídico

A quantificação intracelular de corpos lipídicos nos macrófagos J774 foi determinada pela utilização da sonda Bodipy® 493/503 [2-[1-(3,5-Dimetil-2H-pirrol-2-ilideno)etil]-3,5-dimetil-1H-pirrolato-N1-N2]difluoro]boro, Sigma Aldrich), marcador de gotículas de lipídios neutros. Em placas de 96 escavações de fundo chato e estéreis (KASVI®) foram plaqueadas 1,5x10⁵ macrófagos J774 por poço e mantidas em câmara úmida a 37 °C por 2 horas, para permitir a aderência celular. Em seguida, as células foram incubadas com 25 µM dos compostos LDT409 ou LDT540 pré-diluídos com 1 % de DMSO (Sigma-Aldrich) e DEMEM completo. As células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo, e controle positivo tratadas com LPS 1µg/mL. Foram utilizados como estímulos celulares hemácias livres de parasitos ou parasitadas com *Plasmodium berghei* ANKA em densidade de 7,5x10⁵ em meio de cultura DEMEM completo, e mantidas em incubação a 37 °C em câmara úmida com 5 % de CO₂ por 24 horas.

Após período de incubação, a placa foi lavada uma vez com STF pH 7,2 e incubada com 200 µL de Bodipy® na diluição de 1:5000 por 30 minutos, conforme instrução do fabricante. Após incubação, as células foram lavadas uma vez com STF pH 7,2 e fixadas com paraformaldeído a 4 %. O experimento foi realizado por três vezes em triplicata. Foi utilizado um grupo de células marcado com a sonda, e um grupo não marcado para a calibração do equipamento. Todas as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo BD LRS FORTESSA a 488 nm de excitação e 530 nm de emissão, seguido de análise pelo software FlowJo®, e a análise estatística realizada em Graphpad Prism 5 para Windows (GraphPad Software – San Diego, EUA).

5.2.9 Quantificação da expressão da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2)

A quantificação da COX-2 nos macrófagos J774 foi determinada por reação antígeno-anticorpo e detectada por citometria de fluxo. Em placas de 96 escavações de fundo chato e estéreis (KASVI®) foram plaqueadas $1,5 \times 10^5$ macrófagos por poço, e mantidas em câmara úmida a 37°C por 2 horas para permitir a aderência celular. Em seguida, as células foram incubadas com 25 µM dos compostos LDT409 ou LDT540 pré-diluídos com 1 % de DMSO (Sigma-Aldrich) e DEMEM completo. As células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo e as tratadas com LPS 1 µg/mL como controle positivo. Foram utilizados como estímulos celulares hemácias livres de parasitos ou parasitadas com *Plasmodium berghei* ANKA em densidade de $7,5 \times 10^5$ em meio de cultura DEMEM completo, e mantidas em incubação a 37°C em câmara úmida com 5 % de CO₂ por 24 horas.

Após período de incubação, as células J774 foram lavadas, fixadas com paraformaldeído, bloqueadas com BSA 1 % e permeabilizadas, conforme descrito no item 5.2.5. Após permeabilização, foram incubadas por 24 horas com 0,25 µL do anticorpo policlonal IgG anti-Cox-2 produzido em cabra, conforme instrução do fabricante. Depois desse período as células foram lavadas e permeabilizadas, conforme item 5.2.5 e incubadas com 0,3 µL do anticorpo secundário IgG produzido em coelho e marcado com FICT, diluído em 200 µL de solução STF/BSA®, conforme instrução do fabricante. A placa foi mantida ao abrigo da luz e em câmara úmida a 37 °C por 90 minutos. Em seguida mais duas lavagens foram realizadas, e adicionados 200 µL de solução STF/BSA® seguido de homogeneização para desaderência celular. O experimento foi realizado por três vezes em triplicata. Foram utilizadas amostras de macrófagos J774 não marcadas com anticorpo, e amostras marcadas com anticorpo conjugado com fluorocromo (controle isotípico), foram utilizados para a calibração do citômetro. Todas as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo BD LRS FORTESSA, os dados refinados pelo software FlowJo®, e a análise estatística realizada pelo software Graphpad Prism 5 para Windows (GraphPad Software – San Diego, EUA).

Tabela 4: Anticorpos primários e secundários conforme antígenos

Antígeno Intracelular		
Proteína	Anticorpo Primário	Anticorpo secundário
COX-2	cabra anti-COX-2 - Santa Cruz Biotechnology®, (N-20) – SC1746	Anti-Cabra - Merck® - FICT – F7367

5.2.10 Análise Estatística

Inicialmente, os dados foram analisados em relação à normalidade das amostras pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e D'Agostino e Pearson. Os grupos considerados dentro da normalidade e variância das amostras foram analisados por meio de testes estatísticos paramétricos e, quando não enquadrados dentro da normalidade, por testes estatísticos não paramétricos.

Para as análises realizadas com mais de dois grupos independentes foi utilizado o teste ANOVA para grupos paramétricos, acompanhados do método Tukey para comparação entre os grupos; ou Kruskal-Wallis para amostras não paramétricas, seguido do método comparativo de Dunn.

Para a análise entre dois grupos independentes foi utilizada o teste T-student para amostras paramétricos e/ou Mann-Whitney para não paramétricos. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando menores que 0,05 ($p < 0,05$). As análises e os gráficos foram realizados empregando-se o software Graphpad Prism 5 para Windows (GraphPad Software – San Diego, EUA).

Resultados

6. RESULTADOS

6.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

O planejamento sintético vizou a obtenção de moléculas agonistas parciais de receptores PPAR, LDT409 e LDT540A, desenvolvidas por Ferreira (2018). As metodologias empregadas compreenderam procedimentos clássicos de interconversão de grupos funcionais como a O-alkilação com bromoisobutirato de etila dos cardanois saturado (**12S**) e monoinsaturado (**12A**), seguida de hidrólise alcalina dos ésteres **15** e **16**, em condições experimentais sob aquecimento em banho de óleo ou à temperatura ambiente para obtenção dos produtos finais **17** e **18**.

Os compostos reproduzidos estão compreendidos no pedido de propriedade intelectual intitulado “*Novel ligands of PPAR α /d/g derived from cashew nut shell liquid (CNSL) with application to metabolic and Alzheimer’s disease*”, número 10002758, depositado em 26 de maio de 2014 no *Canadian Intellectual Property Office*.

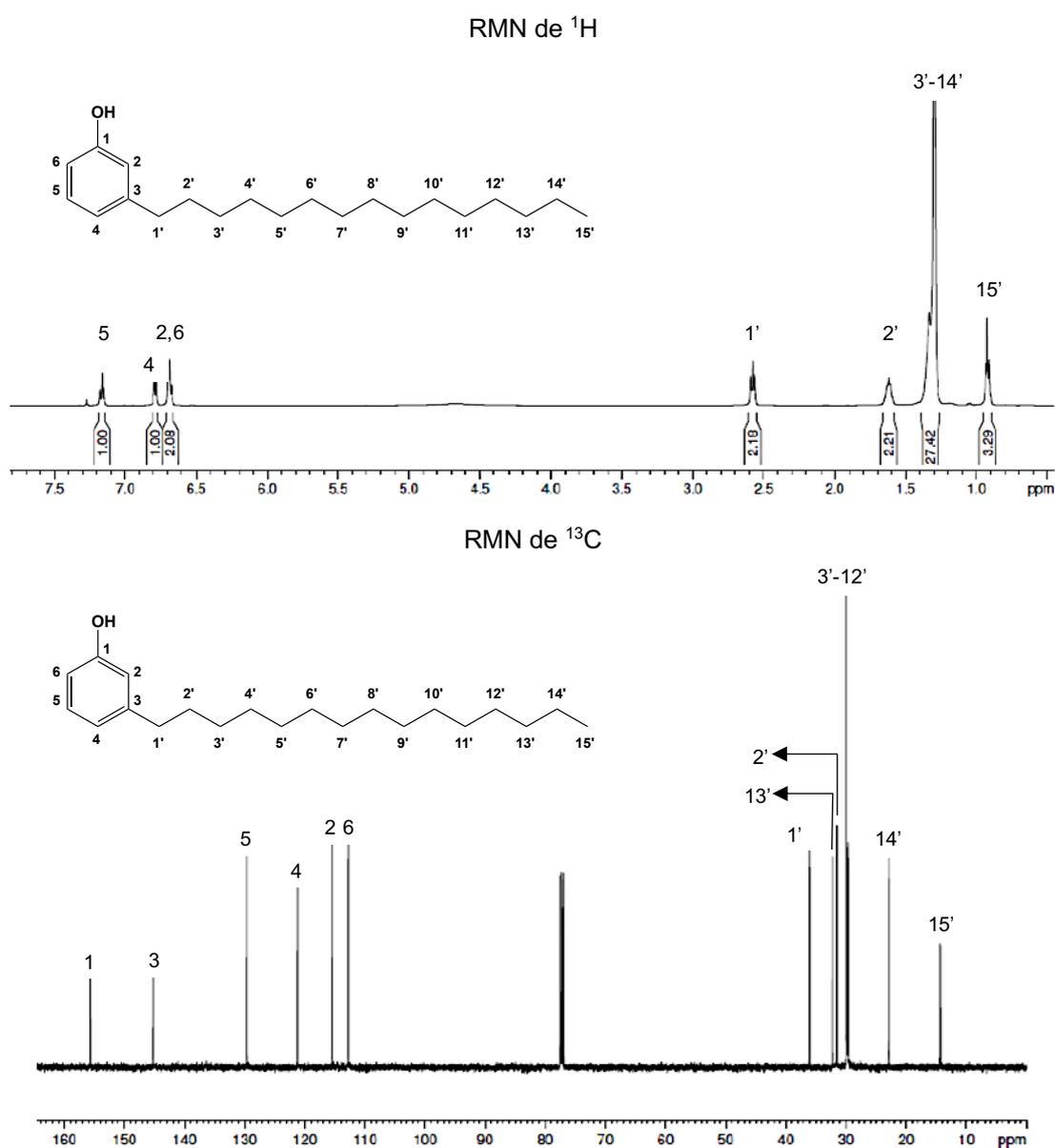
6.1.1 Obtenção do Cardanol Saturado (LDT 10, **12S**)

O cardanol saturado (**12S**) foi obtido a partir da purificação do produto comercial 3-pentadecilfenol (SIGMA-ALDRICH®), em coluna cromatográfica em gel de sílica eluída com mistura de hexano;acetato de etila, levando à obtenção de sólido marrom claro em rendimento de 99 %, caracterizado em CCD como única mancha (Rf 0,48 em Hex_{80%}: AcOEt_{20%}).

A estrutura molecular do LDT10 (**12S**) foi confirmada por meio de análise espectroscópica de RMN de ¹H e de ¹³C (Figura **13**). Neste sentido, o grupo metila foi assinalado como tripleto em 0,88 ppm (Anexos 1 a 3, Págs.) e 14,3 ppm em RMN de ¹³C (Anexos 4 e 6, Pág.) para o grupo metila terminal. Os hidrogênios metilênicos 3’ a 14’ da cadeia alifática foram assinalados como multipletos com deslocamento químico entre 1,26 ppm e 1,29 ppm; enquanto o multipletos assinalado entre 1,57 ppm e 1,62 ppm bem como o tripleto em 2,58 ppm foram atribuídos aos hidrogênios 2’ e 1’ respectivamente. A cadeia saturada do derivado **12S** (C_{1’-15’}) foi confirmada pelos deslocamentos de 14,3 ppm a 36,1 ppm.

Os deslocamentos dos hidrogênios aromáticos – identificados como multipletto (H6 e H2), dupletto (H4) e triplicto (H5) – variaram de 6,63 ppm a 7,14 ppm no espectro de RMN de ^1H . Estes dados foram corroborados pelos deslocamentos entre 112,7 ppm e 129,6 ppm em RMN de ^{13}C . Adicionalmente, os deslocamentos mais desblindados em 145,2 ppm e 155,6 ppm foram assinalados para os carbonos quaternários 3 e 1, respectivamente. Por sua vez, O deslocamento referente à hidroxila fenólica foi identificado em 4,77 ppm no espectro de RMN de ^1H .

Figura 13: Espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C do derivado LDT10 (**12S**).

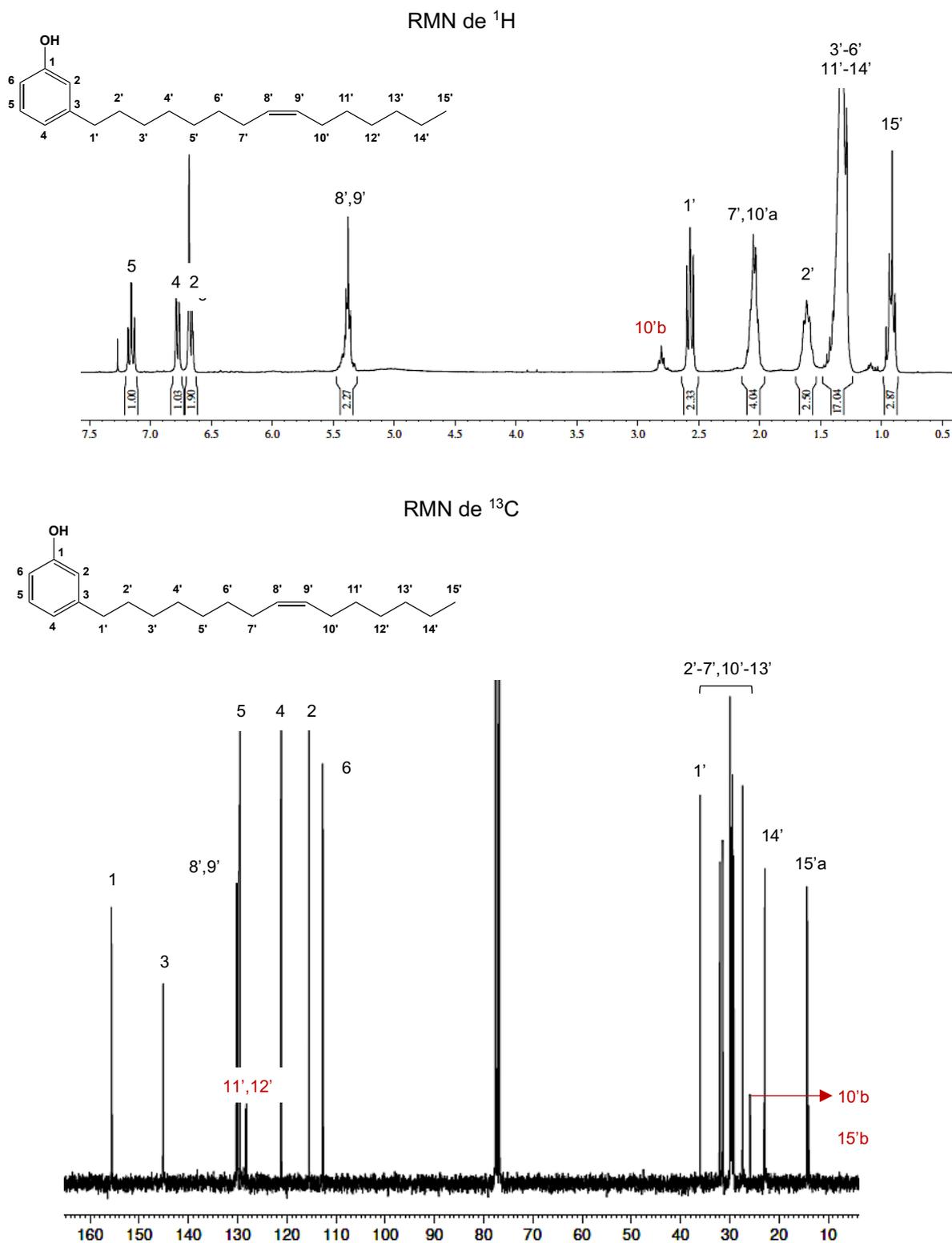


6.1.2 Obtenção do Cardanol monoinsaturado (LDT 10A, 16)

Para a obtenção do cardanol monoinsaturado (**12A**) a partir da mistura de cardanois (**12**) (Figura 10, Pág. 41) foi realizada a purificação em coluna cromatográfica contendo gel de sílica impregnada com 11 % de nitrato de prata como fase estacionária. Esta fase possibilita a separação dos diferentes compostos insaturados pela interação das duplas ligações com íons de prata do tipo cátion- π , de forma que quanto maior o número de insaturações presentes na estrutura química maior afinidade pela fase sólida e maior o tempo de retenção na coluna (ANDREÃO, 2010). A metodologia forneceu o derivado LDT10A (**12A**) em rendimento de 37 %, caracterizado em CCD como única mancha (R_f 0,28 em Hex_{80%}: AcOEt_{20%}).

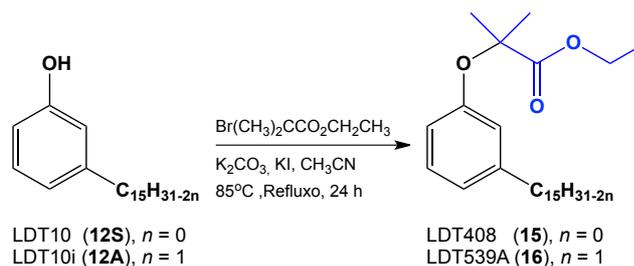
A estrutura molecular do derivado LDT10A (**12A**) foi confirmada por análise espectroscópica de RMN de ^1H e de ^{13}C (Figura 14). O grupo metila terminal 15' foi identificado como multipletto entre 0,89 ppm e 0,94 ppm (Anexos 3, Pág.). Entretanto, foram identificados dois diferentes deslocamentos em RMN de ^{13}C assinalados em 13,9⁹ ppm (LDT10B, **12B**) e 14,3 ppm (LDT10A, **12A**) para o grupamento metila terminal (Anexo 5, Pág.). Desta forma, constatamos que a coluna dopada com AgNO_3 foi eficiente para reter o derivado triênico (LDT10C (**12C**), e talvez grande parte do LDT10B (**12B**), mas não permitiu obter o derivado monoinsaturado de forma pura. Os hidrogênios metilênicos da cadeia alifática foram assinalados em três multipletos entre 1,29 ppm e 1,40 ppm (3'-6' e 11'-14'); 1,59 ppm e 1,64 ppm (2') e 2,01 ppm e 2,10 ppm (7' e 10') e confirmados pelos sinais entre 22,9 ppm (14'); 27,4 ppm (7' e 10'); 29,2 ppm e 29,9 ppm (3'-6' e 11'-12'); 31,4 ppm (2') e 32,0 ppm (13') no espectro de RMN de ^{13}C . Os hidrogênios assinalados como tripleto em 2,57 ppm no espectro de RMN de ^1H foi atribuído ao hidrogênio 1', evidenciado pelo sinal em 36,0 ppm em RMN de ^{13}C . A subunidade monoinsaturada do derivado **12A** foi confirmada pelo assinalamento do grupo vinilideno 8'-9' como multipletto entre 5,36 ppm e 5,40 ppm em RMN de ^1H , confirmado pelos sinais em 130,2 ppm e 130,3 ppm em RMN de ^{13}C . Corroborando com o indício da presença do derivado LDT10B (**12B**) os hidrogênios bis-alílicos (10'b) foram assinalados pela presença de multipletto na faixa de 2,79 ppm a 2,83 ppm (RMN de ^1H) e sinal em 25,9 ppm (RMN de ^{13}C). Adicionalmente, o vinilideno 11'-12'b-c foi assinalado como multipletto na faixa de 5,37 ppm a 5,40 ppm no espectro de RMN de ^1H e confirmados por RMN de ^{13}C pela presença de sinais entre 128,2 e 128,4 ppm.

Figura 14: Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C do derivado LDT10A (**12A**).



Ainda que o derivado LDT10A (**12A**) estivesse impuro com o derivado LDT10B (**12B**), foi dado prosseguimento ao planejamento sintético para posterior purificação do derivado-alvo LDT540A (**18**).

6.1.3 Obtenção dos derivados beta-oxiésteres LDT408 (**15**) e LDT539A (**16**)



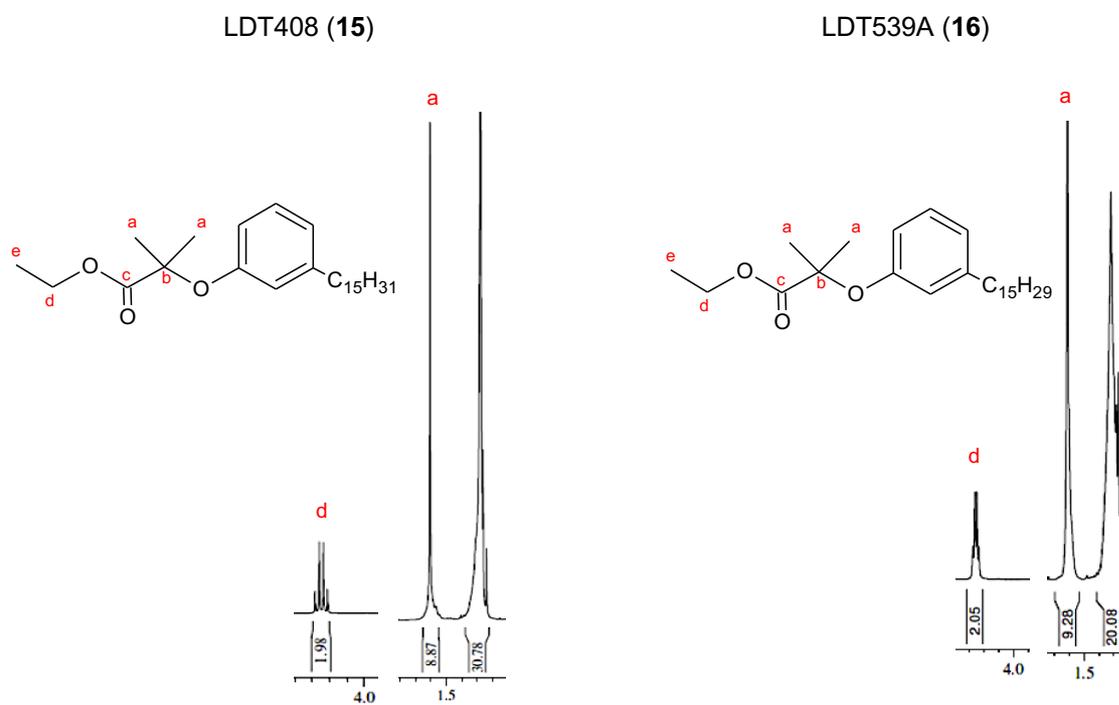
Os produtos de partida LDT10 (**12S**) e LDT10A (**12A**), em experimentos independentes, foram submetidos à reação de O-alkilação com o bromoisobutirato de etila conduzindo aos produtos intermediários LDT408 (**15**) e LDT539A (**16**). O composto **15**, óleo amarelo caracterizado em CCD como única mancha (R_f 0,54 em $\text{Hex}_{80\%}:\text{AcOEt}_{20\%}$), foi obtido em rendimento de 86 %. O derivado **16** foi obtido em rendimento de 98 % como óleo incolor e caracterizado em CCD como única mancha (R_f 0,44 em $\text{Hex}_{80\%}:\text{AcOEt}_{20\%}$).

A conversão dos compostos **12S** e **12A** nos derivados **15** e **16** foi confirmadas pela presença do metileno do grupo carbetóxi assinalado como respectivos quartetos em 4,24 ppm e 4,28 ppm em RMN de ^1H (Anexo 3 e 5, Págs.), confirmados pelos deslocamentos químicos em 61,5 ppm em RMN de ^{13}C para ambos (Anexo 4 e 6, Págs.). Os grupos metila ligados no carbono alfa ao grupo carbetoxila foram assinalados em RMN de ^1H como multipletos entre 1,59 ppm e 1,64 ppm (**12S**) e simpleto em 1,59 ppm (**12A**), corroborados pelo deslocamento químico em 25,6 ppm em RMN de ^{13}C para ambos. Adicionalmente, os espectros de RMN de ^{13}C revelaram a presença do carbono quaternário alfa ao grupo carbetóxi evidenciado pelo sinal em 79,1 ppm para ambos os compostos, enquanto que os grupos carbonila foram identificados pelos respectivos assinalamentos em 174,7 ppm (**15**) e 174,6 ppm (**16**), confirmando a caracterização dos ester-derivados intermediários. Os principais sinais para a interconversão estão apresentados na Figura 15.

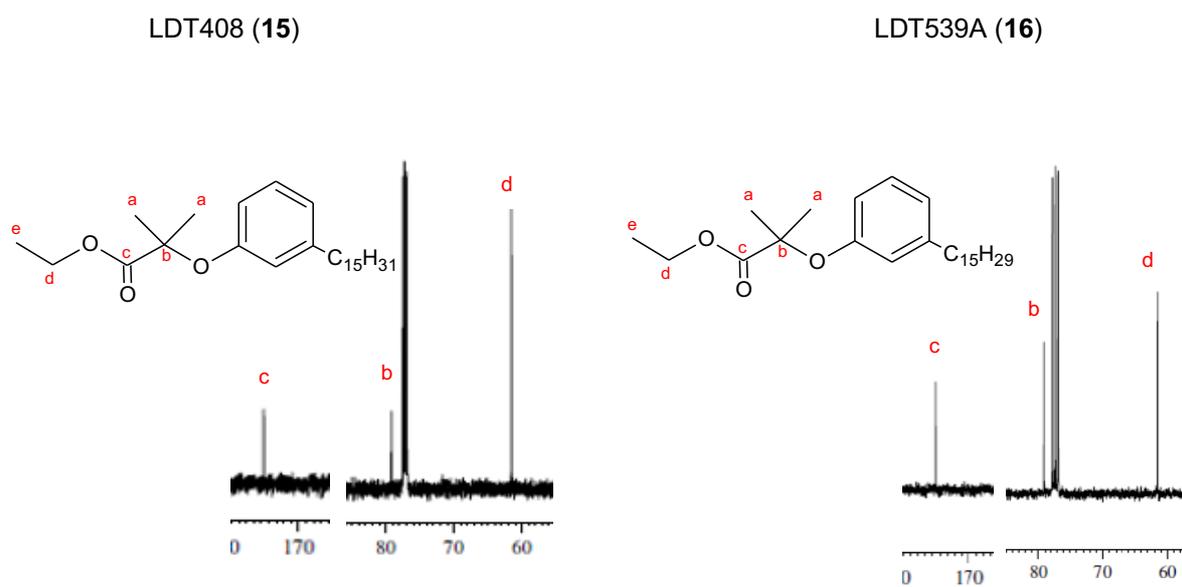
O derivado LDT539A (**16**) manteve o padrão de impureza que corresponde ao derivado LDT539B (estrutura não apresentada), e foi empregado sem purificação para a última etapa do planejamento sintético.

Figura 15: Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C dos intermediários LDT408 (**15**) e LDT539A (**16**).

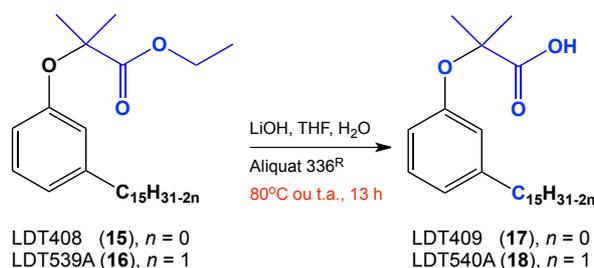
RMN de ^1H



RMN de ^{13}C



6.1.4 Obtenção dos derivados beta-oxiésteres LDT409 (17) e LDT540A (18)

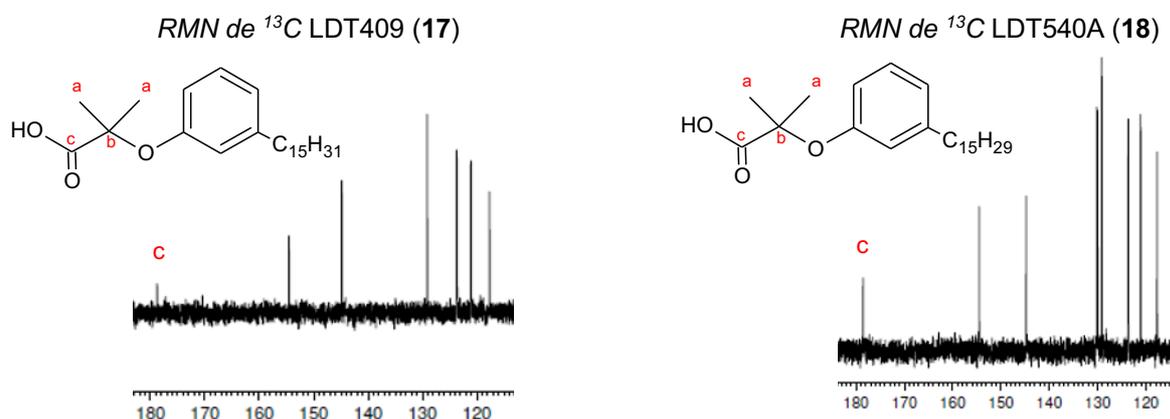


Os derivados LDT408 (15) e LDT539A (16) foram submetidos à reação de hidrólise em meio alcalino para obtenção dos respectivos derivados ácidos LDT409 (17) e LDT540A (18). O derivado 17, sólido branco floculoso caracterizado com uma única mancha em CCD (Rf 0,52 em Hex_{50%}:AcOEt_{50%}), foi obtido em rendimento de 89 %, enquanto 20 foi obtido como óleo claro em rendimento de 70 % e também caracterizado como única mancha em CCD (Rf 0,44 em Hex_{50%}:AcOEt_{50%}).

A conversão dos ésteres nos ácido foi confirmada pelos respectivos assinalamentos em 178,8 ppm e 178,6 ppm referentes às carboxilas no espectro de RMN de ¹³C (Anexo 10 e 12, Págs). Adicionalmente, a ausência de deslocamento químico em 61,5 ppm referentes aos grupos metilenos da subunidade etoxila nos espectros de RMN de ¹³C corroboram as conversões planejadas (Figura 16)

A análise dos espectros mostrou a ausência do possível derivado LDT540B (estrutura não apresentada), confirmando a pureza do derivado-alvo LDT540A (18)

Figura 16: Espectros de RMN de ¹³C do LDT409 (17) e LDT540A (18).



As principais da propriedades físico-químicas dos intermediários e dos produtos finais são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Propriedades físico-químicas dos intermediários e produtos finais

Código	Fórmula Molecular	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Apresentação	Rendimento (%)	Rf
LDT10	C ₂₁ H ₃₆ O	304,518	Sólido marrom	99	0,48*
LDT408	C ₂₇ H ₄₆ O ₃	418,662	Óleo amarelo	86	0,54*
LDT409	C ₂₅ H ₄₂ O ₃	390,599	Sólido branco	89	0,52**
LDT10iA	C ₂₁ H ₃₄ O	302,502	Óleo claro	37	0,28*
LDT539A	C ₂₇ H ₄₆ O ₃	416,646	Óleo incolor	98	0,44*
LDT540A	C ₂₅ H ₄₀ O ₃	388,592	Óleo claro	70	0,44**

Rf: Fator de Retenção; *Hex_{80%}:AcOEt_{20%}; ** Hex_{50%}:AcOEt_{50%}

Os resumos dos principais assinalamentos nos espectros de RMN de hidrogênio e carbono-13 para os produtos de partida, éster-intermediários e produtos-alvo estão apresentados nas Tabela 6.

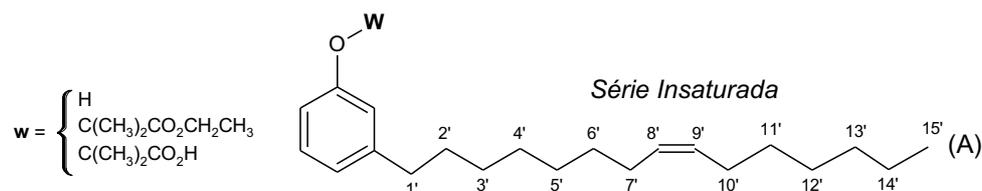
Tabela 6: Principais deslocamentos químicos de RMN (ppm, CDCl₃) da série saturada.

$$w = \begin{cases} H \\ C(CH_3)_2CO_2CH_2CH_3 \\ C(CH_3)_2CO_2H \end{cases}$$

Série Saturada

RMN		Grupo	RMN ¹ H / RMN ¹³ C (ppm, CDCl ₃)		
			LDT10 (12S)	LDT408 (15)	LDT409 (17)
¹ H	C ₁₅ H ₃₁		0,88 - 2,56	0,89 - 2,54	0,89 - 2,57
¹³ C			14,3 - 36,1	14,3 ² - 36,1	14,3 - 36,0
¹ H	Ar		6,63 - 7,14	6,64 - 7,13	6,75 - 7,18
¹³ C			112,7 - 155,6	116,2 - 155,6	117,7 - 154,5
¹ H	ArOC(CH ₃) ₂ CO ₂ CH ₂ <u>CH</u> ₃		--	1,23 - 1,26	--
¹³ C			--	14,2 ⁸	--
¹ H	ArOC(<u>CH</u> ₃) ₂ CO ₂ CH ₂ CH ₃		--	1,59 - 1,64	1,61
¹³ C			--	25,6	25,3
¹ H	ArOC(CH ₃) ₂ CO ₂ <u>CH</u> ₂ CH ₃		--	4,24	--
¹³ C			--	61,5	--
¹ H	ArOC(CH ₃) ₂ CO ₂ CH ₂ CH ₃		--	--	--
¹³ C			--	79,1	79,7
¹ H	ArOC(CH ₃) ₂ <u>C</u> O ₂ H		--	--	--
¹³ C			--	174,7	178,8

Tabela 7: Principais deslocamentos químicos de RMN (ppm, CDCl₃) da série insaturada.



RMN		Grupos	RMN de ¹ H / RMN de ¹³ C (ppm, CDCl ₃)		
			LDT10A (12A)	LDT539A (16)	LDT540A (18)
¹ H	15'		0,89 - 0,94	0,88	0,87 - 0,89
¹³ C			14,3	14,2	14,3
¹ H	3'-6' e 11'-12'		1,29 - 1,40	1,25 - 1,31	1,27 - 1,31
¹³ C			29,2 - 29,9	29,2 - 29,9	29,2 - 29,9
¹ H	13'		1,29 - 1,40	1,25 - 1,31	1,27 - 1,31
¹³ C			31,9	32,0	32,0
¹ H	14'		1,29 - 1,40	1,25 - 1,31	1,27 - 1,31
¹³ C			22,9	22,9	22,9
¹ H	2'		1,59 - 1,64	1,59	1,61
¹³ C			31,5	31,5	31,5
¹ H	7' e 10'		2,01 - 2,10	1,95 - 2,01	2,01 - 2,06
¹³ C			27,4	27,4	27,4
¹ H	1'		2,57	2,54	2,57
¹³ C			36,0	36,1	36,0
¹ H	8'-9'		5,36 - 5,40	5,33 - 5,37	5,36
¹³ C			130,2 - 130,3	130,0 - 130,1	130,0-130,1
¹ H	Ar		6,65 - 7,16	6,64 - 7,12	6,75-7,18
¹³ C			112,7 - 155,6	116,3 - 128,9	117,6-154,5
¹ H	ArOC(CH ₃) ₂ CO ₂ CH ₂ CH ₃		--	1,25 - 1,31	1,61
¹³ C			--	14,2	--
¹ H	ArOC(CH ₃) ₂ CO ₂ CH ₂ CH ₃		--	1,59	1,61
¹³ C			--	25,6	25,3
¹ H	ArOC(CH ₃) ₂ CO ₂ CH ₂ CH ₃		--	4,25	--
¹³ C			--	61,5	--
¹ H	ArOC(CH ₃) ₂ CO ₂ CH ₂ CH ₃		--	--	--
¹³ C			--	79,1	79,7
¹ H	ArC(CH ₃) ₂ CO ₂ CH ₂ CH ₃		--	--	--
¹³ C			--	174,6	--
¹ H	ArC(CH ₃) ₂ CO ₂ H		--	--	178,6
¹³ C			--	--	--

6.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

6.2.1 Avaliação dos compostos na citotoxicidade do LDT409 e LDT540A em macrófagos J774

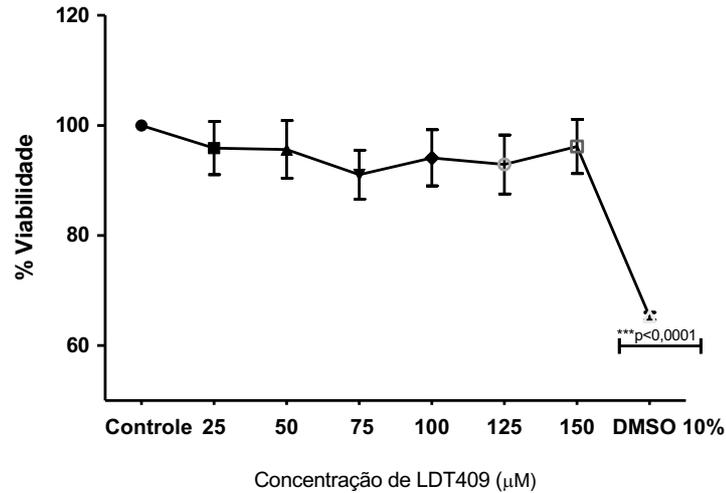
O ensaio de citotoxicidade por MTT consiste em método não radioativo e de alto rendimento para mensurar a proliferação, a viabilidade e a citotoxicidade. Inicialmente, o perfil de toxicidade a diferentes concentrações dos compostos LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**) foi determinado nos macrófagos J774.

O ensaio foi baseado na utilização do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium] (MTT), composto que após permeação celular sofre reação de redução por desidrogenases mitocondriais ao produto insolúvel formazan que absorve radiação ultravioleta em 450 nm, em que a absorbância é diretamente proporcional ao número de células vivas. Por outro lado, as células mortas perdem essa capacidade e, portanto, não mostram sinal (ABCAM, 2018).

As células foram incubadas com concentrações que variaram de 25 μM a 150 μM dos compostos LDT409 (**17**) ou LDT540A (**18**), diluídos em 1 % de DMSO e meio de cultura DEMEM. Anteriormente, Cascaes (2017) demonstrou que a utilização do diluente DMSO 1 % não afeta o metabolismo mitocondrial sobre cultura de macrófagos J774. Um grupo de células sem tratamento foi utilizado como controle negativo, cuja a média de absorbância do MTT foi considerado como 100 % de viabilidade celular; e um grupo tratado com 10 % de DMSO foi utilizado como controle positivo devido aos seus efeitos prejudiciais na viabilidade celular nesta concentração (TONY, et al., 2015).

De acordo com os resultados apresentados, as células tratadas com 25 μM de LDT409 (**17**) apresentaram viabilidade que variou de 85 % a 100 %. Em concentrações maiores que 25 μM mantiveram viabilidade superiores a 80% e não modificaram o metabolismo mitocondrial em comparação ao grupo controle basal ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis) (Figura 17).

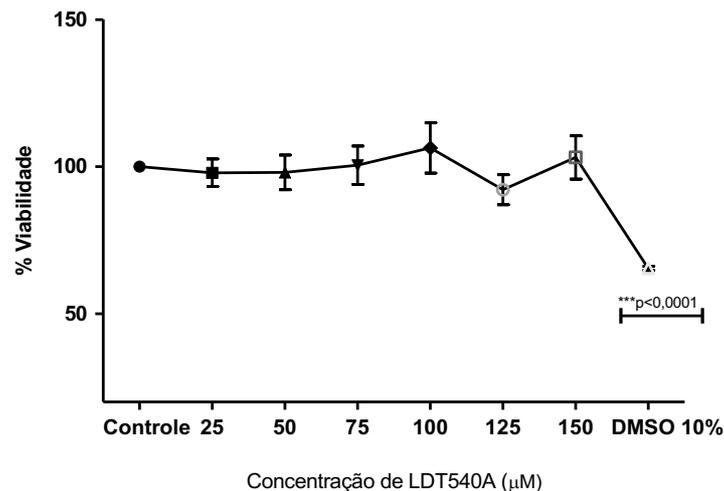
Figura 17: Efeito na viabilidade das células J774 após 24 horas de incubação com LDT409 (17), na presença de 10 µL de solução MTT (5 mg/mL)



Nota: Os resultados mostram que as concentrações de 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 125 µM ou 150 µM do composto não modificou estatisticamente o metabolismo mitocondrial das células J774 quando comparado ao metabolismo basal do controle de células. A utilização de DMSO 10 % utilizada como controle positivo foi considerado tóxico. Método estatístico: Kruskal-Wallis e Dunn para comparação múltipla. Avaliação em triplicata, n=3. Os valores de p foram apresentados na Figura.

Em relação ao LTD540A (18), a viabilidade celular permaneceu em torno de 100 % para o grupo de células tratadas a 25 µM, cujas concentrações maiores praticamente não modificaram a viabilidade celular em comparação ao grupo controle basal ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis) (Figura 18)

Figura 18: Efeito na viabilidade das células J774 após 24 horas de incubação com LTD540A (20), na presença de 10 µL de solução MTT (5 mg/mL).



Notas: Os resultados mostram que as concentrações de 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 125 µM ou 150 µM do composto não modificou estatisticamente o metabolismo mitocondrial das células J774 quando comparado ao metabolismo basal do controle de células. A utilização de DMSO 10% utilizada como controle positivo foi considerado tóxico. Método estatístico: Kruskal-Wallis e Dunn para comparação múltipla. Avaliação em triplicata, n=3. Os valores de p foram apresentados na Figura.

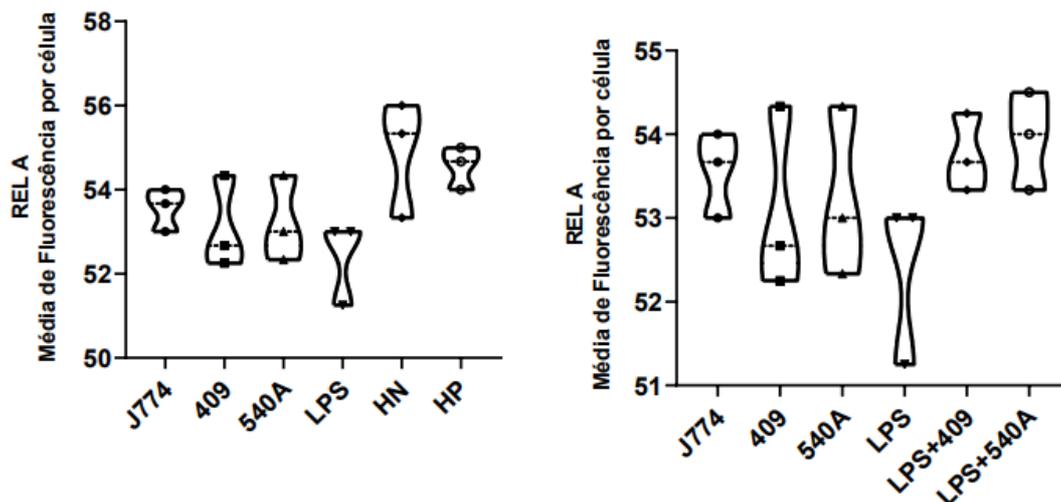
Os resultados do tratamento celular para ambos os compostos mostraram que não houve toxicidade para os macrófagos J774, mesmo considerada a maior concentração de 150 μ M.

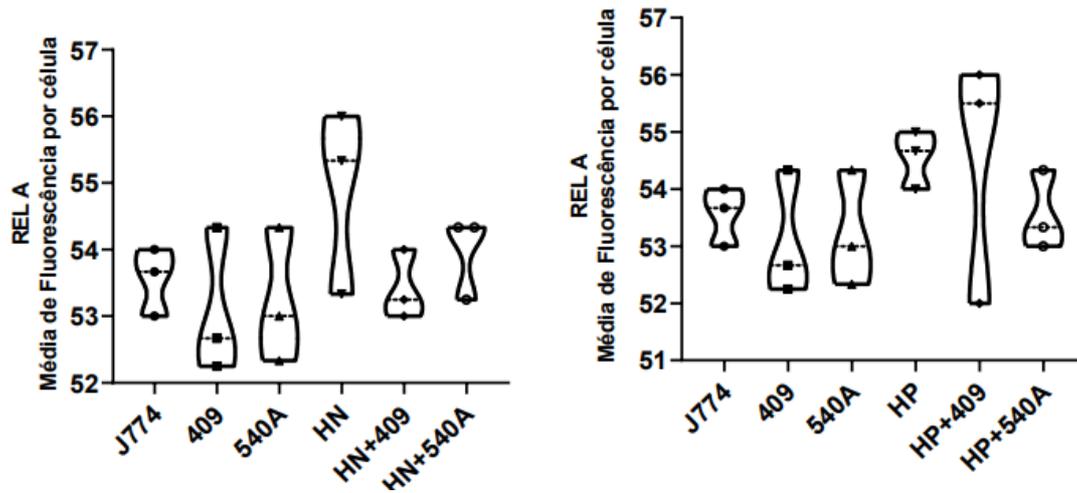
Vale destacar, como apresentado, que o controle positivo apresentou viabilidade celular de 60 %, mostrando diminuição significativa na viabilidade quando comparado ao grupo controle ($***p < 0,0001$; Mann-Whitney) e, portanto, foi considerado citotóxico para os macrófagos J774.

6.2.2 Quantificação da proteína RelA (p65)

Visando quantificar se a estimulação dos macrófagos J774 com hemácias parasitadas com *Plasmodium berghei* ANKA modifica a via canônica pela quantificação da proteína RelA, avaliamos os efeitos dos compostos LDT409 (**17**) e 540A (**18**) durante estimulação sobre a via NF- κ B tendo lipopolissacarídeo (LPS) como controle positivo. Como mostrado na Figura 19, nenhum dos estímulos utilizados foram capazes de alterar o quantitativo do Fator Nuclear kappa B RelA. Os dados ainda revelaram que não foi observado efeito dos compostos **17** e **18** na concentração da proteína nas células J774 (Kruskal-Wallis, seguido de Dunn), não havendo diferenças entre os grupos avaliados. Estes resultados sugerem que a via canônica do NF- κ B não foi modulada. Vale ressaltar que, estes dados são consistentes com experimentos anteriores (dados não mostrados).

Figura 19: Média de Intensidade de Fluorescência celular de RelA





Notas: A influência do LDT409 (17) e LDT540A (18) sobre a expressão de RelA nas células J774 estimulados com o controle positivo LPS, hemácias não parasitadas ou hemácias parasitadas com *Plasmodium berghei* ANKA. Os dados estão representados em medianas. Método estatístico: Kruskal-Wallis e Dunn para comparação múltipla. Avaliação em triplicata, n=3. Os valores de p foram apresentados na Figura.

DMEM: Meio de Cultura Dubelco Modificado; LPS: lipopolissacarídeo; HN: hemácias não parasitadas; HP: hemácias parasitadas

6.2.3 Quantificação da proteína RelB (p68)

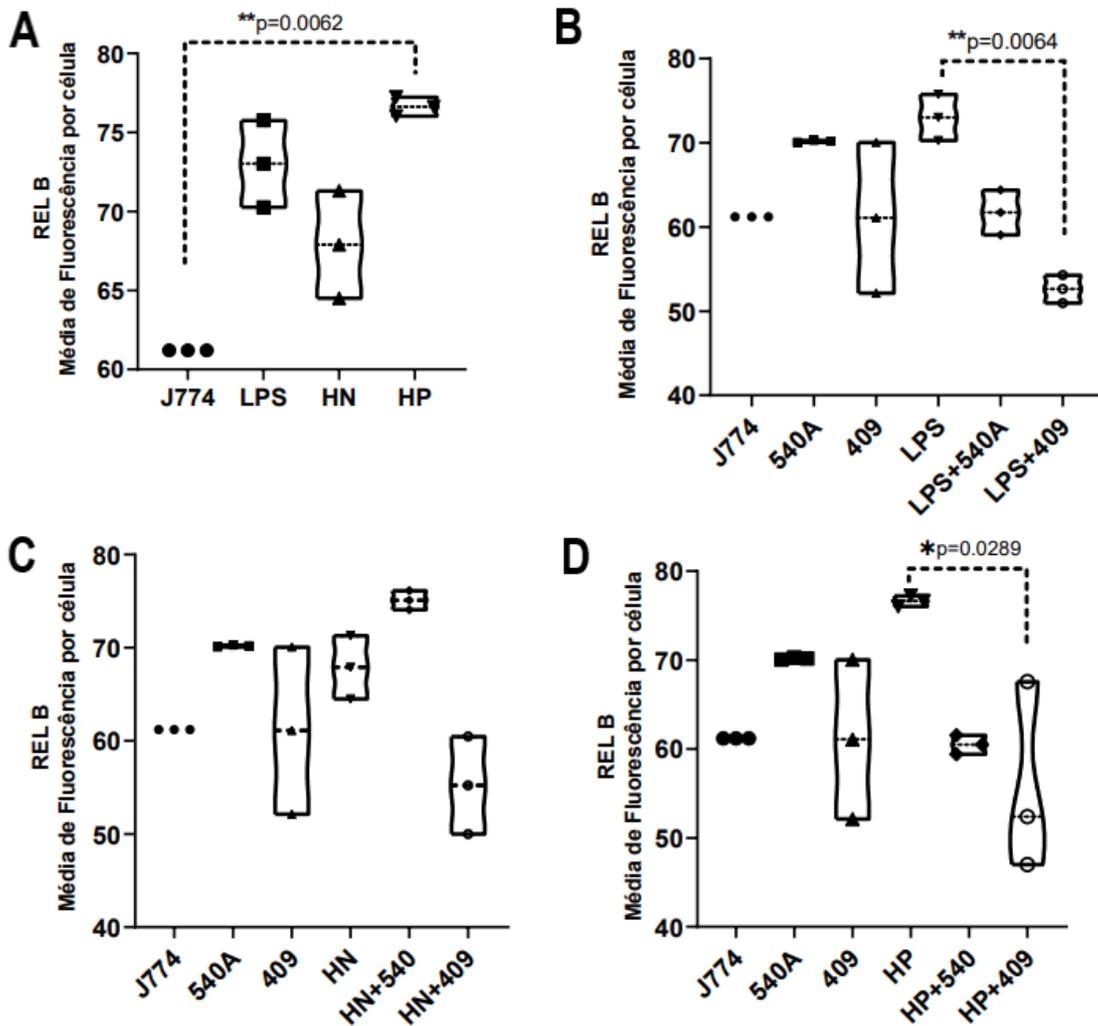
Para quantificarmos o efeito da estimulação dos macrófagos J774 com hemácias parasitadas com *Plasmodium berghei* ANKA sobre a via não canônica do NF- κ B, mensuramos a concentração da proteína RelB a partir dos efeitos dos compostos LDT409 (17) e 540A (18) durante o estímulo sobre a via, tendo LPS como controle positivo.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 20, foi observado efeito biológico dos estímulos LPS, HN, e HP, no aumento da concentração da proteína RelB nas células J774, indicando que a via não canônica do NF- κ B foi modulada neste modelo. Porém, essa diferença só foi considerada estatística apenas quando as células foram estimuladas com hemácias parasitadas com *Plasmodium berghei* ANKA (**p= 0,0062, Kruskal-Wallis e Dun).

O tratamento celular isolado com LDT409 (17) ou LDT540A (18) não modificou a concentração basal da proteína. O derivado 17 produziu redução significativa dos níveis de RelB induzidos por LPS (**p = 0,0064, Kruskal-Wallis e Dun), a concentrações inferiores que o controle de células. O mesmo efeito foi observado para o derivado 18, que reduziu a concentração da proteína a níveis basais, porém a diferença não foi estatística.

Quando as células foram estimuladas com hemácias parasitadas, os dados mostram que o derivado LDT409 (**17**) diminuiu os níveis de RelB (* $p = 0,0289$, Kruskal-Wallis e Dun), embora tenha sido observado efeito do LDT540A (**18**) na redução dos níveis de RelB, a diferença não foi estatística.

Figura 20: Média de Intensidade de Fluorescência celular de RelB em células J774



Notas: A) Influência do LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**) sobre a expressão de RelB nos macrófagos J774 estimulados com controle positivo (LPS), hemácias não parasitadas (HN) e hemácias parasitadas (HP) com *Plasmodium berghei* ANKA. B) Influência do LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**) sobre os níveis de RelB no estímulo com LPS. C) Influência do LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**) sobre os níveis de RelB no estímulo com HN. D) Influência do LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**) sobre estímulo com HP com *Plasmodium berghei* ANKA. Método estatístico: Kruskal-Wallis e Dun para comparação múltipla. Avaliação em triplicata, $n=3$. Os valores de p foram apresentados na Figura.

DMEM: Meio de Cultura Dubelco Modificado; LPS: Lipopolissacarídeo; HN: hemácias não parasitadas; HP: hemácias parasitadas.

6.2.4 Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)

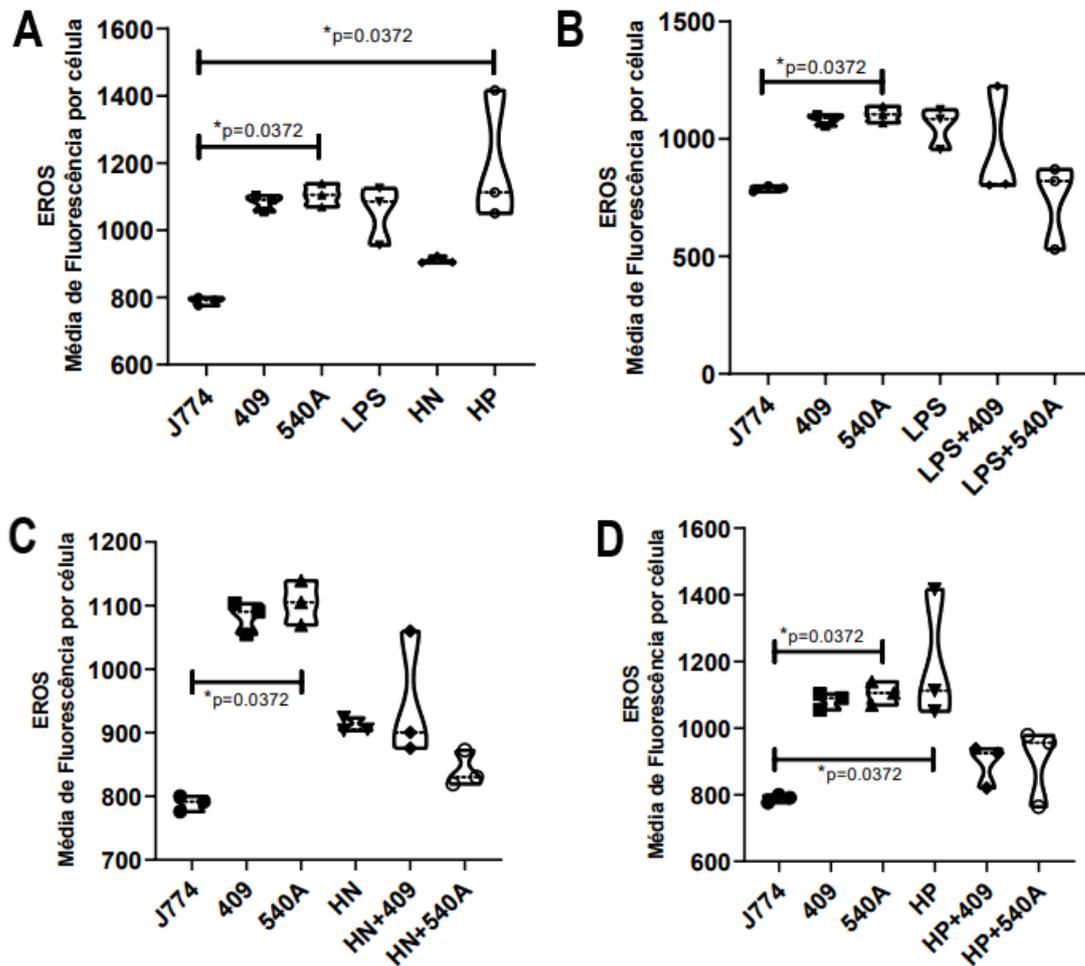
As espécies reativas de oxigênio apresentam papel importante na evolução da malária em que tanto a superindução ou depleção desses mediadores podem ser prejudiciais ao hospedeiro. Para elucidar a relação do parasito com estado oxidativo de macrófagos J774, mensuramos a concentração basal de EROS intracelular após estimulação com o controle positivo o LPS, hemácias parasitadas com *Plasmodium berghei* ANKA e não parasitadas. Por fim, avaliamos a influência dos compostos LDT409 (**17**) e 540A (**18**) sobre os níveis de EROS.

Os resultados apresentados na Figura **21** mostram que a estimulação dos macrófagos J774 com LPS e hemácias não parasitadas provocaram um efeito biológico no aumento de EROS, entretanto, o aumento dos níveis de EROS foi estatístico apenas quando as células J774 foram estimuladas com hemácias parasitadas com *Plasmodium berghei* ANKA (*p = 0,0372, Kruskal-Wallis e Dun).

O tratamento celular isolado com LDT409 (**17**) ou com LDT540A (**18**) mostram uma tendência ao aumento dos níveis de EROS intracelular (*p = 0,0372, Kruskal-Wallis e Dun); porém, embora não estatístico foi observado efeito modulador dos derivados **17** e **18**, por redução dos níveis de EROS quando as células foram estimuladas LPS.

Estes resultados mostram que a presença do parasito está diretamente relacionada com aumento do estresse oxidativo. Biologicamente, o tratamento com LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**) impactaram na redução dos níveis de EROS nos macrófagos J774 estimulados com hemácias parasitadas com *Plasmodium berghei* ANKA, entretanto, a diferença não foi estatística.

Figura 21: Média de Intensidade de Fluorescência celular de EROS em células J774



Notas: A) Influência do LDT409 (17) e LDT540A (18) sobre a expressão de EROS nos macrófagos J774 estimulados com controle positivo (LPS), hemácias não parasitadas (HN) e hemácias parasitadas (HP) com *Plasmodium berhei* ANKA. B) Influência do LDT409 (17) e LDT540A (18) sobre os níveis de EROS no estímulo com LPS. C) Influência do LDT409 (17) e LDT540A (18) sobre os níveis de EROS no estímulo com HN. D) Influência do LDT409 (17) e LDT540A (18) sobre estímulo com HP com *Plasmodium berhei* ANKA. Método estatístico: Kruskal-Wallis e Dun para comparação múltipla. Avaliação em triplicata, n=3. Os valores de p foram apresentados na Figura.

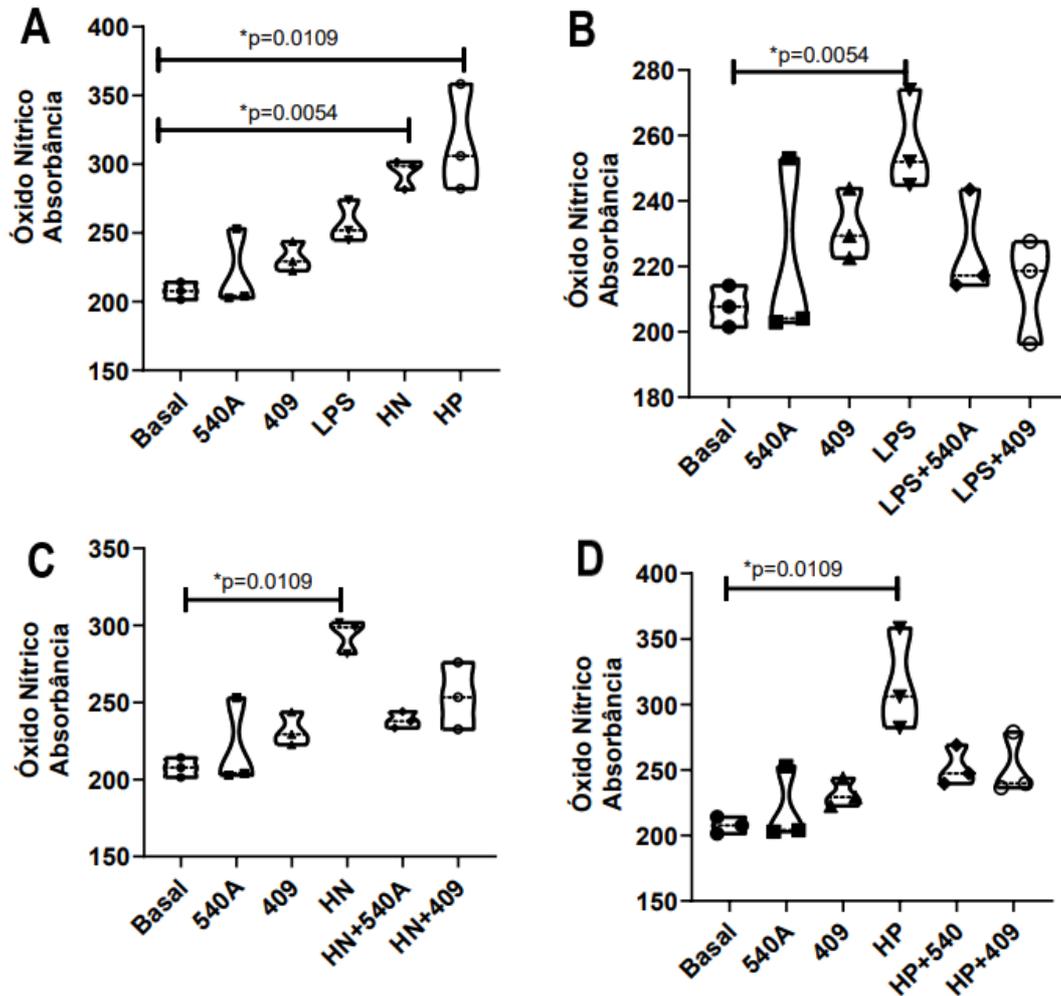
DMEM: Meio de Cultura Dubelco Modificado; LPS: Lipopolissacarídeo; HN: hemácias não parasitadas; HP: hemácias parasitadas.

6.2.5 Quantificação de Óxido Nítrico (NO)

Decidimos analisar a concentração de óxido nítrico, produzido majoritariamente por células com funções imunológicas para controlar parasitemia. Neste sentido, foi observado efeito biológico do LPS (controle positivo) das hemácias não parasitadas ($*p = 0,0054$, Kruskal-Wallis e Dun) e das hemácias parasitadas ($*p = 0,0109$, Kruskal-Wallis e Dun) no aumento a concentração de NO produzido pelas células J774 (Figura 22).

Os resultados mostram que LDT409 (17) e LDT540A (18) não influenciaram a produção basal de óxido nítrico pelos macrófagos J774 (Kruskal-Wallis seguido de Dunn, $p = 0,2521$), porém, embora não estatístico, foi observado efeito biológico do LDT409 (17) LDT540A (18) na redução da concentração de NO induzido pela estimulação com LPS, hemácias não parasitadas e parasitadas com *Plasmodium berghei* ANKA.

Figura 22: Absorbância do óxido nítrico do sobrenadante de macrófagos J774



Notas: A) Influência do LDT409 (17) e LDT540A (18) sobre a expressão de NO nos macrófagos J774 estimulados com controle positivo (LPS), hemácias não parasitadas (HN) e hemácias parasitadas (HP) com *Plasmodium berhei* ANKA. B) Influência do LDT409 (17) e LDT540A (18) sobre os níveis de NO no estímulo com LPS. C) Influência do LDT409 (17) e LDT540A (18) sobre os níveis de NO no estímulo com HN. D) Influência do LDT409 (17) e LDT540A (18) sobre os níveis de NO no estímulo com HP com *Plasmodium berhei* ANKA. Método estatístico: Kruskal-Wallis e Dun para comparação múltipla. Avaliação em triplicata, $n=3$. Os valores de p foram apresentados na Figura.

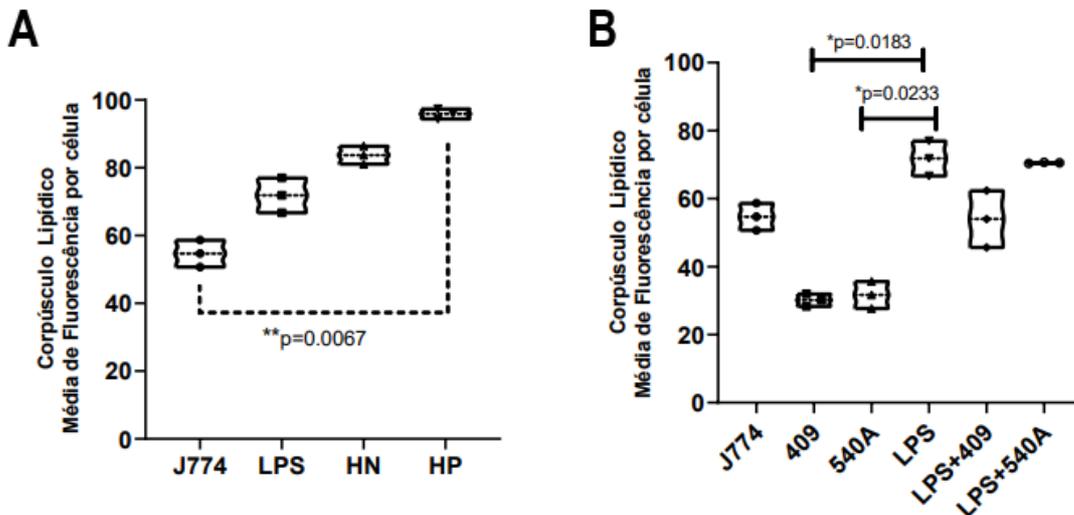
DMEM: Meio de Cultura Dubelco Modificado; LPS: Lipopolissacarídeo; HN: hemácias não parasitadas; HP: hemácias parasitadas.

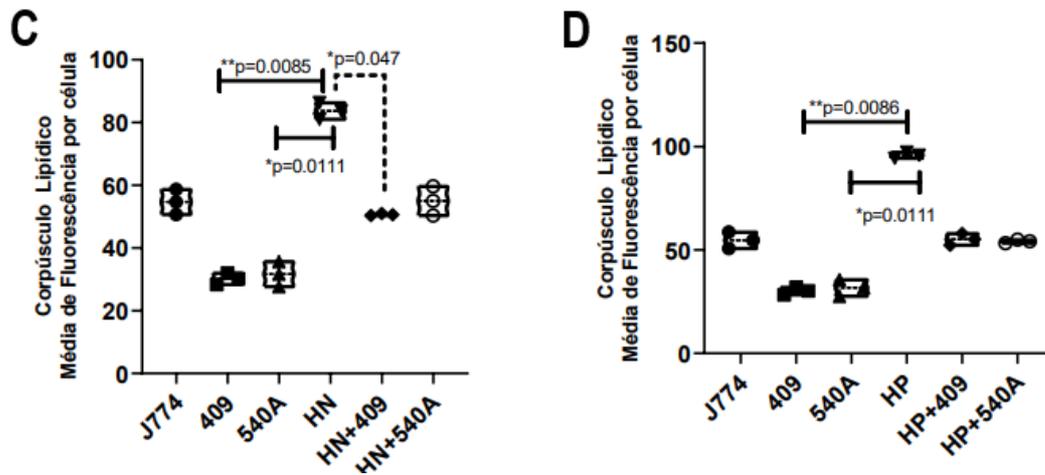
6.2.6 Quantificação dos níveis de Corpúsculos Lipídicos (CL)

A infecção celular por *P. berghei* está relacionado com aumento da concentração de corpos lipídicos (PALACPAC, et al., 2004). Observamos que o controle positivo LPS e hemácias não parasitadas e parasitadas mostraram efeito biológico no aumento de CL em diferentes proporções. Porém apenas o estímulo com hemácias parasitadas com *Plasmodium berghei* ANKA foi considerado estatisticamente significativo (** $p = 0,0067$, Kruskal-Wallis seguido de Dunn).

Observou-se efeito biológico do LDT409 (17) para reduzir os níveis de CL induzidos por LPS e hemácias não parasitadas (* $p = 0,047$, Kruskal-Wallis seguido de Dunn). Embora não estatístico, observou-se efeito biológico de ambos os compostos na redução dos níveis de CL induzidos pelo *P. berghei* ANKA (Figura 23).

Figura 23: Média de Intensidade de Fluorescência de corpos lipídicos (CL) em células J774





Notas: A) Influência do LDT409 (17) e LDT540A (18) sobre a expressão de CL nos macrófagos J774 estimulados com controle positivo (LPS), hemácias não parasitadas (HN) e hemácias parasitadas (HP) com *Plasmodium berhei* ANKA. B) Influência do LDT409 (17) e LDT540A (18) sobre os níveis de CL no estímulo com LPS. C) Influência do LDT409 (17) e LDT540A (18) sobre os níveis de CL no estímulo com HN. D) Influência do LDT409 (17) e LDT540A (18) sobre os níveis de CL no estímulo com HP com *Plasmodium berhei* ANKA. Método estatístico: Kruskal-Wallis e Dun para comparação múltipla. Avaliação em triplicata, n=3. Os valores de p foram apresentados na Figura.

DMEM: Meio de Cultura Dubelco Modificado; LPS: Lipopolissacarídeo; HN: hemácias não parasitadas; HP: hemácias parasitadas.

6.2.7 Quantificação da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2)

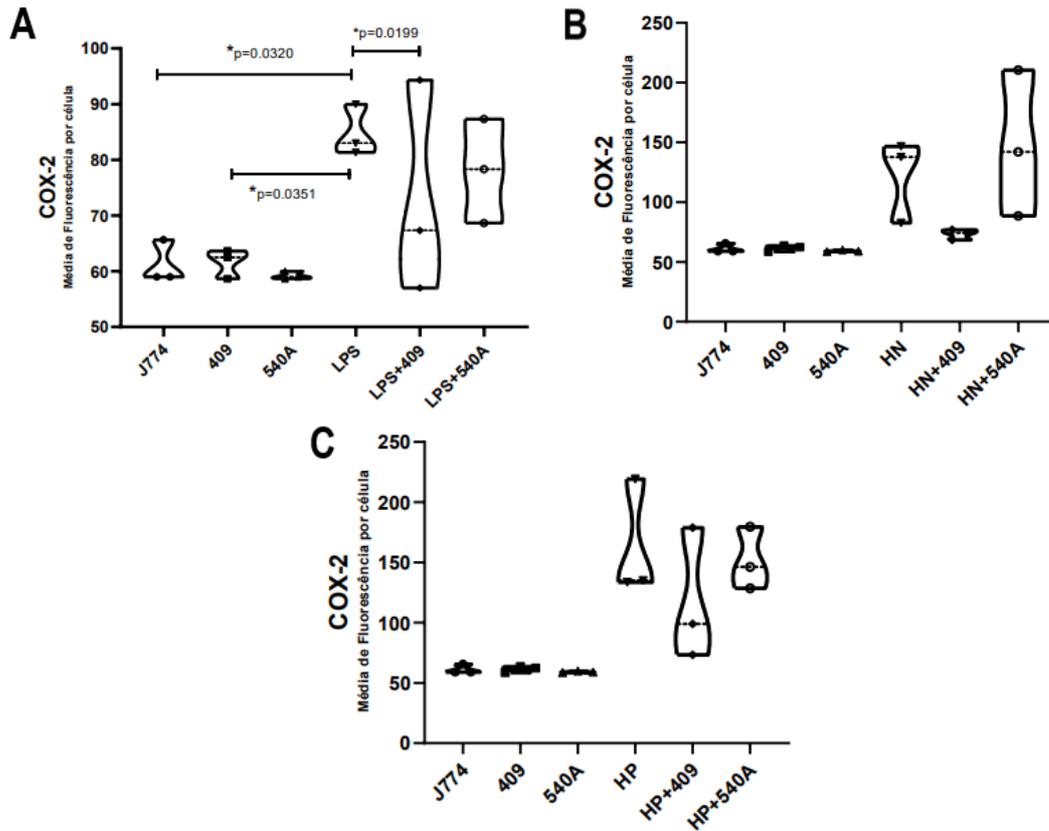
Os dados mostram que apenas o estímulo do LPS induziu aumento estatístico nos níveis de COX-2 (*p = 0,0320, Kruskal-Wallis seguido de Dunn). Observou-se efeito biológico nos níveis de COX-2 no estímulo com hemácias não parasitadas e parasitadas.

O tratamento isolado das células com o LDT409 (17) e LDT540A (18) não altera a concentração de COX-2 basal das células; porém, considerando o aumento dos níveis de COX-2 induzido por LPS, o tratamento com LDT409 (17) reduziu a concentração da enzima (*p = 0,0199, Kruskal-Wallis seguido de Dunn).

Considerando o grupo de células estimuladas com hemácias parasitadas com *Plasmodium berghei* ANKA, nenhum dos compostos influenciou os níveis da enzima.

Os dados referentes a este estudo estão apresentados na Figura 24.

Figura 24: Média de Intensidade de Fluorescência celular de COX-2 em células J774.



Notas: A) Influência do LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**) sobre a expressão de COX-2 nos macrófagos J774 estimuladas com controle positivo (LPS). B) Influência do LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**) sobre os níveis de COX-2 no estímulo com LPS. C) Influência do LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**) sobre os níveis de COX-2 no estímulo com HN. D) Influência do LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**) sobre os níveis de COX-2 no estímulo com HP com *Plasmodium berhei* ANKA. Método estatístico: Kruskal-Wallis e Dun para comparação múltipla. Avaliação em triplicata, n=3. Os valores de p foram apresentados na Figura.

DMEM: Meio de Cultura Dubelco Modificado; LPS: Lipopolissacarídeo; HN: hemácias não parasitadas; HP: hemácias parasitadas.

A Tabela 8 apresenta os principais resultados de avaliação biológica

Tabela 8: Resumo dos resultados de avaliação biológica

	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA	LDT409	LDT540A
Citotoxicidade	----	NT	NT
ReIA	NA	NA	NA
ReIB	↑	RB e RE	RB
EROS	↑	RB	RB
NO	↑	RB	RB
CL	↑	RB	RB
COX-2	↑	NA	NA

NT: Não Tóxico; NA: Não alterou; ↑: aumento; RE: Redução Estatística; RB: Redução Biológica

Discussão

7. DISCUSSÃO

Este estudo teve início a partir da observação de que na malária, mesmo diagnosticada em tempo oportuno e realizado o tratamento adequado, ocorre evolução para as formas graves da doença em virtude de processos inflamatórios extremos. Dessa forma, investigamos a via do NF- κ B de macrófagos J774 estimulados com *Plasmodium berghei* ANKA e os produtos inflamatórios resultantes da ativação, possivelmente por processos de transcrição gênica. De forma complementar, a literatura científica descreve inúmeros mecanismos de *feedback* negativo exercido pelos receptores ativado por proliferadores peroxissomais (PPARs) sobre a via do NF- κ B, tornando-os potenciais alvos anti-inflamatórios (GRYGIEL-GORNIK, 2014; BENSINGER; TONONZOZ, 2008; MICHALIK; WAHLI, 2008; XU et al., 2013; ZINGARELLI et al., 2010; SONG et al., 2016). Assim, avaliamos o efeito dos agonistas parciais de PPARs desenvolvidos por Ferreira (2018), o LTD409 (**17**) e LDT540A (**18**), buscando entender seus efeitos na modulação da via NF- κ B induzida pelo parasito.

Previamente, Ferreira (2018) planejou racionalmente compostos agonistas PPARs como miméticos de ligantes endógenos como o ácido cáprico, mirístico e esteárico, contendo a subunidade farmacofórica dos agonistas sintéticos da classe dos fibratos. Após sintetizados, foram avaliados quanto à atividade PPAR em comparação com agonistas plenos. De vários compostos desenvolvidos, dois derivados ácidos LTD409 (**17**) e LDT540A (**18**), respectivos representantes das séries saturada e insaturada, foram identificados com melhores perfis de atividade sobre os três subtipos de receptores: PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ (FERREIRA, 2018).

A relação estrutura-atividade destes compostos sugere que a subunidade carboxílica interage com resíduos de aminoácidos tirosina e histidina presentes no domínio de ligação ao ligante (DBD), enquanto a calda hidrofóbica e o anel aromático interagem com domínio de ligação ao DNA (LBD), composta por aminoácidos hidrofóbicos. A interação dos agonistas no sítio de ligação do ligante ativam os receptores PPARs para exercerem seus efeitos sobre a via do NF- κ B (SRITHARAN, 2017; YAMADA et al., 2016; YOKOI et al., 2010).

A metodologia sintética para a obtenção dos compostos-alvo compreendeu procedimentos clássicos de conversão dos grupos funcionais, como a *O*-alquilação com o bromoisobutirato de etila dos compostos de partida e hidrólise alcalina dos produtos intermediários ésteres aos produtos finais. Os derivados ácidos foram obtidos em rendimentos globais de 77 % e 69 % considerando as duas etapas sintéticas. Os produtos de partida, intermediários e finais tiveram suas estruturas moleculares confirmadas por ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C .

Os ensaios biológicos foram iniciados pela determinação de toxicidade para os macrófagos J774, em que LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**) não apresentaram citotoxicidade nas concentrações avaliadas, uma vez que a atividade mitocondrial de metabolização do MTT das células tratadas com os compostos não diferiu estatisticamente do metabolismo das células utilizadas como controle basal (sem tratamento). Estes resultados foram idênticos quando comparados à linhagem celular de micróglia BV-2 imortalizadas, avaliadas durante este trabalho (dados não mostrados), sugerindo ausência de toxicidade dos compostos para estas células estudadas.

Os fenômenos intracelulares que ocorrem após ligação de antígenos plasmodiais como a molécula de GPI e hemozoína nos receptores extracelulares ainda precisam ser esclarecidos na malária. Sabe-se que essa interação resulta na ativação da via do NF- κ B mediada por componentes moleculares dispostos numa topologia de rede particular e dependente de cada tipo celular (O'DEA; HOFFMANN, 2010) que resulta na combinação de dímeros de NF- κ B presentes no citoplasma. Estes translocam-se para o núcleo celular e ligam-se a promotores para induzir a expressão de genes de resposta inflamatória e imunológica, onde os produtos de expressão gênica podem conduzir à retroalimentação positiva da via, potencializando o processo inflamatório.

Avaliamos duas vias de ativação NF- κ B altamente interligadas: i. a via canônica representada pela proteína RelA envolvida na resposta imune inata e adaptativa; e ii. a via não canônica representada por RelB relacionada em menor proporção com a inflamação (BASAK; HOFFMANN, 2008).

Nossos resultados mostraram que a via RelA permaneceu inalterada. Tanto o controle positivo LPS quanto as hemácias parasitadas com *Plasmodium*

berghei ANKA não foram capazes de influenciar a concentração da proteína RelA quando comparada ao grupo basal de células. Também não foram identificados quaisquer efeitos modulatórios dos compostos LDT409 (17) e LDT540A (18) sobre a via. Esses resultados de RelA são idênticos aos encontrados em micróglias avaliados em outros experimentos (dados não mostrados). Esta avaliação de RelA difere dos achados de Borges (2013) que identificou aumento da concentração da proteína em macrófagos primários extraídos de camundongos Balb/C no sexto dia de infecção com *Plasmodium berghei* ANKA, exemplificando diferenças importantes na resposta. Segundo Andreu et al. (2017), os macrófagos de linhagem sofrem ativação lenta e menos intensa quando comparado às células de cultura primária, havendo também diferenças em relação ao número de genes expressos e magnitude de indução.

Contudo, o fato de não ter modificado a concentração de RelA não significa que a via canônica esteja inativada neste modelo. Glyn et al., (2002) avaliaram a cinética de sinalização de p65 em células vivas individuais e demonstraram que após estimulação com TNF ocorreu deslocamento de p65 citoplasmático para o núcleo em período de 8-40 minutos. Após 5 horas de estimulação foi observado que a concentração de RelA declinou no núcleo e concentrou novamente no citoplasma. Os dados revelaram que este evento ocorreu em virtude de translocação genuína da proteína basal entre os compartimentos celulares e não por motivo de ressíntese proteica. Desta forma, a concentração das proteínas NF- κ B em resposta a estímulos pode se manter de forma linear ou sinoidal e transitória ou oscilatória, e ocorrer em escala de tempo longa (ODEA; HOFFMANN, 2010). Neste estudo, determinamos os níveis de RelA que ocorreram em período de 24 horas, sendo interessante a realização de estudos adicionais incluindo avaliações em períodos de tempos de 2, 6, 12, 48 e 72 horas para a obtenção de perfil temporal frente aos macrófagos J774.

Além disso, manutenção constante dos níveis de RelA também pode ocorrer em virtude de altas concentrações de proteínas I κ Bs canônicas: I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ . Essas proteínas quinase em estímulos inflamatórios são fosforiladas pelo complexo IKK/NEMO nos resíduos de serina para serem degradadas, processo que torna os dímeros NF- κ B livres para interação com promotores gênicos para indução da expressão gênica; porém, esse processo resulta em

rápida ressíntese e acúmulo de IκBs, tornando o sistema insensível a uma série de perturbações que impedem a translocação de p65 (HOFFMANN et al., 2002; GLYN et al., 2002). De forma complementar, os dímeros com RelA também podem ser inibidos no citoplasma por IκBs não canônicas IκBγ e IκBδ (BASAK et al., 2008).

A lógica regulatória do esquema de sinalização NF-κB trata de sistema de sinalização complexo, no qual componentes da via canônica e não canônica podem atuar de maneira sinérgica ou antagônica. Em contraste aos resultados da via canônica, detectamos atividade não canônica por aumento dos níveis de RelB induzidas por *Plasmodium berghei*. Verificamos que o derivado LDT540A (17) apresentou tendência para reduzir os níveis de RelB induzidas pelo parasito, enquanto o LDT409 (17) reduziu estatisticamente os níveis da proteína, demonstrando efeito anti-inflamatório por diminuição da atividade NF-κB.

A via não canônica atua de forma sinérgica com a via canônica. Primeiro, a proteína RelB é expressa por atividade de RelA; e segundo, que a degradação da IκBδ não canônica, em resposta à estímulos, disponibiliza os dímeros contendo RelA para indução de genes pela via canônica (POMERANTZ; BATIMORE, 2002; XIAO et al., 2004; BASAK, et al., 2008; ODEA; HOFFMANN, 2010). No modelo utilizado é possível atividade de ambas as vias visto que compartilham mecanismos cruzados, promovendo atividade NF-κB (BASAK; HOFFMANN, 2008). Os resultados sugerem atividade NF-κB nos macrófagos devido ao aumento dos níveis de EROS, NO, COX-2 e corpúsculo lipídicos induzidos pelo parasito. Porém, vale ressaltar que as células J774 são provenientes de camundongos da espécie BALB/C, que apresentam característica particular de resistência à malária, e desenvolvem respostas inflamatórias menos intensas quando comparado com células de camundongos C57BL e CBA (BORGES, 2013).

Independente da via de ativação NF-κB, uma das primeiras respostas é a expressão de genes envolvidos com o aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio (EROS) como mecanismo de defesa celular contra agentes infecciosos (MORGAN; LIU, 2010; KOLYADA et al., 1996). Entretanto, as EROS, em certos níveis, são tóxicas devido oxidação de estruturas proteicas, lipídios e ácidos nucleicos (SAITOH et al., 2006; TAKEDA et al., 1999).

Observamos aumento dos níveis gerais de espécies reativas de oxigênio intracelular em macrófagos J774 na presença do parasito. As EROS produzidas durante o processo infeccioso podem intensificar ainda mais a via NF- κ B no citoplasma, visto que o processo oxidativo pode ativar IKKs e apresentar efeitos nos alvos à jusante com consequente retroalimentação positiva da via. Além disso, a oxidação direta de RelA:p50 aumenta a afinidade do dímero no sítio de ligação ao DNA (KABE et al., 2005). Nossos resultados mostraram um efeito biológico dos derivados **17** e **18** na redução do estresse oxidativo gerados pelo *Plasmodium berghei*.

Na continuidade do trabalho, determinamos a espécie reativa óxido nítrico (NO) no sobrenante das células observando seu papel na resposta inflamatória de macrófagos e outras células do sistema imunológico induzidos por ação da enzima iNOS. Os resultados mostraram aumento dos níveis de NO pelos macrófagos J774 estimulados com *Plasmodium berghei* e, a atividade biológica do LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**) na redução do estresse oxidativo. De forma geral, ambos os compostos mostraram papel protetor as estruturas intracelulares provocadas por processos oxidativos induzidos pelo parasito.

O aumento da biogênese dos corpúsculos lipídicos (CL) estava relacionado com a infecção com *Plasmodium berghei* ANKA, e confirmou a ocorrência de processo inflamatório (BOZZA, et al., 2003). Os CL não são apenas depósitos de lipídios neutros, são estruturas altamente reguladas e funcionalmente ativas que aumentam de tamanho e número após estimulação. *In vivo* os CL são formados pela captação de lipídios exógenos como triglicerídios e LDL (ASSIS, et al., 2003). No modelo estudado, o conteúdo dos CL provavelmente advém de fontes intracelulares como os ácidos graxos insaturados e esterificados tais como o ácido decosaheptaenóico e araquidônico, linoleico, e ômega 3 (ASSIS, et al., 2003; RAPOSO, 2010).

O processo biogênico do CL é complexo; porém, sabe-se que está intimamente relacionado com o aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio que oxidam moléculas lipídicas intracelulares, sendo este processo chave para a formação do CL (NAGY et al., 1998). De forma complementar, os receptores PPAR γ apresentam papel fundamental no processo transcricional de genes relacionados ao metabolismo e acúmulo de gotículas lipídicas no

citoplasma das células (TONTONNOZ et al., 1998), diante dessa informação, esperava-se que os compostos agonistas parciais de PPARs LDT409 (17) e LDT540A (18) aumentassem a formação de CL basal das células; porém observamos justamente o contrário. Em virtude de inúmeros mecanismos associados aos receptores de PPARs ativados, hipotetizamos que o mecanismo de repressão ou transrepressão gênica do NF- κ B tenha inibido a transcrição de genes de biogênese da organela inflamatória (WAGNER, et al., 2019). Interessantemente, o tratamento celular com os agonistas de PPARs promoveram redução biológica dos níveis de CL induzidos pelo parasito, provavelmente pelos mesmos mecanismos.

Estudos proteômicos mostram que os CL são estruturas ricas em enzimas COX-2 e LOX-5, que metabolizam seu conteúdo lipídico para a geração dos mediadores inflamatórios leucotrienos, prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (PELLETIER, et al., 2003). Segundo Assis et al., (2003), após 24 horas de estímulo celular, foram observados aumentos na expressão das enzimas COX-2 e LOX-5 que se deslocaram do núcleo celular para se concentrar intra corpúsculo lipídico. Não avaliamos o trajeto e a compartimentalização da enzima COX-2 nas células; porém os experimentos mostraram aumento significativo da concentração da enzima COX-2 total nos macrófagos J774 após estimulação com *Plasmodium berghei*. Esta observação está de acordo com o aumento dos níveis de CL, e possivelmente esteja localizado intra-corpúsculo.

Os derivados LDT409 (17) e LDT540A (18) não exerceram efeitos biológicos e/ou estatisticamente significantes sobre os níveis da enzima. Assis et al. (2003) avaliou *in vivo* a contribuição das enzimas COX-2 e LOX-5 na formação dos CL por inibição induzida por celecoxibe ou zileuton, respectivamente. O tratamento com celecoxibe não refletiu na formação de CL após estímulo; em contraste, zileuton bloqueou a formação de CL, indicando que LOX-5 possa ser o principal responsável pela formação de corpúsculos. Um dos objetivos específicos também seria avaliar em conjunto os níveis de LOX-5, porém dificuldades metodológicas e técnicas impediram a análise dos resultados. Diante dessa informação, postulamos que seria necessário a repetição do experimento de LOX-5 para determinar se os efeitos do aumento dos níveis de corpúsculo lipídicos estariam relacionados com aumento da

atividade enzimática de LOX-5 e, de maneira complementar, avaliar a influência dos compostos LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**) sobre a expressão de LOX-5. Desta forma, poderíamos avaliar se os efeitos de redução de CL observados ocorreram em virtude de modulação de LOX-5, atividade direta dos compostos sobre a biogênese do corpúsculo, ou até mesmo ambos os fatores.

Os receptores nucleares PPARs têm sido bastante estudado nos últimos anos em virtude dos seus efeitos estimulatórios ou inibitórios da expressão gênica. Os fármacos agonistas PPARs já foram identificados para o tratamento de doenças metabólicas; porém, inúmeros pesquisadores têm estudado o papel desses compostos no contexto das doenças infecciosas.

Os PPARs são ativados após interação com agonistas e funcionam como sensores do microambiente intracelular para modular a resposta imune (WAGNER, et al., 2019). Neste contexto, são potenciais anti-inflamatórios devido sua interação direta com fatores NF- κ B por processos de repressão ou transrepressão, cujos mecanismos também envolvem modificações pós-traducionais por fosforilação, acetilação, sumoilação e ubiquitinação (MAHAJAN, et al., 2016; CHAWLA, 2012; NAGY et al., 2012; KISS; NAGY, 2013).

Os macrófagos de mamíferos expressam os três subtipos de PPAR: PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ (JIANG; TIANG, 1998; RICOTE, et al., 1998). O derivado LDT540A (**18**) apresenta atividade agonista parcial sobre os receptores PPAR α (0,73 μ M) e PPAR γ (1,8 μ M) e fraca ativação PPAR β/δ (21 μ M). Por sua vez, LDT409 (**17**) mostra melhor atividade agonista parcial para PPAR α (0,53 μ M) e PPAR γ (0,94 μ M), porém não foi encontrada atividade PPAR β/δ (FERREIRA, 2018). Neste contexto, nossos dados sugerem que os mecanismos dos compostos avaliados podem estar relacionados com as funções sobre os receptores que ativam.

A ativação dos receptores PPAR α por LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**) provavelmente gera efeitos inibitórios sobre a formação de complexos NF- κ B citoplasmáticos e atenua inflamação por efeito de impedimento direto da expressão das proteínas NF- κ B (GRYGIEL-GORNIK, 2014; BENSINGER; TONTONNOZ, 2004; MICHALIK; WAHLI, 2008; SAHIN, 2017).

A receptor PPAR β/δ é induzido fracamente pelo LDT540A (**18**) que, após ativado, se desloca para o núcleo celular e interage diretamente com o promotor

gênico do fator nuclear p65 (RelA) para impedir sua ligação e indução da expressão gênica, havendo redução da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas por repressão das atividades de NF-kB (XU et al., 2013; ZINGARELLI et al., 2010).

Os receptores PPAR γ são encontrados em níveis elevados em macrófagos (MICHALIK; WAHLI, 2008). Durante processo inflamatório desencadeado pelo *Plasmodium*, os macrófagos classicamente ativados (M1) produzem ampla variedade de citocinas pró-inflamatórias, enquanto macrófagos alternativamente ativados (M2) apresentam fenótipo anti-inflamatório e promovem reparo tecidual. O equilíbrio entre duas populações é desencadeado pela atividade de transativação de PPAR γ que induz a expressão de Arg-1 (arginase 1), responsável pela diferenciação M2 (BENSINGER; TONTONNOZ, 2008; SONG et al., 2016). Os resultados obtidos sugerem que ambos os compostos induziram perfil de diferenciação M2.

Este estudo forneceu evidências de que a utilização dos agonistas parciais de PPARs, o LDT409 e o LDT540A regularam negativamente as respostas imunes pró-inflamatórias da infecção celular induzidas pelo *Plasmodium berghei* ANKA. Nossos dados mostraram diminuição dos níveis da proteína não canônica RelB, redução do estresse oxidativo provocado pelas EROS e óxido nítrico, e diminuição dos níveis de corpúsculos lipídicos produzidos pelos macrófagos J774. Os compostos não exerceram efeito biológicos e/ou estatísticos sobre os níveis de COX-2.

7.1 LIMITAÇÕES

Uma limitação deste estudo é que o ensaio de viabilidade por MTT, mesmo sendo uma abordagem amplamente explorada para mensurar a citotoxicidade de candidatos terapêuticos, a redução do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium] não ocorre apenas por atividade de enzimas mitocondriais, há interferências de outras vias metabólicas nas células. Além disso, é possível que os compostos bioativos alterem a capacidade de metabolização mitocondrial. Para evitar erros de interpretação de resultado, ensaios não metabólicos são recomendados (STEPANENKO; DMITRENKO, 2015). A viabilidade celular é mais precisa quando mensurada por marcadores

de morte celular, tais como: determinação dos níveis da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada no citoplasma; avaliação da capacidade das células de excluirm o corante azul de tripano do citoplasma; e pelo ensaio da expressão da luciferase (ARAS, et al., 2008). Porém, o ensaio de MTT foi a única opção disponível no laboratório, por causa desta limitação, para obtenção de dados conclusivos sobre a toxicidade dos derivados **17** e **18**, seria importante a avaliação dos mecanismos de morte celular das células J774 quando em contatos com estes compostos.

Em nossos experimentos associamos os efeitos moduladores da inflamação à atividade agonista dos receptores PPARs, porém, uma limitação foi a ausência de um controle positivo tratado com agonista parcial, como o benzofibrato, visto que os compostos são agonistas fracos (FERREIRA, 2018), e desta forma comparar os resultados obtidos. Além disso, em outros estudos do nosso grupo, os derivados **17** e **18** já foram identificados com ação em diferentes alvos relacionadas a inflamação (dados não mostrados), todavia, não podemos definir que os efeitos observados neste experimento estejam diretamente relacionados ao agonismo de PPARs.

Uma limitação deste estudo, é que não podemos afirmar que a via do NF- κ B estava ativa, visto que a avaliação dos níveis das proteínas RelA e RelB isoladamente são insuficientes para tal resposta, mesmo que nossos resultados indiquem possível ativação por aumento dos níveis EROS, NO, CL e COX-2. A via trata-se de um sistema complexo, que envolve uma infinidade de proteínas com diferentes funções. Neste caso, seria necessário o mapeamento de outras proteínas da via, a realização de experimentos que avaliassem o processo de translocação das proteínas NF- κ B, e os níveis de transcritos das células J774 estimuladas com *Plasmodium berghei* ANKA em comparação com células estimuladas e tratadas com os derivados **17** e **18**.

Esse estudo iniciou-se pela observação que a malária mesmo sendo tratada adequadamente com fármacos antimaláricos, ocorre evolução para as formas graves em decorrência de processo inflamatório intenso. Desta forma, outra limitação foi a ausência de grupos tratados com antimaláricos, em comparação com grupos tratados com antimaláricos associado com agonista de PPARs. Desta forma seria possível avaliar o benefício da utilização dos derivados **17** e **18**.

Conclusão e Perspectivas

8. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

8.1 Conclusão

- Nosso estudo mostrou pela primeira vez o efeito dos compostos agonistas parciais dos receptores PPARs, o LDT409 e o LDT540A, na modulação de vias inflamatórias de macrófagos J774, no contexto de infecção celular induzido pelo *Plasmodium berghei* ANKA.
- O trabalho teve início pela purificação dos compostos de partida, o cardanol saturado (LDT10, **12S**) e cardanol monoinsaturado (LDT10iA, **12A**), este último com presença do derivado dieno LDT10B (**12B**), de acordo com as análises de RMN de hidrogênio e Carbono-13. Por meio de metodologia de interconversão dos grupos funcionais como a O-alkilação, em condições experimentais sob refluxo, foram obtidos os ésteres intermediários LDT408 (**15**) e o LDT539A (**16**); este último ainda como mistura com o éster LDT539B (**16B**). Estes intermediários foram submetidos à hidrólise alcalina sob refluxo para obtenção do ácido LDT409 (**17**), e à temperatura ambiente para LDT540A (**18**). As metodologias utilizadas levaram à obtenção dos compostos-alvo em respectivos rendimentos individuais de 70 % e 98 %, e globais, que inclui as duas etapas sintéticas, de 77 % e 69 %. As estruturas moleculares dos compostos de partida, e dos produtos intermediários e finais foram confirmadas por métodos espectroscópicos de análise, RMN de ¹H e RMN de ¹³C.
- Quanto à determinação do perfil citotóxico, avaliamos os efeitos dos compostos LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**) sobre a viabilidade dos macrófagos J774 em concentrações de 25 μM, 50 μM, 75 μM, 100 μM, 125 μM e 150 μM. Ambos os compostos não mostraram toxicidade, mesmo na maior concentração avaliada, uma vez que não modificaram o metabolismo mitocondrial basal das células.
- A expressão da via do NF-κB pelo *Plasmodium berghei* ANKA foi avaliada pelas proteínas representantes das vias canônica (RelA) e não canônica (RelB). Considerando a via canônica neste modelo, tanto LPS como

controle positivo quanto a presença do parasito não induziram quaisquer alterações, assim como não foram observados efeitos dos agonistas PPAR sobre a via. Do contrário, o parasito induziu alterações na via não canônica do NF- κ B, por aumento da expressão de RelB. Foi observado que ambos os derivados LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**) apresentaram efeito biológico na redução da proteína, porém foi estatístico apenas para o derivado **17**. Embora não foram avaliados os genes transcritos pelas células após estimulação com o parasito, e os efeitos do LDT409 e LDT540A, nossos resultados mostraram aumento dos níveis de EROS, NO, COX-2 e corpúsculo lipídico, que podem ter ocorrido em virtude dos efeitos via NF- κ B sobre os promotores, por consequente aumento da expressão gênica.

- Os compostos LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**) reduziram biologicamente o estresse oxidativo provocado pelas EROS e NO nos macrófagos J774, induzido pelo parasito.
- Nossos resultados mostraram que o parasito induziu o aumento de corpúsculo lipídicos nos macrófagos J774. Em compensação, os compostos LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**) reduziram biologicamente os níveis da organela inflamatória. Uma vez que aumento da concentração de CL nas células estava associado ao aumento dos níveis da enzima inflamatória ciclooxigenase-2, LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**) foram avaliados, mas não exerceram efeitos inibitórios sobre a enzima.

Por fim, este trabalho mostrou efeitos promissores dos compostos LDT409 (**17**) e LDT540A (**18**) na modulação negativa das vias inflamatórias de macrófagos J774 provocadas pelo *Plasmodium berghei*. Porém, trata-se de uma proposta inicial no estudo da malária, ainda é necessário aprofundamento no tema, de forma a avaliar o impacto destes compostos na modulação do sistema imune, e no desenvolvimento das formas graves da doença.

8.2 Perspectivas

Uma vez que os corpos lipídicos armazenam as enzimas COX-2 e LOX-5, a repetição dos experimentos de LOX-5 constitui uma das perspectivas deste trabalho, uma vez que esta enzima é citada por alguns autores como a principal responsável pela formação do conteúdo lipídico. Dessa forma, o estudo complementar ampliaria o conhecimento a respeito da influência dos agonistas parciais de PPARs LDT409 (17) e LDT540A (18) sobre a concentração da enzima.

Ainda no contexto da atividade de COX-2 e LOX-5, considerando que essas enzimas metabolizam o conteúdo dos corpúsculos para a produção de eicosanoides, seria oportuno determinar os níveis de tromboxano, prostaglandinas inflamatórias e leucotrienos bem como e avaliar os efeitos dos compostos LDT409 (17) e LDT540A (18) sobre estes mediadores inflamatórios.

Adicionalmente, tendo em mente que a atividade da via do NF-kB ativa a expressão gênica para produção de citocinas e quimiocinas, que apresentam função retroalimentação positiva da via, a avaliação do perfil de atividade dos dos agonistas PPARs LDT409 (17) e LDT540A (18) frente a estes mediadores seria enriquecedor para esta pesquisa.

E finalmente, a continuação por meio de estudos *in vivo*, utilizando camundongos infectados com *Plasmodium berghei* como modelo, possibilitaria avaliar a evolução, sobrevida, aspectos clínicos e parasitemia de animais controle em comparação com animais tratados com LDT409 (17) e LDT540A (18).

Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

ABCAM. **MTT Cell Proliferation Assay Kit**. For the measurement of cell proliferation in cultured cells. 2018.

ADAMS, John H.; MUELLER, Ivo. The Biology of *Plasmodium vivax*. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [s.l.], v. 7, n. 9, p.025585-025572, 10 maio 2017.

ALVES, P. S. **SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE NOVOS AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS PLANEJADOS A PARTIR DO ÁCIDO ANACÁRDICO**, 2015. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

AMATO, A. A. **Investigação da atividade farmacológica de Benzilideno- e Acridinilideno- Tiazolidinadionas e de Isoflavonas nos receptores alfa, beta/delta e gama ativados por Proliferadores Peroxissomais**. 2008. Tese (Doutorado) - Departamento de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

AMBER-VITOS, O. et al.. The effect of regulating molecules on the structure of the PPAR-RXR complex. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, [s.l.], v. 1861, n. 11, p.1852-1863, 2016.

ANDREÃO, P. S. S et al.. Utilização e recuperação de sílica gel impregnada com nitrato de prata. **Química Nova**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.1852-1863, 2010.

ANDREU, N. et al.. Primary macrophages and J774 cells respond differently to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-5, 2017.

ANTINORI, S. G. L. et al.. Biology of Human Malaria Plasmodia Including *Plasmodium knowlesi*. **Mediterr J Hematol Infect Dis**. [s.l.], v. 4, n. 1, p.1-10, 2012.

ARAS, M. A.; HARTNETT, K. A.; AIZENMAN, E.. Assessment of Cell Viability in Primary Neuronal Cultures. **Current Protocols In Neuroscience**, [s.l.], p.1-8, jul. 2008.

ASSIS, E.F. et al.. Synergism between platelet-activating factor-like phospholipids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists generated during low density lipoprotein oxidation that induces lipid body formation in leukocytes. **J Immunol**, [s.l.], v. 171, n. 4, p.2090-2098, 2003.

BALACHANDRAN, V. S. et al.. Recent advances in cardanol chemistry in a nutshell: from a nut to nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 42, n. 2, p. 427-438, 2013.

BASAK, S. et al.. Generation and Activation of Multiple Dimeric Transcription Factors within the NF- κ B Signaling System. **Molecular And Cellular Biology**, [s.l.], v. 28, n. 10, p.3139-3150, 2008.

BASAK, S.; HOFFMANN, A.. Crosstalk via the NF- κ B signaling system. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, [s.l.], v. 19, n. 3-4, p.187-197, 2008.

BENSINGER, S. J.; TONTONNOZ, P.. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. **Nature**, [s.l.], v. 454, n. 7203, p.470-477, jul. 2008.

BLASCO, B. et al.. Antimalarial drug resistance: linking *Plasmodium falciparum* parasite biology to the clinic. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 23, n. 8, p.917-928, 2017.

BORGES, T. K. S. **MECANISMOS DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM MODELOS MURINOS DE *Plasmodium berghei* ANKA, SUSCETÍVEIS OU NÃO À MALÁRIA CEREBRAL**. 2013. 245 f. Tese (Doutorado) - Curso de Patologia Molecular - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

BOZZA, P. T. et al.. Leukocyte lipid bodies — Biogenesis and functions in inflammation. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba)* - **Molecular And Cell Biology Of Lipids**, [s.l.], v. 1791, n. 6, p.540-551, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Malária**. 2018a. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Malária**. 2018b. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria/situacao-epidemiologica-dados>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Malária: Descrição da Doença**. 2014. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria/descricao-da-doenca>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de diagnóstico laboratorial da malária**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASÍLIA. Subsecretaria de Vigilância a Saúde. Secretaria de Saúde. **Boletim epidemiológico da Malária do Distrito Federal**. [s.l.], n. 1, p.1-5, abr. 2018.

BRINKMANN, F. T.. Oxygen radicals and signaling. **Curr. Opin. Cell Biol**, [s.l.], v. 10, p. 248-253, fev. 1998.

BRINKMANN, X. et al.. Role of macrophages during lethal *Plasmodium berghei* and self-limiting *Plasmodium yoelii* infection in mice. **Infection and Immunity**, [s.l.], v. 44, n.3, p. 743-746, 1984.

CARDOSO, G. S. H. R.. **SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS ANTIPROLIFERATIVOS PLANEJADOS A PARTIR DO ÁCIDO ANACÁRDICO SATURADO**, 2017. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

CASCAES, A. C.G.. **EFEITO DO ÁCIDO ANACÁRDICO IN VITRO E EM MODELOS EXPERIMENTAIS DA MALÁRIA**, 2017. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

CHAWLA, O..Control of macrophage activation and function by PPARs. **Circ Res**, [s.l.], v. 106, n. 10, p.1559-1569, 2012.

CHOPRA, A. et al.. Cloning of the guinea pig 5-lipoxygenase gene and nucleotide sequence of its promoter. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 185, n. 2, p.489-495, 1992.

COBAN, C. et al.. Tissue-specific immunopathology during malaria infection. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 18, n. 4, p.266-278, 2018.

DINIZ JONES, D. P.. Redefining oxidative stress. **Antioxidants e redox signaling**, [s.l.], v. 8, n. 9, p. 1865-1879, 2006.

DINIZ, S. Q. **ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS DE PACIENTES INFECTADOS PELO *Plasmodium vivax***. 2015. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

Dissertação (Mestrado) - Integrative Biology, University Of Guelph, Ontario, 2017.

DOHI, T. et al.. Pathological activation of canonical nuclear-factor κ B by synergy of tumor necrosis factor α and TNF-like weak inducer of apoptosis in mouse acute colitis. **Cytokine**, [s.l.], v. 69, p. 14-21, 2014.

DUNST, J. et al.. Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-16, 2017.

FERREIRA, L. C. et al.. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 145, n. 1, p. 100–108, 2013.

FERREIRA, T.A.M.. **Síntese e Avaliação Farmacológica de novos ligantes PPAR Planejados a partir do Cardanol**. 2014. 170 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas- Faculdade de Saúde e Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Eliminação da malária é tema do programa Sala de Convidados**. 2018. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/eliminacao-da-malaria-e-tema-do-programa-sala-de-convidados>>.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Malária**. 2011. Disponível em: <[http://www.fiocruz.br/ioc/media/malaria %20folder.pdf](http://www.fiocruz.br/ioc/media/malaria%20folder.pdf)>.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Malária**: parasito que infecta macacos também pode infectar humanos. 2017.

GALLEGO-DELGADO, J.; RODRIGUEZ, A.. Rupture and Release: A role for soluble erythrocyte content in the pathology of cerebral malaria. **Trends in Parasitology**, [s.l.], v. 3, n. 1657, p. 1-3, 2017.

GAZZINELLI, R. T. et al.. Innate sensing of malaria parasites. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 14, n. 11, p.744-757, 2014.

GILLRIE, M. R.; HO, M.. Dynamic interactions of *Plasmodium* spp. with vascular endothelium. **Tissue Barriers**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.1268667-126866719, 2016.

GINDERACHTER, J. V. et al.. Macrophages, PPARs, and Cancer. **Ppar Research**, [s.l.], v. 2008, p.1-11, 2008.

GLAHAN, S. et al.. Exploring pancreatic pathology in *Plasmodium falciparum* malaria patients. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-8, 2018.

GLASS, Christopher K.; OGAWA, Sumito. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.44-55, 16 dez. 2005.

GLYN, N. et al. Multi-parameter analysis of the kinetics of NF- κ B signalling and transcription in single living cells. **Journal of Cell Science**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1137-1148, 13 dez. 2002.

GOMES, E. M. R.. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Revista Brasileira de Medicina Intensiva**, [s.l.], v. 23, n. 3, p.358-369, 2011.

GONZAGA, W. A. **Preparação e Avaliação Farmacológica de Derivados dos Lipídios Fenólicos**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

GOODMAN, L. S. et al.. **Goodman & Gilman manual de farmacologia e terapêutica**. Porto Alegre: AMGH, 2015.

GROGER, M. et al. A systematic review of the clinical presentation, treatment and relapse characteristics of human Plasmodium ovale malaria. **Malaria Journal**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.1-5, 2017.

GRYGIEL-GÓRNIAK, B.. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications - a review. **Nutrition Journal**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.1-10, 2014.

HAMAD, F. B; MUBOFU, E. B.. Potential Biological Applications of Bio-Based Anacardic Acids and Their Derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], vol. 16, 2015.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S.. Shared Principles in NF- κ B Signaling. **Cell**, [s.l.], v. 132, n. 3, p.344-362, 2008.

Hoffmann A. et al. The I κ B-NF- κ B signaling module: Temporal control and selective gene activation. **Science**, [s.l.], v. 298, n. 1, p. 1241–1245, 2002.

HOFFMANN, A.. The I κ B-NF- κ B Signaling Module: Temporal Control and Selective Gene Activation. **Science**, [s.l.], v. 298, n. 5596, p.1241-1245, 8 nov. 2002.

HONG, F. et al.. The Opportunities and Challenges of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Ligands in Clinical Drug Discovery and Development. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 8, p.1-29, 2018.

JIANG, C.; TIANG, A. T.. PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, [s.l.], v. 391, n. 6662, p.82-86, 1998.

KABE, Y. et al.. Redox Regulation of NF- κ B Activation: Distinct Redox Regulation Between the Cytoplasm and the Nucleus. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s.l.], v. 7, n. 3-4, p.395-403, 2005.

KALTSCHMIDT, B. et al.. A ciclo-oxigenase-2 é um gene alvo neuronal do NF- κ B. **Bmc Molecular Biology**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.1-12, 2002.

KARIN, M. et al.. NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 2, n. 4, p.301-310, abr. 2006.

KIDA, Y. et al.. Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF- κ B in human gingival fibroblasts. **Cytokine**, [s.l.], v. 29, n. 4, p.159-168, 2005.

KISS, M. C.; NAGY, L. The role of lipid-activated nuclear receptors in shaping macrophage and dendritic cell function: From physiology to pathology. **J Allergy Clin Immunol**, [s.l.], v. 132, n. 2, p.264-286, 2013.

KOLYADA, A. Y. et al.. Transcriptional Regulation of the Human iNOS Gene in Vascular-Smooth-Muscle Cells and Macrophages: Evidence for Tissue Specificity. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 220, n. 3, p.600-605, 1996.

KOSTADINOVA, R. et al.. PPARs in Diseases: Control Mechanisms of Inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 12, n. 25, p.2995-3009, 2005.

LAGANA, A. 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**, [s.l.], v. 17, n. 7, p.1-15, 2016.

LAPOUBLE, O. M. M. et al.. Situação epidemiológica da malária na região amazônica brasileira, 2003 a 2012. **Rev Panam Salud Publica**, [s.l.], v. 38, n. 4, p.300-306, 2015.

LIEHL, P. et al.. Host-cell sensors for Plasmodium activate innate immunity against liver-stage infection. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.47-53, 2013.

LOGRADO, L. P. L. et al.. Synthesis and Biological Evaluation of new salicylate macrolactones from Anacardic Acids. **J. Braz. Chem. Soc**, [s.l.], v.16, p.1217-1225, 2005.

LUBI, M. C; THACHIL, E. T.. Cashew nut shell liquid (CNSL) – a versatile monomer for polymer synthesis. **Monomers and polymers**, [s.l.], v.3, n.2, p.123-153, 2000.

MAHAJAN. S. S. A.. Frienemies of infection: A chronic case of host nuclear receptors acting as cohorts or combatants of infection. **Critical reviews in microbiology**, [s.l.], v. 42, n. 4, p.526-534, 2016.

MAZZETTO, S. E.; LOMONACO, D.. Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Quim. Nova**, [s.l.], v.32, n. 3, p.732-741. 2009.

MELO, R. C. N.; BANDEIRA-MELO, C.. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 113, p. 30-49, 2007.

MICHALIK, L.; WAHLI, W.. PPARs Mediate Lipid Signaling in Inflammation and Cancer. **Ppar Research**, [s.l.], v. 2008, p.1-15, 2008.

MILLER, L. H et al.. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.156-167, 2013.

MITRA, S. et al.. Alteration in Nuclear Factor-KappaB Pathway and Functionality of Estrogen via Receptors Promote Neuroinflammation in Frontal Cortex after 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Treatment. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.1-18, 2015.

MORAES, L. A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 110, n. 3, p.371-385, jun. 2006.

MORGAN, M. J; LIU, Z. G.. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. **Cell Research**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.103-115, 2010.

NAGY, L. et al.. Oxidized LDL Regulates Macrophage Gene Expression through Ligand Activation of PPAR γ . **Cell**, [s.l.], v. 93, n. 1, p.229-240, 1998.

NAGY, L. S. et al.. Nuclear hormone receptors enable macrophages and dendritic cells to sense their lipid environment and shape their immune response. **Physiol Rev**, [s.l.], v. 92, n. 2, p.739-789, 2012.

O'DEA, E.; HOFFMANN, A. The Regulatory Logic of the NF- κ B Signaling System. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.1-12, 2010.

OECKINGHAUS, A. et al.. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. **Nature Immunology**, [s.l.], v. 12, n. 8, p.695-708, 2011.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. **Casos de malária aumentam na região das Américas**. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5591:casos-de-malaria-aumentam-na-regiao-das-americas&Itemid=812>. Acesso em: 08 jul. 2018.

PALACPAC, N.M. et al.. Developmental-stage-specific triacylglycerol biosynthesis, degradation and trafficking as lipid bodies in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **J Cell Sci**, [s.l.], v. 117, n. 8, p.1469-1480, 2004.

PATEL, R. N; BANDYOPADHYAY, G.. Economic appraisal of of supercritical fluid extraction of refined cashew nut shell liquid. **Bioresource Technology**, v.97, p.847-853. 2006.

PAULA, A. B et al.. Infecção Grave por *Plasmodium vivax* em indivíduo não residente de área endêmica: um relato de caso. **Revista Ciência e Saúde**. 2016.

PELLETIER, J. M..Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Ann Rheum**, [s.l.], v. 5, n. 65, p.501-509, 2003.

PERKINS, N. D.. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.49-62, 2007.

POMERANTZ, J. L.; BALTIMORE, D.. Two Pathways to NF- κ B. **Molecular Cell**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.693-695, out. 2002.

POTTER, S. M. et al.. Phagocyte derived reactive oxygen species do not influence the progression of murine blood-stage malaria infections. **Infection and Immunity**, Vol. 73, n. 8, p. 4941-4947, 2005.

PRECÁRIO, S. et al.. Oxidative Stress in Malaria. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 13, n. 12, p. 16346-16372, 2006.

QUEIROZ, F. J. G. **Síntese e Avaliação de Inibidores de Histona Acetiltransferases Planejados a Partir do Ácido Isoanacárdico**. 2015. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

RAMOS, L. A. et al.. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, [s.l.], v. 29, n. 5, p.1114-1120, out. 2006.

RAMOS, A. R. **SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE NOVOS LIGANTES MULTIALVO PLANEJADOS A PARTIR DO CARDANOL CANDIDATOS AO TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**. 2018. Tese (Doutorado) - Departamento de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

RAPOSO, H. F.. Efeito dos ácidos graxos n-3 e n-6 na expressão de genes do metabolismo de lipídeos e risco de aterosclerose. **Rev. Nutri**, [s.l.], v. 5, n. 23, p.871-879, 2010.

RESCK, I. S; SANTOS, M. L.; ROMEIRO, L. A. S. New application of triphosgene in a convenient synthesis of 3-aryl-1,3-benzoxazine-2,4-diones from anacardic acids. **Heterocycles**, v.65, p.311-318. 2005.

RICOTE, M. et al.. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. **Nature**, [s.l.], v. 391, n. 6662, p.79-82, 1998.

RILEY, E. M; STEWART, V. A.. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.168-178, 2013.

RODRIGUES, L. C. S.. **MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E CONCENTRAÇÕES DE PRIMAQUINA E CARBOXIPRIMAQUINA EM PACIENTES COM MALÁRIA POR *Plasmodium vivax***. 2014. Tese (Doutorado) - Departamento de Pós Graduação em Doenças Tropicais. Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.

ROGUE, A. et al.. Comparative gene expression profiles induced by PPAR γ and PPAR α/γ agonists in rat hepatocytes. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [s.l.], v. 254, n. 1, p.18-31, jul. 2011.

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

SAITO, Y. et al. Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. **Free Radical Research**, [s.l.], v. 40, n. 6, p.619-630, 2006.

SCHOFIELD, L.; GRAU, G. E.. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 5, n. 9, p.722-735, 2005.

SINGH, B.; DANESHVAR, C.. Human Infections and Detection of Plasmodium knowlesi. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.165-184, 1 abr. 2013.

SILVA, P. P.. **Análise dos corpúsculos lipídicos em macrófagos humanos infectados pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e submetidos ao tratamento com a droga benzonidazol**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Pós Graduação em Biologia Celular, Universidade de Minas Gerais, 2012.

SON, Yong-hae et al. Roles of MAPK and NF- κ B in Interleukin-6 Induction by Lipopolysaccharide in Vascular Smooth Muscle Cells. **Journal Of Cardiovascular Pharmacology**, [s.l.], v. 51, n. 1, p.71-77, 2008.

SONG, G. J. et al.. A novel small-molecule agonist of PPAR- γ potentiates an anti-inflammatory M2 glial phenotype. **Neuropharmacology**, [s.l.], v. 70, n. 3, p.159-169, jan. 2016.

SRITHARAN, A.. **Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)**, TAKEDA, M. et al. Hydrogen Peroxide Induces Necrosis, Apoptosis, Oncosis and Apoptotic Oncosis of Mouse Terminal Proximal Straight Tubule Cells. **Nephron**, [s.l.], v. 81, n. 2, p.234-238, 1999.

STEPANENKO, A.; DMITRENKO, V.. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene**, [s.l.], v. 574, n. 2, p.193-203, dez. 2015.

TAN, H. et al.. The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [s.l.], v. 2016, n. 2, p.1-16, 2016.

TATSCH, E. et al.. Influência dos anticoagulantes e da temperatura de armazenamento sobre os níveis sanguíneos de nitrito. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s.l.], v. 47, n. 2, p.147-150, abr. 2011.

TONTONOZ, P. et al.. PPAR γ Promotes Monocyte/Macrophage Differentiation and Uptake of Oxidized LDL. **Cell**, [s.l.], v. 93, n. 2, p.241-252, 1998.

TONY, P. et al.. TOXICIDADE E EFICIÊNCIA DO DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) NO CONGELAMENTO DE CÉLULAS MADIN-DARBY BOVINE KIDNEY (MDBK). **SCIENCE AND ANIMAL HEALTH**, [s.l.], v. 3, n.2, 2015, p.159-168, 2015.

VARFOLOMEEV, E.; VUCIC, D.. (Un)expected roles of c-IAPs in apoptotic and NF κ B signaling pathways. **Cell Cycle**, [s.l.], v. 7, n. 11, p.1511-1521, 2008.

VIENNOIS, E. et al.. NF- κ B pathway in colitis-associated cancers. **Transl Gastrointest Cancer**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.241-252, 2002.

WAGER, C. M. et al.. Macrophage nuclear receptors: Emerging key players in infectious diseases. **Plos Pathogens**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.1007585-1007613, 2019.

WHO. **Guidelines for the treatment of malaria**. 3^a ed. 2015. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/162441/9789241549127_eng.pdf;jsessionid=25BB7E9F599E07CACF6D21078C6474F8?sequence=1>.

WHO. **World Malaria Report 2016**. Summary. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254912/WHO-HTM-GMP-2017.4-eng.pdf?sequence=1>>.

WHO. **World Malaria Report 2017**. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259492/9789241565523-eng.pdf;jsessionid=DA04DBA33BC65FA93584B5E900F0CCE6?sequence=1>>.

WIRTH, C. C; PRADEL, G.. Molecular mechanisms of host cell egress by malaria parasites. **Int J Med Microbiol**, [s.l.], v. 302, n. 4-5, p.172-178, 2012. 2012.

WONG, E. T.; TERGAONKAR, V.. Roles of NF- κ B in health and disease: mechanisms and therapeutic potential. **Clinical Science**, [s.l.], v. 116, n. 6, p.451-465, 2009.

WYKES, M. N. et al.. Plasmodium Strain Determines Dendritic Cell Function Essential for Survival from Malaria. **Plos Pathogens**, [s.l.], v. 3, n. 7, p.0904-0912, 2007.

XU, J. et al.. Inhibition of 12/15-lipoxygenase by baicalein induces microglia PPAR β/δ : a potential therapeutic role for CNS autoimmune disease. **Cell Death & Disease**, [s.l.], v. 4, n. 4, p.569-569, abr. 2013.

YAMADA, H. 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. **Journal Of Lipids**, [s.l.], v. 2016, p.1-9, 2016.

YANG, X. J.. Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. **Bioessays**, [s.l.], v. 26, n. 10, p.1076-1087, 2004.

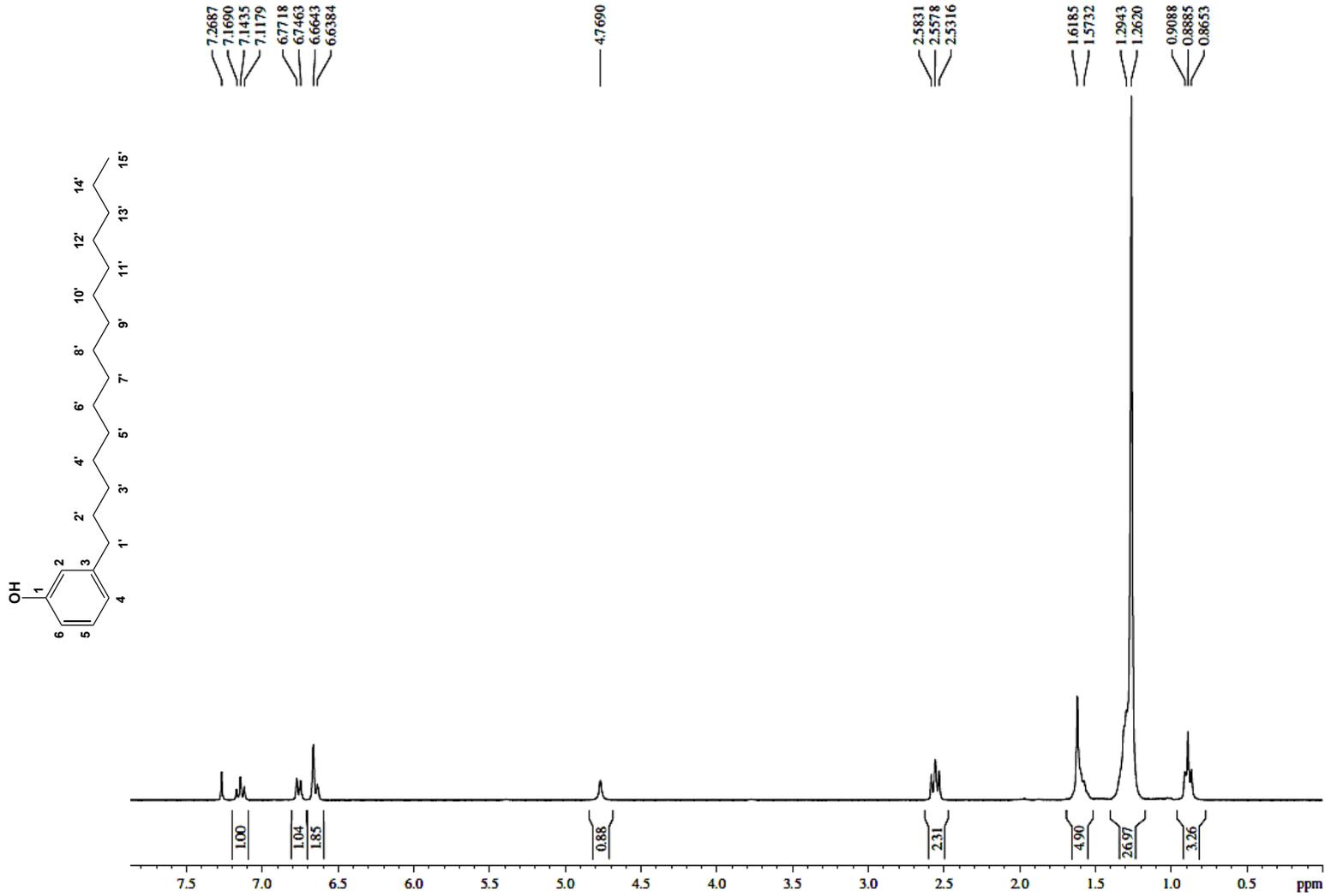
YOKOI, H. et al.. Hydroxy Monounsaturated Fatty Acids as Agonists for Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, [s.l.], v. 33, n. 5, p.854-861, 2010.

ZINGARELLI, B. et al. Peroxisome Proliferator – Activated Receptor δ Regulates Inflammation via NF- κ B Signaling in Polymicrobial Sepsis. **Journal of Pathology**, [s.l.], v. 177, n. 4, p.1834-1847, 2010.

ANEXOS

**ANEXO 1 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)
3-Pentadecilfenol (LDT10, 12S)**

LDT 10 (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [¹H/CDCl₃/303K] Operador Herbert 20.03.2018



```

Current Data Parameters
NAME      LDT 10
EXPNO    1
PROCNO   1

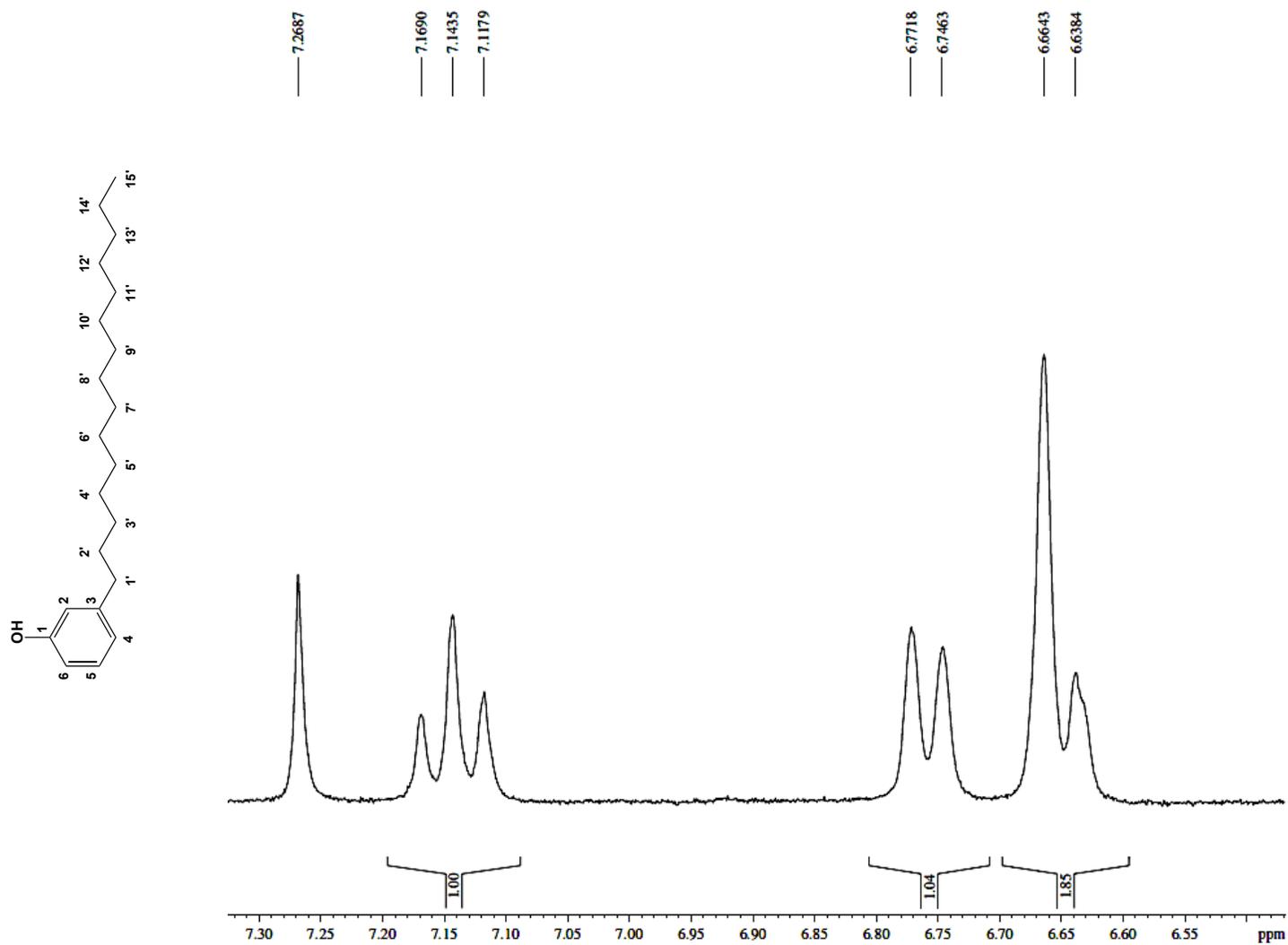
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180320
Time     15.42
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Dual 13C/
PULPROG  zg
TD        65536
SOLVENT  CDCl3
NS        8
DS        0
SWH      7183.908 Hz
FIDRES   0.109618 Hz
AQ       4.5613556 sec
RG       12.7
DW       69.600 usec
DE       10.00 usec
TE       300.0 K
D1       1.0000000 sec
TDO      1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1     1H
P1       10.25 usec
PL1      3.00 dB
SFO1    300.1324010 MHz

F2 - Processing parameters
SI       32768
SF       300.1300128 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       0.00 Hz
GB       0
PC       1.00
    
```

ANEXO 2 – Expansão do Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) 3-Pentadecilfenol (LDT10, 12S)

LDT 10 (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [$^1\text{H}/\text{CDCl}_3/303\text{K}$] Operador Herbert 20.03.2018



Current Data Parameters
NAME LDT 10
EXPNO 1
PROCNO 1

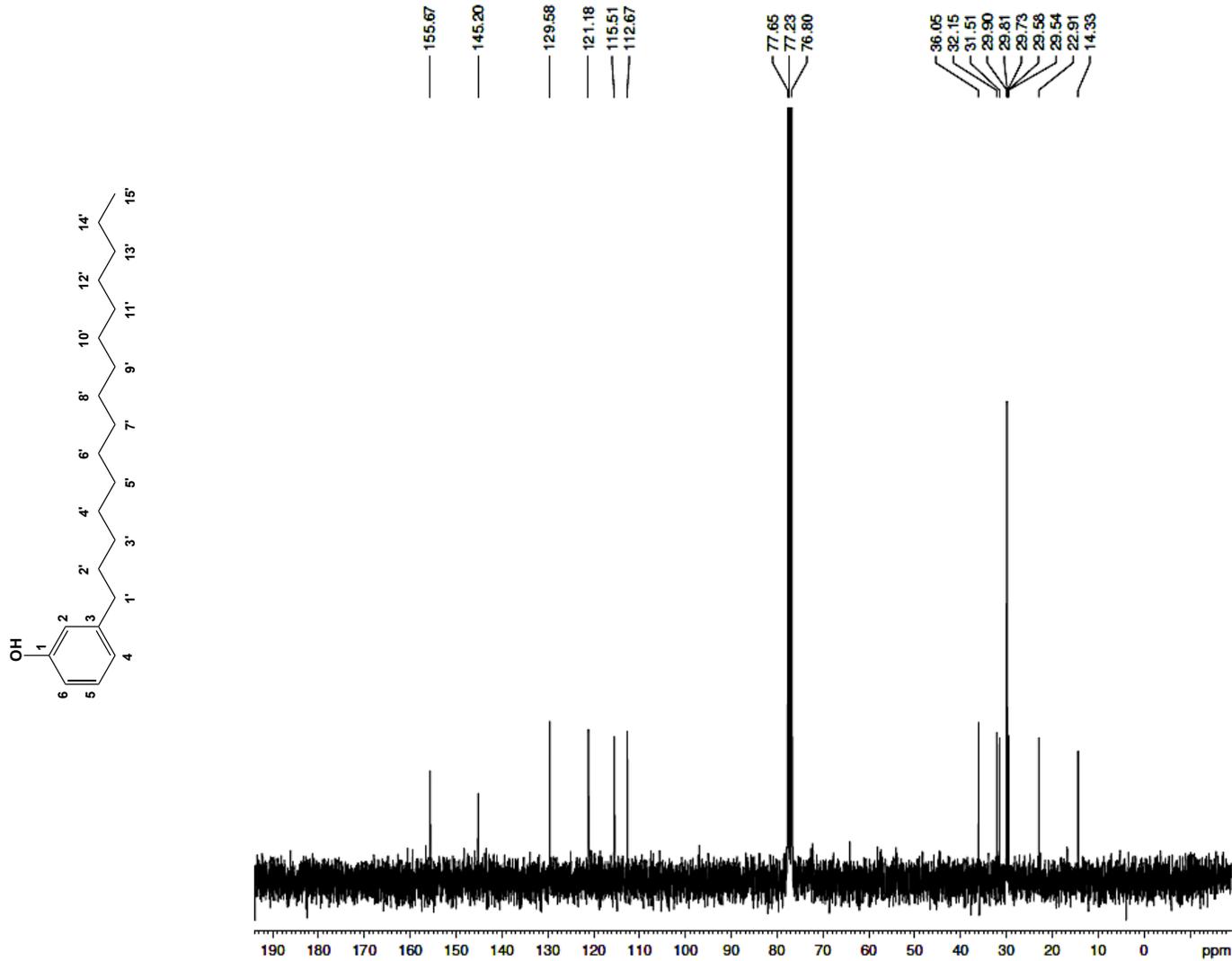
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20180320
Time 15.42
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13C/
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT CDCl_3
NS 8
DS 0
SWH 7183.908 Hz
FIDRES 0.109618 Hz
AQ 4.5613556 sec
RG 12.7
DW 69.600 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 ^1H
PI 10.25 usec
PL1 3.00 dB
SFO1 300.1324010 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300128 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

ANEXO 3 – Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) 3-Pentadecilfenol (LDT10, 12S)

LDT 10 (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [¹³C/CDCl₃/303K] Operador Herbert 20.03.2018



```

Current Data Parameters
NAME      LDT 10
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180320
Time     16.16
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Dual 13C/
PULPROG  zgpg30
TD       32768
SOLVENT  CDCl3
NS       1024
DS       0
SWH      17985.611 Hz
FIDRES   0.548877 Hz
AQ       0.9110004 sec
RG       32768
DW       27.800 usec
DE       10.00 usec
TE       300.0 K
D1       1.0000000 sec
d11      0.0300000 sec
DELTA    0.8999999 sec
TD0      1

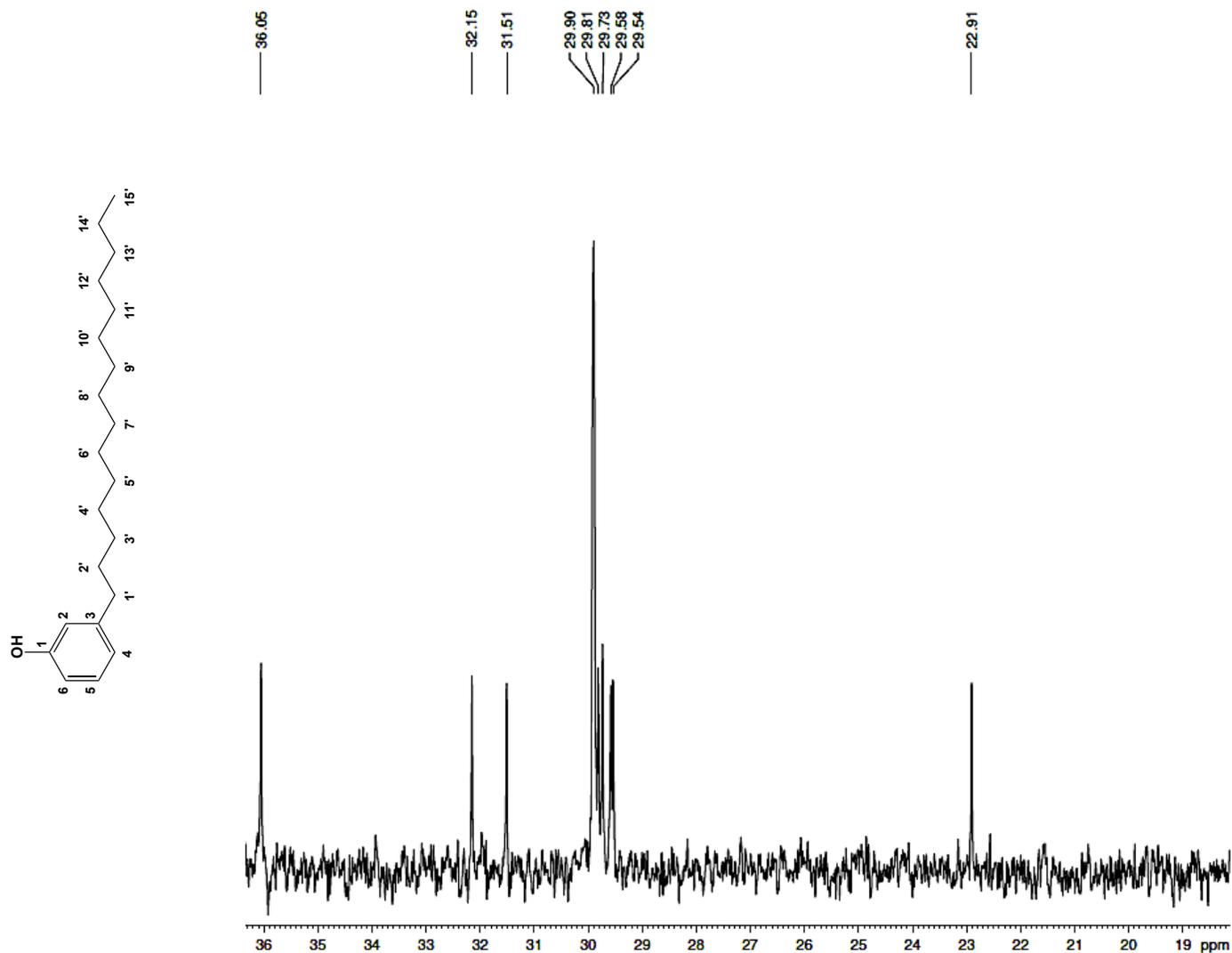
----- CHANNEL f1 -----
NUC1     13C
P1       11.50 usec
PL1      3.00 dB
SFO1     75.4752950 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2  waltz16
NUC2     1H
PCPD2    80.00 usec
PL2      3.00 dB
PL12     19.48 dB
PL13     19.48 dB
SFO2     300.1312000 MHz

F2 - Processing parameters
SI       65536
SF       75.4677346 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       1.00 Hz
GB       0
PC       1.40
    
```

ANEXO 4 – Expansão do Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) 3-Pentadecilfenol (LDT10, 12S)

LDT 10 (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [$^{13}\text{C}/\text{CDCl}_3/303\text{K}$] Operador Herbert 20.03.2018



```

Current Data Parameters
NAME      LDT 10
EXPNO    2
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180320
Time     16.16
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Dual 13C/
PULPROG  zgpg30
TD       32768
SOLVENT  CDCl3
NS       1024
DS       0
SWH      17985.611 Hz
FIDRES   0.548877 Hz
AQ       0.9110004 sec
RG       32768
DW       27.800 usec
DE       10.00 usec
TE       300.0 K
D1       1.0000000 sec
d11      0.0300000 sec
DELTA    0.89999998 sec
TD0      1

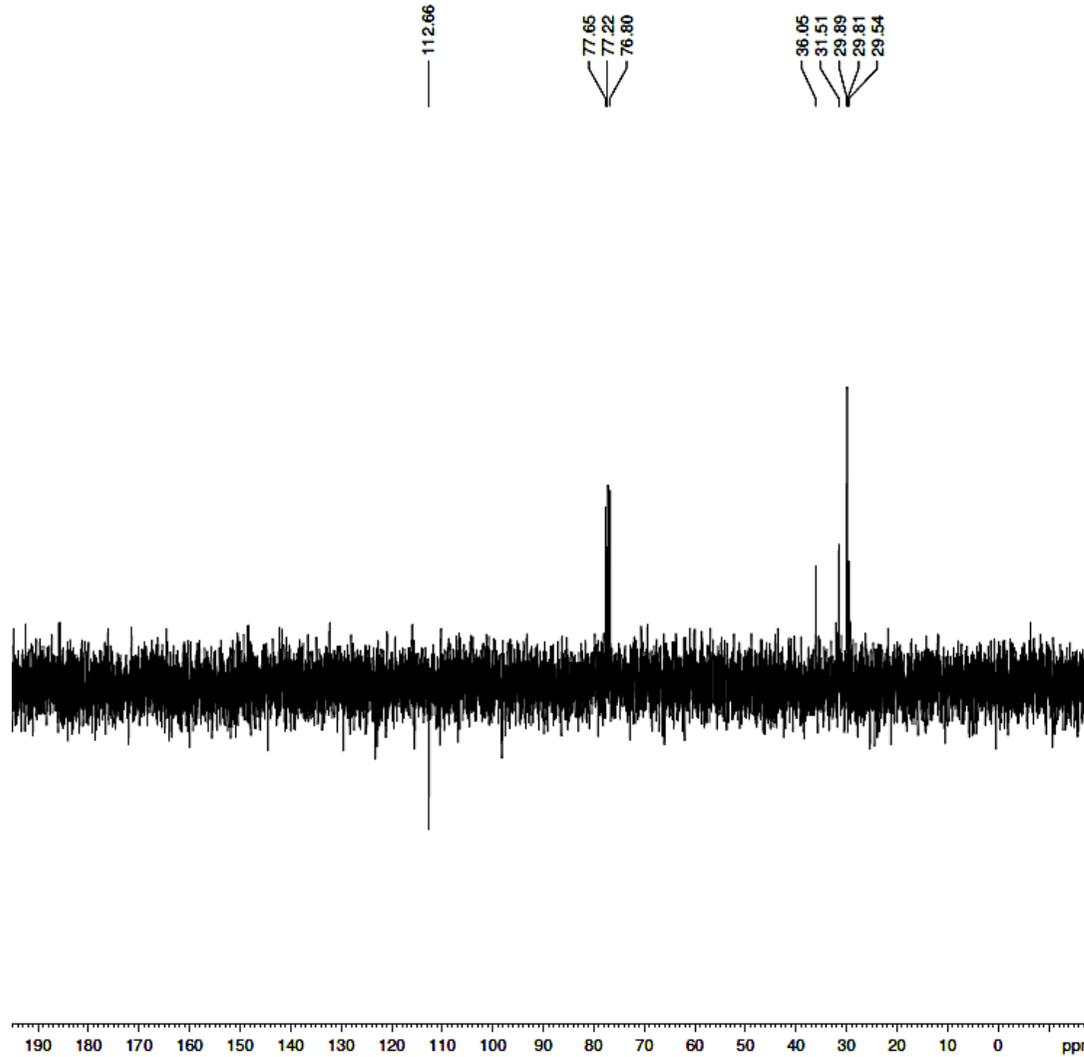
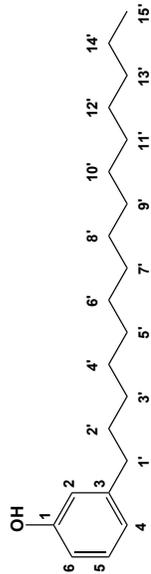
----- CHANNEL f1 -----
NUC1      13C
P1        11.50 usec
PL1       3.00 dB
SFO1      75.4752950 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2   waltz16
NUC2      1H
PCPD2     80.00 usec
PL2       3.00 dB
PL12      19.48 dB
PL13      19.48 dB
SFO2      300.1312000 MHz

F2 - Processing parameters
SI        65536
SF        75.4677346 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        1.00 Hz
GB        0
PC        1.40
    
```

ANEXO 5 – Espectro de RMN de ^{13}C _APT (75 MHz, CDCl_3) 3-Pentadecilfenol (LDT10, 12S)

LDT 10 (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [APT/ CDCl_3 /303K] Operador Herbert 20.03.2018



```

Current Data Parameters
NAME      LDT 10
EXPNO    3
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20180320
Time      16.29
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm Dual 13C/
PULPROG   jmod
TD        32768
SOLVENT   CDCl3
NS        392
DS        0
SWH       17985.611 Hz
FIDRES    0.548877 Hz
AQ        0.9110004 sec
RG        32768
SM        27.800 usec
DE        10.00 usec
TE        300.0 K
CNS12     145.0000000
CNS11     1.0000000
D1        1.0000000 sec
d20       0.00689655 sec
DELTA     0.00001464 sec
TD0       1

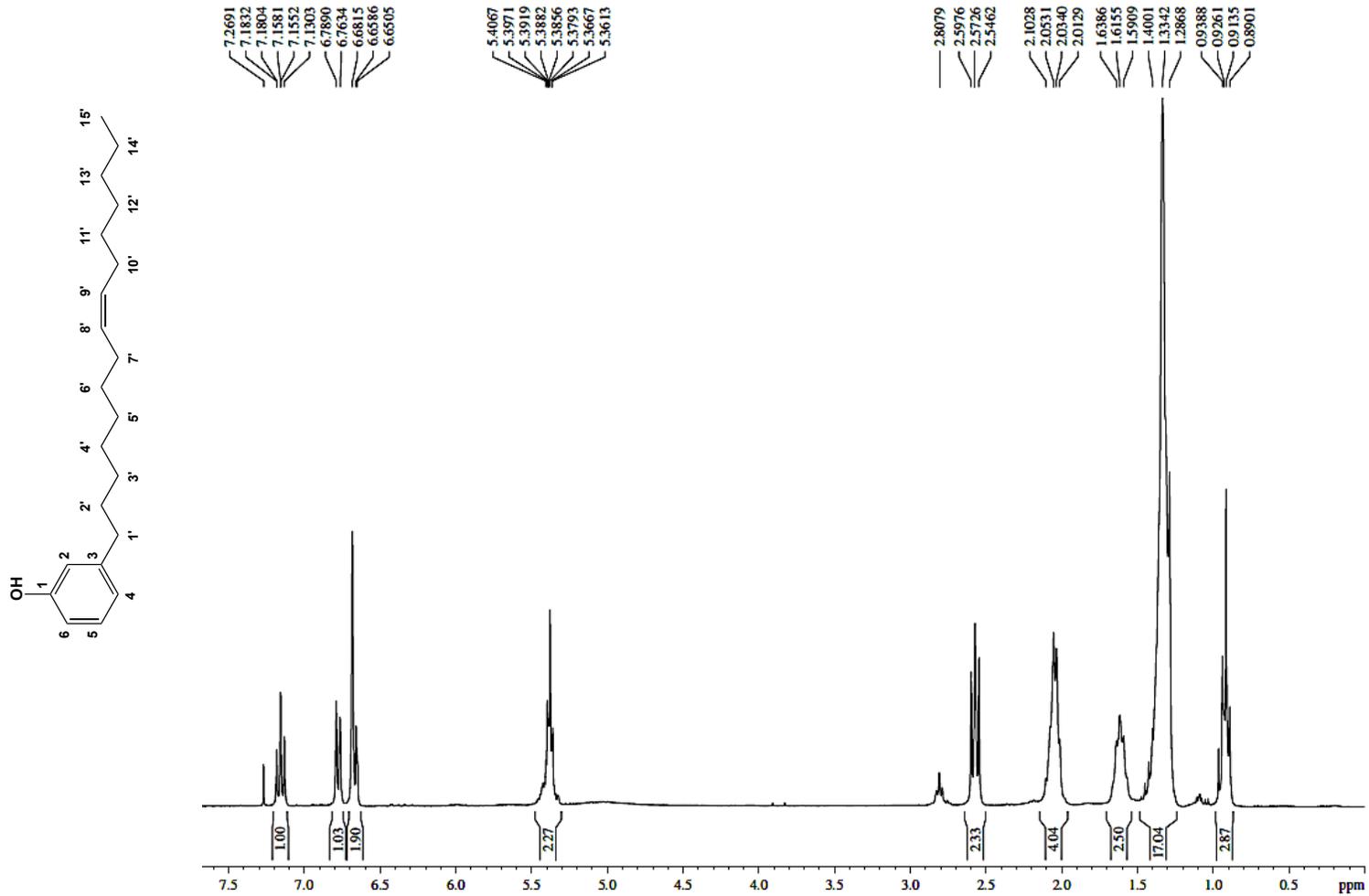
----- CHANNEL f1 -----
NUC1      13C
P1        11.50 usec
P2        23.00 usec
PL1       3.00 dB
SFO1      75.4752950 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2   waltz16
NUC2      1H
PCPD2     80.00 usec
PL2       3.00 dB
PL12      19.48 dB
SFO2      300.1312000 MHz

F2 - Processing parameters
SI        65536
SF        75.4677346 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        1.00 Hz
GB        0
PC        1.40
    
```

**ANEXO 6 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)
(Z)-3-(Pentadec-8-enil)fenol (LDT10A, **12A**)**

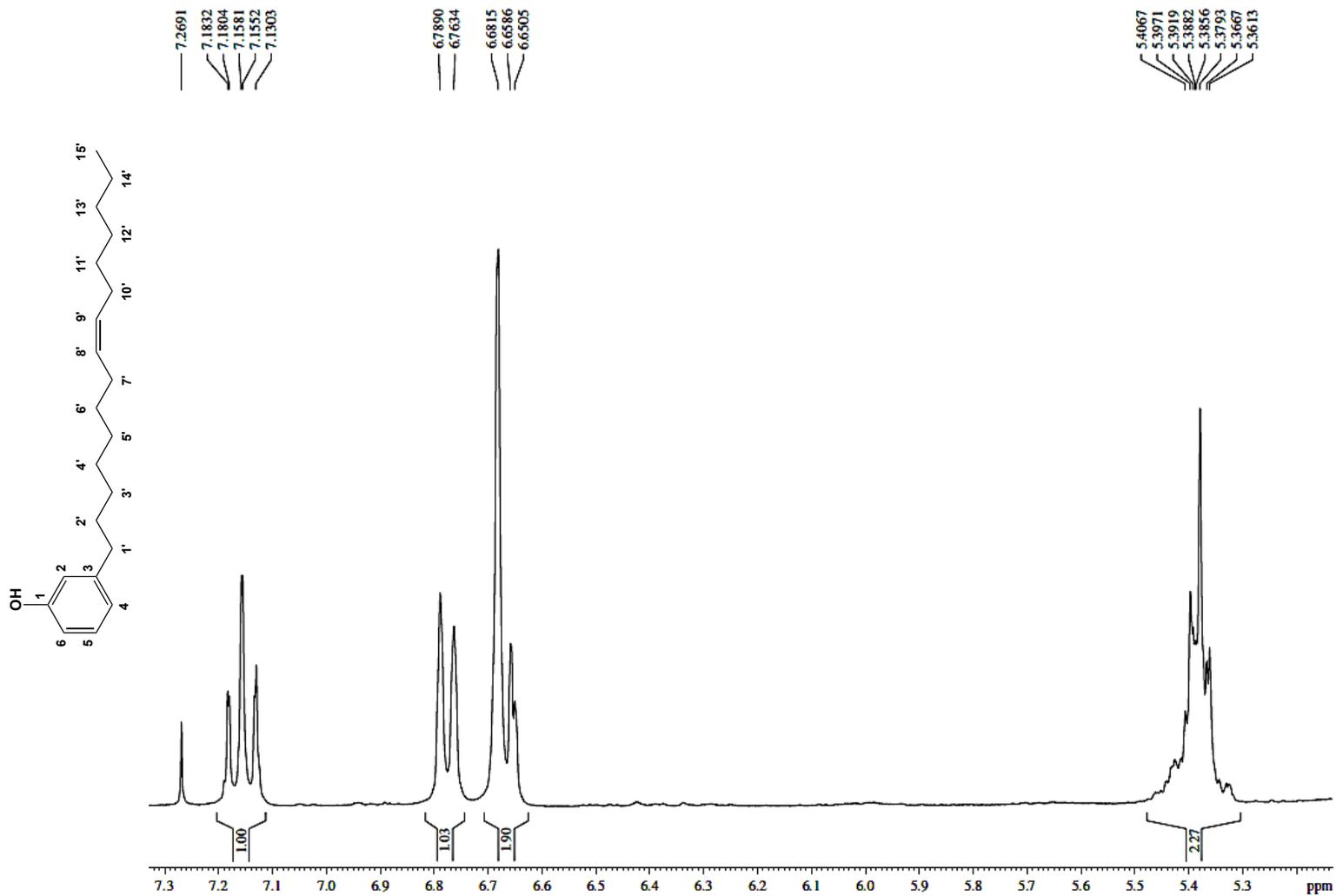
LDT 10A (LIZ ROMERO / FERNANDA - CID) [17/06/2016] Operado por LIZ ROMERO



Current Data Parameters
 NAME LDT 10A
 EXPNO 1
 PROCNO 1
 F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20180420
 Time 11.58
 INSTRUM spect
 PROBHID 5 mm Dual 13C/
 PULPROG zg
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 8
 DS 0
 SWH 7183.908 Hz
 FIDRES 0.109618 Hz
 AQ 4.5613556 sec
 RG 127
 DW 69.600 usec
 DE 10.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.0000000 sec
 TD0 1
 ===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 ¹H
 P1 10.25 usec
 PL1 3.00 dB
 SFO1 300.1324010 MHz
 F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 300.1300126 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

ANEXO 7 – Expansão do Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) (Z)-3-(Pentadec-8-enil)fenol (LDT10A, 12A)

LDT 10A (LUIZ ROBERTO FERREIRA - CIB) (17/03/2018) Operado em 20/04/2018



Current Data Parameters
NAME LDT 10A
EXPNO 1
PROCNO 1

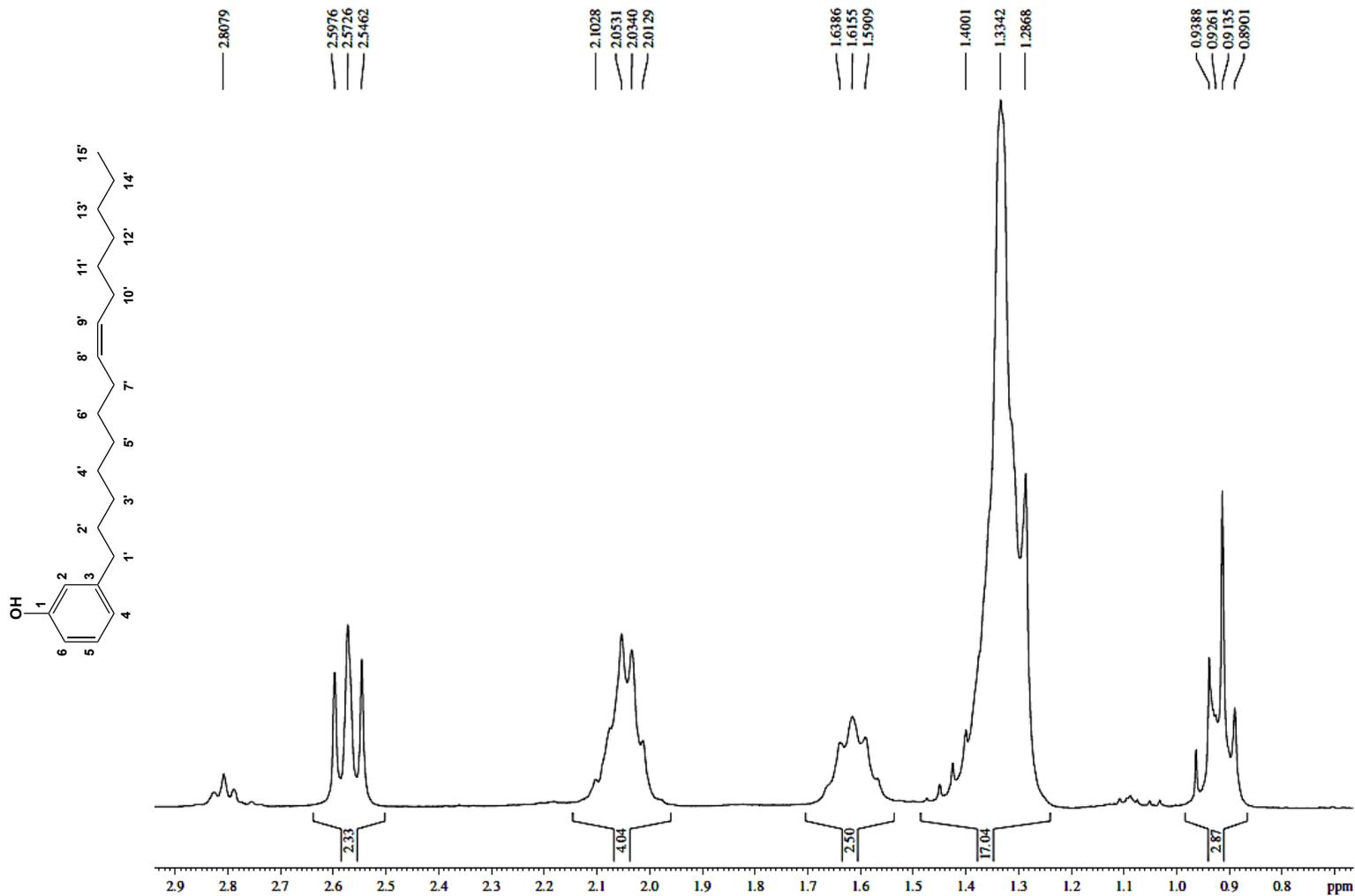
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20180420
Time 11.58
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13C/
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT CDCl_3
NS 8
DS 0
SWH 7183.908 Hz
FIDRES 0.109618 Hz
AQ 4.5613356 sec
RG 12.7
DW 69.600 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.0000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 ====
NUC1 ^1H
P1 10.25 usec
PL1 3.00 dB
SFO1 300.1324010 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300126 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

ANEXO 8 – Expansão do Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) (Z)-3-(Pentadec-8-enil)fenol (LDT10A, 12A)

LDT 10A (LUIZ ROMARIO FERREIRA - UNB) [1- CDCl_3] 300 MHz 16/04/2018



```

Current Data Parameters
NAME      LDT 10A
EXPNO    1
PROCNO   1

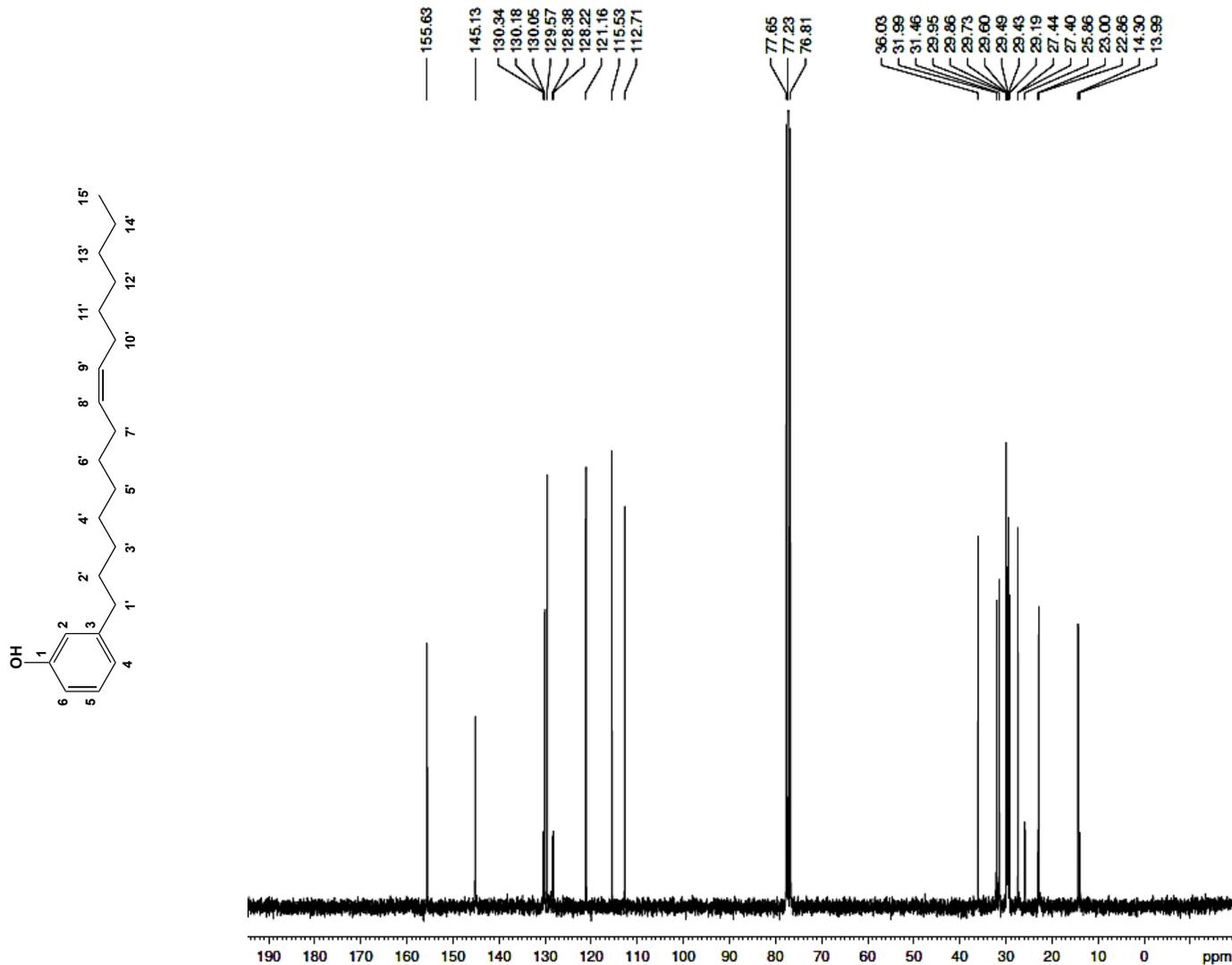
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180420
Time     11.58
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Dual 13C/
PULPROG  zg
TD        65536
SOLVENT  CDCl3
NS        8
DS        0
SWH       7183.908 Hz
FIDRES    0.109618 Hz
AQ        4.5613556 sec
RG        12.7
DW        69.600 usec
DE        10.00 usec
TE        300.0 K
D1        1.0000000 sec
TD0       1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      1H
P1        10.25 usec
PL1       3.00 dB
SFO1     300.1324010 MHz

F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        300.1300126 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.00 Hz
GB        0
PC        1.00
    
```

ANEXO 9 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) (Z)-3-(Pentadec-8-enil)fenol (LDT10A, 12A)

LDT 10iA (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [$^{13}\text{C}/\text{CDCl}_3/303\text{K}$] Operador Herbert 20.04.2018



```

Current Data Parameters
NAME          LDT 10iA
EXPNO        2
PROCNO       1

F2 - Acquisition Parameters
Date_        20180420
Time         12.27
INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm Dual 13C/
PULPROG      zgpg30
ID           32768
SOLVENT      CDCl3
NS           872
DS           0
SWH          17985.611 Hz
FIDRES       0.548877 Hz
AQ           0.9110004 sec
RG           32768
DW           27.800 usec
DE           10.00 usec
TE           300.0 K
D1           1.00000000 sec
d11          0.03000000 sec
DELTA        0.89999998 sec
TD           1

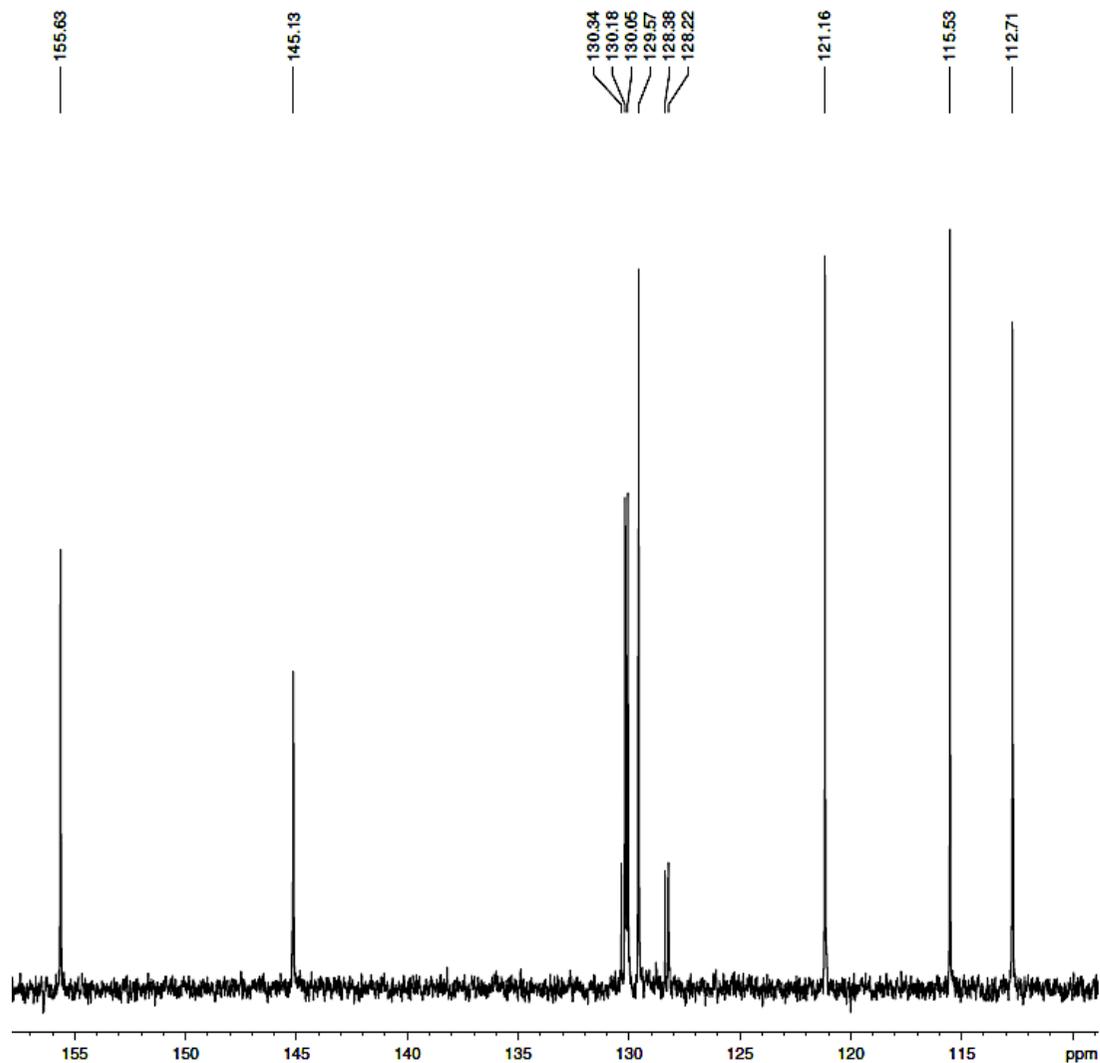
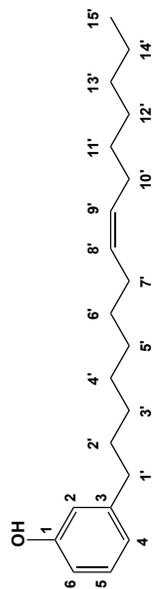
----- CHANNEL f1 -----
NUC1          13C
P1            11.50 usec
PL1           3.00 dB
SFO1          75.4752950 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2      waltz16
NUC2          1H
PCPD2         80.00 usec
PL2           3.00 dB
PL12          19.48 dB
PL13          19.48 dB
SFO2          300.1312000 MHz

F2 - Processing parameters
SI            65536
SF            75.4677169 MHz
WDM           EM
SSB           0
LB            1.00 Hz
GB            0
PC            1.40
    
```

ANEXO 10 – Expansão do Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) (Z)-3-(Pentadec-8-enil)fenol (LDT10A, 12A)

LDT 10iA (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [$^{13}\text{C}/\text{CDCl}_3/303\text{K}$] Operador Herbert 20.04.2018



```

Current Data Parameters
NAME      LDT 10iA
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180420
Time     12.27
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Dual 13C/
PULPROG  zgpg30
TD        32768
SOLVENT  CDCl3
NS        872
DS        0
SWH       17985.611 Hz
FIDRES    0.548877 Hz
AQ        0.9110004 sec
RG        32768
DW        27.800 usec
DE        10.00 usec
TE        300.0 K
D1        1.0000000 sec
d11       0.0300000 sec
DELTA     0.8999999 sec
TD0       1

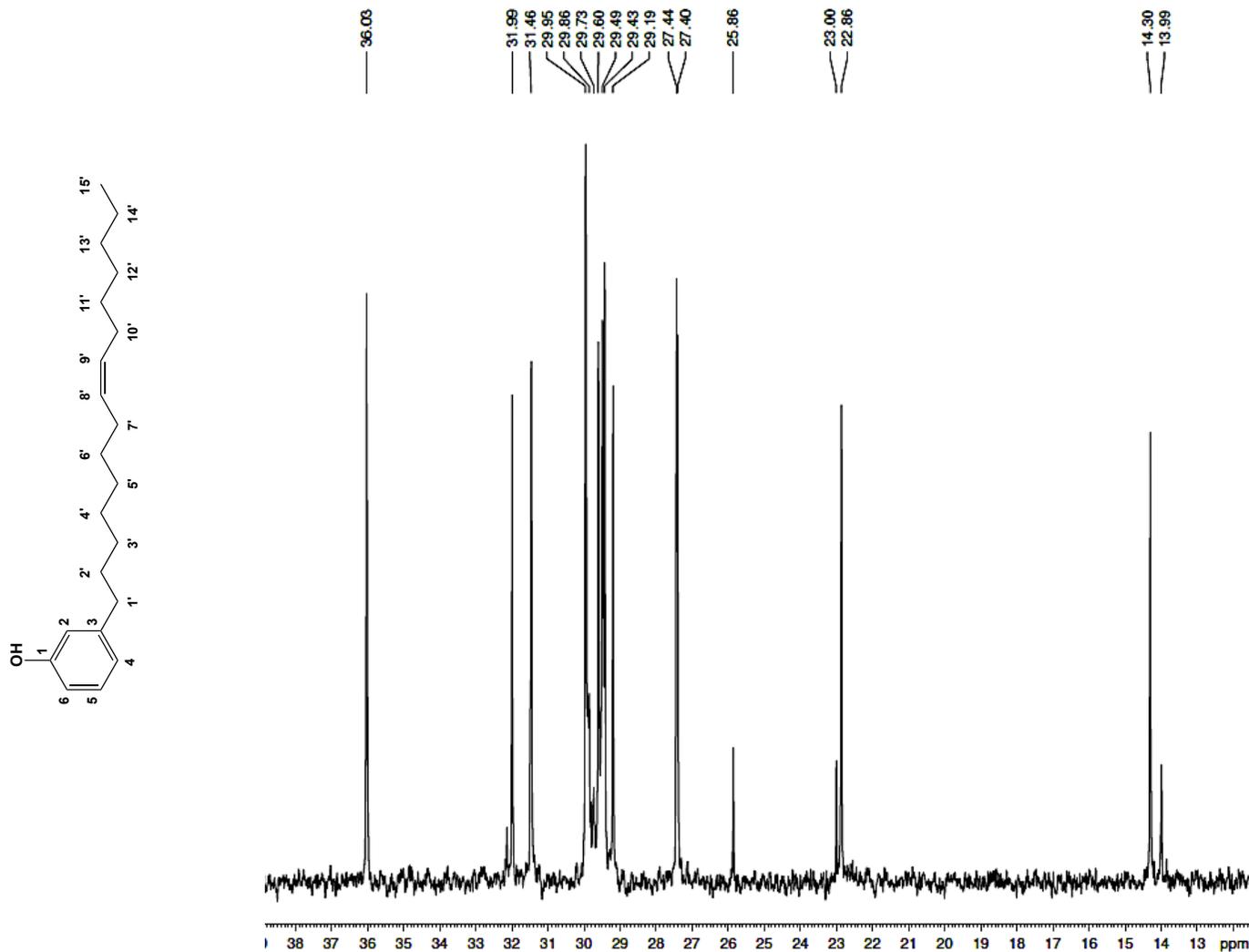
----- CHANNEL f1 -----
NUC1      13C
P1        11.50 usec
PL1       3.00 dB
SFO1      75.4752950 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2  waltz16
NUC2      1H
PCPD2     80.00 usec
PL2       3.00 dB
PL12     19.48 dB
PL13     19.48 dB
SFO2     300.1312000 MHz

F2 - Processing parameters
SI        65536
SF        75.4677369 MHz
WWM       2K
SSB       0
LB        1.00 Hz
GB        0
PC        1.40
    
```

ANEXO 11 – Expansão do Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) (Z)-3-(Pentadec-8-enil)fenol (LDT10A, 12A)

LDT 10iA (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [$^{13}\text{C}/\text{CDCl}_3/303\text{K}$] Operador Herbert 20.04.2018



```

Current Data Parameters
NAME      LDT 10iA
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180420
Time     12.27
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Dual 13C/
PULPROG  zgpg30
TD       32768
SOLVENT  CDCl3
NS       872
DS       0
SWH      17985.611 Hz
FIDRES   0.548877 Hz
AQ       0.9110004 sec
RG       32768
RW       27.800 usec
DE       10.00 usec
TE       300.0 K
D1       1.0000000 sec
d11      0.0300000 sec
DELTA    0.89999998 sec
TD0      1

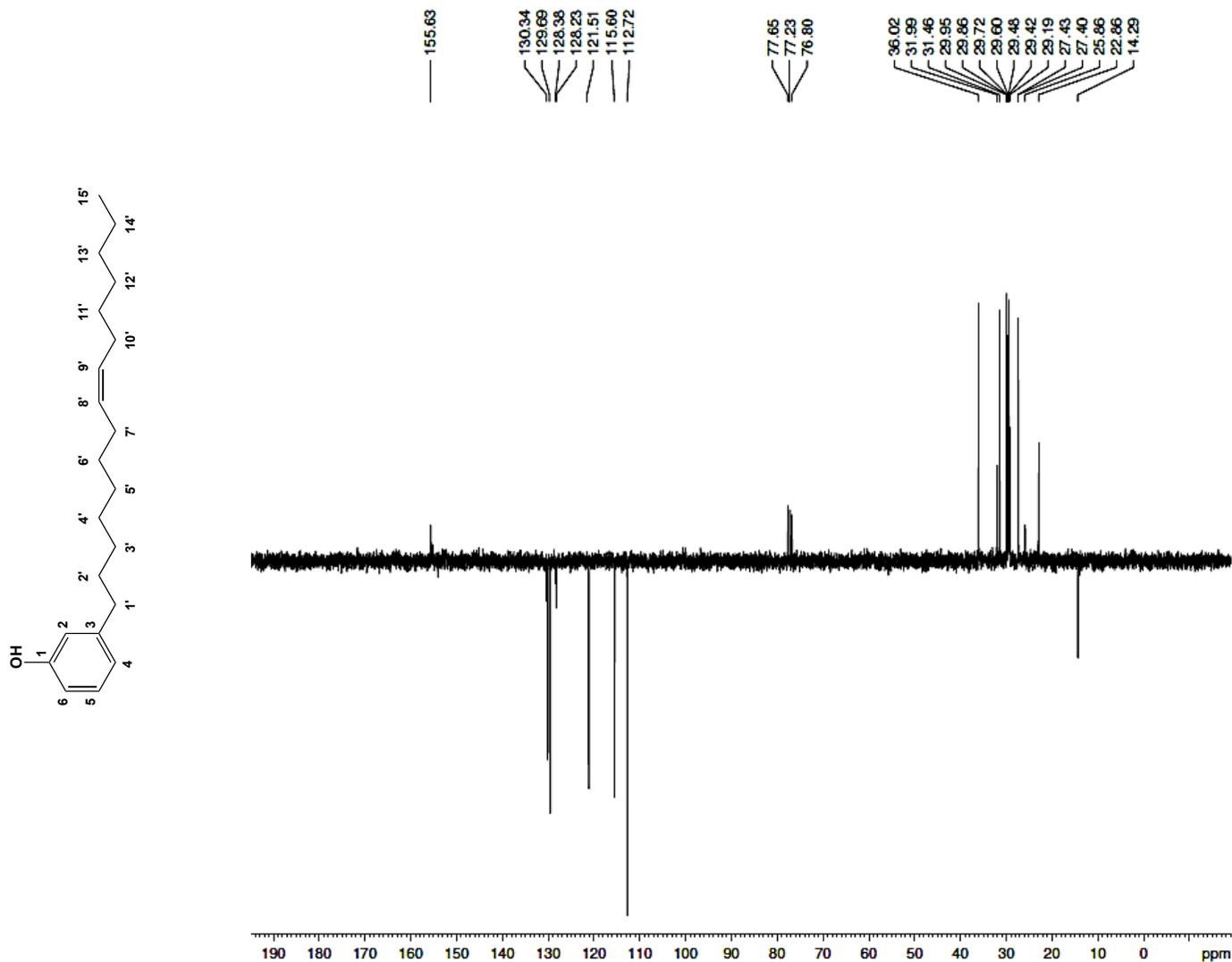
----- CHANNEL f1 -----
NUC1     13C
P1       11.50 usec
PL1      3.00 dB
SFO1     75.4752950 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2  waltz16
NUC2     1H
PCPD2    80.00 usec
PL2      3.00 dB
PL12     19.48 dB
PL13     19.48 dB
SFO2     300.1312000 MHz

F2 - Processing parameters
SI       65536
SF       75.4677369 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       1.00 Hz
GB       0
PC       1.40
    
```

ANEXO 12 – Espectro de RMN de ^{13}C _APT (75 MHz, CDCl_3) (Z)-3-(Pentadec-8-enil)fenol (LDT10A, 12A)

LDT 101A (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [APT/ CDCl_3 /303K] Operador Herbert 20.04.2018



```

Current Data Parameters
NAME      LDT 101A
EXPNO    3
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180420
Time     12.48
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Dual 13C/
PULPROG  zgpg30
TD        32768
SOLVENT  CDCl3
NS        636
DS        0
SWH       17985.611 Hz
FIDRES   0.548877 Hz
AQ        0.9110004 sec
RG         32768
DW        27.800 usec
DE         10.00 usec
TE         300.0 K
CNST2    145.0000000
CNST11   1.0000000
D1        1.00000000 sec
d20       0.00689655 sec
DELTA    0.00001464 sec
ID0       1

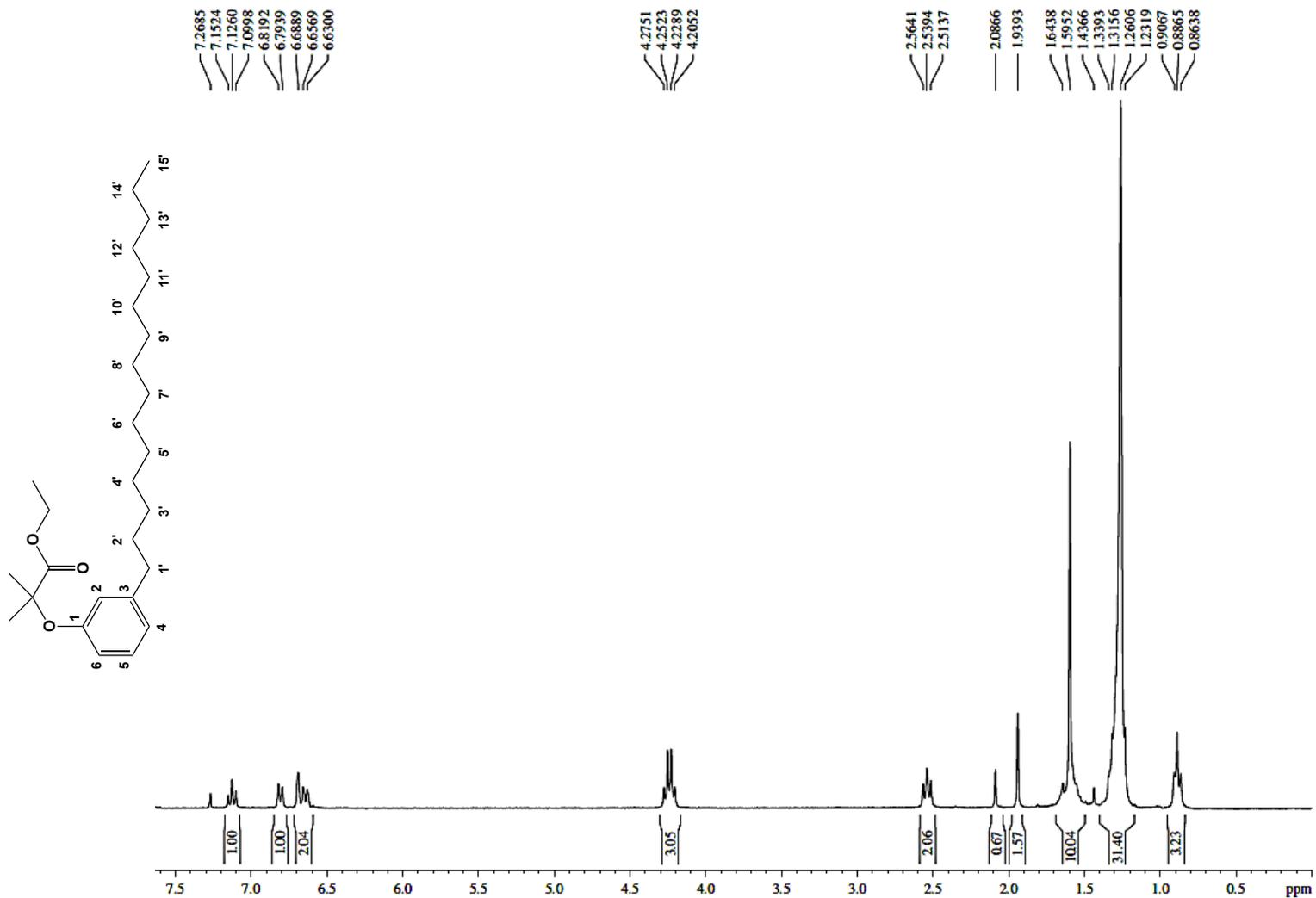
----- CHANNEL f1 -----
NUC1      13C
P1        11.50 usec
P2        23.00 usec
PL1       3.00 dB
SF01     75.4752950 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2  waltz16
NUC2      1H
PCPD2    80.00 usec
PL2       2.00 dB
PL12     19.48 dB
SF02    300.1312000 MHz

F2 - Processing parameters
SI        65536
SF        75.4677369 MHz
MSW       EM
SSB       0
LB        1.00 Hz
GB         0
PC         1.40
    
```

**ANEXO 13 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)
2-Metil-2-(3-pentadecilfenóxi)propanoato de etila (LDT408, 15)**

LDT 408 (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [¹H/CDCl₃/303K] Operador Herbert 20.03.2018



Current Data Parameters
 NAME LDT 408
 EXPNO 1
 PROCNO 1

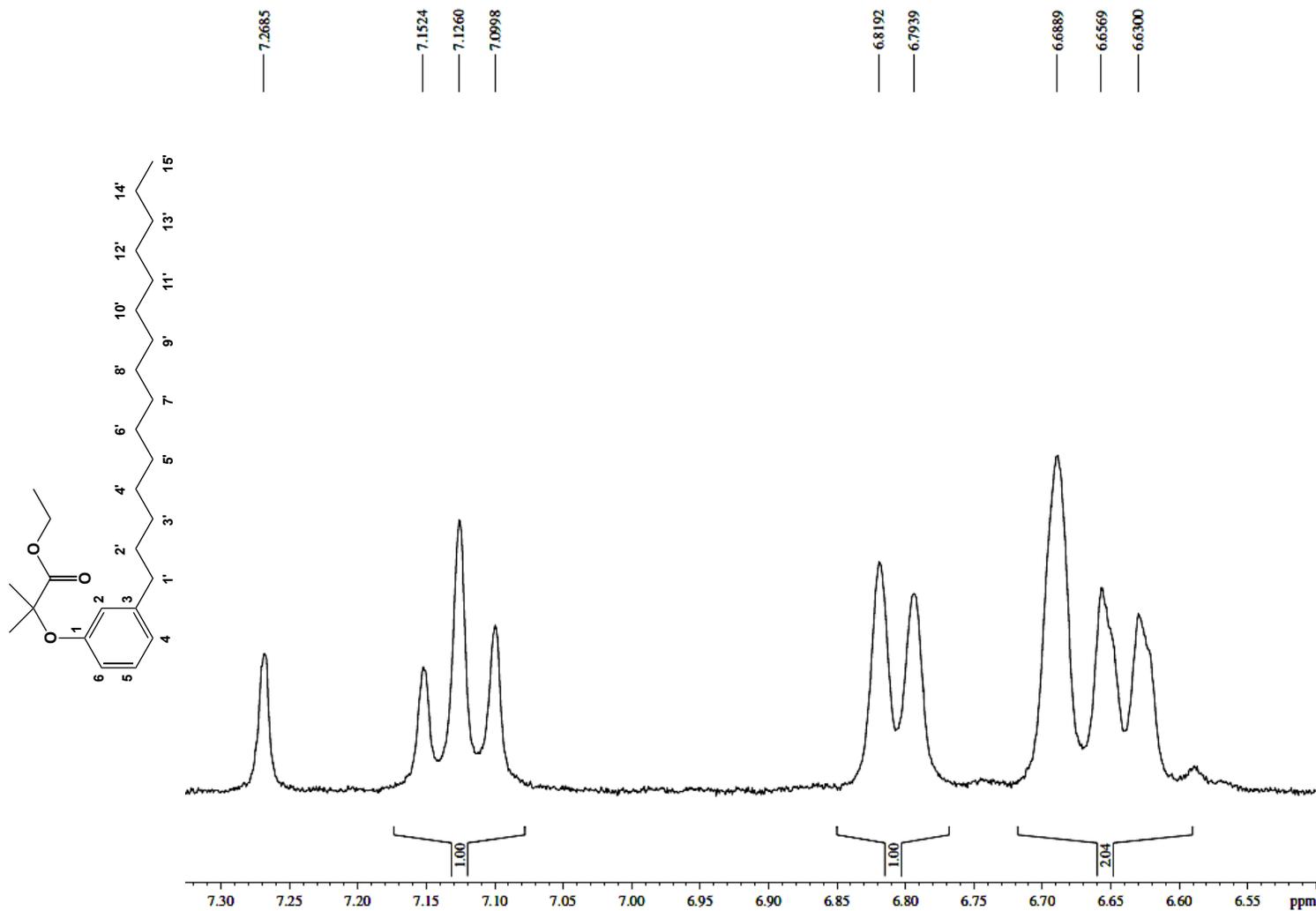
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20180320
 Time 16.34
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Dual 13C/
 PULPROG zg
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 8
 DS 0
 SWH 7183.908 Hz
 FIDRES 0.109618 Hz
 AQ 4.5613556 sec
 RG 12.7
 DW 69.600 usec
 DE 10.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec
 TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 10.25 usec
 PL1 3.00 dB
 SFO1 300.1324010 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 300.1300126 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

**ANEXO 14 – Expansão do Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)
2-Metil-2-(3-pentadecilfenóxi)propanoato de etila (LDT408, **15**)**

LDT 408 (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [$^1\text{H}/\text{CDCl}_3/303\text{K}$] Operador Herbert 20.03.2018



Current Data Parameters
 NAME LDT408
 EXPNO 1
 PROCNO 1

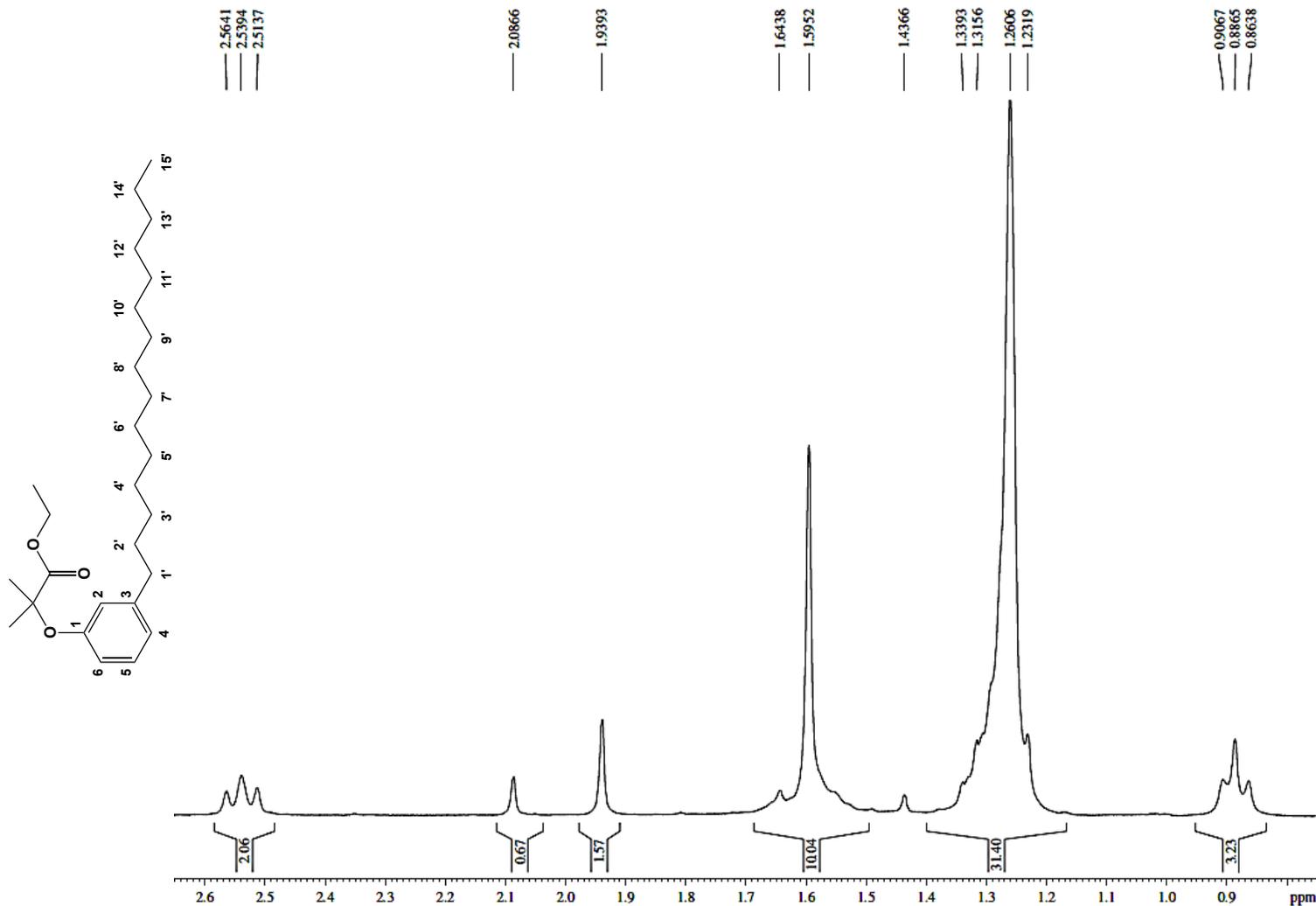
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20180320
 Time 16.34
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Dual 13C/
 PULPROG zg
 TD 65536
 SOLVENT CDCl_3
 NS 8
 DS 0
 SWH 7183.908 Hz
 FIDRES 0.109618 Hz
 AQ 4.5613556 sec
 RG 12.7
 DW 69.600 usec
 DE 10.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec
 TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 ^1H
 P1 10.25 usec
 PL1 3.00 dB
 SFO1 300.1324010 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 300.1300126 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

**ANEXO 15 – Expansão do Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)
2-Metil-2-(3-pentadecilfenóxi)propanoato de etila (LDT408, 15)**

LDT 408 (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [$^1\text{H}/\text{CDCl}_3/303\text{K}$] Operador Herbert 20.03.2018



Current Data Parameters
 NAME LDT 408
 EXPNO 1
 PROCNO 1

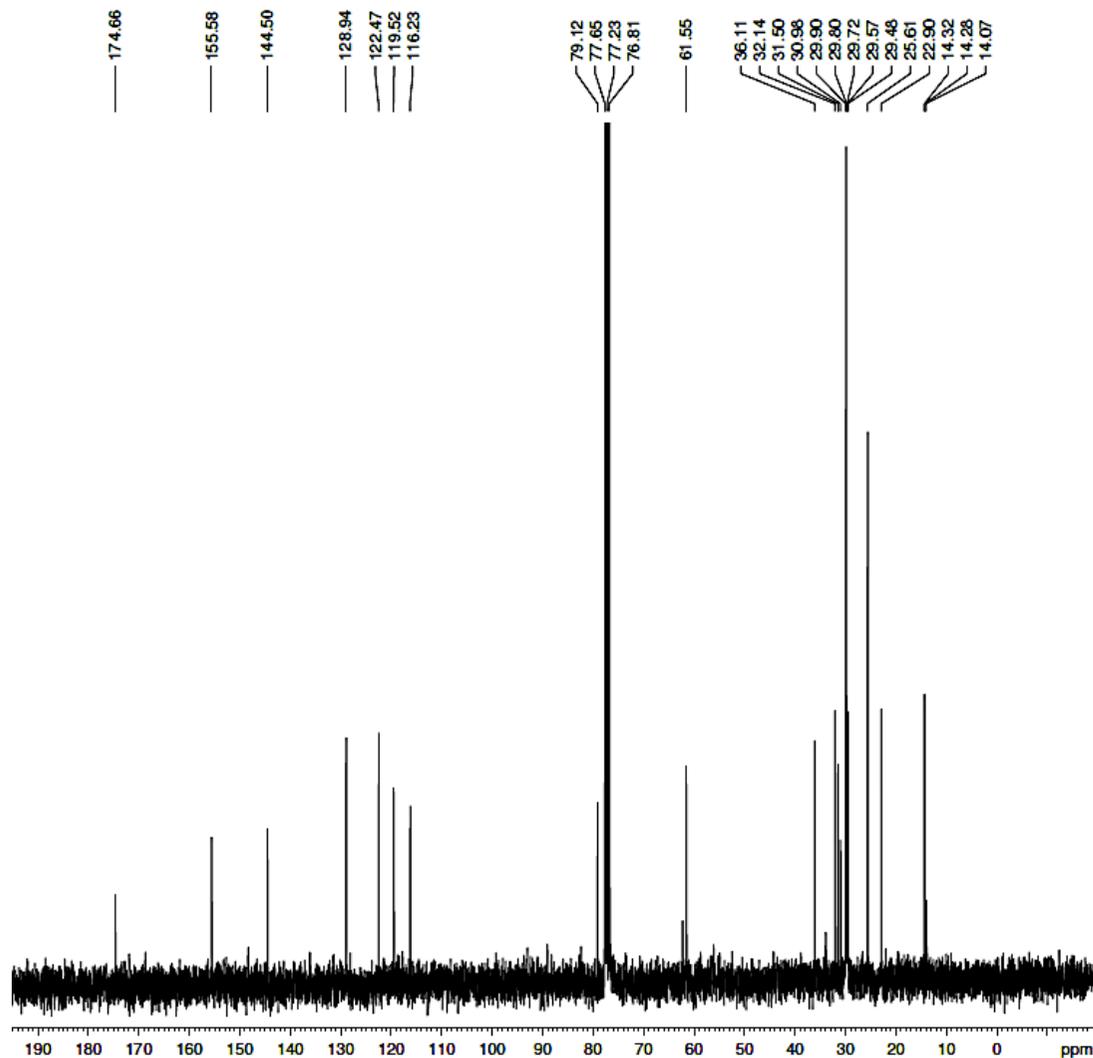
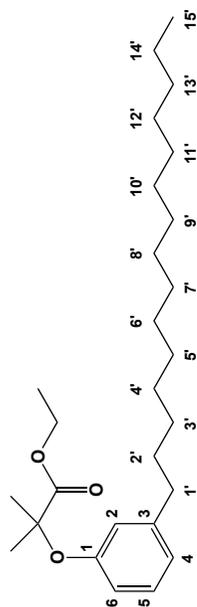
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20180320
 Time 16.34
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Dual 13C/
 PULPROG zg
 TD 65536
 SOLVENT CDCl_3
 NS 8
 DS 0
 SWH 7183.908 Hz
 FIDRES 0.109618 Hz
 AQ 4.5613556 sec
 RG 12.7
 DW 69.600 usec
 DE 10.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec
 TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 ^1H
 P1 10.25 usec
 PL1 3.00 dB
 SFO1 300.1324010 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 300.1300126 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

**ANEXO 16 – Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)
2-Metil-2-(3-pentadecilfenóxi)propanoato de etila (LDT408, 15)**

LDT 408 (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [¹³C/CDCl₃/303K] Operador Herbert 20.03.2018



```

Current Data Parameters
NAME      LDT 408
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180320
Time     16:51
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Dual 13C/
PULPROG  zgpg30
TD       32768
SOLVENT  CDCl3
NS       512
DS       0
SWH      17985.611 Hz
FIDRES   0.548877 Hz
AQ       0.9110004 sec
RG       32768
DM       27.800 usec
DE       10.00 usec
TE       300.0 K
D1       1.0000000 sec
d11      0.0300000 sec
DELTA    0.69999998 sec
TD0      1

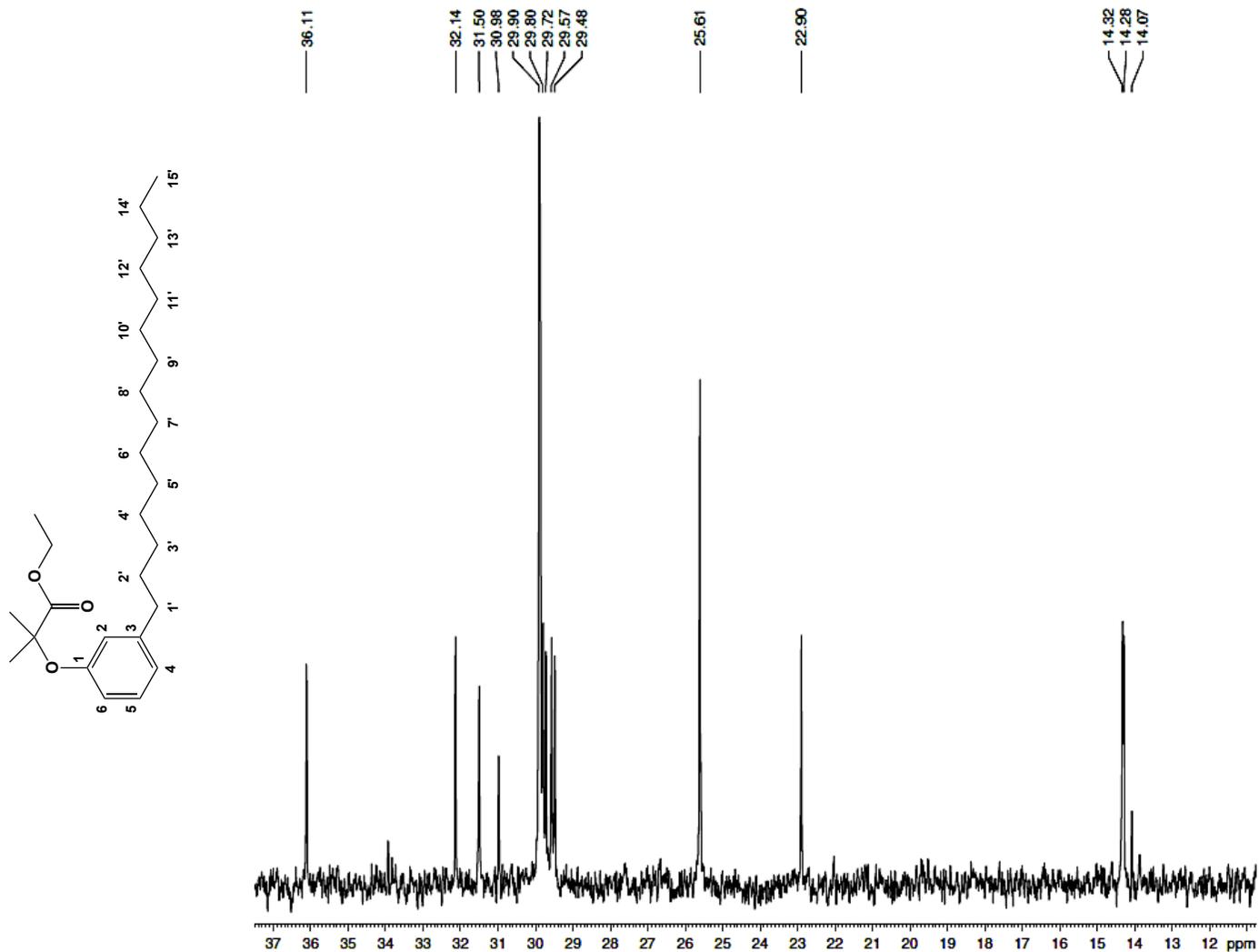
----- CHANNEL f1 -----
NUC1      13C
P1        11.50 usec
PL1       3.00 dB
SFO1      75.4752950 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2  waltz16
NUC2      1H
PCPD2     80.00 usec
PL2       3.00 dB
PL12      19.48 dB
PL13      19.48 dB
SFO2      300.1312000 MHz

F2 - Processing parameters
SI        65536
SF        75.4677353 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        1.00 Hz
GB        0
PC        1.40
    
```

**ANEXO 17 – Expansão do Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)
2-Metil-2-(3-pentadecilfenóxi)propanoato de etila (LDT408, 15)**

LDT 408 (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [$^{13}\text{C}/\text{CDCl}_3/303\text{K}$] Operador Herbert 20.03.2018



```

Current Data Parameters
NAME          LDT 408
EXPNO        2
PROCNO       1

F2 - Acquisition Parameters
Date_        20180320
Time         16.51
INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm Dual 13C/
PULPROG      zgpg30
TD           32768
SOLVENT      CDCl3
NS           512
DS           0
SWH          17985.611 Hz
FIDRES       0.548877 Hz
AQ           0.9110004 sec
RG           32768
DM           27.800 usec
DE           10.00 usec
TE           300.0 K
D1           1.0000000 sec
d11          0.03000000 sec
DELTA        0.89999998 sec
TD0          1

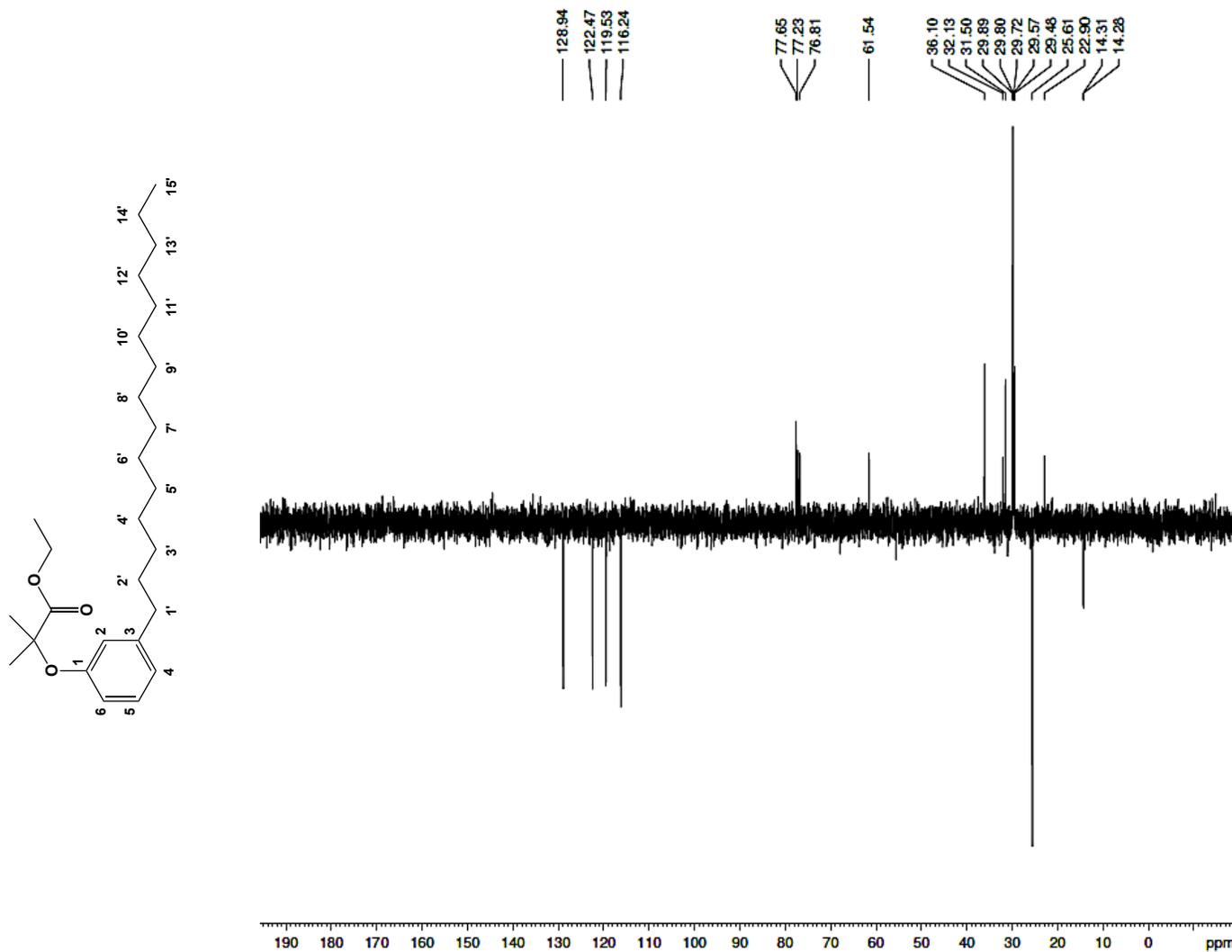
----- CHANNEL f1 -----
NUC1          13C
P1           11.50 usec
PL1          3.00 dB
SFO1         75.4752950 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2      waltz16
NUC2          1H
PCPD2        80.00 usec
PL2          3.00 dB
PL12         19.48 dB
PL13         19.48 dB
SFO2         300.1312000 MHz

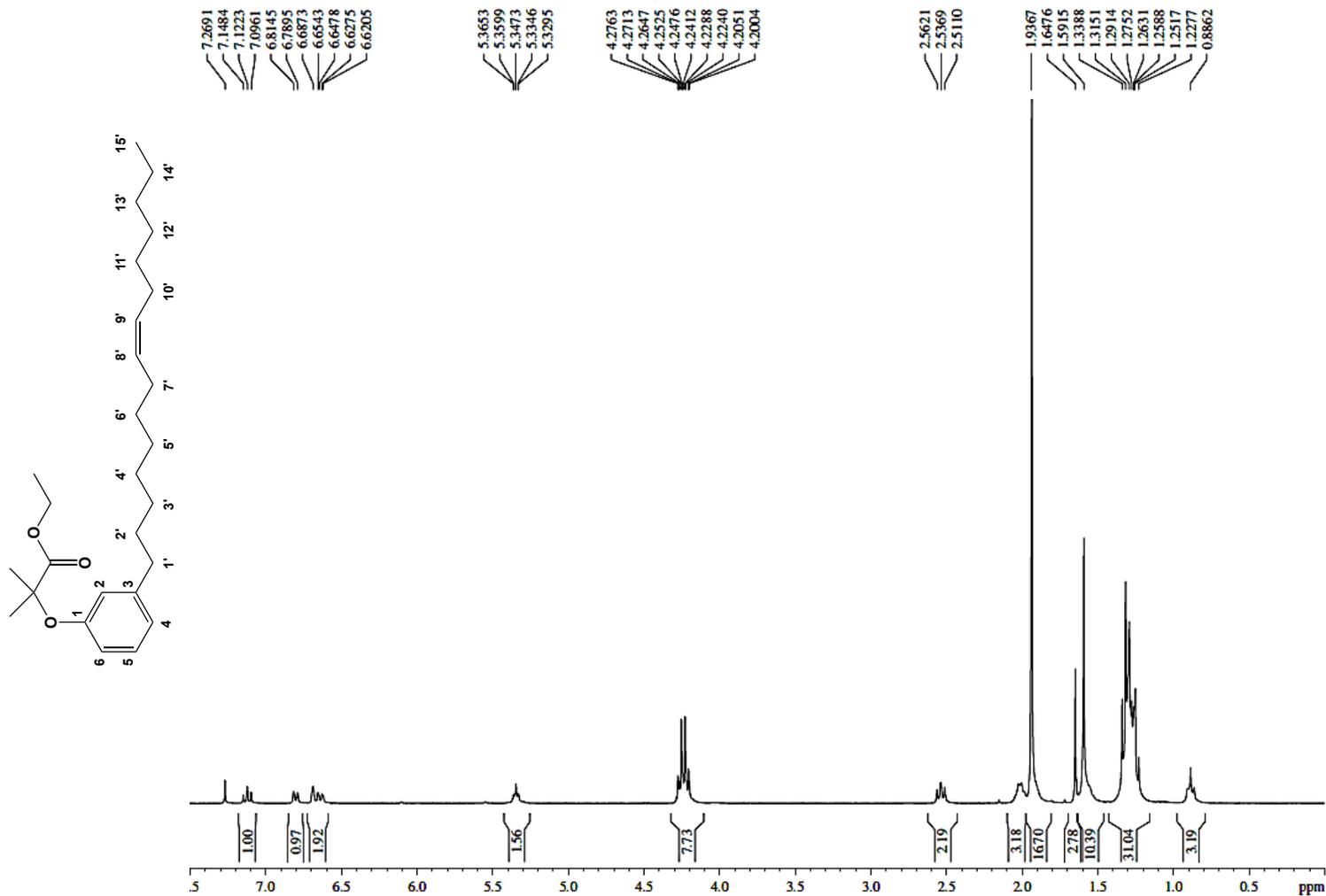
F2 - Processing parameters
SI           65536
SF           75.4677353 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           1.00 Hz
GB           0
PC           1.40
    
```

ANEXO 18 – Espectro de RMN de ^{13}C _APT (75 MHz, CDCl_3) 2-Metil-2-(3-pentadecilfenóxi)propanoato de etila (LDT408, 15)

LDT 408 (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [APT/ CDCl_3 /303K] Operador Herbert 20.03.2018



ANEXO 19 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)
2-Metil-2-(3-((8Z)-pentadec-8-en-1-il)fenóxi)propanoato de etila (LDT539A, 16)



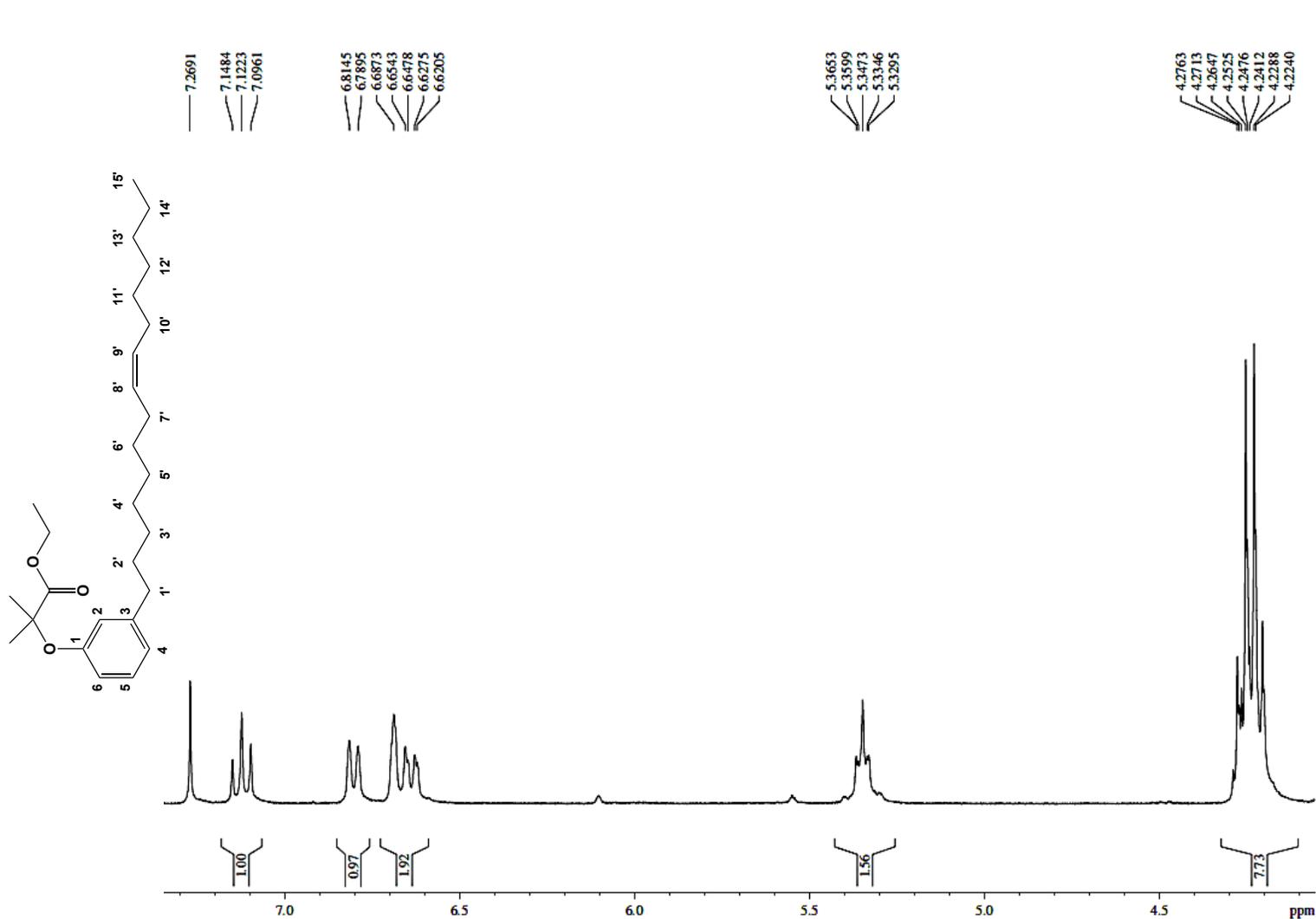
Current Data Parameters
NAME LDT539A
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20180420
Time 12.54
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13C/
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 8
DS 0
SWH 7183.908 Hz
FIDRES 0.109618 Hz
AQ 4.5613556 sec
RG 12.7
DW 69.600 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 10.25 usec
PL1 3.00 dB
SFO1 300.1324010 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300126 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

**ANEXO 20 – Expansão do Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)
2-Metil-2-(3-((8Z)-pentadec-8-en-1-il)fenóxi)propanoato de etila (LDT539A, 16)**



Current Data Parameters
NAME LDT 539A
EXPNO 1
PROCNO 1

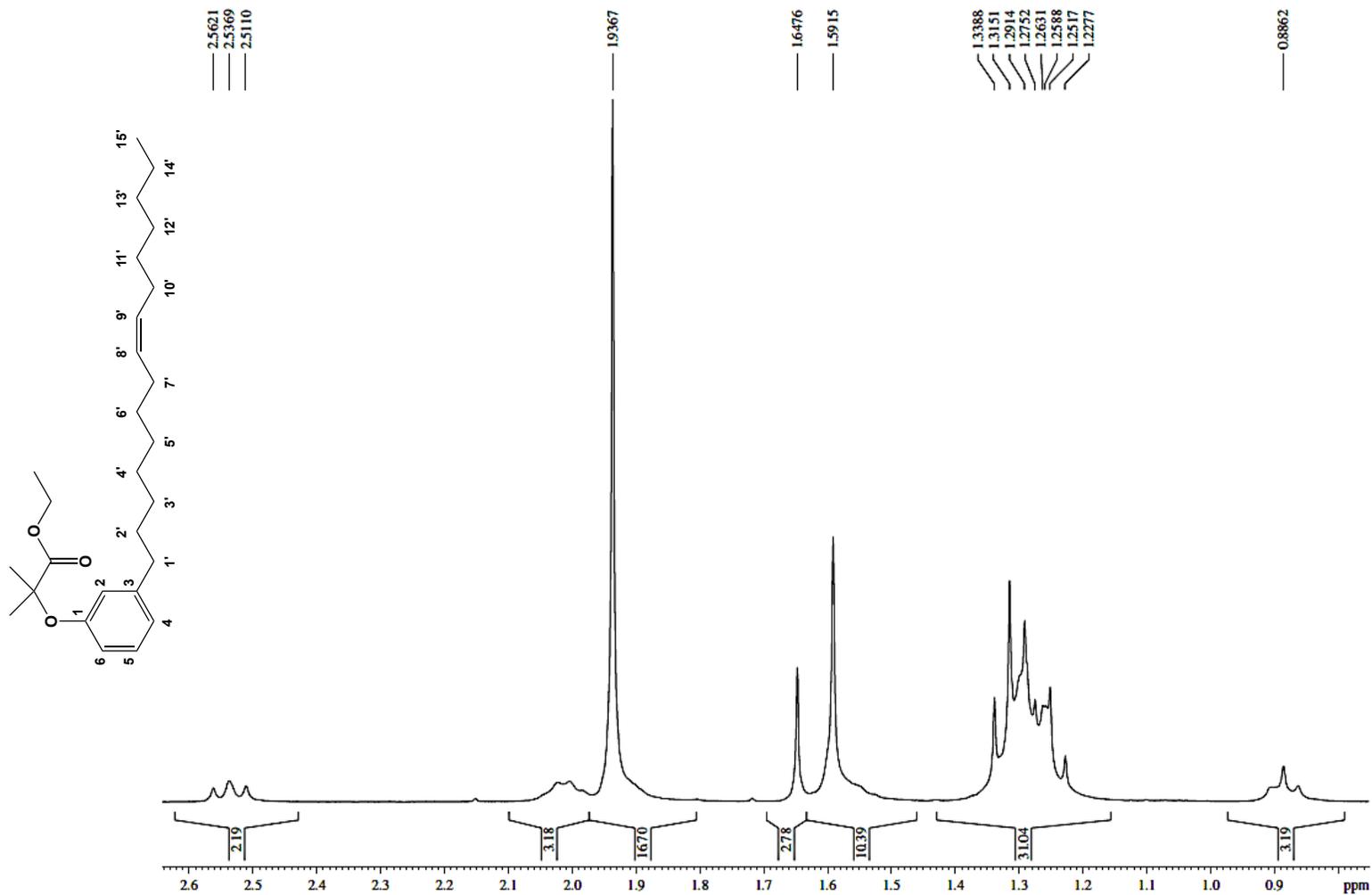
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20180420
Time 12.54
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13C/
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 8
DS 0
SWH 7183.908 Hz
FIDRES 0.109618 Hz
AQ 4.5613356 sec
RG 12.7
DW 69.600 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.0000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 10.25 usec
PL1 3.00 dB
SFO1 300.1324010 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300126 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

**ANEXO 21 – Expansão do Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)
2-Metil-2-(3-((8Z)-pentadec-8-en-1-il)fenóxi)propanoato de etila (LDT539A, 16)**

LDT 539A (2012) NOME DO COMPOUNDO: 2-Metil-2-(3-((8Z)-pentadec-8-en-1-il)fenóxi)propanoato de etila OPERADO EM: 20/09/2010



Current Data Parameters
 NAME LDT539A
 EXPNO 1
 PROCNO 1

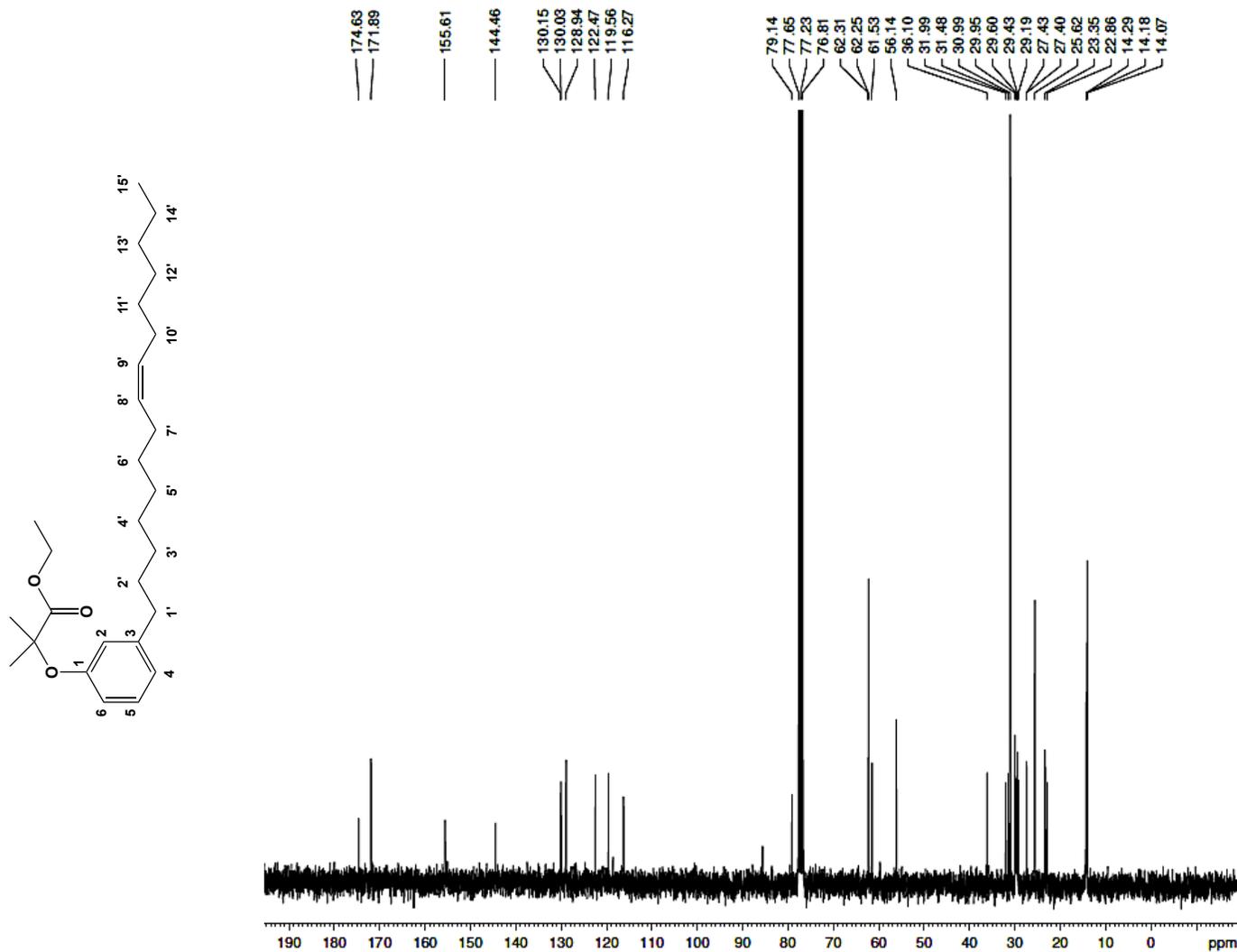
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20180420
 Time 12.54
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Dual 13C/1
 PULPROG zg
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 8
 DS 0
 SWH 7183.908 Hz
 FIDRES 0.109618 Hz
 AQ 4.5613556 sec
 RG 127
 DW 69.600 usec
 DE 10.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.0000000 sec
 TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 10.25 usec
 PL1 3.00 dB
 SFO1 300.1324010 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 300.1300126 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

**ANEXO 22 – Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)
2-Metil-2-(3-((8Z)-pentadec-8-en-1-il)fenóxi)propanoato de etila (LDT539A, 16)**

LDT 539IA (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [¹³C/CDCl₃/303K] Operador Herbert 20.04.2018



```

Current Data Parameters
NAME          LDT 539IA
EXPNO        2
PROCNO       1

F2 - Acquisition Parameters
Date_        20180420
Time         13.24
INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm Dual 13C/
PULPROG      zgpg30
TD           32768
SOLVENT      CDCl3
NS           1024
DS           0
SWH          17985.611 Hz
FIDRES       0.548877 Hz
AQ           0.9110004 sec
RG           32768
DM           27.890 usec
DE           10.00 usec
TE           300.0 K
D1           1.0000000 sec
d11          0.0300000 sec
DELTA        0.89999998 sec
TD0          1

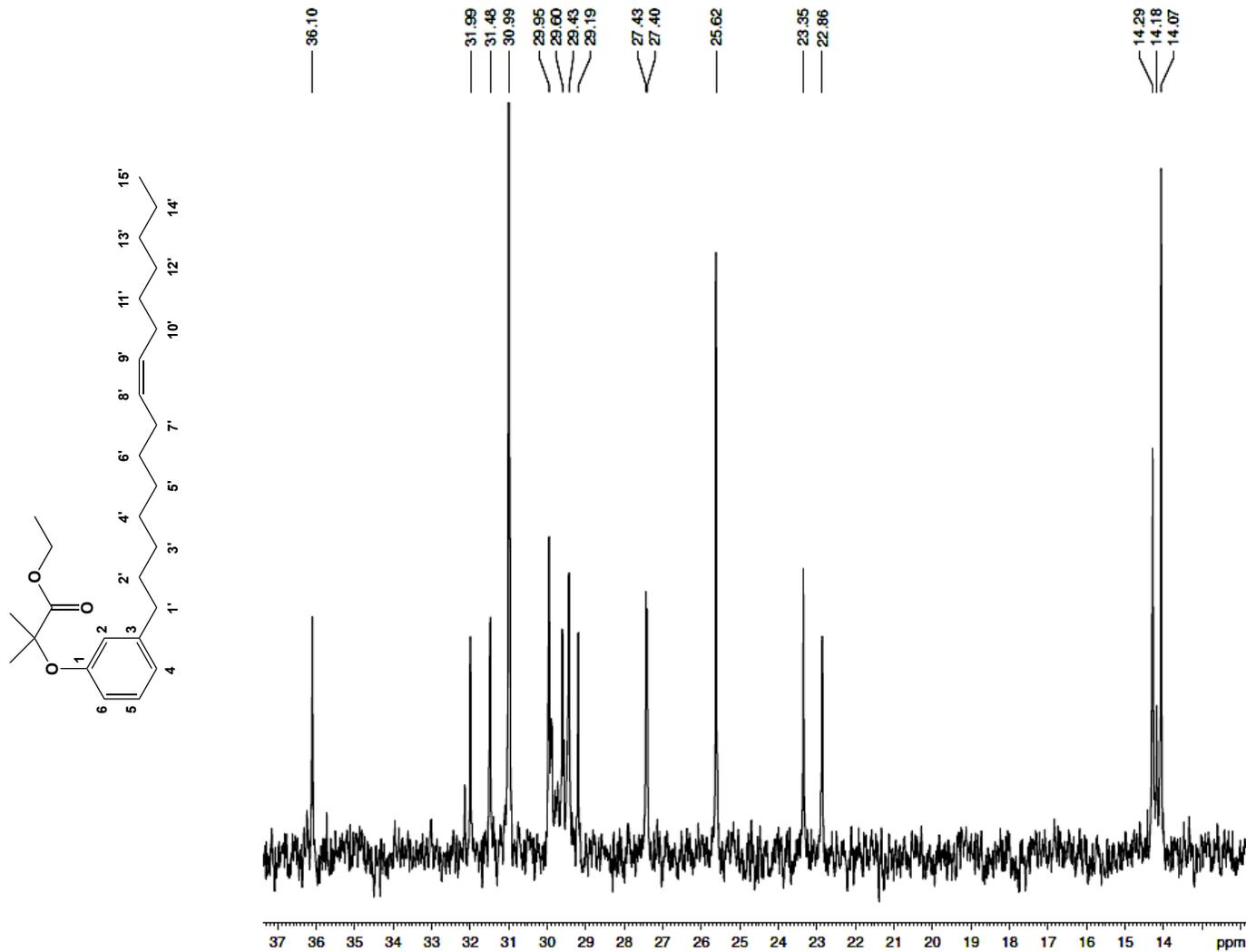
----- CHANNEL f1 -----
NUC1          13C
P1           11.50 usec
PL1          3.00 dB
SFO1         75.4752950 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2      waltz16
NUC2          1H
PCPD2        80.00 usec
PL2          3.00 dB
PL12         19.48 dB
PL13         19.48 dB
SFO2         300.1312000 MHz

F2 - Processing parameters
SI           65536
SF           75.4677345 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           1.00 Hz
GB           0
PC           1.40
    
```

**ANEXO 23 – Expansão do Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)
2-Metil-2-(3-((8Z)-pentadec-8-en-1-il)fenóxi)propanoato de etila (LDT539A, 16)**

LDT 539IA (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [$^{13}\text{C}/\text{CDCl}_3/303\text{K}$] Operador Herbert 20.04.2018



```

Current Data Parameters
NAME      LDT 539IA
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180420
Time     13.24
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Dual 13C/
PULPROG  zgpg30
TD       32768
SOLVENT  CDCl3
NS       1024
DS       0
SWH      17985.611 Hz
FIDRES   0.548877 Hz
AQ       0.9110094 sec
RG       32768
DW       27.890 usec
DE       10.00 usec
TE       300.0 K
D1       1.0000000 sec
d11      0.0300000 sec
DELTA    0.89999998 sec
TD0      1

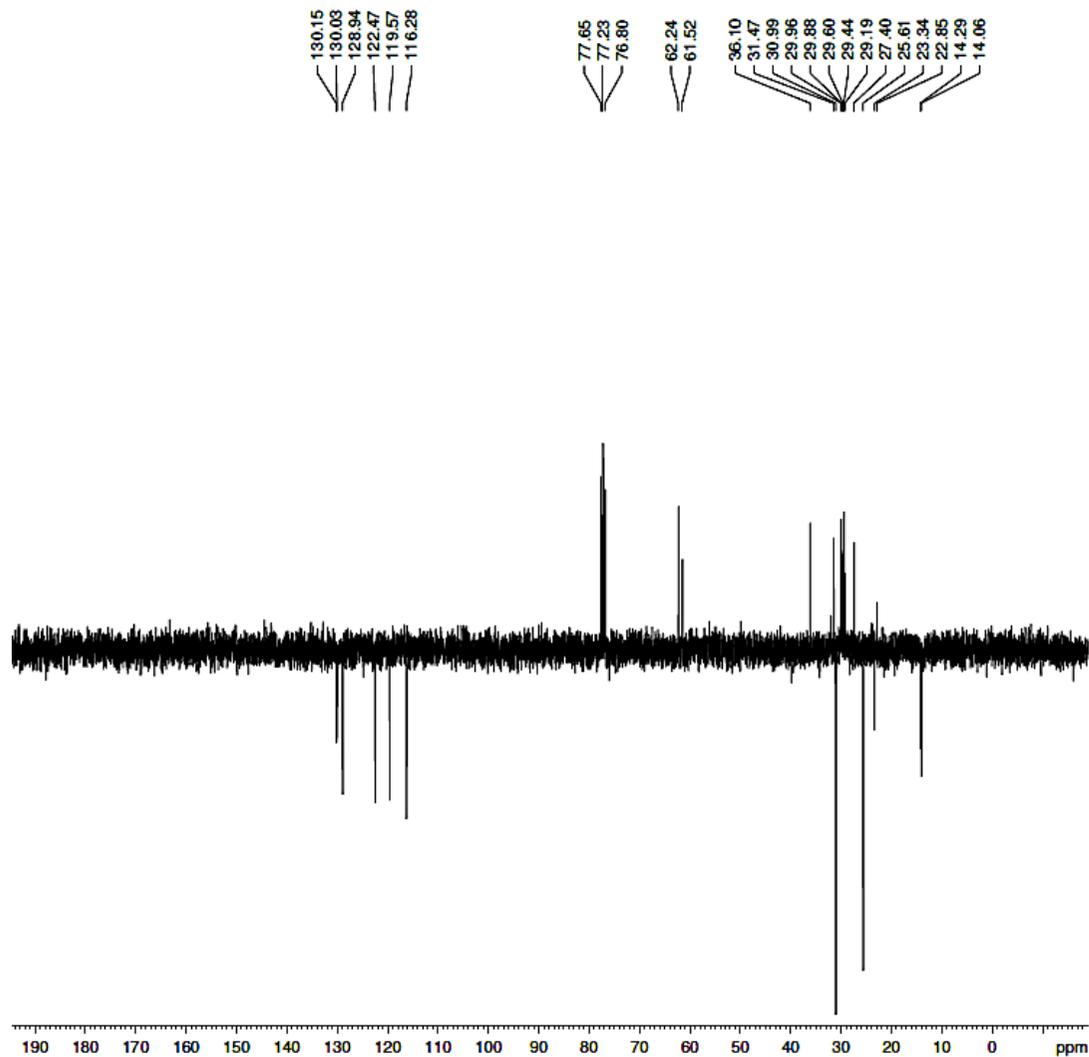
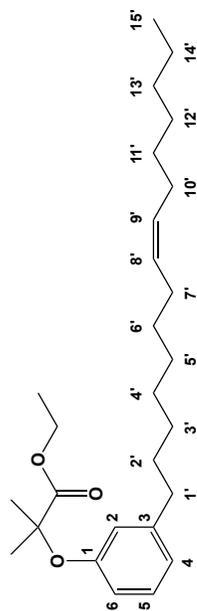
----- CHANNEL f1 -----
NUC1     13C
P1       11.50 usec
PL1      3.00 dB
SFO1     75.4752950 Mhz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2  waltz16
NUC2     1H
PCPD2    80.00 usec
PL2      3.00 dB
PL12     19.48 dB
PL13     19.48 dB
SFO2     300.1312000 Mhz

F2 - Processing parameters
SI       65536
SF       75.4677345 Mhz
WDW      EM
SSB      0
LB       1.00 Hz
GB       0
PC       1.40
    
```

ANEXO 24 – Espectro de RMN de ^{13}C _APT (75 MHz, CDCl_3) 2-Metil-2-(3-((8Z)-pentadec-8-en-1-il)fenóxi)propanoato de etila (LDT539A, 16)

LDT 539IA (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [APT/ CDCl_3 /303K] Operador Herbert 20.04.2018



```

Current Data Parameters
NAME      LDT 539IA
EXPNO     3
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20180420
Time      14.01
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm Dual 13C/
PULPROG   jmod
TD         32768
SOLVENT   CDCl3
NS         1024
DS         0
SWH        17985.611 Hz
FIDRES     0.548877 Hz
AQ         0.9110004 sec
RG         32768
RW         21.800 usec
DE         10.00 usec
TE         300.0 K
CNST2     145.000000
CNST11    1.0000000
D1         1.0000000 sec
dZ0        0.00689655 sec
DELTA      0.00001464 sec
TDO        1

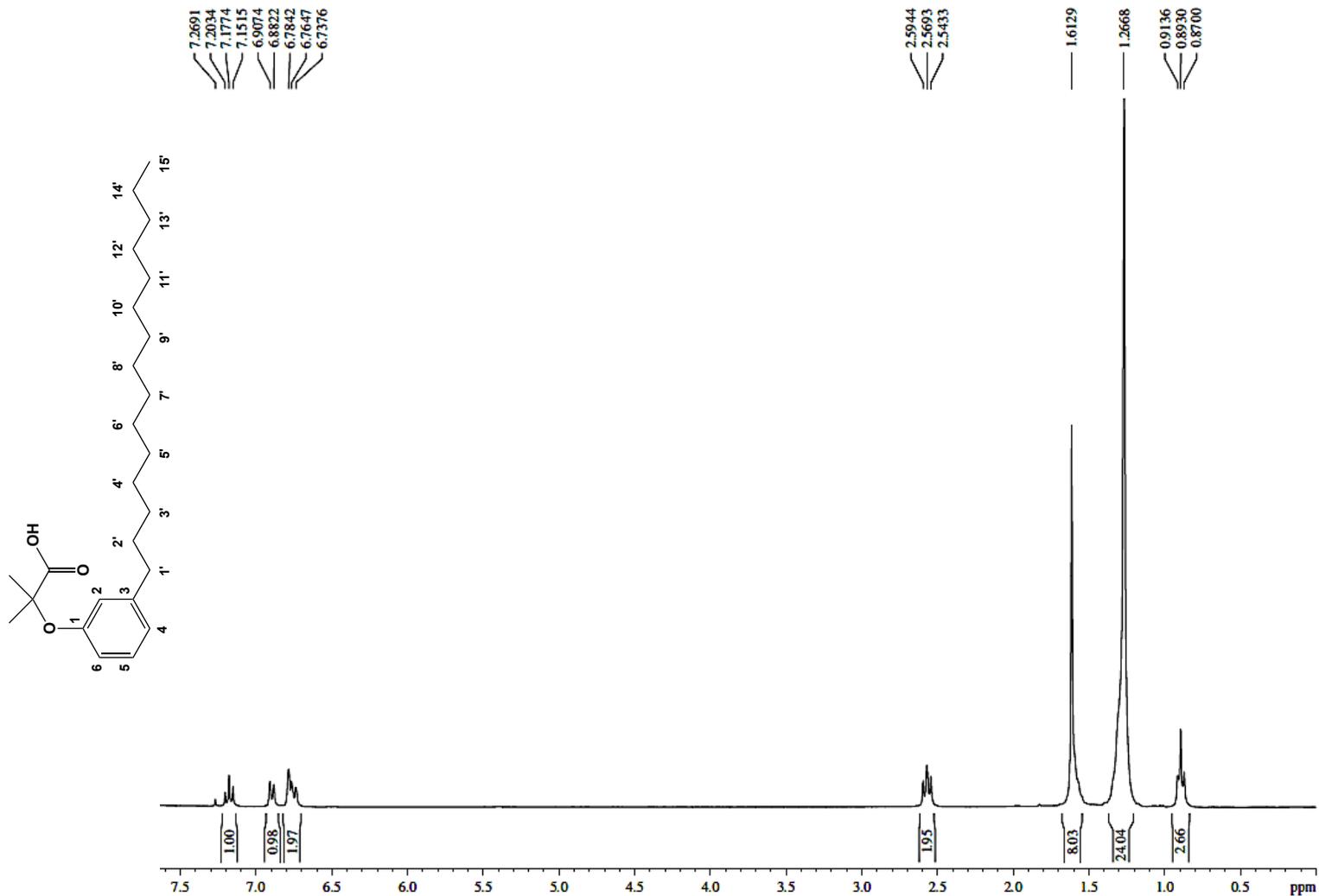
----- CHANNEL f1 -----
NUC1       13C
P1         11.50 usec
P2         23.00 usec
PL1        3.00 dB
SF01       75.4752950 Mhz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2    waltz16
NUC2       1H
PCPD2      80.00 usec
PL2        3.00 dB
PL12       19.48 dB
SF02       300.1312000 Mhz

F2 - Processing parameters
SI         65536
SF         75.4677345 Mhz
WDW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40
    
```

**ANEXO 25 – Expansão do Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)
 Ácido 2-Metil-2-(3-pentadecilfenóxi)propanóico (LDT409, 17)**

LDT 409 (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [$^1\text{H}/\text{CDCl}_3/303\text{K}$] Operador Herbert 20.03.2018



Current Data Parameters
 NAME LDT 409
 EXPNO 1
 PROCNO 1

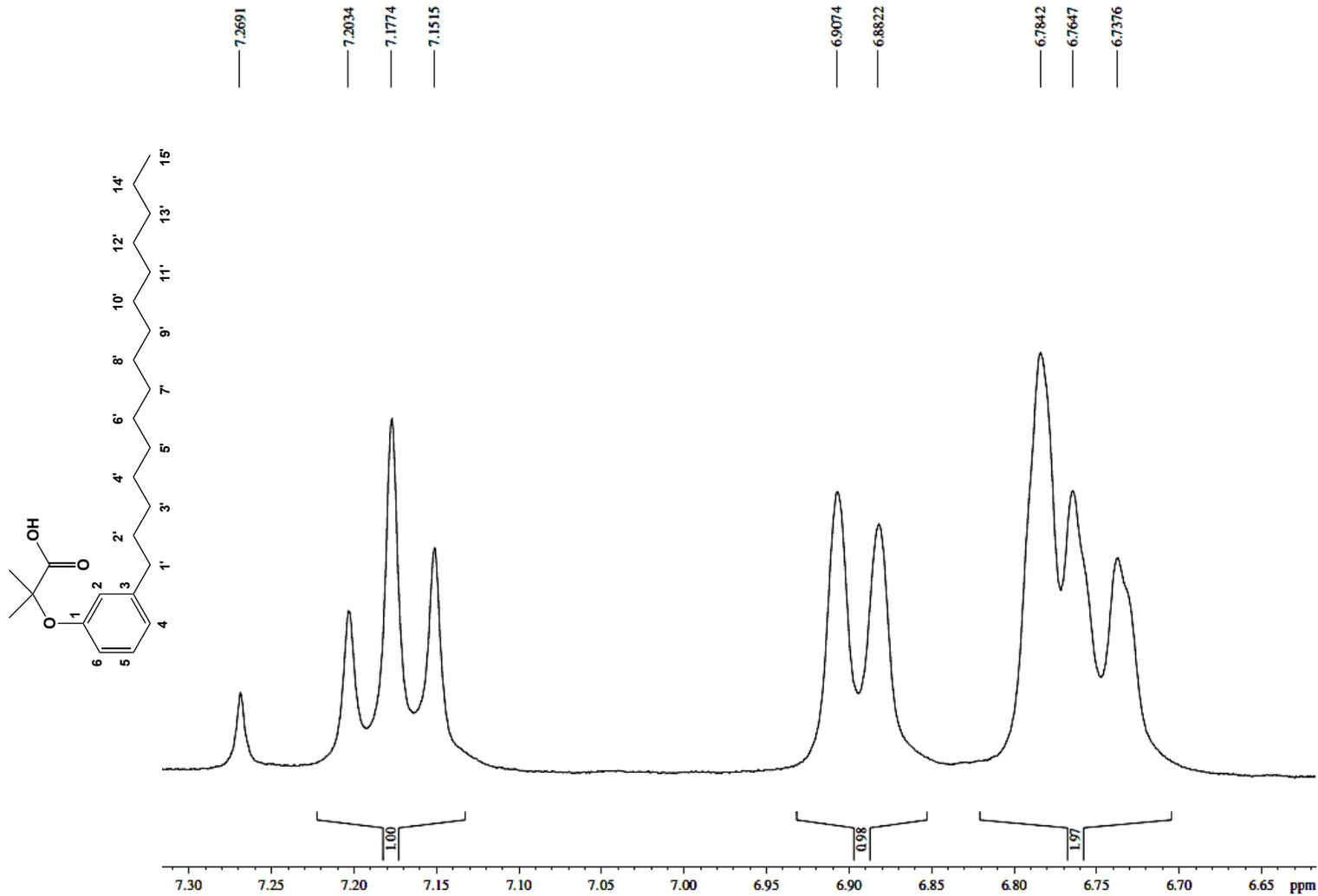
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20180320
 Time 17.10
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Dual 13C/
 PULPROG zg
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 8
 DS 0
 SWH 7183.908 Hz
 FIDRES 0.109618 Hz
 AQ 4.5613556 sec
 RG 12.7
 DW 69.600 usec
 DE 10.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec
 TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 ^1H
 P1 10.25 usec
 PL1 3.00 dB
 SFO1 300.1324010 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 300.1300136 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

**ANEXO 26 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)
Ácido 2-Metil-2-(3-pentadecilfenóxi)propanóico (LDT409, 17)**

LDT 409 (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [¹H/CDCl₃/303K] Operador Herbert 20.03.2018



Current Data Parameters
 NAME LDT 409
 EXPNO 1
 PROCNO 1

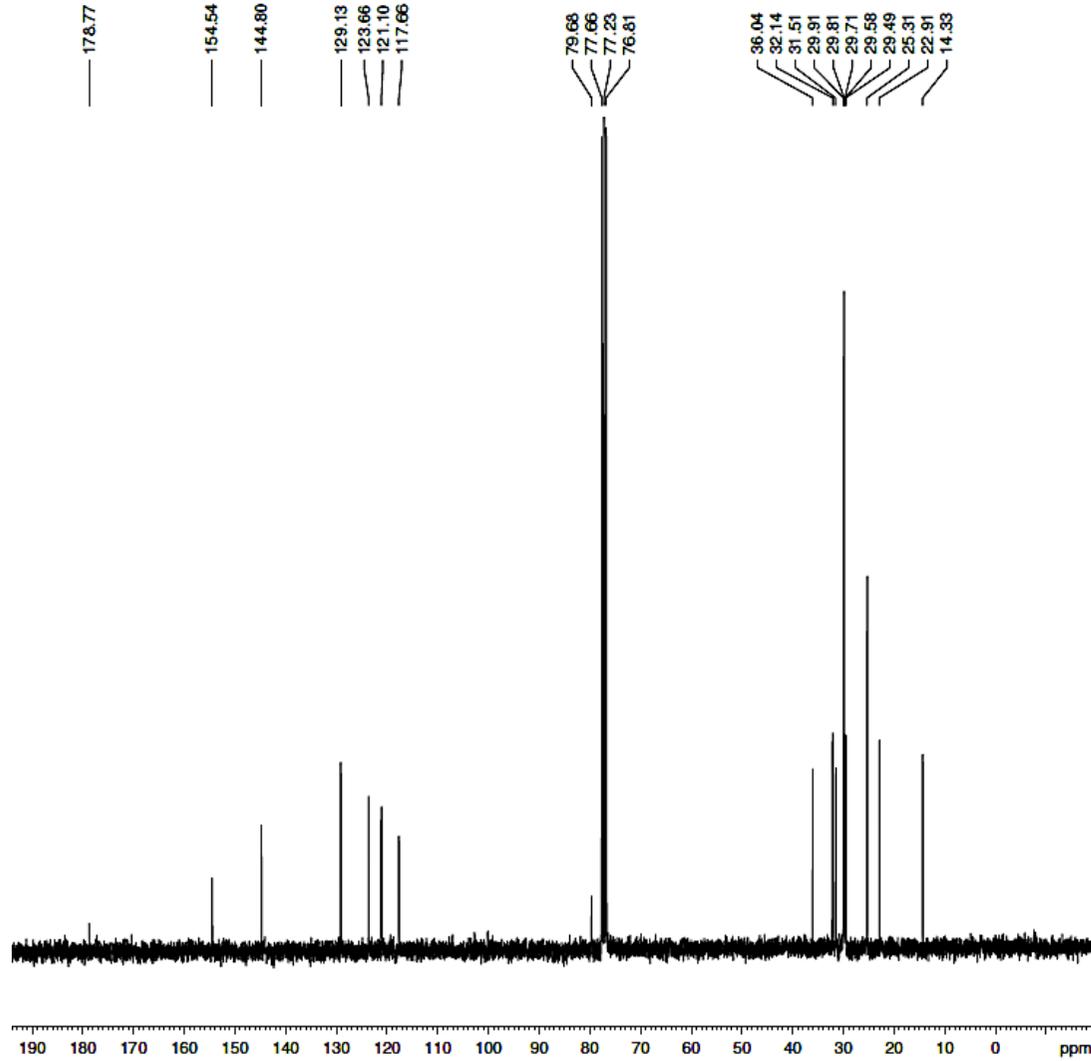
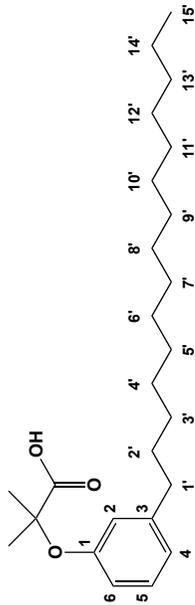
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20180320
 Time 17.10
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Dual 13C/
 PULPROG zg
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 8
 DS 0
 SWH 7183.908 Hz
 FIDRES 0.109618 Hz
 AQ 4.5613556 sec
 RG 12.7
 DW 69.600 usec
 DE 10.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.0000000 sec
 TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 10.25 usec
 PL1 3.00 dB
 SFO1 300.1324010 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 300.1300126 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

**ANEXO 27 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)
Ácido 2-Metil-2-(3-pentadecilfenóxi)propanóico (LDT409, 17)**

LDT 409 (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [$^{13}\text{C}/\text{CDCl}_3/303\text{K}$] Operador Herbert 20.03.2018



```

Current Data Parameters
NAME      LDT 409
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180320
Time     17.27
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Dual 13C/
PULPROG  zgpg30
TD       32768
SOLVENT  CDCl3
NS       512
DS       0
SWH      17985.611 Hz
FIDRES   0.548877 Hz
AQ       0.9110004 sec
RG       32768
DM       27.800 usec
DE       10.00 usec
TE       300.0 K
D1       1.0000000 sec
d11      0.0300000 sec
DELTA    0.89999998 sec
TD0      1

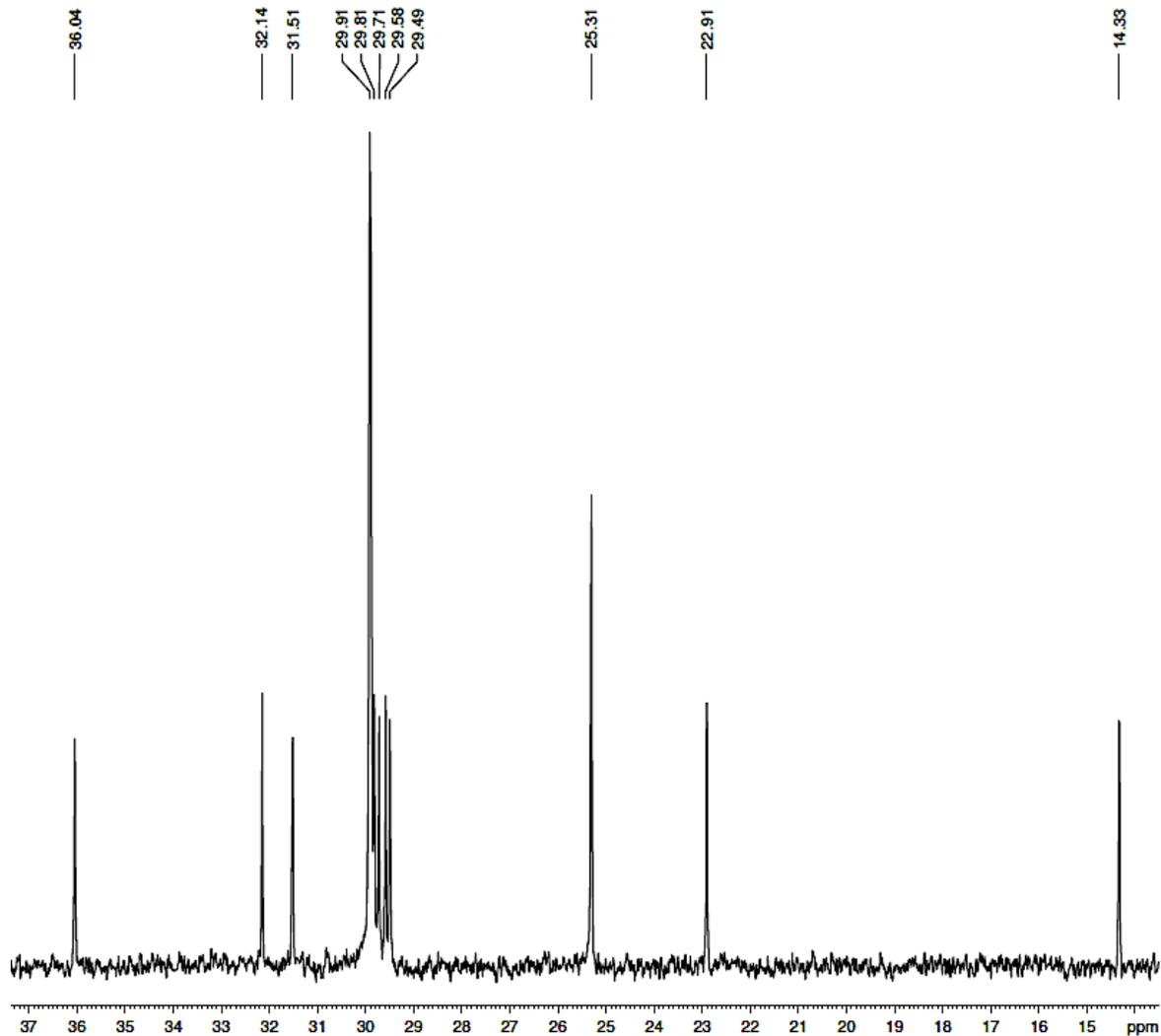
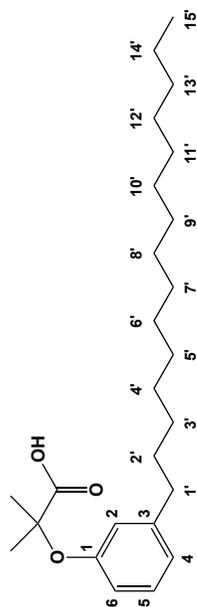
----- CHANNEL f1 -----
NUC1      13C
P1        11.50 usec
PL1       3.00 dB
SFO1     75.4752950 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2  waltz16
NUC2      1H
PCPD2    80.00 usec
PL2       3.00 dB
PL12     19.48 dB
PL13     19.48 dB
SFO2    300.1312000 MHz

F2 - Processing parameters
SI        65536
SF       75.4677353 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        1.00 Hz
GB        0
PC        1.40
    
```

ANEXO 28 – Expansão do Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) Ácido 2-Metil-2-(3-pentadecilfenóxi)propanóico (LDT409, 17)

LDT 409 (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [$^{13}\text{C}/\text{CDCl}_3/303\text{K}$] Operador Herbert 20.03.2018



```

Current Data Parameters
NAME          LDT 409
EXPNO        2
PROCNO       1

F2 - Acquisition Parameters
Date_        20180320
Time         17.27
INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm Dual 13C/
PULPROG      zgpg30
TD           32768
SOLVENT      CDCl3
NS           512
DS           0
SWE          17985.611 Hz
FIDRES       0.548877 Hz
AQ           0.9110004 sec
RG           32768
EW           27.800 usec
DE           10.00 usec
TE           300.0 K
D1           1.00000000 sec
d11          0.03000000 sec
DELTA        0.89999998 sec
TD0          1

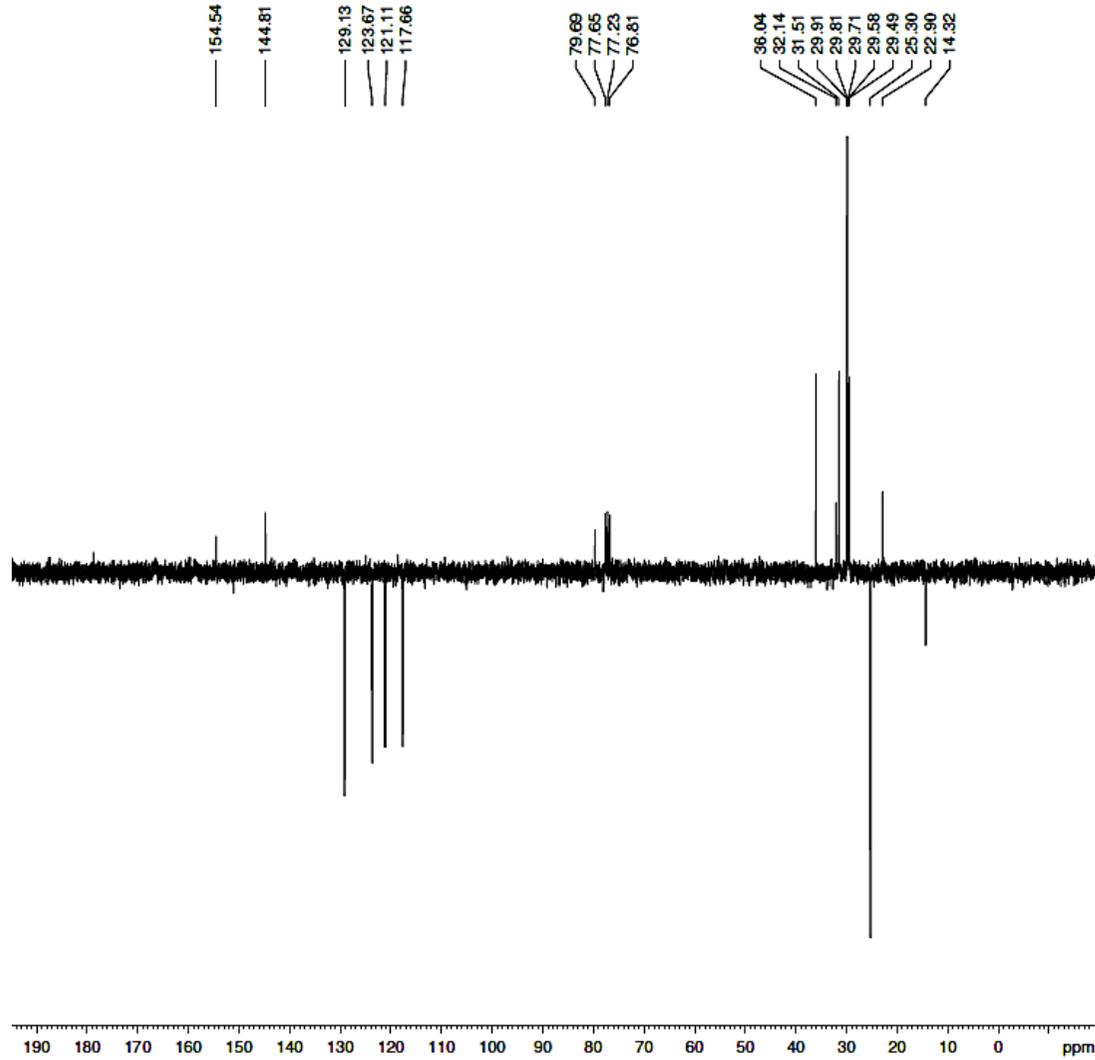
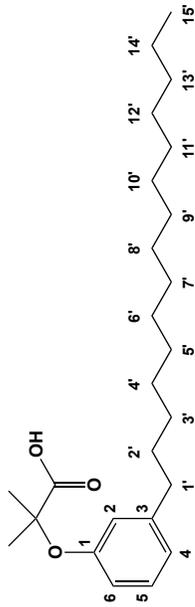
----- CHANNEL f1 -----
NUC1         13C
P1           11.50 usec
PL1          3.00 dB
SFO1         75.4752950 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2      walzr16
NUC2         1H
PCPD2        80.00 usec
PL2          3.00 dB
PL12         19.48 dB
PL13         19.48 dB
SFO2         300.1312000 MHz

F2 - Processing parameters
SI           65536
SF           75.4677353 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           1.00 Hz
GB           0
PC           1.40
  
```

**ANEXO 29 – Espectro de RMN de ¹³C_APT (75 MHz, CDCl₃)
Ácido 2-Metil-2-(3-pentadecilfenóxi)propanóico (LDT409, 17)**

LDT 409 (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [APT/CDCl₃/303K] Operador Herbert 20.03.2018



```

Current Data Parameters
NAME          LDT 409
EXPNO        3
PROCNO       1

F2 - Acquisition Parameters
Date_        20180320
Time         17.44
INSTRUM      spect
PROBRD       5 mm Dual 13C/
PULPROG      1pocd
TD           32768
SOLVENT      CDCl3
NS           512
DS           0
SWH          17985.611 Hz
FIDRES       0.548877 Hz
AQ           0.9110004 sec
RG           32768
DW           27.800 usec
DE           10.00 usec
TE           300.0 K
CNST12       145.0000000
CNST11       1.0000000
D1           1.0000000 sec
d20          0.0068955 sec
DELTA        0.0001464 sec
TD0          1

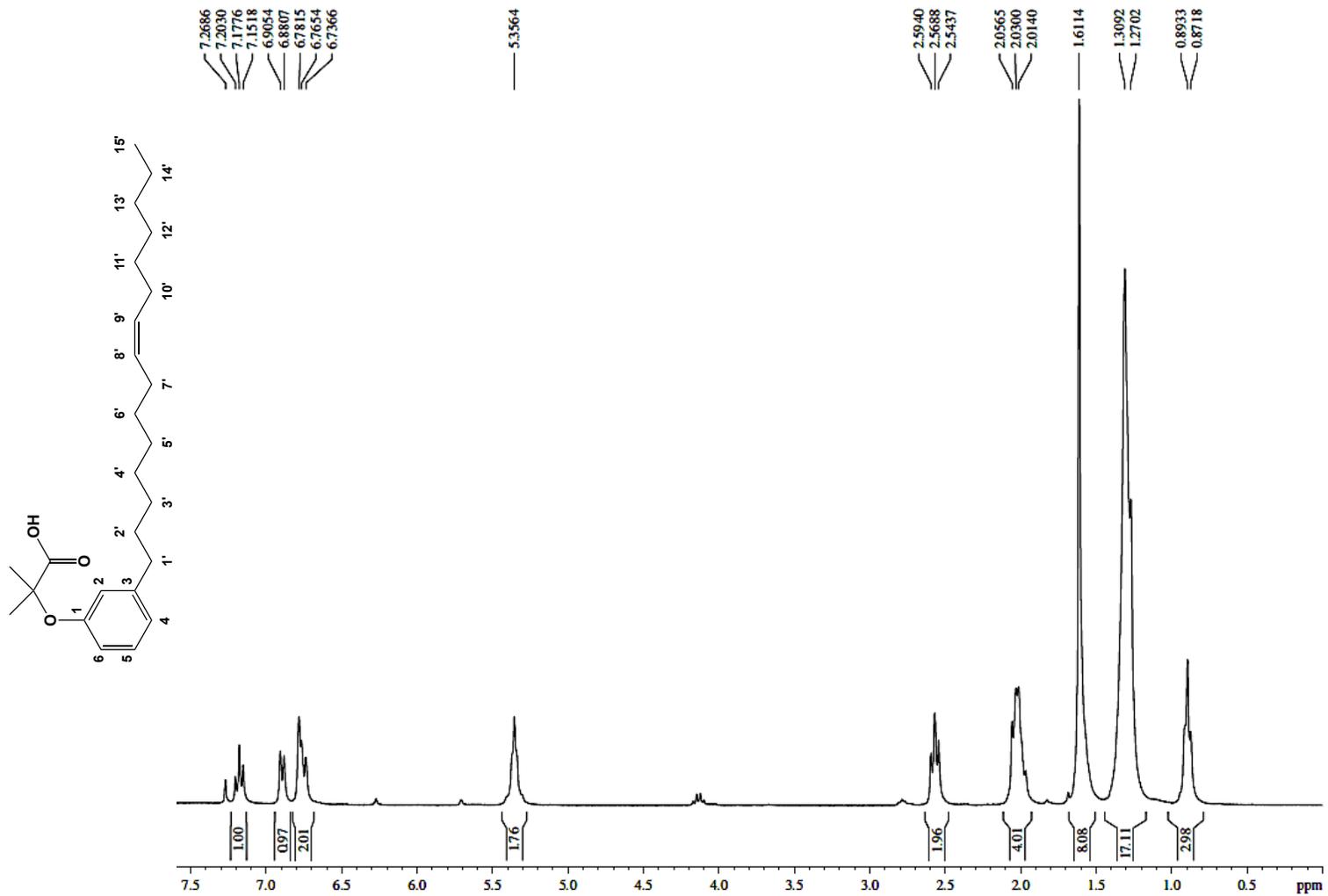
----- CHANNEL f1 -----
NUC1         13C
P1           11.50 usec
P2           23.00 usec
PL1          3.00 dB
SFO1         75.4752950 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2      waltz16
NUC2         1H
PCPD2        80.00 usec
PL2          3.00 dB
PL12         19.48 dB
SFO2         300.1312000 MHz

F2 - Processing parameters
SI           65536
SF           75.4677353 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           1.00 Hz
GB           0
PC           1.40
    
```

ANEXO 30 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)
Ácido 2-metil-2-(3-((8Z)-pentadec-8-en-1-il)fenóxi)propanóico (LDT540A, 18)

LDT 540A (LUIZ ROBERTO FERREIRA - CIB) (CDCl₃ 300K) Operado: 18/04/2018



Current Data Parameters
NAME LDT 540A
EXPNO 1
PROCNO 1

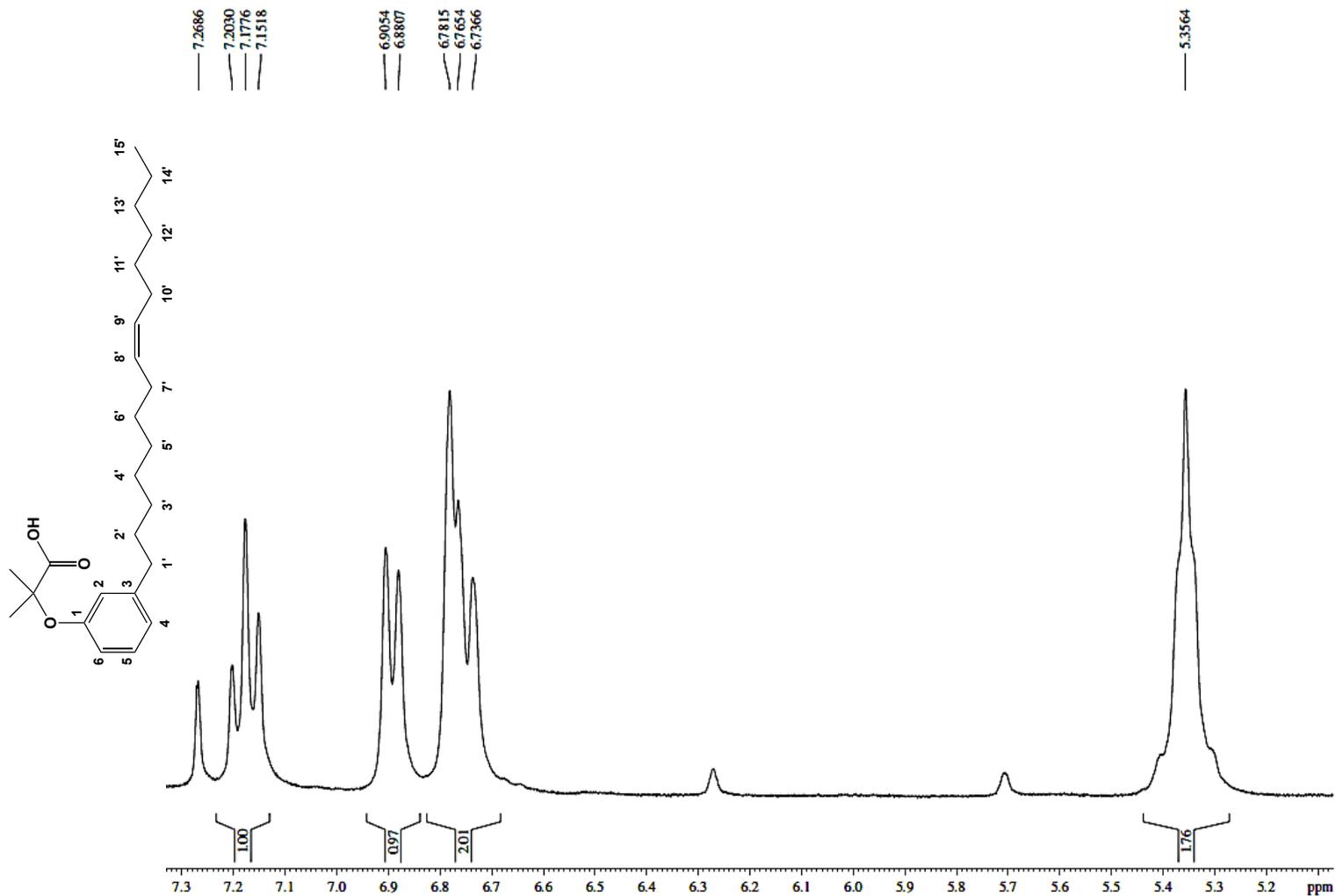
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20180423
Time 9:05
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13C/
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 8
DS 0
SWH 7183.908 Hz
FIDRES 0.109618 Hz
AQ 4.561356 sec
RG 12.7
DW 69.600 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 ====
NUC1 1H
P1 10.25 usec
PL1 3.00 dB
SFO1 300.1324010 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300126 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

**ANEXO 31 – Expansão do Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)
 Ácido 2-metil-2-(3-((8Z)-pentadec-8-en-1-il)fenóxi)propanóico (LDT540A, 18)**

LDT 540A (LUIZ ROMERO / FERNANDA - UNB) [17/03/2018] Operado: 18/04/2018



Current Data Parameters
 NAME LDT 540A
 EXPNO 1
 PROCNO 1

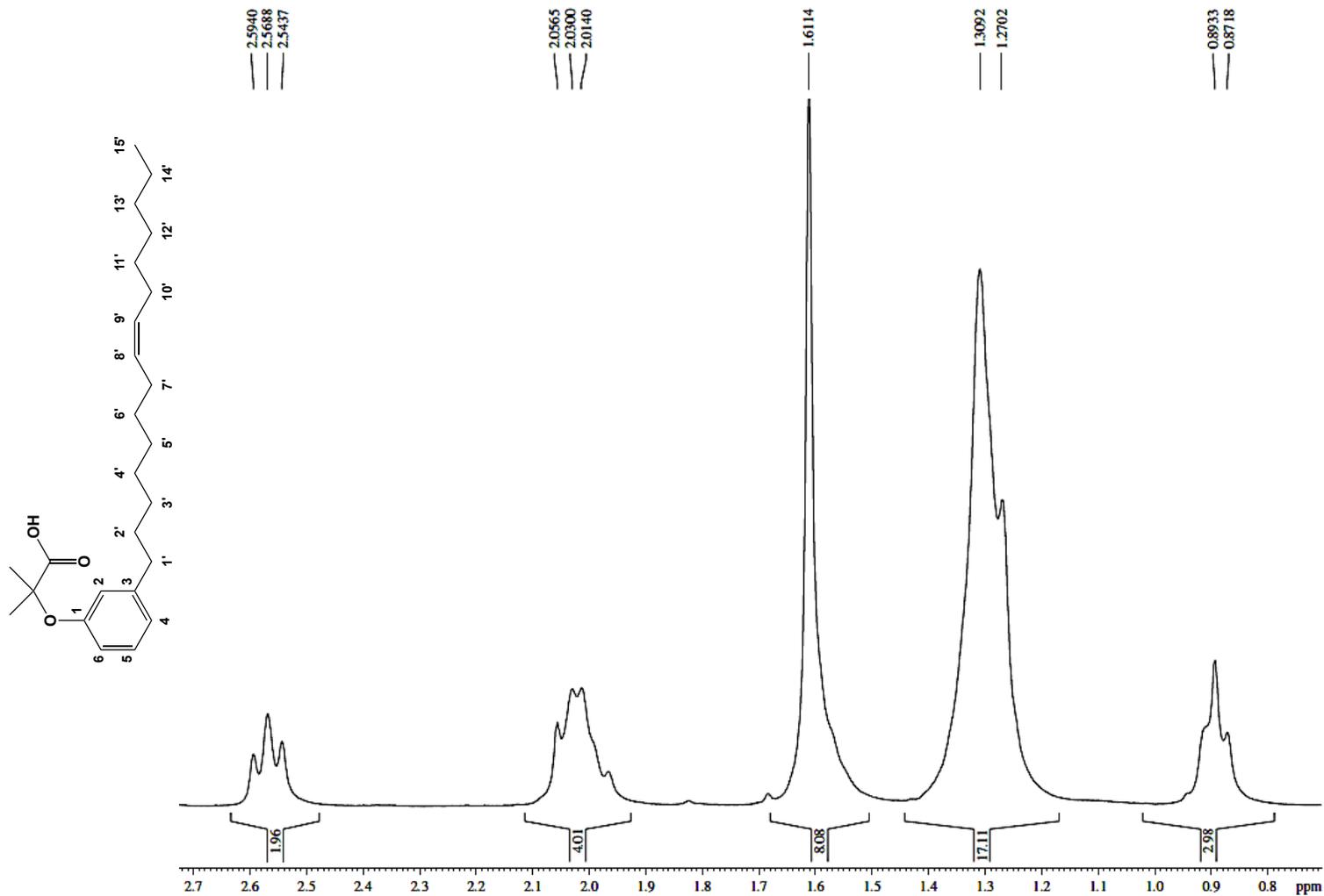
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20180423
 Time 9.05
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Dual 13C/
 PULPROG zg
 TD 65536
 SOLVENT CDCl_3
 NS 8
 DS 0
 SWH 7183.908 Hz
 FIDRES 0.109618 Hz
 AQ 4.5613556 sec
 RG 12.7
 DW 69.600 usec
 DE 10.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.0000000 sec
 TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 ^1H
 P1 10.25 usec
 PL1 3.00 dB
 SFO1 300.1324010 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 300.1300126 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

**ANEXO 32 – Expansão do Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)
 Ácido 2-metil-2-(3-((8Z)-pentadec-8-en-1-il)fenóxi)propanóico (LDT540A, 18)**

LDT 540A (LUIZ ROMERO / FERNANDA - SIB) / PRODCL335K / Operado / 11/01/2016



Current Data Parameters
 NAME LDT 540A
 EXPNO 1
 PROCNO 1

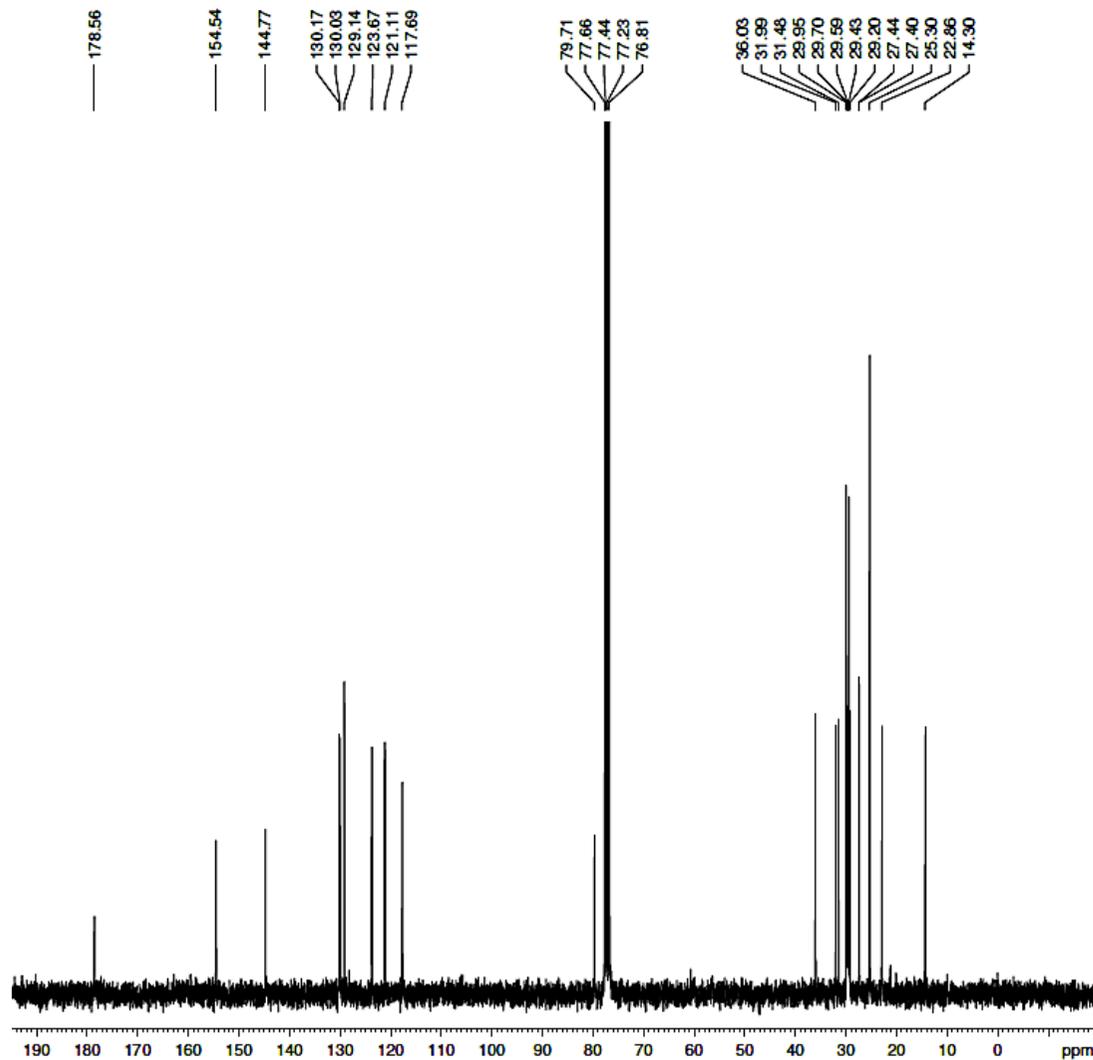
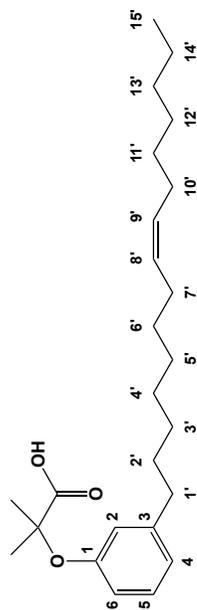
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20180423
 Time 9:05
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Dual 13C/
 PULPROG zg
 TD 65536
 SOLVENT CDCl_3
 NS 8
 DS 0
 SWH 7183.908 Hz
 FIDRES 0.109618 Hz
 AQ 4.5613556 sec
 RG 12.7
 DW 69.600 usec
 DE 10.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.0000000 sec
 TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 ^1H
 P1 10.25 usec
 PL1 3.00 dB
 SFO1 300.1324010 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 300.1300126 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

ANEXO 33 – Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)
Ácido 2-metil-2-(3-((8Z)-pentadec-8-en-1-il)fenóxi)propanóico (LDT540A, 18)

LDT 5401A (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [¹³C/CDCl₃/303K] Operador Herbert 23.04.2018



```

Current Data Parameters
NAME      LDT 5401A
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180423
Time     9.39
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Dual 13C/
PULPROG  zgpg30
ID       32768
SOLVENT  CDCl3
NS       1024
DS       0
SWH      17985.611 Hz
FIDRES   0.548877 Hz
AQ       0.9110004 sec
RG       32768
DW       27.800 usec
DE       10.00 usec
TE       300.0 K
D1       1.00000000 sec
d11      0.03000000 sec
DELTA    0.89999998 sec
TD       1

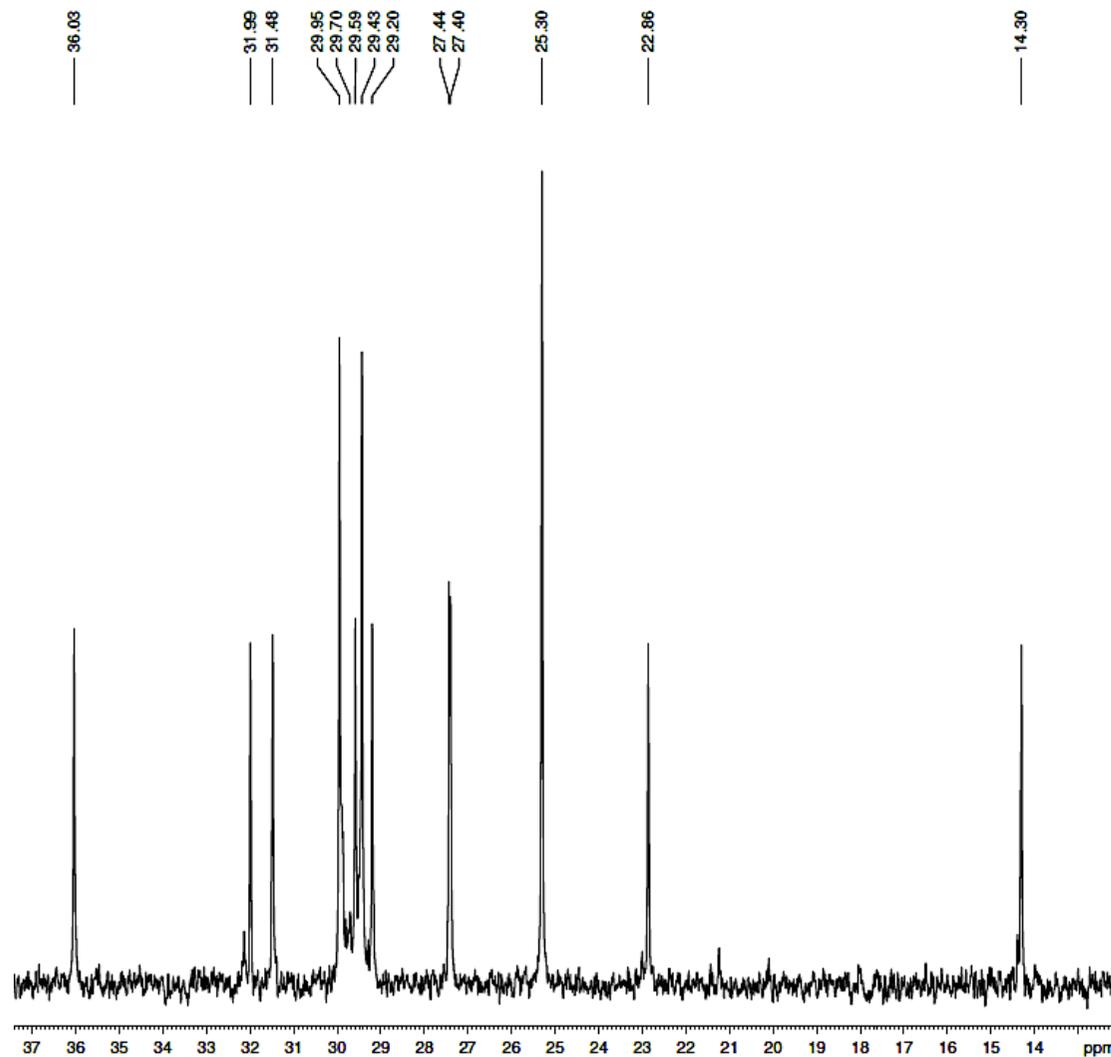
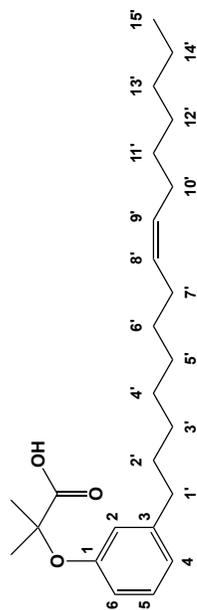
----- CHANNEL f1 -----
NUC1     13C
P1       11.50 usec
PL1      3.00 dB
SFO1     75.4752950 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2  waltz16
NUC2     1H
PCPD2    80.00 usec
PL2      3.00 dB
PL12     19.48 dB
PL13     19.48 dB
SFO2     300.1312000 MHz

F2 - Processing parameters
SI       65536
SF       75.4677351 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       1.00 Hz
GB       0
PC       1.40
    
```

**ANEXO 34 – Expansão do Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)
 Ácido 2-metil-2-(3-((8Z)-pentadec-8-en-1-il)fenóxi)propanóico (LDT540A, 18)**

LDT 540iA (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [$^{13}\text{C}/\text{CDCl}_3/303\text{K}$] Operador Herbert 23.04.2018



```

Current Data Parameters
NAME      LDT 540iA
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180423
Time     9.39
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Dual 13C/
PULPROG  zgpg30
TD        32768
SOLVENT  CDCl3
NS        1024
DS        0
SWH       17985.611 Hz
FIDRES    0.548877 Hz
AQ        0.3110004 sec
RG        32768
DM        27.800 usec
DE        10.00 usec
TE        300.0 K
D1        1.00000000 sec
d11       0.03000000 sec
DELTA     0.89999998 sec
TDO       1

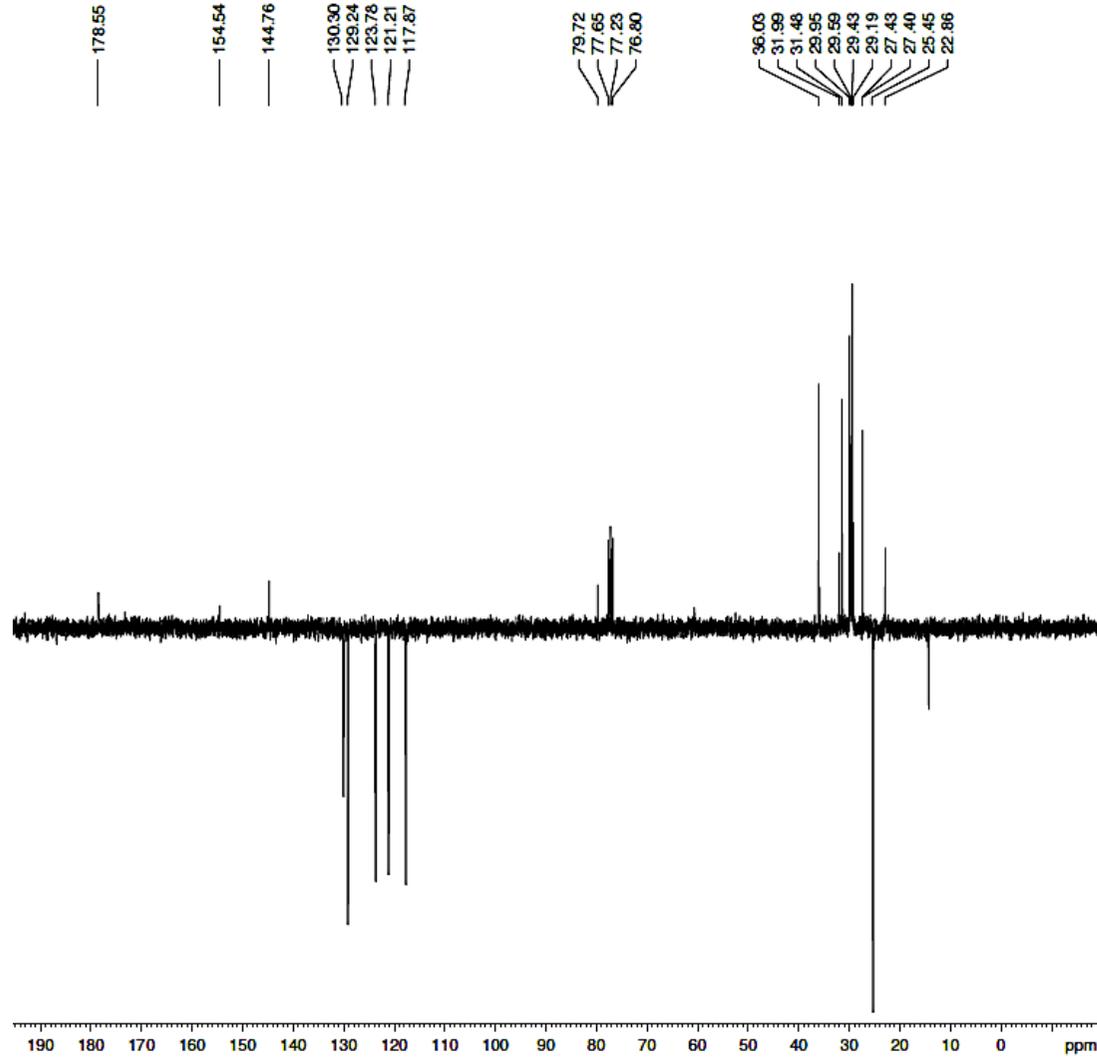
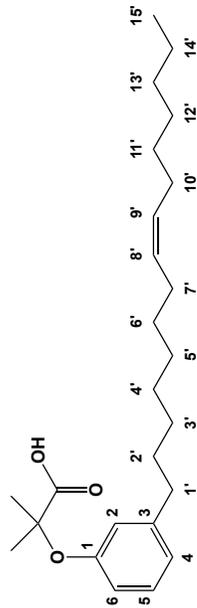
----- CHANNEL f1 -----
NUC1      13C
P1        11.50 usec
PL1       3.00 dB
SFO1      75.4752950 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2   waltz16
NUC2      1H
PCPD2     80.00 usec
PL2       3.00 dB
PL12      19.48 dB
PL13      19.48 dB
SFO2      300.1312000 MHz

F2 - Processing parameters
SI         65536
SF         75.4677351 MHz
WFM       EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40
    
```

**ANEXO 35 – Espectro de RMN de ¹³C_APT (75 MHz, CDCl₃)
Ácido 2-metil-2-(3-((8Z)-pentadec-8-en-1-il)fenóxi)propanóico (LDT540A, 18)**

LDT 540A (LUIZ ROMEIRO / FERNANDA – UnB) [APT/CDCl₃/303K] Operador Herbert 23.04.2018



```

Current Data Parameters
NAME          LDT 540A
EXPNO        2
PROCNO       1

F2 - Acquisition Parameters
Date_        20180423
Time         10.13
INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm Dual 13C/
PULPROG      zgpg30
ID           32768
SOLVENT      CDCl3
NS           1024
DS           0
SWH          17985.611 Hz
FIDRES       0.548877 Hz
AQ           0.911004 sec
RG           32768
DW           27.800 usec
DE           10.00 usec
TE           300.0 K
CNST2        145.0000000
CNST11        1.0000000
D1            1.0000000 sec
d20           0.00689655 sec
DELTA        0.00001464 sec
TD0           1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1          13C
P1            11.50 usec
p2            23.00 usec
PL1           3.00 dB
SFO1          75.4752950 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2       waltz16
NUC2          13C
PCPD2         80.00 usec
PL2           3.00 dB
PL12          19.48 dB
SFO2          300.1312000 MHz

F2 - Processing parameters
SI            65536
SF            75.4677351 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            1.00 Hz
GB            0
PC            1.40
    
```



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 10 de abril de 2019.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **“AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR IN VITRO DOS DERIVADOS LDT409 E LDT540A EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS INFECTADOS COM PLASMODIUM BERGHEI ANKA.”** Protocolo n.º 84/2018, sob responsabilidade da Professor Luiz Antônio Soares Romeiro foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Mus musculus (2 machos)*. A presente aprovação é válida pelo período de: 15/12/2018 a 10/02/2019.



Prof. Dr. Cássio José da Silva
Coordenador da CEUA – UnB

